

Biofilms

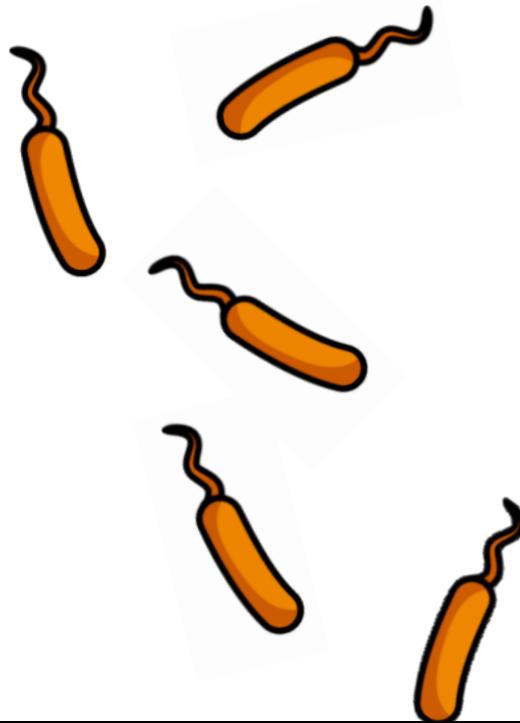
Micro-organismes : amis ou ennemis ?

Anaïs Brosse

Modes de vie des micro-organismes

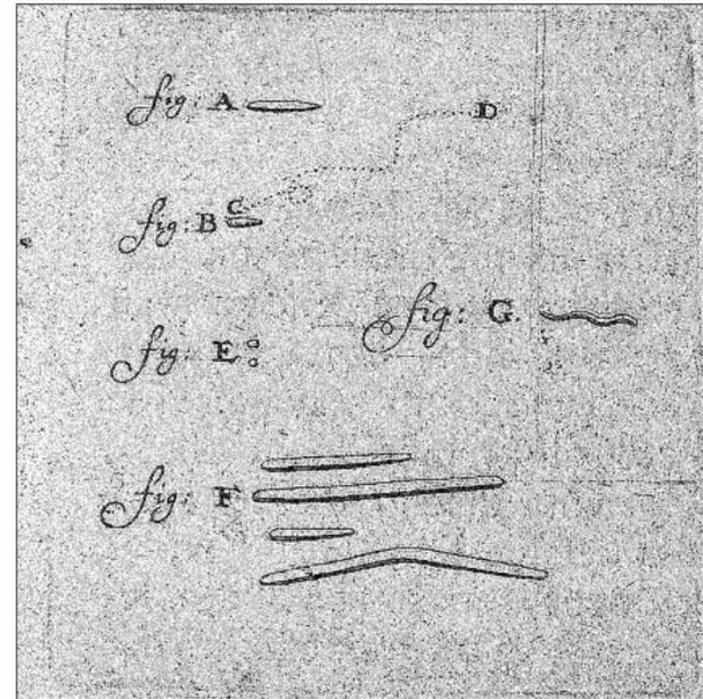
Etat planctonique

=

Micro-organismes en
suspension

Faible proportion à l'état
planctonique
En réalité vie sous forme de
biofilm dans le milieu naturel

Modes de vie des micro-organismes

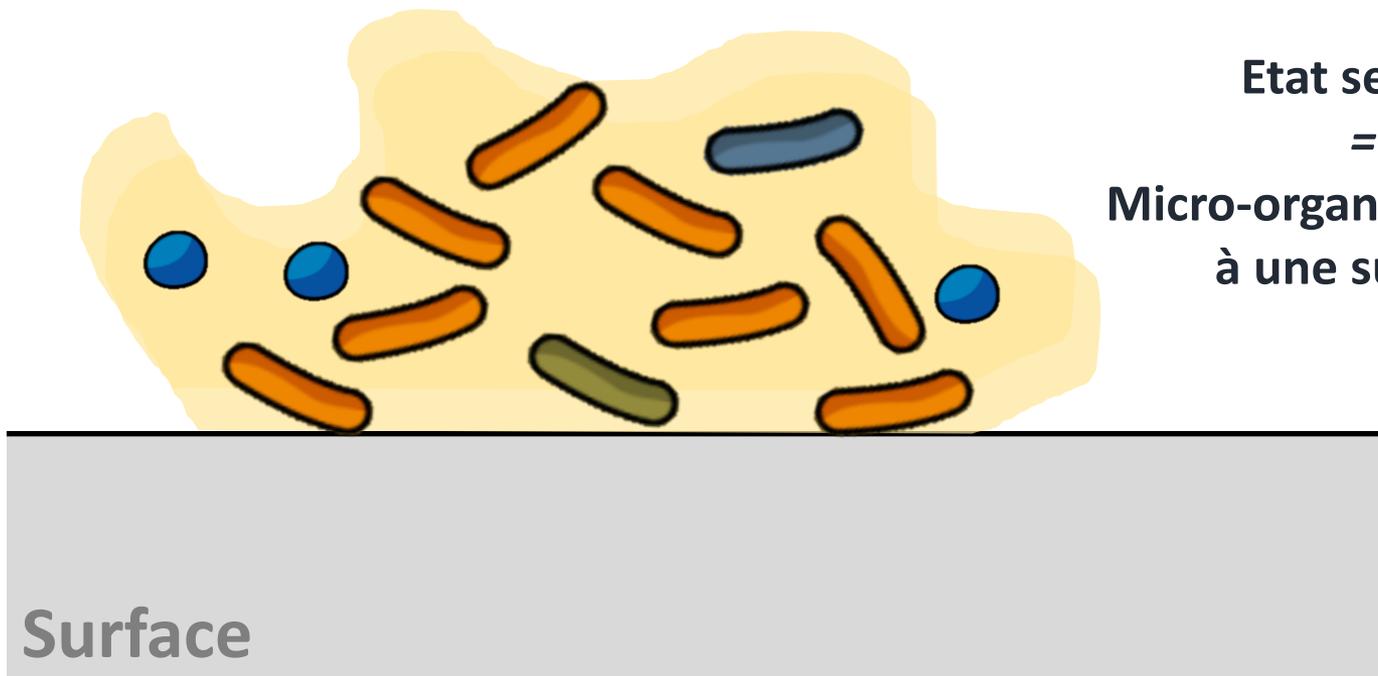
Observation des premiers regroupements bactériens par Antoni van Leeuwenhoek
XVIIe siècle

Dessin original tiré des notes d'Antoni Van Leeuwenhoek. On y voit certains types de bactéries qu'il a observées dans un échantillon de plaque dentaire. Parmi elles, on trouve des cocci (E), des bactéries fusiformes (F) et des spirochetes (G)

Modes de vie des micro-organismes

Biofilm « *Communauté microbienne contenue dans une matrice de polymères, adhérant à une surface* » (Costerton 1978)

- C'est un mode de vie très répandu parmi les micro-organismes
- Les biofilms sont souvent multicellulaires
- Adhérence aux surfaces biotiques (ex: cellule de la muqueuse intestinale) ou abiotique (ex : lame de verre)

Biofilm

Etat sessile

=

Micro-organismes fixés
à une surface

Surface

Exemples de biofilms

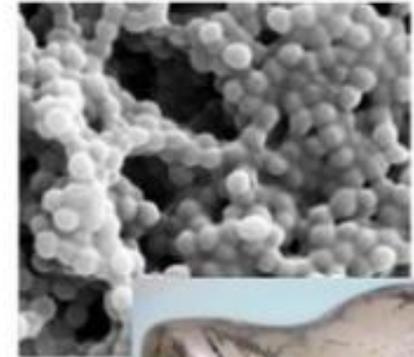
Sur des surfaces
minérales et végétales



Sur des surfaces
industrielles



Sur des dispositifs
médicaux



Exemples de biofilms

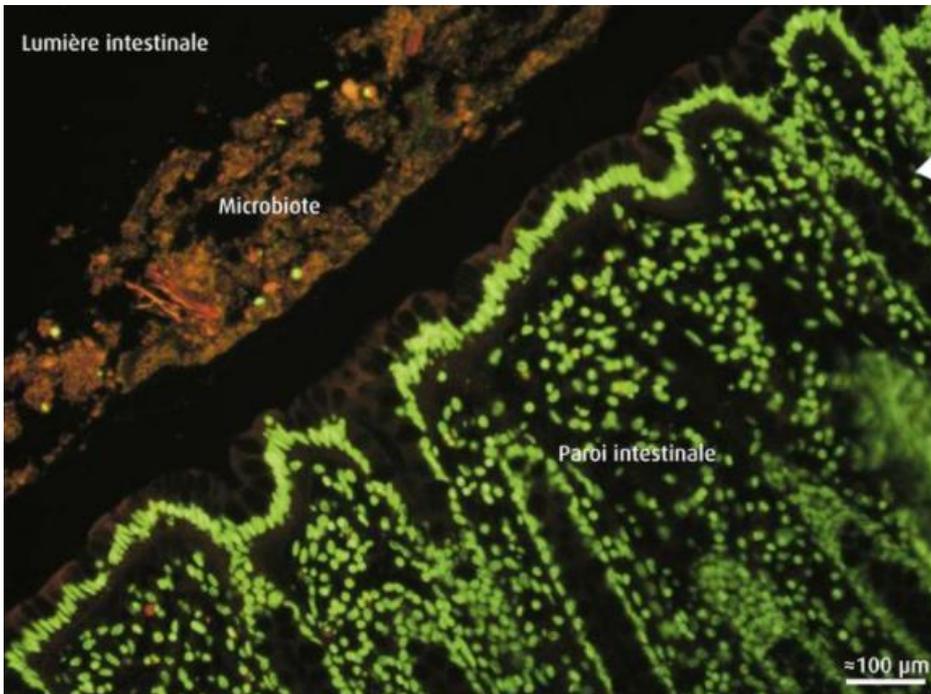
Sur des surfaces « animales »



Plaque dentaire

Et même dans la nourriture !

Croute = biofilm



Effets délétères

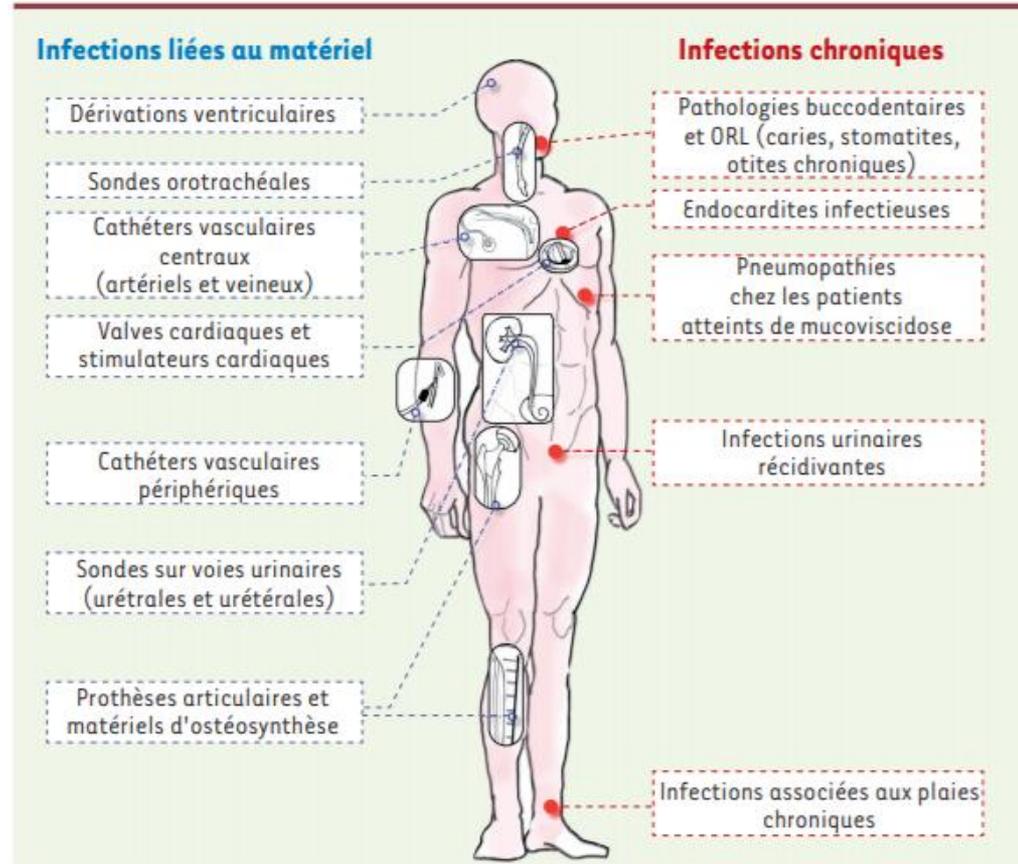
Domaine industriel :

- Contamination des équipements dans les industries
 - Contaminations des produits fabriqués
 - Contamination de l'eau à usage pharmaceutique
- Colmatage des systèmes de filtration
- Accélération des phénomènes de corrosion
- Formation de bio-salisures (ex : coques des bateaux)

Effets délétères

Domaine médical :

- Colonisation des dispositifs médicaux implantés pouvant conduire à un état septique sévère
- 60% des infections bactériennes associées à des biofilms
- Infections nosocomiales par des bactéries produisant des biofilms (*S. aureus*, *P. aeruginosa*)
- Tolérance des biofilms aux antibiotiques



Lebeaux & Ghigo, 2012 , Médecine Science

Bénéfices

Biofilms des bactéries commensales :

- Protection des organismes contre l'intrusion de pathogènes
- Exemple : microbiote présente dans le tractus intestinal

Traitement des eaux usées :

- Activité épuratrice des biofilms bactériens
- Utilisation des matériaux polluants comme source de carbone et d'énergie par des microorganismes



Clarificateur **AVANT** traitement bactérien

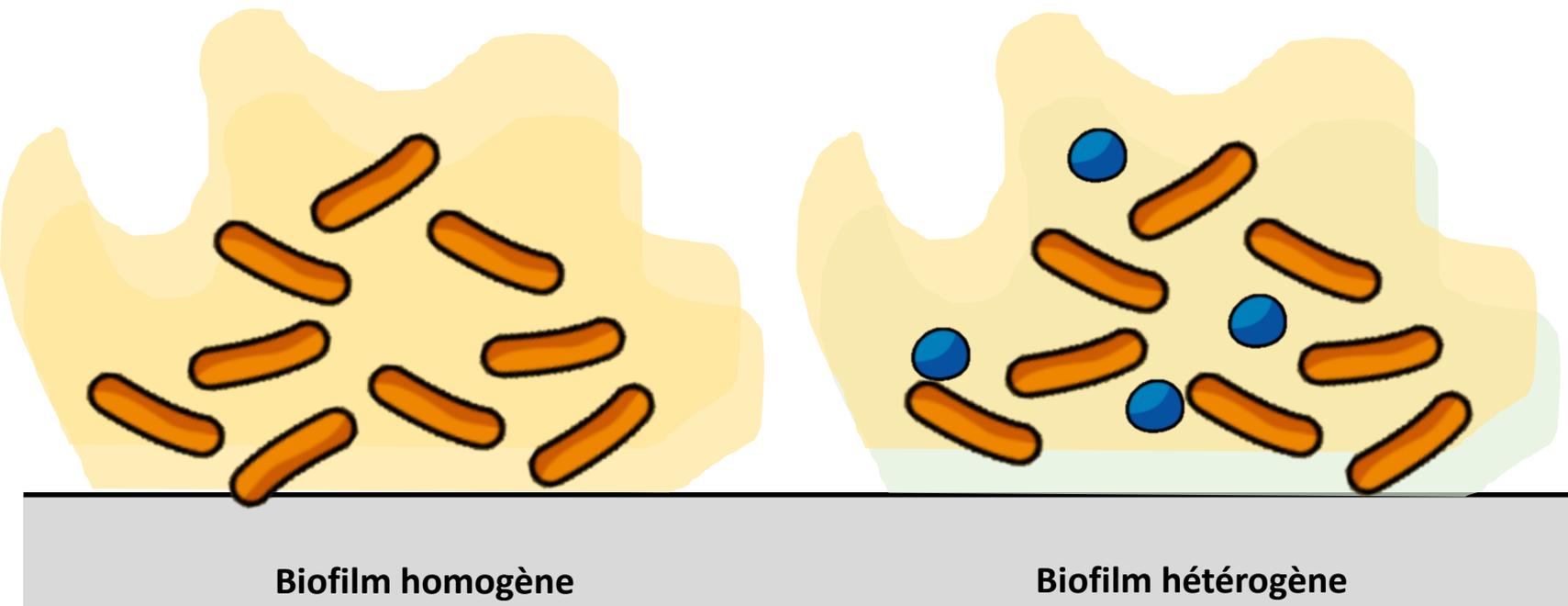


Clarificateur **APRES** traitement bactérien

4 facteurs sont nécessaires pour l'établissement du biofilm :

- Les micro-organismes
- Un milieu humide
- Une surface (ou une interface)
- Des nutriments

La variété de ces 4 éléments est à l'origine de la diversité des biofilms



Formation du biofilm

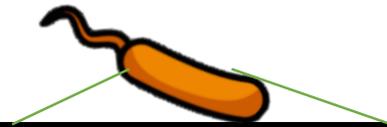
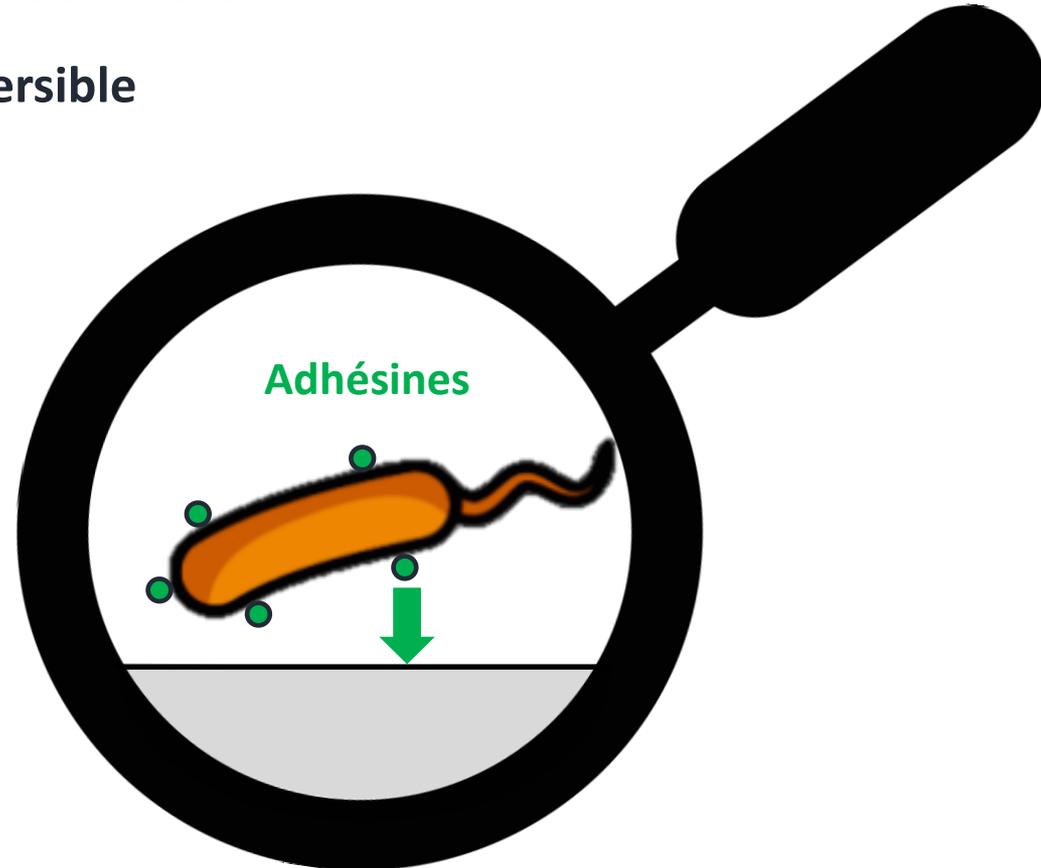
- Première étape : l'adhésion initiale , un phénomène rapide et réversible



Formation du biofilm

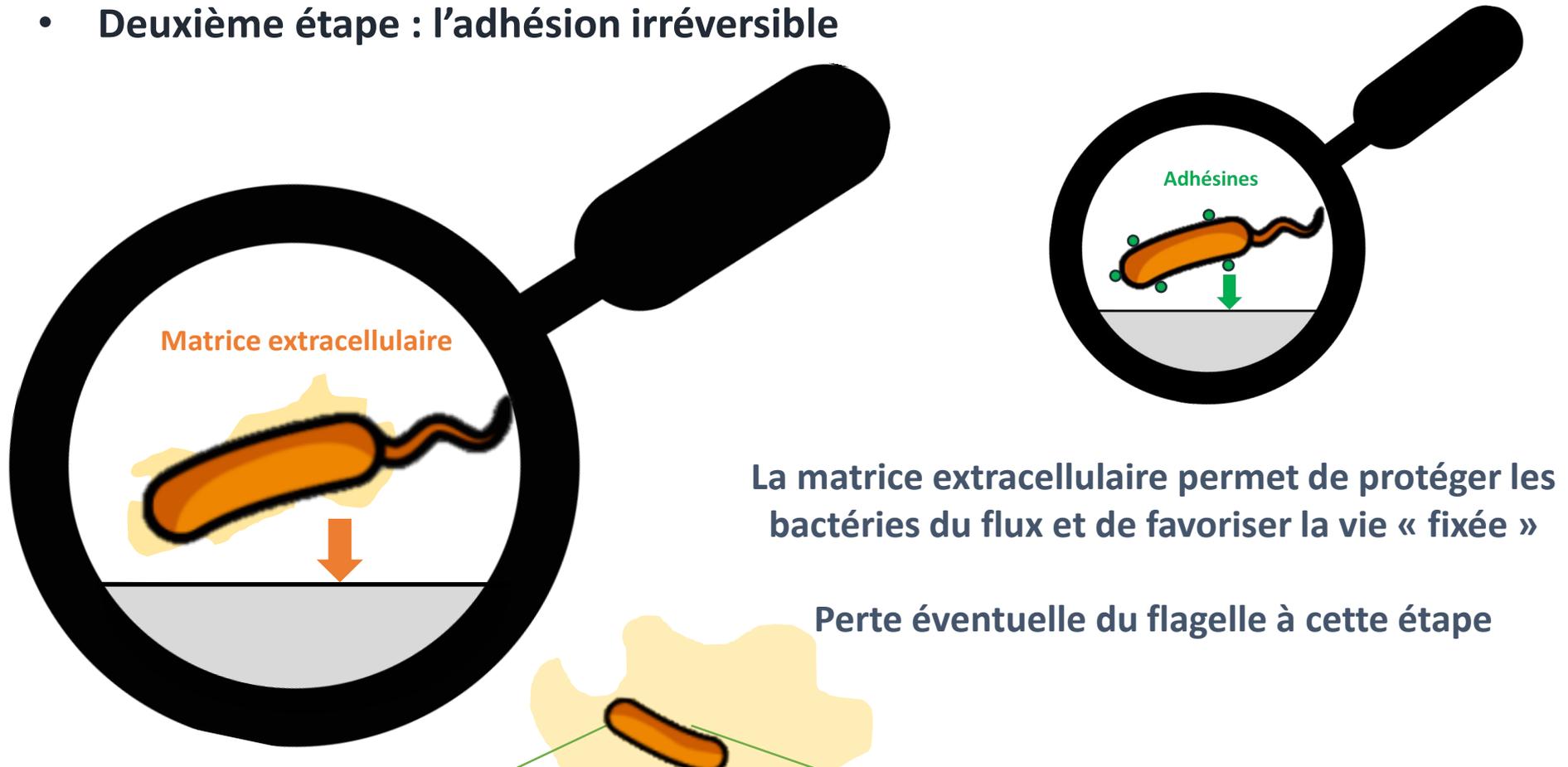
- Deuxième étape : l'adhésion irréversible

Attachement irréversible médié par
les pili et les fimbriae
(adhésines retrouvées sur ces
structures ou polymères d'ancrage)



Formation du biofilm

- Deuxième étape : l'adhésion irréversible



Formation du biofilm

- Troisième étape : formation des microcolonies

Les bactéries s'agrègent et se multiplient pour former les microcolonies

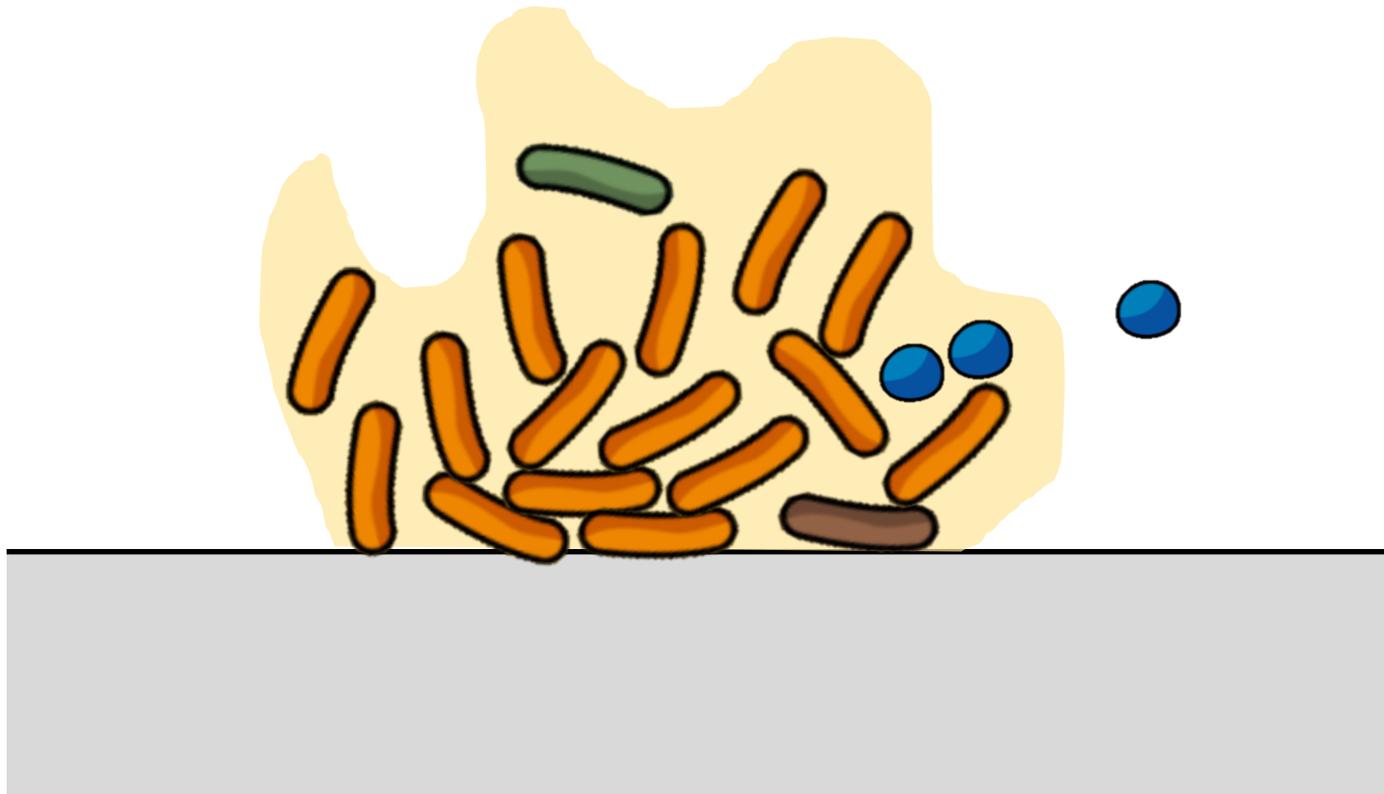


Formation du biofilm

- **Quatrième étape : maturation du biofilm**

Croissance en épaisseur

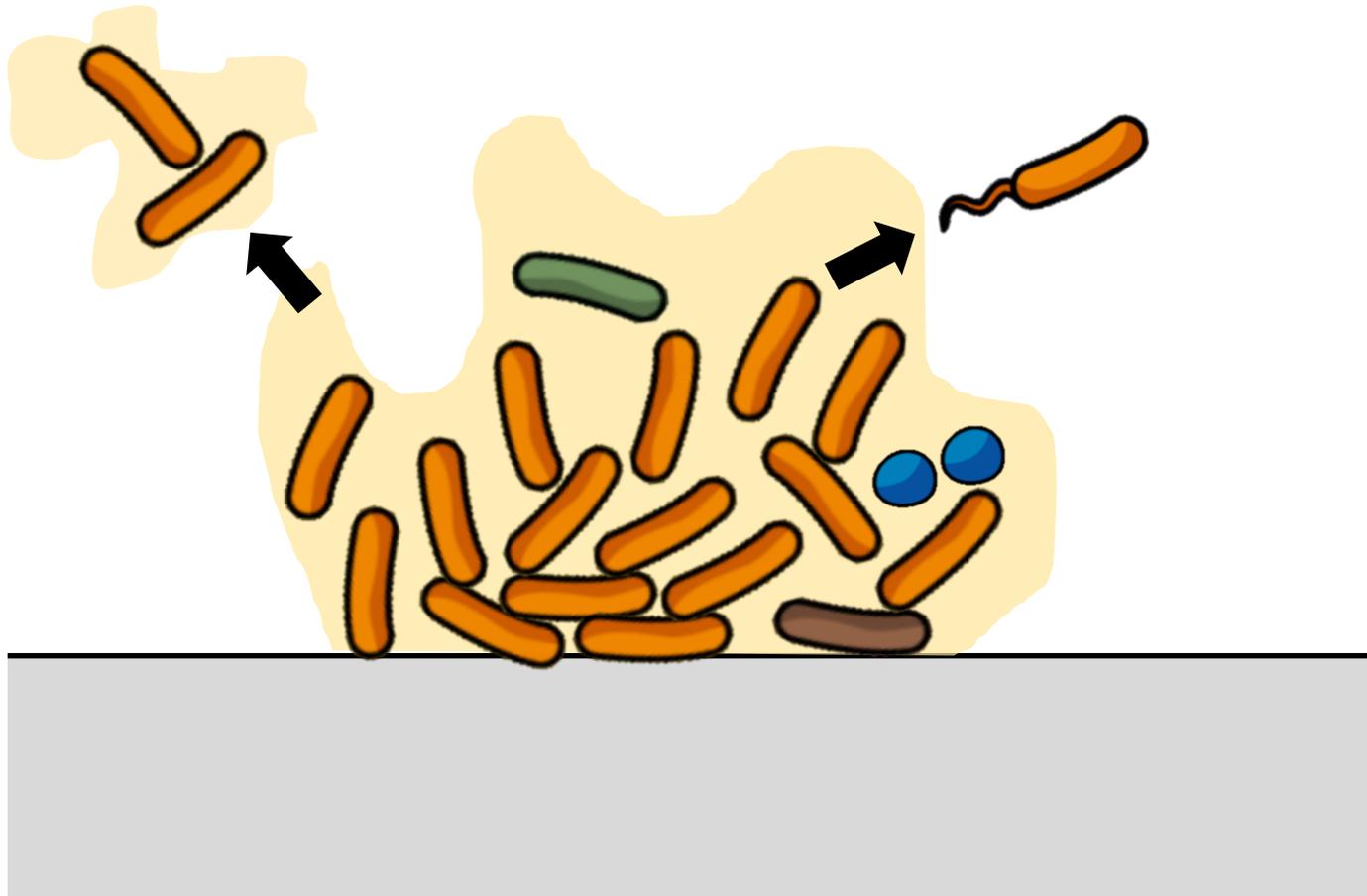
Incorporation de bactéries d'espèces différentes ou autres microorganismes (biofilm mixte)



Formation du biofilm

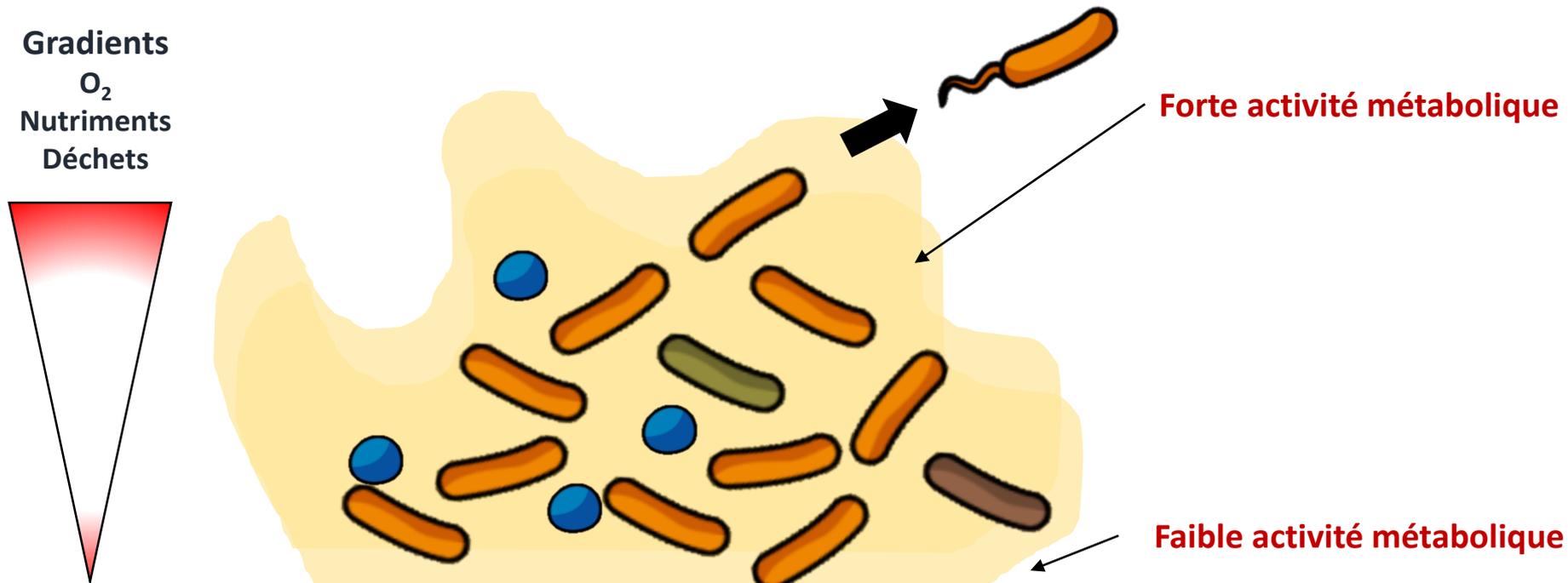
- Cinquième étape : détachement du biofilm

Le biofilm peut se disperser et libérer des bactéries mobiles (dispersion active) ou des agrégats bactériens entourés de matrice (dispersion passive). Ceci peut permettre l'établissement du biofilm sur une nouvelle surface



Caractéristiques du biofilm

- Hétérogénéité physico-chimique dans le biofilm
- Degré de viabilité variable des microorganismes (viables, viables non cultivables, morts)
- Possibilité de différences locales dans le biofilm (ex : activité métabolique différente)
- Source pour relarguer des micro-organismes sous forme planctonique



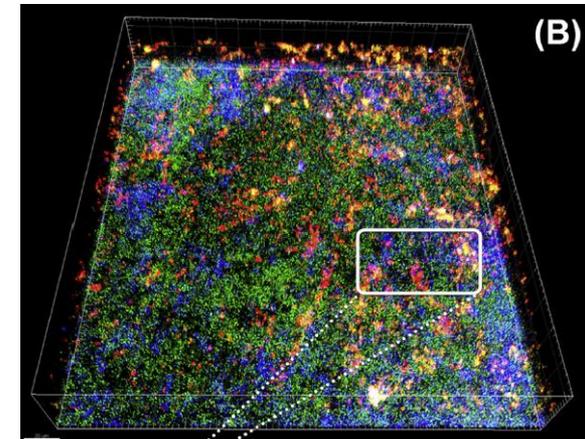
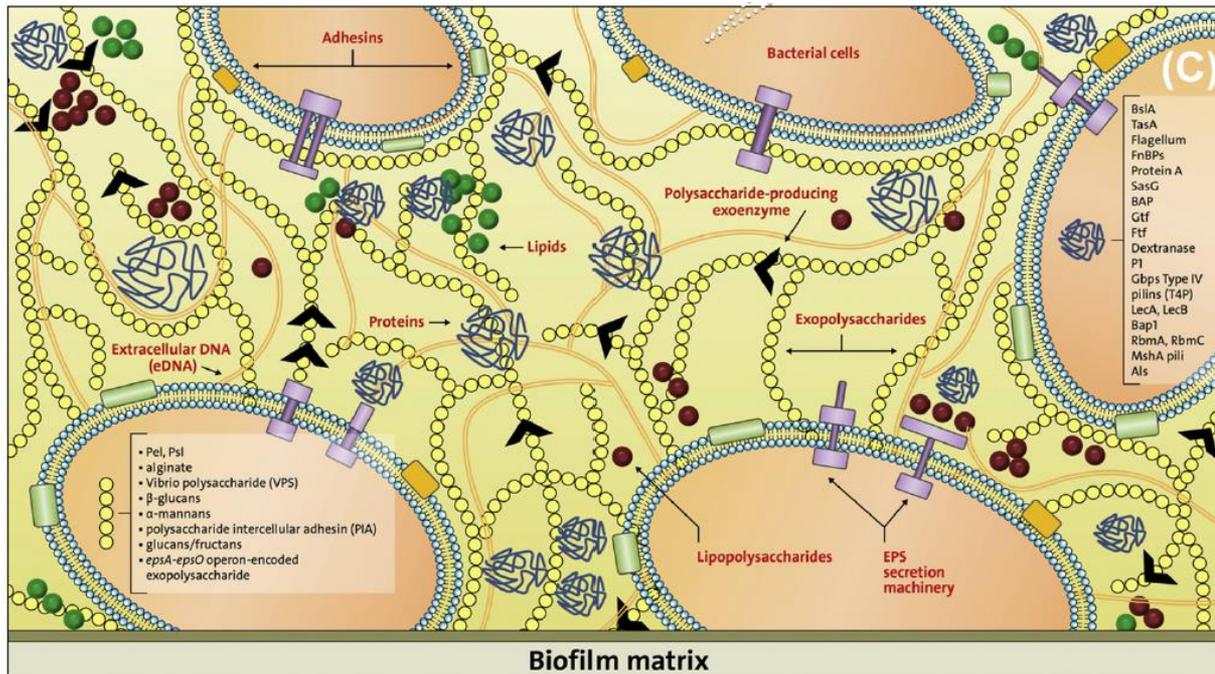
Caractéristiques du biofilm

- **Matrice extracellulaire**

- ❑ Constituée essentiellement de **polysaccharides extracellulaires sécrétés** par les micro-organismes mais également de **protéines** (issues du métabolisme microbien), d'**acides nucléiques** (issus de la lyse de micro-organismes) et enfin de produits issus du milieu environnant (substances minérales ou organiques, débris divers)

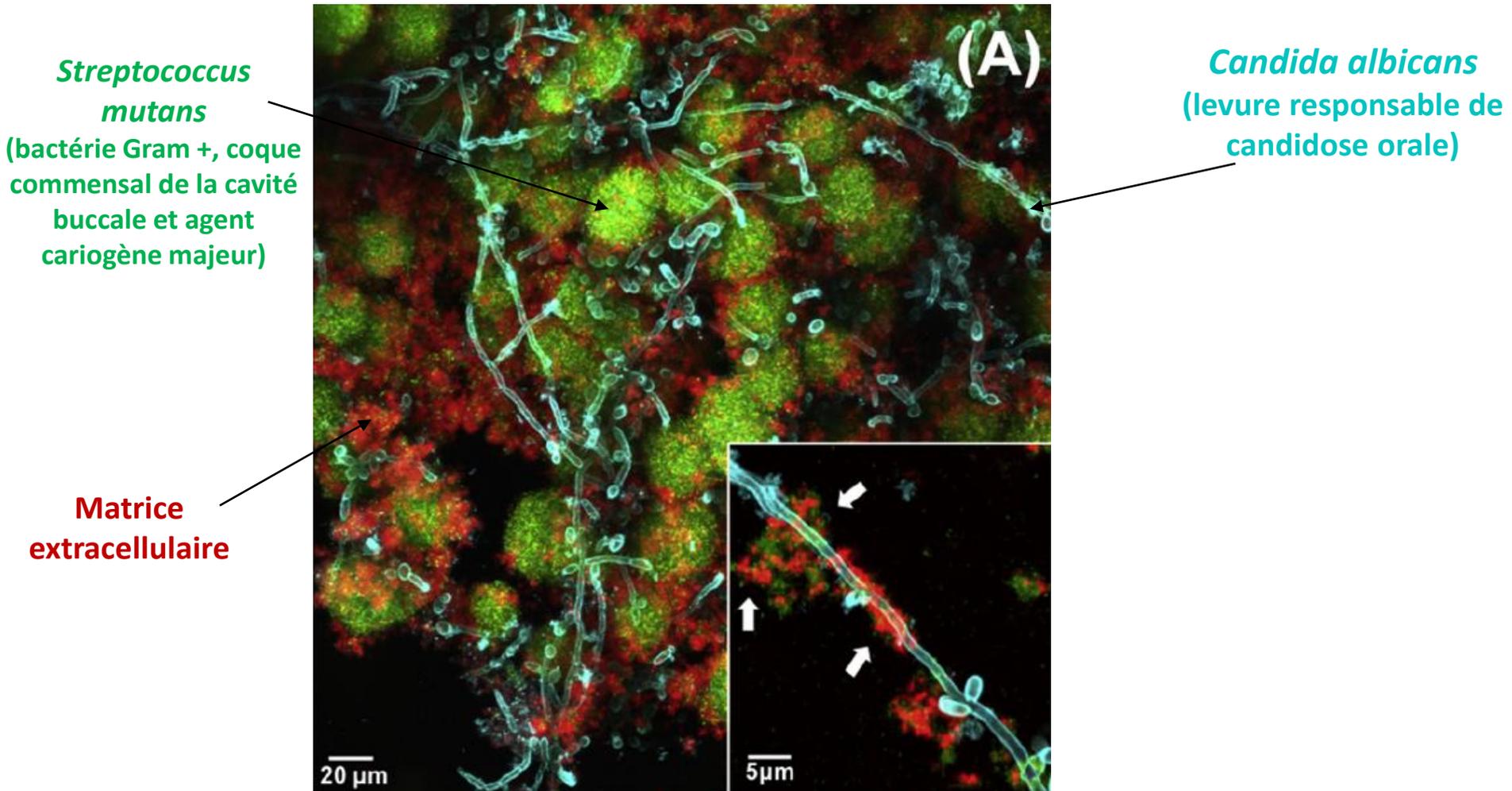
- ❑ Très hydratée

- ❑ Dynamique: n'est pas uniforme dans sa composition et sa forme dans le temps et l'espace

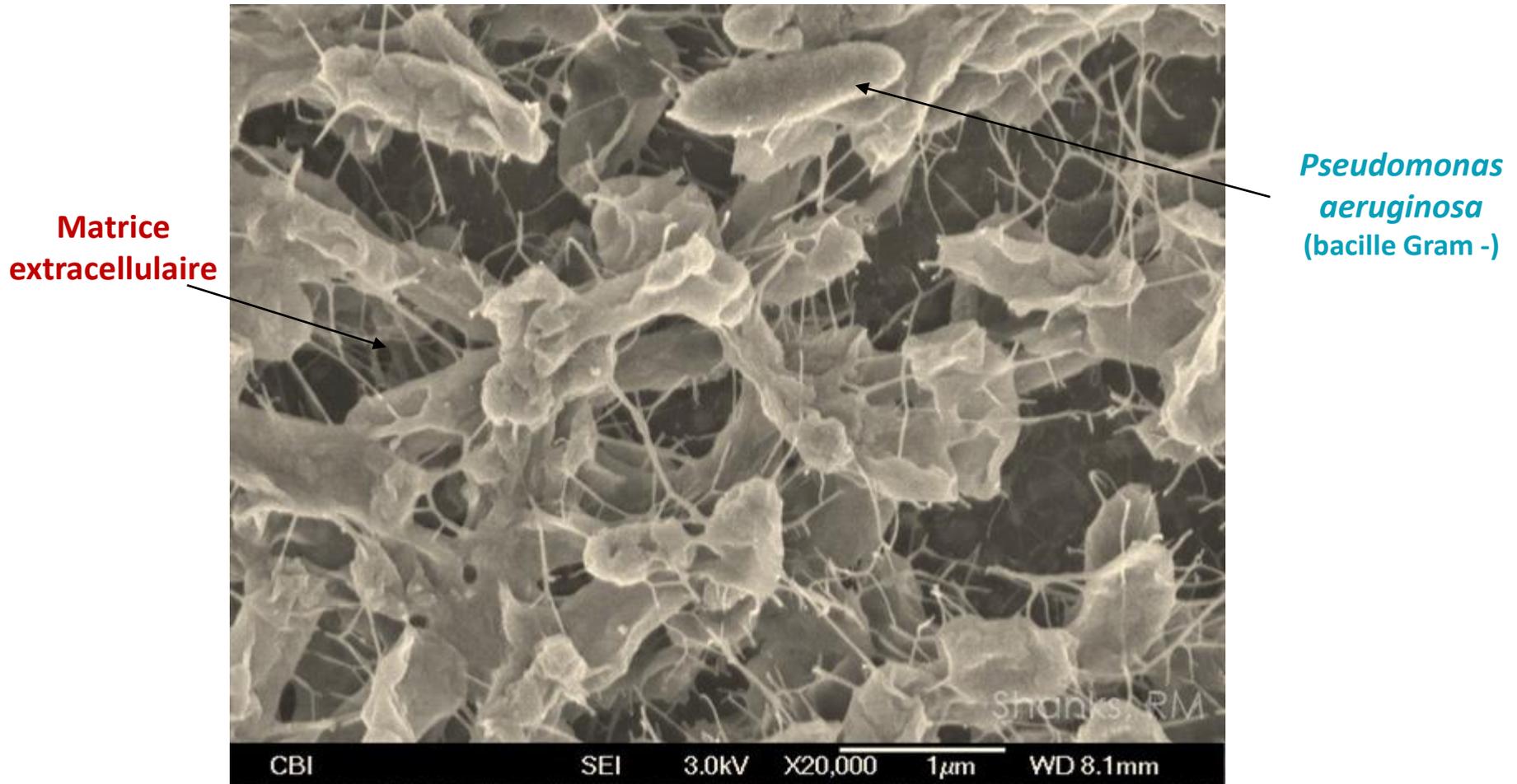


Reconstruction 3D de biofilm
Microscopie confocale à balayage laser

- Exemple de biofilm dentaire (microscopie confocale)



- Exemple de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (microscopie électronique à balayage)
- Bactérie résistante à de nombreux antiseptiques, responsable d'infections nosocomiales



- Exemple de biofilm fongique d'*Aspergillus fumigatus* (microscopie électronique à balayage)
- Responsable d'infections pulmonaires sévères

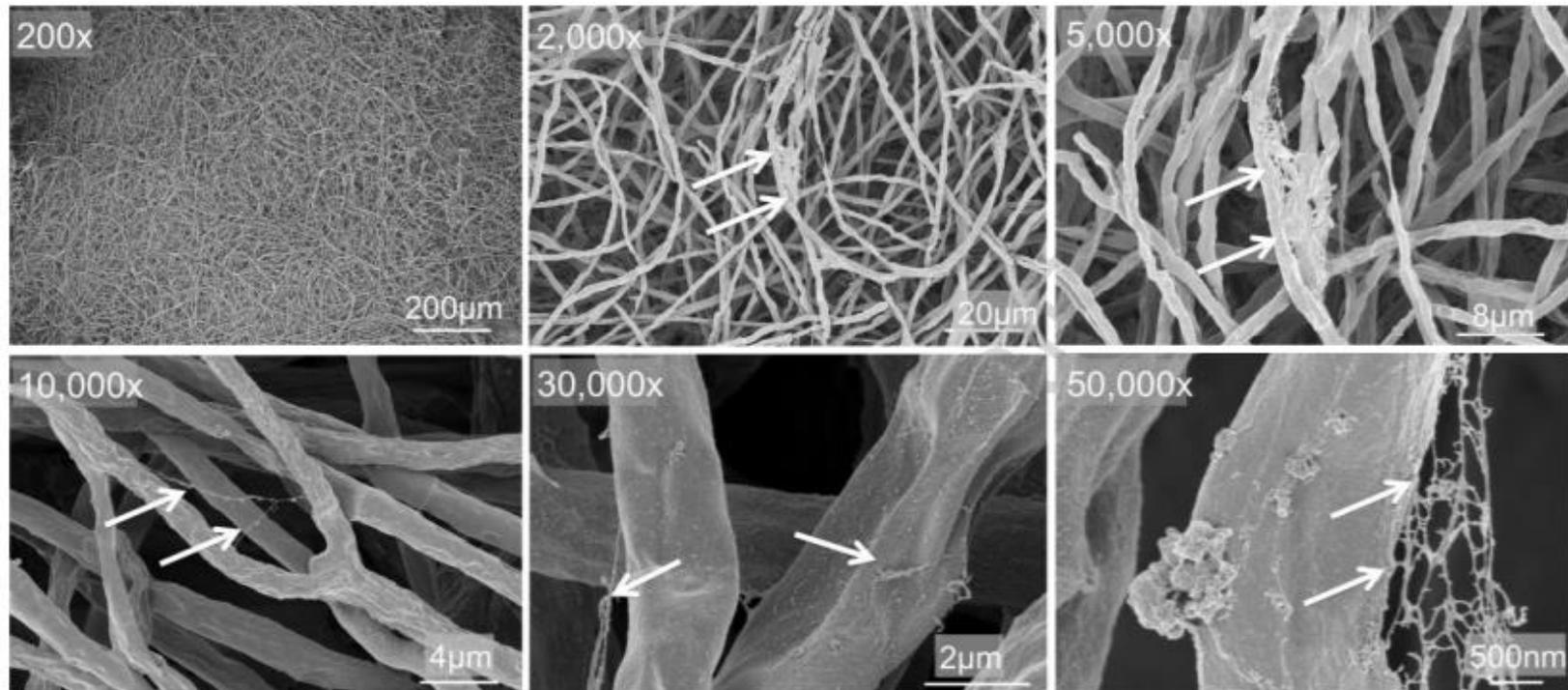
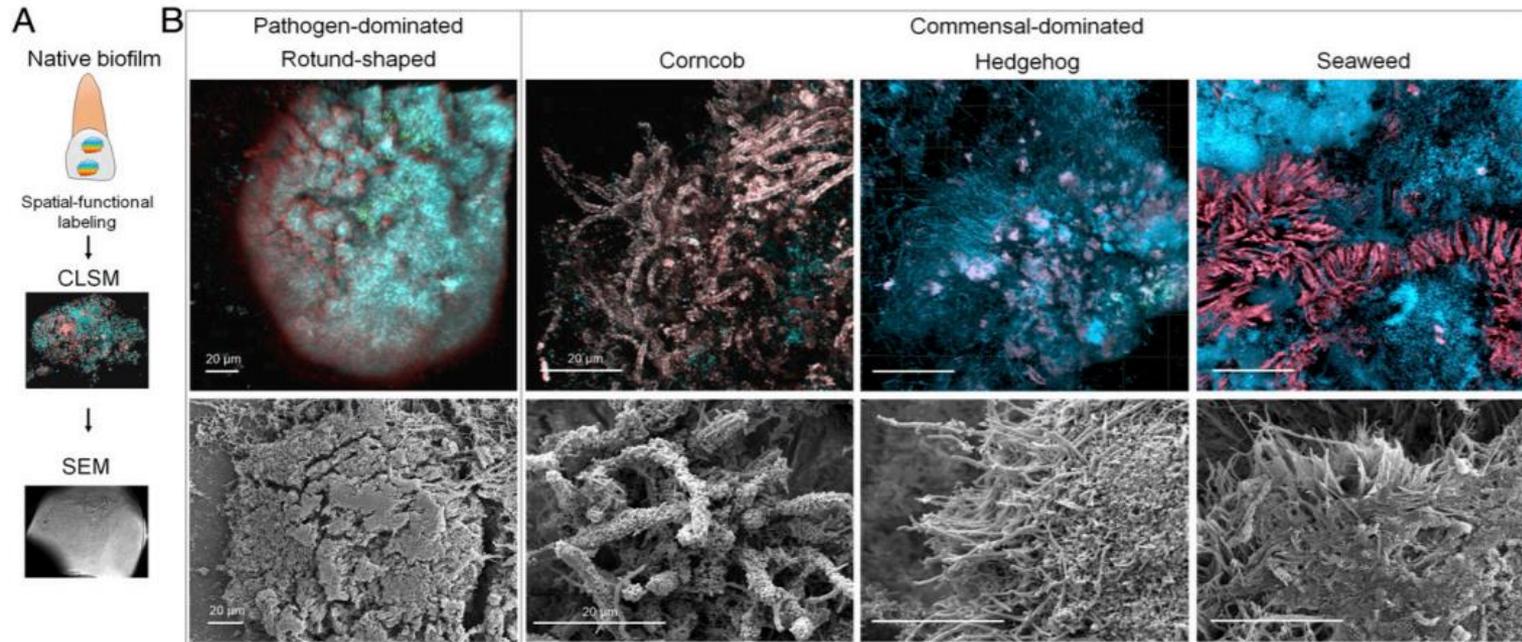
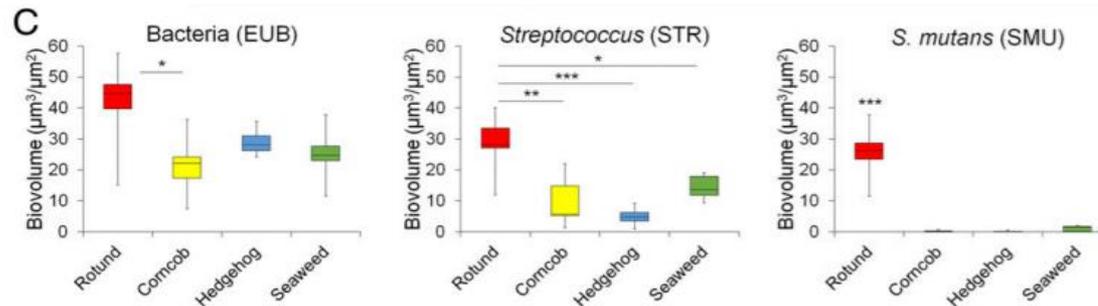


FIGURE 4: Cryofixation of disk grown *A. fumigatus* biofilms reveal well-preserved hyphae and ECM (arrows) in a non-collapsed 3D biofilm architecture.

ECM = matrice extracellulaire

Diversité structurale des biofilms

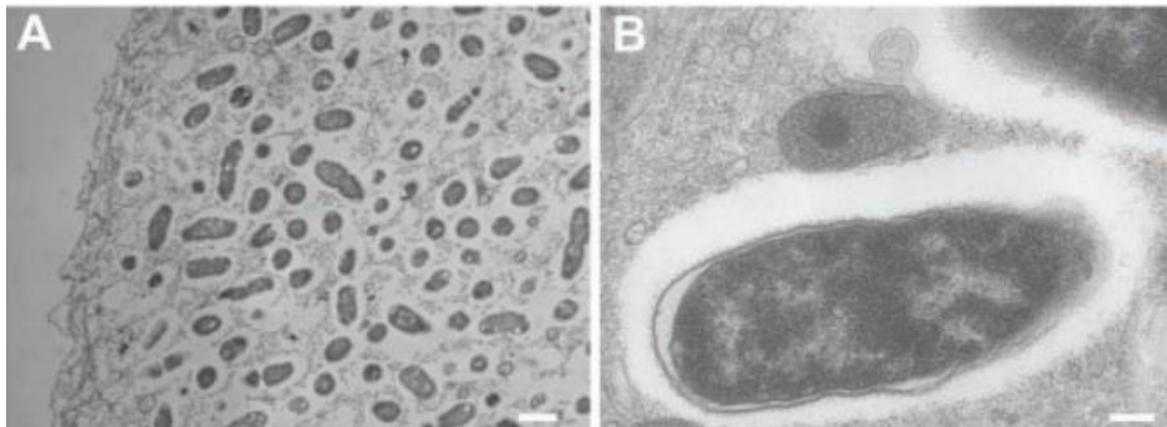
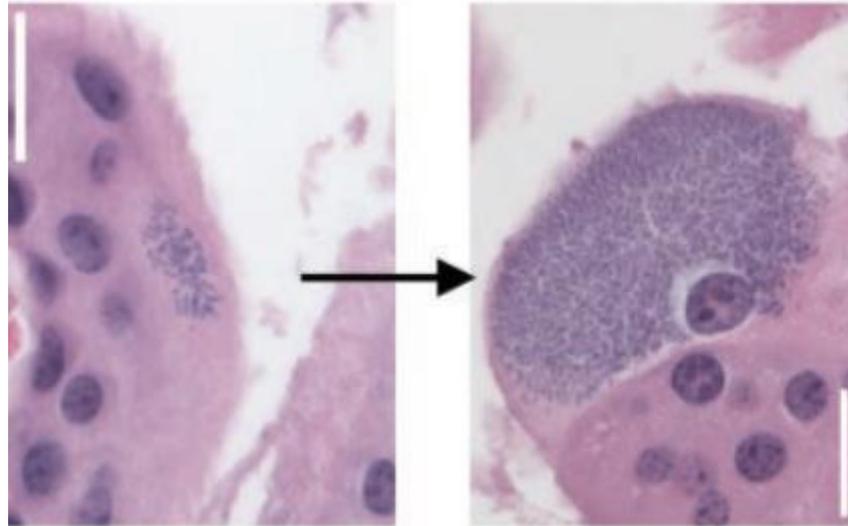
- Densité microbienne variable : 10^4 à 10^8 microorganismes viables/cm²
- Epaisseur variable de quelques μm à plusieurs cm
- Architecture parfois spécifique (forme ronde) du biofilm dentaire formé par *S. mutans* (carie infantile)

*Forme ronde**Epi de maïs**Hérisson**Algue marine*

Biofilm intracellulaire

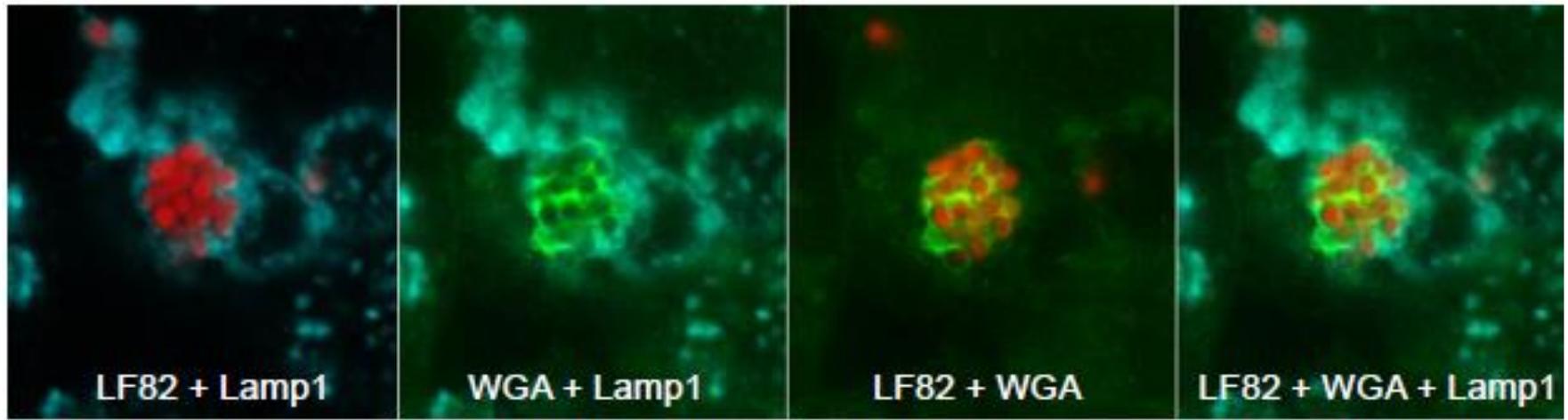
Présence d'une matrice de type biofilm autour d'*E. coli* UT189

Cellules épithéliales de vessie de souris infectée par une souche d'*E. coli* uropathogène



Biofilm intracellulaire

Présence d'une matrice de type biofilm entourant *E. coli* LF82 dans la vacuole du macrophage



Prudent *et al.*, 2020, bioRxiv

Lamp1 = marqueur de la membrane lysosomale (localisation du phagolysosome)

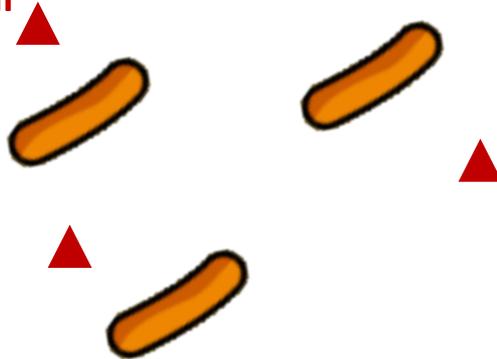
WGA = marqueur utilisé pour visualiser les exo-polysaccharides formant la matrice de type « biofilm »

Le biofilm, un haut lieu d'échange !

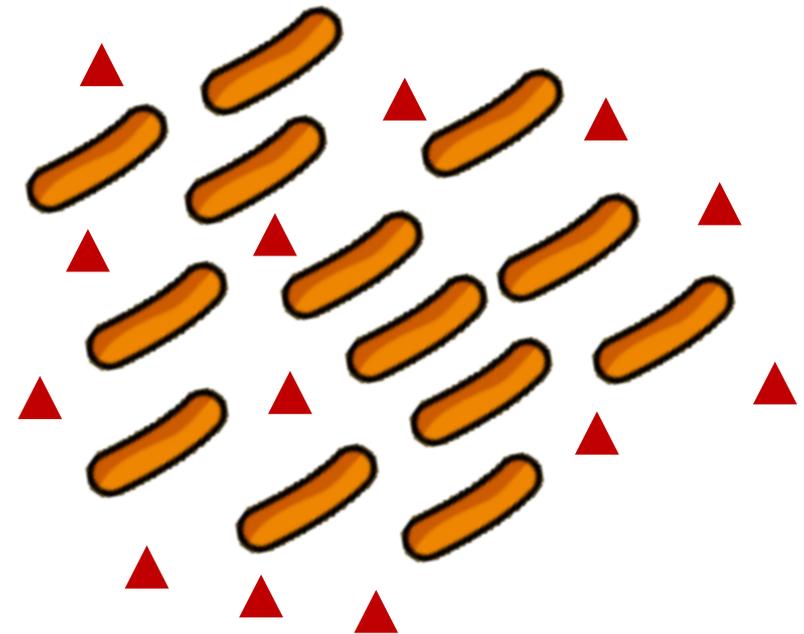
Le quorum-sensing = capacité des microorganismes à détecter des molécules indiquant la densité de population, à intégrer ce signal et opter pour un comportement collectif

Faible densité cellulaire

Auto-inducteur

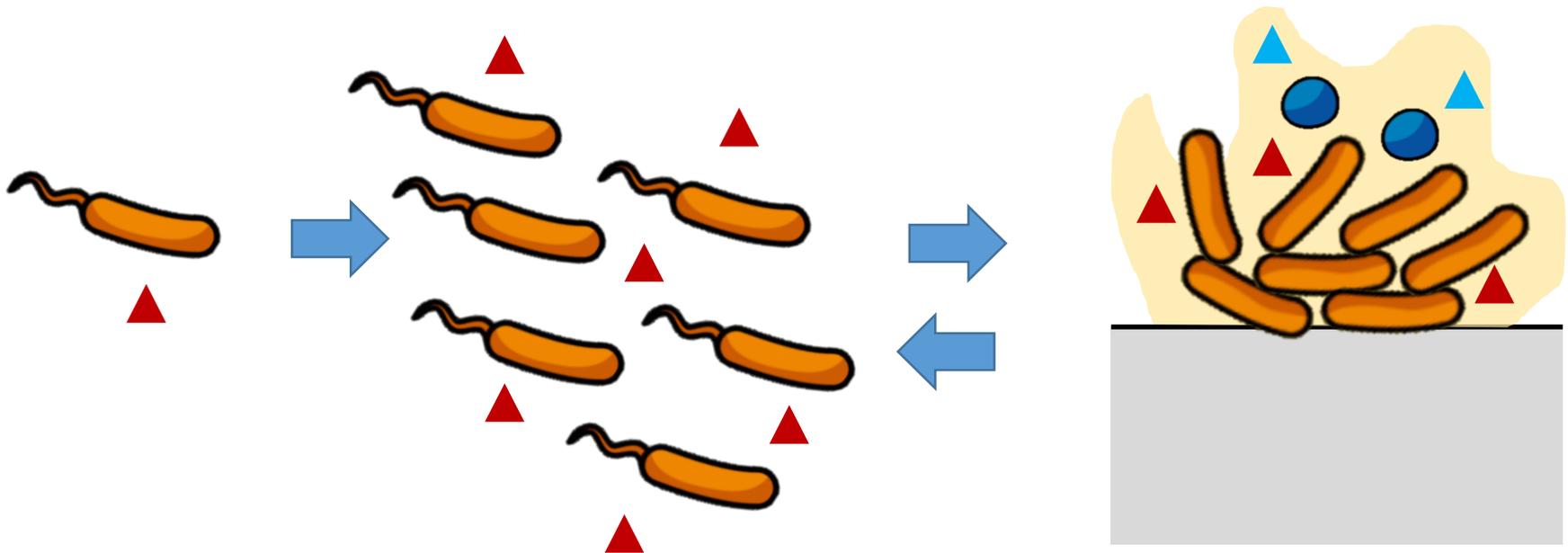


Forte densité cellulaire



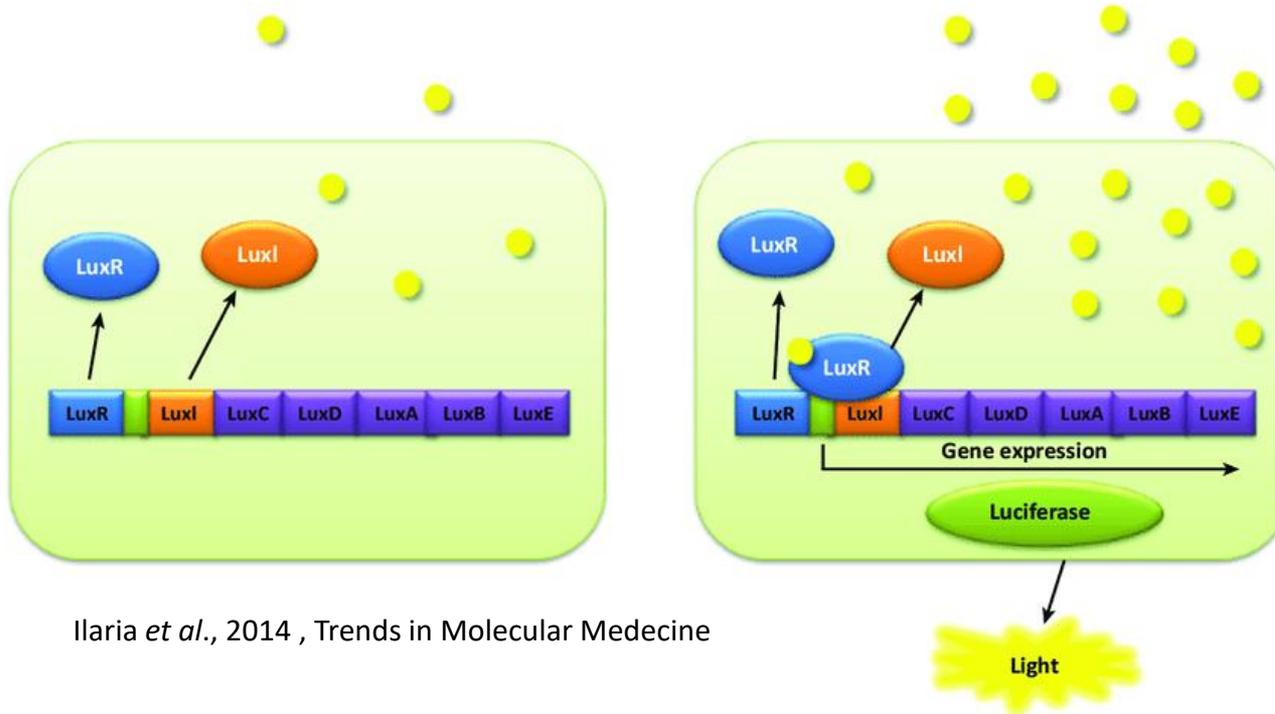
Le biofilm, un haut lieu d'échange !

Activation du mode « biofilm » ou dispersion du biofilm par le quorum sensing



Le biofilm, un haut lieu d'échange !

Exemple : activation de la bioluminescence chez *Vibrio fischeri*



Ilaria *et al.*, 2014 , Trends in Molecular Medicine

Forte densité cellulaire



Quand il y a peu de bactéries → peu de production de l'auto-inducteur par LuxI

Quand la population bactérienne atteint le seuil → la quantité d'auto-inducteur est suffisante pour se fixer au régulateur LuxR qui sous cette forme active la transcription de l'opéron *lux* conduisant *in fine* à la production de luciférase donc au phénomène de bioluminescence

Le biofilm, un haut lieu d'échange !

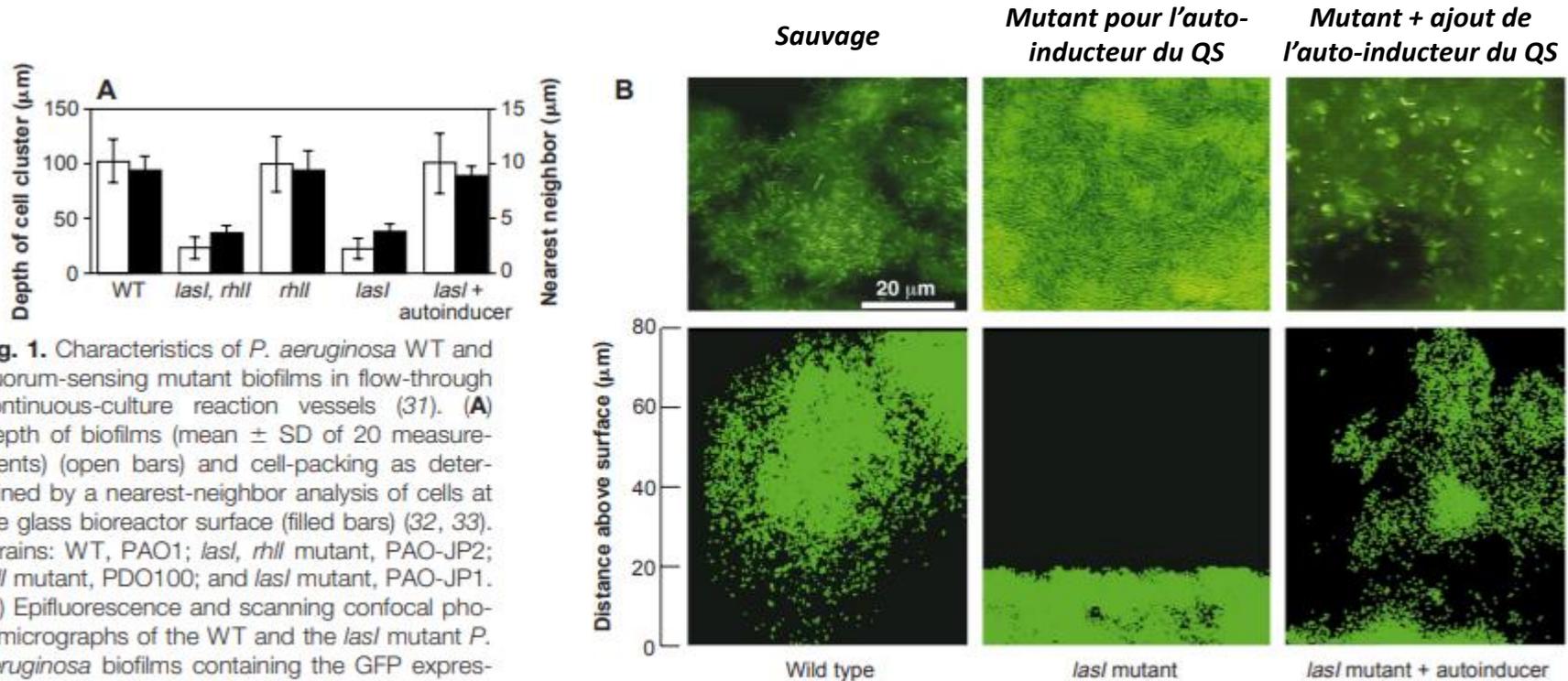
Exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*

Fig. 1. Characteristics of *P. aeruginosa* WT and quorum-sensing mutant biofilms in flow-through continuous-culture reaction vessels (31). **(A)** Depth of biofilms (mean \pm SD of 20 measurements) (open bars) and cell-packing as determined by a nearest-neighbor analysis of cells at the glass bioreactor surface (filled bars) (32, 33). Strains: WT, PAO1; *lasI, rhII* mutant, PAO-JP2; *rhII* mutant, PDO100; and *lasI* mutant, PAO-JP1. **(B)** Epifluorescence and scanning confocal photomicrographs of the WT and the *lasI* mutant *P. aeruginosa* biofilms containing the GFP expression vector pMRP9-1. (Top) Epifluorescence photomicrographs of the WT (PAO1) and the *lasI* mutant (PAO-JP1) grown with or without the autoinducer, 3OC₁₂-HSL added to the medium. (Bottom) Sagittal views of Z series of wild-type and *lasI* mutant biofilms (with

or without 3OC₁₂-HSL) acquired by scanning confocal laser microscopy. Because the bacterial cells contain GFP, the color correlates with cell density.

Davies *et al.*, 1998, Science

Les mutants pour le gène *lasI* ne produisant plus l'auto-inducteur (3-oxododécanyol-HSL) présentent des biofilms plus minces que les souches sauvages.

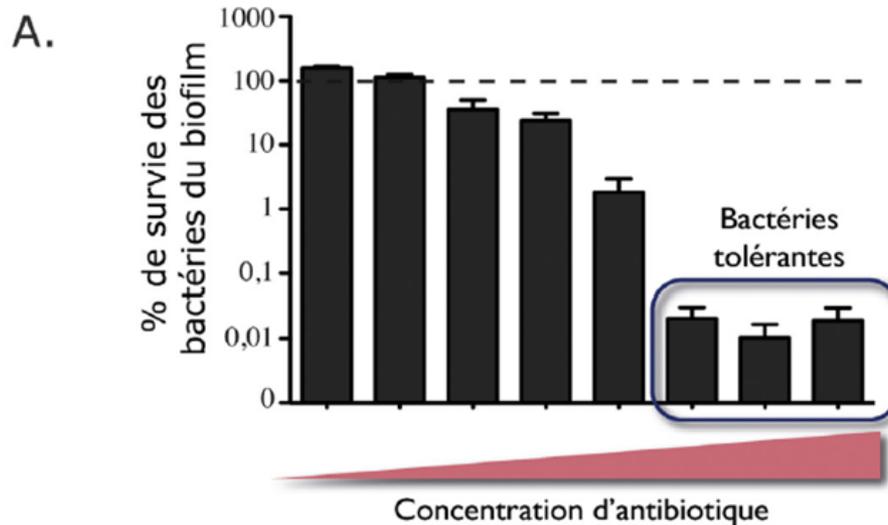
Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Par rapport à des bactéries en culture liquide, celles retrouvées dans les biofilms tolèrent des doses antibiotiques de 10 à 1000 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI)

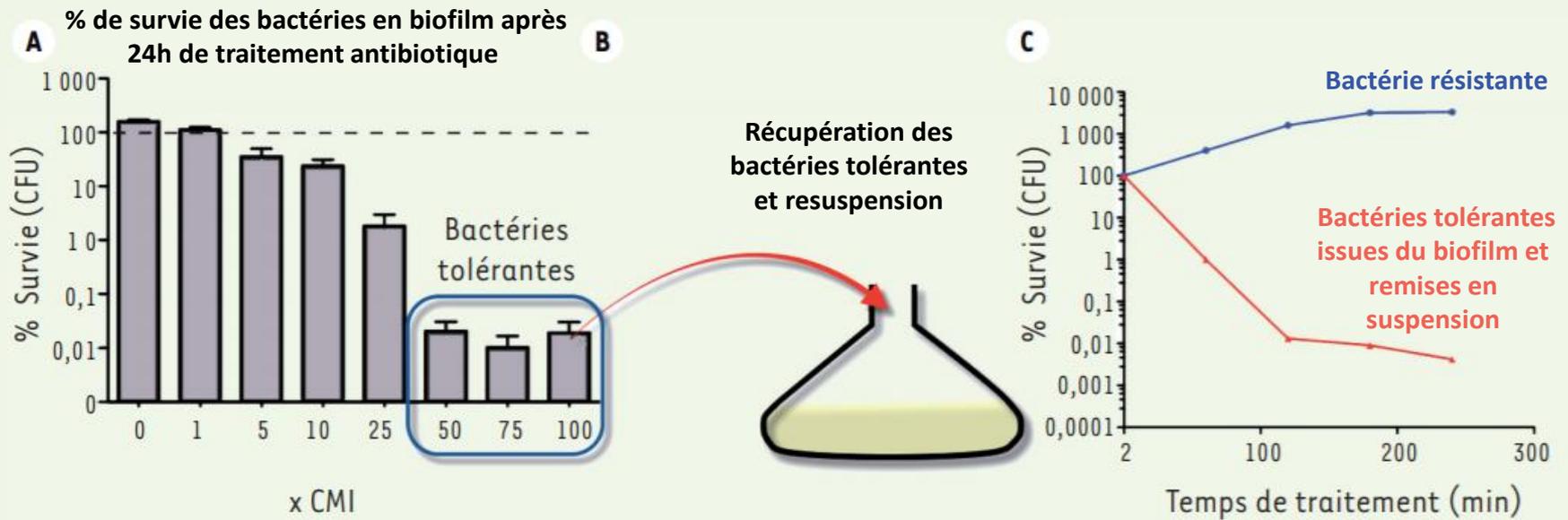
TABLE 4. Susceptibility of planktonic and biofilm bacteria to selected antibiotics

Reference	Organism	Antibiotic	MIC or MBC of planktonic phenotype (µg/ml)	Concn effective against biofilm phenotype (µg/ml)
215	<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4	Vancomycin	2 (MBC)	20 ^a
26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Imipenem	1 (MIC)	>1,024 ^b
26	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ampicillin	2 (MIC)	512 ^b
208	<i>P. pseudomallei</i>	Ceftazidime	8 (MBC)	800 ^c
114	<i>Streptococcus sanguis</i> 804	Doxycycline	0.063 (MIC)	3.15 ^d

Dolan & Costerton 2002, Clin Microbiol Rev

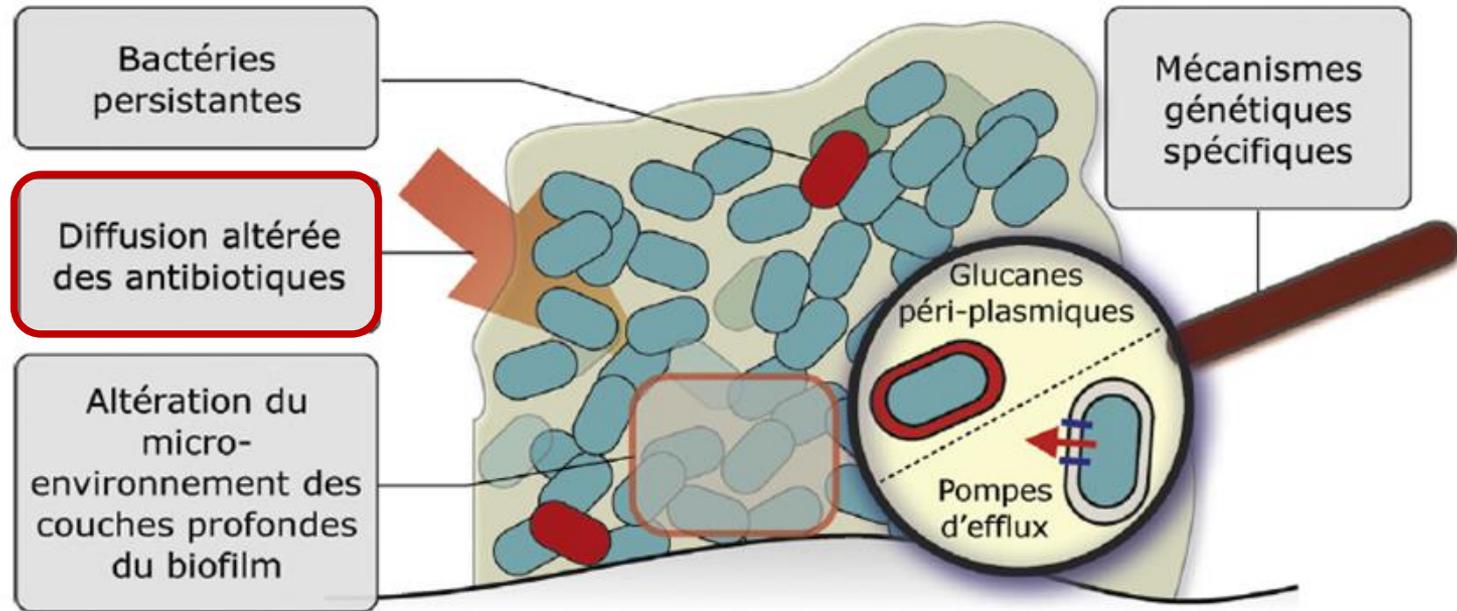


Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Tolérance \neq RésistanceLebeaux *et al.*, 2012 , Medecine Science

Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Mécanismes possibles pour expliquer cette tolérance :



Lebeaux *et al.*, 2012 , Medecine Science

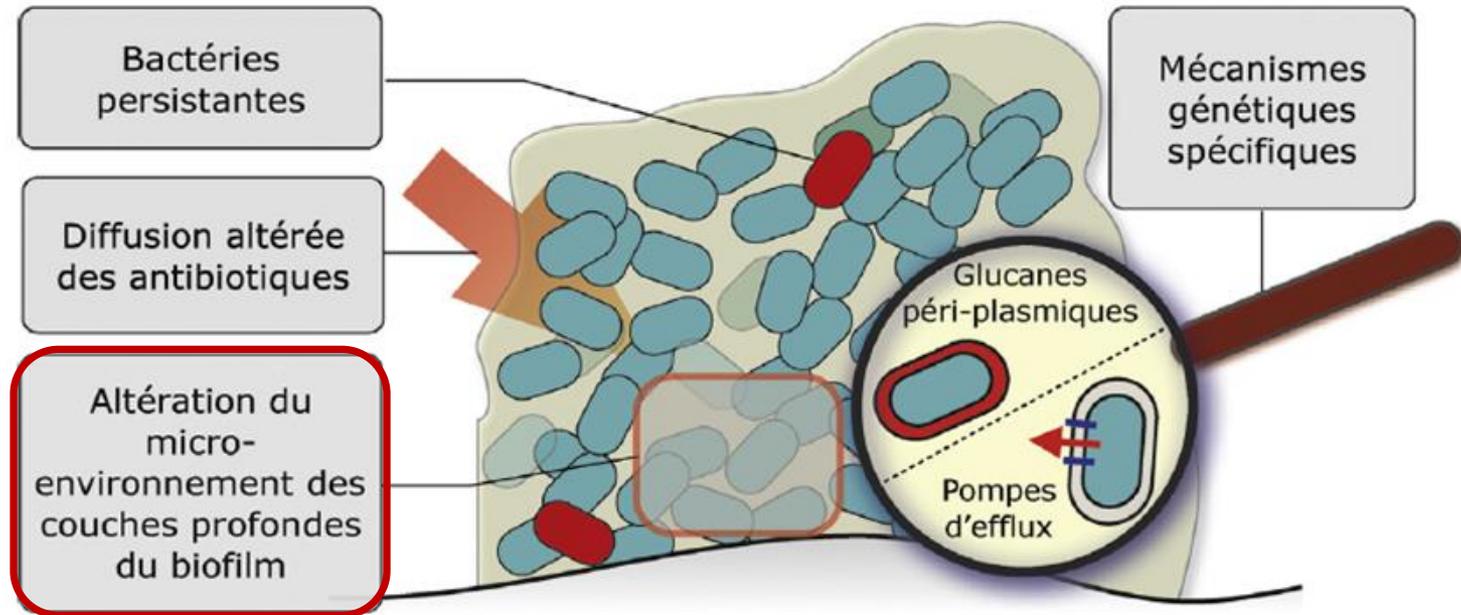
Exemple : après 2h de contact entre un antiseptique chloré et un biofilm mixte (*Pseudomonas aeruginosa* / *Klebsiella pneumoniae*), la concentration de l'antiseptique dans les couches profondes du biofilm n'est que de 20% (De Beer *et al.*, 1994, Environ Microbiol).

MAIS

Dans certains biofilms ou les antibiotiques diffusent correctement, on retrouve des bactéries tolérantes

Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Mécanismes possibles pour expliquer cette tolérance :



Lebeaux *et al.*, 2012 , Medecine Science

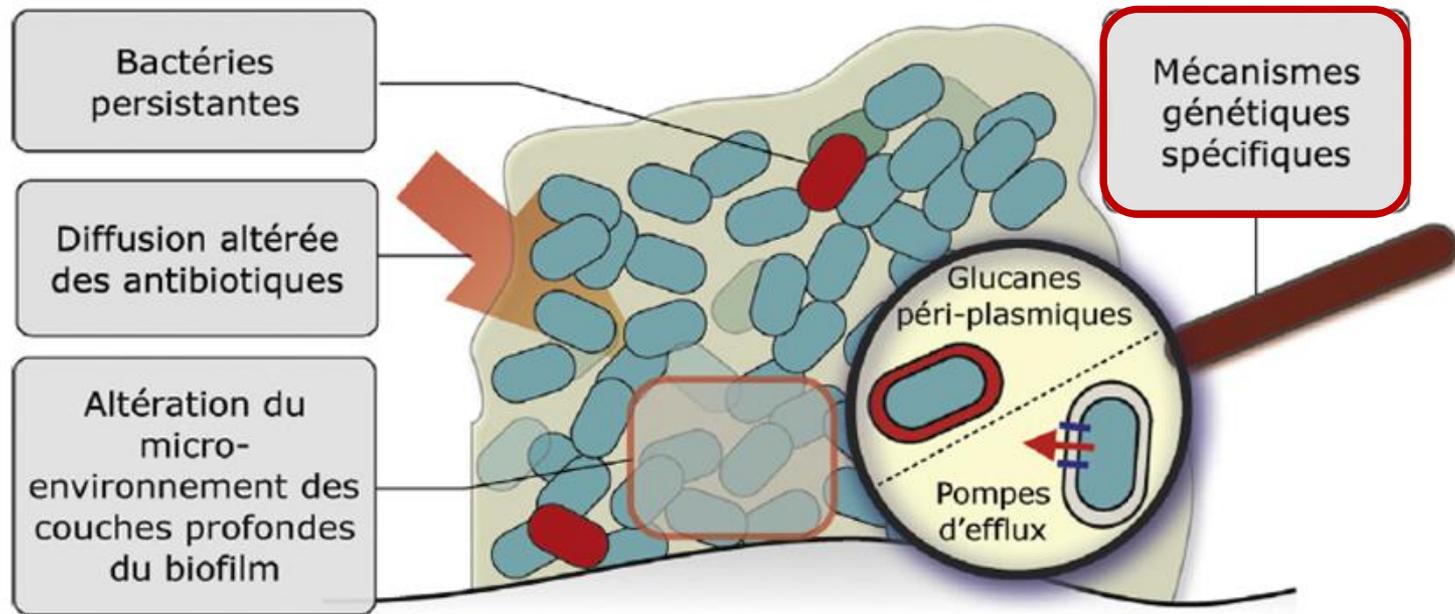
Exemple : du fait de la carence nutritionnelle dans les couches profondes du biofilm les bactéries ne se multiplient pas donc sont peu sensibles à l'action des β -lactamines (antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi).

MAIS

Ceci n'est pas la phénomène pour des antibiotiques actifs sur des bactéries qui ne se multiplient pas

Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Mécanismes possibles pour expliquer cette tolérance :



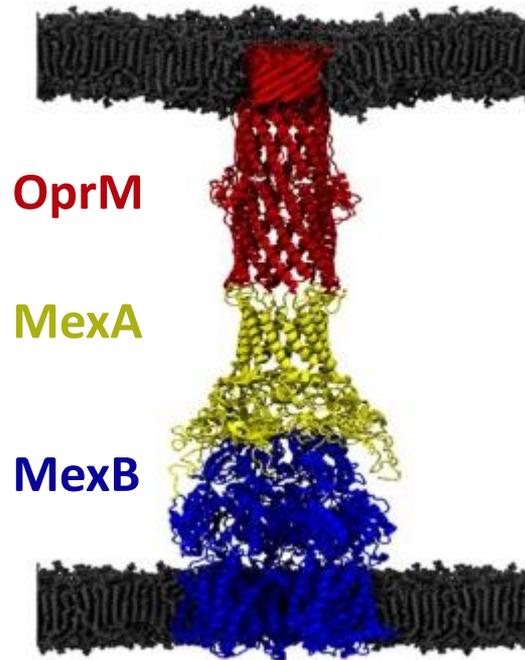
Lebeaux *et al.*, 2012 , Medecine Science

Exemple : séquestration des aminosides par un glucane péri-plasmique produit en condition de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il existe aussi des systèmes de pompe à efflux dont l'expression est modulée en condition de biofilm chez *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

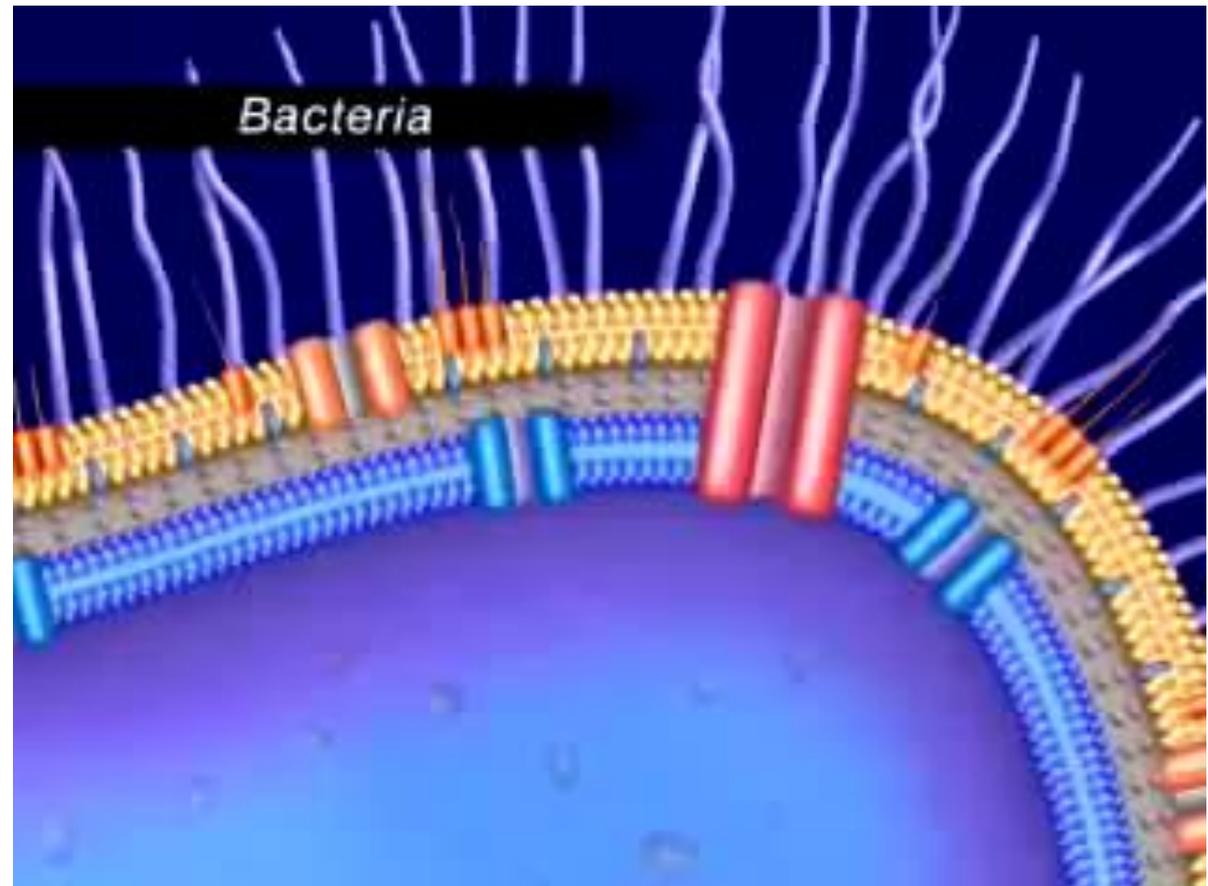
Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Exemple de la pompe à efflux MexAB-OprM chez *Pseudomonas aeruginosa* :
Pompe la plus étudiée car exprimée de manière constitutive

Membrane externe

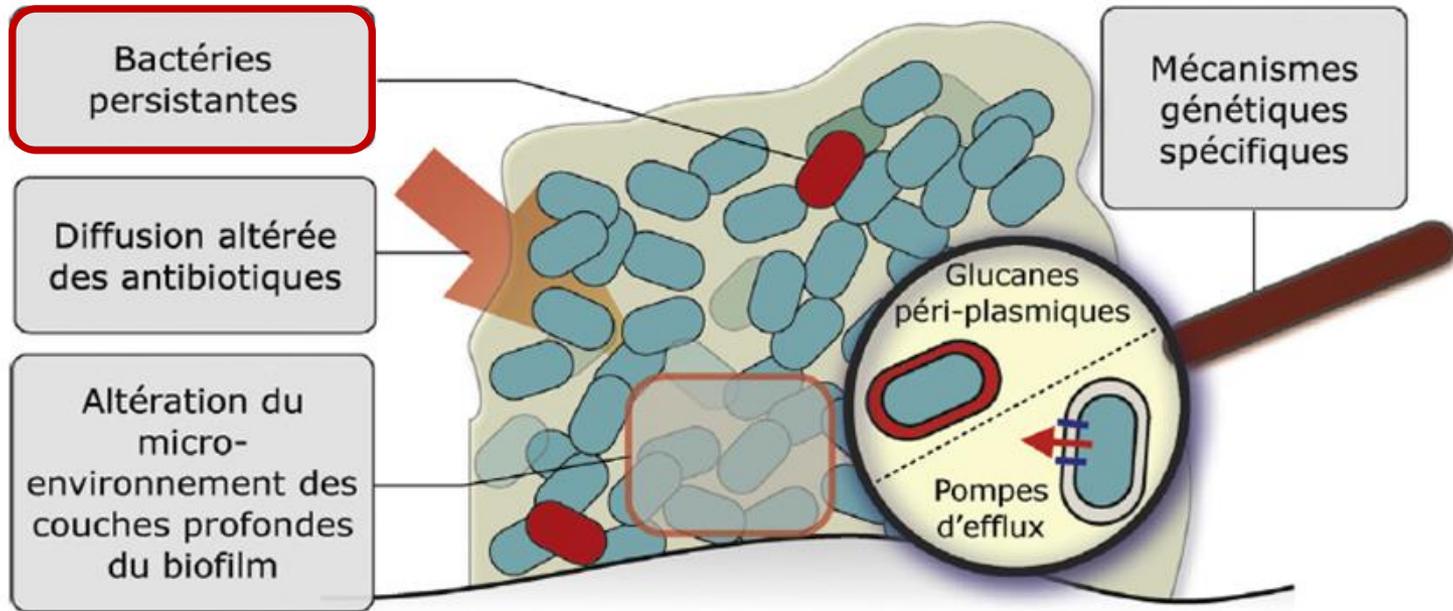


Membrane interne



Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Mécanismes possibles pour expliquer cette tolérance :



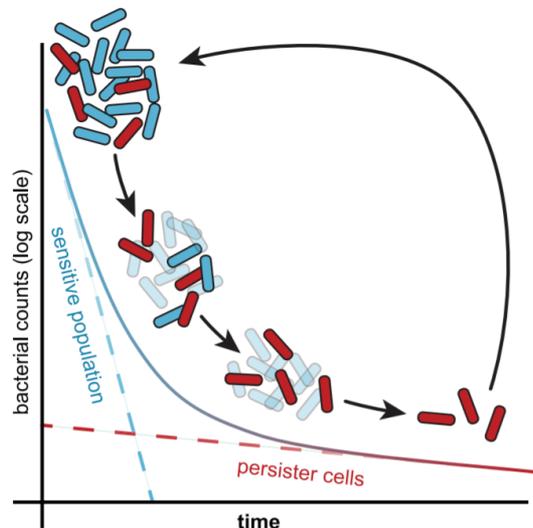
Lebeaux *et al.*, 2012 , Medecine Science

Bactéries persistantes ou « **persisters** » : sous population bactérienne minoritaire (0,001 à 0,1% de la population globale) capable de survivre en présence de forte concentrations d'antibiotiques bactéricides. En condition de stress/ infection la proportion de persisters peut augmenter fortement.

Les bactéries persistantes

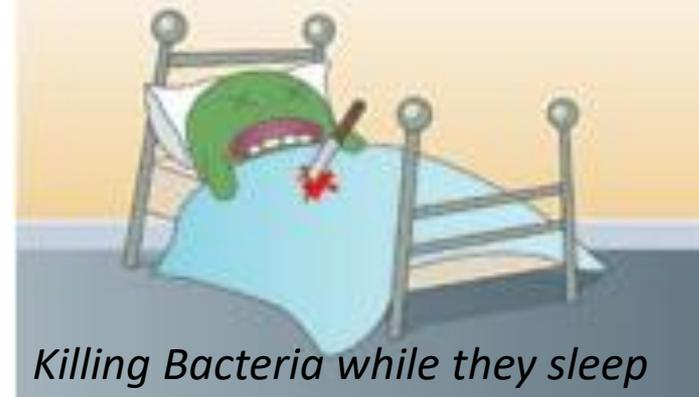
Caractéristiques des « persisters » :

- Très **tolérantes** aux antibiotiques (à plusieurs classes) mais pas **résistantes**
- Il s'agit de bactéries qui transitoirement ne se multiplient pas mais ont la capacité de reprendre une croissance après arrêt du traitement antibiotique : « bactéries **dormantes** »
- Phénomène décrit dès 1944 par Joseph Bigger qui n'arrivait pas à stériliser totalement un inoculum de *Staphylococcus aureus* avec de la pénicilline



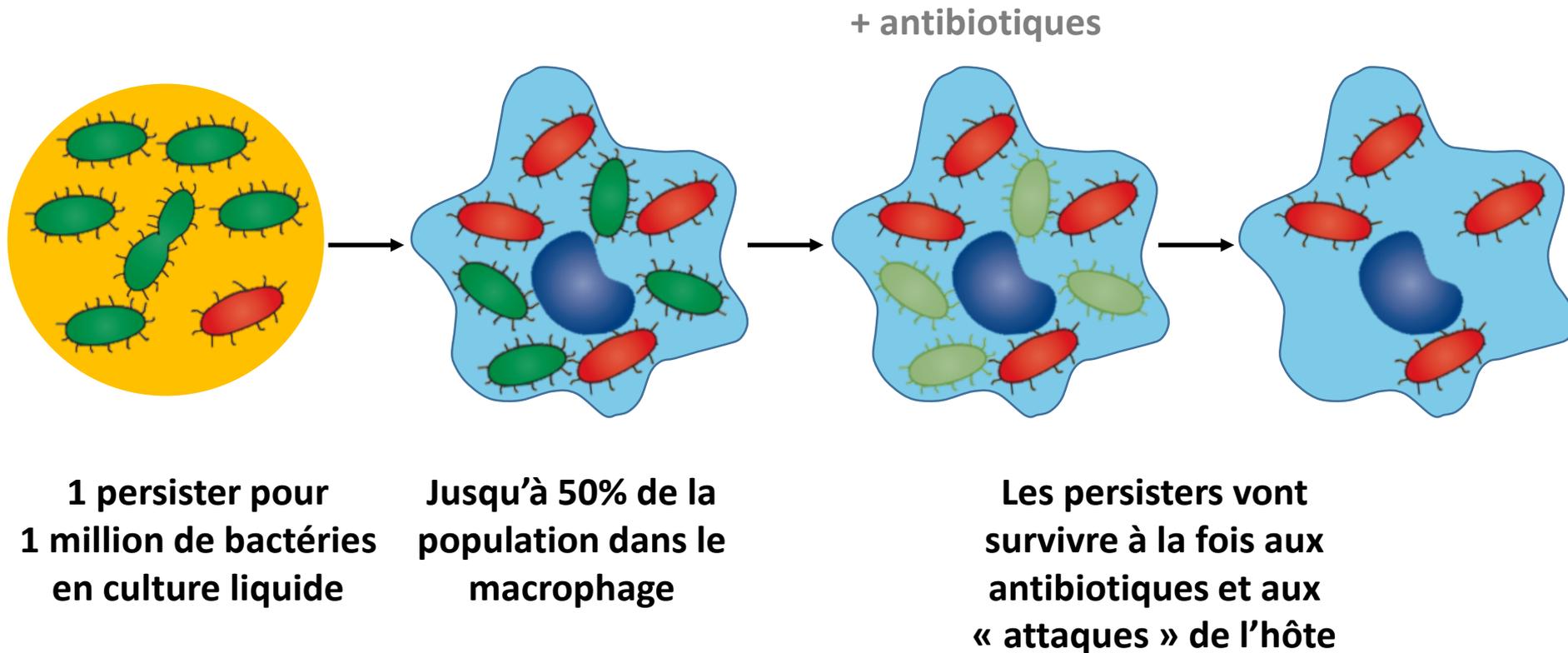
Harms *et al.*, 2016, Science

How to fight against persisters ?



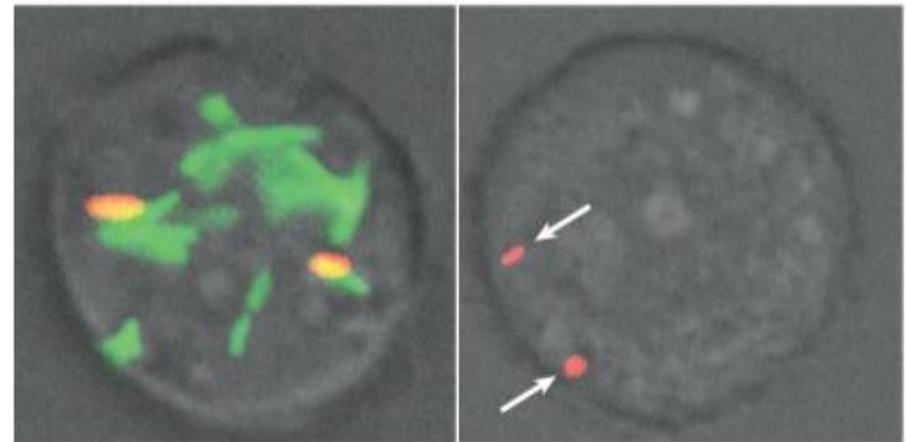
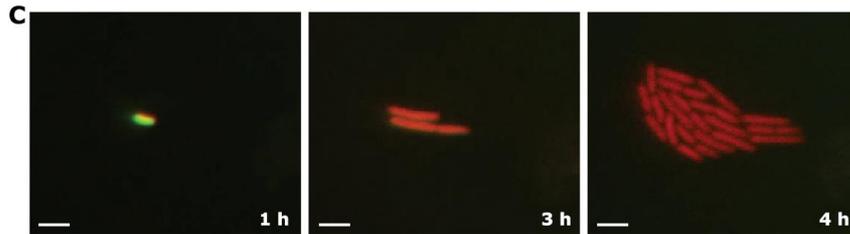
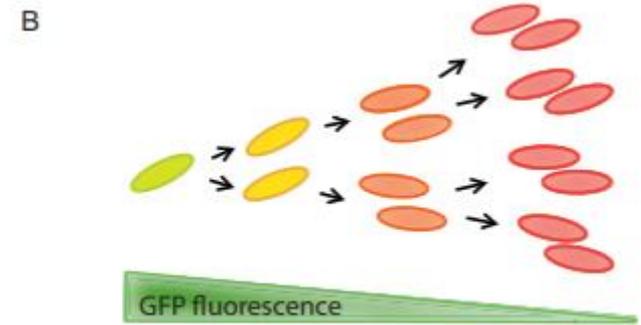
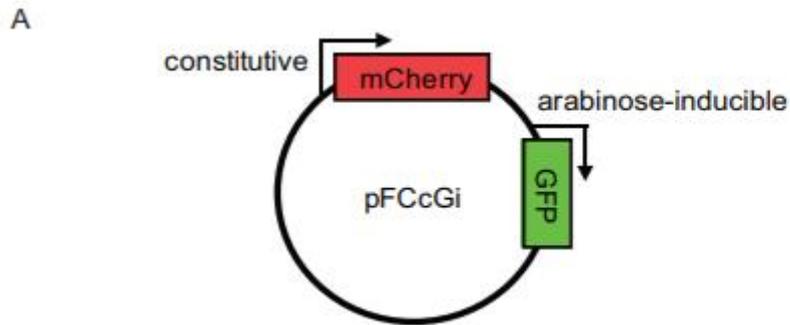
Les bactéries persistantes

Etude des persisters durant l'infection chez Salmonelle :

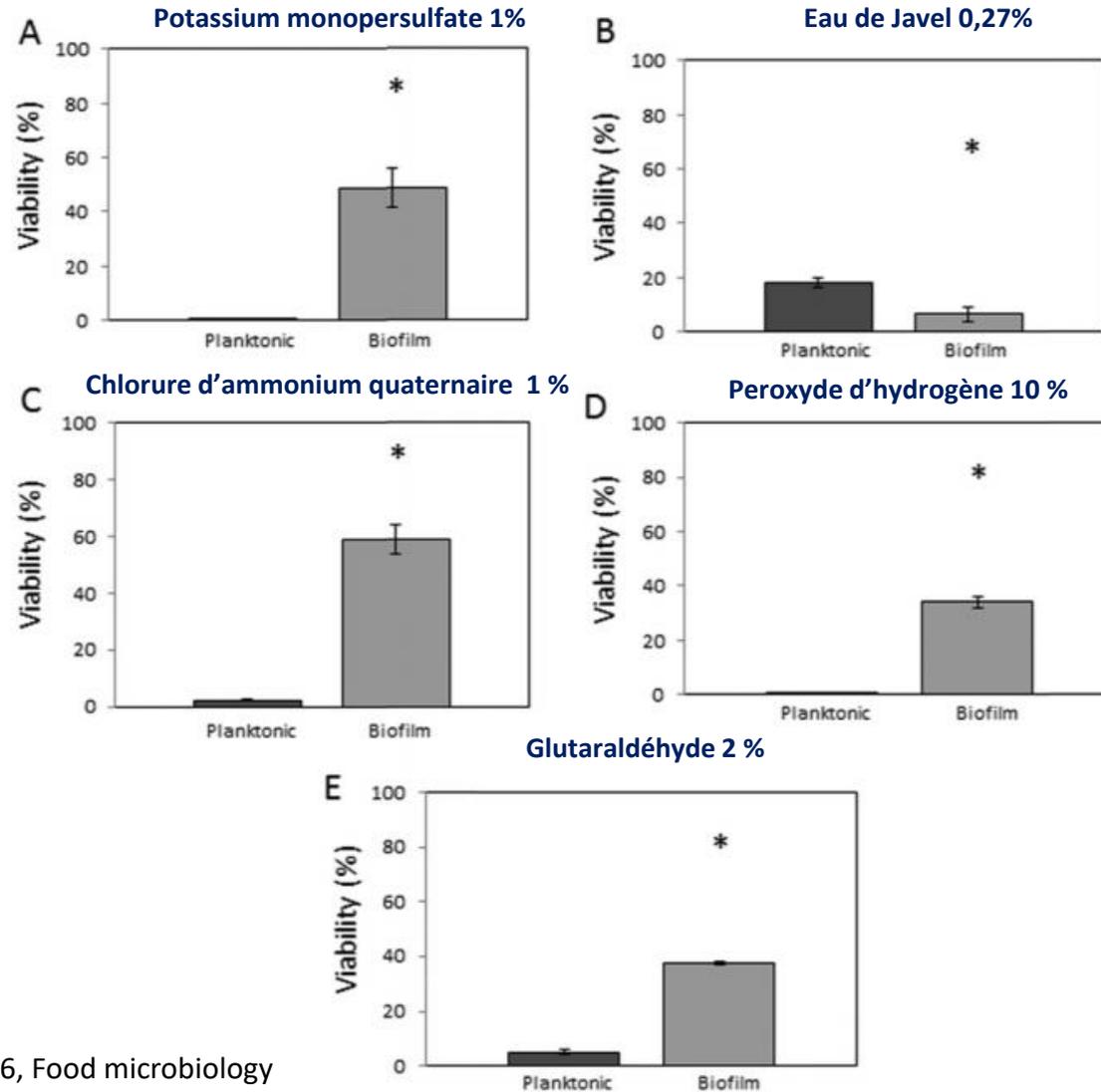


Les bactéries persistantes

Etude des persisters durant l'infection chez Salmonelle :



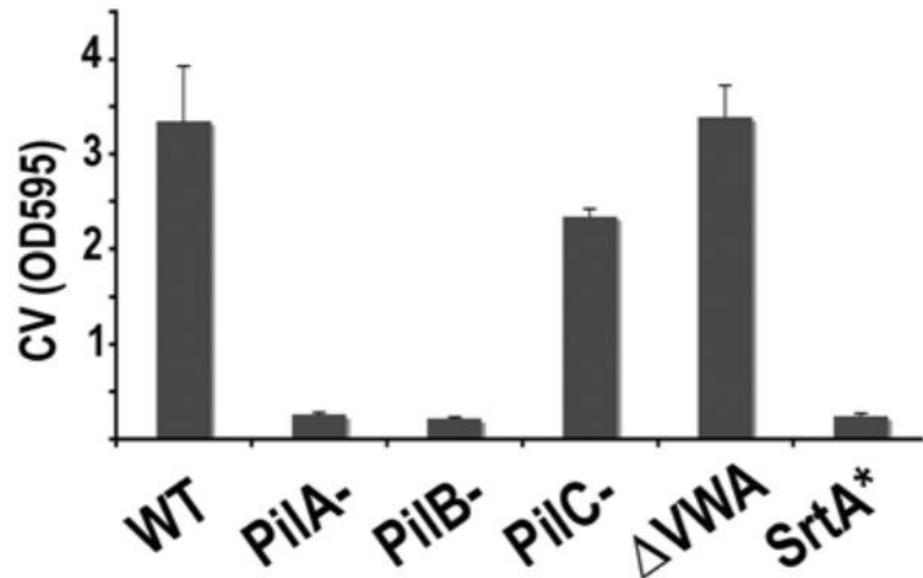
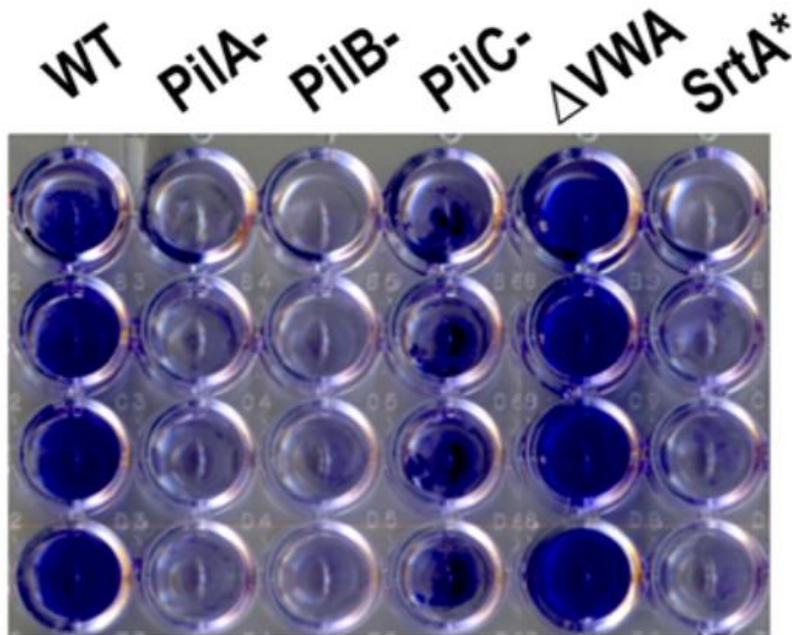
Tolérance des biofilms aux désinfectants / autres agents ?

Exposition de 10 min pour des cellules en suspension ou des biofilms de 6 jours de *Clostridium perfringens* :

Méthodes d'étude des biofilms *in vitro*

Etude en condition statique : modèles en plaque 96 puits

Culture en plaque → rinçage → coloration au cristal violet

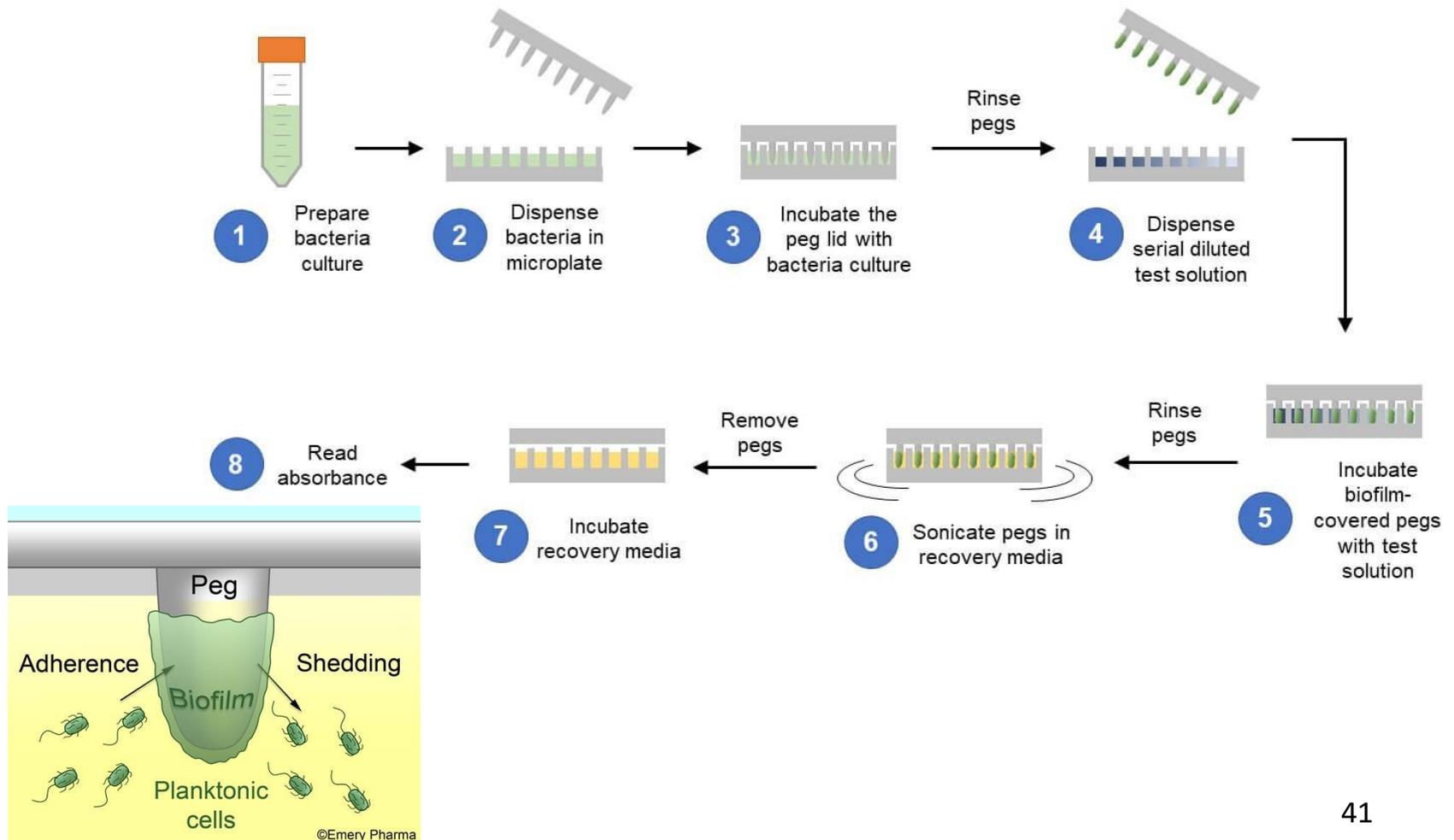
Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009, Plos pathogens

→ Le pilus de *Streptococcus agalactiae* (cause principale des septicémies et des méningites chez les nouveaux nés) est important pour la formation des biofilms

Méthodes d'étude des biofilms *in vitro*

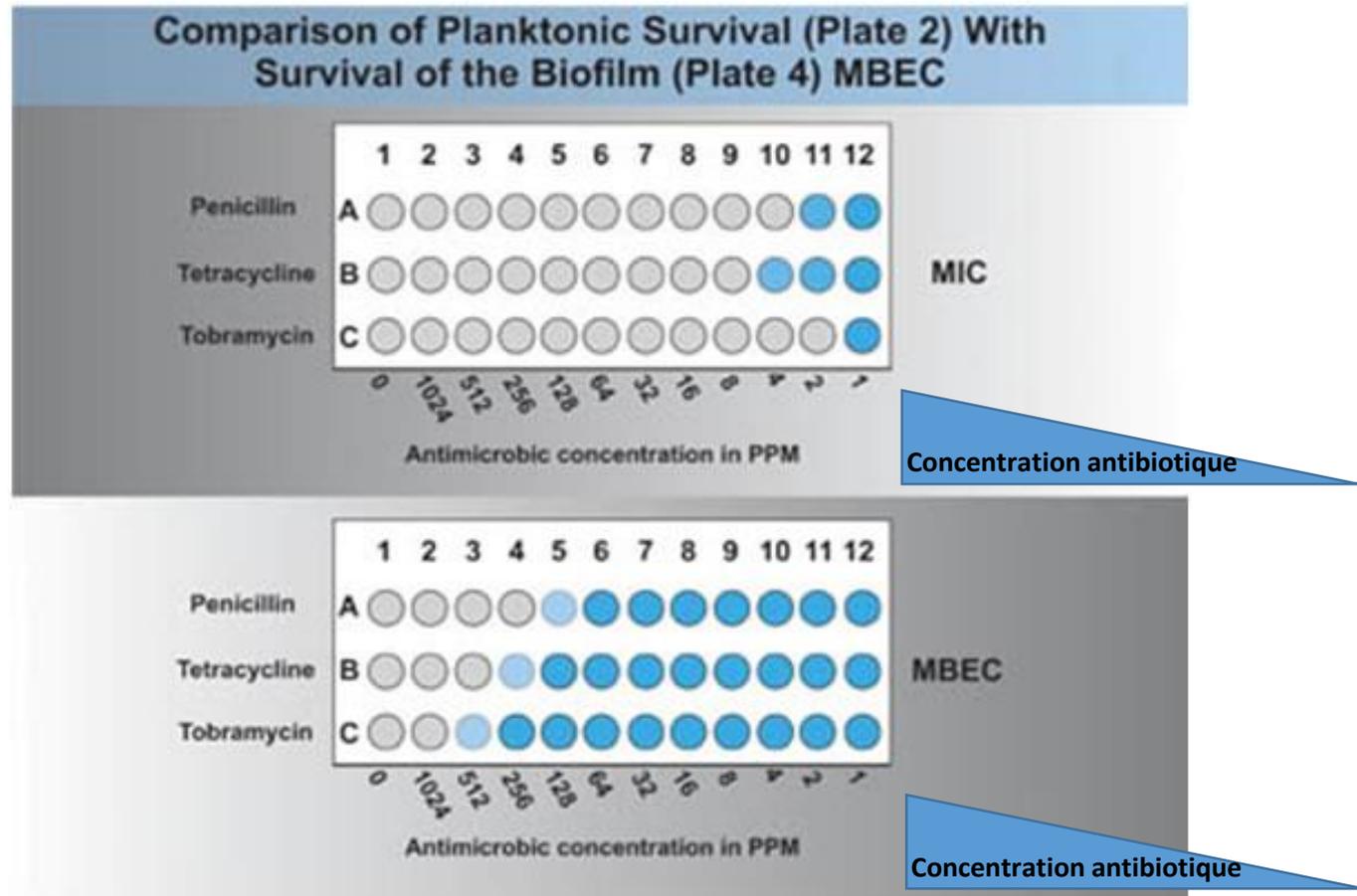
Le test MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration) peut être utilisé pour déterminer la concentration minimale d'un composé capable de pénétrer et éradiquer un biofilm.

MBEC assay



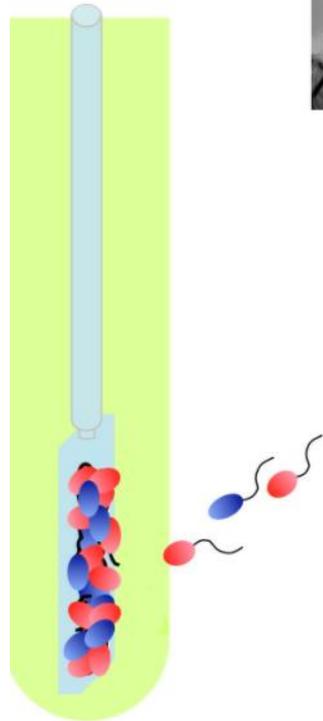
Méthodes d'étude des biofilms *in vitro*

Le test MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration) peut être utilisé pour déterminer la concentration minimale d'un composé capable de pénétrer et éradiquer un biofilm.

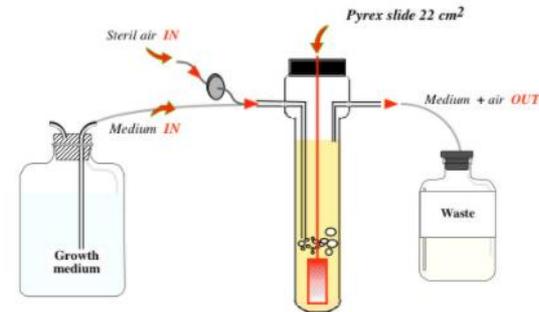


Méthodes d'étude des biofilms *in vitro*

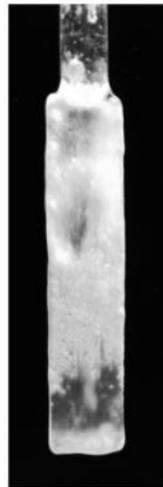
Etude en condition dynamique : modèle en micro-fermenteur



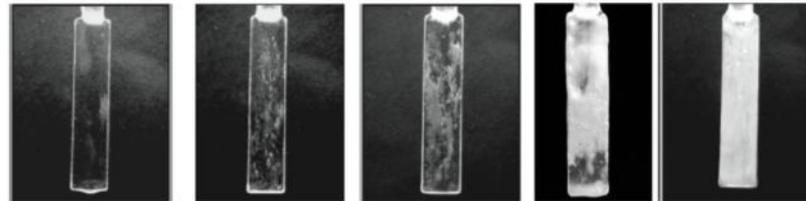
Microfermenteurs



Continuous-flow biofilm formation



Biofilm

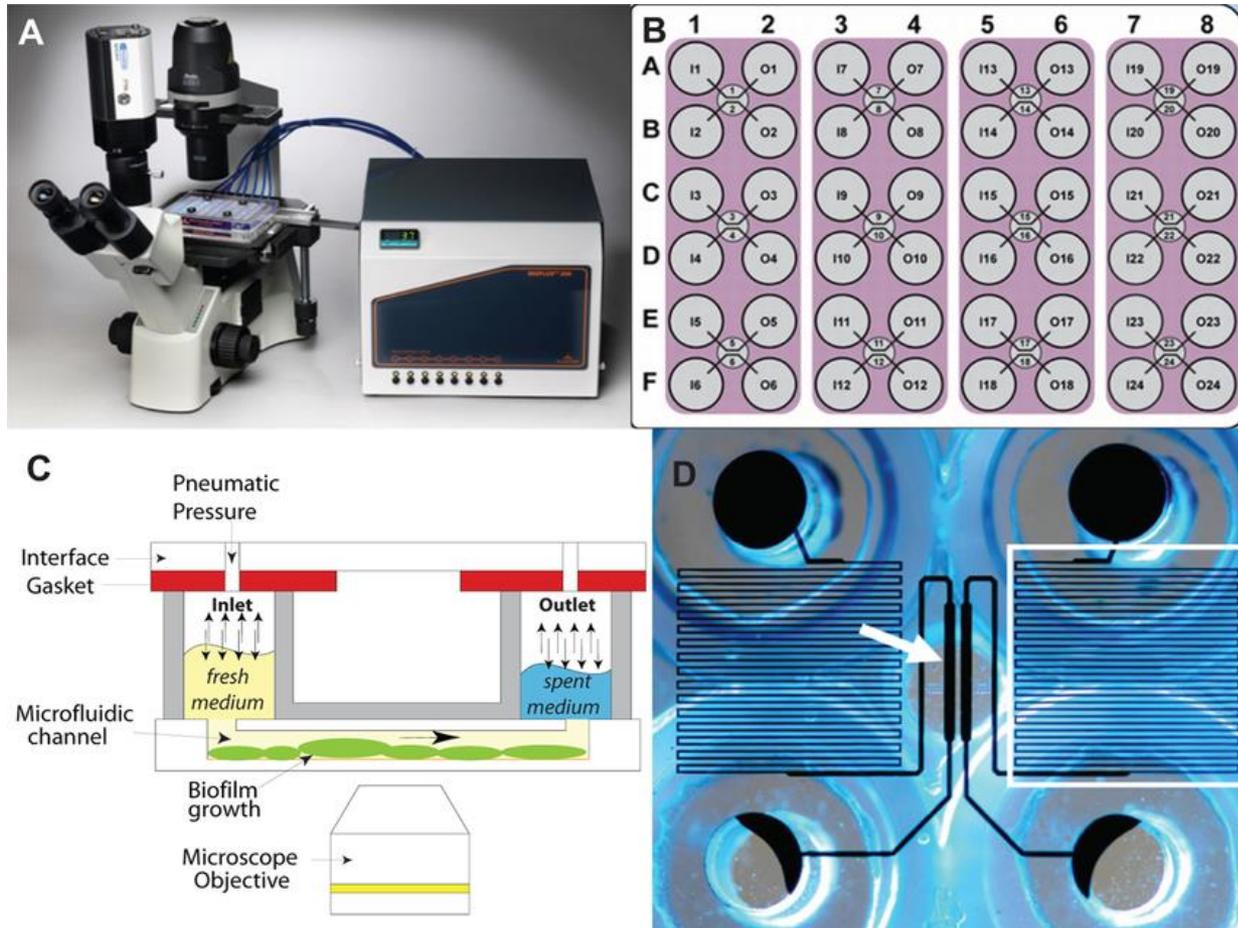


- Genetics
- Genomics
- Biochemistry
- Microscopy

- ● PRODUCTION OF MATURE BIOFILMS
- ● MIXED SPECIES BIOFILMS
- ● BIOFILM AND ADHESION ANALYSES
- ● MATERIAL TESTING
- ● TEST OF ANTI-BIOFILM APPROACHES

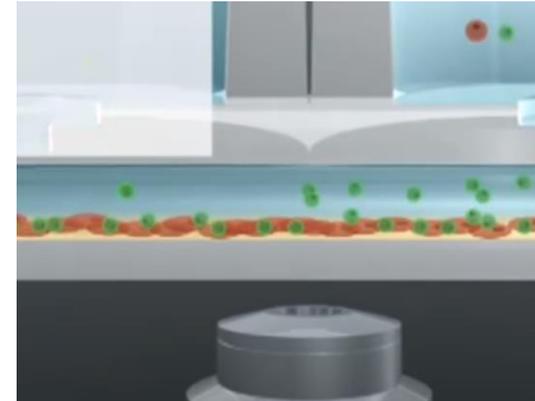
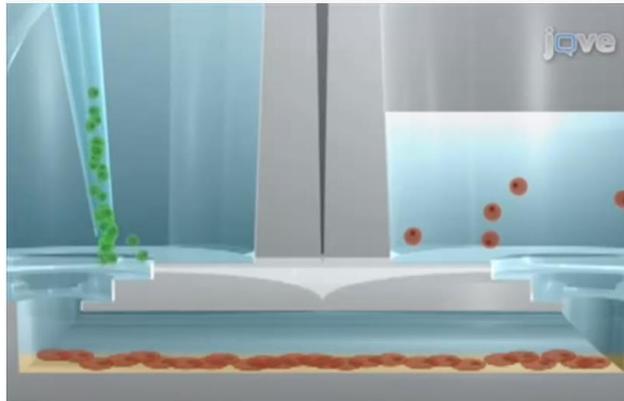
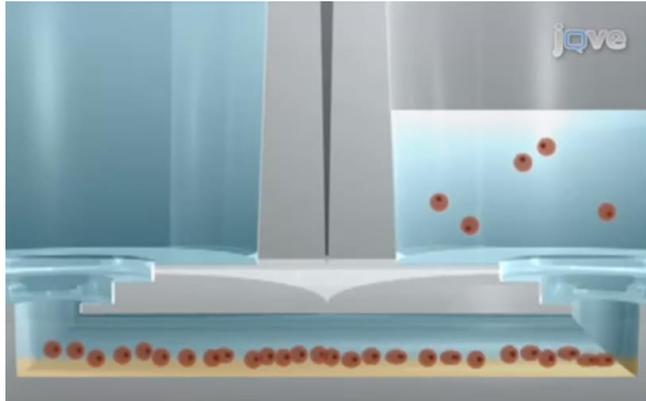
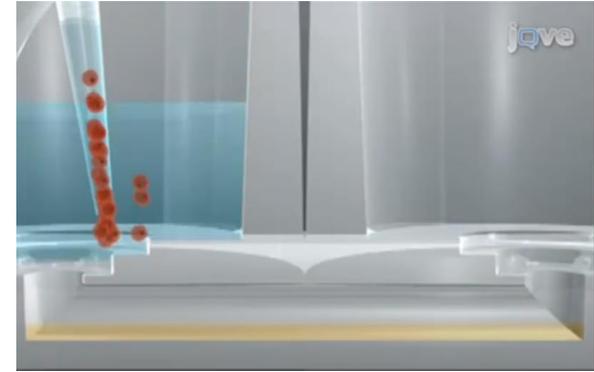
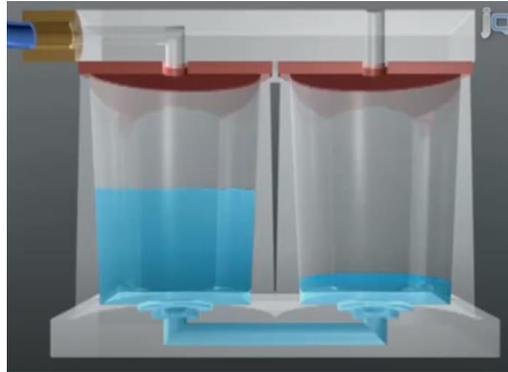
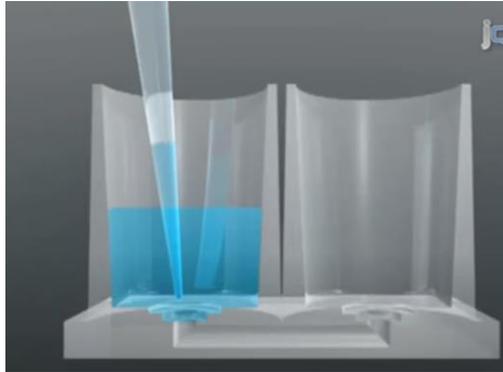
Méthodes d'étude des biofilms *in vitro*

Etude en condition dynamique : système BioFlux



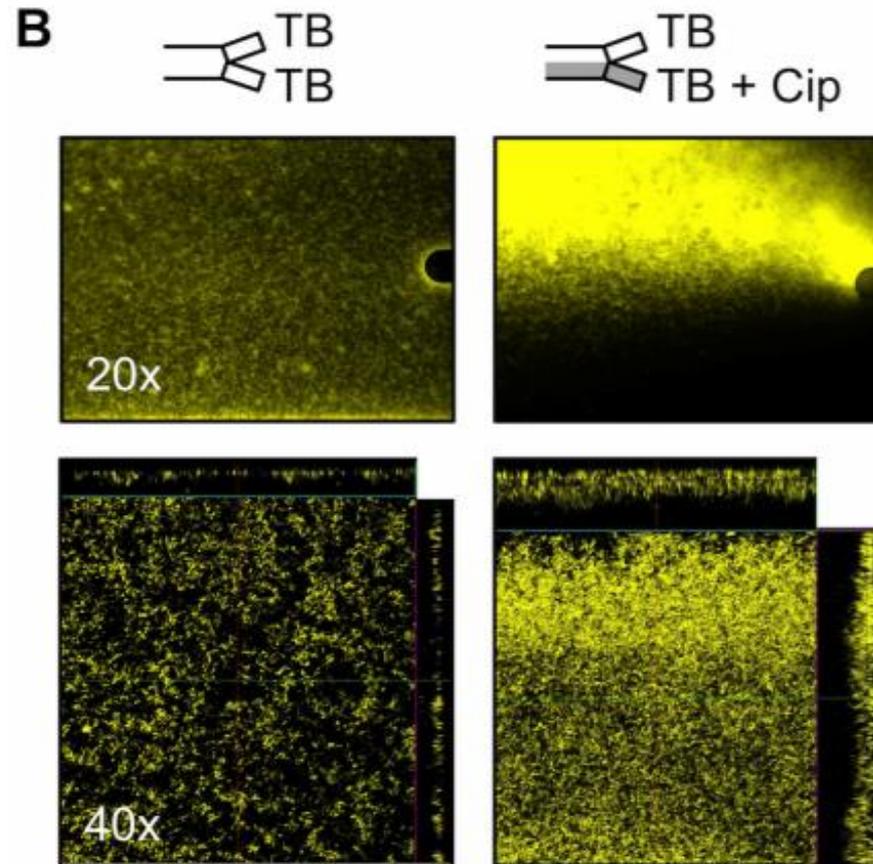
Méthodes d'étude des biofilms *in vitro*

Etude en condition dynamique : système BioFlux



Méthodes d'étude des biofilms *in vitro*

Etude en condition dynamique : système BioFlux

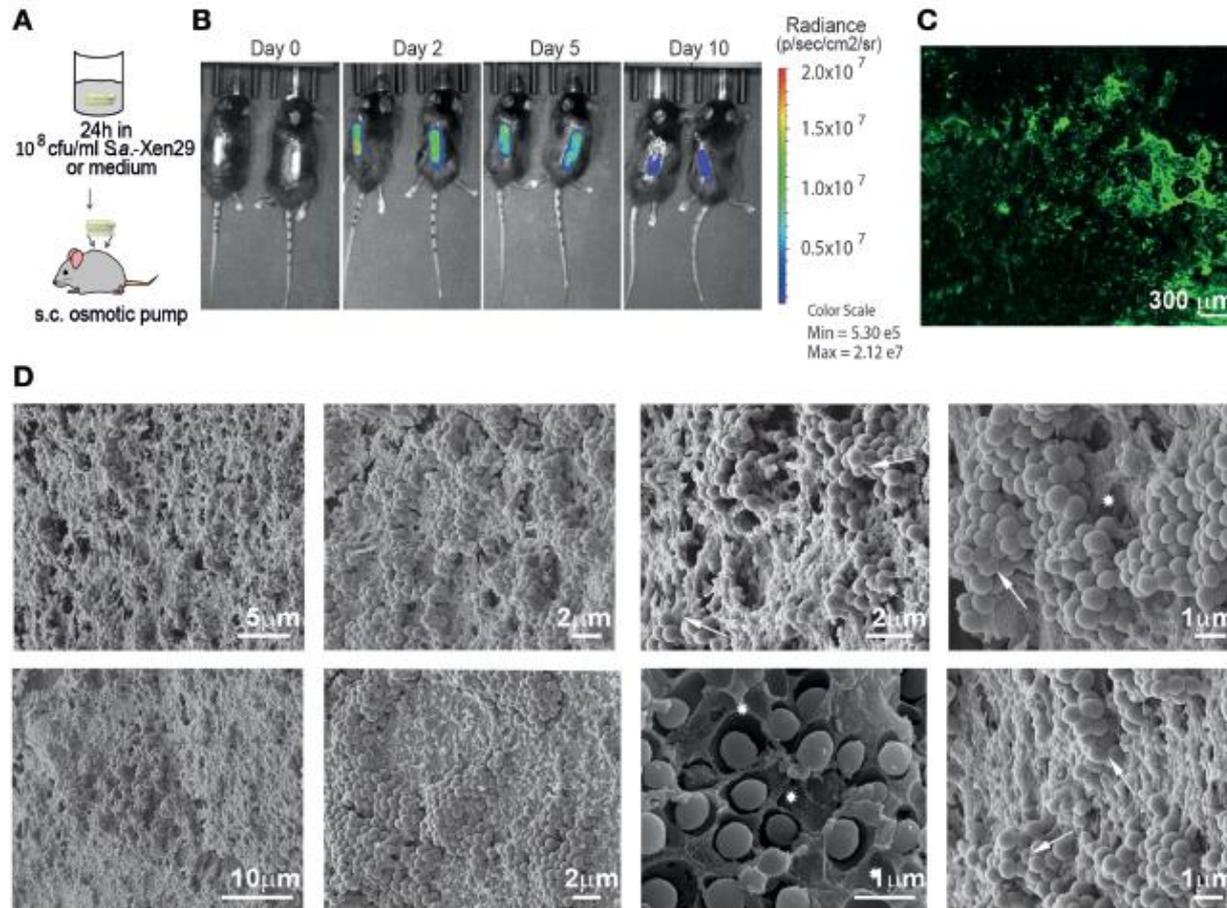


Oliveira *et al.*, 2015, Plos biology

→ Le gradient d'antibiotique (ici la ciprofloxacine) dans le milieu (TB = Tryptone broth) créé dans la chambre microfluidique induit un stress ayant pour conséquence la formation de biofilm chez la souche PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*

Méthodes d'étude des biofilms *in vivo*Implantation d'un dispositif et suivi de la formation du biofilm de *S. aureus* bioluminescent à sa surface

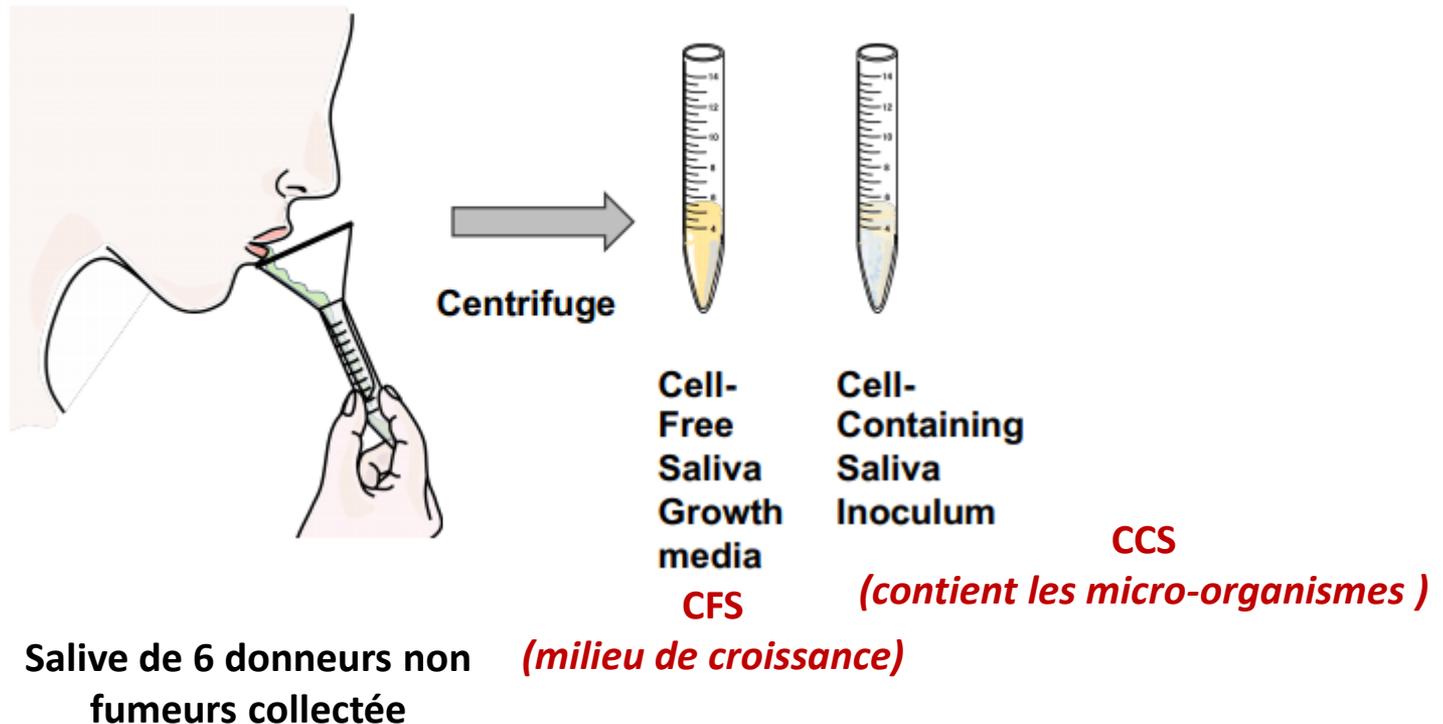
Souche de *S. aureus* - *Xen29* : contient une copie stable de l'opéron lux de *Photobacterium lumiscens*



Gut *et al.*, 2015, Plos biology

Méthodes de lutte contre les biofilms

Utilisation de la nisine de *Lactococcus lactis* comme agent anti-biofilm formé par la flore orale afin de lutter contre la plaque dentaire. La nisine entraîne la formation de pores conduisant à la lyse cellulaire.

1^{ère} étape : obtention du microbiote oral

Méthodes de lutte contre les biofilms

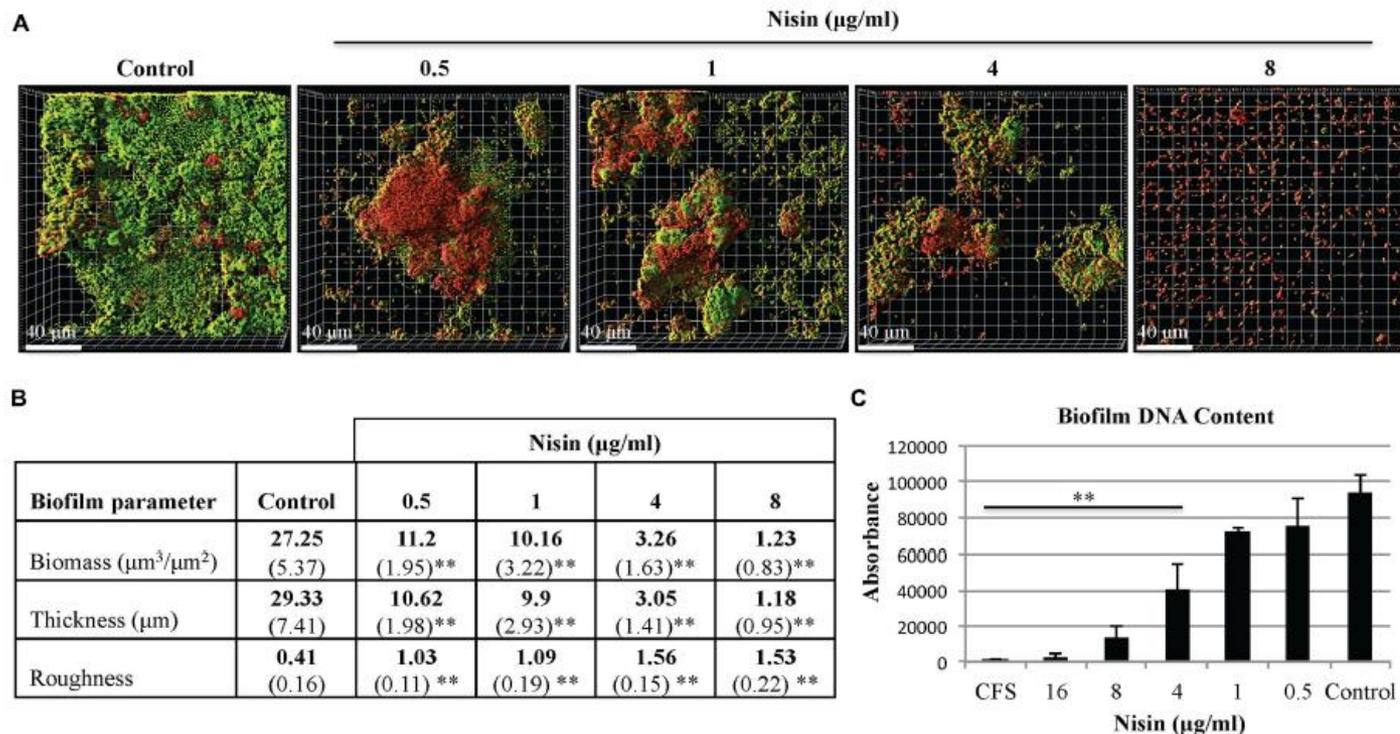
2^{ème} étape : test de la nisine sur le biofilm formé après incubation de CCS dans le système BioFlux

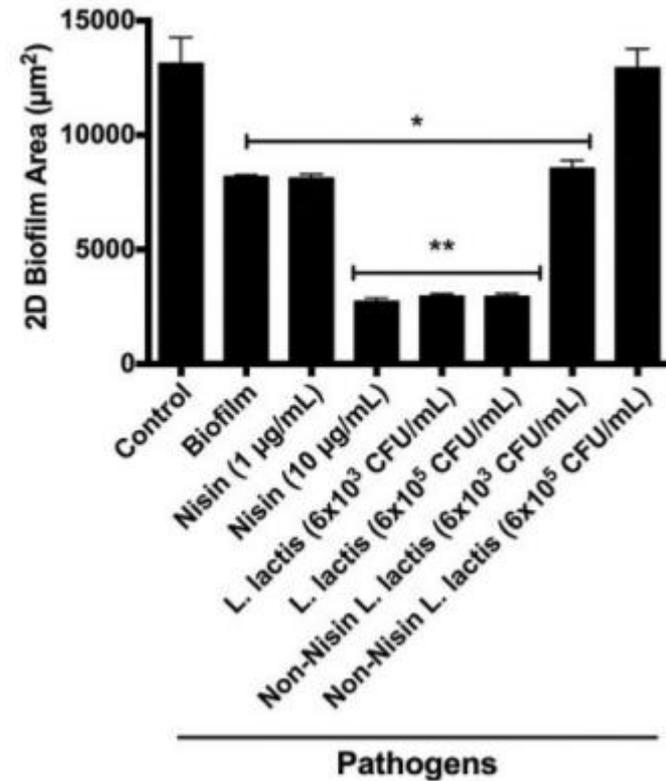
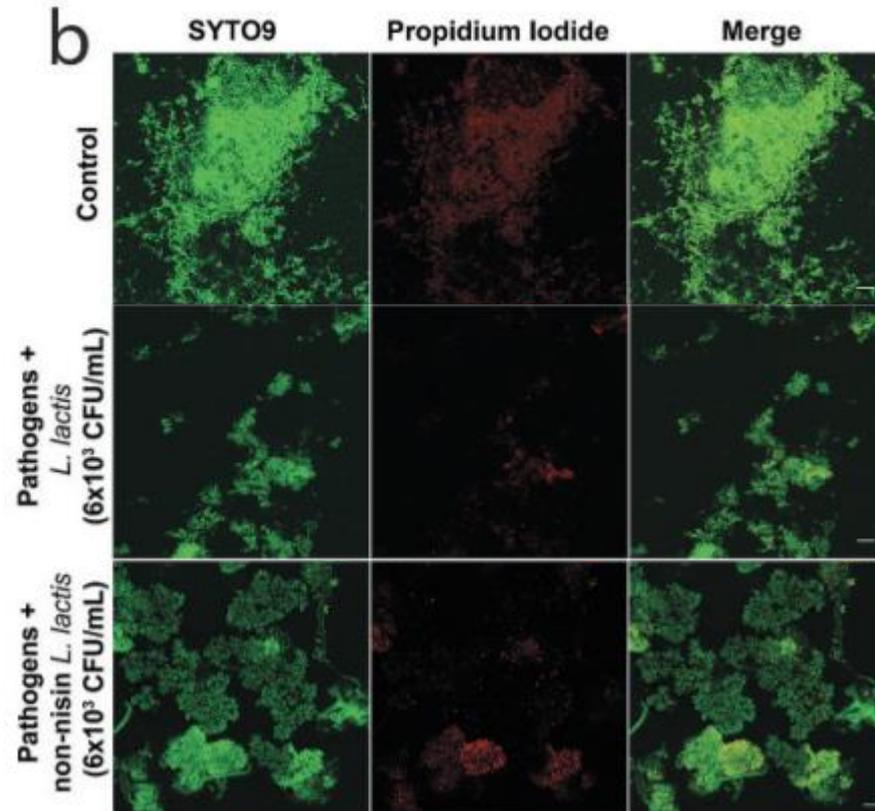
FIGURE 2 | Nisin inhibits the formation of multi-species biofilms in a static model system. Cell-containing saliva (CCS) was inoculated in filter sterilized cell-free saliva (CFS) for 20–22 h at 37°C with or without nisin. **(A)** Confocal microscopy images are represented in the x–y plane. A green signal indicates viable live cells (Syto 9), a red signal indicates damaged/dead

cells (propidium iodide), **(B)** Biofilm biomass, thickness, and roughness [mean (SD)] were derived from imaging of at least three separate wells (experiments), **(C)** DNA content of the biofilms was quantified by absorption spectroscopy at fluorescence intensity of 530 nm. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: significant differences from the control (nisin-free).

Postulat : Le producteur de nisine *Lactococcus lactis* pourrait être utilisé comme probiotique en vue de limiter la plaque dentaire.

Méthodes de lutte contre les biofilms

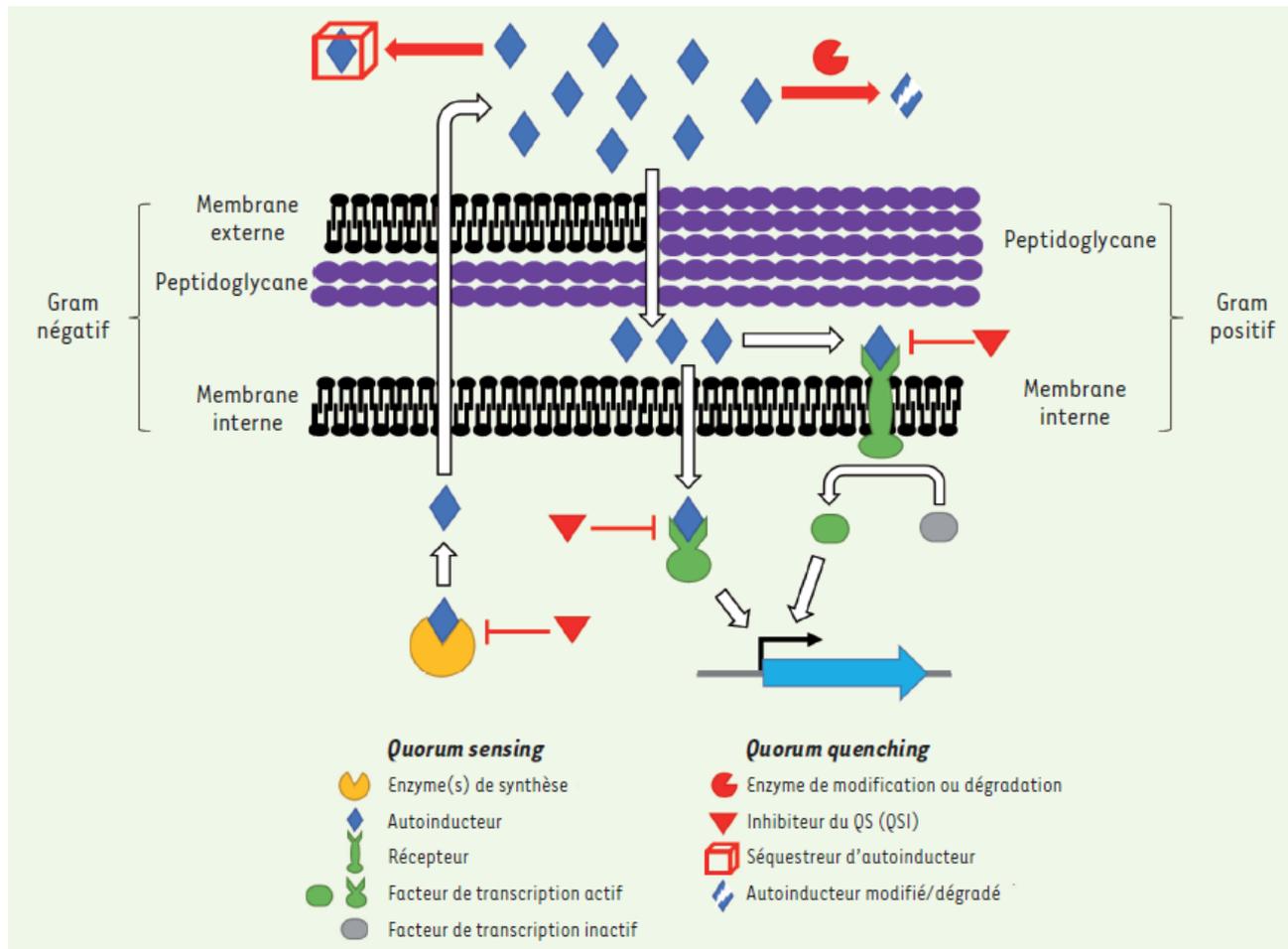
3^{ème} étape : impact de l'utilisation de *Lactococcus lactis* producteur de nisine sur le biofilm oral



Lactococcus lactis pourrait être utilisé comme probiotique car il limite la formation de biofilm.

Méthodes de lutte contre les biofilms

Le quorum quenching ou comment brouiller la communication entre bactéries



Bactéries incluses dans un biofilm	Bactéries en suspension
Cellules fixées à une surface inerte ou vivante	Cellules libres
Milieu pauvre	Milieu riche
Vie en communauté	Isolées ou en petits groupes
Inclus dans une matrice extracellulaire	Peu de contact entre celles sauf densité importante
En équilibre dynamique Métabolisme hétérogène	Cycle de multiplication classique avec différentes phases
Peu sensibles aux agents antimicrobiens	Sensibles aux agents antimicrobiens