

# ED 3 Biofilms UEL 337

Anaïs Brosse

*Streptococcus pyogenes*, ou streptocoque du groupe A (GAS), est un agent pathogène humain qui peut causer une grande variété de maladies humaines. De multiples sources de données montrent que la formation d'un biofilm pendant une infection au GAS est un facteur important contribuant à l'échec d'un traitement antibiotique. GAS s'associe généralement en forme de chainettes comme un « collier de perles ». Bien que la formation de chainettes soit une caractéristique morphologique déterminante du GAS, la contribution de cette caractéristique morphologique à sa pathogénicité et à la formation d'un biofilm n'a pas été étudiée en profondeur. C'est l'objet de cette publication.

Dans un premier temps, les auteurs se sont intéressés aux facteurs pouvant moduler la taille des chainettes. Comme il avait été rapporté dans une publication précédente que le lysozyme pouvait affecter la taille des chainettes de *Bacillus cereus* ils ont voulu tester cette hypothèse.

Le lysozyme est une enzyme impliquée dans la défense contre les infections bactériennes. Il est produit par les cellules des lignées granulocytaires et monocytaires et sécrétée dans de nombreux liquides biologiques (sérum, larmes, salive, lait, mucus nasal ...) surtout chez les vertébrés et les insectes. Le lysozyme agit soit comme opsonine innée (molécule qui se fixe à la membrane d'une cellule cible et induit la phagocytose) ou comme une enzyme capable de lyser les bactéries en particulier les Gram positif. Les auteurs ont donc cultivé plusieurs souches de *Streptococcus pyogenes* soit dans un milieu de culture classique (THY-G), soit additionné de 10% sérum de bœuf fœtal (FBS), soit additionné de lysozyme à une concentration 10 µg/ml ce qui correspond aux quantités de lysozymes retrouvées dans le sérum humain. En parallèle, un test de viabilité des cellules a été effectué et quel que soit la condition et la souche testée les bactéries sont vivantes.

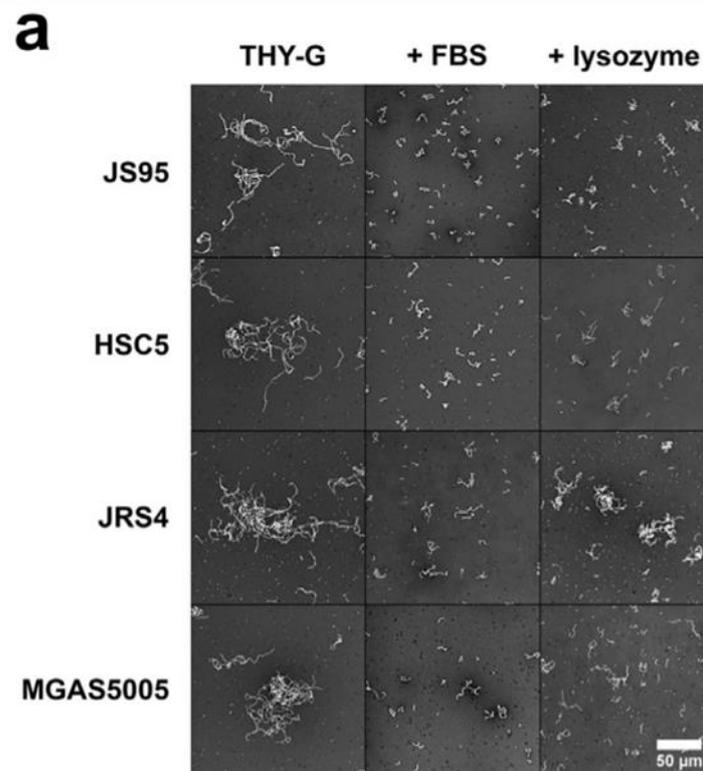


Figure 1 : Image en microscopie optique de la morphologie de plusieurs souches de *Streptococcus pyogenes* après culture en milieu THY-G seul ou additionné de sérum de bœuf fœtal (FBS) ou de lysozyme.

- 1- Quel est l'aspect morphologique des souches de *Streptococcus pyogenes* en absence de lysozyme ?

Il s'agit de coques essentiellement regroupés sous forme de chainettes ce qui est typique de cette espèce.

- 2- Quel est l'aspect morphologique des souches de *Streptococcus pyogenes* en présence de lysozyme ?

On remarque que l'ajout de sérum de bœuf foetal et de lysozyme a pour effet de raccourcir les chainettes en particulier pour la souche JS95.

- 3- Que pouvez-vous conclure de cette expérience ?

Le lysozyme doit empêcher la formation des chainettes.

Les auteurs ont ensuite voulu savoir si l'effet du lysozyme sur les chainettes pouvait avoir un effet sur la formation des biofilms de *Streptococcus pyogenes*. Les auteurs ont dans un premier temps cultivés les biofilms dans des plaques 24 puits avec ou sans lysozyme. Après établissement du biofilm, il ont ajouté à la procédure habituelle une étape de lavage à haute vitesse pour tester la robustesse du biofilm. Enfin, ils ont observé en détails au microscope confocal l'aspect des biofilms.

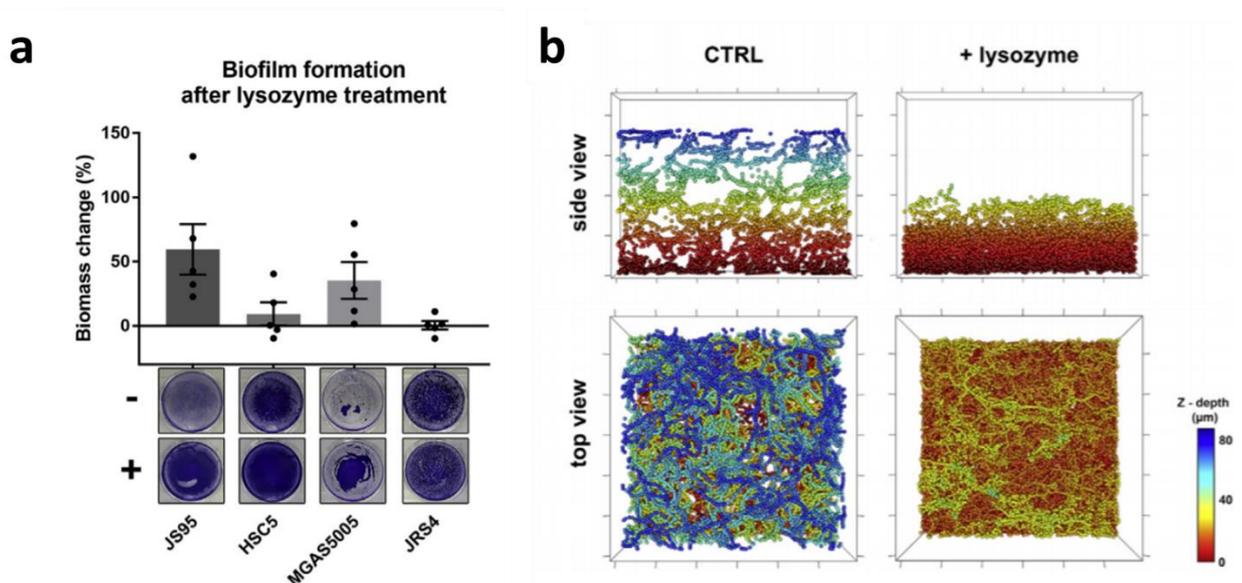


Figure 2 : Etude de la formation des biofilms chez *Streptococcus pyogenes* en présence (+) ou en absence de lysozyme (-)   une concentration finale de 10  g/ml. A) Mesure de la biomasse obtenue B) Représentation tridimensionnelle des biofilms traités ou non au lysozyme de la souche JS95 et obtenue après acquisition d'images en microscopie confocale.

- 4- Quelle technique utilisée par les auteurs pour estimer la formation des biofilms est présentée en figure 2a ?
- 5- Quel en est son principe ?
- 6- Comment mesure t'on la biomasse formée après coloration au cristal violet ?

Il s'agit de la méthode au cristal violet. Le principe est de faire pousser les bactéries dans des plaques, les laver après incubation ce qui permet d'éliminer les cellules non adhérentes et ensuite de colorer le

biofilm au cristal violet. En mesurant l'absorbance du cristal violet à 590 nm il est possible d'estimer la quantité de biofilm ou biomasse.

- 7- Quel est l'effet de l'ajout du lysozyme sur la biomasse des biofilms des différentes souches de *Streptococcus pyogenes* ? Comparez l'aspect des biofilms pour la souche JS95 avant et après traitement.

Dans la figure a), on remarque que l'ajout de lysozyme semble avoir permis la formation d'un biofilm avec une biomasse plus importante que sans lysozyme pour les souches JS95 et MGAS5005 (mais pas pour les souches JSR4 et HSC5). Si l'on observe les vues au microscope, on remarque que l'ajout de lysozyme a modifié la structure du biofilm puisque l'on voit que les cellules sont tassées les unes sur les autres sans chainage évident. En revanche dans le contrôle sans lysozyme on retrouve bien les chainettes caractéristiques de l'espèce. Le biofilm est plus « lâche » et plus épais.

Les auteurs ont ensuite voulu évalué la tolérance des biofilms de *Streptococcus pyogenes* formés en absence ou en présence de lysozyme. Pour cela ils ont utilisé le test MBEC.

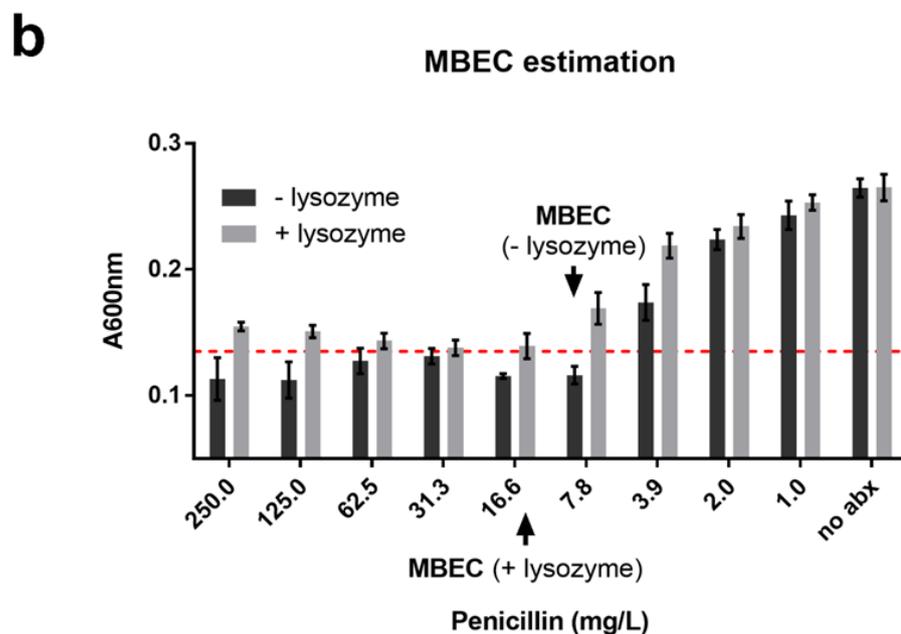


Figure 3 : Essai MBEC vis-à-vis de la pénicilline sur des biofilms de la souche JS95 en présence ou en absence de lysozyme. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des puits sans croissance visible.

- 8- Quel est le principe du test MBEC ?

Le but est de faire croitre les biofilms sur des picots puis les plonger dans des solutions avec une concentration croissante de la molécule à tester ici la pénicilline afin d'en déterminer la concentration minimale pour inhiber la formation du biofilm.

- 9- Comparer le résultat du test MBEC en absence ou en présence de lysozyme.

On remarque qu'avec l'ajout de lysozyme permet la formation de biofilms un peu plus résistants à la pénicilline que sans lysozyme.