



**Vie bactérienne communautaire (2),
l'union fait la force: les biofilms**

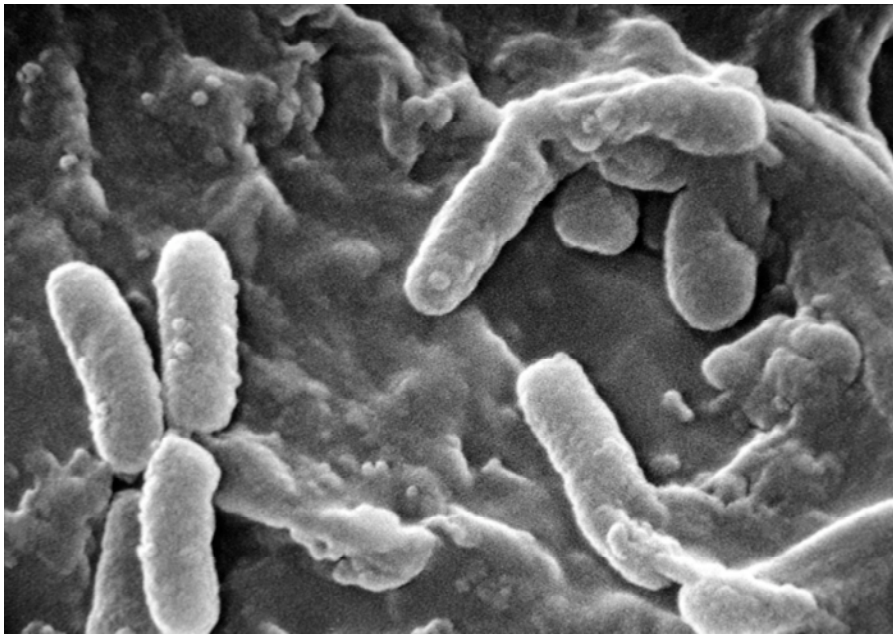
Philippe Sansonetti

Leçon # 4

e pluribus unum ?

La plupart des espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces.

Certainly we felt that pure, planktonic cultures were the only way to work. Yet, in nature, bacteria don't live like that, in fact most of them occur in mixed, surface-dwelling, communities.

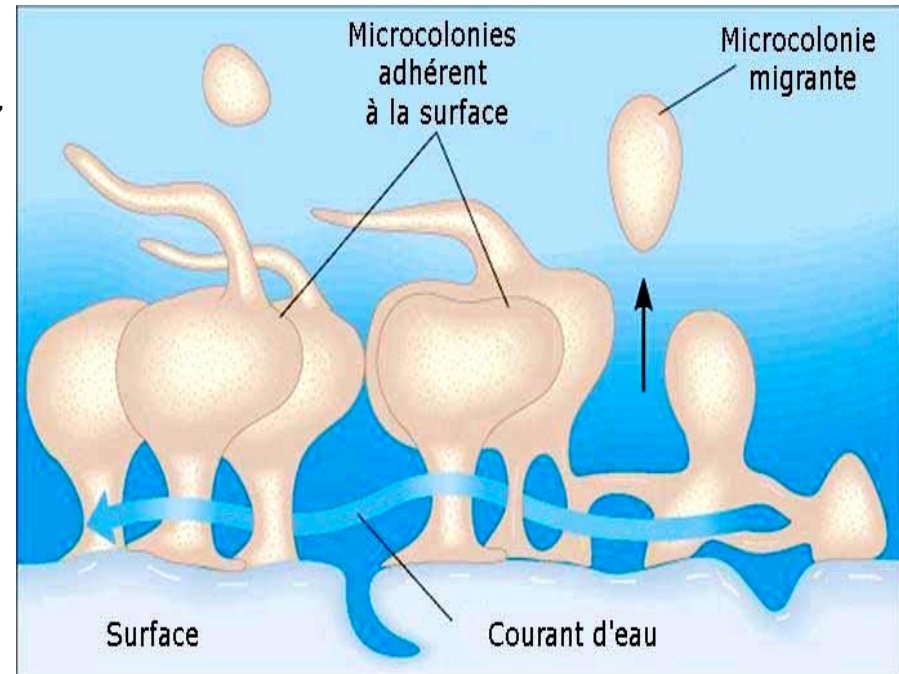


Roberto Kolter

Définition

Sutherland IW. 2001. Trends Microbiol., 9:222-227

Le biofilm est une communauté de microorganismes (bactéries, champignons, autres ?) fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.

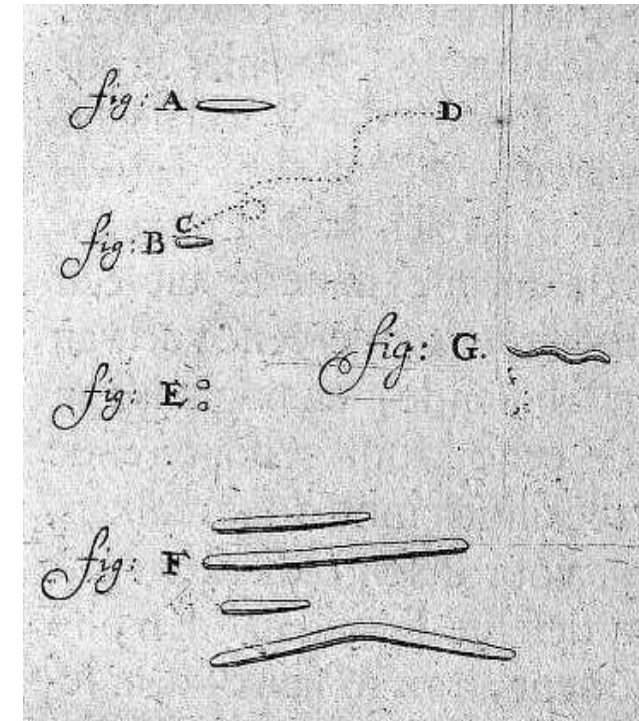
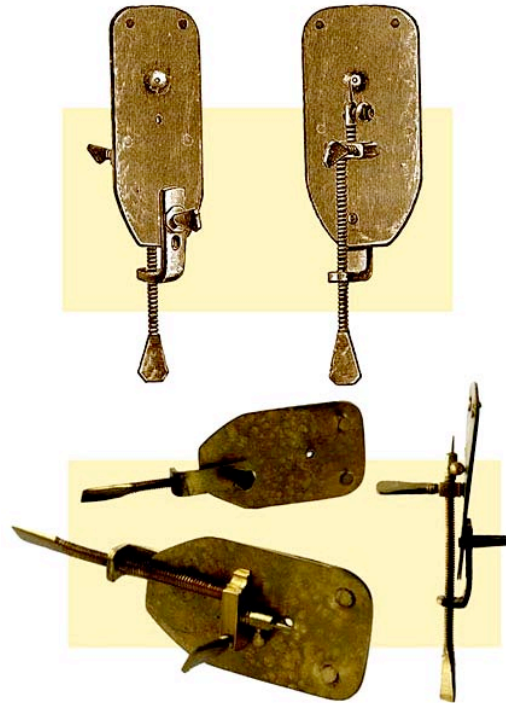


Les biofilms sont ubiquitaires, ils concernent le monde animal, végétal, minéral, aquatique, technologique. C'est une structure vivante, dynamique, en perpétuel remaniement.

Leur effet est souvent perçu comme délétère car les aspects médicaux (infections nosocomiales sur dispositifs invasifs) et technologiques (*sludge* = obstruction des tuyauteries, perte de glisse des coques de bateaux) sont mis au premier plan.

Ils ont aussi des effets positifs...

Historique (1)



1683

Antonie Van Leeuwenhoek observe la présence de microorganismes (animalicules) issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire.

Il peut être considéré comme le découvreur des biofilms...

Historique (2)

250 ans plus tard...

Heukalagian & Heller (1940) observent « l'effet de bouteille »: la fourniture d'un substrat solide auquel des microorganismes marins peuvent s'attacher augmente leur croissance et activité métabolique (Heukelekian H, Heller A. 1940. J. Bacteriol.,40:547-558)

Zobell (1943) observe que dans le milieu marin la quantité de bactéries fixée à un substrat est largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide (Zobell CE. 1943. J.Bacteriol.,46:39-56)

Jones (1969), travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux, grâce à l'utilisation de la microscopie électronique à transmission et à balayage, ajoutant le rouge de Ruthénium (marquage des sucres) au tétr oxyde d'Osmium, confirme non seulement les agrégats mono ou polymicrobiens, mais aussi l'existence d'une matrice polyosidique (Jones et coll. 1969. J.Bacteriol.,99:316-325).

Historique (3)

Characklis (1973) démontre que des dépôts microbiens au sein de conduites d'eau de systèmes industriels apparaissent tenaces et résistants aux désinfectants (Characklis WG. 1973. Water Res.,7:1249-1258).

Costerton (1978), sur la base de l'observation de l'ultrastructure de la plaque dentaire et de communautés microbiennes sessiles dans les torrents de montagne, propose la **théorie des biofilms** (Costerton et coll. 1973. **How bacteria stick**. Sci.Am.,238:86-95).

La perception de l'importance des biofilms microbiens en médecine a été largement encouragée par les observations initiales sur la plaque dentaire et le rôle des communautés microbiennes complexes et organisées dans la carie dentaire (« slime » polyosidique de *Streptococcus mutans*).

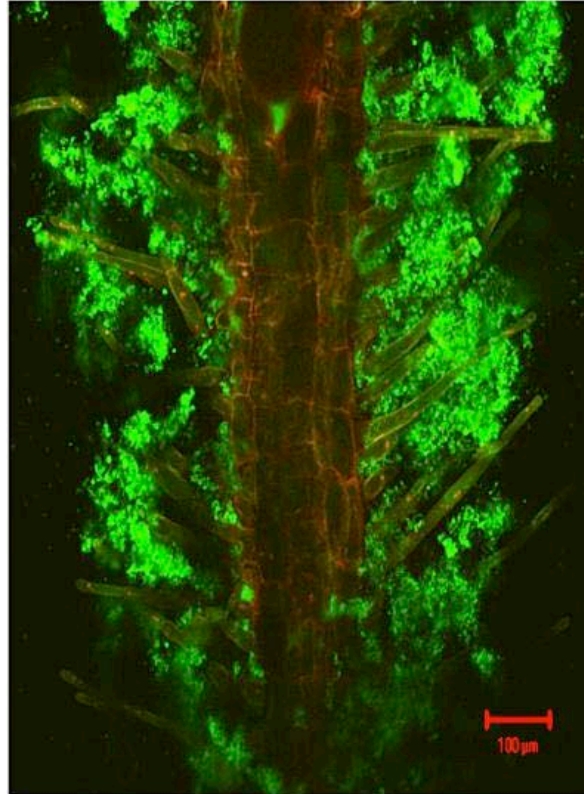


Sludge / corrosion tuyauteries



Rôle ubiquitaire des biofilms

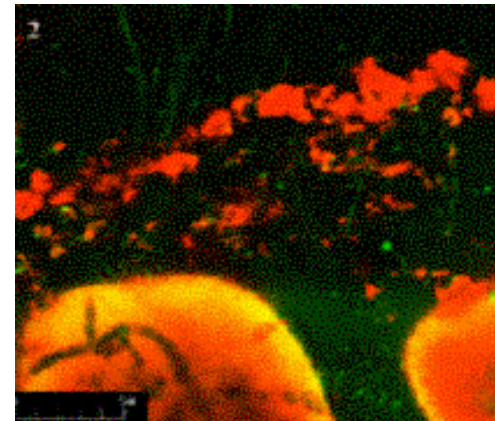
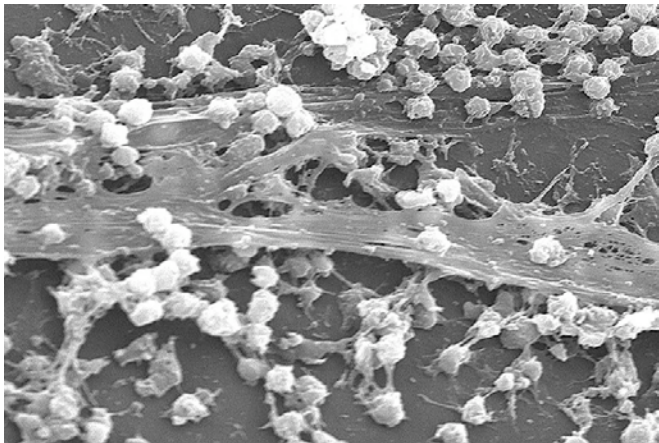
B. subtilis / racine d'Arabidopsis



Stromatolithes
Shark Bay (Australie)



S. aureus / cathétère



Plaque dentaire



A l'échelle de la planète, le biofilm est probablement le mode de vie dominant des bactéries

1 - Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999.
Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.
Science, 284: 1318-1322

2 - Coetser SE, Cloete TE. 2005.
Biofouling and biocorrosion in industrial water systems.
Crit.Rev.Microbiol., 31:213-232 [Dispositive 3](#)

3 - Walker JJ, Spear JR, Pace NR. 2005.
Geobiology of a microbial endolithic community in the
Yellowstone geothermal environment.
Nature, 434:1011-1014

4 - Rinaudi LV, Giordano W. 2009.
An integrated view of biofilm formation in rhizobia.
FEMS Microbiol.Lett., 12:708-714

1 + 2 - Declerck P et coll. 2009.
Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms
of water distribution pipes.
Microbiol.Res., 164:593-603



Mode de vie des bactéries

La vie microbienne sédentaire, en **biofilm**, est l'un des deux modes de vie des organismes unicellulaires.

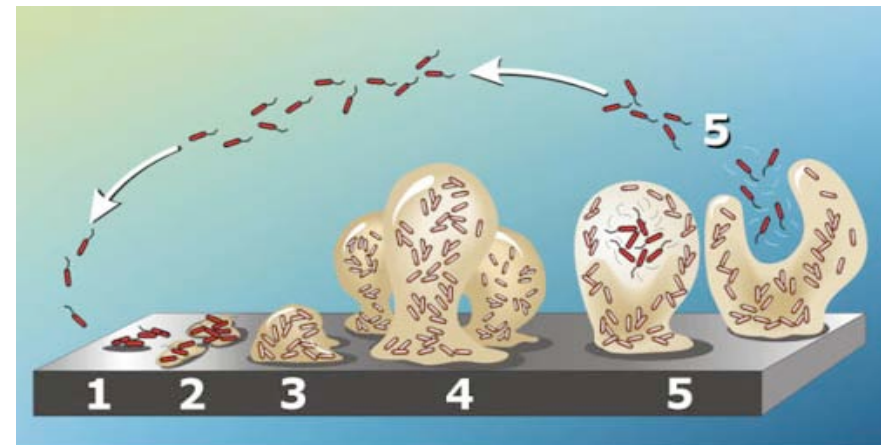
Il représente un mode de vie ancien, essentiel au cycle de vie des procaryotes, prévalent dans divers environnements, dominant en milieu hostile (Hall-Stoodley L et coll. 2004. Nat.Rev.Microbiol., 2:95-108).

La structure et la physiologie du biofilm donnent aux microorganismes qui le constituent des conditions d'organisation sociale proches de celles qu'établissent entre elles les cellules eucaryotes au sein des tissus.

L'autre mode de vie, nomade, est la flottaison en milieu liquide dite **planctonique**.

Cycle «biofilmisation - planctonisation»

Beloin C et coll. 2008. Curr.Top.Microbiol.Immunol., 322:249-289



Définition « classique »

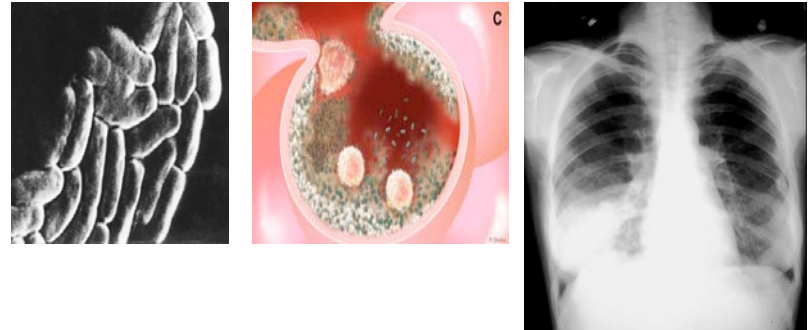
La définition d'un biofilm comporte deux critères qui restent largement contextuels et morphologiques (descriptifs):

- Constitution d'une communauté mono ou polymicrobienne au niveau d'une surface solide, incluant en médecine surface de l'émail dentaire (plaque dentaire) et corps étrangers (prothèses, valves artificielles, cathétères), sur laquelle elle acquiert une structure tridimensionnelle (bactéries sessiles)
- Associée à la formation par les microorganismes concernés d'une matrice extracellulaire constituée de polymères complexes : « Extracellular Polymeric Substance » (EPS = polysosides, ADN).

Difficulté de définir des critères moléculaires, en particulier une signature transcriptionnelle, du fait de l'hétérogénéité d'état physiologique des bactéries constitutives (temps/espace)

(Beloin C & Ghigo JM. 2005. Trends Microbiol.,13:16-19)

Définition « élargie » Surfaces inanimées & animées



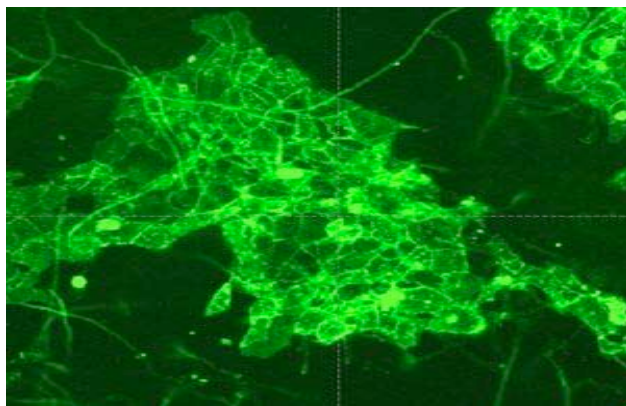
Le concept s'est rapidement étendu,
surfaces non obligatoirement solides:

-Formations de communautés à l'interface air-liquide/gel/mucus
(Ferguson BJ, Stolz DB. 2005. Am.J.Rhinol., 19:452-457)

- Adhérence à des surfaces animées: muqueuses aux défenses
altérées, ou de surface rugueuse

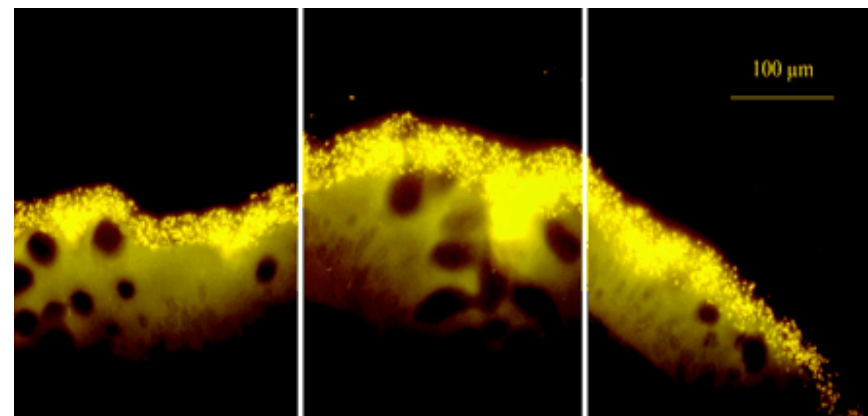
(Characklis WG et coll. 1990. Biofilms, New York, John Wiley & Sons, pp341-394)

Aspergillus fumigatus. Hyphes
surface épithélium trachéal (CF)



Seidler MJ et coll., 2008,
Antimicrob.Agents Chemother.,52:4130-4136

Bacteroides fragilis - FISH
visualisé avec une sonde Bfra-Cy3



Swidsinski A et coll., 2005,
J.Clin.Microbiol., 43:3380-3389

Biofilms et médecine

60 % des infections bactériennes impliquent des biofilms (NIH)

Infections nosocomiales

Union Européenne (European Center for Disease Prevention and Control):

3 millions/an, 50 000 décès (<http://www.ecdc.int/index.html>)

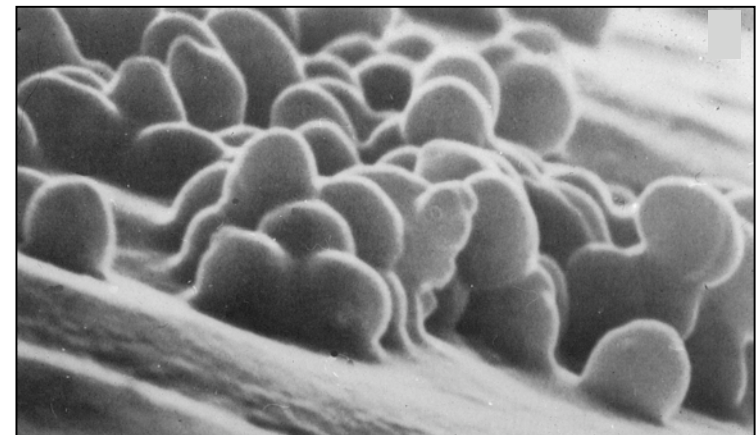
USA (Centers for Diseases Control and Prevention):

1,7 million/an, 99 000 décès (CDC Report, 2007)

60-70 % des infections nosocomiales sont liées à l'implantation d'un dispositif médical/chirurgical et aucun n'échappe à l'infection (sondes urinaires, canules d'intubation, valves cardiaques, prothèses vasculaires et orthopédiques, shunts cérébro-vasculaires, lentilles de contact, dispositifs intra-utérins, etc...) .

La physiopathologie de ces infections est liée initialement à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers.

Les biofilms tuent !



Cadre général

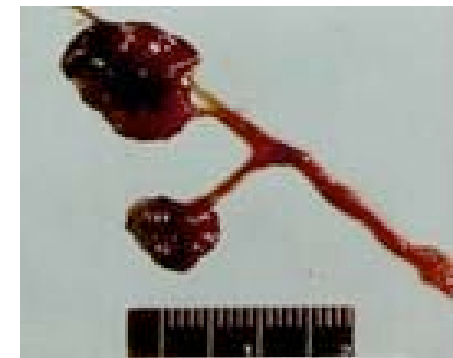
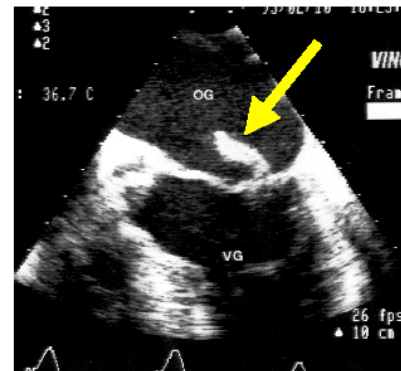
Le développement d'une infection dont la physiopathologie repose sur l'existence d'un biofilm représente une situation grave, aux conséquences importantes (nécessité d'ablation du matériel étranger, changement dans la vie d'un patient atteint de mucoviscidose lors de la survenue du premier épisode de surinfection bronchique, etc...) et au pronostic parfois précaire.

Ces infections sont souvent chroniques et/ou récidivantes et recouvrent des situations difficiles à gérer: bactériémies/septicémies récurrentes par « planctonisation » de microorganismes constitutifs du biofilm, espèces bactériennes non-cultivables, inflammation chronique, arrêts de cicatrisation, dissémination d'embols septiques (infections sur prothèses valvulaires ou vasculaires).



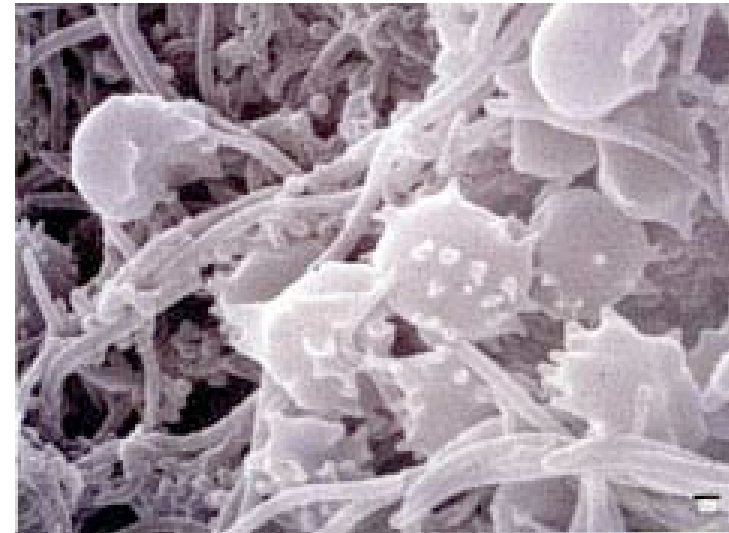
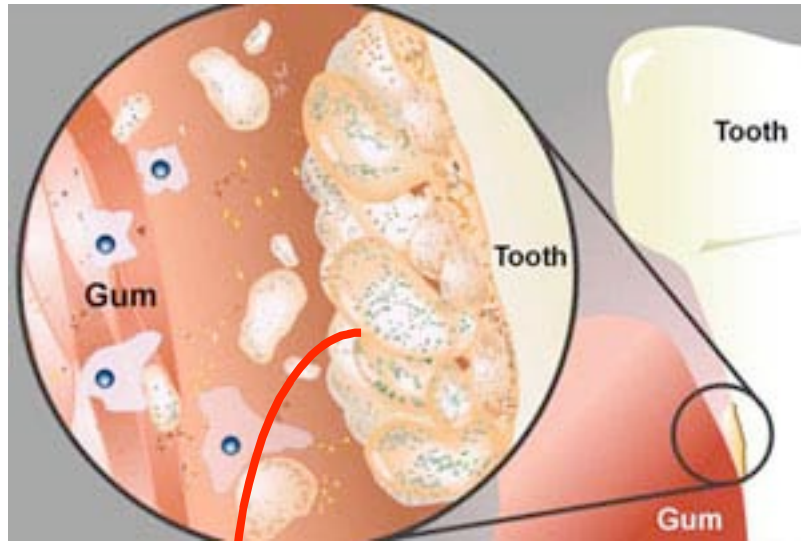
Ostéomyélite
fémorale
périprothétique

Végétation valve mitrale / anévrysme mycotique



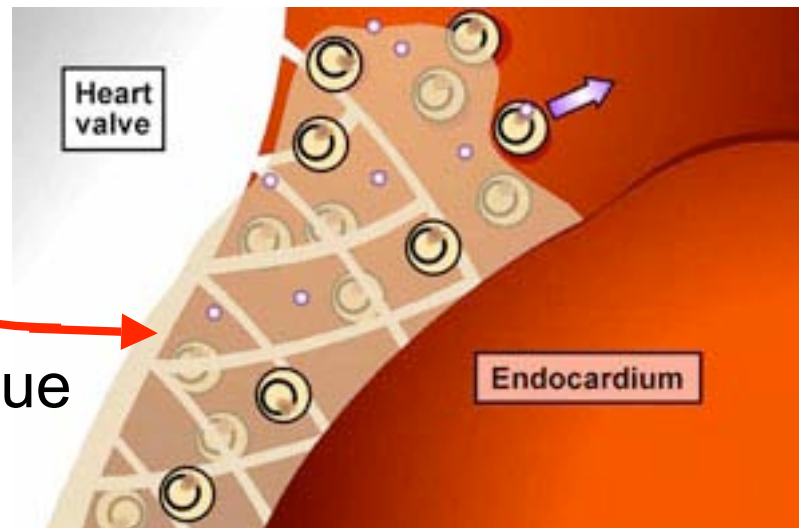
D'un biofilm à l'autre...

Plaque dentaire = biofilm



Planctonisation, circulation systémique de bactéries (streptocoques) issues du biofilm de la plaque dentaire

Végétation endocarditique valvulaire = biofilm

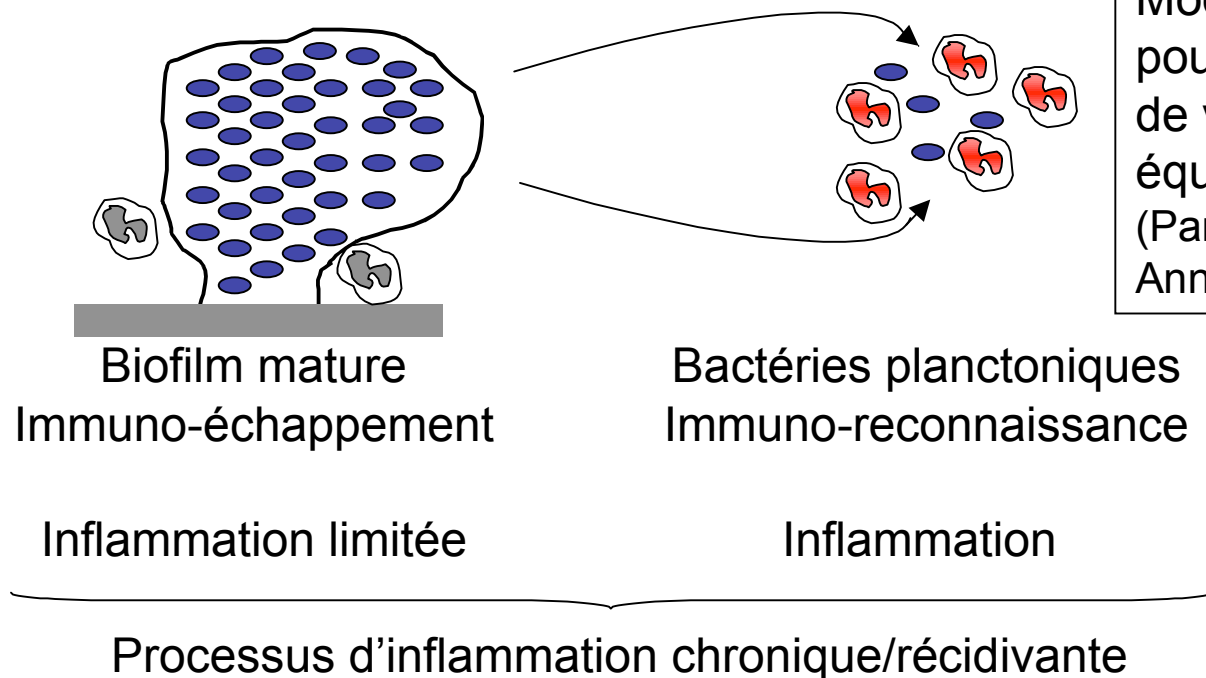


Biofilm et inflammation chronique

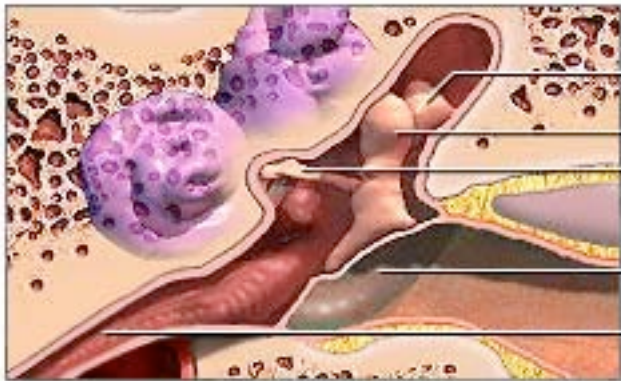
Une fois un biofilm établi, sa fragmentation brutale peut causer des embols métastatiques dramatiques (embol septique cérébral)

Les bactéries planctoniques quittent périodiquement le biofilm, se multiplient et se dispersent dans la circulation.

Programmation génétique du cycle biofilmisation-planctonisation (séminaire J-M Ghigo)

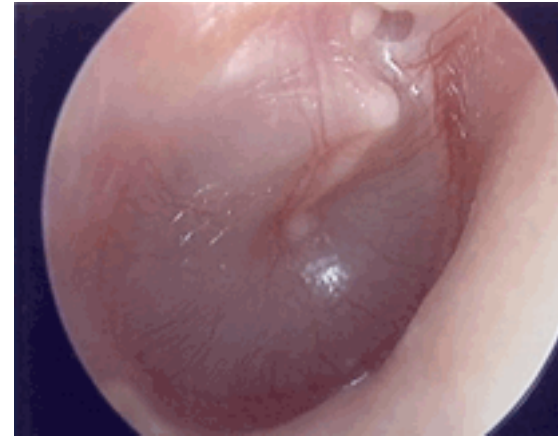


Mode de survie idéal pour un microorganisme de virulence intermédiaire: équilibre défense-survie (Parsek MR. 2003. Ann.Rev.Microbiol.)



Enclume
Marteau
Etrier
Tympan
Trompe d'Eustache

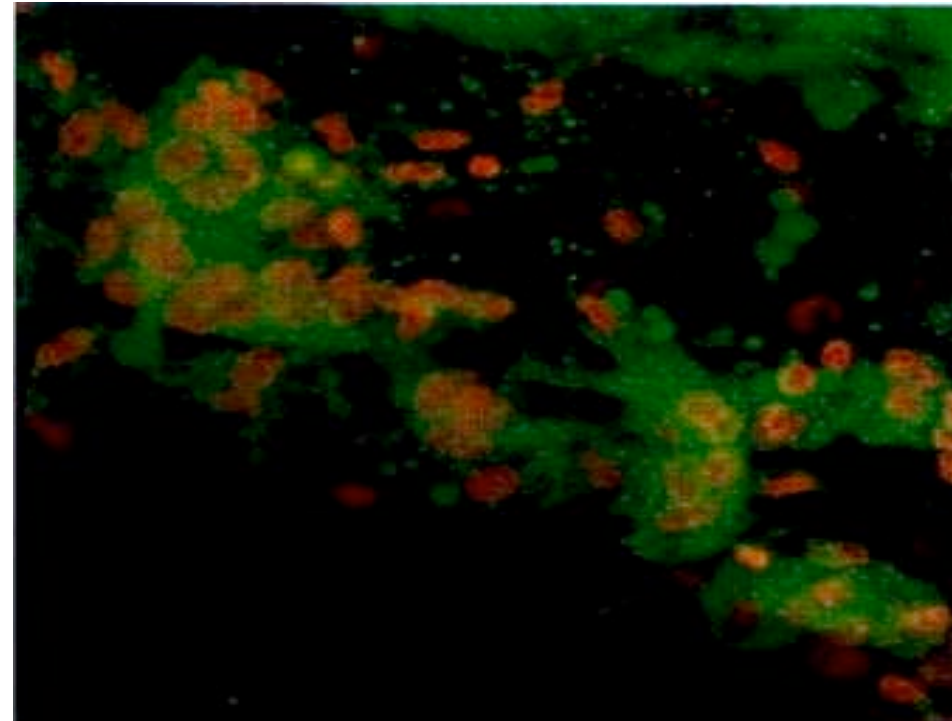
Oreille moyenne



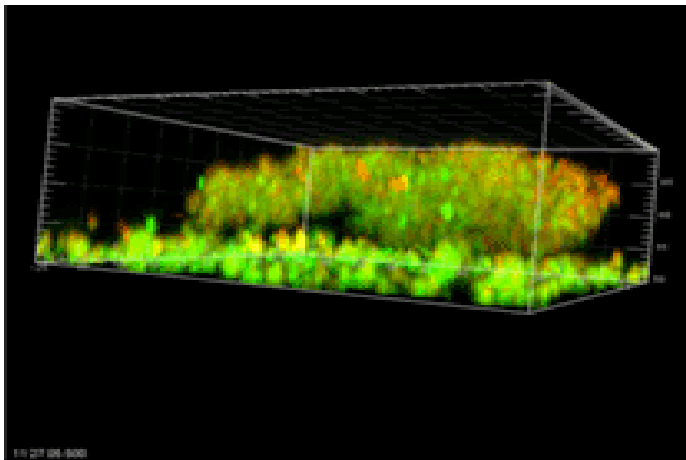
Otite moyenne



Oteite Moyenne
Inflammation et épanchement



Biofilm (*H. influenzae* et *S. pneumoniae*)



Trois caractéristiques dominantes des biofilms médicaux:

« **Récalcitrance** » des bactéries aux antibiotiques

Persistance malgré une réponse immunitaire soutenue

Hétérogénéité métabolique de la population bactérienne due à l'accumulation de multiples microniches:

- Zones privées de nutriments où les bactéries prennent un phénotype « dormant » de phase stationnaire
- Gradients de concentration d'oxygène faisant alterner des zones anoxiques/acides avec des zones oxygénées/neutres

Cette hétérogénéité participe sans doute largement aux propriétés de récalcitrance et de persistance

Hétérogénéité phénotypique des biofilms

Les bactéries des biofilms sont fonctionnellement hétérogènes

(Hall-Stoodley L et coll. 2004. Nat.Rev.Microbiol.,2:95-108; Lenz et coll. 2008. Appl.Environment. Microbiol., 74:4463-4471; Bagge N et coll. 2004. Antimicrob.Agents Chemother.,48:1168-1174):

Différences d'expression de protéines de surface

De niveaux de résistance aux antibiotiques

D'utilisation de nutriments

D'expression de facteurs de virulence

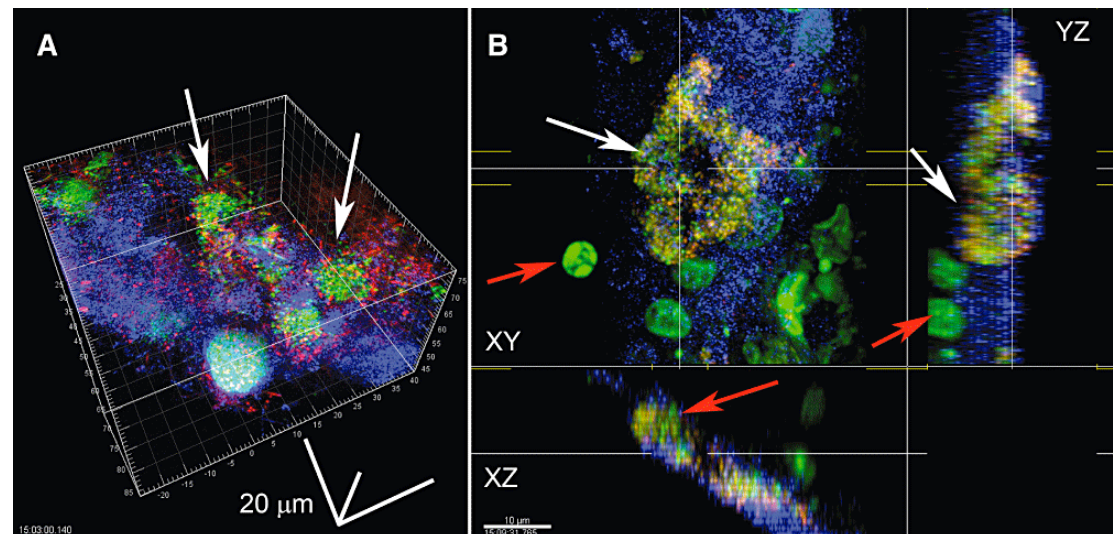
Les bactéries coordonnent leur comportement dans les biofilms

(Jensen PO et coll. 2007. Microbiol., 153:1329-1338)

Grâce à l'émission/perception de signaux intercellulaires en fonction de leur densité (Quorum Sensing) et à la perception de paramètres environnementaux (systèmes à deux composants)

Microscopie confocale: analyse d'aggrégats de biofilms (flèches blanches) constitués de cocci et bacilles au sein d'une végétation adénoïde (otite chronique)
Marquage par kit ADN vivant/mort.
Bactéries vivantes = vertes,
Bactéries mortes = rouges
Cellules inflammatoires = noyaux (flèches rouges)

Opportunités d'adaptation !



Hall-Stoodley L, Stoodley P. 2009. Cell.Microbiol., 11:1034-1043

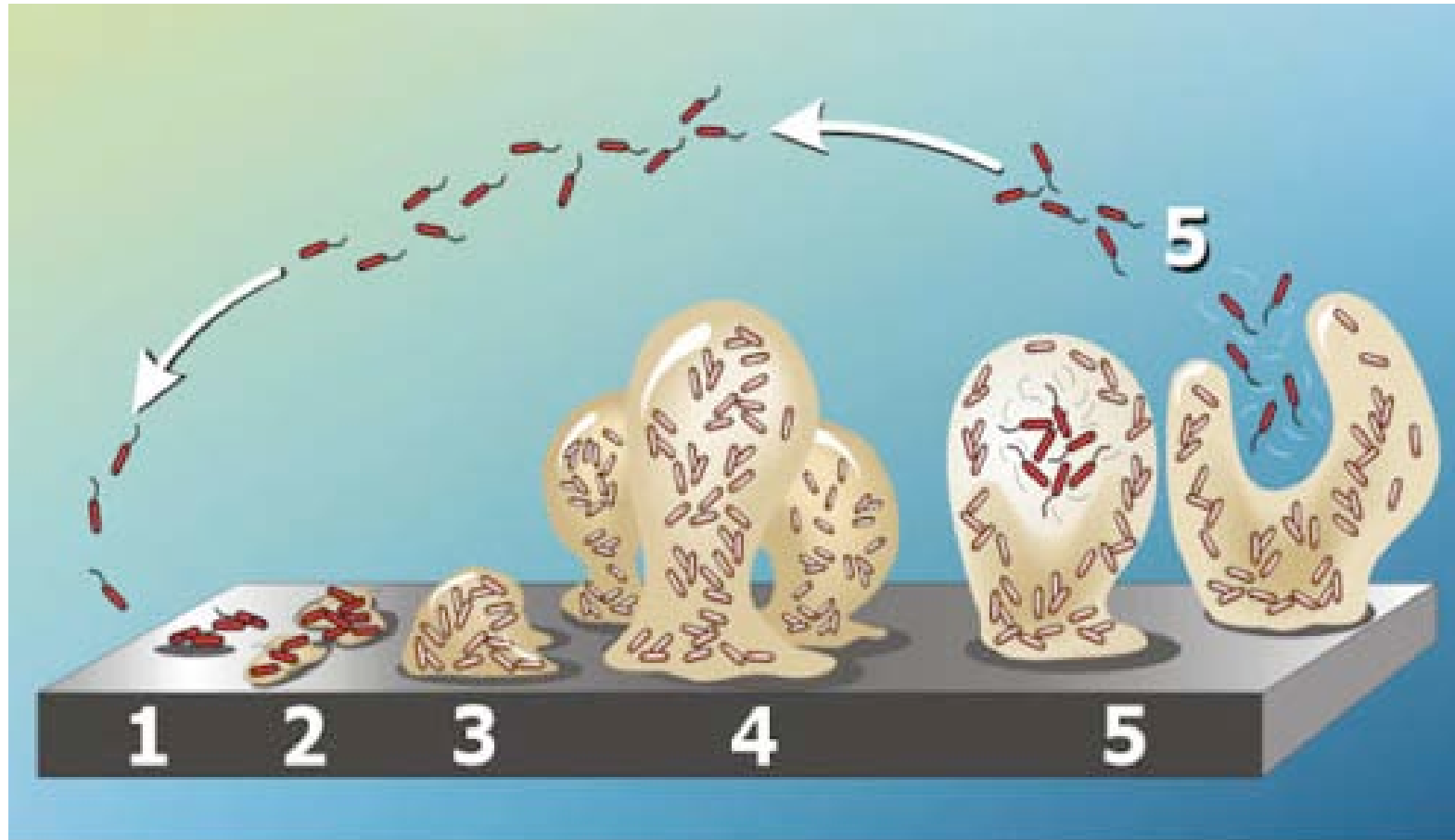
Analyse génétique et moléculaire de la constitution des biofilms

- 1 - Construction / déconstruction des biofilms
(bases génétiques, moléculaires et cellulaires)
- 2 - Concept de « récalcitrance » aux antibiotiques
- 3 - Infection, inflammation, réponse immunitaire: le paradigme d'immunoéchappement des bactéries en biofilm
- 4 - Vers une extension du concept de biofilms ?
(biofilms intracellulaires, biofilms viraux)
- 5 - Nouvelles approches pour la détection et le contrôle des biofilms médicaux

(Beloin C, Roux A, Ghigo JM. 2008.Curr.Top.Microbiol.Immunol.,322:249-289
Lemon KP et coll. 2008. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 322:1-16)

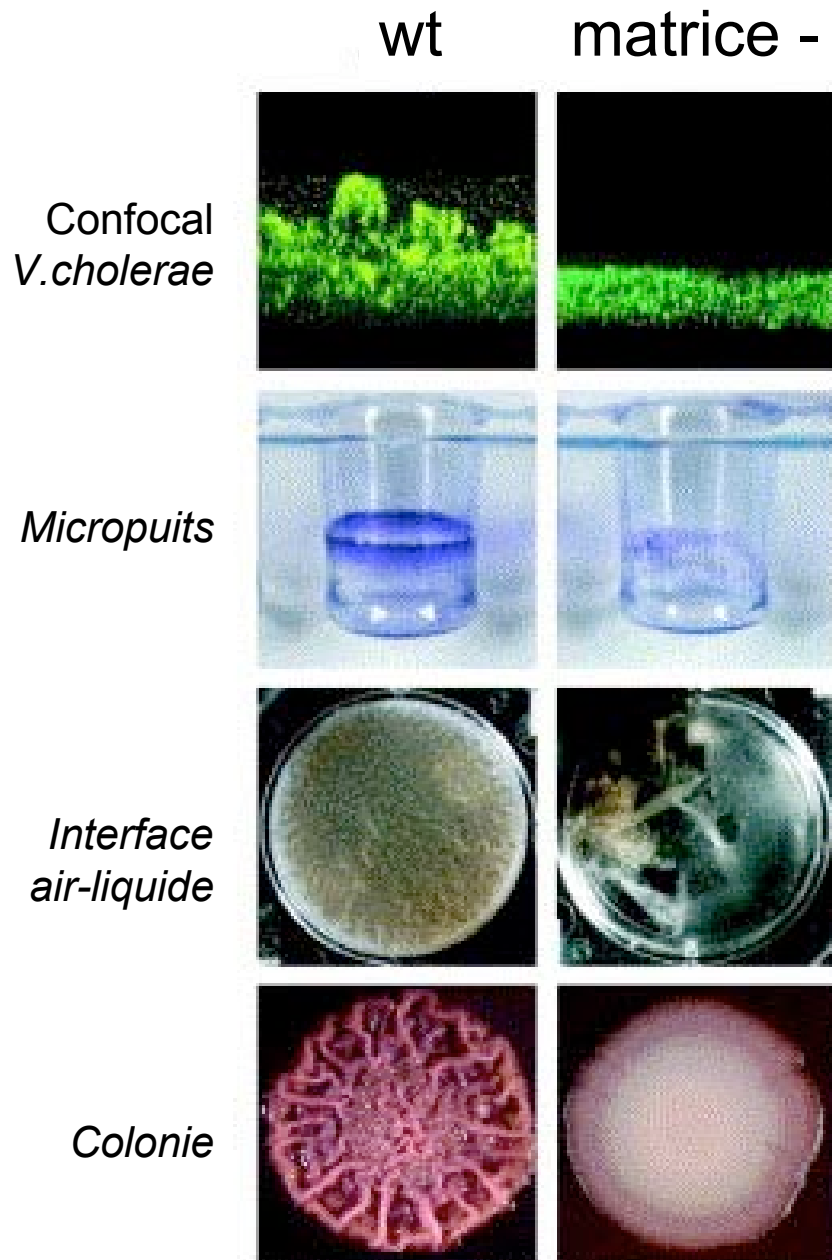
Construction / déconstruction d'un biofilm

“Planctonisation, nomadisme”

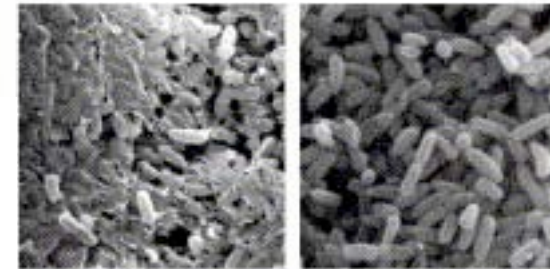


“Biofilmisation, sédentarité”

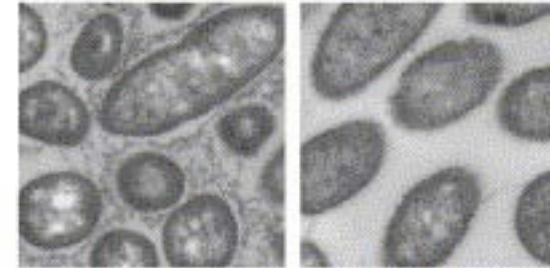
Outils d'étude des biofilms au laboratoire



SEM



TEM



wt

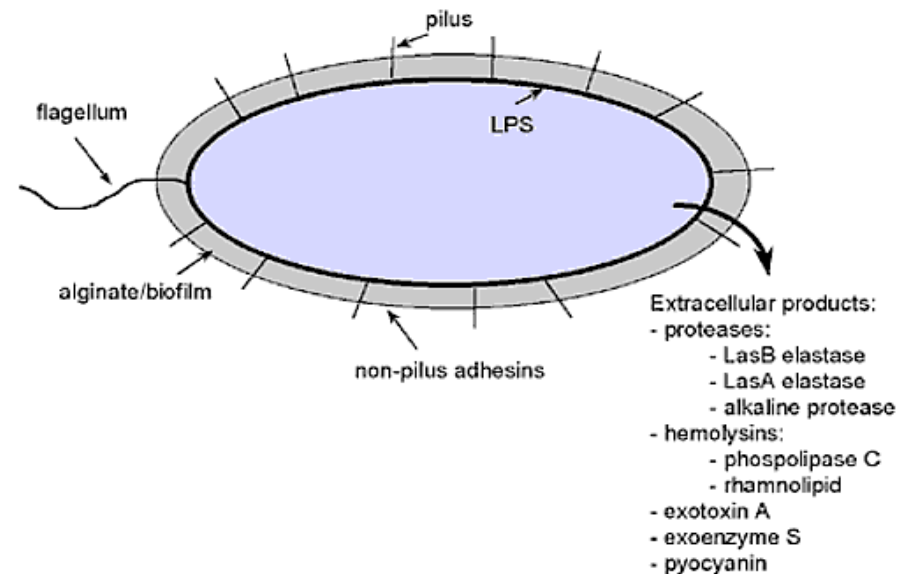
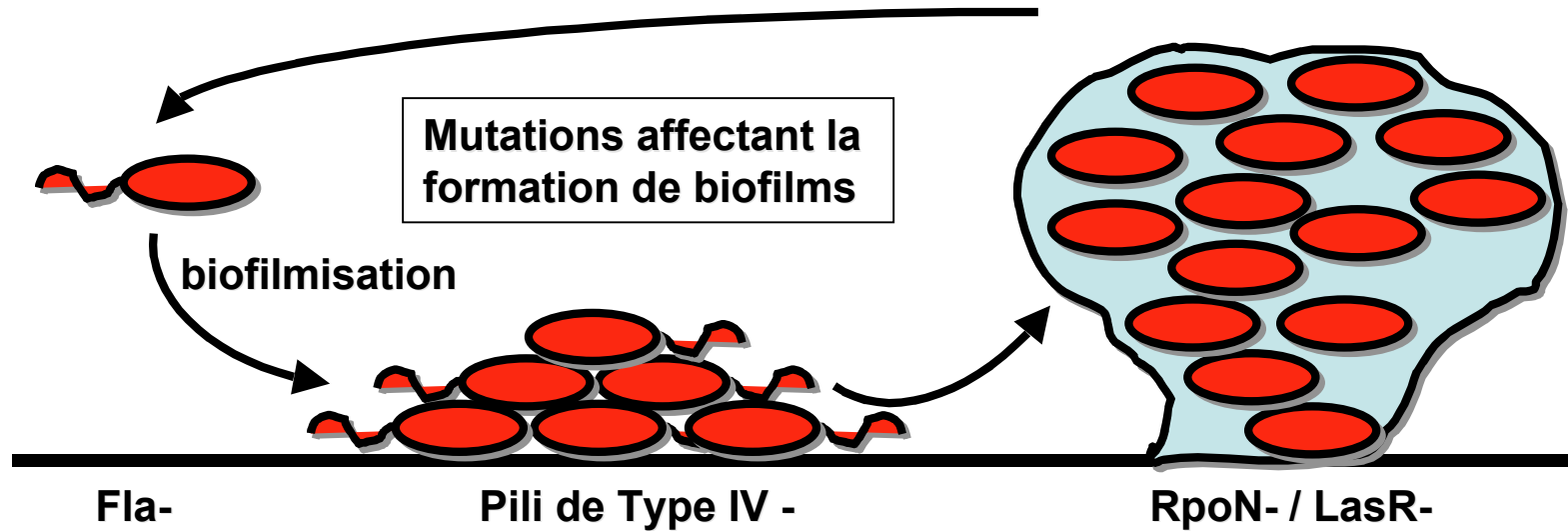
matrice -

Visualisation de la matrice extracellulaire.
Biofilm formé par *P. aeruginosa* wt et
mutant déficient en production de matrice.

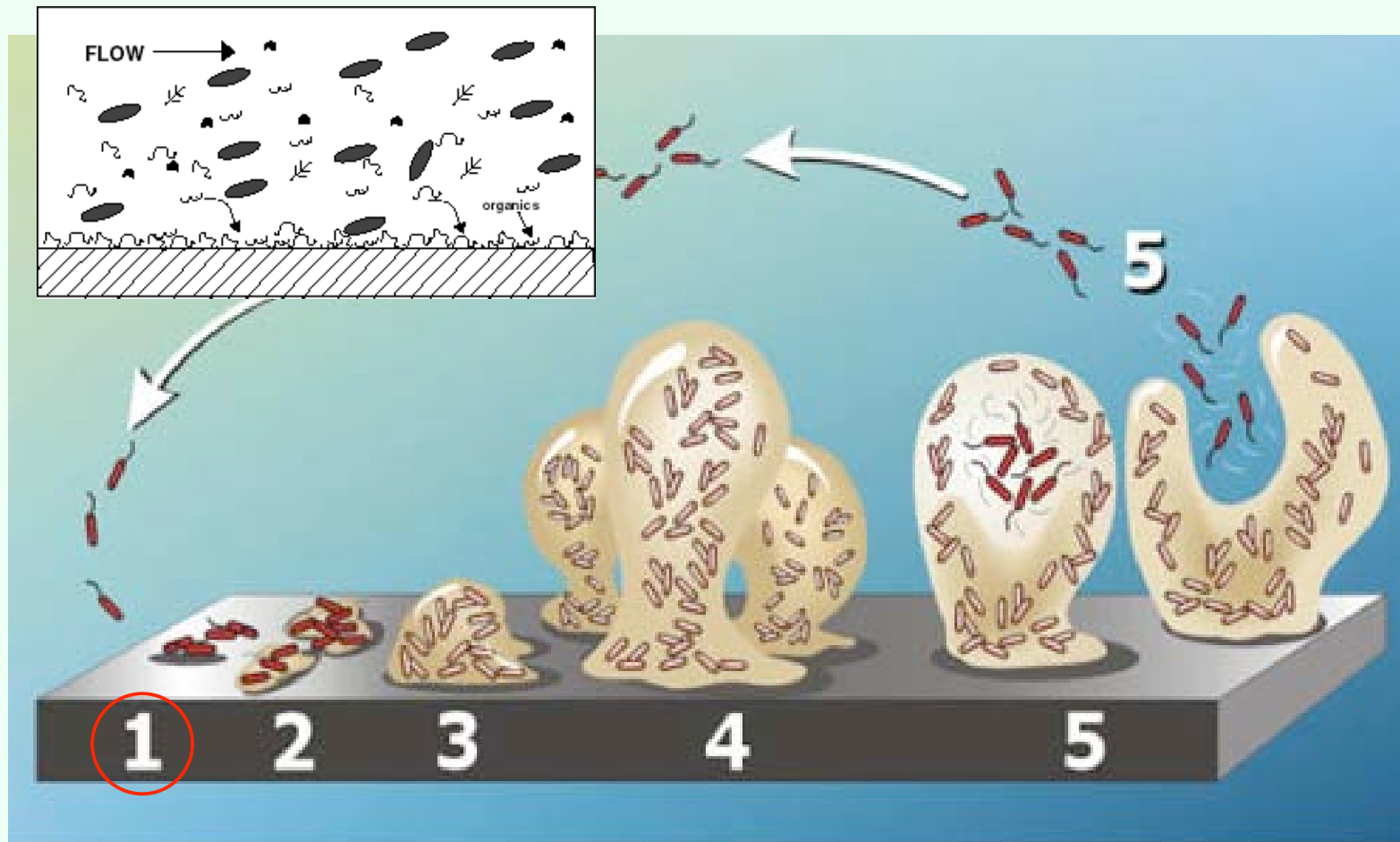
Formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*

Implication des signaux intercellulaires du QS dans le développement de biofilms bactériens

planctonisation Davies DG et coll. 1998. Science. 280:295-298



1^{ère} étape: “conditionnement” de la surface



Adsorption de macromolécules formant un “**film de conditionnement**”.
Traces de matières organiques neutralisant charges excessives et énergie libre de surface qui préviennent l'établissement d'une proximité entre bactéries et surface (Mueller RF et coll. 1992. Biotechnol.Bioeng.,39:1161-1170).

Conditions préalables à l'attachement des bactéries pionnières (fondatrices du biofilm)

Les microorganismes s'attachent plus rapidement et plus efficacement à des surfaces hydrophobes et non polaires.

(Bendinger R et coll. 1993. Appl.Environ.Microbiol., 59:3973-3977

Pringle JH & Fletcher M. 1983. Appl.Environ.Microbiol.,45:811-819

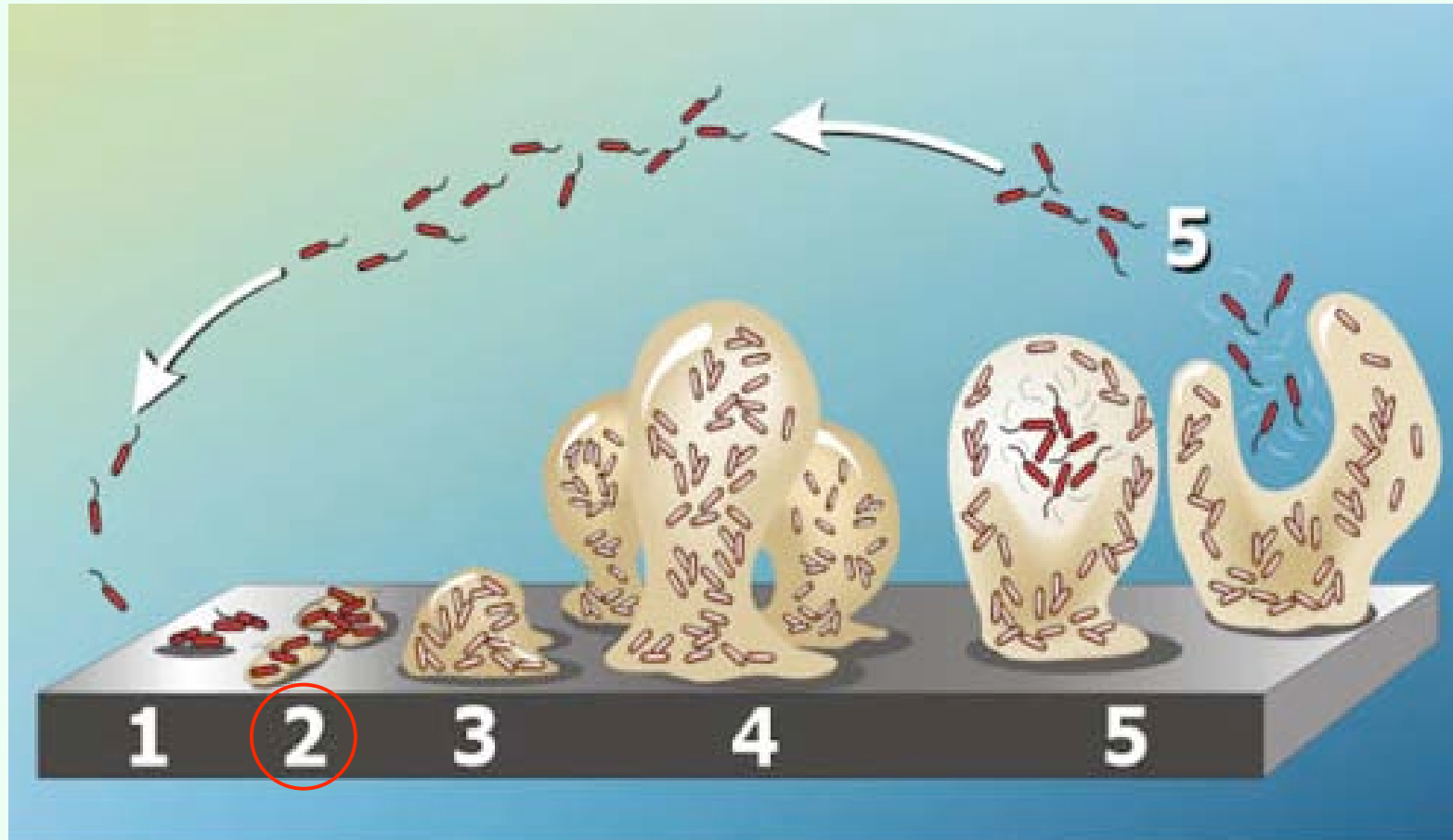
Fletcher M & Loeb GI. 1979. Appl.Environ.Microbiol.,37:67-72)

Les molécules organiques constituant le film de conditionnement peuvent aussi servir de source de nutriments aux bactéries en cours d'attachement, permettant le succès de l'étape de colonisation primaire pour ces bactéries pionnières.

Le taux d'établissement des bactéries pionnières dépend aussi de la rhéologie locale, en particulier des caractéristiques de vitesse et de turbulence du milieu liquide environnant contenant les bactéries en suspension.

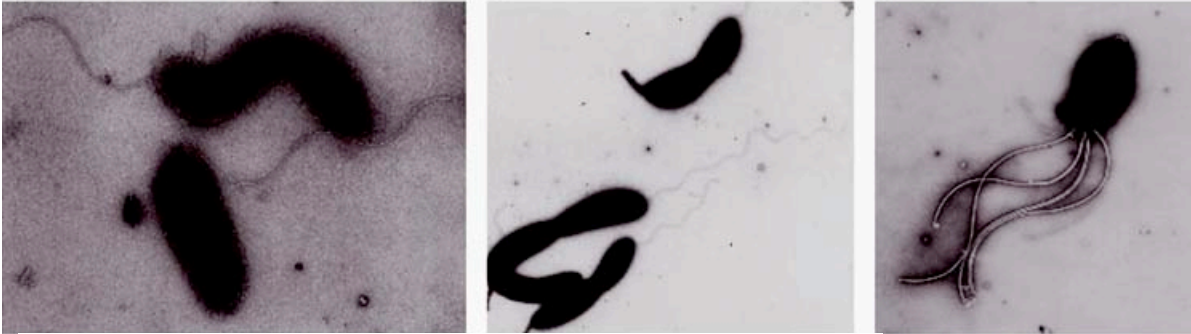
(Donlan RM. 2002. Emerg.Infect.Dis.,8:881-890)

2^{ème} étape: mouvement bactérien vers la surface conditionnée

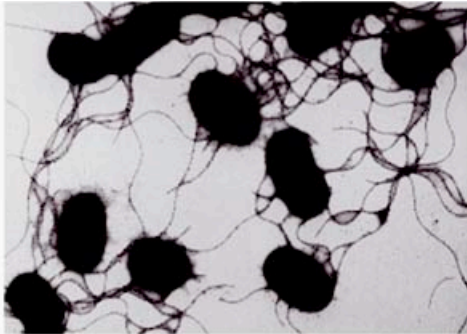


Accès des bactéries à la surface conditionnée: **chimiotaxie/motilité**, sédimentation, mouvement Brownien, transport convectif

Vibrio cholerae *Caulobacter crescentus* *Vibrio fischeri*



Flagelles



Escherichia coli
Salmonella



Spirochètes
Nature Reviews | Microbiology



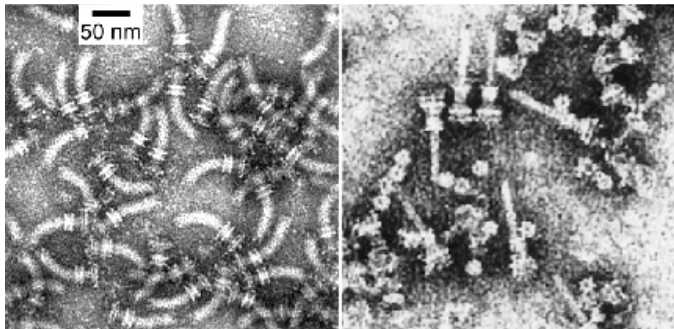
Monotriche



Lophotriche



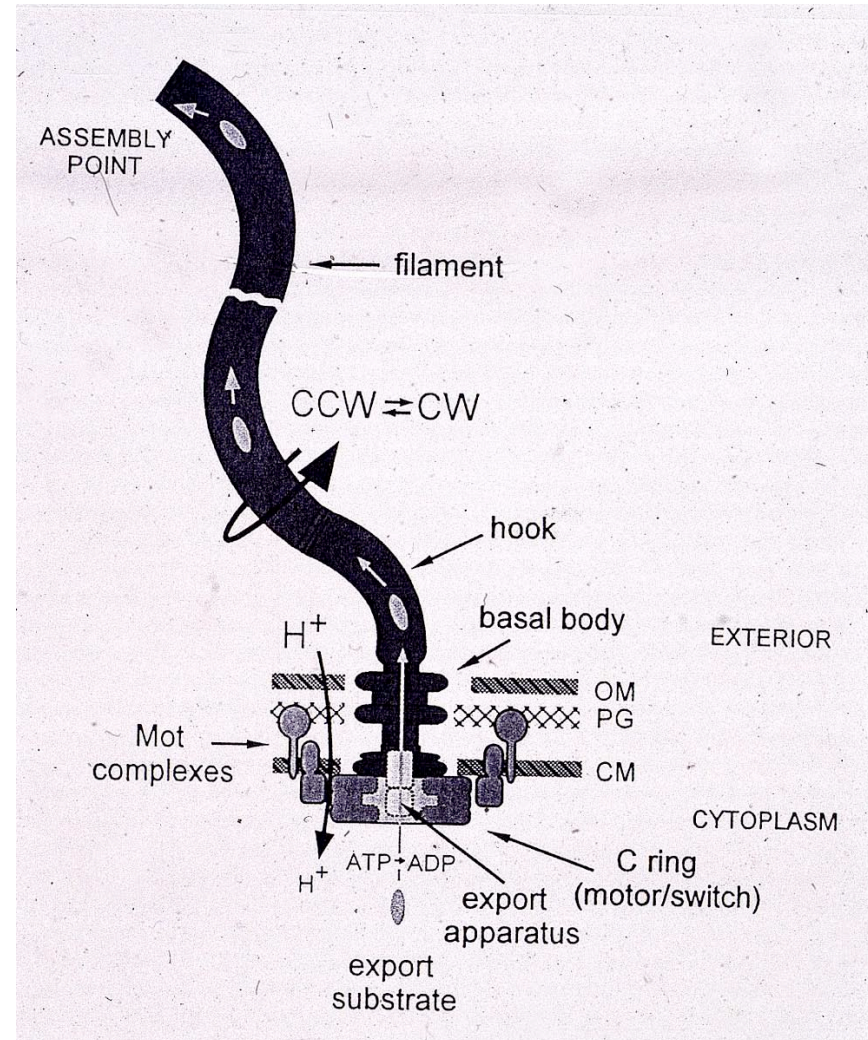
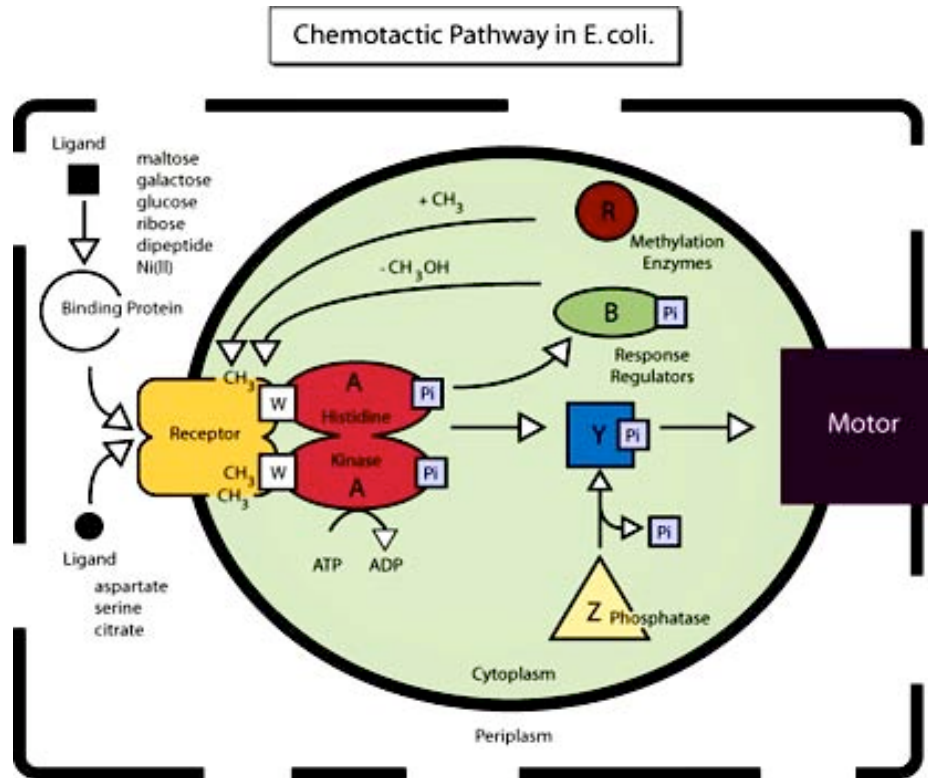
Péritriche



Flagelles

TTSS

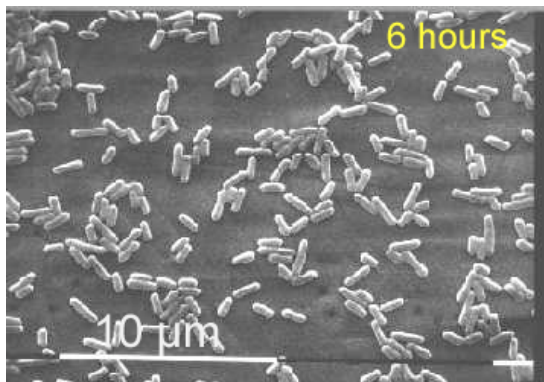
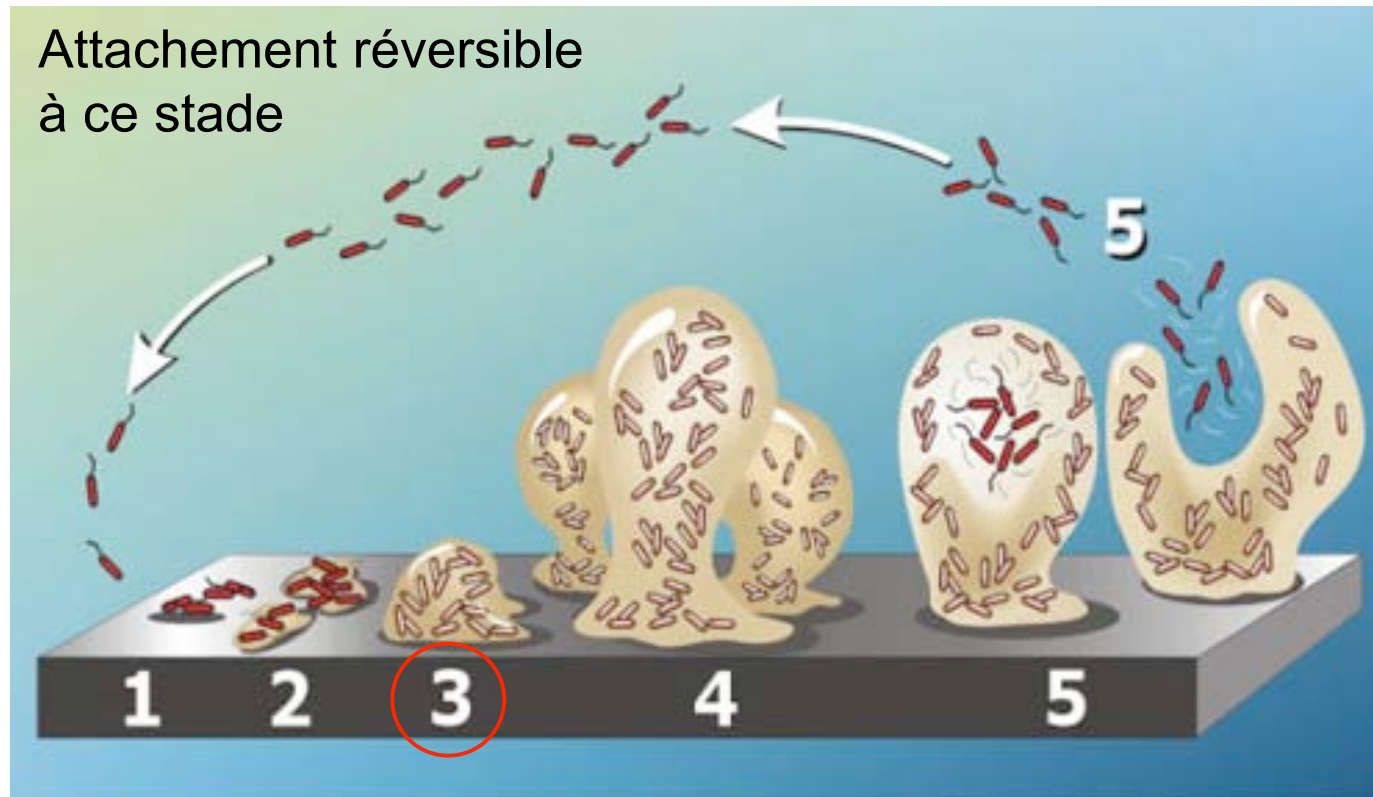
Couplage chimiotaxie-motilité



Le flux de protons assure le mouvement rotatif du flagelle

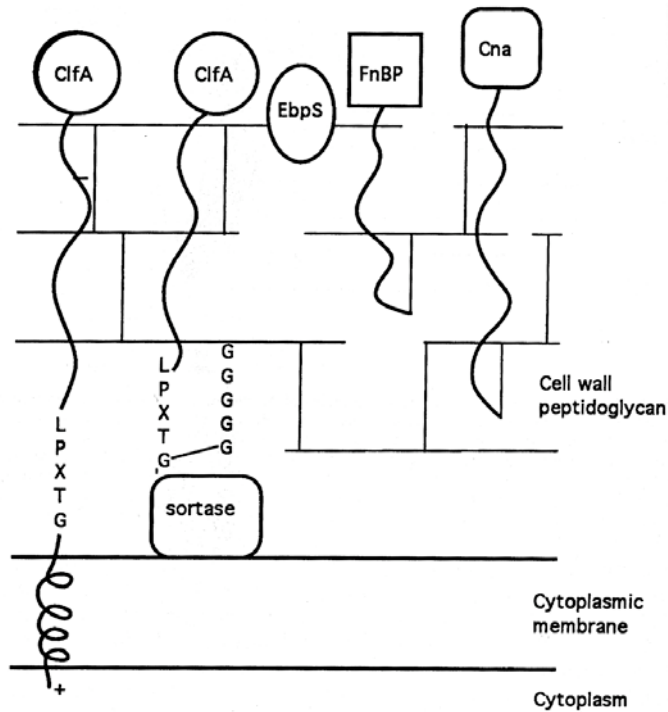
Macnab RM. 2003. *Annu.Rev.Microbiol.*, 57:77-100
 Frye J et coll. 2006. *J.Bacteriol.*, 188:2233-2243

3^{ème} étape: adhérence à la surface

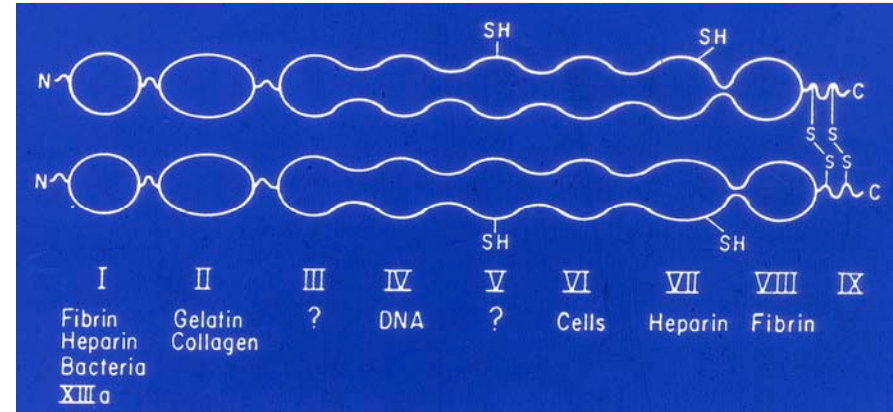


- 1 - Attachement initial par interactions électrostatiques de van der Waals.
- 2 - Perception de la surface.
- 3 - Adhésion spécifique. Exemple: FBP de bactéries à Gram + et Fibronectine (agent organique déposé sur la surface = film de conditionnement)

« matrix-binding proteins »
faible affinité, nombre élevé (10^6 - 10^7 /bact.)



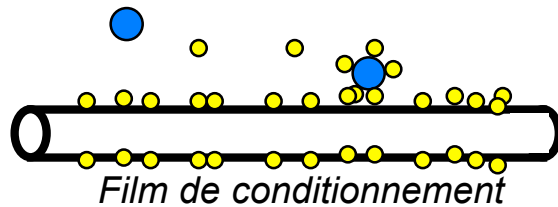
Adhérence des cocci à Gram +
(staphylocoques, entérocoques) aux
protéines matricielles



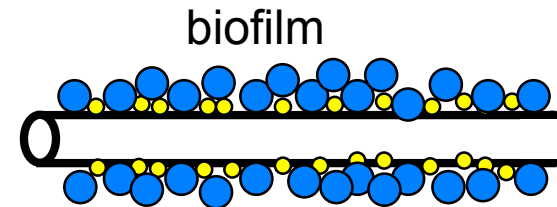
fibrinogène

Nobbs AH et coll. 2009. Microbiol.Mol.Biol.Rev, 73:407-450

● cocci à Gram +



cathétère

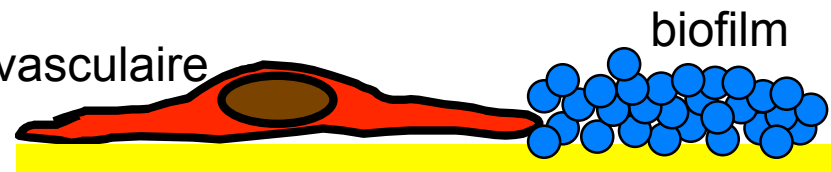


biofilm

●●● Protéines matricielles: fibronectine, laminine, fibrinogène, collagène



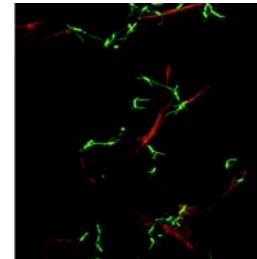
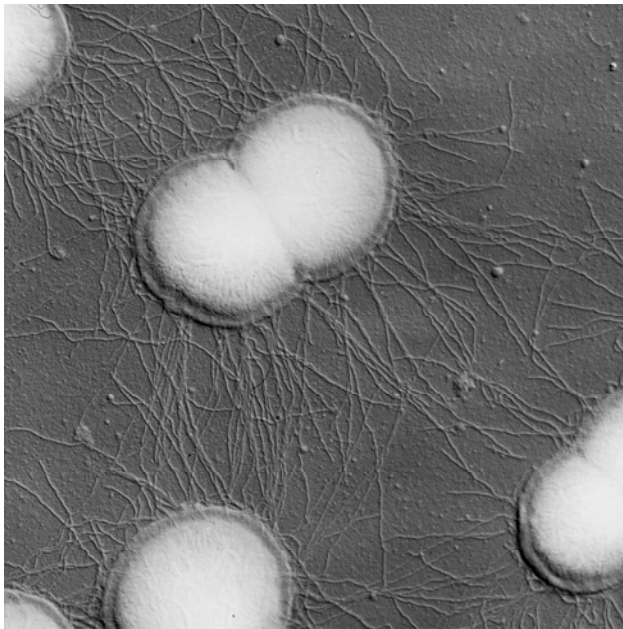
Cicatrice endocardique/vasculaire



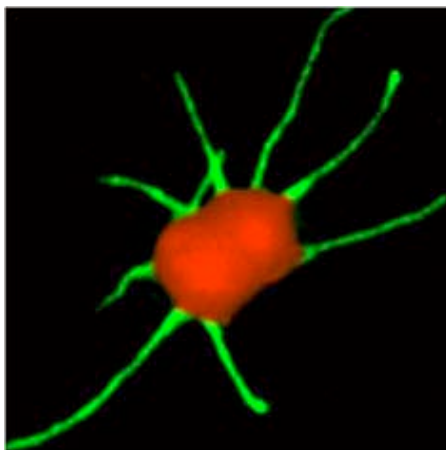
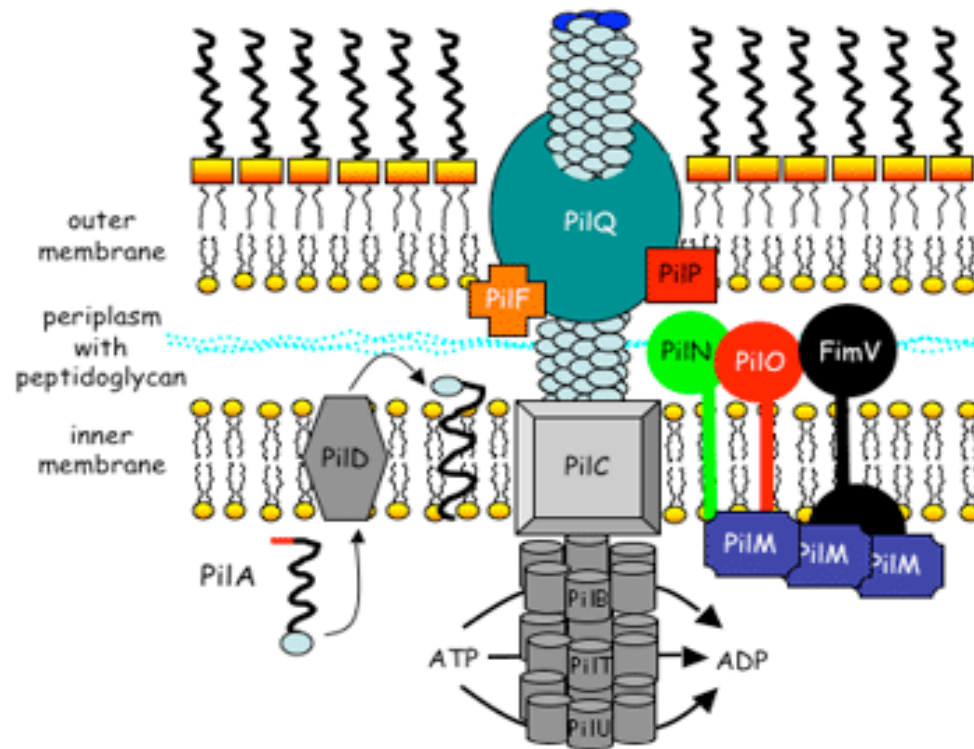
biofilm

Fonction des pili / fimbriae dans la motilité et dans l'attachement des bactéries

Neisseria meningitidis
(pili de type IV)



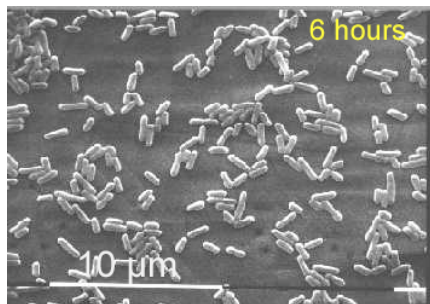
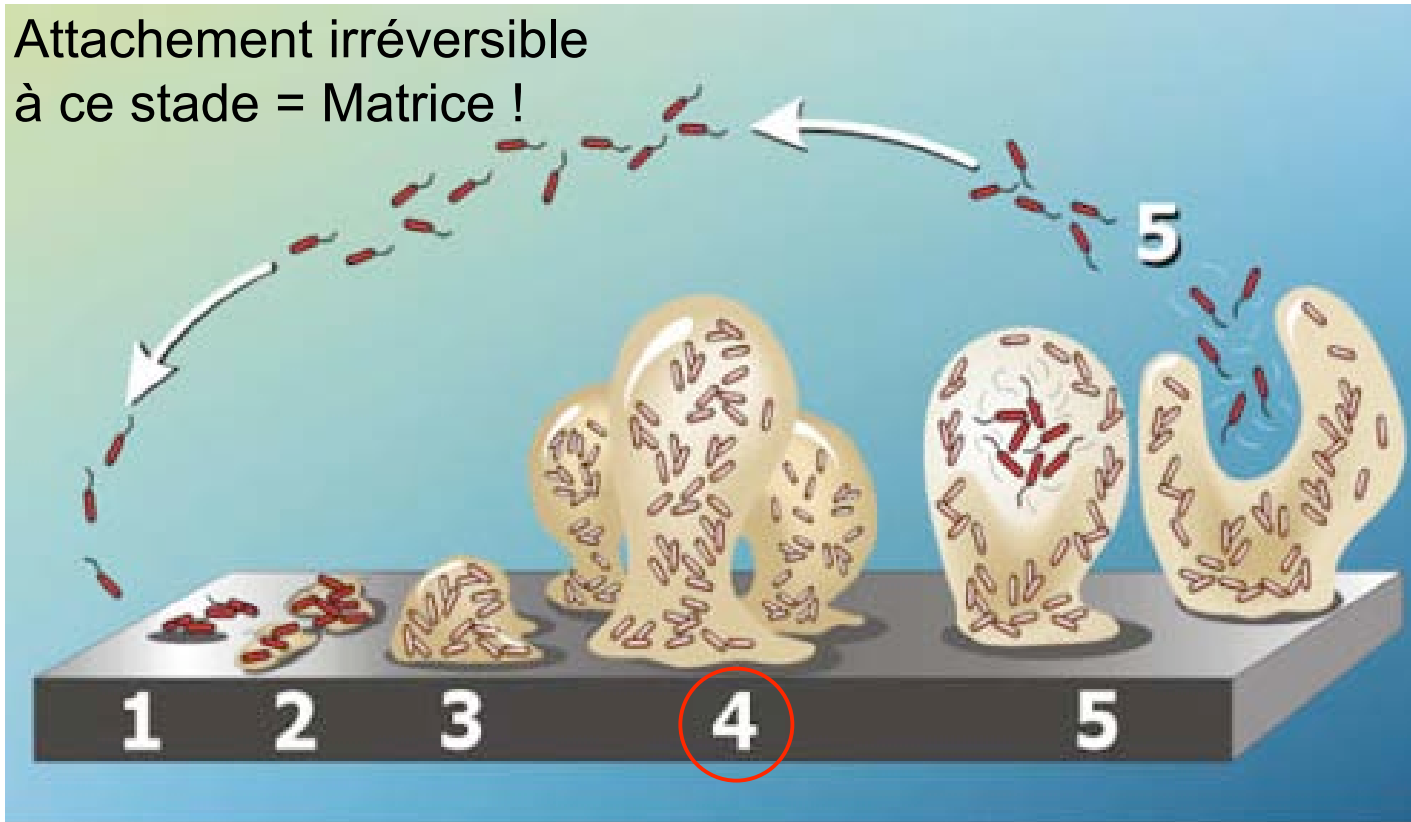
Pseudomonas aeruginosa
(pili de type IV)



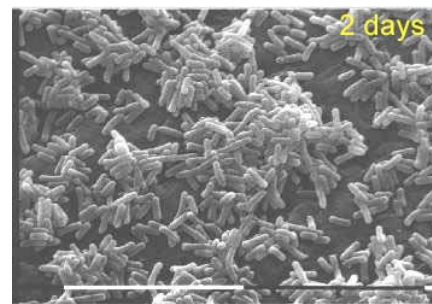
Giltner CL et coll. 2006. Mol.Microbiol., 59:1083-1096
Asikyan ML et coll. 2008. J.Bacteriol., 190:7022-7034

4^{ème} étape: ancrage à la surface

Attachement irréversible
à ce stade = Matrice !



6 heures



2 jours

Modification radicale de la physiologie des bactéries entrant en mode de vie biofilm:
Klebsiella oxytoca + glutamate sur particules de carbone activé vs milieu liquide:

- Taux de division accéléré (x10)
- Consommation d'O₂ augmentée
- (Davies DG. 1988. Microb.Ecol., 15:165-175)
- **Production de la matrice**

L'attachement des bactéries pionnières à la surface conditionnée entraîne une cascade de modifications physiologiques qui correspondent à un nouveau programme d'expression de gènes essentiels au développement du biofilm, en particulier l'expression et la sécrétion des composants de la matrice qui constituent le « ciment » qui va tenir entre elles les bactéries et maintenir ancrés à la surface les éléments de ce biofilm.

- *P. aeruginosa*: une série d'ARN polymérases associées à des facteurs σ dérèglent un nombre important de gènes indispensables à ce processus

(Costerton JW et coll. 1995. Ann.Rev.Microbiol., 49:711-745

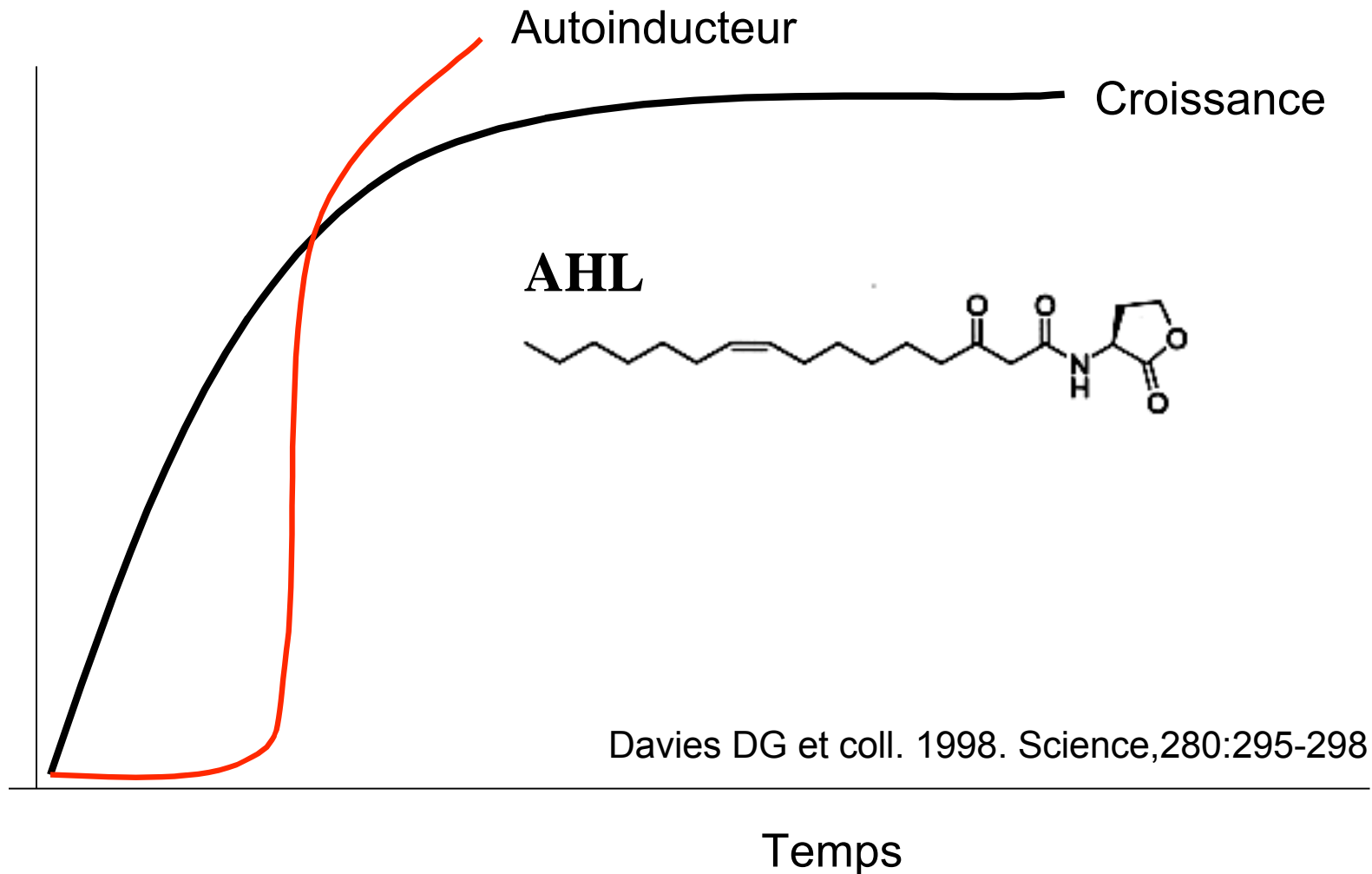
Schurr MJ et coll. 1994. J.Bacteriol.,176:3375-3382)

Après 6 jours de croissance en biofilm, seulement 40 % des protéines exprimées sont identiques à celles exprimées par les bactéries planctoniques (Sauer K et coll. 2002. J.Bacteriol.,184:1140-1154)

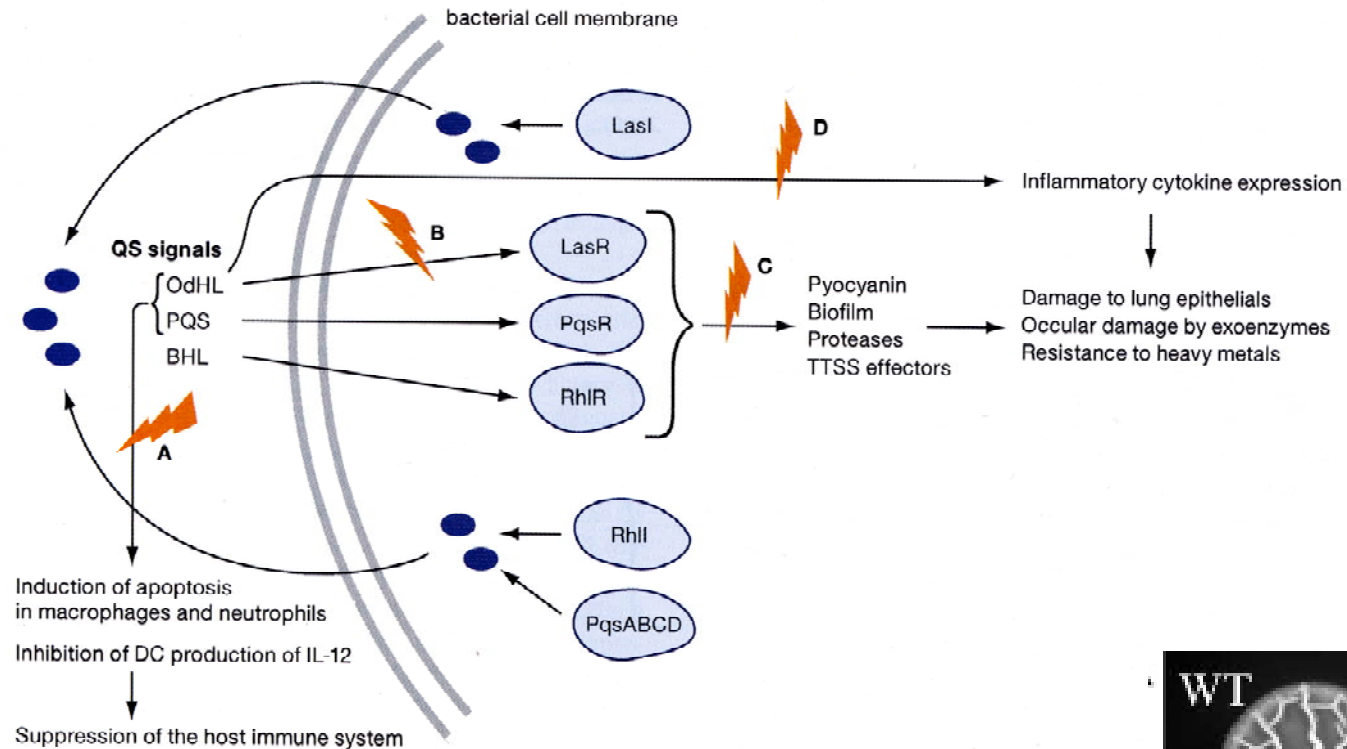
Les gènes *algD*, *algU*, *rpoS* et les gènes contrôlant la synthèse de polyphosphokinases sont induits: biosynthèse de la capsule d'alginate qui compose la matrice du biofilm (Pulcini E.2001. Emerg.Infect.Dis.,8:881-810)

Une étude détaillée par DNA microarray a cependant montré que le pool de gènes différentiellement exprimé entre bactéries en biofilm et en plancton était seulement de 1 % du génome soit environ 500 gènes (Whitely M et coll. 2001. Nature,413:860-864). Hétérogénéité de la population à un instant t ?

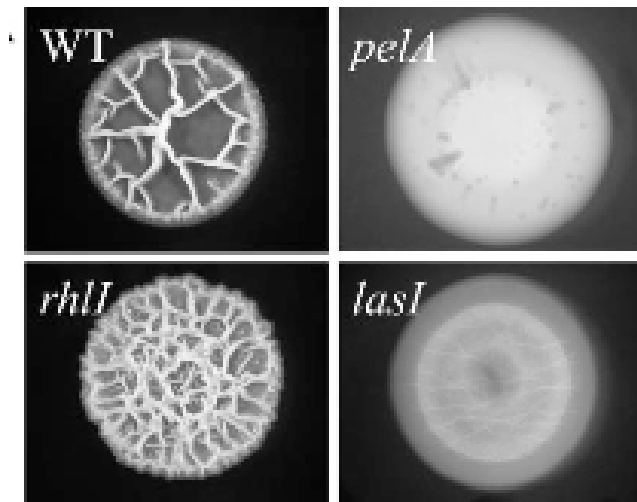
Dans la population bactérienne en croissance, la régulation induite par l'adhérence initiale est relayée par le système du Quorum Sensing



Production de matrice et Quorum Sensing chez *P. aeruginosa*



La production de la matrice du biofilm est sous le contrôle du Quorum Sensing. La nature de l'EPS en cause varie selon les souches. Pas systématiquement Alginate. Polyoside riche en glucose codé par l'opéron *pel* chez *P. aeruginosa* PA14.



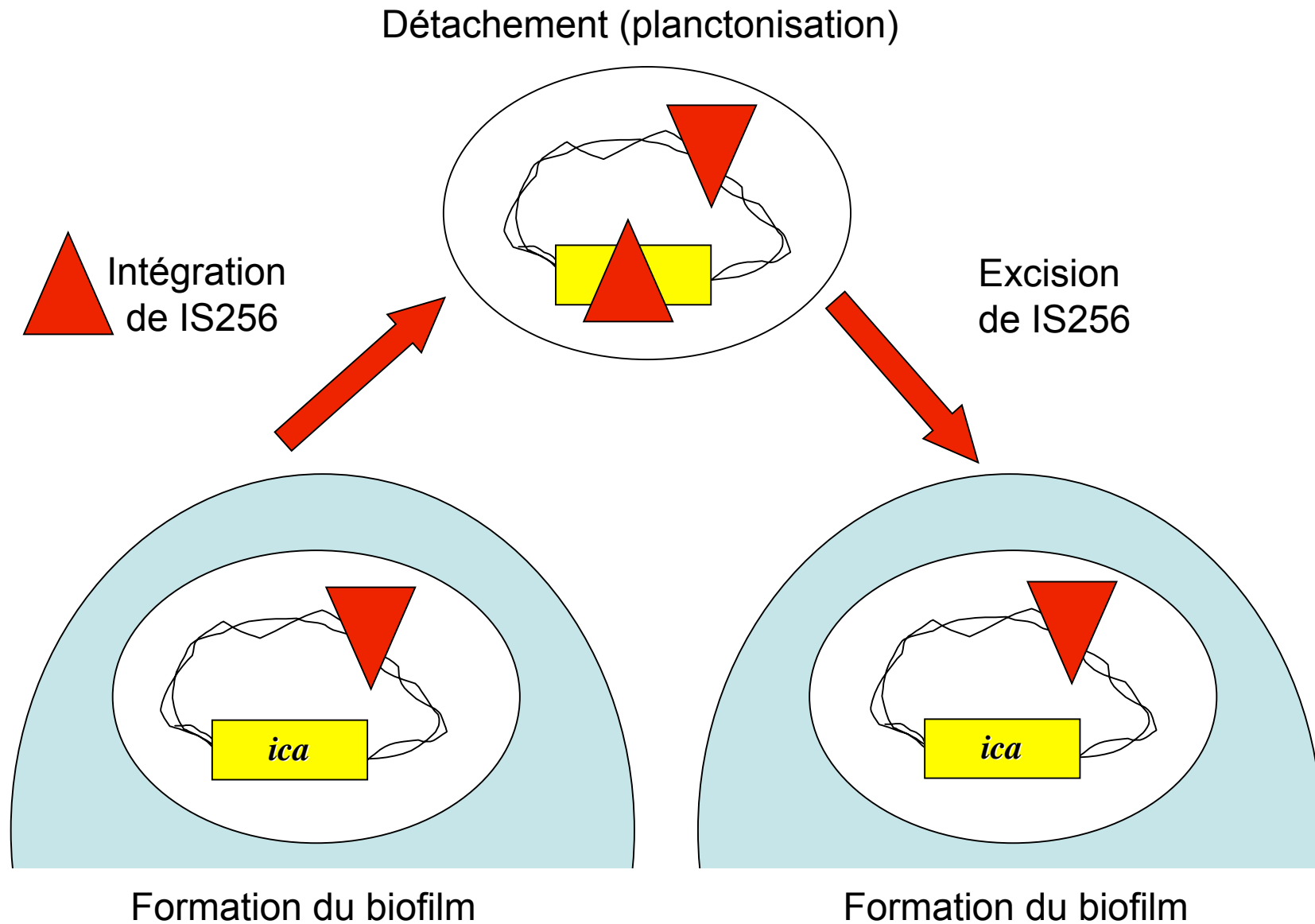
La matrice du biofilm est largement constituée d'exopolysides (EPS)

Chez les bactéries à Gram + les EPS sont essentiellement cationiques (Sutherland BW. 2001. Trends Microbiol.,9:222-227)

Staphylococcus aureus et *S. epidermidis* produisent une matrice composée d'un polymère de β -1,6 N-acétylglucosamine (polysaccharide intercellular adhesin ou PIA) dont la synthèse est sous le contrôle de l'opéron *ica* (Costerton et coll. 2004. Int.J.Artif.Organs,28:1062-1068).

Chez les bactéries à Gram -, les EPS sont neutres ou polyanioniques. *E. coli* et *S. typhimurium* produisent de la cellulose comme composant essentiel de leurs biofilms (Zogaj X et coll. 2001. Mol.Microbiol.,39:1452-1463)

Elle est aussi constituée de protéines (pili de type IV) et d'acides nucléiques (ADN) dont le rôle structurant et protecteur a sans doute été jusqu'à présent sous-évalué.



Formation d'un biofilm sur une surface plastique par *S. aureus* (rare) et *S. epidermidis* (fréquent) par le polyside PIA dont la synthèse est codée par l'opéron *icaADBC* (Heilmann C et coll. 1996. Mol.Microbiol.,20:1083-1091)

Un rôle négligé pour l'ADN extracellulaire (eADN) dans la matrice des biofilms ?

(Whitchurch CB et coll. 2002. Science,295:1487

Steinberger RE & Holden PA. 2005. Appl.Environment.Microbiol.,71:5404-5410

Flemming HC et coll. 2007. J.Bacteriol.,189:7945-7947)

Certaines bactéries, sous le contrôle de signaux du Quorum Sensing, libèrent des copies de leur ADN dans le milieu.

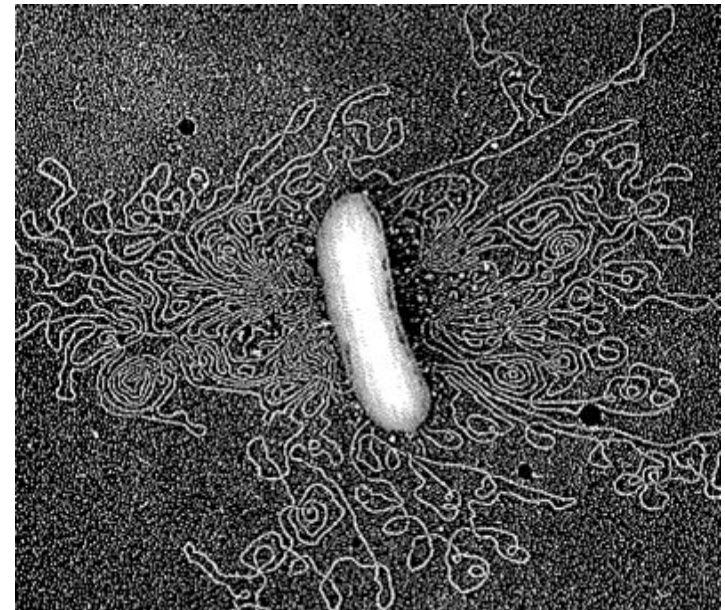
D'autres bactéries meurent et se lysent au sein du biofilm et *de facto* libèrent leur ADN au sein de la matrice.

L'ADN très chargé négativement qui s'accumule autour des bactéries les protège contre l'activité de composés cationiques bactéricides (peptides antimicrobiens, certains antibiotiques).

L'ADN représente une molécule idéale pour assurer la formation d'un échafaudage structurant du biofilm.

Permet l'échange de gènes au sein du biofilm.

Peut servir de source de nutriments dans des conditions oligotrophiques.



Streptococcus mutans est un microorganisme dominant de la plaque dentaire et est sans doute l'agent étiologique dominant de la carie dentaire.

Le système de Quorum Sensing de *S. mutans* comporte une phéromone (autoinducteur) appelée « competence-stimulating peptide » (CSP) et un système récepteur à deux composants (ComDE) qui régule:

Compétence génétique (libération/capture d'ADN) (Li YH et coll. 2001. J.Bacteriol.,183:897-908)

Formation des biofilms (Li YH et coll. 2002. J.Bacteriol.,184:2699-2708)

Tolérance à l'acide (Li YH. 2001. J.Bacteriol.,183:6875-6884)

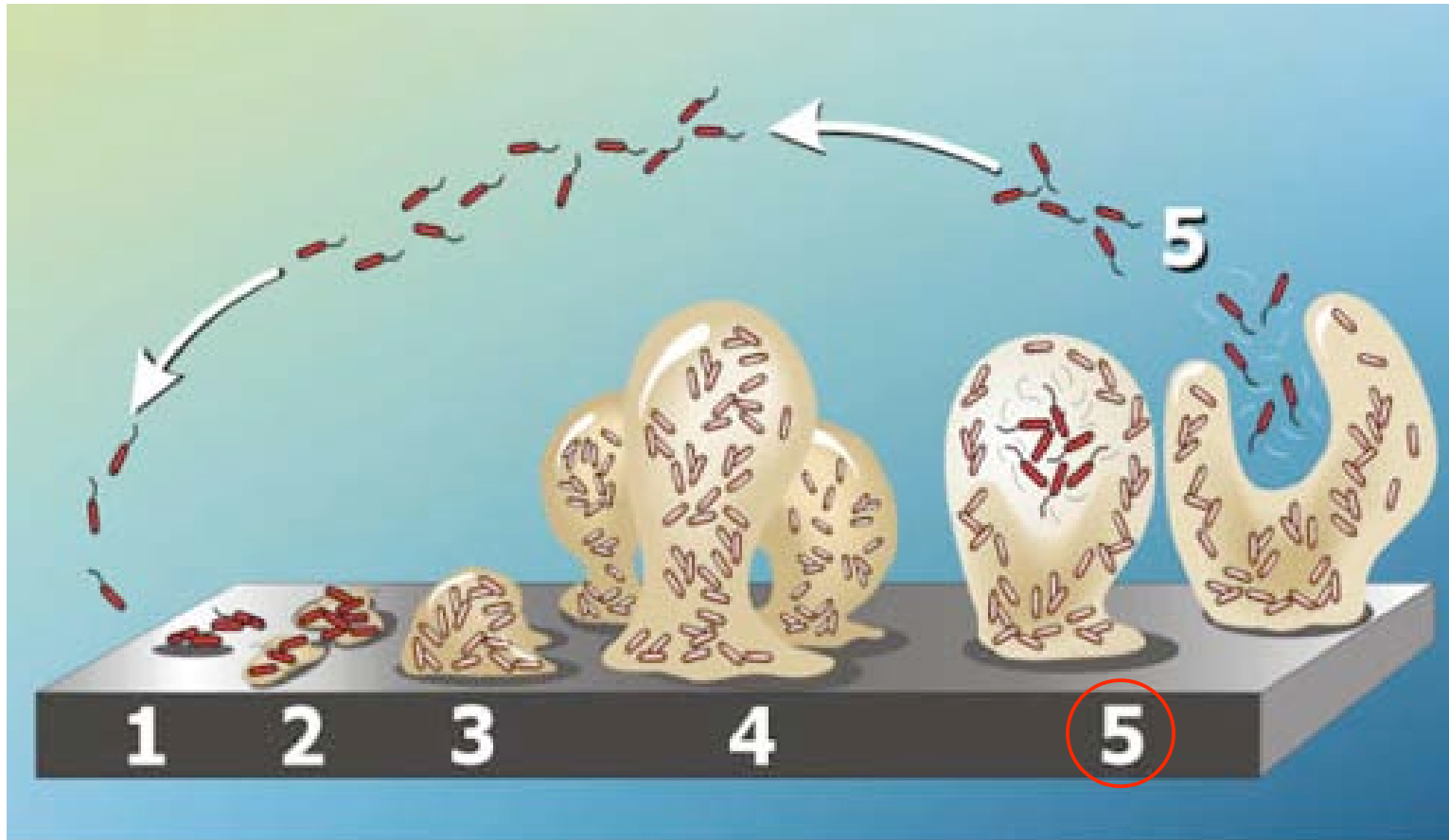
Production de bactériocines (Kreth J et coll. 2006. FEMS Microbiol.Lett.,265:11-17)

CSP est inductible par le stress et entraîne l'autolyse d'une fraction de la population de *S. mutans* à forte concentration.

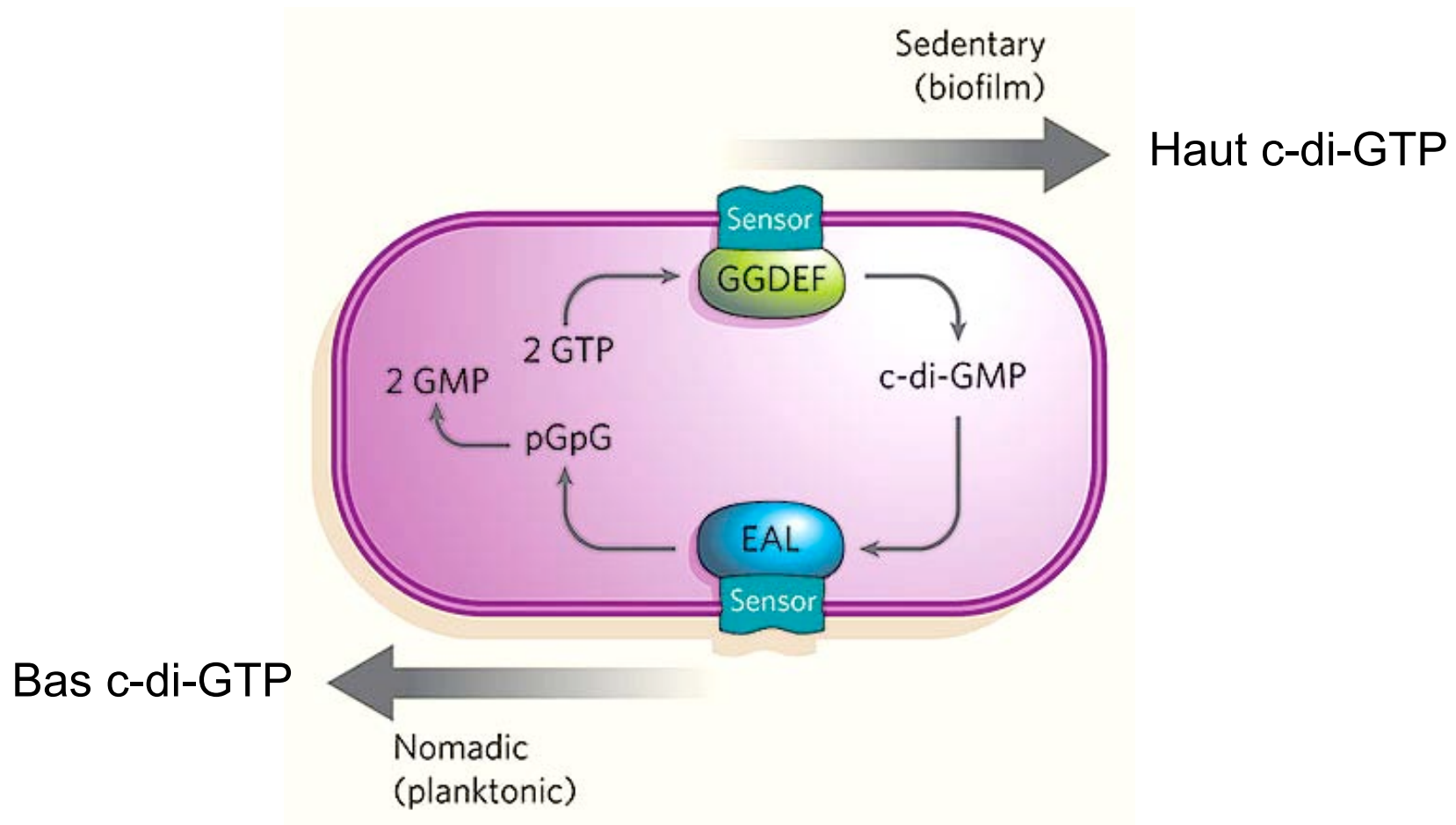
L'autolyse est due à l'accumulation d'une bactériocine CipB et est prévenue par Cipl (protéine d'immunité).

L'autolyse induite par CSP est source massive d'ADN dans le biofilm de la plaque dentaire (Perry JA et al. 2009. FEMS Microbiol.Lett.,299:261-266)

5^{ème} étape: détachement /planctonisation



- Contraintes physiques
- Disponibilité de nutriments (la disponibilité de glucose est un paramètres inducteurs du détachement)
- Signaux intercellulaires (pas liés directement au QS)



Chez les bactéries mobiles (flagellées) Gram - comme Gram +, la régulation du « switch » entre motilité et production de matrice est au cœur du dispositif de choix entre vie planctonique (nomadique) et vie en biofilm (sédentaire). La hiérarchie décisionnelle est encore mal connue. Le **c-di-GMP** semble être le médiateur central dans de nombreuses espèces (Kolter R & Greenberg EP. 2006. Nature,441:300-302).

Récalcitrance aux antibiotiques des bactéries en biofilms

« Persisters »

Lorsque des bactéries s'engagent en mode de croissance en biofilm, elles tolèrent des concentrations d'antibiotiques de 10 à 1000 fois supérieures aux MIC (minimum inhibitory concentration) de bactéries génétiquement similaires cultivées en conditions planctoniques et des concentrations bien plus élevées sont sans doute nécessaires pour atteindre une bactéricidie vraie.

Récalcitrance: hypothèses et certitudes

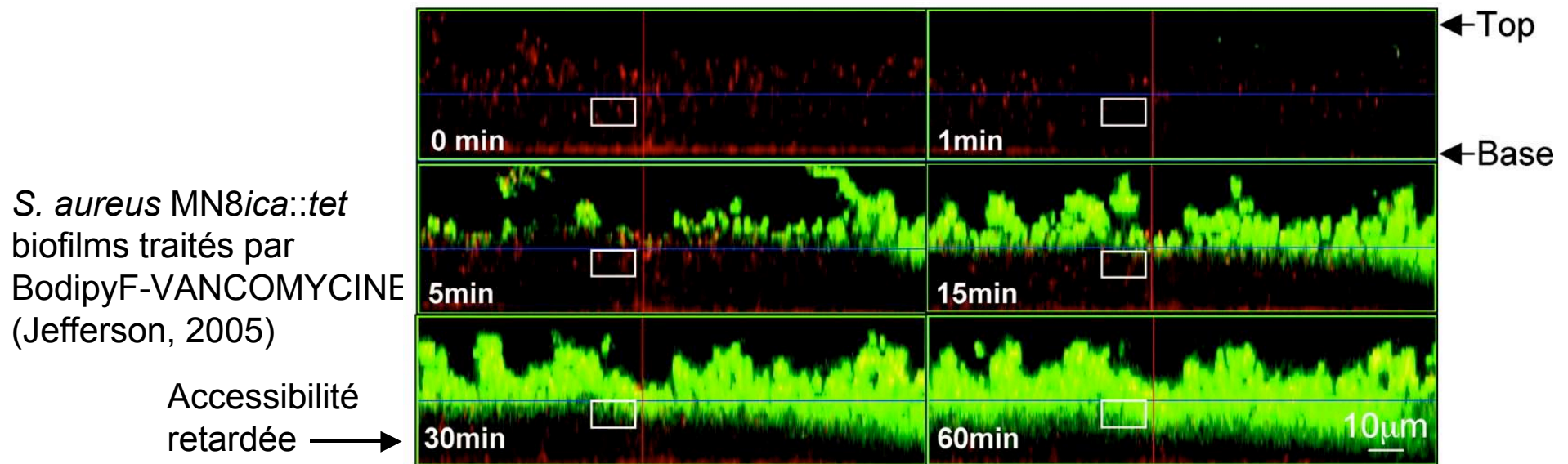
- 1 - Diminution de l'accessibilité des antibiotiques par la matrice du biofilm.
- 2 - Activité accrue des pompes à efflux (« multidrug efflux pumps »)
- 3 - Etat d'hétérogénéité métabolique, particulièrement de croissance lente voire dormance des bactéries dans certains secteurs du biofilm.
- 4 - Expression de gènes impliqués dans la réponse générale au stress.
- 5 - Emergence d'un phénotype spécifique aux bactéries en biofilm qui reste à caractériser. Implication du Quorum Sensing.
- 6 - « Switch » génétiques contrôlant le passage bactéries planctoniques-bactéries persistantes (« persisters »).
- 7 - Combinaison probable de plusieurs de ces facteurs.

Récalcitrance aux antibiotiques des bactéries en biofilms (1)

Accessibilité des antibiotiques au sein du biofilm.

La matrice du biofilm ne peut constituer une barrière physico-chimique étanche aux antibiotiques. Elle peut cependant retarder leur accessibilité aux bactéries, diminuant les doses bactéricides disponibles et laissant le temps aux bactéries d'exprimer leurs mécanismes inductibles de résistance (Jefferson KK et coll. 2005. Antimicrob.Agents Chemother.,49:2467-2473).

La charge des polymères (Walters et coll., 2003), la présence de bactéries mortes et d'enzymes dégradant les antibiotiques participe à cet effet de retardement (Bagge et coll. 2004)

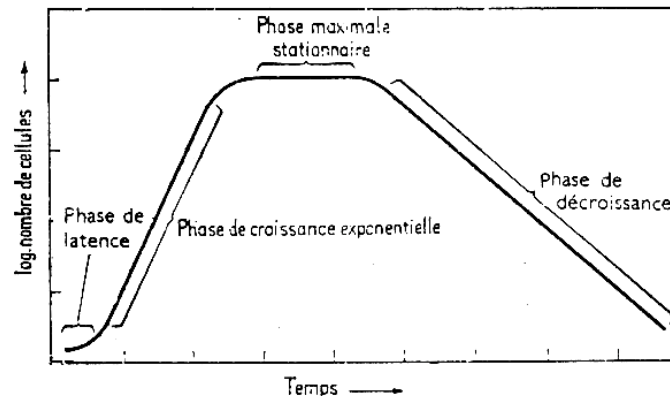


Accessibilité des bactéries planctoniques à BodipyFL-VAN = 5 mn !

Récalcitrance aux antibiotiques des bactéries en biofilms

(2)

Présence de zones privées de nutriments/O₂ au sein du biofilm: situation de croissance stationnaire causant une dormance des bactéries, donc une résistance de niveau élevé, en particulier aux antibiotiques actifs uniquement sur les bactéries en division comme les beta-lactamines (Walkers et coll. 2003. Antimicrob.Agents Chemother., 47:317-323; Fux CA et coll. 2004. J.Bacteriol.,186:4486-4491)



Le niveau d'expression du gène *rpoS* (sous-unité Sigma S responsable de l'expression d'un groupe de gènes en début de phase stationnaire ou en condition de stress) s'accroît en fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire et est corrélé avec l'arrêt de croissance et l'augmentation de bactéries antibio-résistantes (Ito A et coll. 2008. Biotechnol.Bioeng.,99:1462-1471).

RpoS pourrait donc réguler l'apparition de souches résistantes.

RpoS est aussi impliqué dans la régulation génétique globale contrôlant l'engagement d'*E. coli* dans la formation d'un biofilm (Keren I et coll. 2004. FEMS Microbiol.Lett.,230:13-18)

Sensibilité d'*E. coli* cultivé en condition planctonique à trois antibiotiques:

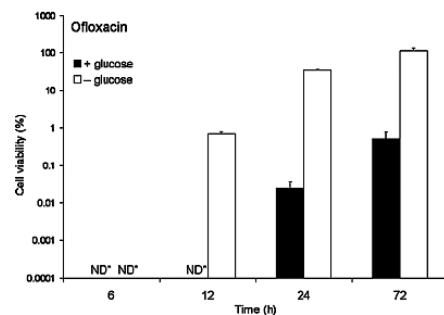
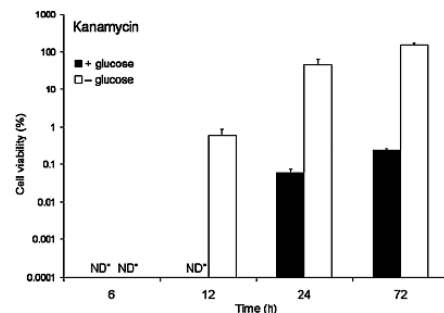
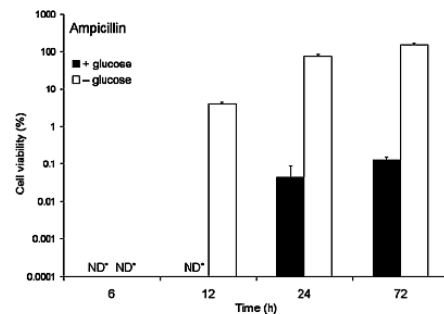
Ampicilline (100 µg/ml)

Kanamycine (25 µg/ml)

Ofloxacine (10 µg/ml)

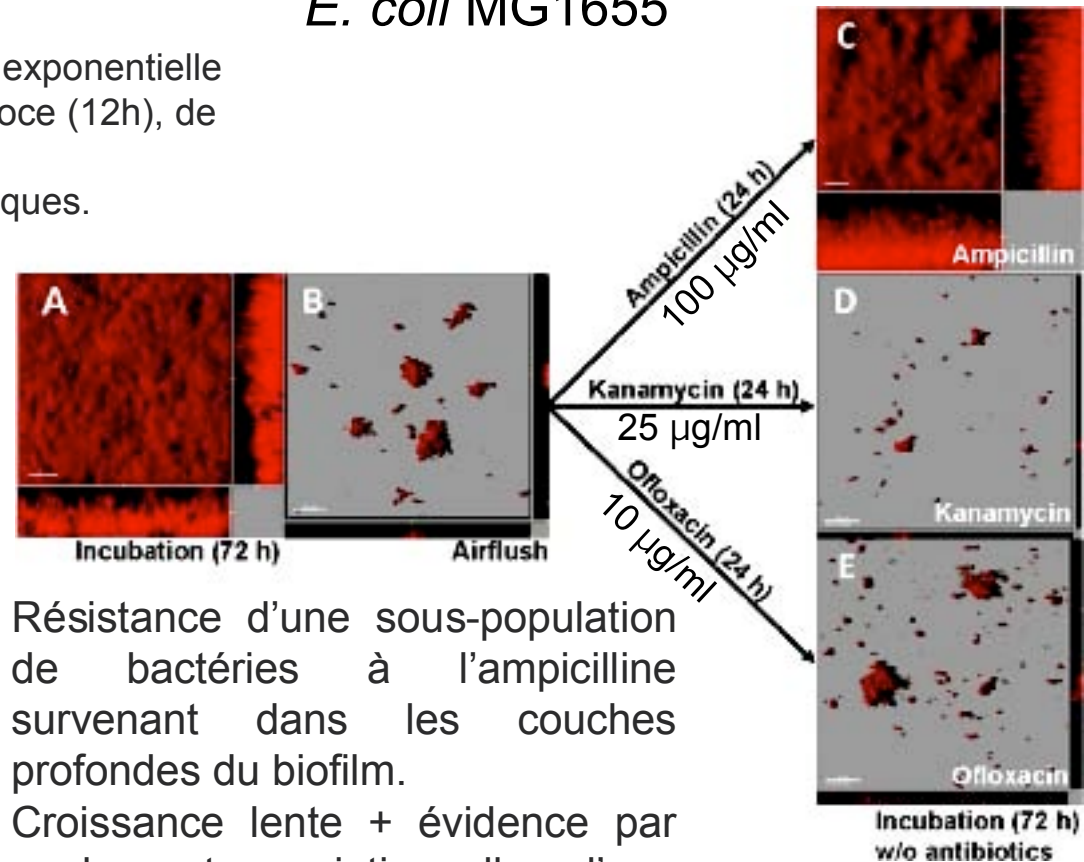
Bactéries obtenues en phase de croissance exponentielle +/- Glucose (6h), de phase stationnaire précoce (12h), de phase stationnaire tardive (24h et 72h).

Lavées puis mises en présence des antibiotiques.



Résistance accrue d'*E. coli* aux antibiotiques au sein de biofilms matures

E. coli MG1655



Résistance d'une sous-population de bactéries à l'ampicilline survenant dans les couches profondes du biofilm.

Croissance lente + évidence par analyse transcriptionnelle d'une activation de *rpoS*

RpoS- strain 20x plus sensibles à l'Ampicilline dans les mêmes conditions expérimentales.

Ito A et coll. 2009. Appl.Environment.Microbiol.,75:4093-4100

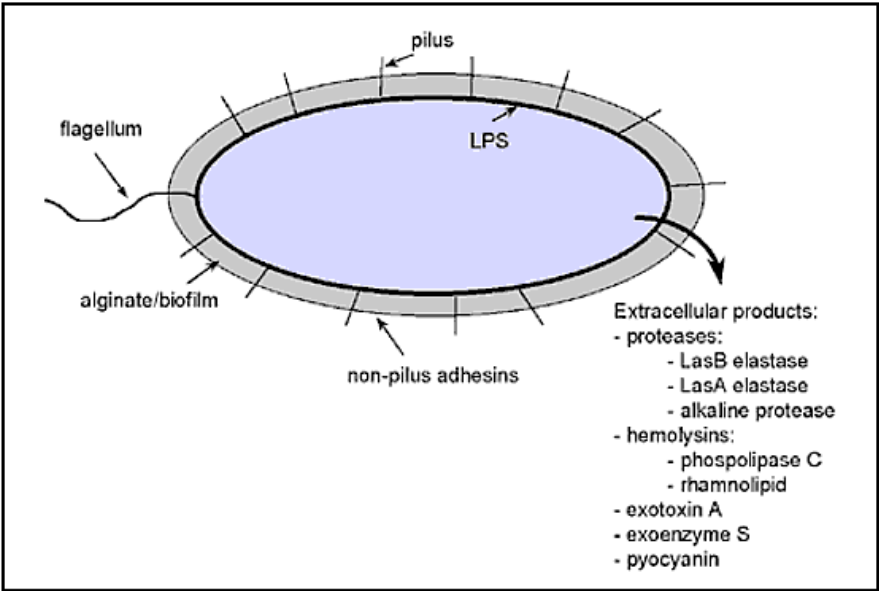
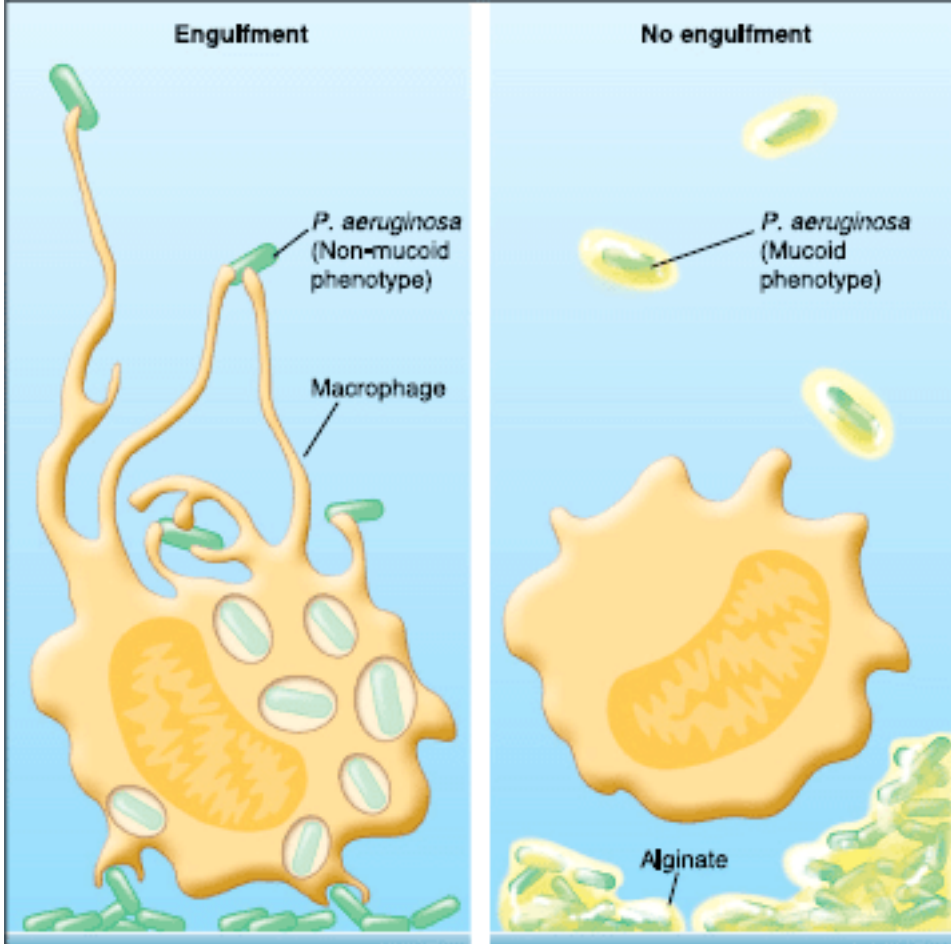
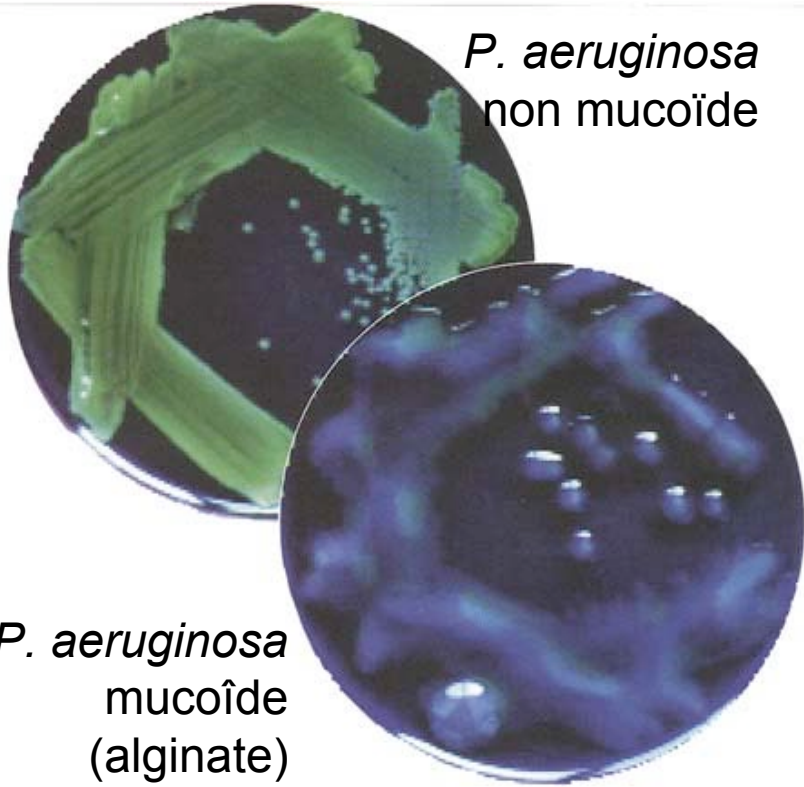
Résistance aux défenses immunitaires des bactéries en biofilms

Lorsque des bactéries s'engagent en mode de croissance en biofilm, elles acquièrent aussi des capacités de résistance aux défenses immunitaires de l'hôte. Les mécanismes en sont mal connus (moins bien que ceux de la récalcitrance aux antibiotiques).

Résistance aux défenses immunitaires de l'hôte

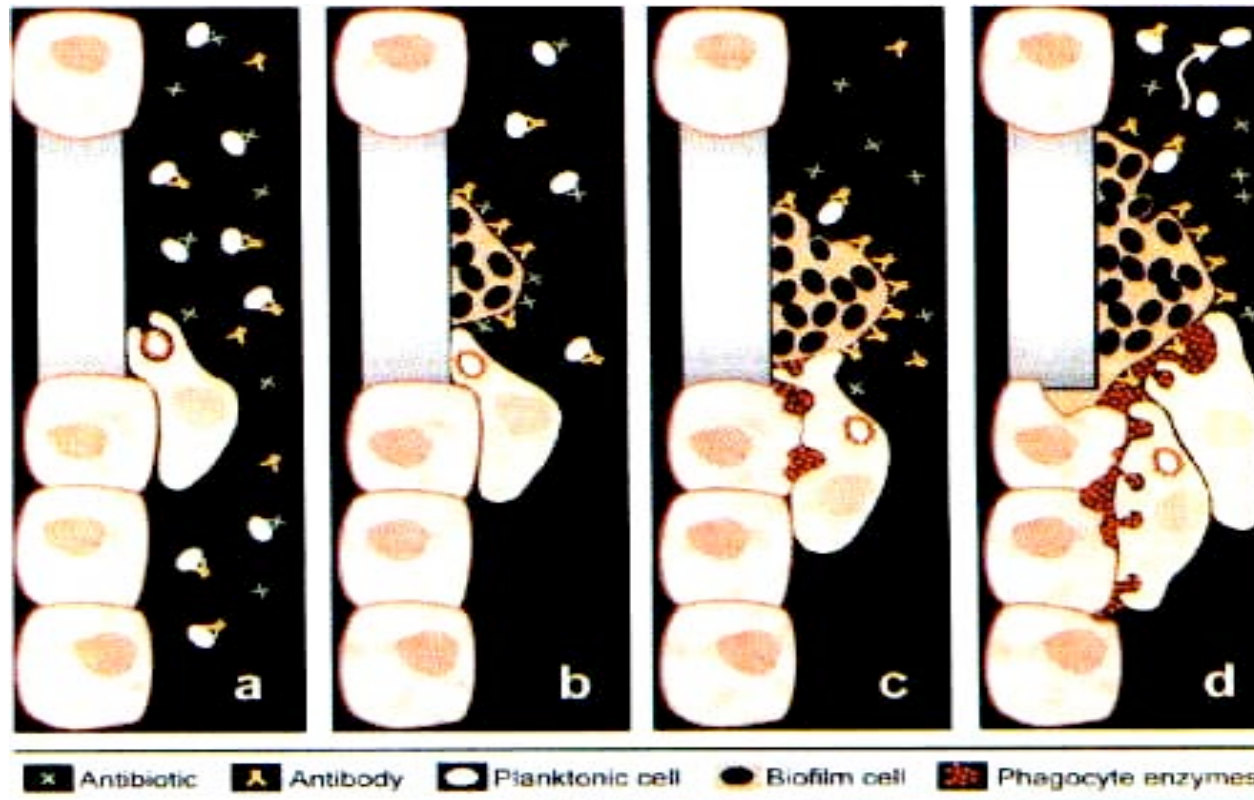
- 1- Pénétration limitée des cellules phagocytaires (PNN) au sein des biofilms et diffusion médiocre de leurs molécules bactéricides.
- 2 - Rôle des senseurs à deux composants et des autoinducteurs du Quorum Sensing dans la mise en place d'un programme de résistance aux phagocytes et leurs effecteurs bactéricides.
- 3 - Inhibition des propriétés phagocytaires des cellules recrutées par les composants du biofilm (matrice polysidique).
- 4 - Inhibition des propriétés bactéricides des effecteurs des PNN par des molécules concentrées dans la matrice du biofilm.
- 5 - Blocage de l'accès des anticorps aux bactéries présentes dans le biofilm.

Activité antiphagocytaire de la capsule mucoïde de *P. aeruginosa*



L'alginate a une fonction pro-inflammatoire:
Induction de TNF- α et IL-12

Phagocytose frustrée



Les bactéries planctoniques sont en général efficacement phagocytées et tuées par les phagocytes (PNN et macrophages). Lorsque les bactéries sont associées à des biofilms, elles donnent lieu à un phénomène de « phagocytose frustrée » au cours duquel la phagocytose est inefficace, y compris du fait de l'inaccessibilité des anticorps opsonisants. Les phagocytes sécrètent néanmoins leurs facteurs microbicides, y compris des enzymes qui sont délétères pour les tissus adjacents et en accélèrent la destruction (Costerton JW et coll., 1999. *Science*,284:1318-1322).

Peut-on élargir le concept de biofilm ?

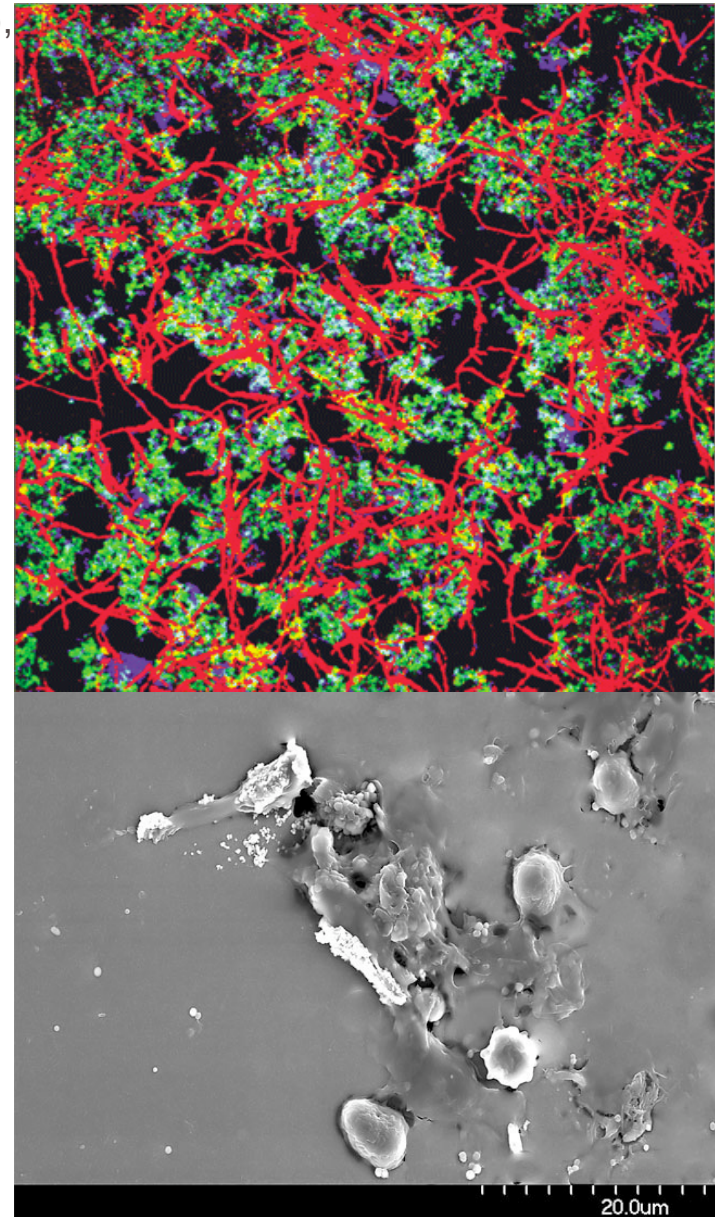
Fusobacterium nucleatum (rouge),
Streptococcus oralis (bleu),
Actinomyces naeslundii (vert)
(salive)

Biofilms complexes

Biofilms intracellulaires ?

Biofilms viraux ?

Autres...?

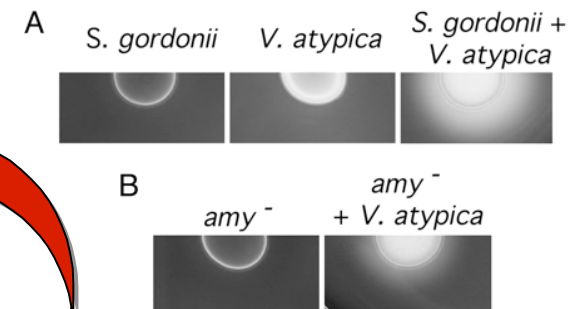
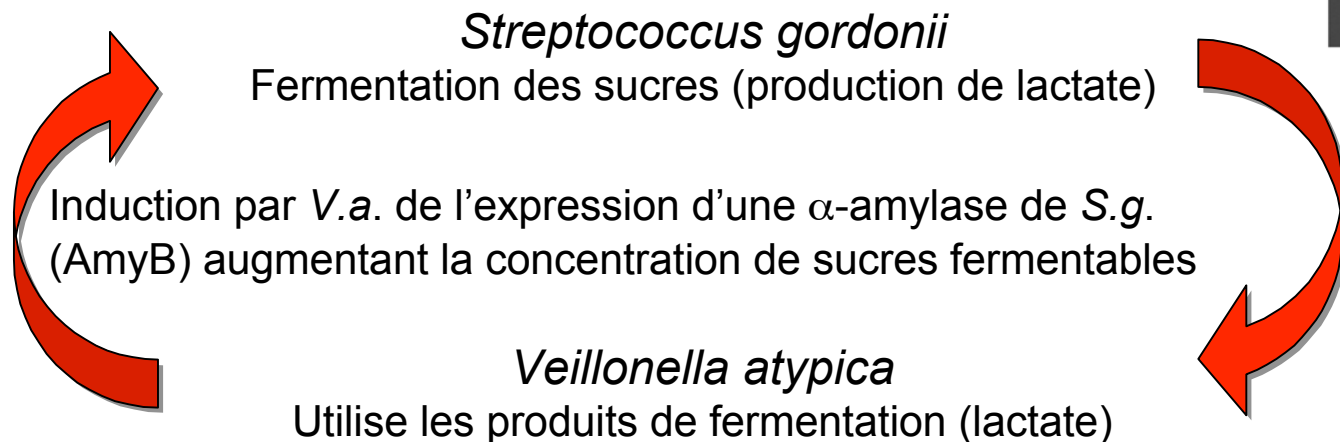


Biofilms polymicrobiens

Bien que la plupart des travaux expérimentaux soient réalisés avec une seule espèce microbienne, la réalité est celle de communautés plurimicrobiennes.

La co-évolution des espèces microbiennes doit être vue sous l'angle de la dynamique de communautés complexes évoluant comme la résultante de coopérations (symbioses vitales) et de compétitions (antagonismes mortels).

Plaque dentaire: plus de 500 espèces bactériennes différentes coexistantes, la moitié incultivables.



Egland PE et coll. 2004.
PNAS,48:16917-16922

Pseudomonas aeruginosa

Diminution du niveau de production de quinolone et de pyocyanine



3-oxo-C12HSL

Dialogue croisé des autoinducteurs du QS

Farnesol

Candida albicans (levure dimorphique)

Diminution du nombre des hyphes

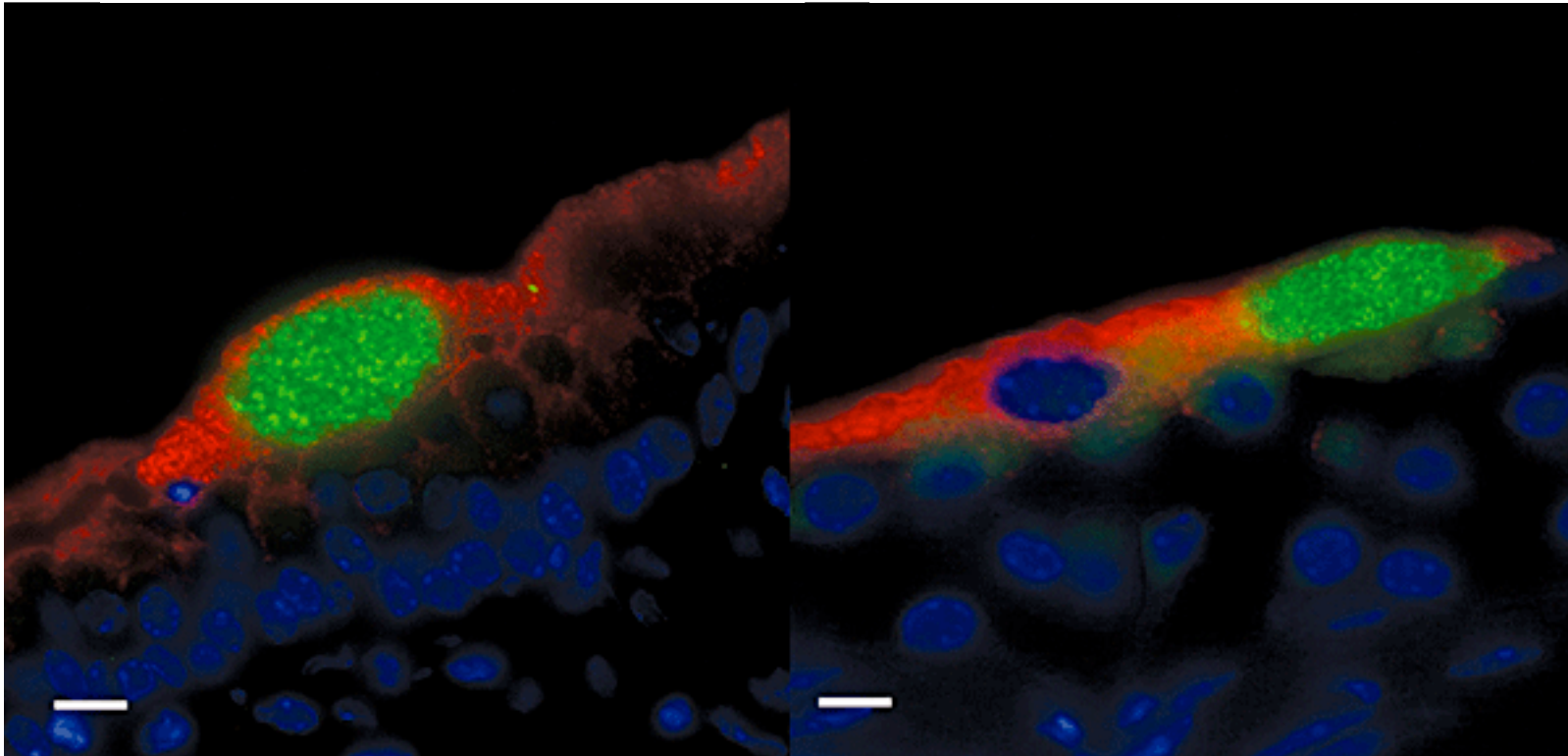


Morphotype levure (commensal)

Morphotype filamenteux (hyphe = virulent)

Biofilms intracellulaires ?

(Wright KJ et coll. 2007. Cell.Microbiol.,9:2230-2241)

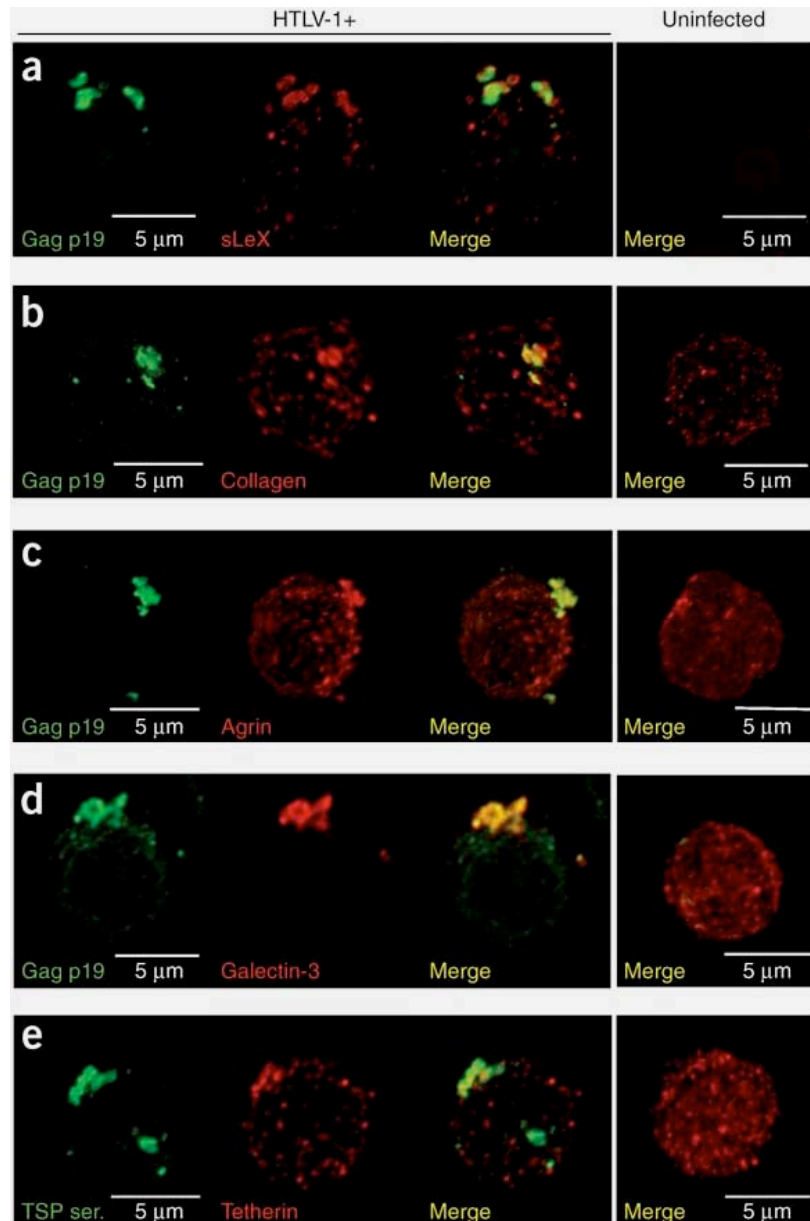


UPEC expriment des pili de type 1 servant à adhérer à et envahir les cellules superficielles de l'épithelium vésical.

Dans le compartiment intracellulaires, les bactéries se divisent rapidement et forment une volumineuse poche d'endocytose (intracellular bacterial community, IBC) dans laquelle les bactéries expriment des fonctions retrouvées au sein des biofilms, en particulier le Quorum Sensing. Ces bactéries expriment encore des pili de type 1 qui sont nécessaires à la formation d'IBCs. Après 4-6 heures les IBCs se disloquent et les bactéries se dispersent.

Biofilms viraux ?

(Pais-Correia AM et coll. 2009.Nat.Med. Epub, 20 Dec.)



HTLV-1 est un retrovirus lymphotrope dont la transmission de cellule à cellule nécessite un contact intercellulaire (ex.: le transfert d'un lymphocyte CD4+ à une cellule dendritique nécessite la formation d'une « synapse immunologique »).

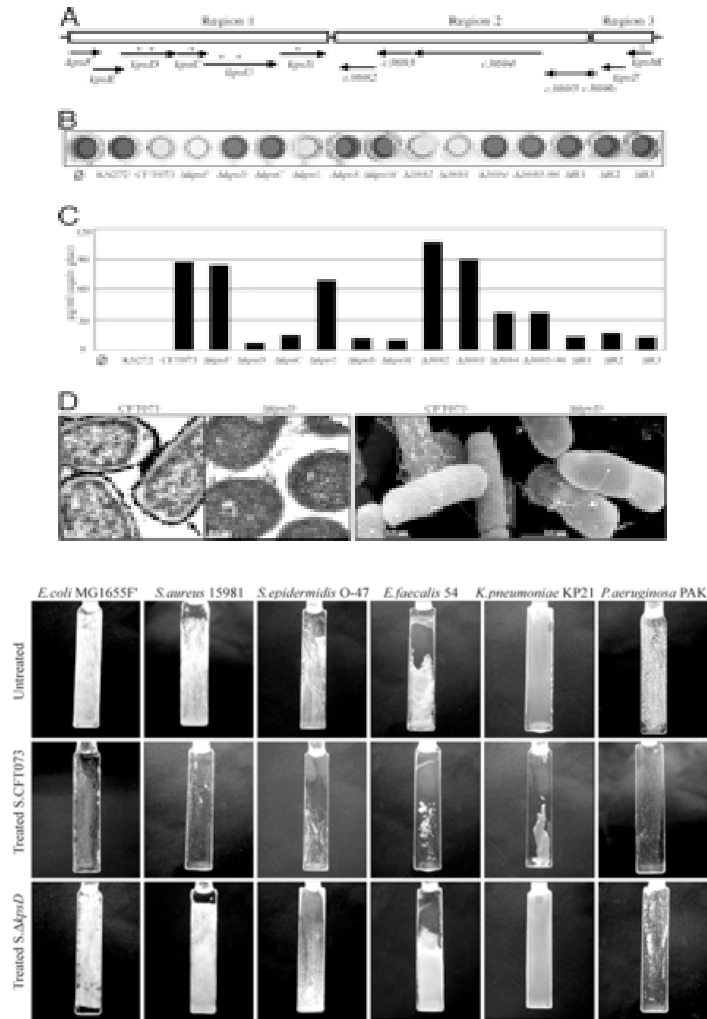
Les lymphocytes T infectés par HTLV-1 stockent transitoirement le virus à leur surface sous forme d'aggrégats riches en polyosides qui sont retenus entre eux et à la surface de la cellule par des composants de matrice extracellulaire dont la production et l'excrétion sont induites par le virus (collagène et agrine) et des protéines cellulaires d'adhésion (tétherine et galectine-3).

Ces agrégats viraux adhèrent rapidement à la cellule partenaire avec laquelle le lymphocyte T infecté interagit, permettant son infection. La déstabilisation de ces agrégats bloque l'infection.

Approches innovantes dans la prévention et le traitement des biofilms

Treatment des surfaces

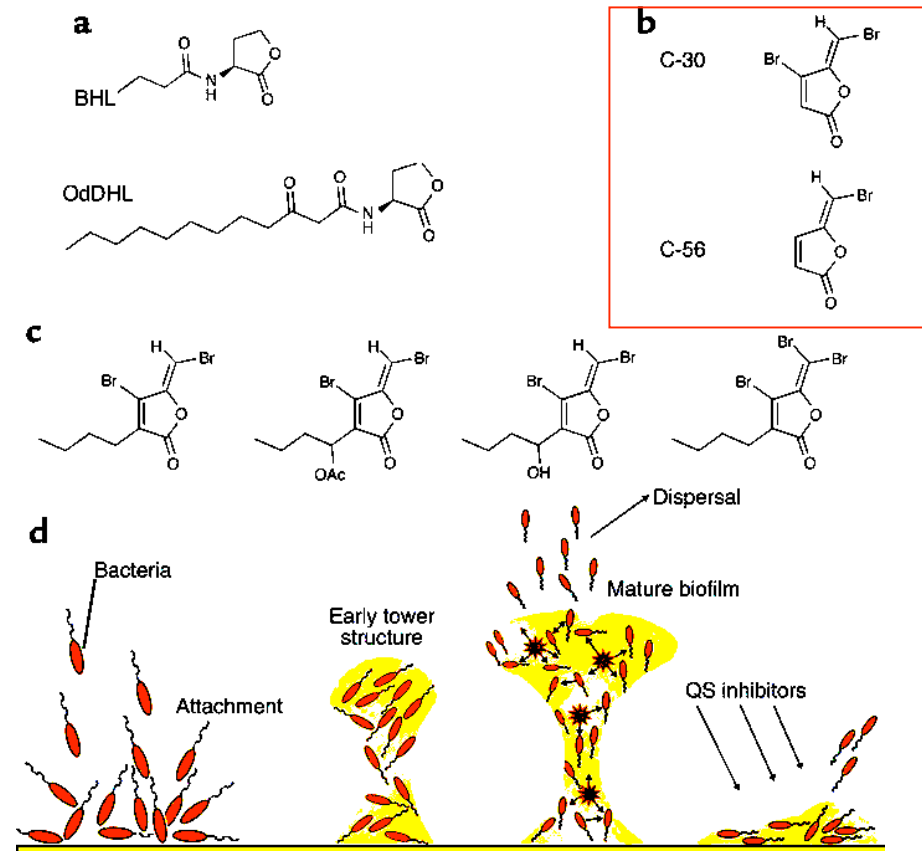
Prévention de la formation de biofilms
Par un polyoside de *E. coli* (CFT073)



Vale J et coll. 2006. PNAS, 103:12558-12563

Treatment des biofilms établis

Inhibition de la génération du signal AHL
Inhibition de la dissémination du signal AHL
(Quorum Quenching)
Inhibition de la réception du signal AHL
(analogues structuraux antagonistes)



Hentzer M & Givskov M. 2003. J. Clin. Invest., 112:1300-1307

Les furanones, composés naturels de l'algue rouge *Delisea pulchra*, peuvent déplacer AHL de LuxR. Leur effet inhibiteur du Quorum Sensing reste limité. Des analogues de synthèse (C-30, C-56) sont beaucoup plus efficaces: *P. aeruginosa* PAO1 cultivé sans (a) et avec 10 microM de C-30 (b)
Traitement des biofilms après 3 jours par 100 microg/ml de Tobramycine.

