



HAL
open science

Étude des effets de la subtilisine A, seule ou en combinaison avec des antibiotiques, sur des biofilms de *Staphylococcus pseudintermedius*

Paul Payrastre

► **To cite this version:**

Paul Payrastre. Étude des effets de la subtilisine A, seule ou en combinaison avec des antibiotiques, sur des biofilms de *Staphylococcus pseudintermedius*. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03772349

HAL Id: dumas-03772349

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03772349v1>

Submitted on 12 Sep 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2022 THESE : 2022–TOU 3 – 4016

ETUDE DES EFFETS DE LA SUBTILISINE A, SEULE OU EN COMBINAISON AVEC DES ANTIBIOTIQUES, SUR DES BIOFILMS DE STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS

THESE pour obtenir le titre de

DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement devant
l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

PAYRASTRE Paul

Directrice de thèse : Mme Aude FERRAN

JURY

PRESIDENTE :

Mme Peggy GANDIA

Professeure à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURES :

Mme Aude FERRAN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Marie-Christine CADIERGUES

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE
--

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE
--

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*

Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*

M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*

M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*

Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*

M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*

M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*

M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*

Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*

Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*

Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*

Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*

Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*

Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*

Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*

M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*

M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

Remerciements

A Madame la Professeure Peggy GANDIA

Présidente de mon jury de thèse,

Professeure des Universités et praticienne hospitalier au CHU de Toulouse

Pharmacocinétique et toxicologie clinique

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Hommages respectueux.

A Madame la Docteur Aude FERRAN

Directrice de ces travaux de thèse,

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie - Thérapeutique

Pour votre disponibilité, votre gentillesse et tout le temps consacré à ce travail. Toute ma gratitude.

A Madame la Professeure Marie-Christine CADIERGUES

Deuxième assesseure,

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Spécialiste européenne en dermatologie

Qui m'a fait l'honneur d'accepter le rôle d'assesseure de cette thèse. Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Alain Bousquet-Melou

Directeur de l'unité INTHERES,

Pour m'avoir accueilli dans son unité et avoir pris le temps de m'aiguiller dans mes choix

A l'ensemble des membres de l'unité INTHERES de l'INRAE ENVT

En particulier, à **Ophélie Gourbeyre**

Pour l'accueil chaleureux et les conseils avisés fournis et surtout pour toute la bienveillance dont vous avez fait preuve.

Table des matières

Liste des figures.....	11
Liste des tableaux.....	13
Liste des abréviations.....	14
I. INTRODUCTION	16
A. Les pyodermites canines	17
1. Définition et caractérisation	17
2. Les pyodermites superficielles	17
3. Les pyodermites profondes	18
4. Traitements antibiotiques.....	19
B. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	20
1. Caractéristiques.....	20
2. Les facteurs de virulence	21
3. Résistance aux antibiotiques.....	21
a) Les MRSP	21
b) Les MSSP	22
4. Pouvoir zoonotique	22
C. Les biofilms bactériens	23
1. Caractérisation	23
2. Etapes de formation	23
3. Importance et mécanismes de résistance des biofilms.....	25
4. Méthodes de lutte contre les biofilms.....	27
a) Lutte prophylactique	27
b) Destruction de la matrice extracellulaire.....	27
D. Objectifs de la thèse	29
II. MATERIELS ET METHODES	30
A. Souches utilisées	30
B. Molécules utilisées.....	30
1. Céphalexine.....	30
2. Marbofloxacin	30
3. Subtilisine A.....	30
C. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	31
D. Formation du biofilm.....	31
E. Exposition aux différentes molécules.....	32

F.	Quantification de la biomasse par le cristal violet	33
1.	Intérêt du cristal violet	33
2.	Méthode	33
G.	Quantification de l'activité métabolique de la résazurine	33
1.	Intérêt de la résazurine.....	33
2.	Méthode	34
H.	Analyses statistiques	34
III.	RESULTATS	35
A.	Détermination des CMI	35
1.	Céphalexine.....	35
2.	Marbofloxacin	35
3.	Subtilisine A.....	36
B.	Effet des molécules sur la biomasse des biofilms.....	37
1.	Subtilisine A.....	37
2.	Antibiotiques.....	38
3.	Co-exposition à la subtilisine A et à un antibiotique	39
a)	Subtilisine A et céphalexine	39
b)	Subtilisine A et marbofloxacin.....	40
C.	Effet sur l'activité métabolique.....	42
1.	Subtilisine A.....	42
2.	Antibiotiques.....	43
3.	Co-exposition à la subtilisine A et à un antibiotique	44
a)	Subtilisine A et céphalexine	44
b)	Subtilisine A et marbofloxacin.....	45
IV.	DISCUSSION.....	47
A.	Résultats de la CMI de Subtilisine A	47
B.	Efficacité des molécules testées	48
1.	Effets de la subtilisine A seule.....	49
2.	Effets des antibiotiques seuls.....	50
3.	Effets de l'association de la subtilisine A et d'un antibiotique	51
C.	Limites de l'étude.....	52
1.	Type de biofilms exposés aux molécules	52
2.	Sélection des concentrations testées	52
3.	Sélection des indicateurs (biomasse et activité métabolique)	53
D.	Perspectives.....	53

1. Evaluation des effets sur la survie des bactéries.....	53
2. Evaluation de l'effet de la souche bactérienne.....	54
3. Evaluation d'expositions répétées à la subtilisine A.....	54
4. Possibilité d'une utilisation clinique	54
V. CONCLUSION	56
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	59
VII. ANNEXES	65

Liste des figures

Figure 1 : Image d'une pyodermite superficielle. Présence de larges pustules et de papules érythémateuses [7]	17
Figure 2 : Image d'une pyodermite profonde. Zone alopecique avec lichénification de la peau et ulcère central [7].	18
Figure 3 : Taux approximatifs de portage de <i>S. pseudintermedius</i> par sites chez le chien [10].	20
Figure 4 : Activité métabolique à l'intérieur d'un biofilm [17].	24
Figure 5 : Représentation schématique des stades de formation d'un biofilm [24].	25
Figure 6 : Les agents de dispersion de biofilm et leurs mécanismes [40].	28
Figure 7 : Représentation schématique d'une plaque après ensemencement.	31
Figure 8 : Représentation schématique d'une plaque après ajout des molécules.	32
Figure 9 : Schématisation de la transformation de la résazurine en résorufine.	33
Figure 10 : Croissance bactérienne observée en fonction de la concentration en subtilisine A.	36
Figure 11 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL) sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de <i>S. pseudintermedius</i>	37
Figure 12 : Impact d'une exposition de 24h à la céphalexine (50 µg/mL) ou à la marbofloxacin (5 µg/mL) sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de <i>S. pseudintermedius</i>	38
Figure 13 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la céphalexine (50 µg/mL) ou à l'association des deux sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de <i>S. pseudintermedius</i>	39
Figure 14 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la marbofloxacin (5 µg/mL) ou à l'association des deux sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de <i>S. pseudintermedius</i>	40
Figure 15 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL) sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de <i>S. pseudintermedius</i>	42

Figure 16 : Impact d'une exposition de 24h à la céphalexine (50 µg/mL) ou à la marbofloxacin (5 µg/mL) sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*.....43

Figure 17 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la céphalexine (50 µg/mL) ou à la combinaison des deux sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*.....44

Figure 18 : Impact d'une exposition à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la marbofloxacin (5 µg/mL) ou à la combinaison des deux sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*.....45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des souches utilisées selon leur résistance à la méthicilline.	30
Tableau 2 : Valeur de la CMI de céphalexine la plus fréquemment obtenue sur les 5 souches de <i>S. pseudintermedius</i>	35
Tableau 3 : Valeur de la CMI de marbofloxacin la plus fréquemment obtenue en fonction des souches utilisées.	35
Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'exposition aux différentes molécules sur la biomasse des biofilms, comparativement au témoin non exposé.	48
Tableau 5 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'exposition aux différentes molécules sur l'activité métabolique des biofilms, comparativement au témoin non exposé.	49

Liste des abréviations

MRSP : Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*

MSSP : Methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius*

PBP : Penicillin binding protein

AMM : autorisation de mise sur le marché

EPS : Extracellular polymeric substances

ADN : Acide désoxyribonucléique

RESAPATH : Réseau de surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries d'origine animale en France

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

CMI : Concentration minimale inhibitrice

MHA : Mueller Hinton Agar

TSB : Tryptic soy broth

DO₆₀₀ : Densité optique à 600nm

PBS : Phosphate-buffered saline

UFC : unité formant colonie

I. INTRODUCTION

Aujourd'hui, la résistance bactérienne aux antibiotiques, ou antibiorésistance, pose un problème majeur en santé publique au niveau mondial. Les conséquences semblent de plus en plus préoccupantes en santé humaine et animale et il est urgent de rechercher des solutions permettant de préserver l'efficacité des antibiotiques existants et de limiter la dissémination des résistances dans l'environnement [1, 2].

Pour prévenir efficacement l'émergence et la propagation des gènes de résistance et des bactéries résistantes chez l'homme et l'animal, différentes mesures ont été identifiées dans la feuille de route interministérielle pour la maîtrise de la résistance aux antibiotiques, lancée en France en 2016 [3]. Il s'agit notamment de programmes de surveillance de l'utilisation des antibiotiques chez l'homme et l'animal, de l'encadrement de la consommation d'antibiotiques et de la prévention des infections. La communication des informations sur la résistance aux antibiotiques, au grand public et au personnel de santé, est aussi mise en avant afin de permettre un engagement collectif.

Compte-tenu de l'importance et de l'interdépendance des dimensions humaines, animales et environnementales de l'antibiorésistance, il semble évident que médecine humaine et vétérinaire ne peuvent être dissociées dans cet objectif et qu'une vision dite « one health » doit être adoptée [2, 4, 5]. Il est aujourd'hui important de trouver des traitements alternatifs ou complémentaires aux antibiotiques afin de prévenir et de lutter contre ces résistances et c'est dans ce cadre que mes travaux de thèse ont été réalisés.

Ces travaux concernent plus particulièrement la formation des biofilms, l'une des causes de la résistance aux antibiotiques, et sont focalisés sur l'utilisation de la subtilisine A associée ou non à un antibiotique, sur des biofilms de *Staphylococcus pseudintermedius*, la bactérie la plus fréquemment isolée lors de pyodermite canine.

A. Les pyodermites canines

1. Définition et caractérisation

Les pyodermites sont des infections bactériennes de la peau entraînant la production de pus. C'est l'un des motifs de consultation les plus fréquents en dermatologie vétérinaire et l'une des principales causes de l'utilisation d'antibiotiques dans la pratique vétérinaire des animaux de compagnie [6].

Les pyodermites sont classées en deux catégories, les pyodermites superficielles et les pyodermites profondes.

2. Les pyodermites superficielles

Les pyodermites superficielles sont définies par une colonisation bactérienne des follicules pileux et de l'épiderme adjacent. Elles sont majoritairement secondaires à un facteur déclenchant (infestation parasitaire, allergie, maladie endocrinienne, piqure, blessure...). Elles sont fréquentes chez le chien mais rares chez le chat [7].

Les lésions pouvant être observées sont des papules (petites surélévations cutanées, fermes et bien circonscrites), des pustules (petites surélévations cutanées, fluctuantes, remplies de pus), de l'érythème circonscrit (rougeur de la peau d'origine congestive) et de l'alopecie (zone de diminution de densité pileuse) (figure 1).



Figure 1 : Image d'une pyodermite superficielle. Présence de larges pustules et de papules érythémateuses [7]

La prise en charge recommandée comprend [6, 7]:

- L'identification de la cause sous-jacente
- Le traitement antibiotique systémique d'une durée minimale de 3 à 4 semaines. Le traitement doit être poursuivi une semaine après la disparition des symptômes pour éviter les rechutes.
- Le lavage concomitant de l'animal avec un shampoing antiseptique, contenant par exemple de la chlorhexidine, tous les 2 à 7 jours.

Dès lors que la cause sous-jacente est correctement identifiée et prise en charge par un traitement adéquat, le pronostic est bon. Une durée insuffisante du traitement antibiotique peut causer la récurrence des lésions dans les 7 jours. En l'absence de réponse au traitement une résistance à l'antibiotique ou une maladie de peau non bactérienne doivent être suspectées [7].

3. Les pyodermites profondes

Les pyodermites profondes sont définies par la colonisation plus large et plus profonde des tissus avec la formation de furoncles (extension des lésions folliculaires aux couches plus profondes du derme), voire de cellulite (coalescence de plusieurs furoncles). Une cause sous-jacente est, là aussi, souvent imputable. De même que pour les pyodermites superficielles les chiens sont plus fréquemment touchés que les chats [7].

Les lésions pouvant être observées sont des papules de taille importante, de la cellulite et une alopecie plus généralisée. Du contenu séro-sanguinolent à purulent peut s'écouler des lésions (figure 2).



Figure 2 : Image d'une pyodermite profonde. Zone alopecique avec lichénification de la peau et ulcère central [7].

La prise en charge est similaire à celle d'une pyodermite superficielle, mais le traitement antibiotique systémique doit être administré sur une plus longue durée, minimum 6 à 8 semaines, et poursuivi 2 semaines après la disparition des lésions. De plus, la zone lésée doit être lavée tous les jours avec un shampoing antiseptique afin de retirer les croûtes et l'exsudat. Comme pour les pyodermes superficielles le pronostic est bon mais dans les cas sévères ou chroniques de la fibrose, des cicatrices ou des zones d'alopecies peuvent devenir permanentes [7].

4. Traitements antibiotiques

Pour les pyodermes superficielles et profondes, l'antibiothérapie peut être mise en place de manière probabiliste en ciblant *S. pseudintermedius*, qui est le pathogène le plus fréquemment impliqué dans cette pathologie. Pour cela, il y a plusieurs antibiotiques recommandés en première intention, au choix [6,7] :

- Des antibiotiques de la classe des Beta-lactamines, agissant en inhibant la synthèse de paroi bactérienne :
 - o Des céphalosporines de première génération, telles que la céphalexine à 30 mg/kg toutes les 12 heures.
 - o De l'amoxicilline, une pénicilline de groupe A, associée à l'acide clavulanique à 22 mg/kg toutes les 12 heures.
- L'association de triméthoprim et de sulfadiazine de 22 à 30 mg/kg toutes les 12 heures, inhibant la synthèse d'acide nucléique chez les bactéries.

En cas d'échecs ou de récurrence les antibiotiques recommandés en seconde intention sont [6, 7] :

- Des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique bactérienne dont :
 - o Le chloramphénicol de 30 à 50 mg/kg toutes les 8 heures.
 - o La clindamycine à 11 mg/kg toutes les 12 heures, qui appartient à la famille des lincosamides.
- Des quinolones de 3^{ème} génération, qui interfèrent avec la réplication de l'ADN entraînant une lyse bactérienne, telles que la marbofloxacine de 2.75 à 5.5 mg/kg toutes les 12 à 24 heures.

Cependant, en France les quinolones de 3^{ème} génération sont des antibiotiques dits d'importance critique et ne peuvent être utilisés qu'après réalisation d'un antibiogramme mettant en évidence la sensibilité de la souche testée spécifiquement à ces molécules.

Outre *Staphylococcus pseudintermedius*, qui est la bactérie la plus fréquemment isolée lors de pyoderme canine, de façon plus rare *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus canis* et *Pseudomonas aeruginosa* peuvent aussi être retrouvés [6, 7].

B. Staphylococcus pseudintermedius

1. Caractéristiques

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquistes et des agents pathogènes opportunistes importants du monde animal. Les *Staphylococcus* sont des coques à Gram positif qui sont classés selon deux grands types, ceux à coagulase positive qui, grâce à cette enzyme sont capables de transformer le fibrinogène en fibrine et les staphylocoques à coagulase négative. La plupart des *Staphylococcus* pathogènes en médecine vétérinaire, dont *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus pseudintermedius*, sont des staphylocoques à coagulase positive.

Staphylococcus pseudintermedius, est un agent commensal de la peau et des muqueuses des canidés, qui est aussi porté par les félidés, les mustélidés et les équidés, mais ces derniers ne sont pas considérés comme des hôtes naturels et sont moins fréquemment porteurs que les canidés.

La dénomination *S. intermedius* existant avant 2007 s'est avérée en réalité relative à 3 espèces différentes : *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* et *S. delphini*. Cependant, la quasi-totalité des souches présentes chez l'Homme, le chien et le chat a été ultérieurement identifiée comme *S. pseudintermedius*. Il est donc communément accepté de considérer qu'il s'agit de *S. pseudintermedius* lorsqu'il est mentionné *S. intermedius* chez ces espèces dans les documents antérieurs à 2007 [8, 9].

Chez le chien, les sites préférentiels de colonisations de *S. pseudintermedius* sont les muqueuses nasales et buccales ainsi que la région péri-anale (figure 3).

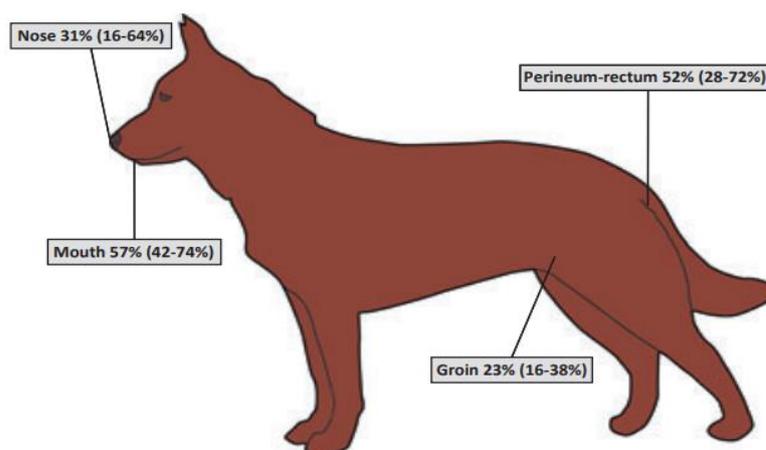


Figure 3 : Taux approximatifs de portage de *S. pseudintermedius* par sites chez le chien [10].

Les chiens représentent l'espèce la plus fréquemment infectée par *S. pseudintermedius*, qui est un agent pathogène opportuniste. En effet, *S. pseudintermedius* ne devient pathogène que lors de lésions de la barrière cutanée ou d'une diminution de la résistance de l'hôte (immunodépression, atopie, maladie intercurrente...). Il s'agit donc en général d'une infection non contagieuse à des chiens sains [10].

Bien que *S. pseudintermedius* soit un agent commensal, il reste le principal agent pathogène responsable de pyodermite chez le chien. Il est aussi fréquemment rencontré dans les otites et les surinfections de plaie. De par sa fréquence, il s'agit d'un agent pathogène majeur en santé animale [10].

2. Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence de *S. pseudintermedius* sont multiples : ils comprennent des enzymes (coagulases, protéases, thermonucleases) et des toxines (cytotoxines, exfoliative toxine et enterotoxines) mais leur connaissance reste encore limitée [10]. Les facteurs dépendant de l'hôte ont un rôle crucial dans sa pathogénicité. Ainsi, à titre d'exemple, l'adhésion de la bactérie est meilleure sur des cornéocytes de chiens atteints de dermatite atopique ou sur des cornéocytes localisés dans des zones inflammatoires que sur des cornéocytes de chiens sains [10, 11].

Il a été montré que les chiens atteints de dermatite atopique étaient davantage porteurs de *S. pseudintermedius* que les individus sains, en particulier en ce qui concerne le portage auriculaire. Les raisons exactes restent inconnues mais un dysfonctionnement de la barrière et de l'immunité cutanée, ainsi qu'une meilleure adhérence des bactéries sont suspectés [11].

3. Résistance aux antibiotiques

En ce qui concerne la sensibilité aux antibiotiques, les souches de *S. pseudintermedius* sont séparées en deux groupes : les souches dites résistantes à la méthicilline (Methicillin-Resistant *S. pseudintermedius* ou MRSP), qui possèdent le gène *mecA*, codant pour la protéine « pénicilline binding protéine » PBP qui les rend résistantes aux antibiotiques de la classe des bêta-lactamines, et les souches dites sensibles à la méthicilline (Methicillin-Susceptible *S. pseudintermedius* ou MSSP) qui ne possèdent pas ce gène [8].

a) Les MRSP

Le gène *mecA* des souches MRSP est localisé sur une « cassette chromosomique » qui peut héberger d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. Actuellement, chez les souches MRSP, il existe des résistances à presque toutes les molécules antibiotiques possédant une autorisation de mise sur le marché (AMM) vétérinaire (bêta-lactamines, quinolones, tétracyclines, lincosamides). Ces souches représentent donc un enjeu majeur pour la lutte antibactérienne en particulier en médecine vétérinaire [8, 12].

A titre d'exemple, une étude réalisée en France en 2014 [12] a montré que sur 243 souches de *S. pseudintermedius* isolées 41, soit 16.9%, étaient des MRSP. Ces souches ont été isolées sur des chiens pris en charge dans une clinique vétérinaire de Paris. Il n'est pas précisé si ces chiens ont pu recevoir des traitements, dont des antibiotiques, avant l'isolement des différentes souches. Parmi les 41 souches isolées plus de 90% étaient multi-résistantes, c'est-à-dire résistantes à au moins 3 classes d'antibiotiques différentes, et présentaient quasi systématiquement une co-résistance à l'erythromycine (macrolide), la spiramycine (macrolide), la lincomycine (lincosamide), l'enrofloxacin (quinolone de 3^{ème} génération) et la kanamycine (aminoside). Plus de 70% des souches étaient également résistantes à la tobramycine (aminoside), la gentamicine (aminosides) et la tétracycline (tétracycline). La prévalence de la résistance au chloramphénicol de ces souches était de 22%.

Dans la littérature internationale, le pourcentage de chiens porteurs de MRSP est en général inférieur à celui rapporté ici, il varie entre 1.5% et 4.5% dans une population saine mais peut atteindre 7% chez des chiens ayant une maladie de peau active [13, 14].

b) Les MSSP

Malgré l'absence du gène *mecA*, les souches MSSP peuvent aussi présenter et acquérir des résistances contre de nombreux antibiotiques. L'étude citée précédemment [13] a montré que sur les 202 souches de MSSP isolées, 64,9% étaient résistantes à la pénicilline (bêta-lactamine), environ 25% étaient résistantes à la lincomycine (lincosamide) et au chloramphénicol et 30,7% étaient multi résistantes.

4. Pouvoir zoonotique

S. pseudintermedius possède de plus un pouvoir zoonotique ; même si les infections humaines restent rares, elles représentent un risque important lié à l'émergence des MRSP. Comme chez le chien, les cas d'infections chez l'Homme surviennent dans des cas particuliers (immunodéfiance, maladie intercurrente, morsure...) [13]. Une partie des infections chez l'Homme peut être consécutive à des contaminations iatrogènes liées à des endoscopies ou des opérations chirurgicales [13, 15]. Des cas d'endocardites, d'infections de plaies chirurgicales, de rhino sinusites et bactériémies ont notamment été recensés chez l'Homme [16].

La colonisation de la peau et des muqueuses chez l'Homme reste rare mais le portage transitoire est fréquent, en particulier chez les propriétaires de chien, suite à un contact direct ou indirect par l'environnement (la poussière pouvant notamment être vectrice de ces bactéries). Le pourcentage de propriétaires porteurs de MRSP serait d'environ 0.4%. Cependant, les propriétaires de chien atteints de maladies de peau actives pourraient être plus à risque, car comme indiqué précédemment, la prévalence de MRSP dans cette population est plus importante [13].

En plus de l'acquisition de gènes de résistances, l'un des facteurs qui permet à la fois un échappement aux traitements antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte, est la capacité de *S. pseudintermedius* à former des biofilms. Cette propriété spécifique fait l'objet de cette thèse.

C. Les biofilms bactériens

1. Caractérisation

Un biofilm bactérien correspond à un mode de vie des bactéries qui contribue à leur survie dans un milieu hostile. Le biofilm est décrit comme une communauté bactérienne structurée, adhérente à une surface et encapsulée dans une matrice extracellulaire. Les bactéries vivent en micro-colonies, séparées les unes des autres par des canaux de circulation de liquide, qui leur permettent l'accès à des nutriments et l'élimination de leurs déchets métaboliques. Ces bactéries sont capables de communiquer entre elles et leur nombre influe sur le fonctionnement et la structure du biofilm en agissant directement sur la transcription de gènes spécifiques [17].

De par un changement d'expression génique, les bactéries à l'intérieur du biofilm sont profondément différentes des bactéries planctoniques isolées et pouvant se déplacer librement à l'extérieur de ce dernier [17, 18].

La matrice extracellulaire (ou EPS pour Extracellular Polymeric Substances) est composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire.

Les exopolysaccharides forment de longs brins linéaires ou ramifiés qui se fixent aux surfaces cellulaires et s'étirent pour former de grands réseaux. Ils servent de trame pour l'adhésion d'autres glucides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides [19].

Les protéines extracellulaires constituent un autre composant majeur de la matrice extracellulaire. Certaines sont attachées aux surfaces cellulaires et aux polysaccharides pour aider à la formation et à la stabilisation du biofilm, d'autres sont des enzymes qui permettent de fournir les bactéries du biofilm en carbone et en énergie.

L'ADN extracellulaire provient en partie de cellules lysées, mais est aussi sécrété activement par les bactéries du biofilm. Il a un rôle essentiel dans l'adhésion du biofilm à une surface. En raison de sa charge négative, l'ADN extracellulaire est capable de chélater des cations métalliques et certains antibiotiques chargés positivement [19].

L'ensemble de ses molécules a donc un effet protecteur sur les bactéries contre les facteurs environnementaux délétères, y compris les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte [17, 20].

2. Etapes de formation

Les biofilms peuvent se former sur des surfaces biotiques et abiotiques. Leur formation nécessite plusieurs étapes :

- Un attachement réversible à la surface, grâce à des adhésines et des forces électrostatiques, puis la formation de micro colonies dans lesquelles les bactéries adhèrent entre elles.

A ce stade les bactéries ont la capacité de redevenir planctoniques.

Leur motilité diminue mais la production de la matrice extracellulaire facilite l'accès aux nutriments les captant.

- La phase suivante consiste en la croissance des colonies, coordonnée par un système dit de « quorum sensing » qui va notamment permettre le maintien d'une densité optimale de bactéries. En effet, quand la concentration des molécules « signal », produites par les bactéries à proximité, excède un certain seuil, la division bactérienne est inhibée [21].
- Puis une phase dite de colonisation ; à ce stade la disponibilité en nutriments va influencer la taille et la forme du biofilm. Le gradient de nutriments et d'oxygène dans le biofilm induit des variations du métabolisme et de l'activité cellulaire. Les bactéries localisées vers l'extérieur auront une activité et une croissance plus rapide que les bactéries localisées plus à l'intérieur du biofilm (figure 4). Parmi les cellules les moins actives certaines vont entrer en dormance. Les bactéries du biofilms atteignent alors un équilibre et parviennent à réguler leur métabolisme en fonction des changements survenant dans leur microenvironnement [11].

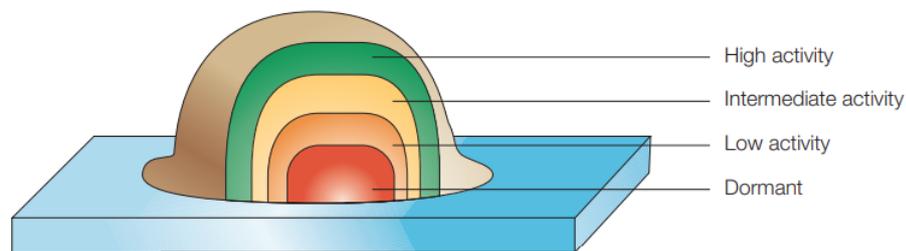


Figure 4 | **Metabolic activity in a biofilm microcolony.** Metabolic activity in a biofilm cell cluster is a function of depth within the biofilm and is influenced by nutrient transport. Cells at the edges of a microcolony at the bulk liquid interface are the most active. Cells deep within the microcolony can potentially remain dormant and provide a nucleus for regrowth following antibiotic treatment.

Figure 4 : Activité métabolique à l'intérieur d'un biofilm [17].

- Enfin, survient un stade de dispersion, au cours duquel des bactéries sont libérées dans l'environnement. Ces bactéries ne se détachent pas au hasard. Seules celles arrivées à un stade dit « final » pourront se détacher selon un processus actif. En effet, les bactéries au centre du biofilm se lysent libérant ainsi des nutriments accessibles aux bactéries qui vont être libérées. Ces dernières vont alors stopper l'expression de certains gènes essentiels à leur vie dans le biofilm (gènes permettant la production d'exopolysaccharides, des pilis, etc...) et vont de nouveau exprimer des gènes permettant la vie planctonique (permettant notamment la production de protéines chimiotactiques, de flagelle, etc...) [17, 22, 23].

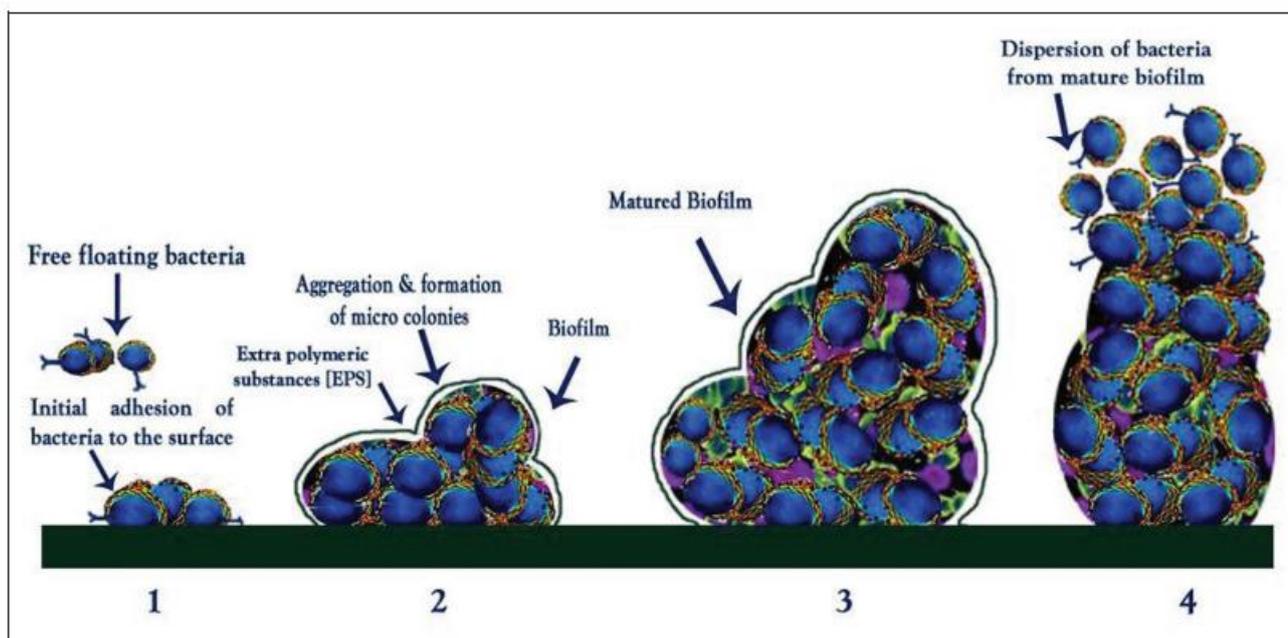


Figure 5 : Représentation schématique des stades de formation d'un biofilm [24].

En ce qui concerne les biofilms formés par *S. pseudintermedius*, une étude les a décrits grâce à l'analyse par microscopie confocale et électronique. Cette étude a montré qu'ils possèdent une forme de « champignon », avec plusieurs couches de micro colonies imbriquées dans une matrice extracellulaire dite « fibrillaire », dans laquelle les filaments d'EPS forment un réseau extensif qui s'étire à l'intérieur, entre les cellules et sur la surface d'adhésion [16].

3. Importance et mécanismes de résistance des biofilms

Les biofilms bactériens représentent un problème majeur en médecine. Ils seraient impliqués dans près de 80% des infections microbiennes chez l'homme [17]. De nombreuses maladies chroniques et récidivantes pourraient être liées à leur présence. De plus, le développement de biofilm sur le matériel biomédical notamment les sondes urinaires, les cathéters et le matériel d'ostéosynthèse est extrêmement fréquent et pourrait être responsable d'environ 70% des infections acquises à l'hôpital et être la cause de nombreux échecs thérapeutiques [17, 24, 25].

Le principal danger des biofilms est leur capacité à échapper à la fois au système immunitaire de l'hôte et aux traitements antimicrobiens pouvant être mis en place [20, 26].

En effet, les bactéries au sein de biofilms sont jusqu'à 500 fois plus résistantes aux antibiotiques que les planctoniques [26]. Même lors d'utilisation de biocides oxydants tels que l'eau de javel (hypochlorite de sodium), connus pour être parmi les agents antimicrobiens les

plus efficaces, la concentration requise est environ 600 fois plus élevée pour détruire un biofilm de *S. aureus* que pour tuer une population planctonique de la même espèce [27].

Cette capacité de résistance des biofilms s'explique par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la matrice extracellulaire exerce une action mécanique en diminuant la pénétration des molécules dans certaines zones du biofilm, mais aussi en fixant, repoussant ou réagissant à certaines molécules [17, 19].

De plus, la présence de bactéries « dormantes » aussi appelée « persisters », au sein des biofilms pourraient jouer un rôle central dans cette tolérance aux antibiotiques. Les persisters sont décrits comme possédant un phénotype différent des autres bactéries du biofilm et étant plus résistantes aux molécules antibactériennes que ces dernières. Ces bactéries ont une activité cellulaire diminuée et ne se répliquent pas. Or, la plupart des antibiotiques ciblent des processus actifs de la cellule que ce soit la réplication (sulfamides), la production de la paroi (beta-lactamines), ou l'expression de protéines (macrolides, tétracyclines, phénicolés). Les persisters sont donc insensibles ou beaucoup moins sensibles que les bactéries planctoniques à l'activité de ces antibiotiques [28].

Cependant, même des antibiotiques ayant des cibles conservées chez les persisters, ne parviennent pas toujours à éliminer la totalité des cellules du biofilm. Par exemple la daptomycine, qui a montré une efficacité contre les cellules dont le métabolisme a été inhibé, n'exercera une activité bactéricide sur des *S. aureus* dormant qu'à des concentrations très élevées (64 fois la concentration minimale inhibitrice) [28, 29].

De plus, comme évoqué précédemment, le biofilm est capable de re-disséminer des bactéries, précédemment protégées par le biofilm, dans la circulation ou les tissus environnant entraînant ainsi des rechutes, des échecs thérapeutiques et l'apparition de nouveaux foyers infectieux chez les patients [17, 18]. Les traitements antibiotiques sont donc souvent plus longs et répétés dans des cas d'infections par des bactéries capables de former des biofilms, entraînant un risque accru d'acquisition et de dissémination de facteurs de résistance aux antibiotiques [28, 30].

Enfin, même si la totalité des bactéries était éliminée, la matrice extracellulaire restante sur la surface pourrait faciliter l'adhésion de nouvelles bactéries de la même ou d'une nouvelle espèce [31].

Dans le cas de *S. pseudintermedius*, une étude récente montre que la plupart des antibiotiques, de première et de seconde intention, recommandés dans le traitement des pyodermites canines (dont l'amoxicilline, la céphalexine et la marbofloxacin) ont une efficacité antibactérienne limitée *in vitro* contre les biofilms de *S. pseudintermedius*. De plus, l'activité antimicrobienne des antibiotiques testés semble moindre chez *S. pseudintermedius* comparé à *S. aureus*, ce qui explique les difficultés cliniques à traiter les pyodermites canines, mais indique aussi qu'une infection chez l'homme pourrait être difficile à éradiquer [30].

S. pseudintermedius devrait donc être considérée comme un agent avec un potentiel zoonotique important capable de produire des biofilms, ce qui lui octroie une tolérance

importante face au système immunitaire et aux traitements antibactériens. Cela pouvant entraîner de surcroît une dissémination des gènes de résistances [16, 30].

Tout cela met en évidence la nécessité de lutter contre la formation de ce type de biofilm.

4. Méthodes de lutte contre les biofilms

Dans la lutte contre les biofilms, la première approche est l'utilisation d'antibiotiques par voie locale ou systémique. Cependant, leur efficacité requiert souvent une utilisation de fortes doses sur une longue durée et conduit parfois à des échecs ou des récives, voire même à l'émergence de résistances. La combinaison d'antibiotiques ayant des cibles différentes est utilisée dans la lutte contre les résistances bactériennes mais semble peu efficace pour éradiquer les bactéries ayant formé un biofilm [30, 32].

C'est pourquoi, plusieurs autres types de stratégies ont été développées pour lutter contre les biofilms.

a) Lutte prophylactique

La première possibilité est une lutte prophylactique ayant pour objectif d'interférer avec le développement du biofilm en ciblant des précurseurs de ce dernier, en bloquant l'attachement initial ou l'agrégation des bactéries entre elles, voire en augmentant les performances du système immunitaire du patient [33]. Par exemple, des cathéters avec un revêtement en nanostructure d'argent imprégné d'antibiotique ou d'antiseptique sont utilisés pour éviter l'adhérence et la colonisation par des bactéries [24, 34]. Ces méthodes sont particulièrement efficaces pour éviter le développement de biofilms sur du matériel médical. Cependant, ces méthodes ne parviennent pas à la destruction de biofilms déjà formés et ont donc peu d'effet pour traiter les infections cliniques [31].

b) Destruction de la matrice extracellulaire

La deuxième possibilité est la destruction mécanique ou chimique de la matrice extracellulaire, afin d'obtenir une meilleure exposition des bactéries au système immunitaire ou aux antibiotiques. Pour cela, il n'existe actuellement pas de méthode consensuelle mais de nombreuses possibilités existent. La première est l'utilisation de molécules ayant un effet de type surfactant, par exemple la mannoprotéine (un extrait de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*) permet à la fois une diminution de l'adhérence de *S. aureus* au substrat mais aussi une diminution de la biomasse de biofilm déjà formé [33, 35]. Les traitements de type photo dynamique ont aussi montré une efficacité intéressante contre les biofilms de *S. aureus* [26]. Enfin, les traitements enzymatiques représentent une autre alternative, il en existe une grande variété qui vont cibler différents constituants du biofilm dans l'objectif de le détruire (figure 6) [36 à 40].

Parmi tous ces traitements enzymatiques, la dispersine B, la protéinase K et la DNase I semblent être les plus fréquemment utilisées. La dispersine B est une enzyme produite par *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, elle a montré une efficacité dans la prévention et la destruction des biofilms de *S. epidermidis* [36]. La protéinase K présente une efficacité dans la destruction de biofilm de *S. aureus*, cependant son efficacité dépend grandement de la composition du biofilm [37]. La DNase I est une endonucléase qui a elle aussi démontré une efficacité dans la destruction de certaines souches de *S. aureus* [38].

Dispersal agent	Mechanism	References	Specific factor
Proteases	Degradation of proteinaceous matrix components	McGavin et al., 1997; O'Neill et al., 2008 Mootz et al., 2013 Abraham and Jefferson, 2012 Marti et al., 2010 Lauderdale et al., 2010; Shukla and Rao, 2013 Beenken et al., 2003; Trotonda et al., 2005; Tsang et al., 2008; Zielinska et al., 2012 Lauderdale et al., 2009	V8 protease (SspA) Staphopains (Cysteine Proteases) Aureolysin (Aur) Aur, SspA Proteinase K <i>sarA</i> regulation <i>sigB</i> , <i>agr</i> regulation
agr activation by AIP	Expression of agr regulated factors (proteases and PSMs)	Yarwood et al., 2004; Boles and Horswill, 2008; Lauderdale et al., 2010	AIP
Phenol-soluble modulins	Surfactant-mediated dispersal	Peschel and Otto, 2013	PSMs
<i>S. epidermidis</i> Esp	Degradation of proteinaceous matrix components; inhibition of autolysis through Atl degradation	Iwase et al., 2010; Chen et al., 2013; Sugimoto et al., 2013	Esp
Nucleases	Degradation of eDNA	Kiedrowski et al., 2011 Kiedrowski et al., 2014	Nuc Nuc2
Dispersin B	Degradation of polysaccharide matrix components	Kaplan et al., 2004; Donelli et al., 2007	DisB
D-amino acids	Protein synthesis inhibition in <i>B. subtilis</i> , unknown in <i>S. aureus</i>	Kolodkin-Gal et al., 2010; Hochbaum et al., 2011; Leiman et al., 2013; Sanchez et al., 2013	D-amino acids
Stringent response inhibition	Unknown	de la Fuente-Nunez et al., 2014; Reffuveille et al., 2014	Peptide 1018

Figure 6 : Les agents de dispersion de biofilm et leurs mécanismes [40].

Cependant, la composition du biofilm peut varier de façon importante entre les espèces et même entre les souches de bactérie, rendant difficile la mise en place d'une méthode de lutte unique [41].

Dans le cas de *S. aureus*, une étude récente a montré l'intérêt de la subtilisine A, une endopeptidase à serine produite par *Bacillus licheniformis* (bactérie ubiquiste du sol) et du gluconate de calcium dans la lutte contre les biofilms. En effet, parmi 8 substances testées, ces 2 molécules ont permis une réduction significative de la biomasse du biofilm sur 21 des 24

souches testées. De plus, combinées à un antibiotique, elles ont permis une réduction de la population bactérienne du biofilm [31].

La combinaison d'une molécule agissant sur la matrice du biofilm et d'un antibiotique pourrait représenter une approche intéressante, en permettant une meilleure exposition des bactéries à l'antibiotique après destruction de la matrice [40].

D. Objectifs de la thèse

Il existe peu de données sur la lutte contre les biofilms de *S. pseudintermedius*. Une étude s'est intéressée à l'huile de Manuka (*Leptospermum scoparium*), une huile essentielle qui inhiberait la formation du biofilm de *S. pseudintermedius* de manière concentration dépendante et avec un effet antibactérien pour des souches MRSP et MSSP. Cependant, le mécanisme n'est actuellement pas clairement compris et une destruction du biofilm mature n'a pas été mise en évidence [42].

A l'exception de l'huile de Manuka, l'efficacité des molécules citées précédemment (subtilisine A, DNase I, dispersine B, protéinase K) n'a pas été évaluée sur des biofilms formés par *S. pseudintermedius*. C'est pourquoi, l'objectif de ce travail de thèse concerne l'évaluation de l'efficacité de ces molécules sur des biofilms formés par différentes souches de *S. pseudintermedius*, isolées à partir de chiens atteints de pyodermite. Cette étude s'est portée en particulier sur la subtilisine A qui avait montré une bonne efficacité dans la destruction des biofilms de plusieurs souches de *S. aureus* [31].

II. MATERIELS ET METHODES

A. Souches utilisées

Le laboratoire disposait de 20 souches de *S. pseudintermedius* isolées sur des chiens atteints de pyodermite. Elles ont été collectées à travers le réseau RESAPATH (réseau de surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries d'origine animale en France), en collaboration avec l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) de Lyon. Ces souches ont été préalablement caractérisées selon leur résistance à la méthicilline, par la recherche du gène *mecA*, par l'ANSES de Lyon.

Parmi ces 20 souches, 5 sont utilisées dans cette étude (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des souches utilisées selon leur résistance à la méthicilline (MSSP = Souche de *S. pseudintermedius* sensible à la méthicilline, MRSP= souche de *S. pseudintermedius* résistante à la méthicilline).

Souche	Sensibilité à la méthicilline
240	MRSP
244	MSSP
245	MSSP
246	MSSP
247	MSSP

B. Molécules utilisées

La céphalexine, la marbofloxacin et la subtilisine A ont été achetées chez Sigma-Aldrich.

1. Céphalexine

50 mg de céphalexine en poudre ont été dissout dans 4.9 mL d'eau ultra pure, à laquelle 100 µL de NaOH 2M ont été ajoutés. La solution a ensuite été stérilisée avec un filtre 0.2 µm. La solution mère ainsi obtenue à 10 mg/mL a été stockée moins de 3 mois à -20°C.

2. Marbofloxacin

10 mg de marbofloxacin en poudre ont été dissouts dans 10 mL d'eau ultra pure. La solution a été stérilisée avec un filtre 0.2 µm. La solution mère ainsi obtenue à 1mg/mL a été stockée moins de 3 mois à -20°C.

3. Subtilisine A

Pour la subtilisine A, la solution commerciale concentrée à 3 UI/mL a été utilisée.

C. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI ont été déterminées en réalisant des dilutions sériées au demi des différentes molécules, dans du Bouillon Mueller Hinton (MHB), dans des microplaques 96 puits à fond conique. Les gammes de concentrations testées pour les CMI étaient de 32 µg/mL à 0.0625 µg/mL pour la céphalexine, de 8 µg/mL à 0.0156 µg/mL pour la marbofloxacin et de 0.75 UI/mL à 0.0015 UI/mL pour la subtilisine A. Les deux dernières colonnes de chaque plaque ont été conservées, comme témoin positif et négatif. Le témoin négatif contenant uniquement du milieu MHB et le témoin positif contenant l'inoculât bactérien.

Afin d'obtenir un inoculât bactérien standardisé, chacune des souches a d'abord été ensemencée sur une gélose Mueller Hinton Agar (MHA) et mise à l'étuve à 37°C durant 24 heures. Quelques colonies de chaque souche ont ensuite été diluées dans une solution de MHB pour obtenir une densité optique à 600 nm (DO_{600}) comprise entre 0.06 et 0.08 (concentration bactérienne d'environ 5×10^7 UFC/mL), puis une dilution d'un facteur 100 a été réalisée. Pour chaque souche, 100 µL de l'inoculât ainsi obtenu ont été ajoutés dans les puits correspondants.

Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C durant 18 heures puis elles ont été lues à l'œil nu en se basant sur la turbidité de la suspension observée et/ou la présence de culot dans chaque puits. La CMI a été déterminée comme la concentration en molécule la plus faible sans croissance visible de la souche.

Chaque CMI a été déterminée au moins en triplicat.

D. Formation du biofilm

Les souches ont d'abord été ensemencées sur des géloses Mueller Hinton Agar (MHA) puis incubées à 37°C durant 24 heures. Quelques colonies de chaque souche ont ensuite été diluées dans une solution de TSB (tryptic soy broth) pour obtenir une DO_{600} de 0.08 (concentration bactérienne d'environ 5×10^7 UFC/mL), puis deux dilutions successives d'un facteur 100 ont été réalisées. Ensuite, 1,8 mL de cette suspension a été disposée dans 8 puits d'une plaque 12 puits. Les 4 autres puits ont été remplis avec 1.8 mL de TSB seul (témoins négatifs) (figure 7).

La plaque a ensuite été placée dans l'incubateur à 37 °C durant 24 heures sans agitation pour permettre la formation de biofilm au fond de la plaque.

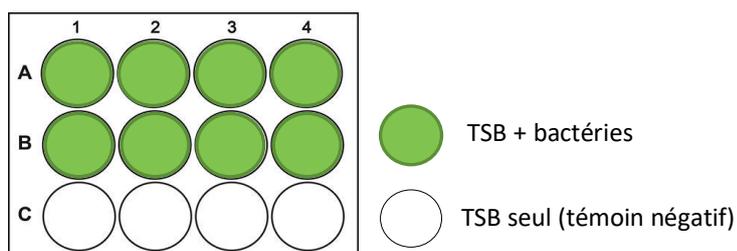


Figure 7 : Représentation schématique d'une plaque après ensemencement.

E. Exposition aux différentes molécules

Après 24 heures d'incubation, les molécules ont été ajoutées pour tester dans chaque plaque la subtilisine A, la marbofloxacin ou la céphalexine. Les associations de la marbofloxacin ou de la céphalexine avec la subtilisine A ont aussi été testées (figure 8).

Les concentrations testées des molécules dans les puits étaient de 50 µg/mL pour la céphalexine, de 5 µg/mL pour la marbofloxacin et de 0.01 UI/mL pour la subtilisine A.

Après dilution de la solution mère de céphalexine dans du TSB afin d'obtenir une solution fille concentrée à 5 mg/mL, 18 µL ont été ajoutés dans les puits contenant de la céphalexine.

De même, la solution mère de marbofloxacin a été diluée dans du TSB afin d'obtenir une solution fille concentrée à 0.1 mg/mL puis 90 µL ont été ajoutés dans les puits contenant de la marbofloxacin.

Pour la subtilisine A, 6 µL de la solution commerciale à 3 UI/mL ont été ajoutés aux puits.

Il y avait systématiquement 2 puits témoins positifs sans molécule ajoutée et 4 puits témoins négatifs sans bactéries.

Les plaques ont ensuite été remises à l'incubation à 37 °C durant 24 heures sans agitation avant d'évaluer l'effet des molécules.

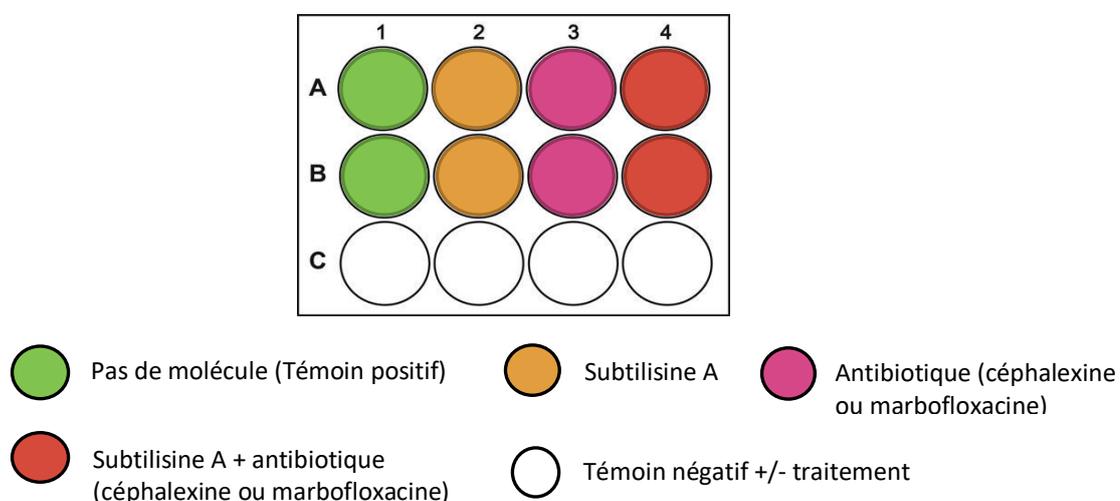


Figure 8 : Représentation schématique d'une plaque après ajout des molécules.

Après cette nouvelle incubation, le surnageant a été retiré et chaque puits a été rincé avec 2 mL de PBS (Phosphate-buffered saline) stérile, trois fois avant quantification de la biomasse par coloration au cristal violet ou quantification de l'activité métabolique par la résazurine. Des plaques différentes ont été utilisées pour les 2 colorations.

F. Quantification de la biomasse par le cristal violet

1. Intérêt du cristal violet

Le cristal violet ou violet de gentiane est un colorant utilisé notamment dans la coloration de GRAM. Il se fixe sur les bactéries et les composants de la matrice extracellulaire du biofilm. Après fixation suivie d'une solubilisation dans l'éthanol, la mesure de la densité optique permet une quantification de la biomasse des biofilms [31, 43].

2. Méthode

Après les étapes de rinçage, 2 mL de cristal violet à 2.5% (w/v) ont été ajoutés dans chaque puits et laissés durant 3 minutes à température ambiante. La solution de cristal violet a ensuite été aspirée et un dernier rinçage avec 2 mL de PBS a été réalisé afin d'éliminer l'excès de colorant. Les plaques ont ensuite été laissées ouvertes à l'air ambiant jusqu'au séchage complet.

Pour la lecture, 2 mL d'éthanol à 96% ont été ajoutés dans chaque puits afin de solubiliser le cristal violet fixé aux bactéries et à la matrice du biofilm. Les plaques ont ensuite été agitées à faible vitesse pendant 30 minutes.

La densité optique de chaque puits a ensuite été mesurée à 595 nm avec un lecteur de plaque (FIUOstar omega, BMG labtech).

G. Quantification de l'activité métabolique de la résazurine

1. Intérêt de la résazurine

En présence d'activité métabolique, la résazurine est transformée par un procédé d'oxydoréduction en résorufine (figure 9). La résazurine est bleue et possède une faible activité fluorescente alors que la résorufine est rose et possède une forte fluorescence. La mesure de la fluorescence permet ainsi une quantification de l'activité métabolique des bactéries présentes dans les puits [43, 44].

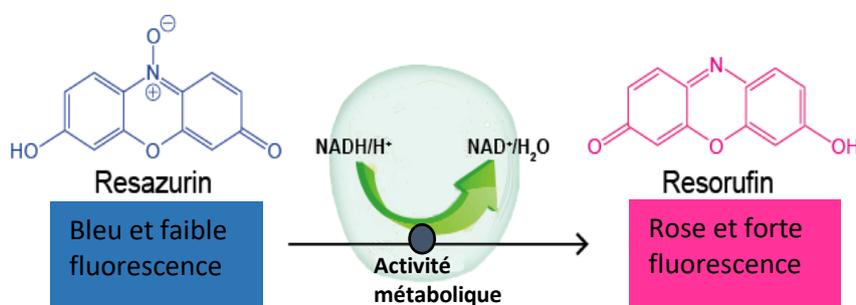


Figure 9 : Schématisation de la transformation de la résazurine en résorufine.

2. Méthode

A partir de la solution commerciale de résazurine (Sigma Aldrich), une solution concentrée à 0.5 mg/mL a été préparée. Cette solution a ensuite été diluée dans du TSB pour obtenir une solution fille concentrée à 5 µg/mL. Après les étapes de rinçages des puits décrites plus haut, 2 mL de la solution fille de résazurine ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 3 heures. Une légère agitation à la main a été réalisée au bout d' 1h30.

Après les 3 heures d'incubation, la fluorescence a été mesurée dans chaque puits avec une longueur d'onde d'émission à 544 nm et de lecture à 590 nm (FIUOstar omega, BMG labtech).

H. Analyses statistiques

Chaque valeur obtenue de DO (cristal violet) ou de fluorescence (résazurine) a été corrigée par la valeur du témoin négatif (molécules testées sans bactérie) : la valeur de la DO (cristal violet) et de la fluorescence (résazurine) du témoin négatif (sans bactérie) a été soustraite à la valeur obtenue dans les puits traités.

Pour la DO et la fluorescence, par souche, nous disposons de 23 valeurs pour le témoin positif (bactérie sans traitement), de 22 pour la subtilisine A, de 8 pour la céphalexine et la marbofloxacin et de 8 pour la combinaison marbofloxacin ou céphalexine avec la subtilisine A.

Les analyses des DO et de la fluorescence ont été réalisées sur GraphPad 6. Une ANOVA à une variable a été réalisée avec comme facteur : le traitement. Une analyse post-hoc (test de Tukey) a permis la comparaison des traitements entre eux, lorsqu'un effet traitement était identifié. Les valeurs ont été considérées significatives si la p-value était inférieure à 0.05.

III. RESULTATS

A. Détermination des CMI

1. Céphalexine

Pour la céphalexine, les CMI des cinq souches de *S. pseudintermedius* ont été déterminées par le laboratoire en amont de nos manipulations. Les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Valeur de la CMI de céphalexine la plus fréquemment obtenue sur les 5 souches de *S. pseudintermedius*.

Souche	Valeur de la CMI la plus fréquemment obtenue en $\mu\text{g/mL}$ (n=5)
240	16
244	2
245	2
246	2
247	2

La CMI de céphalexine est donc de 2 $\mu\text{g/mL}$ pour toutes les souches, sauf la 240 (MRSP) pour laquelle elle est de 16 $\mu\text{g/mL}$.

2. Marbofloxacin

Les CMI de marbofloxacin pour les 5 souches sont rapportées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Valeur de la CMI de marbofloxacin la plus fréquemment obtenue en fonction des souches utilisées.

Souche	Valeur de la CMI la plus fréquemment obtenue en $\mu\text{g/mL}$ (n=3)
240	0.25
244	0.125
245	0.25
246	0.25
247	0.25

Les CMI de marbofloxacin pour les souches utilisées est de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ pour toutes les souches, sauf la 244 pour laquelle elle est de 0.125 $\mu\text{g/mL}$.

3. Subtilisine A

Lors de la détermination de la CMI de la subtilisine A, des résultats inattendus ont été observés. En effet, pour certaines souches, la croissance était inhibée à certaines concentrations mais pas aux concentrations maximales testées. Afin de représenter les résultats, nous avons accordé un score de 2 pour une forte turbidité, un score de 1 pour une légère turbidité et un score de 0 pour un puits non trouble (figure 10).

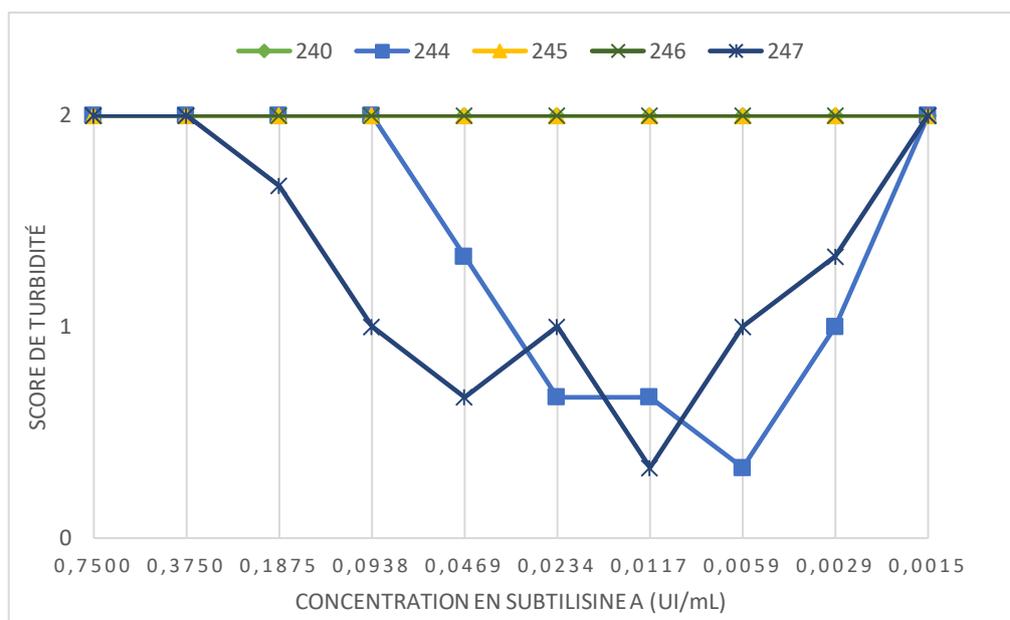


Figure 10 : Croissance bactérienne observée en fonction de la concentration en subtilisine A. La croissance bactérienne a été quantifiée à l'œil nu (2= croissance bactérienne forte ; 1= croissance faible ; 0= absence de croissance). Chaque point représentant la moyenne obtenue, après avoir répété l'expérience 3 fois

Pour les souches 240, 245 et 246, la subtilisine A n'a pas exercé d'effet sur la croissance bactérienne, même à forte concentration (CMI > 0.75 UI/mL). Pour les souches 244 et 247, il existe un intervalle de concentrations ($0.0015 < \text{Concentration inhibitrice} < 0.37 \text{ UI/mL}$) pour lequel la croissance bactérienne a été inhibée.

B. Effet des molécules sur la biomasse des biofilms

1. Subtilisine A

La biomasse a été quantifiée 24h après l'ajout de subtilisine A à 0.01 UI/mL à des biofilms de 24h (figure 11).

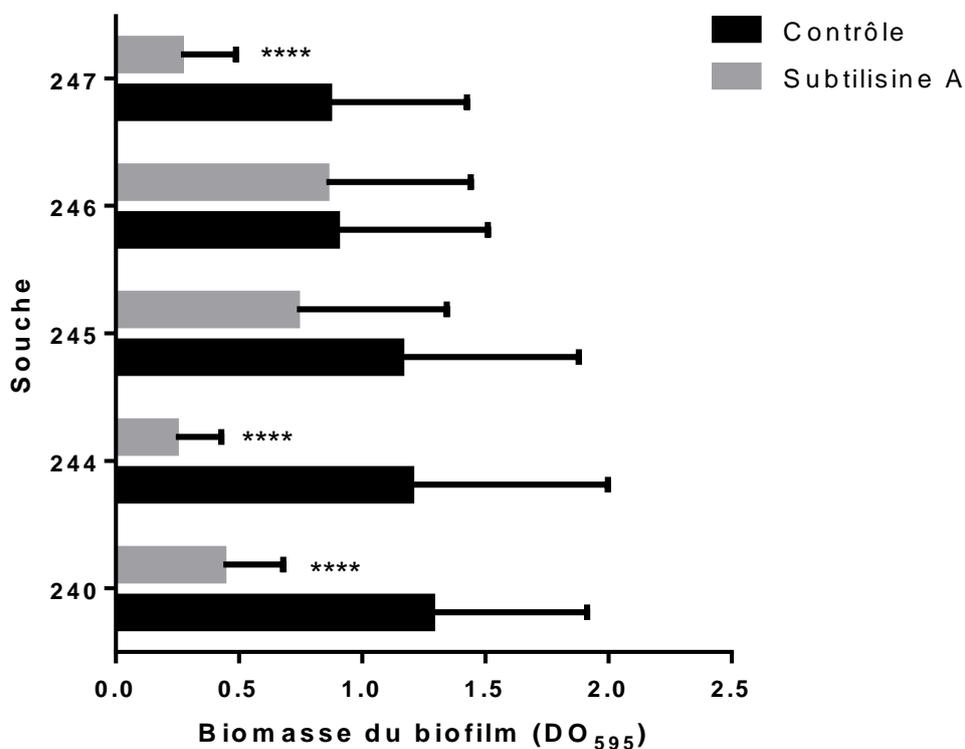


Figure 11 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL) sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*. La biomasse correspond à la mesure de la DO₅₉₅ du puit traité et exposé au cristal violet, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n = 23 ; subtilisine A n = 22). La barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative avec le contrôle par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (**** pour p < 0.00005).

Bien que la variabilité de la biomasse des biofilms entre les réplicats pour une même condition soit relativement importante, on constate qu'une exposition de 24h à la subtilisine A conduit à une diminution significative de la biomasse pour 3 des 5 souches utilisées (240, 244 et 247), comparativement au contrôle (sans subtilisine).

2. Antibiotiques

La biomasse a été quantifiée 24h après l'ajout de céphalexine à 50 µg/mL, ou de marbofloxacin à 5 µg/mL, à des biofilms de 24h (figure 12).

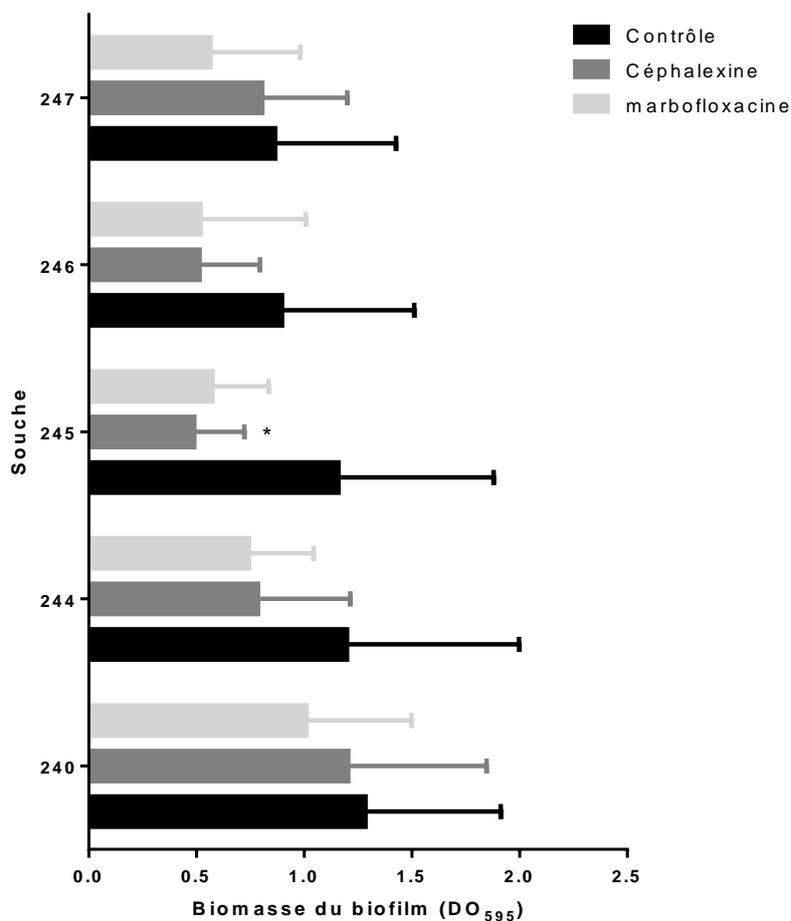


Figure 12 : Impact d'une exposition de 24h à la céphalexine (50 µg/mL) ou à la marbofloxacin (5 µg/mL) sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*. La biomasse correspond à la mesure de la DO_{595} du puit traité et exposé au cristal violet, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n = 23 ; céphalexine n = 8 ; marbofloxacin n = 8). La barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative avec le contrôle par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (* pour $p < 0.05$).

Après 24h d'exposition à la céphalexine ou à la marbofloxacin, la biomasse n'est pas significativement différente du contrôle sans antibiotique, excepté pour la souche 245 avec la céphalexine. Une tendance à la diminution de biomasse est toutefois observée pour les deux antibiotiques pour les souches 244 et 246 mais sans atteindre la significativité.

3. Co-exposition à la subtilisine A et à un antibiotique

a) Subtilisine A et céphalexine

La biomasse a été quantifiée 24h après l'ajout de céphalexine à 50 µg/mL, de subtilisine A à 0.01 UI/mL ou de l'association des deux, à des biofilms de 24h (figure 13).

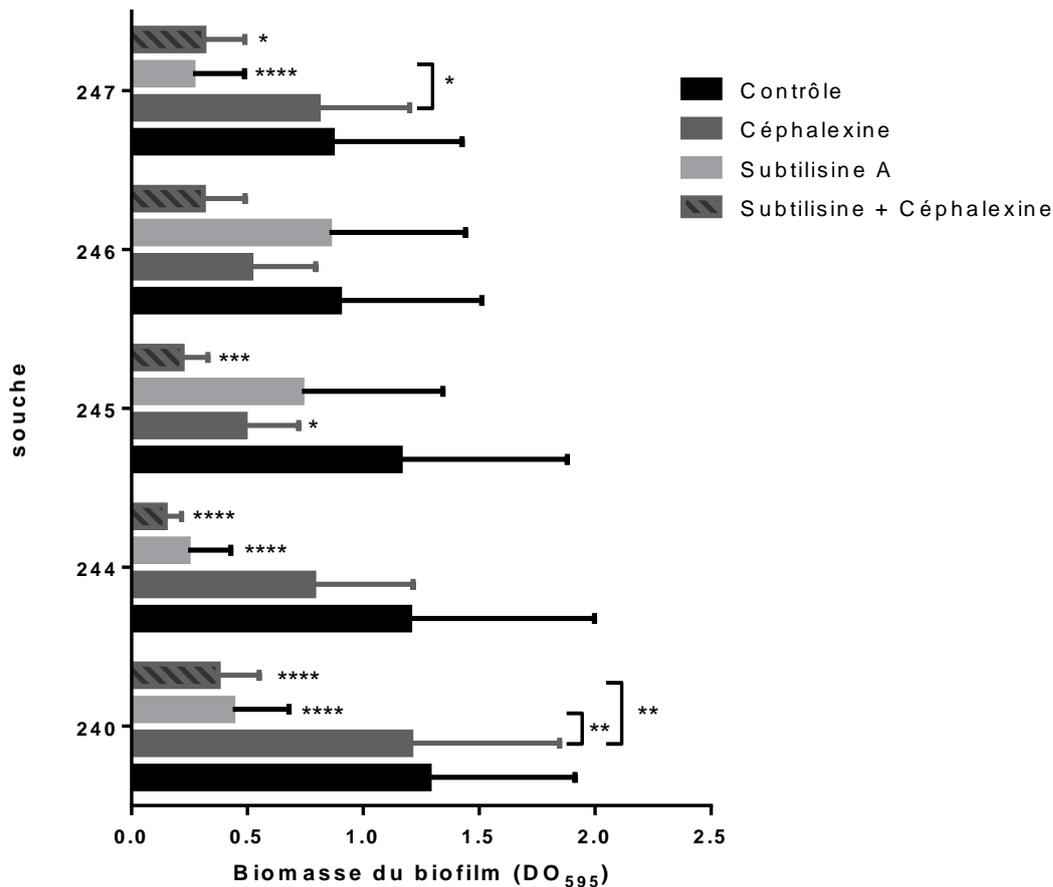


Figure 13 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la céphalexine (50 µg/mL) ou à l'association des deux sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*. La biomasse correspond à la mesure de la DO₅₉₅ du puit traité et exposé au cristal violet, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n = 23 ; céphalexine n = 8 ; subtilisine A n = 22 ; subtilisine A + céphalexine n = 8). La barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative entre deux groupes (avec le contrôle si non précisé) par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (* : p < 0.05 ; ** : p < 0.005 ; *** : p < 0.0005 ; **** : p < 0.00005).

Pour les souches 240 et 247, l'exposition à la subtilisine A seule a induit une diminution de la biomasse significativement plus importante que l'exposition à la céphalexine seule.

Par rapport au contrôle, la co-exposition à la céphalexine et la subtilisine A a entraîné une réduction significative de la biomasse des biofilms pour toutes les souches utilisées, exceptée la 246.

Pour la souche 240, l'exposition des biofilms à la combinaison de la subtilisine A et de la céphalexine a conduit à une réduction significativement plus importante de la biomasse qu'avec la céphalexine seule.

Bien que la différence ne soit pas significative, on constate pour toutes les souches, excepté la 247, que l'exposition à la combinaison a tendance à entraîner une diminution plus intense de la biomasse que celle obtenue par l'exposition à la céphalexine seule ou la subtilisine A seule.

b) Subtilisine A et marbofloxacine

La biomasse a été quantifiée 24h après l'ajout de marbofloxacine à 5 µg/mL, de subtilisine A à 0.01 UI/mL ou de l'association des deux, à des biofilms de 24h (figure 14).

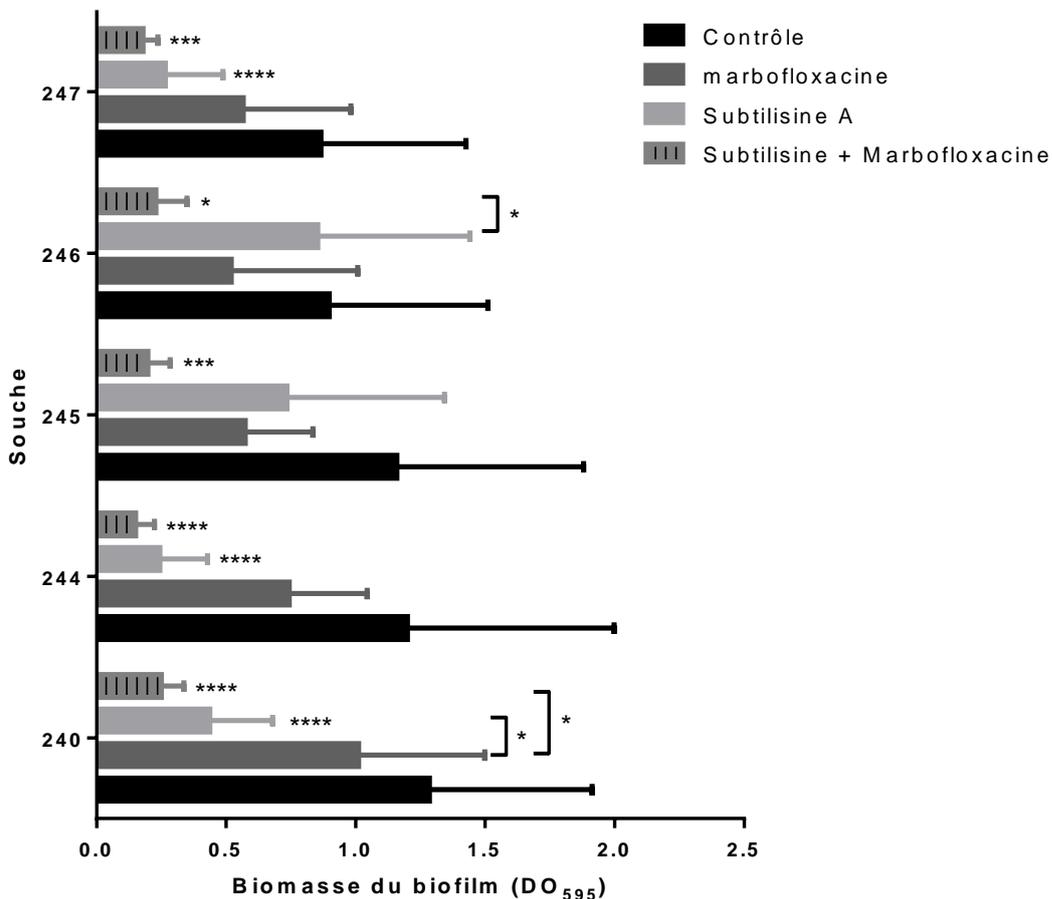


Figure 14 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la marbofloxacine (5 µg/mL) ou à l'association des deux sur la biomasse des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*. La biomasse correspond à la mesure de la DO₅₉₅ du puit traité et exposé au cristal violet, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n = 23 ; marbofloxacine n = 8 ; subtilisine A n = 22 ; subtilisine A + marbofloxacine n = 8). La

barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative entre deux groupes (avec le contrôle si non précisé) par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.005$; *** : $p < 0.0005$; **** : $p < 0.00005$).

Comme le montre la figure 14, la co-exposition des biofilms à la marbofloxacinine et à la subtilisine A a entraîné une réduction importante et significative de leurs biomasses, par rapport au contrôle non exposé, pour la totalité des souches testées.

Pour la souche 240, l'exposition des biofilms à la subtilisine A seule a induit une diminution significativement plus importante qu'une exposition à la marbofloxacinine seule.

Quelle que soit la souche, l'exposition à la combinaison des deux molécules n'a pas permis de réduction significativement différente de la biomasse comparativement à la fois à la marbofloxacinine seule et à la subtilisine A seule. En effet, pour la souche 240, on observe une diminution de la biomasse plus importante après exposition à la combinaison qu'après exposition à la marbofloxacinine seule mais pas plus importante qu'après exposition à la subtilisine A seule. Inversement, pour la souche 246, la combinaison a induit une diminution de la biomasse significativement plus importante qu'avec la subtilisine A seule mais pas plus importante qu'avec la marbofloxacinine seule.

C. Effet sur l'activité métabolique

1. Subtilisine A

L'activité métabolique a été évaluée 24h après l'ajout de subtilisine A à 0.01 UI/mL à des biofilms de 24h (figure 15).

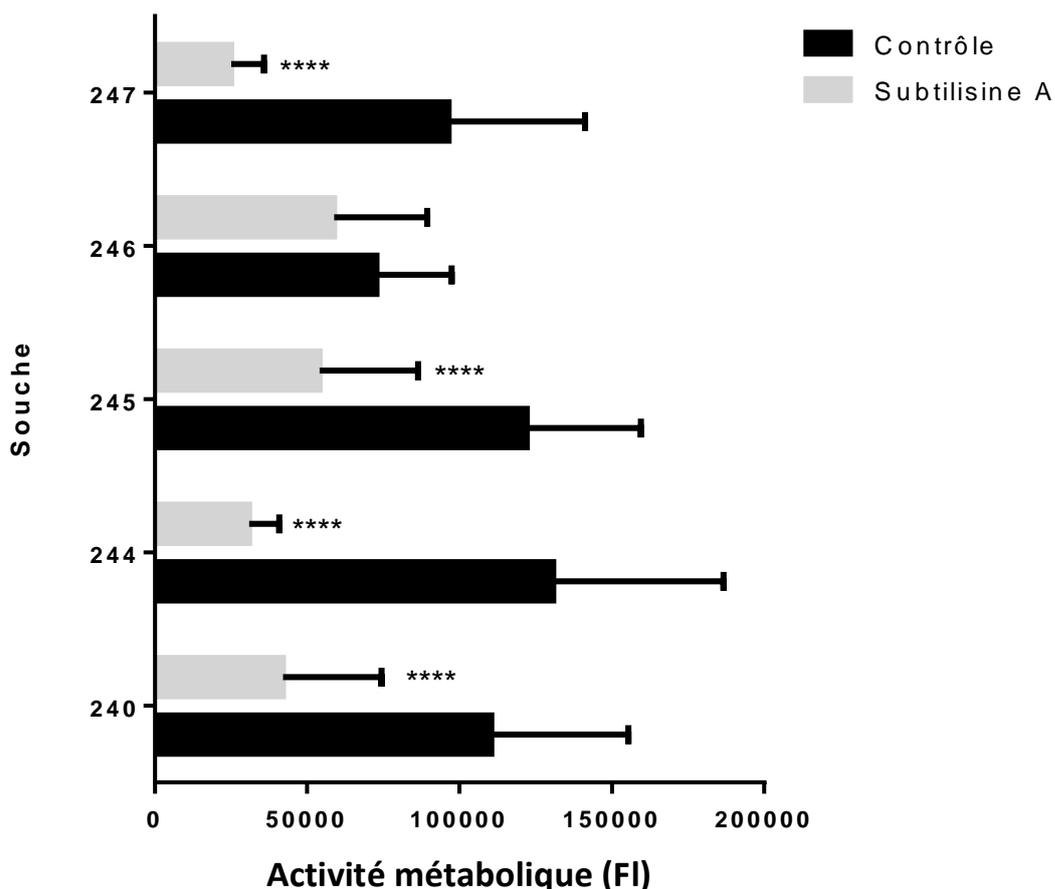


Figure 15 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL) sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*. L'activité métabolique correspond à la mesure de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 544 nm et de lecture de 590 nm) du puit traité et exposé à la résazurine, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n = 23 ; subtilisine A n = 22). La barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative avec le contrôle par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (**** pour $p < 0.00005$).

De façon identique à ce qui a été observé pour la biomasse des biofilms, on constate une certaine variabilité dans la mesure de l'activité métabolique pour chaque souche dans les conditions contrôles, entraînant des écarts types relativement importants. Toutefois, l'exposition durant 24h des biofilms à la subtilisine A a conduit à une réduction significative de leurs activités métaboliques, pour toutes les souches sauf la 246, comparativement au contrôle non exposé à la subtilisine A.

2. Antibiotiques

L'activité métabolique a été quantifiée 24h après l'ajout de céphalexine à 50 µg/mL, ou de marbofloxacin à 5 µg/mL, à des biofilms de 24h (figure 16).

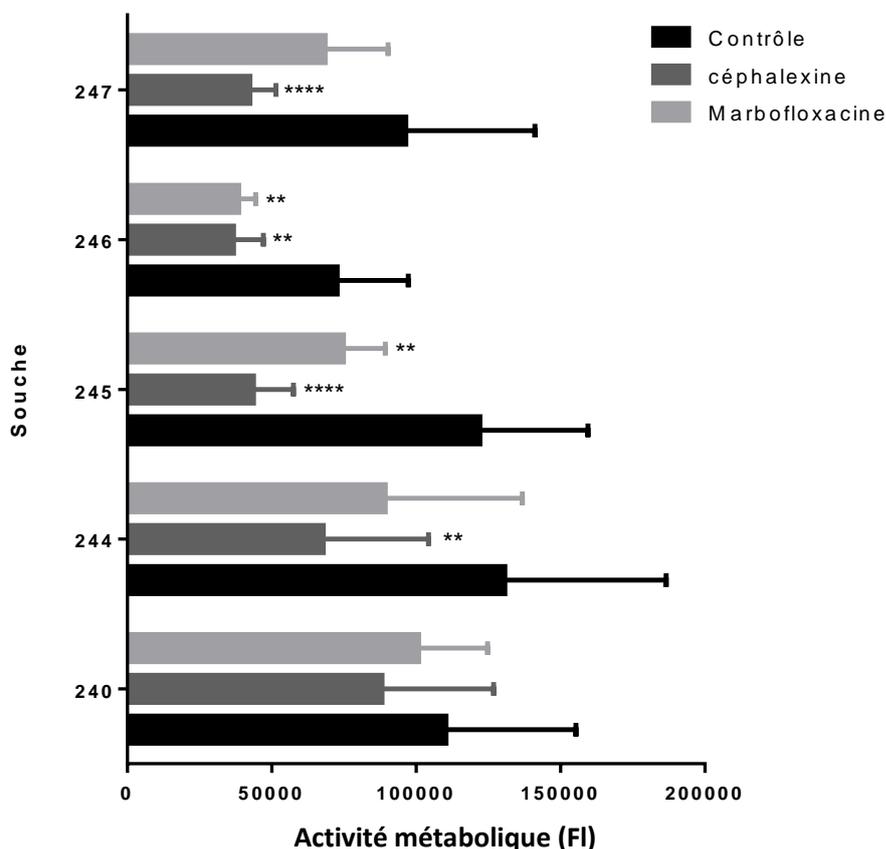


Figure 16 : Impact d'une exposition de 24h à la céphalexine (50 µg/mL) ou à la marbofloxacin (5 µg/mL) sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*. L'activité métabolique correspond à la mesure de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 544 nm et de lecture de 590 nm) du puit traité et exposé à la résazurine, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n = 23 ; céphalexine n = 8, marbofloxacin n = 8). La barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative avec le contrôle par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (* : p < 0.05 ; ** : p < 0.005 ; *** : p < 0.0005 ; **** : p < 0.00005).

L'exposition des biofilms à la céphalexine a entraîné une baisse significative de l'activité métabolique pour toutes les souches, sauf la 240. Le traitement des biofilms à la marbofloxacin a induit une baisse significative pour 2 des 5 souches (245 et 246).

L'activité métabolique moyenne des biofilms est plus faible pour les groupes exposés à la céphalexine que ceux exposés à la marbofloxacin, pour toutes les souches, sans que la différence ne soit statistiquement significative.

3. Co-exposition à la subtilisine A et à un antibiotique

a) Subtilisine A et céphalexine

L'activité métabolique a été quantifiée 24h après l'ajout de céphalexine à 50 µg/mL, de subtilisine A à 0.01 UI/mL ou de l'association des deux, à des biofilms de 24h (figure 17).

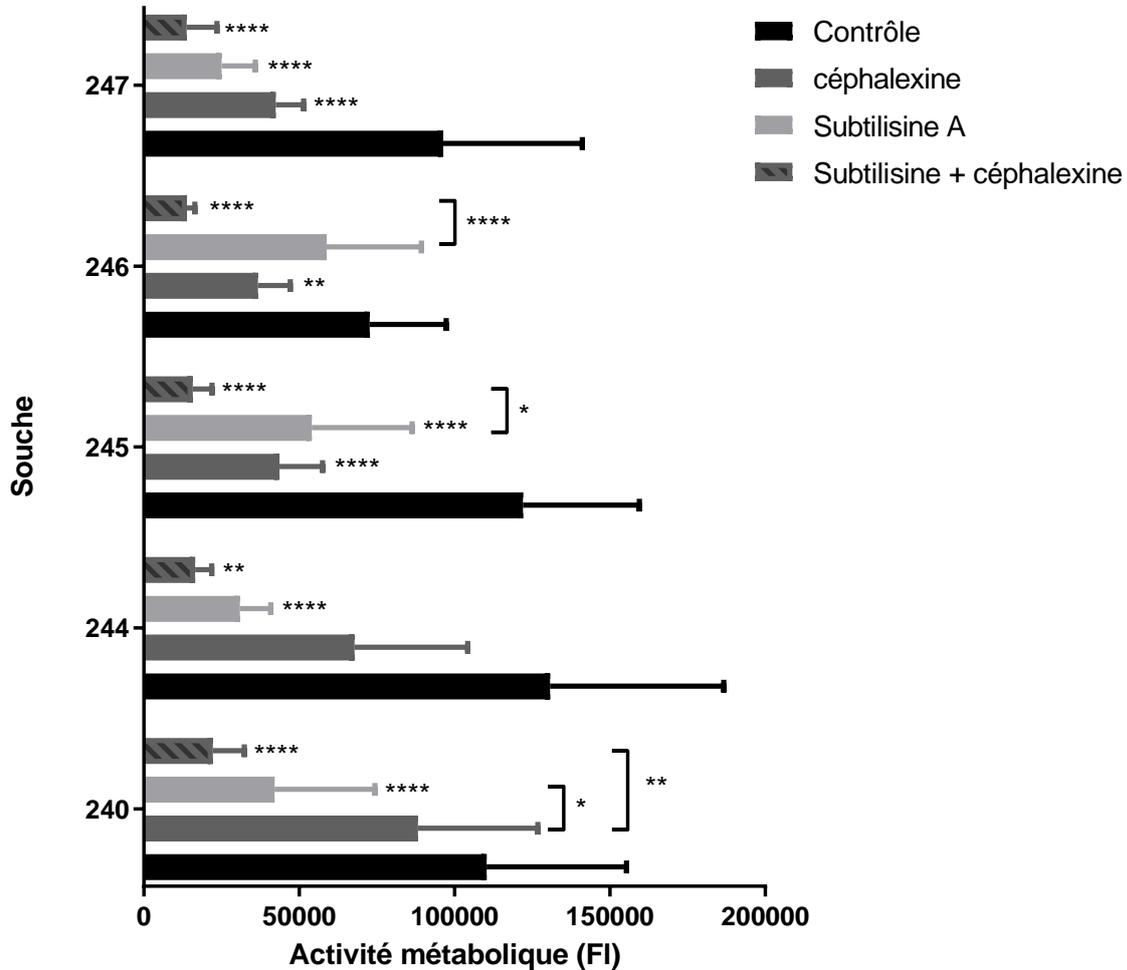


Figure 17 : Impact d'une exposition de 24h à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la céphalexine (50 µg/mL) ou à la combinaison des deux sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de *S. pseudintermedius*. L'activité métabolique correspond à la mesure de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 544 nm et de lecture de 590 nm) du puit traité et exposé à la résazurine, soustraite par celle du puit du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n=23 ; céphalexine n=8 ; Subtilisine A n=22 ; Subtilisine A + céphalexine n=8). La barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative entre deux groupes (avec le contrôle si non précisé) par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (* : p < 0.05 ; ** : p < 0.005 ; *** : p < 0.0005 ; **** : p < 0.00005).

L'activité métabolique des biofilms de la souche 240 est significativement plus faible après exposition à la subtilisine A seule qu'après exposition à la céphalexine seule.

L'exposition des biofilms à la combinaison de la céphalexine et de la subtilisine A, a provoqué une diminution importante et significative de l'activité métabolique pour la totalité des souches comparativement au contrôle non traité.

L'activité métabolique des biofilms des souches 245 et 246 a été significativement réduite après exposition à la combinaison des deux molécules en comparaison à l'exposition à la subtilisine A seule.

Pour la souche 240, l'exposition à la combinaison a induit une diminution de la biomasse significativement plus importante qu'avec la céphalexine seule.

Malgré une tendance, quelle que soit la souche, la combinaison des deux molécules n'induit pas de réduction significative comparativement à la fois à la céphalexine seule et à la subtilisine seule.

b) Subtilisine A et marbofloxacine

L'activité métabolique a été quantifiée 24h après l'ajout de marbofloxacine à 5 µg/mL, de subtilisine A à 0.01 UI/mL ou de l'association des deux, à des biofilms de 24h (figure 18).

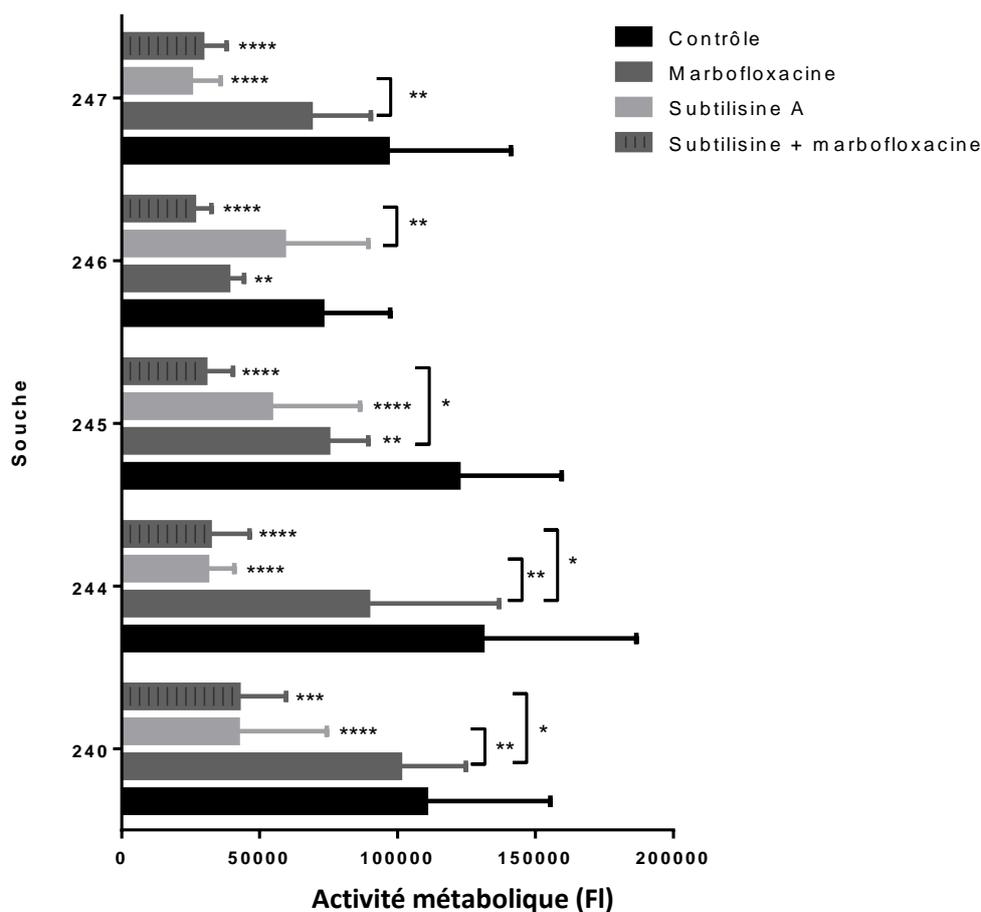


Figure 18 : Impact d'une exposition à la subtilisine A (0.01 UI/mL), à la marbofloxacine (5 µg/mL) ou à la combinaison des deux sur l'activité métabolique bactérienne des biofilms, pour chaque souche de *S.*

pseudintermedius. L'activité métabolique correspond à la mesure de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 544 nm et de lecture de 590 nm) du puit traité et exposé à la résazurine, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n=23 ; marbofloxacin n=8 ; Subtilisine A n=22 ; Subtilisine A + marbofloxacin n=8). La barre d'erreur indique l'écart type. Les étoiles indiquent une différence significative entre deux groupes (avec le contrôle si non précisé) par le test d'ANOVA à une variable et la comparaison multiple de Tukey (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.005$; *** : $p < 0.0005$; **** : $p < 0.00005$).

Concernant les souches 240, 244 et 247, on observe une activité métabolique significativement plus faible après exposition à la subtilisine A seule qu'après une exposition à la marbofloxacin seule.

L'exposition des biofilms à la combinaison de la marbofloxacin et de la subtilisine A, a conduit à une baisse significative de leurs activités métaboliques, et ce pour la totalité des souches de *S. pseudintermedius* testées, comparativement au contrôle non exposé.

Quelle que soit la souche, la combinaison n'a par contre pas entraîné de réduction significativement différente à la fois par rapport à la marbofloxacin seule et à la subtilisine seule.

En effet, en ce qui concerne la souche 246, on observe une diminution de l'activité métabolique plus importante après une exposition à la combinaison qu'après une exposition à subtilisine A seule mais pas plus importante qu'avec la marbofloxacin seule. Inversement, pour les souches 240, 244 et 245, l'exposition à la combinaison a permis une diminution de la biomasse significativement plus importante qu'avec une exposition à la marbofloxacin seule, mais pas plus importante qu'avec la subtilisine A seule.

IV. DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'étudier l'efficacité de la subtilisine A, seule ou en combinaison avec des antibiotiques dans la lutte contre les biofilms de *S. pseudintermedius*. La finalité étant d'évaluer la pertinence d'une application topique de subtilisine A, en complément d'un traitement antibiotique par voie systémique, dans le traitement des pyodermites chez le chien.

Pour aborder cette question, des choix méthodologiques ont dû être faits et les résultats préliminaires obtenus *in vitro* dans cette thèse représentent une première base donnée prometteuse, mais encore insuffisante pour pouvoir recommander cette combinaison en pratique vétérinaire à l'heure actuelle. En effet, même si la subtilisine A semble pouvoir dégrader les biofilms de certaines souches de *S. pseudintermedius*, de nombreux aspects complémentaires restent encore à être évalués.

A. Résultats de la CMI de Subtilisine A

Les subtilisines sont des protéases utilisées dans les lessives, dans l'industrie de la tannerie, pour les conserves de l'industrie alimentaire et enfin comme agent de pré stérilisation dans les hôpitaux [45]. Des études ont déjà mis en évidence un effet de la subtilisine contre l'adhésion de *Pseudomonas* et de biofilm d'*E. coli* à une surface [46, 47].

Dans cette thèse, la concentration de 0.01 UI/mL a été choisie à partir des données de la bibliographie [31].

Dans l'étude de Liu *et al.* [31], montrant l'effet de la subtilisine A sur des biofilms de *S. aureus*, la CMI de la subtilisine A était supérieure à 0.05 UI/mL sur les 24 souches de *S. aureus* testées. Nous nous attendions à obtenir des résultats similaires et ne pas avoir d'inhibition de la croissance bactérienne à la concentration utilisée. Cependant l'exposition à la subtilisine A à des concentrations comprises entre 0.0015 et 0.37 UI/mL a inhibé la croissance de 2 des 5 souches testées (244 et 247) (figure 10), alors que la concentration de 0.74 UI/mL n'a pas inhibé la croissance de ces souches. La concentration utilisée dans la suite des expérimentations de 0.01 UI/mL avait donc un effet bactériostatique ou bactéricide sur 2 des 5 souches.

L'effet inhibiteur de la subtilisine A sur la croissance des bactéries peut s'expliquer par son pouvoir protéolytique. En effet, les subtilisines ont notamment la capacité d'hydrolyser les adhésines (protéines essentielles pour l'attachement à une surface et des bactéries entre elle) [48]. La lyse de certaines protéines constitutives de la paroi a pu entraîner la lyse des bactéries et donc leur mort ou bloquer le processus de division.

Cependant, cela n'explique pas qu'à plus forte concentration (0.74 UI/mL), il y ait une perte de cet effet inhibiteur (figure 10). Ce type de résultats, avec un effet présent à concentration moyenne qui diminue à faible et à forte concentration peut s'apparenter à un modèle en forme de « U inversé » ou « inverted U-shaped model » [49]. Une possibilité pour expliquer ce résultat est une réponse des bactéries au stress entraîné par la présence d'une grande quantité de subtilisine, par exemple avec l'activation de pompe à efflux. Une autre possibilité est qu'à très forte concentration, les protéases s'auto-inhibent ou ne sont plus dans des conditions favorables à leur activité.

B. Efficacité des molécules testées

Les tableaux suivants (tableaux 4 et 5) reprennent les résultats des figures 11 à 18, afin de mettre en évidence les molécules ayant conduit à une diminution significative de la biomasse (tableau 4) ou de l'activité métabolique (tableau 5) sur les différentes souches testées, par rapport au témoin non exposé.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'exposition aux différentes molécules sur la **biomasse des biofilms**, comparativement au témoin non exposé. Un « + » représente une diminution significative ($p < 0.05$) de la biomasse après exposition à la molécule (ou à la combinaison des deux molécules) comparé au témoin non exposé.

	Céphalexine	Marbofloxacin	Subtilisine A	Subtilisine A + céphalexine	Subtilisine A + marbofloxacin
S240	-	-	+	+	+
S244	-	-	+	+	+
S245	+	-	-	+	+
S246	-	-	-	-	+
S247	-	-	+	+	+
Total	1/5	0/5	3/5	4/5	5/5

Tableau 5 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'exposition aux différentes molécules sur l'**activité métabolique des biofilms**, comparativement au témoin non exposé. Un « + » représente une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité métabolique après exposition à la molécule (ou à la combinaison des deux molécules) comparé au témoin non exposé.

	Céphalexine	Marbofloxacin	Subtilisine A	Subtilisine A + céphalexine	Subtilisine A + marbofloxacin
S240	-	-	+	+	+
S244	+	-	+	+	+
S245	+	+	+	+	+
S246	+	+	-	+	+
S247	+	-	+	+	+
Total	4/5	2/5	4/5	5/5	5/5

1. Effets de la subtilisine A seule

La subtilisine A seule a exercé un effet intéressant sur les biofilms de 24h de *S. pseudintermedius*, puisqu'elle a induit une baisse significative de l'activité métabolique pour 4 des 5 souches et une baisse de la biomasse pour 3 des 5 souches (tableaux 4 et 5). L'activité métabolique a donc été diminuée, même sur les souches pour lesquelles la subtilisine A n'avait pas montré d'effet inhibiteur sur la croissance des bactéries planctoniques à la concentration testée (figure 10). La subtilisine A semble donc capable d'agir sur les biofilms de *S. pseudintermedius* de certaines souches, formés depuis 24 heures.

Il est à noter que la diminution de la biomasse et de l'activité métabolique ne sont pas systématiquement corrélées chez les souches testées.

L'un des mécanismes pouvant expliquer les effets de la subtilisine A est son activité protéolytique. L'hydrolyse de protéines essentielles à l'adhésion du biofilm, notamment les adhésines, a pu permettre la dégradation de la matrice du biofilm et ainsi l'élimination d'une partie de ce dernier lors des étapes de rinçage. L'élimination d'une partie du biofilm (comprenant de la matrice et des bactéries) peut expliquer la diminution de la biomasse et de l'activité métabolique du biofilm [31, 39, 48].

Les effets de la subtilisine A sont dépendants de la souche puisque pour la souche 246 la subtilisine n'a eu d'effet significatif ni sur la biomasse ni sur l'activité métabolique. Cependant, ils ne semblent pas dépendre du caractère résistant ou non à la méthicilline de la souche (tableaux 1, 4 et 5). Ces caractéristiques sont similaires à celles observées sur des souches de *S. aureus* [31].

La subtilisine A seule semble avoir eu un effet supérieur aux antibiotiques seuls sur la biomasse des biofilms puisqu'elle a entraîné une réduction significative de la biomasse des biofilms sur 3 des 5 souches, alors que la céphalexine a exercé un effet sur la biomasse d'une seule des souches et la marbofloxacin sur aucune d'entre elles (tableau 4).

2. Effets des antibiotiques seuls

L'exposition aux antibiotiques seuls a exercé un effet nettement plus important sur l'activité métabolique que sur la biomasse des biofilms (tableaux 4 et 5) ce qui peut s'expliquer par leur capacité à tuer les bactéries (activité bactéricide), sans altérer la structure ou la stabilité du biofilm.

L'exposition à la céphalexine a induit une diminution de l'activité métabolique sur toutes les souches, sauf la 240 (MRSP) pour laquelle la CMI de céphalexine (16 µg/mL) est plus élevée que celles des autres souches (2 µg/mL) (tableau 5). L'exposition à la céphalexine seule a diminué la biomasse uniquement de la souche 245 (tableau 4).

L'exposition à la marbofloxacin, quant à elle, a entraîné uniquement une réduction de l'activité métabolique sur 2 des 5 souches sans effet significatif sur la biomasse (tableaux 4 et 5). La céphalexine semble donc avoir exercé un effet sur un plus grand nombre de souches de *S. pseudintermedius* que la marbofloxacin alors que leur mode d'action aurait laissé supposer un résultat inverse. En effet, la céphalexine a pour cible principale la synthèse de la paroi bactérienne et n'est pas supposée interférer directement avec le métabolisme bactérien alors que la marbofloxacin en agissant sur l'enroulement de l'ADN peut perturber l'expression génique et la réplication.

Cependant, même si la céphalexine semble plus efficace que la marbofloxacin quand les résultats sont comparés au groupe contrôle (tableau 4), on n'observe pas de différence significative, pour une souche donnée, entre les groupes exposés à la céphalexine et à la marbofloxacin quand ils sont comparés entre eux (figures 12 et 16). Malgré des tendances suggérant une efficacité plus importante de la céphalexine comparée à la marbofloxacin, les résultats obtenus n'ont pas atteint le seuil de significativité. Cette absence de différence significative peut potentiellement s'expliquer par un nombre de données plus faible pour les groupes exposés aux antibiotiques (n=8) que pour le groupe témoin (n=23). Elle peut aussi s'expliquer par la forte variabilité de la biomasse et de l'activité métabolique au sein d'une même souche, entraînant des écarts types relativement importants qui rendent difficile l'obtention de différences statistiquement significatives.

3. Effets de l'association de la subtilisine A et d'un antibiotique

Il est à noter que l'exposition à l'association de la subtilisine A et de la céphalexine a induit une diminution de l'activité métabolique et de la biomasse sur la totalité des souches testées excepté pour la biomasse sur la souche 246 (tableau 4). Il est à rappeler que cette souche est la seule pour laquelle la subtilisine A seule n'a pas eu d'effet significatif.

L'exposition des biofilms à l'association de la subtilisine A et de la marbofloxacinine a permis une diminution de leurs biomasses et de leurs activités métaboliques, pour la totalité des souches testées (tableaux 4 et 5).

Malgré une tendance à une plus grande efficacité des combinaisons de molécules, les différences sont rarement statistiquement significatives entre le groupe exposé à la combinaison et le groupe exposé à une molécule seule, que ce soit la subtilisine ou les antibiotiques (figures 13, 14, 17 et 18). Le nombre plus faible de données pour la combinaison (n= 8) que pour les molécules seules (n=23) et la variabilité obtenue dans la mesure des indicateurs, entraînant des écarts types relativement importants, contribuent vraisemblablement à ce manque de significativité.

Malgré cela, l'association de la subtilisine A et d'un antibiotique, en particulier la marbofloxacinine, montre des effets intéressants et un spectre plus large que la subtilisine A ou les antibiotiques seuls. Cette association semble donc présenter un réel intérêt dans la lutte contre les biofilms de *S. pseudintermedius*.

C. Limites de l'étude

1. Type de biofilms exposés aux molécules

Dans cette étude, tous les résultats ont été obtenus sur des biofilms de 24h formés sur des supports en polystyrène (plaque Greiner référence : 665102). Or, la composition de la matrice extracellulaire des biofilms varie en fonction du temps et de l'environnement [17, 18]. Le modèle *in vitro* utilisé dans cette étude, avec des biofilms formés sur des supports, n'est pas complètement représentatif de la situation *in vivo*, dans laquelle les biofilms sont formés sur l'épiderme de chien, ce qui constitue une des limites de cette étude [50].

2. Sélection des concentrations testées

La céphalexine est un antibiotique utilisé en première intention dans le traitement des pyodermites canines. La dose de céphalexine recommandée chez le chien et le chat est de 15 à 30 mg/kg deux fois par jour [6, 7]. Pour une prise par voie orale à la posologie de 15 mg/kg, le pic plasmatique est d'environ 15 µg/mL chez le chien [51]. La concentration sélectionnée pour cette étude était de 50 µg/mL. Cette concentration se situe au-dessus des CMI pour la totalité des souches testées (tableau 2) et l'antibiotique était donc supposé inhiber le développement, voir tuer les bactéries planctoniques.

La marbofloxacin est un antibiotique recommandé en seconde intention dans le traitement des pyodermites canines. La dose de marbofloxacin recommandée chez le chien et le chat est de 2 à 5.5 mg/kg une à deux fois par jour. Une prise par voie orale à la dose de 2 mg/kg induit un pic plasmatique d'environ 1 µg/mL chez le chien [6, 52]. La concentration sélectionnée dans cette étude était de 5 µg/mL, ce qui correspond à une valeur supérieure aux CMI de marbofloxacin pour toutes les souches testées (tableau 3).

Dans le cadre de cette thèse, il n'était pas possible de tester plusieurs concentrations d'antibiotiques et nous avons donc sélectionné, pour chaque antibiotique, la concentration qui semblait la plus pertinente. Nous aurions pu choisir la concentration en fonction des CMI des souches étudiées (par exemple 10 ou 100 fois la CMI) mais nous avons préféré travailler avec des concentrations réalistes, c'est-à-dire atteignables au site infectieux. Cependant, pour éviter de conclure trop prématurément à une « non-efficacité », nous avons choisi des concentrations légèrement supérieures aux concentrations maximales plasmatiques rapportées après l'administration des doses recommandées pour chaque antibiotique chez le chien [6, 7]. Le choix de ces concentrations élevées a pu majorer les effets des antibiotiques sur les biofilms, et n'est pas complètement représentatif d'une situation *in vivo*, pour laquelle les concentrations fluctuent au niveau du site infectieux.

De même pour la subtilisine A, seuls les effets d'une exposition de 24h à la concentration de 0.01 UI/mL ont pu être évalués lors de cette étude.

3. Sélection des indicateurs (biomasse et activité métabolique)

Il n'existe pas d'indicateur spécifique de la destruction du biofilm, nous avons donc décidé d'étudier deux indicateurs en parallèle, qui sont la biomasse et l'activité métabolique, pour mieux comprendre les effets de la subtilisine A seule ou en combinaison avec un antibiotique.

La biomasse évaluée par coloration au cristal violet est l'indicateur le plus souvent utilisé dans les études sur le biofilm [16, 31, 43]. C'est un indicateur hybride qui dépend du nombre de bactéries vivantes, de la quantité de matrice extracellulaire et de débris de bactéries mortes restant adhérents à la matrice. A nombre égal de bactéries, la biomasse sera plus élevée chez celles qui produisent le plus de biofilm, c'est-à-dire, celles qui ont une production de matrice extra-cellulaire plus importante. Cependant, même si la biomasse d'un biofilm est en majorité constituée par la matrice extra cellulaire [53], elle pourrait être identique lorsqu'un faible nombre de bactéries produisent beaucoup de biofilms ou au contraire, lorsqu'un nombre important de bactéries produisent peu de biofilms.

L'activité métabolique est aussi un indicateur hybride qui dépend de la quantité de bactéries vivantes et de l'intensité de leur activité métabolique. Une diminution de l'activité métabolique peut donc signifier qu'une partie de la population bactérienne est morte ou que les bactéries, toujours vivantes, ont modifié leur phénotype pour entrer en dormance.

Au cours de nos expérimentations, nous avons observé un certain niveau de variabilité dans la mesure de l'activité métabolique et de la biomasse au sein de chaque souche ce qui a vraisemblablement contribué à un manque de significativité statistique pour certaines comparaisons, malgré des tendances marquées, comme évoqué plus haut.

D. Perspectives

1. Evaluation des effets sur la survie des bactéries

Nous avons mis en évidence un effet sur la biomasse et sur l'activité métabolique qui laisse supposer que la combinaison de la subtilisine A et d'un antibiotique pourrait être efficace pour traiter les infections à *S. pseudintermedius* associées à un biofilm. Pour mieux caractériser la diminution de l'activité métabolique qui peut être due à une entrée en dormance ou à une mort des bactéries, il serait maintenant intéressant de réaliser, en complément, des comptages bactériens qui n'ont pas pu être réalisés pendant le temps consacré à la thèse. En effet, si de nombreuses bactéries restent vivantes après le traitement, une recolonisation des tissus est possible ce qui favoriserait les rechutes [31].

2. Evaluation de l'effet de la souche bactérienne

Les résultats ont montré une bonne efficacité de la subtilisine A, en particulier lorsqu'elle est combinée à un antibiotique dans la lutte contre les biofilms de *S. pseudintermedius*. Cependant, l'efficacité de la subtilisine A apparaît varier en fonction de la souche. Par exemple, son efficacité est limitée sur la souche 246 (figures 11 et 15, tableaux 4 et 5). Une explication potentielle à ce phénomène est la variabilité de la composition de la matrice extracellulaire du biofilm entre les souches d'une même espèce de bactérie [41]. Il serait intéressant de connaître la base génétique de cette inefficacité. Des PCR suivies de séquençage pourraient être réalisées pour rechercher les séquences de gènes codant pour les protéines de paroi mais celles-ci sont extrêmement nombreuses. Nous n'étions pas en capacité de faire cette étude pendant la durée de cette thèse.

Il serait également intéressant de reproduire ces expériences sur un plus grand nombre de souches pour connaître la fréquence des souches pour lesquelles la subtilisine A est inefficace et ensuite évaluer son potentiel intérêt dans un traitement clinique de première intention.

3. Evaluation d'expositions répétées à la subtilisine A

Dans notre étude, les biofilms ont été exposés durant 24 heures à des concentrations constantes de molécules.

Il serait intéressant d'exposer à plusieurs reprises les biofilms aux différentes molécules testées, avec des concentrations fluctuantes, afin de s'approcher de la situation d'un traitement clinique d'une pyodermite.

4. Possibilité d'une utilisation clinique

Comme évoqué en introduction, le succès de la prise en charge des pyodermites canines repose sur plusieurs paramètres. Il est d'abord primordial d'identifier la cause sous-jacente à l'origine des lésions, à l'aide du contexte clinique et d'exams complémentaires. Sans la prise en charge de cette cause sous-jacente, des récurrences sont à prévoir, et par conséquent les traitements, dont l'antibiothérapie déjà longue, devront être répétés.

La pyodermite est souvent traitée par la réalisation de shampoings ou d'autres soins locaux, couplés à l'administration d'antibiotiques. Pour cette étape, l'adhésion et la confiance du propriétaire sont des points essentiels pour avoir une bonne observance du traitement et éviter les rechutes qui, là aussi, auraient pour conséquence une augmentation de la durée de l'antibiothérapie et une démotivation du propriétaire.

Dans l'ensemble de cette prise en charge, la subtilisine A pourrait se positionner en traitement local, en étant appliquée sur les lésions, en complément des soins locaux et de l'antibiothérapie. En permettant une lyse des biofilms présents au niveau des lésions, la subtilisine A pourrait potentialiser les effets des shampoings et de l'antibiothérapie, voire

permettre une réduction de leurs durées d'utilisation. Ainsi, la subtilisine A pourrait faciliter la prise en charge des pathologies cutanées associées à la présence de biofilms et permettre une réduction de la quantité d'antibiotiques utilisés dans leur prise en charge.

Sur le plus long terme, il serait donc intéressant de compléter cette étude dans l'objectif d'intégrer la subtilisine A dans un produit à application topique pour aider à traiter les pathologies cutanées associées à la formation de biofilms, dont les pyodermites canines.

En effet, un produit contenant la combinaison d'une molécule ayant des propriétés dans la lyse des biofilms et d'un agent antimicrobien pourrait permettre à la fois d'augmenter l'activité de ce dernier, tout en limitant les risques d'émergence de résistance aux molécules antibactériennes [54]. Cela explique que de nombreux agents anti-biofilms soient actuellement étudiés. Cependant, la plupart des tentatives de dispersion de biofilms par l'utilisation d'enzymes en sont au stade d'études précliniques sur des biofilms cultivés *in vitro* [53].

Une des seules enzymes ayant actuellement montré une efficacité *in vivo* est la dispersine B et des étapes pour sa commercialisation sont actuellement en cours [53]. La dispersine B est une protéase qui hydrolyse les exopolysaccharides de la matrice extra cellulaire des biofilms bactériens [55]. Cette protéase est produite par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, une bactérie responsable de maladies parodontales chez l'Homme, lors de la phase de dispersion de leurs biofilms [36]. Des études *in vitro* ont mis en évidence sa capacité à détruire des biofilms de *S. epidermidis* [56], à augmenter les effets antibactériens de la tobramycine (antibiotique de la famille des aminosides) contre les biofilms de *S. aureus* [57]. Enfin, la dispersine B combinée à un peptide antimicrobien (KSL-W), a montré une efficacité antibactérienne sur des biofilms de *S. aureus* et de *S. epidermidis* [58].

Une étude *in vivo*, menée sur la peau de cochon a montré que la dispersine B inhibe significativement la colonisation cutanée par *S. epidermidis* et permet le détachement de colonies préalablement formées [55]. Une autre étude a montré que des cathéters revêtus de teicoplanine (un antibiotique de la famille des glycopeptides) et de dispersine B, dans un modèle d'implant sous-cutané chez le lapin, résistent à la colonisation de *S. aureus* [58].

En ce qui concerne la subtilisine A, aucune étude n'a établi, à ce jour, son innocuité pour une application cutanée à la concentration utilisée dans cette étude. Cependant, une étude récente a démontré l'innocuité de l'administration par voie orale de la subtilisine NAT et la subtilisine QK chez le chien, deux molécules de la famille des subtilisines produites par *Bacillus subtilis*, utilisées pour leurs effets thrombolytiques [59]. Une étude plus ancienne avait aussi mis en évidence l'innocuité de l'application de molécules de la famille des subtilisines, utilisées comme détergents, sur le derme chez l'Homme et le rat à de faibles concentrations [60]. Il serait donc intéressant de vérifier l'innocuité de la subtilisine A par exemple *in vitro*, sur des lignées de kératinocytes, à la concentration utilisée dans cette étude [61].

La subtilisine A pourrait donc être une candidate, comme la dispersine B, pour prévenir ou dégrader des biofilms, mais des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer la pertinence de cette molécule dans l'optimisation de la stratégie thérapeutique de lutte contre les pyodermites canines.

V. CONCLUSION

Les biofilms bactériens représentent aujourd'hui un problème majeur en santé humaine comme en santé animale. Ils sont responsables de nombreuses maladies, souvent récidivantes et difficiles à traiter. De surcroît, la formation de biofilms est un facteur favorisant l'apparition et la dissémination de gènes de résistances [16, 17, 30].

Les pyodermites canines, des infections bactériennes cutanées chez le chien, sont un exemple de pathologies souvent associées à la présence de biofilms bactériens. L'agent le plus fréquemment impliqué dans cette pathologie est *S. pseudintermedius*, un staphylocoque à coagulase positive, agent commensal de l'épiderme des chiens. Cette pathologie est l'un des principaux motifs de consultation en dermatologie vétérinaire, son traitement est souvent long et complexe et repose notamment sur une longue antibiothérapie. La pyodermite canine est d'ailleurs l'une des pathologies responsables de la majeure partie de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux de compagnie [6, 7].

C'est pourquoi il est aujourd'hui important de mettre en place des méthodes de lutte efficaces contre les infections associées à la présence de biofilms bactériens.

Une des approches, présentant un réel intérêt, concerne l'utilisation d'enzymes ayant pour cible les constituants de la matrice extracellulaire du biofilm, permettant ainsi une destructuration de ce dernier. L'utilisation de ce type d'enzyme pourrait augmenter l'efficacité d'une molécule antimicrobienne utilisée conjointement [54]. Dans ce contexte, une étude récente [31] a montré l'intérêt de la subtilisine A, une protéase produite par *Bacillus licheniformis*, associée à un antibiotique dans la destruction de biofilms de *S. aureus*.

Notre étude s'est focalisée sur l'évaluation de l'efficacité de cette molécule, la subtilisine A, seule ou combinée à un antibiotique dans la destruction de biofilms de *S. pseudintermedius*. Pour cela, nous avons exposé des biofilms de 24h de 5 souches de *S. pseudintermedius*, aux différentes molécules durant 24h, puis nous avons mesuré leurs activités métaboliques et leurs biomasses.

Notre étude a montré qu'une exposition des biofilms de 24h de *S. pseudintermedius* à un antibiotique, ici la céphalexine ou la marbofloxacin, entraînait une diminution concomitante de l'activité métabolique et de la biomasse des biofilms uniquement sur un nombre limité de souche (une pour la céphalexine et aucune pour la marbofloxacin). En revanche, une exposition à la subtilisine A seule induisait une baisse significative et concomitante de l'activité métabolique et de la biomasse des biofilms pour 3 des 5 souches testées, comparativement à un témoin non exposé. Enfin, pour les groupes exposés à l'association de la subtilisine A et d'un antibiotique, le nombre de souches affectées de manière significative au niveau de l'activité métabolique et de la biomasse des biofilms était plus important comparativement aux groupes exposés aux composés seuls. En particulier avec l'association de la subtilisine A et de la marbofloxacin, pour laquelle les biofilms exposés ont présenté une biomasse et une

activité métabolique significativement réduite comparativement à un témoin non exposé, pour la totalité des souches testées (tableaux 4 et 5).

In vitro, la subtilisine A, associée à la céphalexine ou à la marbofloxacin, présente donc une bonne efficacité dans la destruction des biofilms de *S. pseudintermedius* de 24h. Ces résultats encourageants offrent de nombreuses perspectives de recherches et suggèrent une possible application clinique de la subtilisine A dans le traitement des pyodermites canines. Des études complémentaires sont cependant nécessaires afin de confirmer ces résultats et de les approfondir. Notamment, l'innocuité et l'efficacité, dans des conditions *in vivo* de la subtilisine A restent à être confirmées.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Laws M, Shaaban A, Rahman KM. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(5):490-516. doi:[10.1093/femsre/fuz014](https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014)
2. J.Carlet, P. Le Coz. Propositions du groupe de travail spécial pur la préservation des antibiotiques. Ministère des affaires sociales et de la santé, juin 2015. Accessible à l'URL http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_antibiotiques.pdf
3. Ministère de la santé. Comité interministériel pour la santé. Feuille de route pour la maîtrise de l'antibiorésistance. Accessible à l'URL : [http:// social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/feuille de route antibioresistance nov 2016.pdf](http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/feuille_de_route_antibioresistance_nov_2016.pdf)
4. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr.* 2018;6(2). doi:[10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017)
5. Guardabassi L, Prescott JF. Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2015;45(2):361-376, vii. doi:[10.1016/j.cvsm.2014.11.005](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.11.005)
6. Hillier A, Lloyd DH, Weese JS, et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Vet Dermatol.* 2014;25(3):163-e43. doi:[10.1111/vde.12118](https://doi.org/10.1111/vde.12118)
7. Hnilica KA, ed. CHAPTER | 3 - Bacterial Skin Diseases. In: *Small Animal Dermatology (Third Edition)*. W.B. Saunders; 2011:37-82. doi:[10.1016/B978-1-4160-5663-8.00003-3](https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5663-8.00003-3)
8. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):418-429. doi:[10.1016/j.vetmic.2009.01.039](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.039)
9. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of phenotypically identified *staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2770-2778. doi:[10.1128/jcm.00360-07](https://doi.org/10.1128/jcm.00360-07)
10. Bannoehr J, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol.* 2012;23(4):253-266, e51-52. doi:[10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x)

11. Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, et al. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol*. 2009;20(3):179-184. doi:[10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x)
12. Haenni M, de Moraes NA, Châtre P, Médaille C, Moodley A, Madec J-Y. Characterisation of clinical canine meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014;2(2):119-123. doi:[10.1016/j.jgar.2014.02.002](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.02.002)
13. Ference EH, Danielian A, Kim HW, Yoo F, Kuan EC, Suh JD. Zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* sinonasal infections: risk factors and resistance patterns. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(7):724-729. doi:[10.1002/alr.22329](https://doi.org/10.1002/alr.22329)
14. van Duijkeren E, Catry B, Greko C, et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(12):2705-2714. doi:[10.1093/jac/dkr367](https://doi.org/10.1093/jac/dkr367)
15. Somayaji R, Priyantha M a. R, Rubin JE, Church D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(4):471-476. doi:[10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008)
16. Pompilio A, De Nicola S, Crocetta V, et al. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. *BMC Microbiol*. 2015;15:109. doi:[10.1186/s12866-015-0449-x](https://doi.org/10.1186/s12866-015-0449-x)
17. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114-122. doi:[10.1038/nrd1008](https://doi.org/10.1038/nrd1008)
18. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. 2002;184(4):1140-1154. doi:[10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002](https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002)
19. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*. 2015;7(4):493-512. doi:[10.4155/fmc.15.6](https://doi.org/10.4155/fmc.15.6)
20. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:435-464. doi:[10.1146/annurev.mi.41.100187.002251](https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251)
21. Boyen F, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet Microbiol*. 2009;135(3-4):187-195. doi:[10.1016/j.vetmic.2008.12.025](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.025)

22. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2017;307(8):481-489. doi:[10.1016/j.ijmm.2017.09.016](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016)
23. Rollet C, Gal L, Guzzo J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;290(2):135-142. doi:[10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x)
24. Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H*. 2014;228(10):1083-1099. doi:[10.1177/0954411914556137](https://doi.org/10.1177/0954411914556137)
25. Passerini L, Lam K, Costerton JW, King EG. Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med*. 1992;20(5):665-673. doi:[10.1097/00003246-199205000-00020](https://doi.org/10.1097/00003246-199205000-00020)
26. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-745. doi:[10.1146/annurev.mi.49.100195.003431](https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431)
27. Luppens SBI, Reij MW, van der Heijden RWL, Rombouts FM, Abee T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(9):4194-4200. doi:[10.1128/AEM.68.9.4194-4200.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4194-4200.2002)
28. Conlon BP. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. *Bioessays*. 2014;36(10):991-996. doi:[10.1002/bies.201400080](https://doi.org/10.1002/bies.201400080)
29. Mascio CTM, Alder JD, Silverman JA. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(12):4255-4260. doi:[10.1128/AAC.00824-07](https://doi.org/10.1128/AAC.00824-07)
30. Ferran AA, Liu J, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. Comparison of the In vitro Activity of Five Antimicrobial Drugs against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Front Microbiol*. 2016;7:1187. doi:[10.3389/fmicb.2016.01187](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01187)
31. Liu J, Madec J-Y, Bousquet-Mélou A, Haenni M, Ferran AA. Destruction of *Staphylococcus aureus* biofilms by combining an antibiotic with subtilisin A or calcium gluconate. *Sci Rep*. 2021;11(1):6225. doi:[10.1038/s41598-021-85722-4](https://doi.org/10.1038/s41598-021-85722-4)
32. Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain P-L, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing *Staphylococcus aureus* Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. *Front Microbiol*. 2018;9:572. doi:[10.3389/fmicb.2018.00572](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00572)

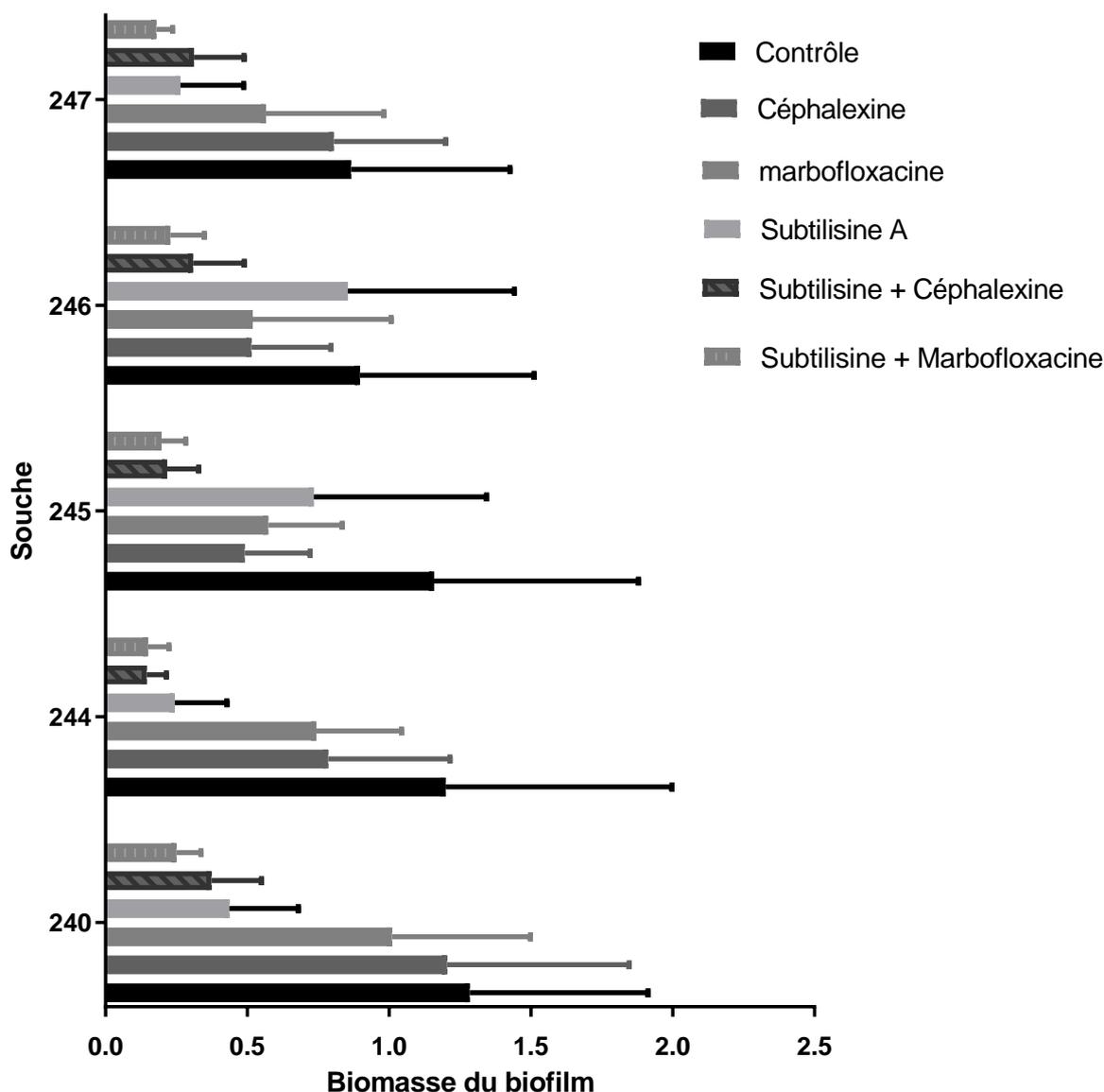
33. Speziale P, Visai L, Rindi S, Pietrocola G, Provenza G, Provenzano M. Prevention and treatment of Staphylococcus biofilms. *Curr Med Chem*. 2008;15(30):3185-3195. doi:[10.2174/092986708786848442](https://doi.org/10.2174/092986708786848442)
34. Lai NM, Chaiyakunapruk N, Lai NA, O'Riordan E, Pau WSC, Saint S. Catheter impregnation, coating or bonding for reducing central venous catheter-related infections in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;3:CD007878. doi:[10.1002/14651858.CD007878.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD007878.pub3)
35. Walencka E, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska S, Sadowska B, Rozalska B. A surface-active agent from *Saccharomyces cerevisiae* influences staphylococcal adhesion and biofilm development. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2007;62(5-6):433-438. doi:[10.1515/znc-2007-5-618](https://doi.org/10.1515/znc-2007-5-618)
36. Kaplan JB, Rangunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7):2633-2636. doi:[10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004)
37. Kumar Shukla S, Rao TS. Dispersal of Bap-mediated Staphylococcus aureus biofilm by proteinase K. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013;66(2):55-60. doi:[10.1038/ja.2012.98](https://doi.org/10.1038/ja.2012.98)
38. Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, Horswill AR. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus on orthopedic implant material. *J Orthop Res*. 2010;28(1):55-61. doi:[10.1002/jor.20943](https://doi.org/10.1002/jor.20943)
39. Baidamshina DR, Trizna EY, Holyavka MG, et al. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. *Sci Rep*. 2017;7:46068. doi:[10.1038/srep46068](https://doi.org/10.1038/srep46068)
40. Lister JL, Horswill AR. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:178. doi:[10.3389/fcimb.2014.00178](https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178)
41. Chaignon P, Sadovskaya I, Rangunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;75(1):125-132. doi:[10.1007/s00253-006-0790-y](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0790-y)
42. Song C-Y, Nam E-H, Park S-H, Hwang C-Y. In vitro efficacy of the essential oil from *Leptospermum scoparium* (manuka) on antimicrobial susceptibility and biofilm formation in Staphylococcus pseudintermedius isolates from dogs. *Vet Dermatol*. 2013;24(4):404-408, e87. doi:[10.1111/vde.12045](https://doi.org/10.1111/vde.12045)
43. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):157-165. doi:[10.1016/j.mimet.2007.11.010](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010)

44. Hu WS, Nam DM, Choi JY, Kim JS, Koo OK. Anti-attachment, anti-biofilm, and antioxidant properties of Brassicaceae extracts on Escherichia coli O157:H7. *Food Sci Biotechnol.* 2019;28(6):1881-1890. doi:[10.1007/s10068-019-00621-9](https://doi.org/10.1007/s10068-019-00621-9)
45. Marchand G. *Méthode d'analyse Des Protéases de Type Subtilisine et Évaluation Des Concentrations de l'air Ambiant de Cinq Centres Hospitaliers.*; 2016.
46. Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D. Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. *J Appl Microbiol.* 2008;105(3):791-799. doi:[10.1111/j.1365-2672.2008.03837.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03837.x)
47. Villa F, Secundo F, Polo A, Cappitelli F. Immobilized Hydrolytic Enzymes Exhibit Antibiofilm Activity Against Escherichia coli at Sub-Lethal Concentrations. *Curr Microbiol.* 2015;71(1):106-114. doi:[10.1007/s00284-015-0834-6](https://doi.org/10.1007/s00284-015-0834-6)
48. Thallinger B, Prasetyo EN, Nyanhongo GS, Guebitz GM. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol J.* 2013;8(1):97-109. doi:[10.1002/biot.201200313](https://doi.org/10.1002/biot.201200313)
49. Lushchak VI. Dissection of the hormetic curve: analysis of components and mechanisms. *Dose Response.* 2014;12(3):466-479. doi:[10.2203/dose-response.13-051.Lushchak](https://doi.org/10.2203/dose-response.13-051.Lushchak)
50. Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, et al. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 2013;21(9):466-474. doi:[10.1016/j.tim.2013.06.002](https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.002)
51. Silley P, Rudd AP, Symington WM, Tait AJ. Pharmacokinetics of cephalexin in dogs and cats after oral, subcutaneous and intramuscular administration. *Vet Rec.* 1988;122(1):15-17. doi:[10.1136/vr.122.1.15](https://doi.org/10.1136/vr.122.1.15)
52. Lei Z, Liu Q, Yang B, et al. Evaluation of Marbofloxacin in Beagle Dogs After Oral Dosing: Preclinical Safety Evaluation and Comparative Pharmacokinetics of Two Different Tablets. *Front Pharmacol.* 2018;9:306. doi:[10.3389/fphar.2018.00306](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00306)
53. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(10):571-586. doi:[10.1038/s41579-020-0385-0](https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0)
54. Gawande PV, Leung KP, Madhyastha S. Antibiofilm and antimicrobial efficacy of DispersinB®-KSL-W peptide-based wound gel against chronic wound infection associated bacteria. *Curr Microbiol.* 2014;68(5):635-641. doi:[10.1007/s00284-014-0519-6](https://doi.org/10.1007/s00284-014-0519-6)
55. Kaplan JB, Mlynek KD, Hettiarachchi H, et al. Extracellular polymeric substance (EPS)-degrading enzymes reduce staphylococcal surface attachment and biocide resistance on pig skin in vivo. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205526. doi:[10.1371/journal.pone.0205526](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205526)

56. Kaplan JB, Ragnath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7):2633-2636. doi:[10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004)
57. Waryah CB, Wells K, Ulluwishewa D, et al. In Vitro Antimicrobial Efficacy of Tobramycin Against *Staphylococcus aureus* Biofilms in Combination With or Without DNase I and/or Dispersin B: A Preliminary Investigation. *Microb Drug Resist*. 2017;23(3):384-390. doi:[10.1089/mdr.2016.0100](https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0100)
58. Darouiche RO, Mansouri MD, Gawande PV, Madhyastha S. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB combination. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(1):88-93. doi:[10.1093/jac/dkp158](https://doi.org/10.1093/jac/dkp158)
59. Xiao S, Dong Y, Hu K, Hu D, Zhou L, Wang Y. Acute and Subchronic Toxicities and Safety Pharmacology Studies of a *Bacillus Subtilisin* in Dogs. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(2):211-218. doi:[10.1248/bpb.b20-00659](https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00659)
60. Griffith JF, Weaver JE, Whitehouse HS, Poole RL, Newmann EA, Nixon GA. Safety evaluation of enzyme detergents. Oral and cutaneous toxicity, irritancy and skin sensitization studies. *Food Cosmet Toxicol*. 1969;7(6):581-593. doi:[10.1016/s0015-6264\(69\)80461-x](https://doi.org/10.1016/s0015-6264(69)80461-x)
61. Choi H, Shin MK, Ahn HJ, Lee TR, Son Y, Kim KS. Irritating effects of sodium lauryl sulfate on human primary keratinocytes at subtoxic levels of exposure. *Microsc Res Tech*. 2018;81(11):1339-1346. doi:[10.1002/jemt.23143](https://doi.org/10.1002/jemt.23143)

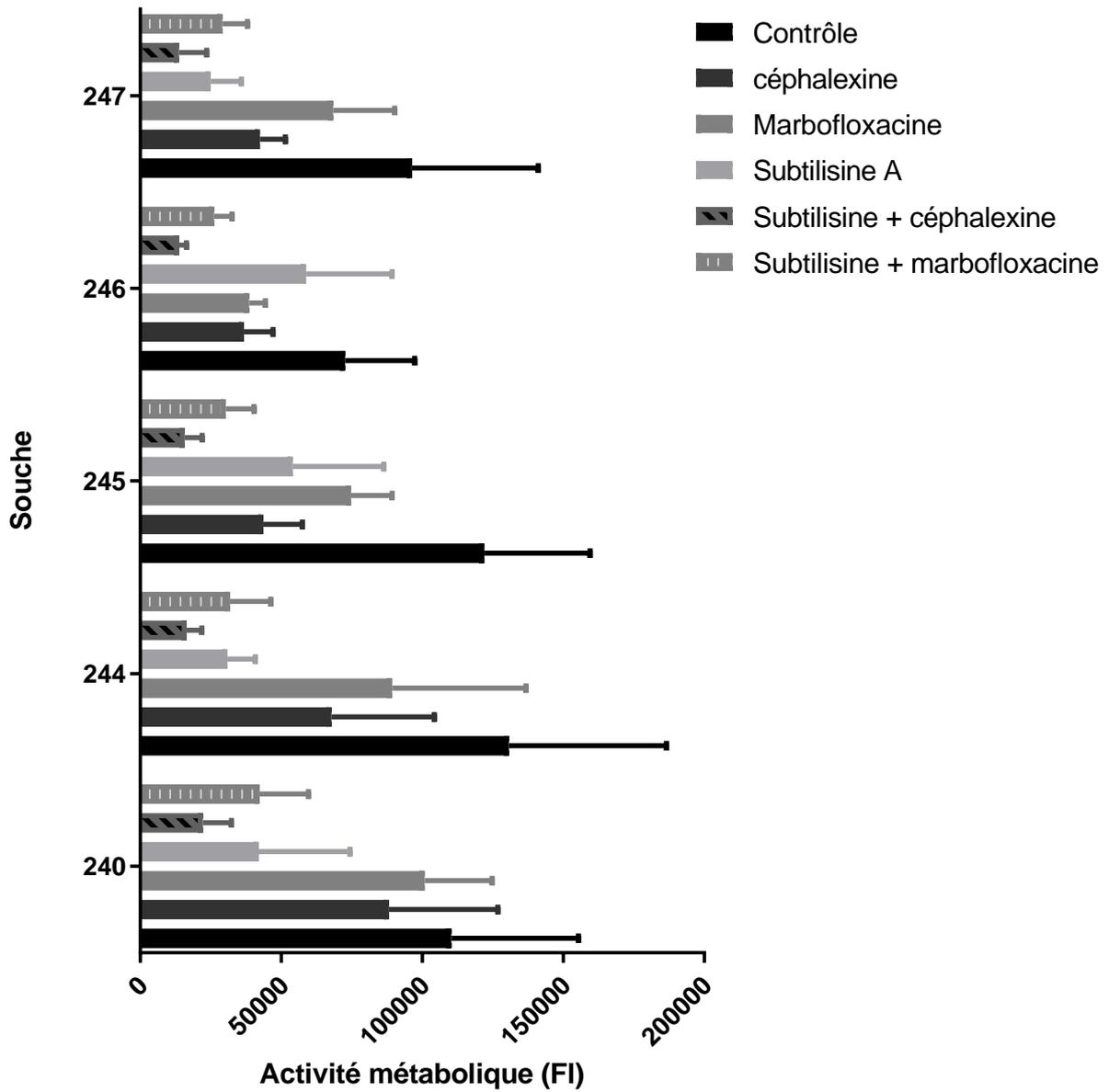
VII. ANNEXES

Annexe 1 : Impact d'une exposition de 24h aux différentes molécules et à leurs combinaisons sur la biomasse des biofilms des différentes souches de *S. pseudintermedius*.



La biomasse correspond à la mesure de la DO_{595} du puit traité et exposé au cristal violet, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle $n = 23$; marbofloxacin $n = 8$; subtilisine A $n = 22$; subtilisine A + marbofloxacin $n = 8$). La barre d'erreur indique l'écart type.

Annexe 2 : Impact d'une exposition de 24h aux différentes molécules et à leurs combinaisons sur l'activité métabolique des biofilms des différentes souches de *S. pseudintermedius*.



L'activité métabolique correspond à la mesure de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 544 nm et de lecture de 590 nm) du puit traité et exposé à la résazurine, soustraite par celle du témoin négatif (sans bactérie). L'histogramme représente les moyennes des valeurs obtenues sur l'ensemble des manipulations réalisées (contrôle n=23 ; marbofloxacin n=8 ; Subtilisine A n=22 ; Subtilisine A + marbofloxacin n=8). La barre d'erreur indique l'écart type.

PAYRASTRE Paul

TITRE : Etude des effets de la subtilisine A, seule ou en combinaison avec des antibiotiques, sur des biofilms de *Staphylococcus pseudintermedius*.

RESUME : Les infections associées à la présence de biofilms bactériens sont difficiles à traiter et nécessitent souvent des antibiothérapies répétées. L'objectif de ce travail était d'étudier les effets de la subtilisine A en combinaison avec de la céphalexine ou de la marbofloxacin sur des biofilms de *S. pseudintermedius* qui sont responsables de pyodermites chez le chien. L'exposition des biofilms formés *in vitro* à la subtilisine A seule a permis une réduction significative de la biomasse et de l'activité métabolique de respectivement 3 et 4 souches bactériennes sur 5 testées. L'association de la subtilisine A à la céphalexine ou à la marbofloxacin a permis d'élargir le spectre avec une activité significative sur respectivement 4 et 5 souches sur 5. La subtilisine A semble donc intéressante pour la prise en charge des biofilms à *S. pseudintermedius* à condition que sa stabilité et son innocuité soient compatibles avec une utilisation chez le chien.

MOTS CLES : Biofilms, Pyodermite, Subtilisine A, Chien, *Staphylococcus pseudintermedius*

TITLE: Study of the effects of subtilisin A, alone or in combination with antibiotics, on *Staphylococcus pseudintermedius* biofilms.

ABSTRACT: Bacterial biofilms-associated infections are difficult to treat and often require repeated antibiotic therapy. The aim of this work was to study the effects of subtilisin A in combination with cephalexin or marbofloxacin on *S. pseudintermedius* biofilms that are a leading cause in dogs pyoderma. Exposure of biofilms formed *in vitro* to subtilisin A alone resulted in a significant decrease in biomass and metabolic activity of respectively 3 and 4 bacterial strains out of 5 tested. The combination of subtilisin A with cephalexin or marbofloxacin allowed to widen the spectrum with a significant activity on respectively 4 and 5 strains out of 5. Subtilisin A thus seems interesting for the management of *S. pseudintermedius* biofilms, provided that its stability and safety are compatible with its use in dogs.

KEYWORDS: Biofilms, Pyoderma, Subtilisine A, Dogs, *Staphylococcus pseudintermedius*