



**HAL**  
open science

## Biofilms et pathogénie

M. Gohar

► **To cite this version:**

M. Gohar. Biofilms et pathogénie. Master. UE NSS Aliments Microbiens et Sécurité Sanitaire M1-Biologie Santé UPSaclay, UVSQ, France. 2023. hal-04329250

**HAL Id: hal-04329250**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04329250>**

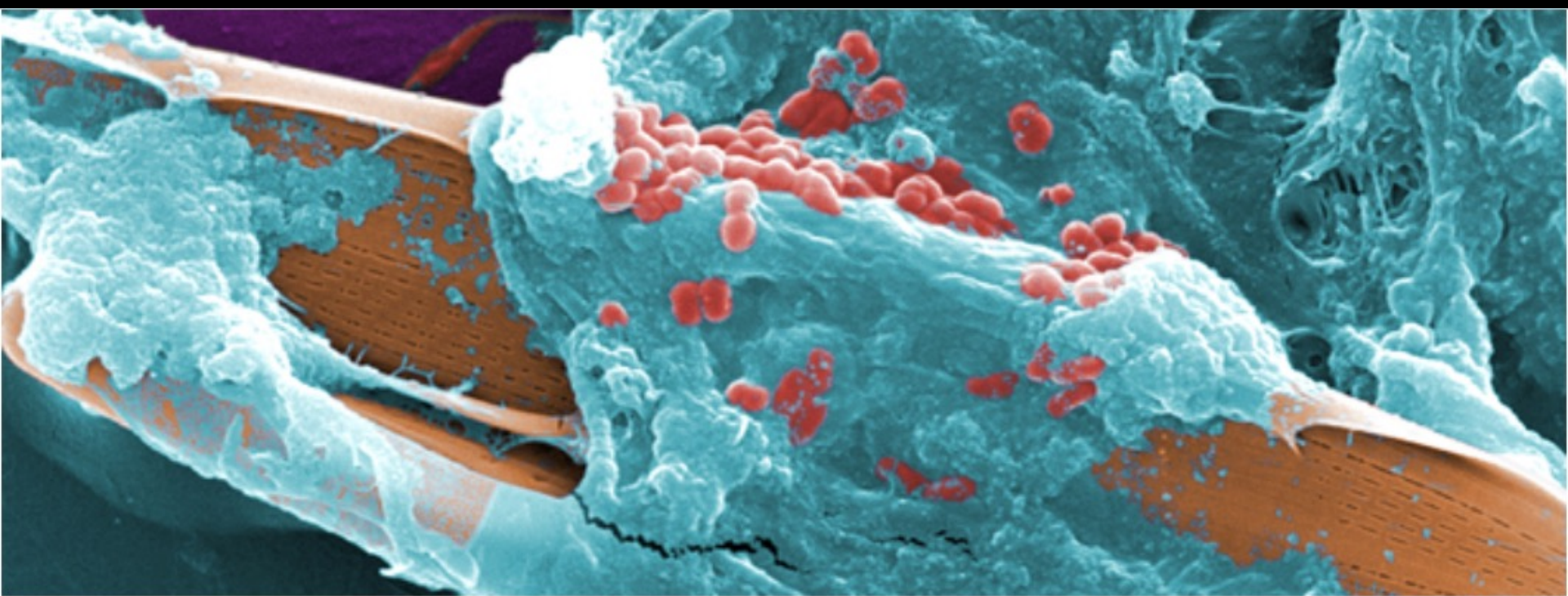
Submitted on 7 Dec 2023

**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.

# Biofilms et Pathogénie

# Biofilm : microorganismes sur des surfaces



crédit photo : Tufts University

# I – DEFINITIONS

# Un biofilm, qu'est ce que c'est ?

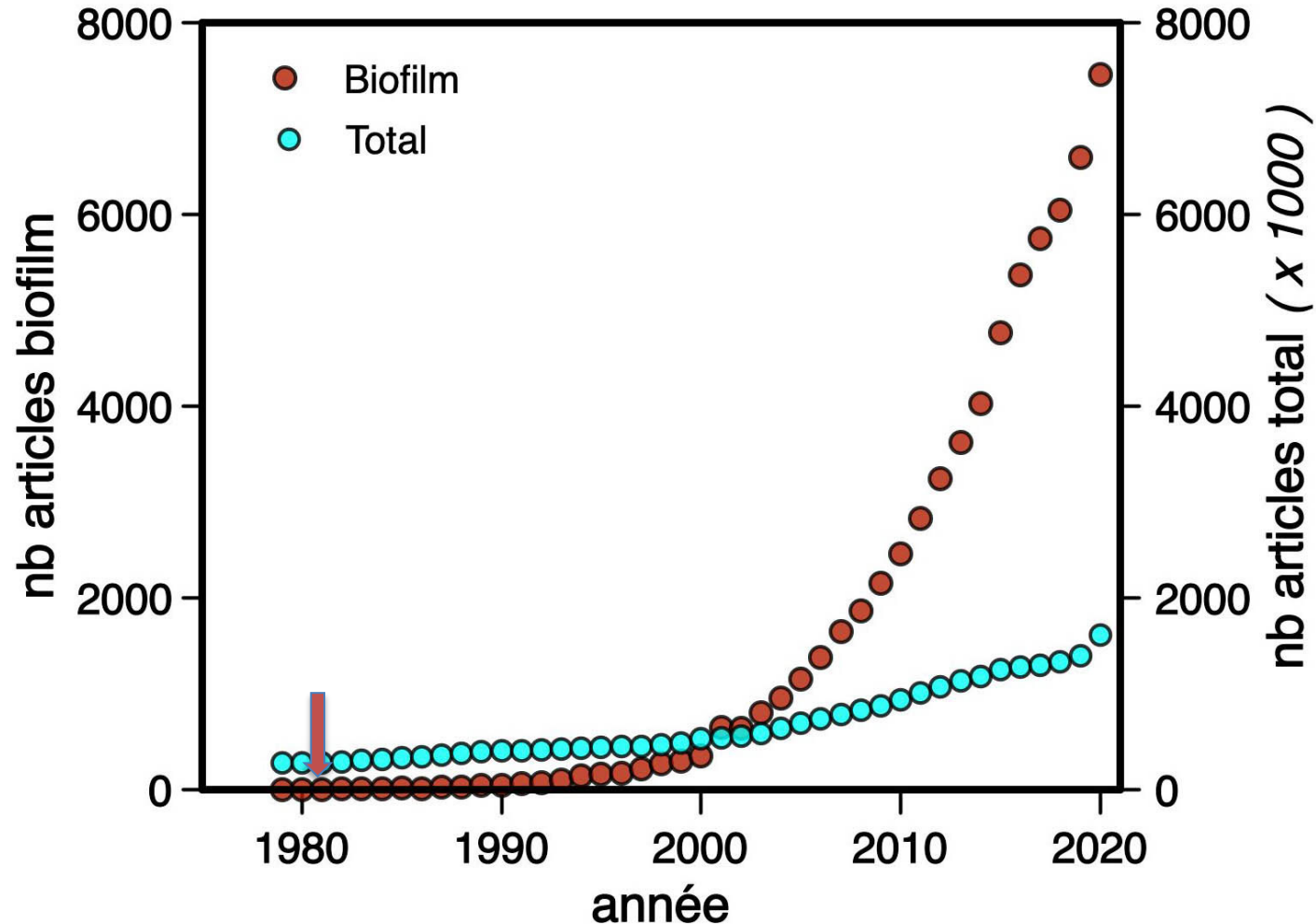
---

- ✿ Communauté de microorganismes **adhérente** à une surface.  
(O' Toole et al., Annu. Rev. Microbiol., 2000)

- ✿ Communauté sessile d'origine microbienne **adhérente** à un substrat ou à une interface et enrobée dans une **matrice de polymères extracellulaires** qu'elle produit.  
(Donlan & Costerton, Clin. Microbiol. Rev., 2002)

# Evolution du nombre de publications sur les biofilms

Le terme 'biofilm' est introduit dans son sens moderne en 1981



# Forme préférentielle de développement dans la nature

*Annu. Rev. Microbiol. 1995. 49:711-45*  
*Copyright © 1995 by Annual Reviews Inc. All rights reserved*

## MICROBIAL BIOFILMS

*J. William Costerton and Zbigniew Lewandowski*  
Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Montana  
59717

*Douglas E. Caldwell and Darren R. Korber*  
Applied Microbiology and Food Science, University of Saskatchewan, Saskatoon,  
Saskatchewan S7N 5A8, Canada

*Hilary M. Lappin-Scott*  
Biological Sciences, University of Exeter, Hatherley Laboratories, Prince of Wales  
Road, Exeter, Devon, EX4 4PS, England

We can now make the  
general statement, based upon detailed analysis of hundreds of aquatic systems,  
that biofilm populations predominate in virtually all nutrient-sufficient aquatic  
systems independent of system geometry and of the type of ecosystem involved

# Une contradiction... ?

---

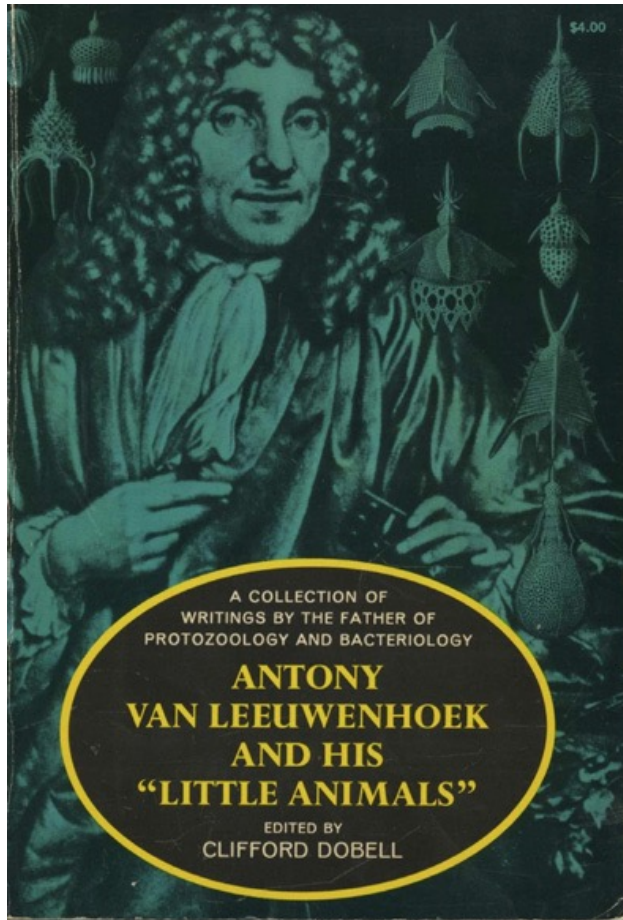
Le biofilm est la forme préférentielle de développement des microorganismes

Pas d'études sur les biofilms avant 1981

?



# Premières observations



Antony van Leeuwenhoek, 1632-1723 : observation de la plaque dentaire

# Premières observations

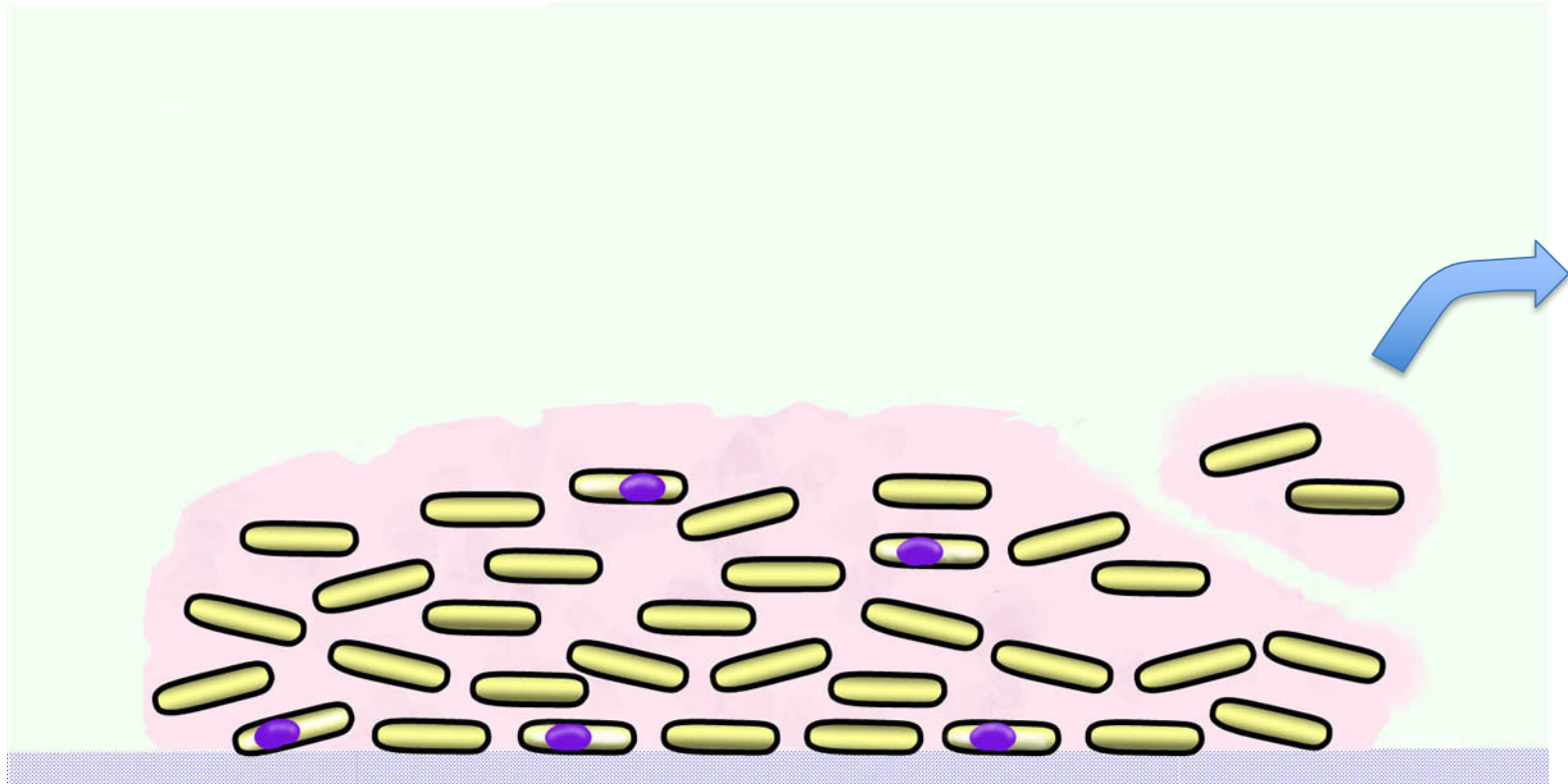
Louis Pasteur, 1864  
Mère de vinaigre  
*Mycoderma aceti*



Briandet et al., 2012, *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, Quae éditions.

# Etapes de la formation d'un biofilm

essaimage



## II – Méthodes d'étude des biofilms

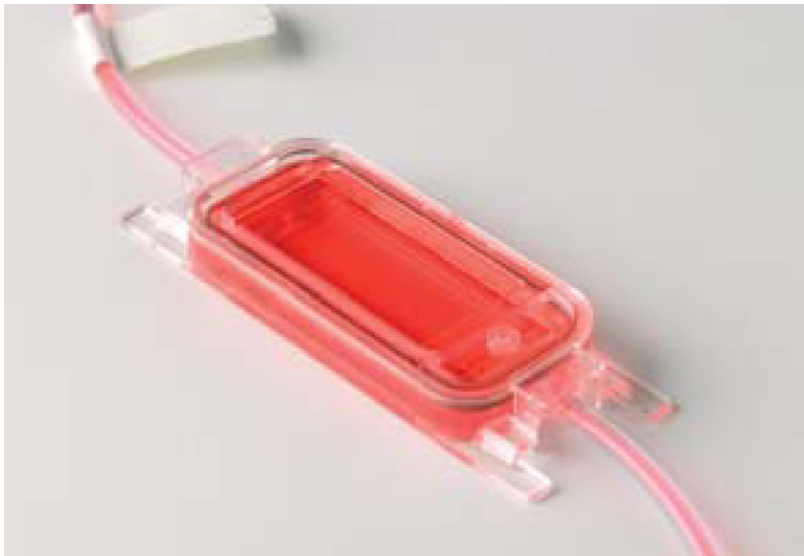
# Méthodes d'étude des biofilms en laboratoire

---

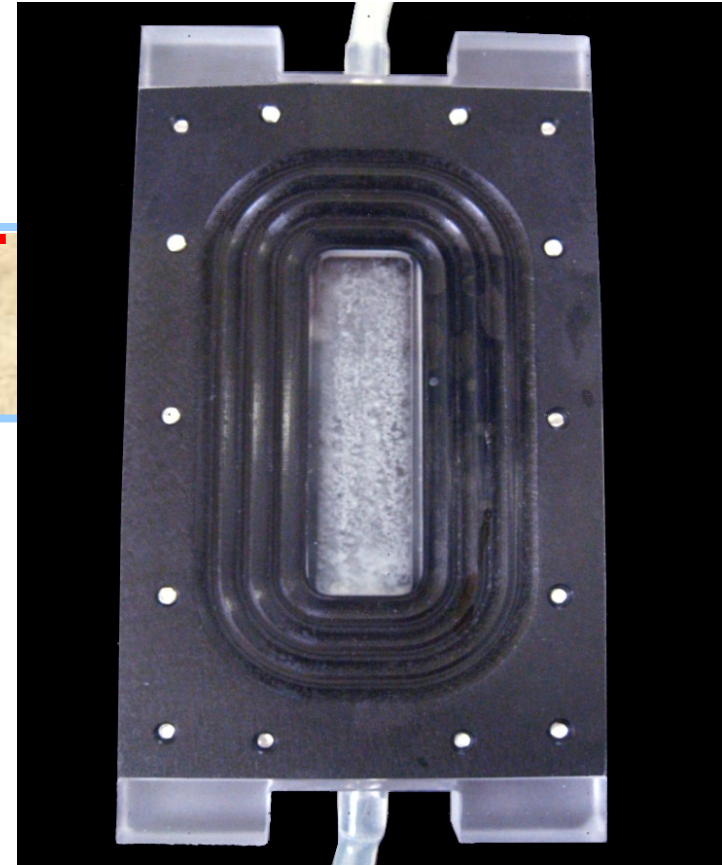
- ✿ flow-cell
- ✿ fermenteurs
- ✿ tubes de verre
- ✿ plaques de microtitration
- ✿ colonies sur boîte
- ✿ microfluidique

# Flow-cells

## Biofilm en immersion



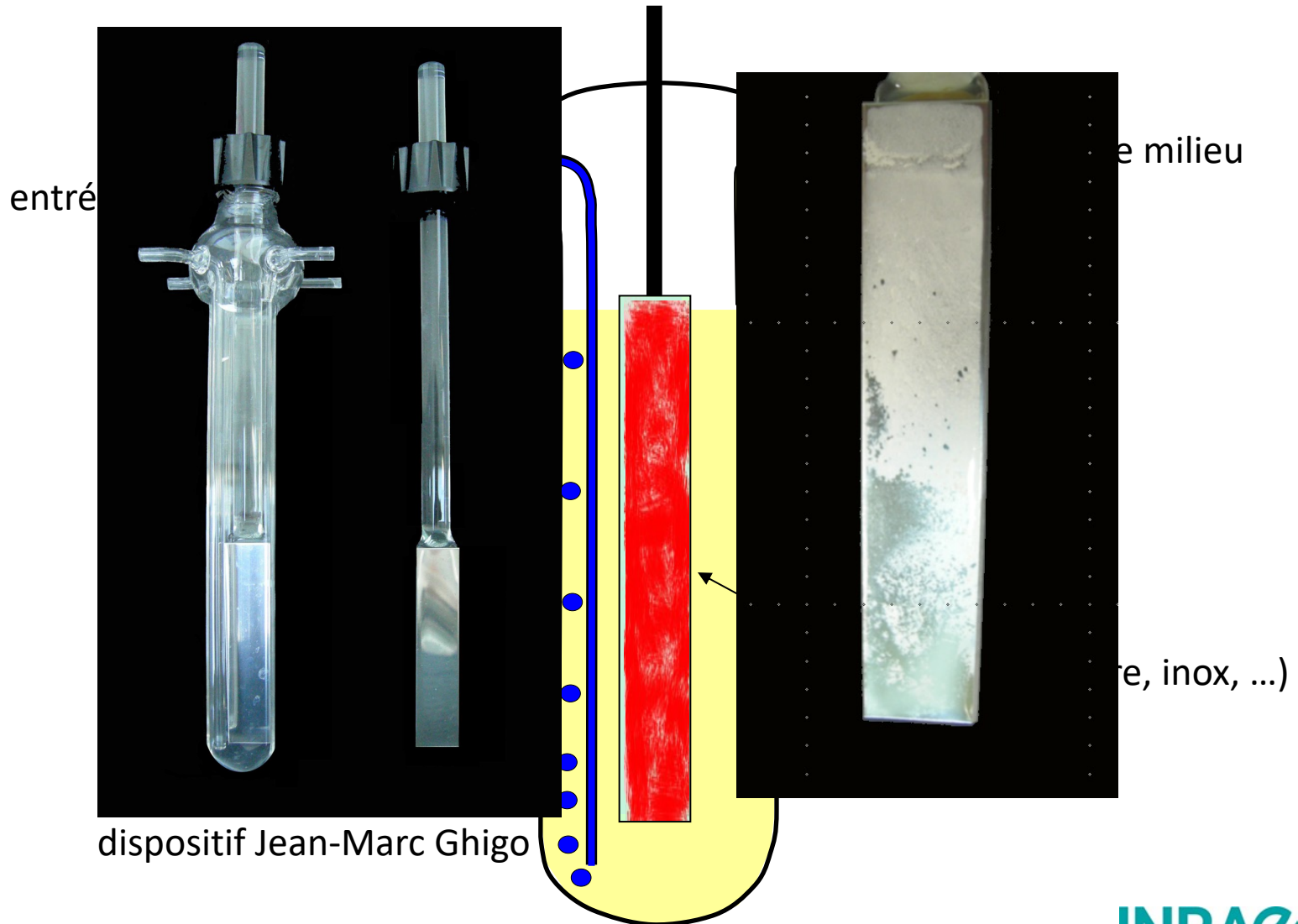
dispositif jetable stovall



dispositif Romain Briandet

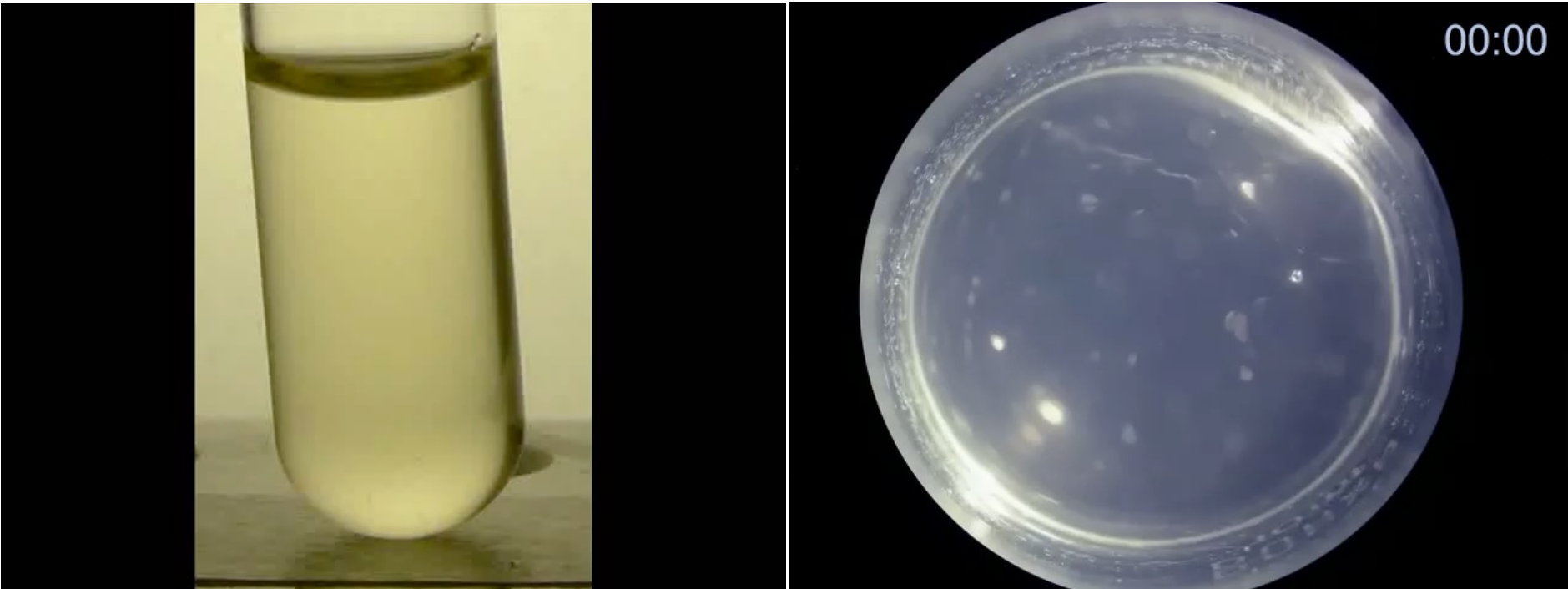
# Microfermenteurs

## Biofilm en immersion



# Tubes de verre

Biofilm à l'interface air-liquide

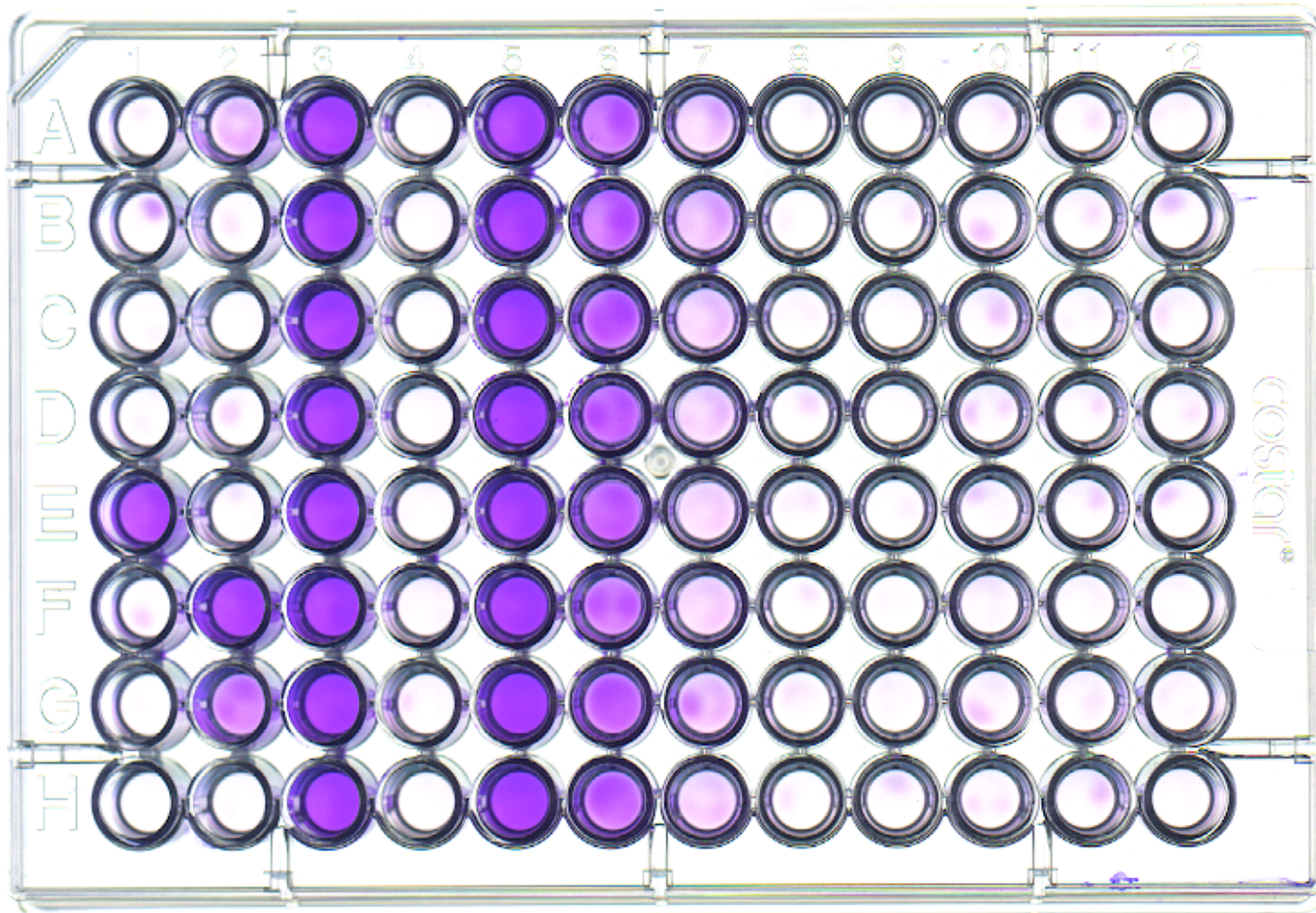




# Plaques de microtitration

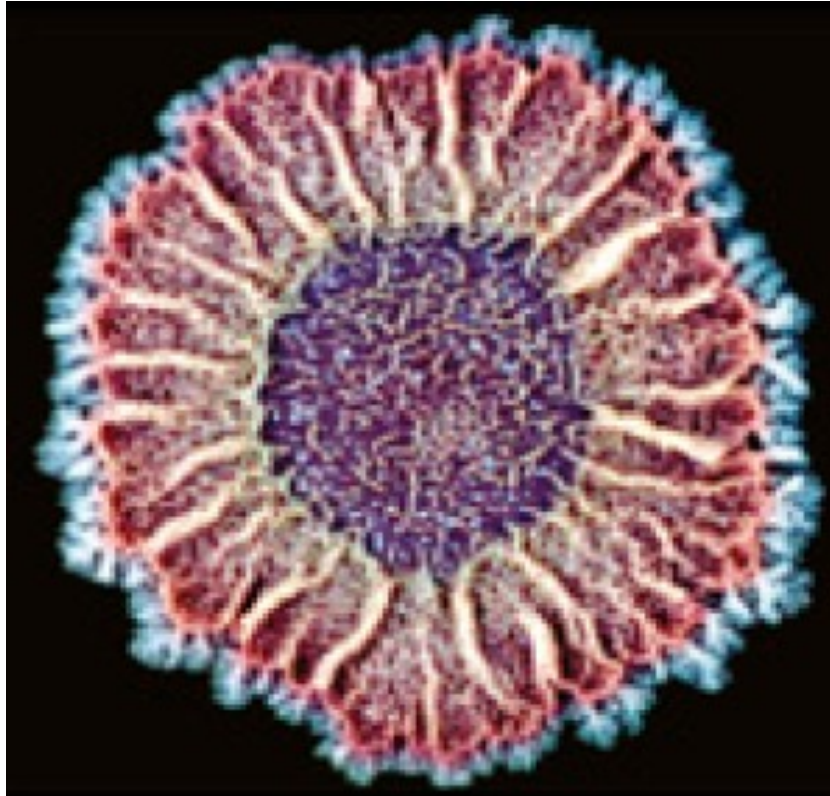
## Biofilm à l'interface air-liquide

Solubilisation



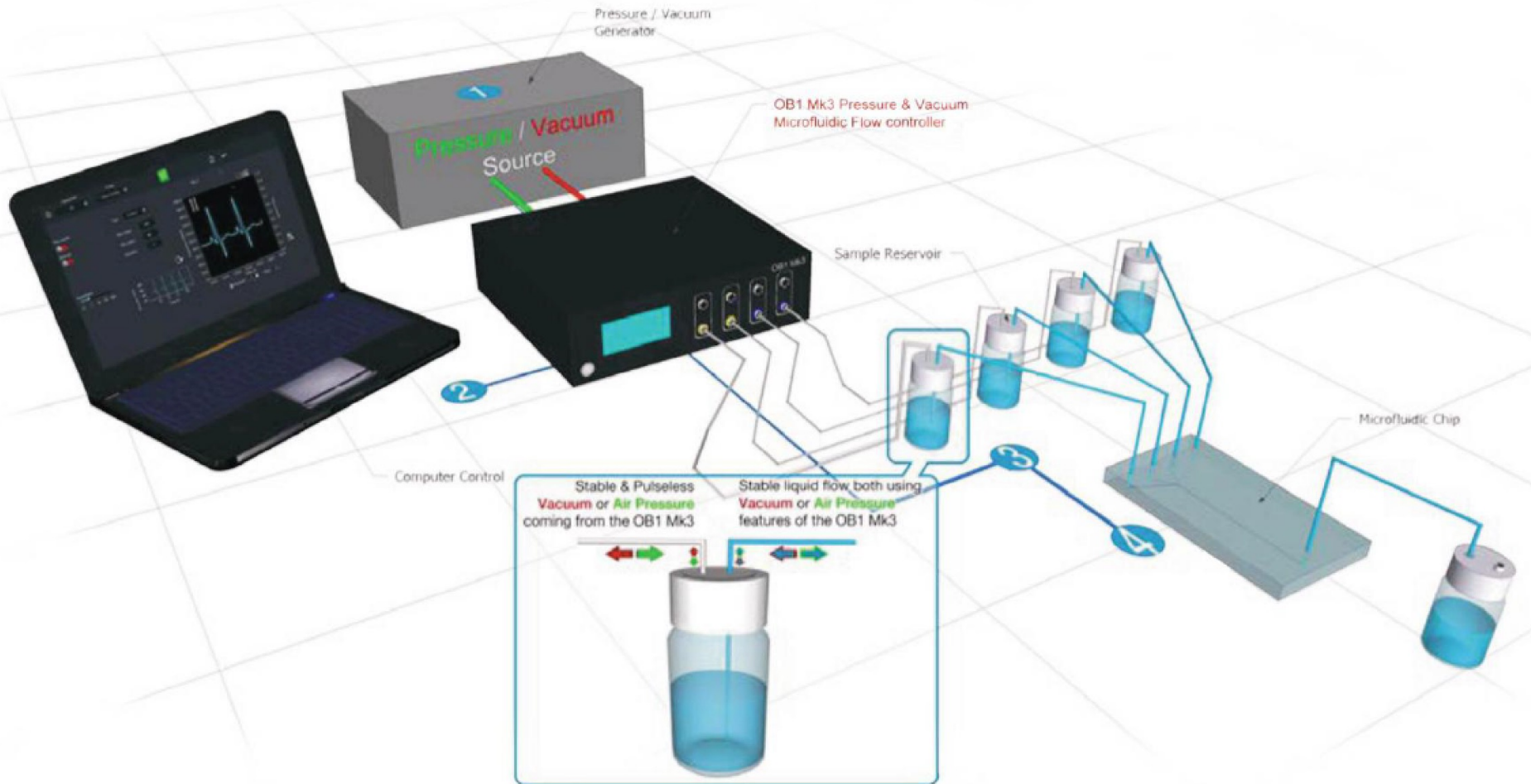
# Colonies sur boites

*Bacillus subtilis* 3610, sur rouge Congo

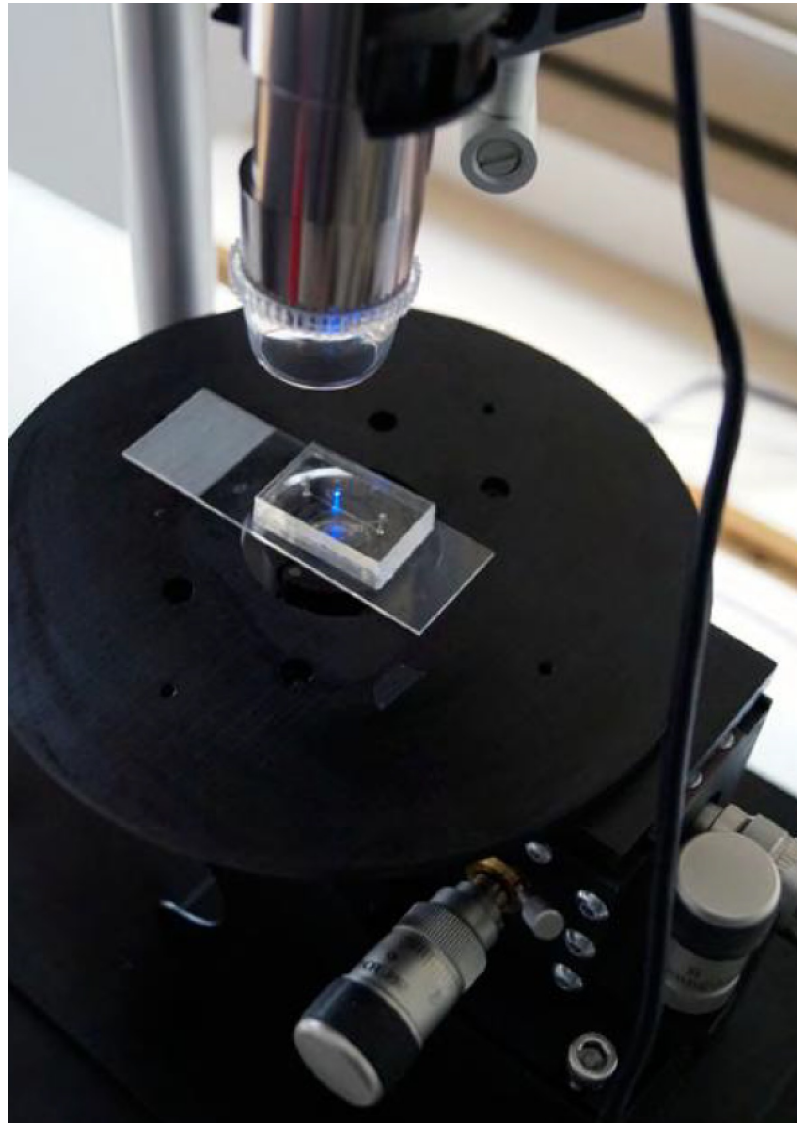


Romero *et al.*, 2010, *PNAS* 107:2230-2234

# Microfluidique - dispositif



# Microfluidique - Chip

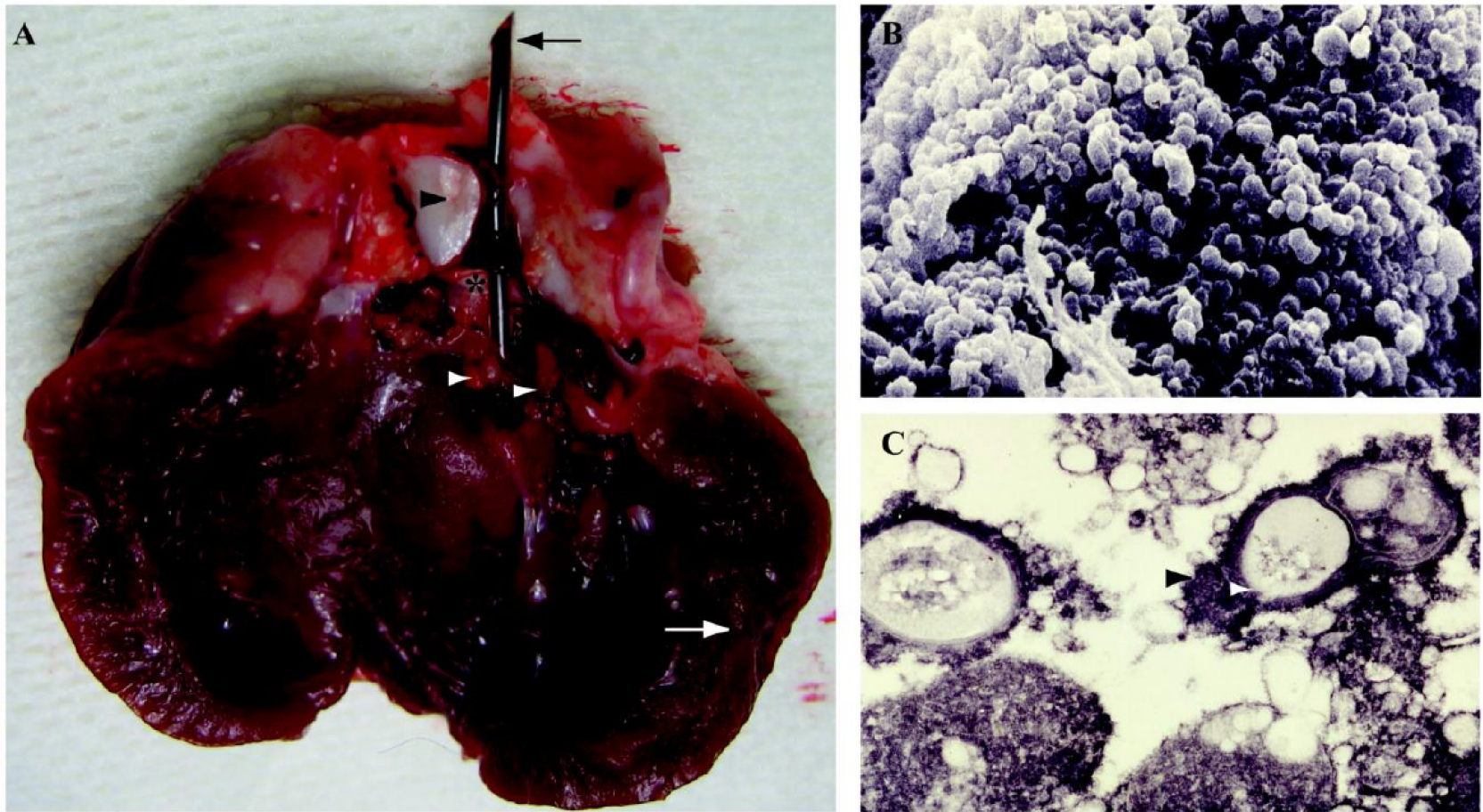


# Méthodes d'étude des biofilms *in vivo*

---

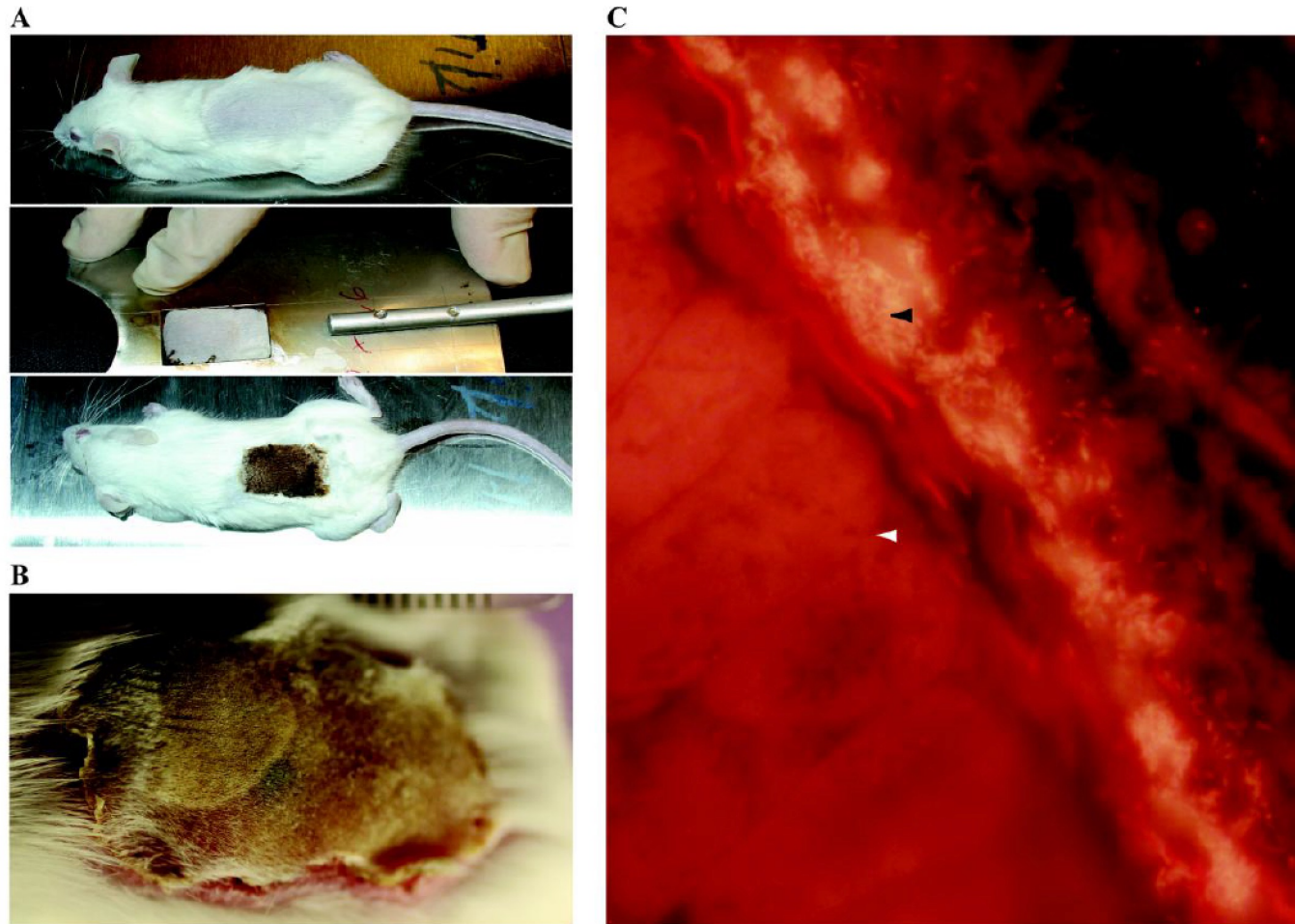
- ✿ biopsies
- ✿ Post-mortem
- ✿ Modèles d'infection

# Méthodes d'étude des biofilms *in vivo* : endocardites



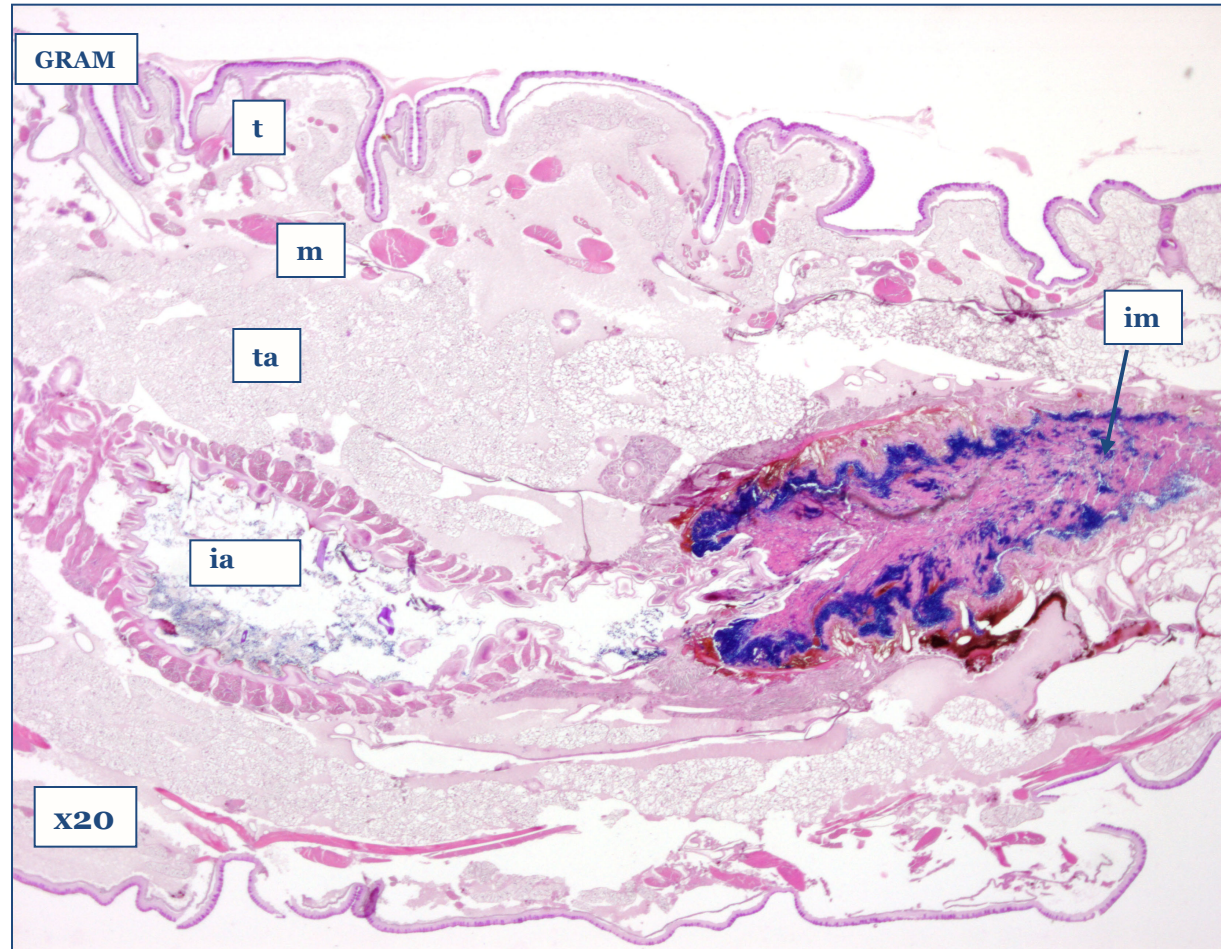
Native valve endocarditis in rabbit model. **A.** Post-mortem examination of a rabbit heart. Aortic endocarditis is induced in female New Zealand White rabbits by insertion of a polyethylene catheter (black arrow) through the right carotid artery into the left ventricle. Twenty-four hours after catheter insertion, pathogenic bacteria were inoculated through ear vein in each rabbit. The catheter is left in place throughout the experiment. Animals are killed 8 h after the last antibiotic injection and the vegetations (white arrowheads) from each rabbit are excised, rinsed in saline, pooled, and weighed. White arrow: left ventricle wall; black arrowhead: aorta; black star: aortic valve. **B.** Scanning electron microscopy of vegetation after 11 days of infection. Biofilm formed by *Streptococcus* spp. at the surface of native aortic valve. **C.** Transmission electron microscopy of bacteria from vegetation after 11 days of infection. Ruthenium red staining reveals the presence of an extracellular matrix (black arrowhead) surrounding *Streptococcus* spp. (white arrowhead) causing native aortic endocarditis.

# Méthodes d'étude des biofilms *in vivo* : brûlures



Burn wound infection biofilm in mice model. **A.** Experimental Settings. Mice are subcutaneously anaesthetized, shaved and then covered with a fire blanket and a metal plate with a window corresponding to approximately 6% of total body surface. A third-degree burn is then induced using a hot-air blower for 7 s at 330 °C. Afterwards, mice receive fluid replacement and pain therapy during the whole experiment. Lastly, mice are infected by alginate embedded *Pseudomonas aeruginosa* beneath the burn wound 2–4 days after burn wound infliction. **B.** Clinical result 4 days after the procedure. Thermal third degree lesion associated with a wound infection. **C.** Confocal laser scanning microscopy of burn wound. A slide of the wound removed *in toto* is stained with *P. aeruginosa* specific peptide nucleic acid (PNA) fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probe (magnification . 400). *P. aeruginosa* forms dense bacterial clusters (black arrowhead) on the surface of the burn wound. White arrowhead indicates subcutaneous area

# Méthodes d'étude des biofilms *in vivo* : coupes histologiques



Nielsen-Leroux., résultats non publiés



# III – La matrice du biofilm

# Propriétés de la matrice du biofilm

- ✿ La matrice du biofilm représente en moyenne plus de 90% du poids sec de celui-ci
- ✿ Elle lui donne de la cohésion et lui confère ses propriétés adhésives
- ✿ Elle limite la diffusion des substances solubles
- ✿ Elle forme un écran protecteur pour la communauté microbienne
- ✿ Elle composée essentiellement de **polysaccharides**, de **protéines** et d'ADN

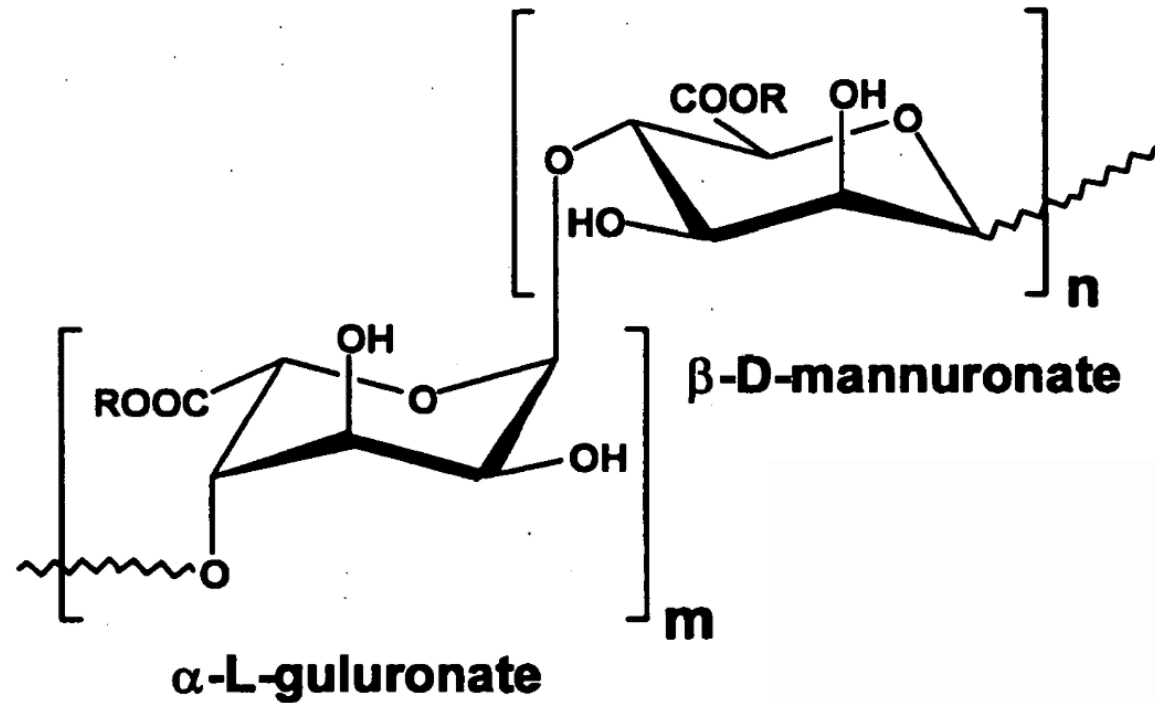
# Exopolysaccharides

# Exopolysaccharides chez *P. aeruginosa*

- ✿ *P. aeruginosa* produit trois exopolysaccharides: Pel, Psl et les alginates
- ✿ Pel est riche en glucose; il est impliqué dans la formation des biofilms aux interfaces air-liquide
- ✿ Psl est constitué d'un pentasaccharide répété contenant du D-glucose, du D-mannose et du L-rhamnose; il joue un rôle dans l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques et dans l'architecture du biofilm
- ✿ Les alginates sont un hétéropolymère de  $\beta$  D-mannuronate et de  $\alpha$  L-guluronate. Il sont impliqués dans la formation des microcolonies au début de la formation du biofilm et dans la stabilité du biofilm mature

# Exopolysaccharides chez *P. aeruginosa*

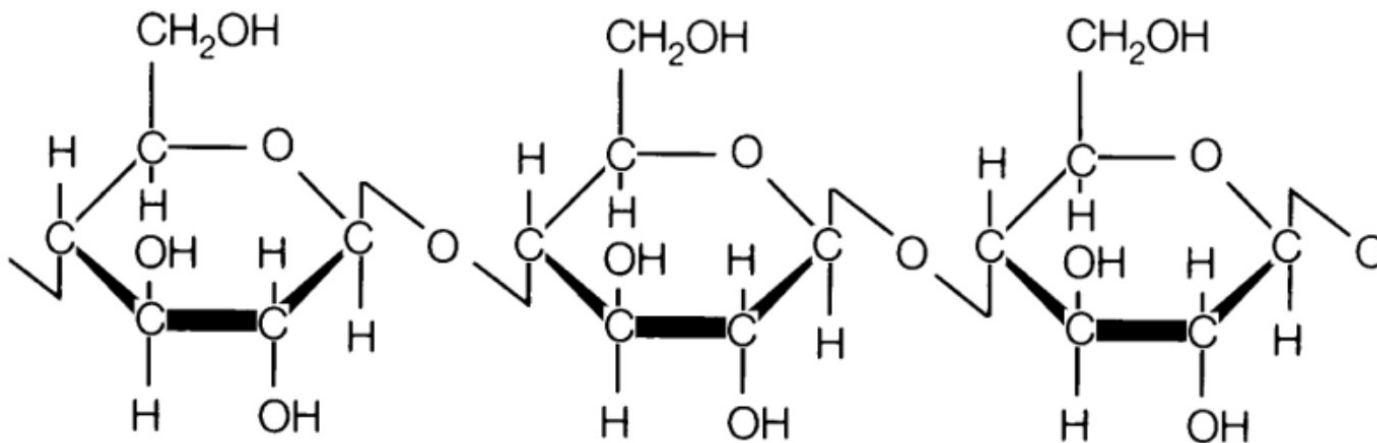
structure des alginate



# Exopolysaccharides chez d'autres espèces

## La cellulose

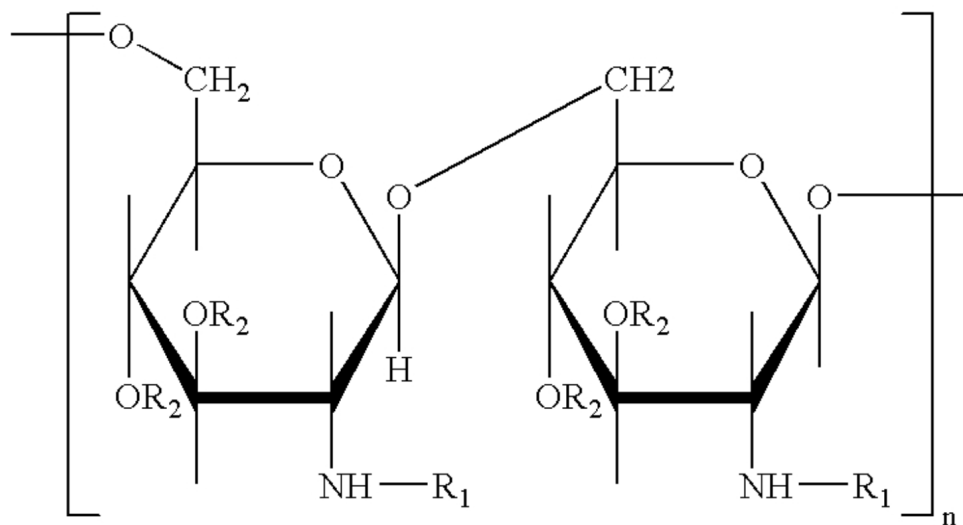
La cellulose est un constituant important de la matrice des biofilms formés par *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium



# Exopolysaccharides chez d'autres espèces

## L'adhésine intercellulaire

L'adhésine intercellulaire est un exopolysaccharide polycationique composé de résidus de *N*-acetylglucosamine liés en  $\beta$ -1,6, partiellement déacétylé. Elle est présente chez *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*



# Protéines

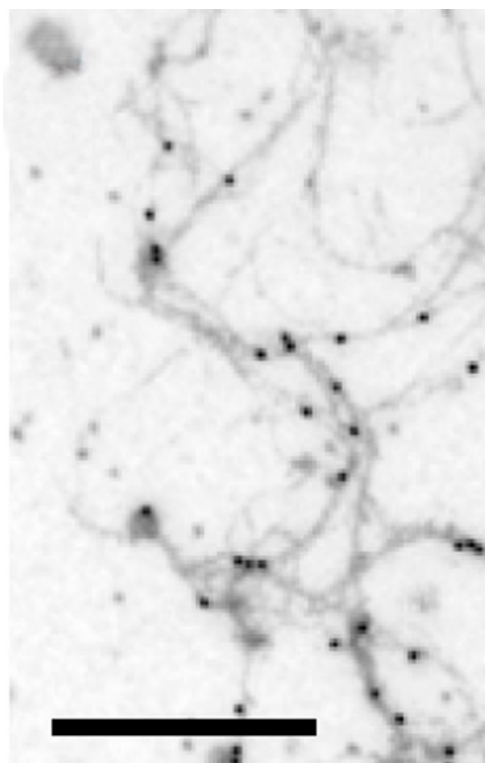


# Protéines de la matrice

Matrice de *B. subtilis* : TasA et TapA

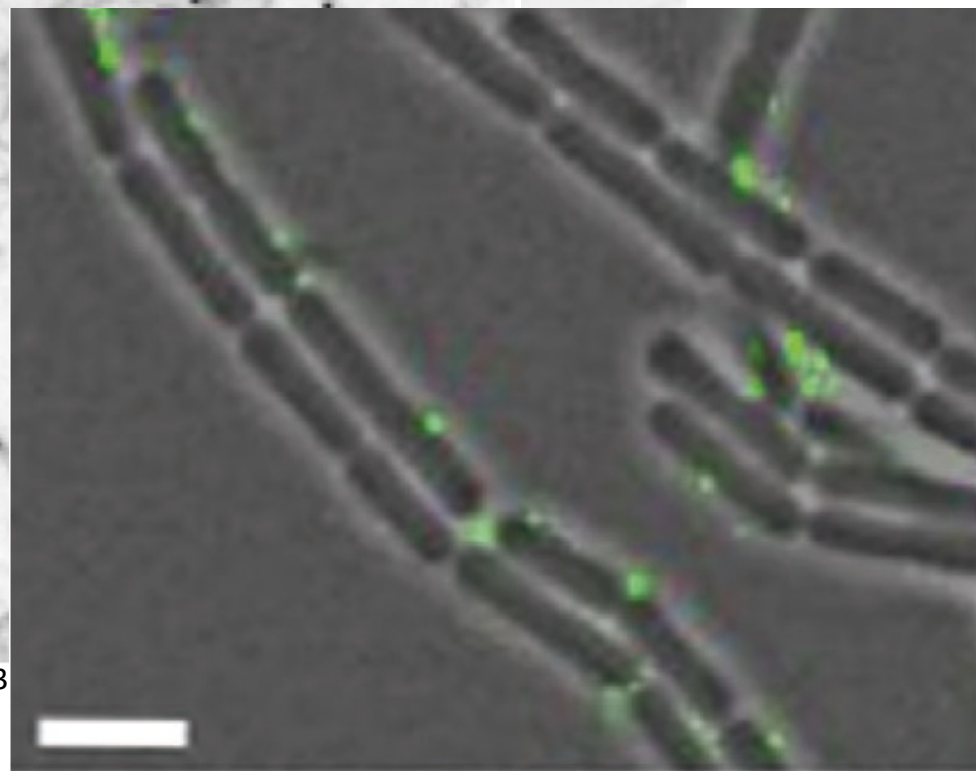


TasA



Romero *et al.*, 2010, *PNAS* 107:223

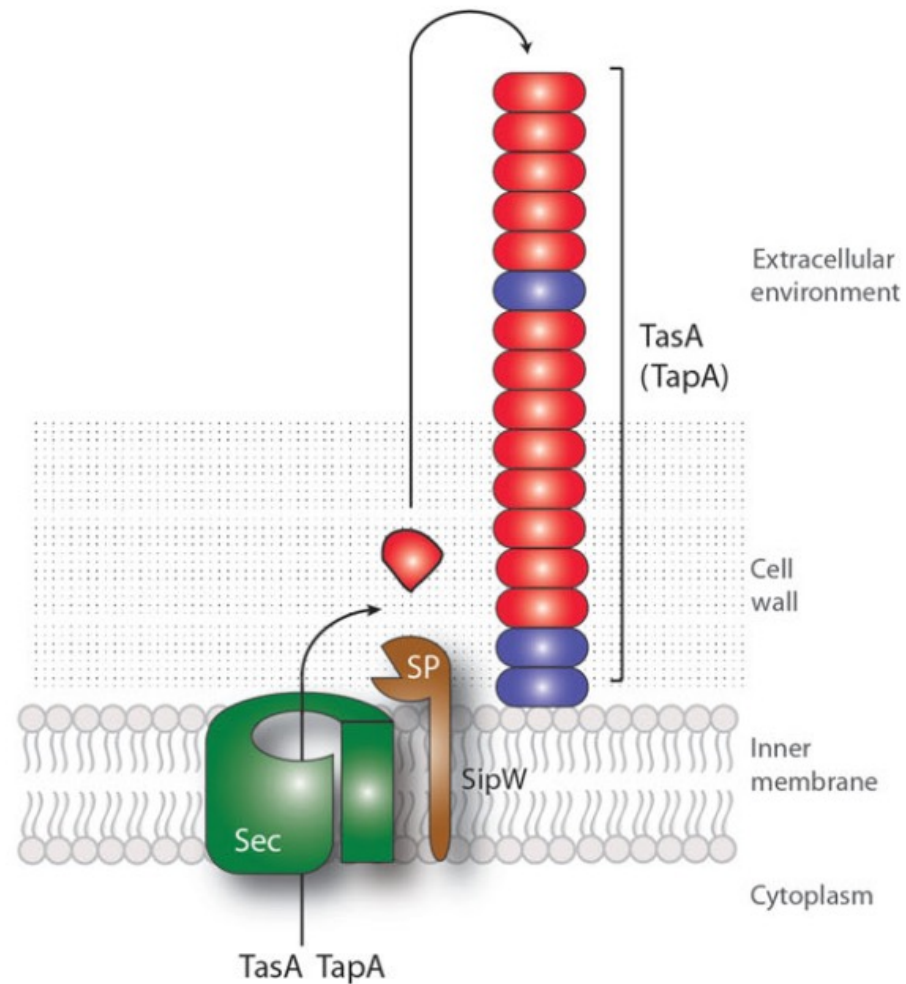
TapA



Romero *et al.*, 2011, *Mol. Microbiol* 80:1155-1168

# Protéines de la matrice

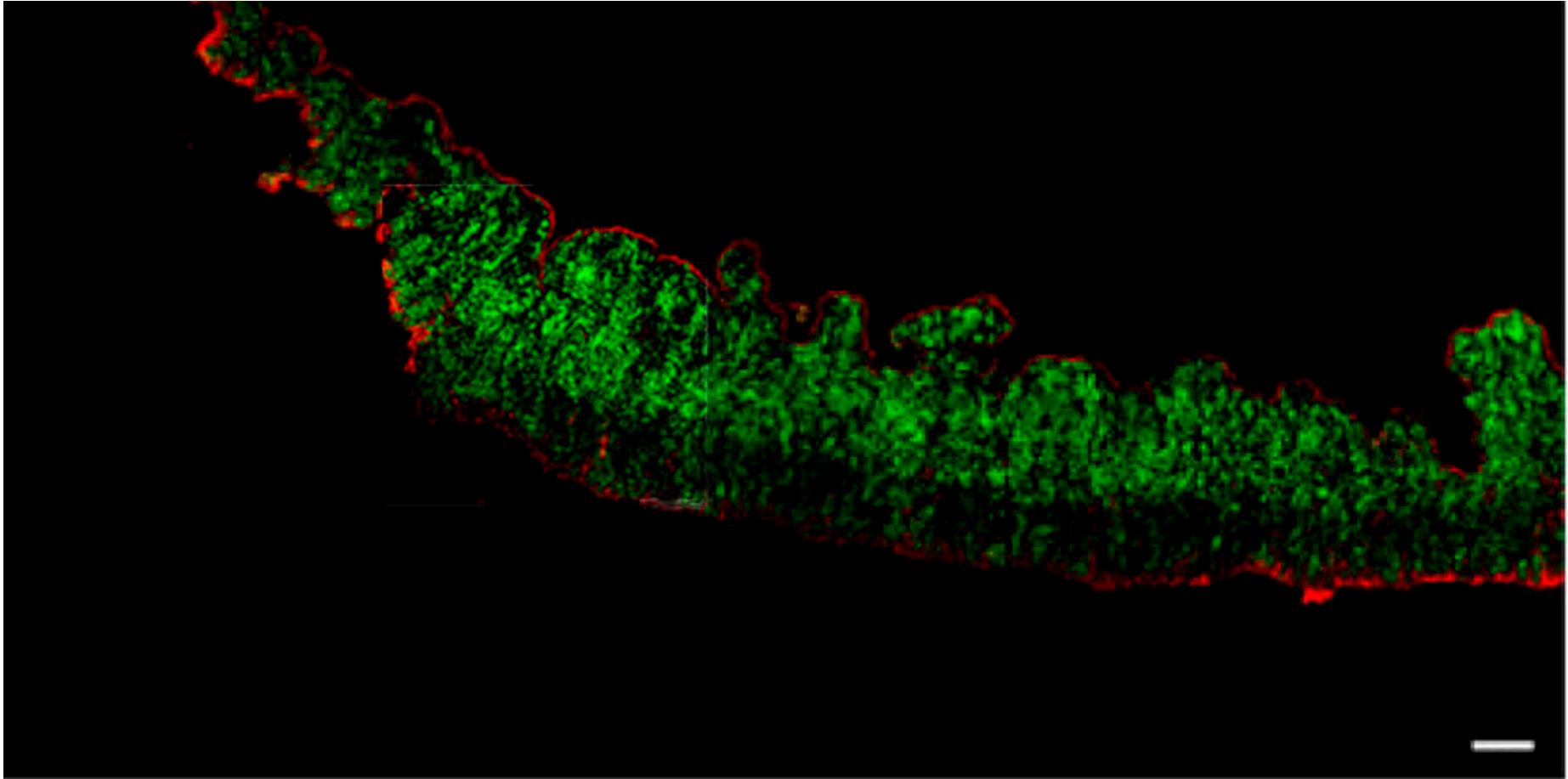
Matrice de *B. subtilis* : TasA et TapA



Hobley et al., 2015, FEMS Microbiol Rev.

# Protéine de la matrice

Matrice de *B. subtilis* : BslA



Hobley *et al.*, 2013, *PNAS* 110:13600-13605

# Protéines de la matrice

*P. aeruginosa* et *S. aureus*

- ✿ *P. aeruginosa* :

  - LecA et LecB stabilisent le biofilm

  - CdrA cross-link Psl et la paroi bactérienne

- ✿ *S. aureus*, *S. enterica* :

  - BapA localisée à la surface de la cellule, requise pour la formation des biofilms

# Rôle protecteur de la matrice

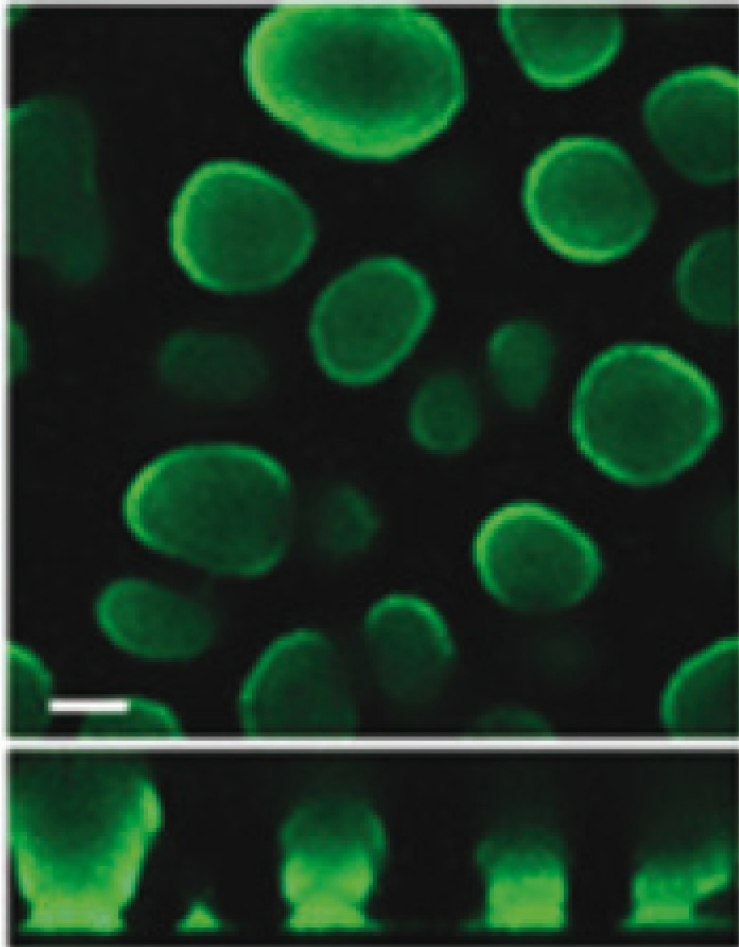
---

- ✿ La matrice fonctionne comme un filtre moléculaire. Elle présente des groupes apolaires, cationiques et anioniques qui lui permettent de séquestrer divers composés et lui confèrent des propriétés adhésives
- ✿ Elle protège la communauté microbienne contre la phagocytose (protozoaires prédateurs et cellules immunitaires)
- ✿ Elle la protège également contre les UV, la dessiccation et les agents biocides (peptides antimicrobiens et antibiotiques)

# Rôle protecteur de la matrice

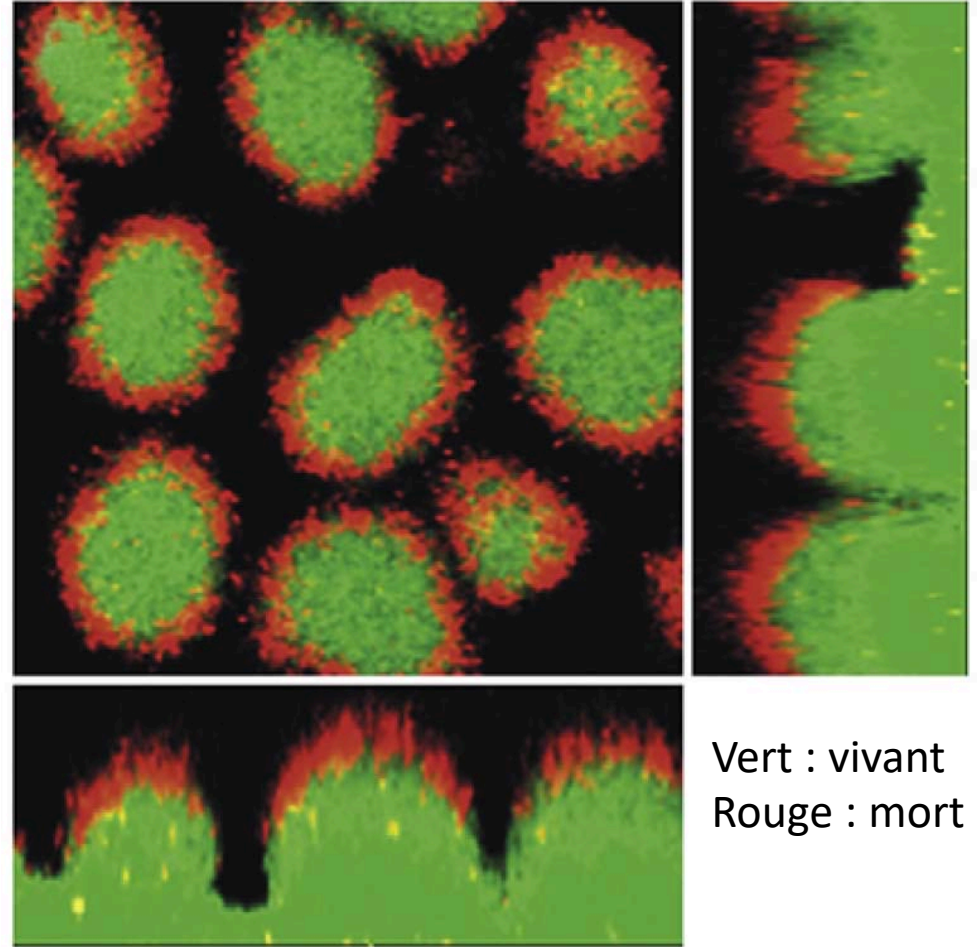
CLSM d'un biofilm de *P. aeruginosa*

Biofilm non traité



Colvin *et al.*, 2012, *Environ Microbiol*, 14:1913-1928

Biofilm traité à la tetracycline



Parsek & Tolker-Nielsen, 2008, *Curr Opin Microbiol* 11: 560-566

# Rôle structural de la matrice

- ✿ limitation de la mobilité cellulaire
- ✿ diminution des coefficients de diffusion
  - ➔ création de microenvironnements (oxygène, nutriments)
  - ➔ apparition de quorum sensing locaux
  - ➔ hétérogénéité du biofilm

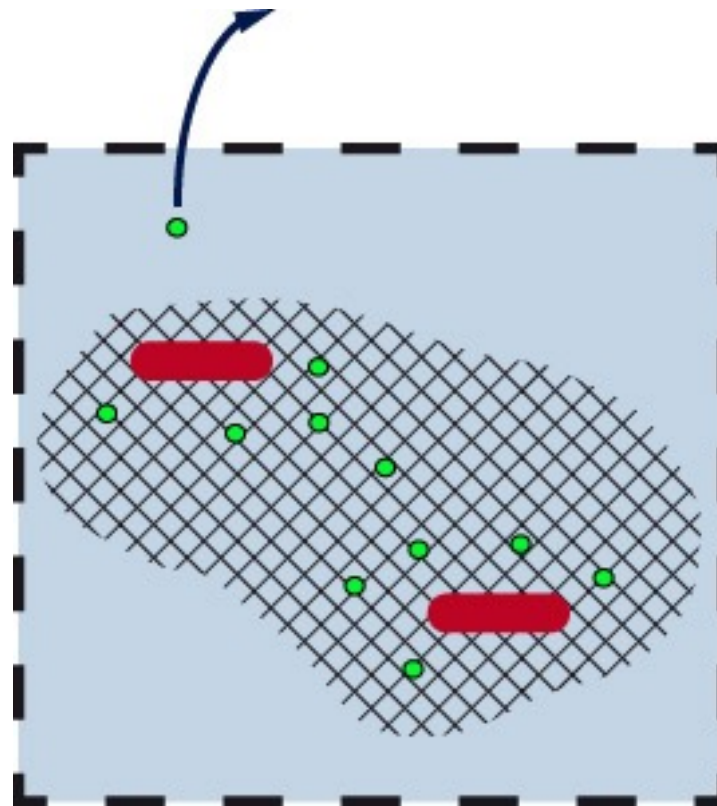
# Quorum Sensing : définition

---

- ✿ Le quorum sensing est un système de régulation dans lequel la bactérie secrète dans l'environnement une molécule-signal (peptide chez les bactéries à Gram +, homosérine lactone chez les bactéries à Gram -).
- ✿ Ce signal, à partir d'un seuil défini, déclenche une réponse de la bactérie (formation de biofilms, production de facteur de virulence, sporulation, luminescence ...)

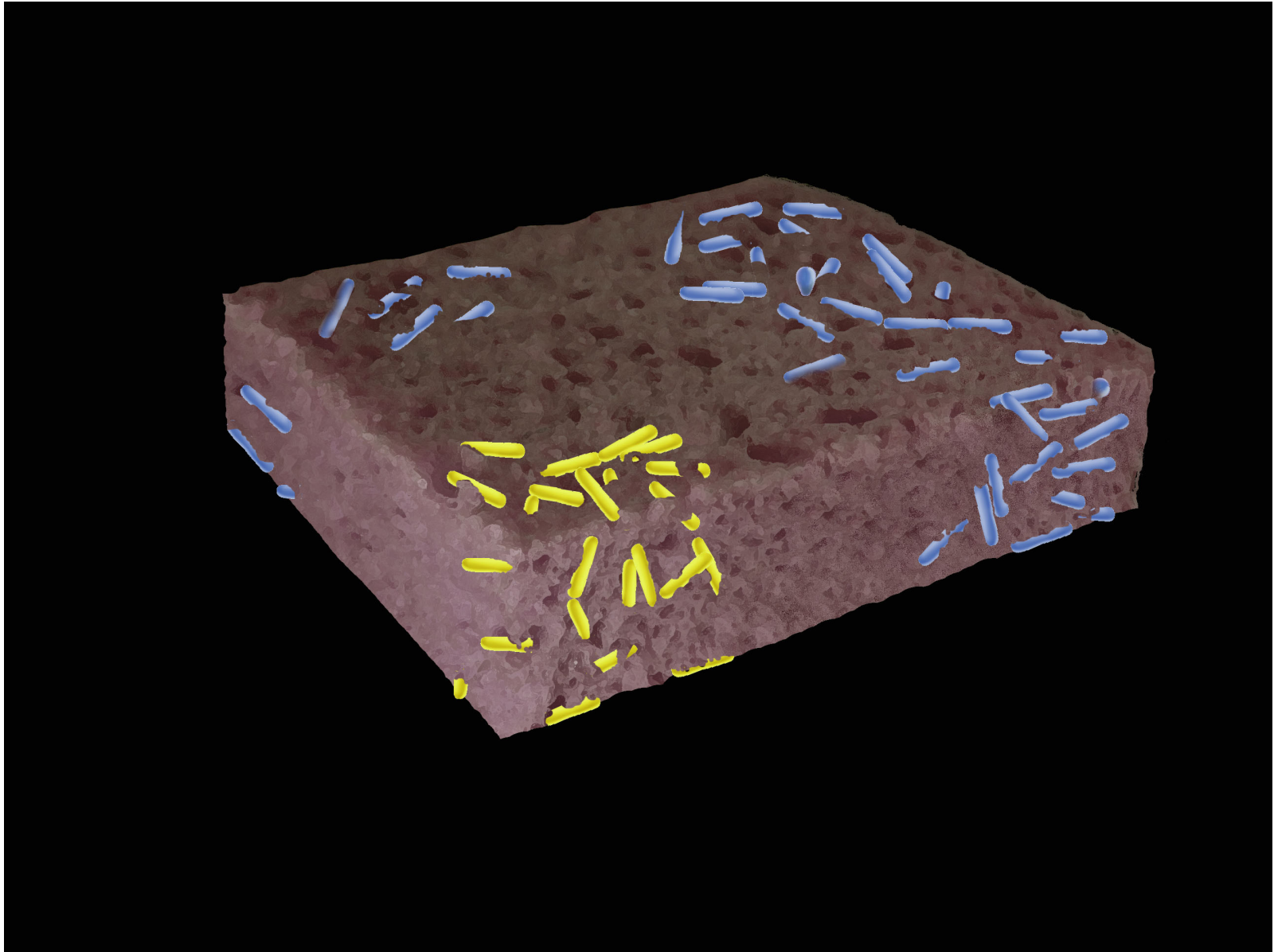


# Quorum Sensing : que mesure t-il ?

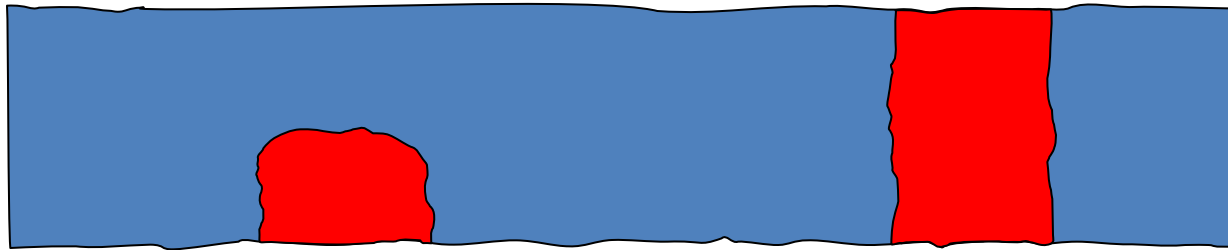


biofilm

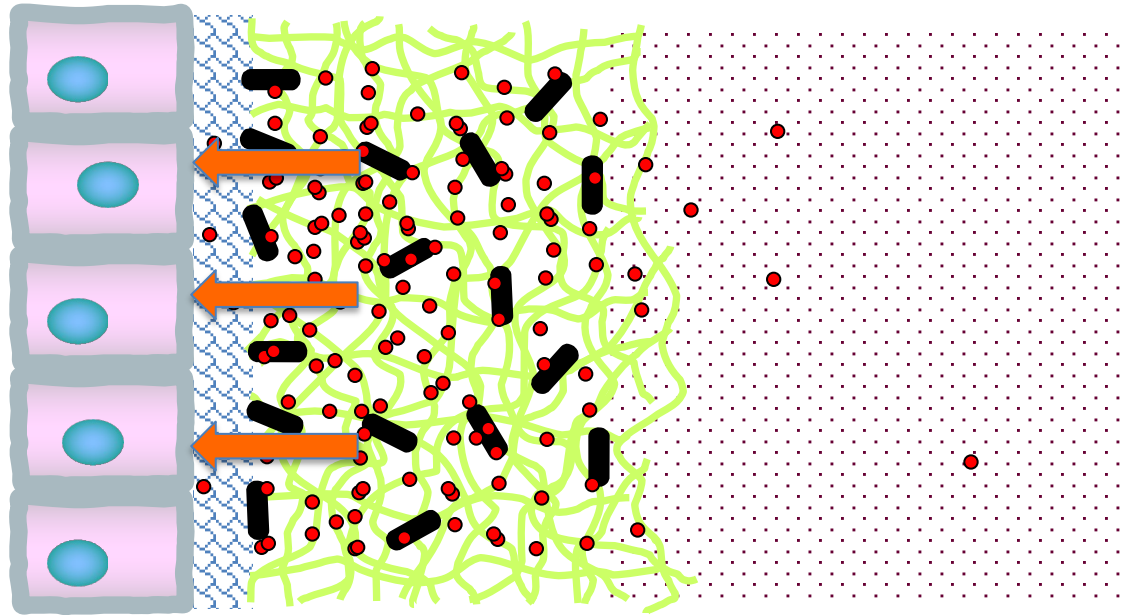
# Quorum sensing dans le biofilm



# Localisation du sécrétome dans le biofilm



# Conséquences sur les biofilms chez l'hôte



# IV – Variabilité phénotypique

# Hétérogénéité phénotypique dans le biofilm

---

- ✿ Une hétérogénéité phénotypique est observée dans des populations isogéniques, indépendamment de mutations génétiques
- ✿ Elle est dûe en grande partie au bruit stochastique dans l'expression des gènes
- ✿ Elle peut constituer une assurance vie en cas de changements brutaux dans l'environnement

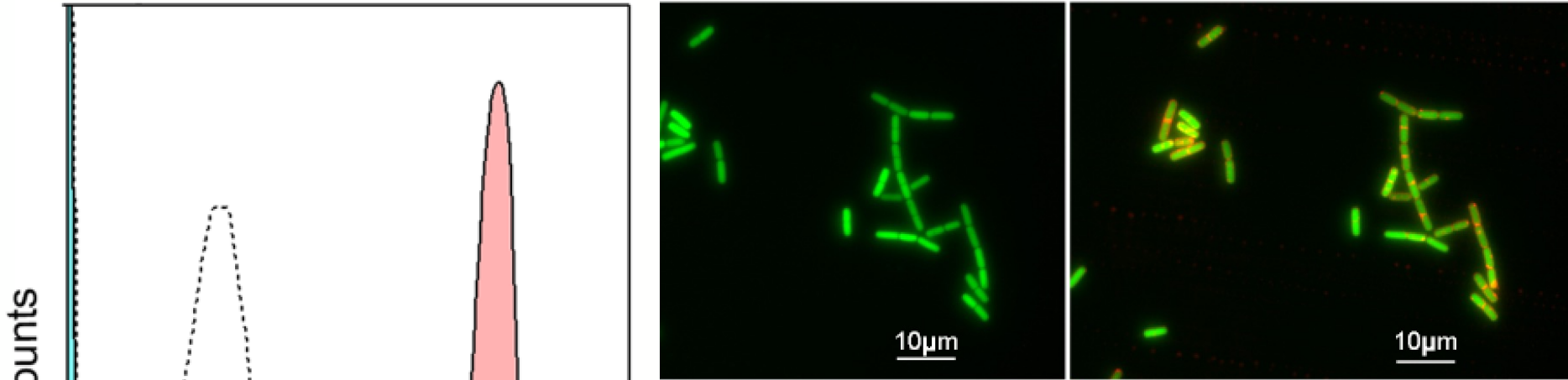
# Hétérogénéité du biofilm chez *B. cereus*

Expression de l'enterotoxine *hbl* chez *B. cereus*

FM4-64

YFP

overlay



# Hétérogénéité du biofilm

Expression de *nprA* (nécrotrophisme) et *spoIIID* (sporulation)

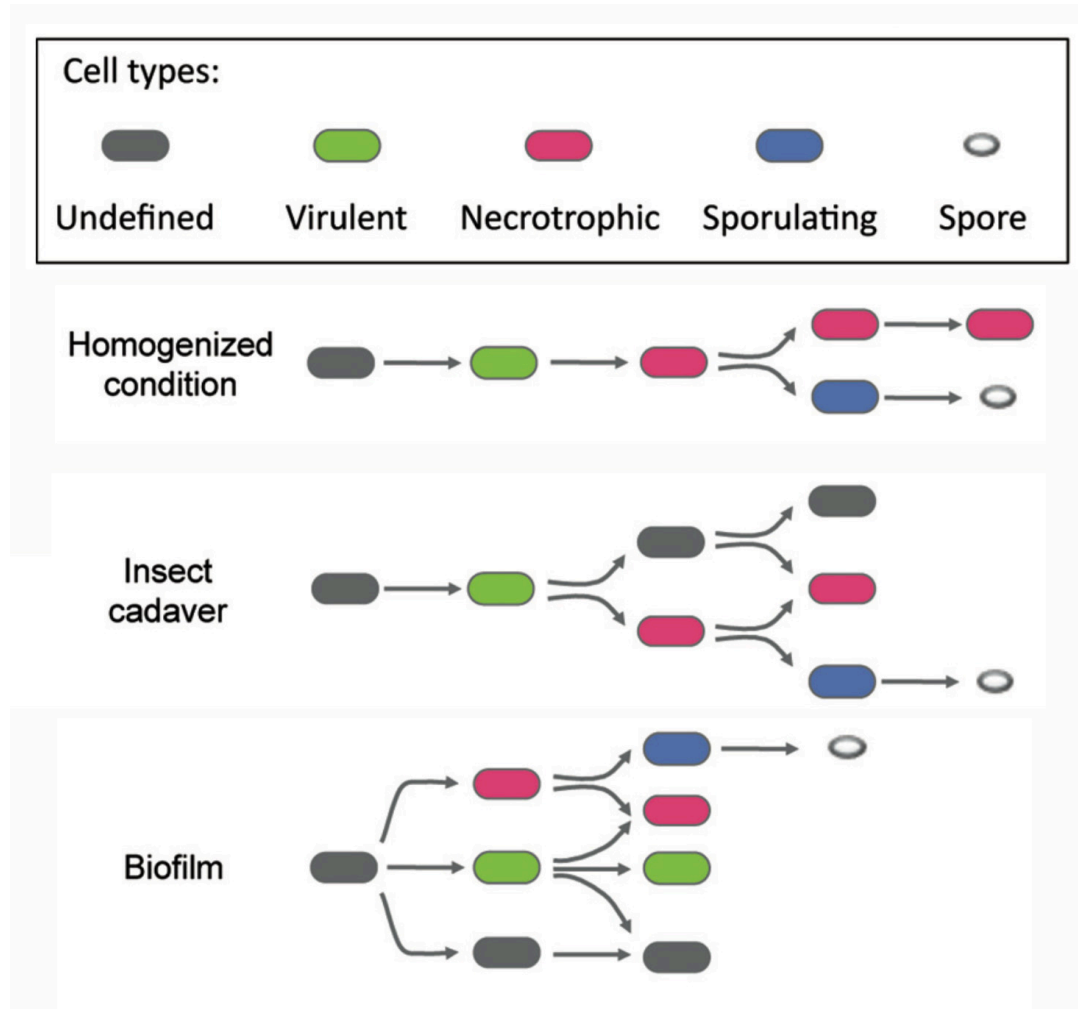


Verplaetse *et al.*, 2015, *mBio*, 6(3):e00138-15



# Hétérogénéité phénotypique chez *B. thuringiensis*

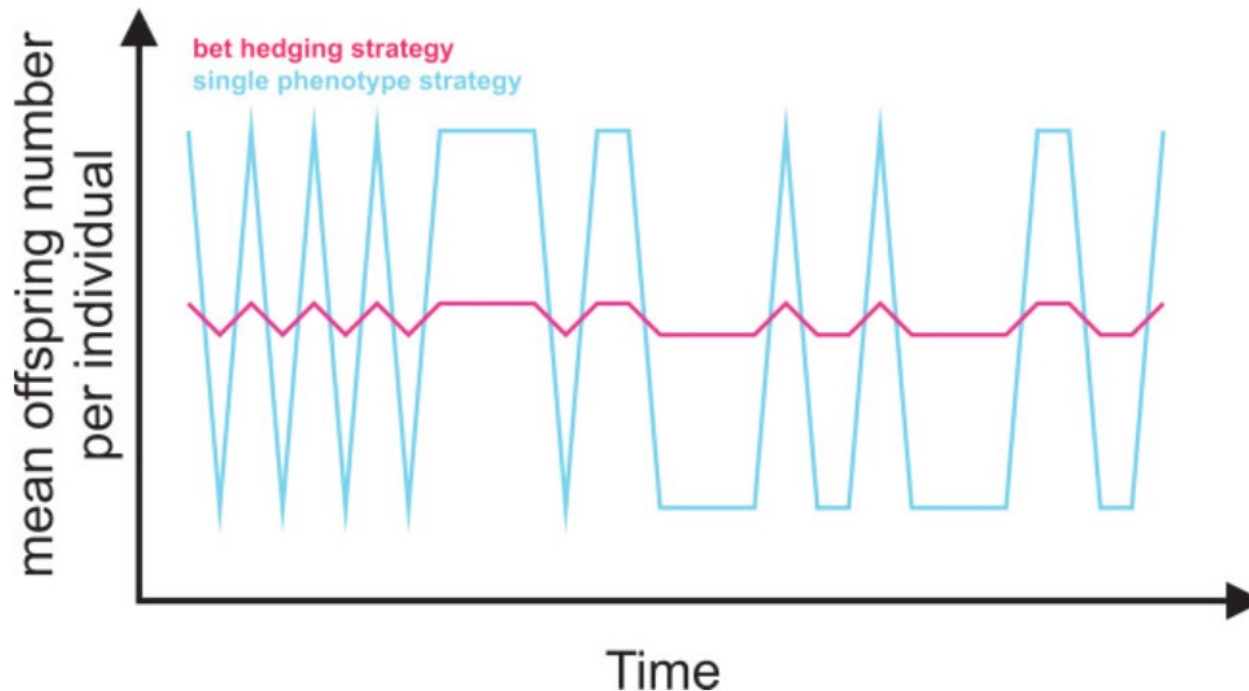
L'hétérogénéité phénotypique est maximum dans le biofilm chez *B. thuringiensis*



Verplaetse *et al.*, 2015, *mBio*, 6:3 e00138-15

# Stratégies de survie (bet-hedging)

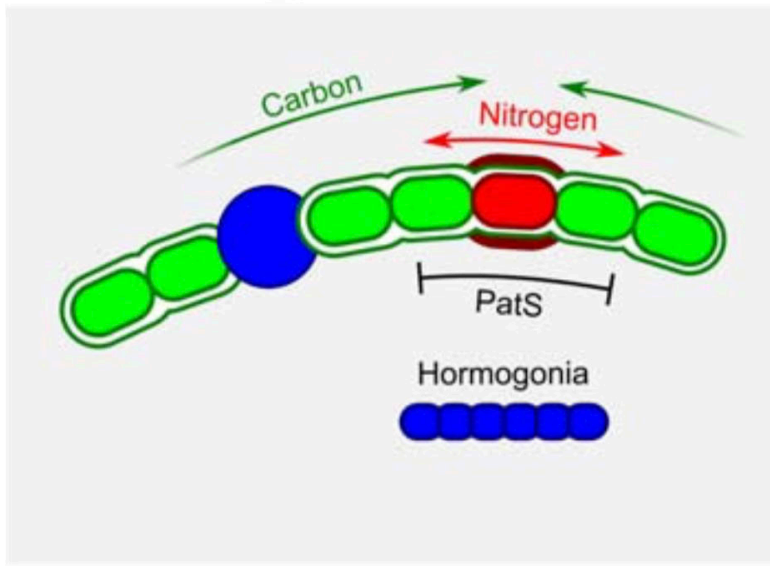
La variance dans le nombre de descendants est diminuée dans les populations hétérogènes comparativement aux populations non hétérogènes



Les populations hétérogènes sont mieux préparées aux changements environnementaux brutaux (stratégie d'assurance-vie)

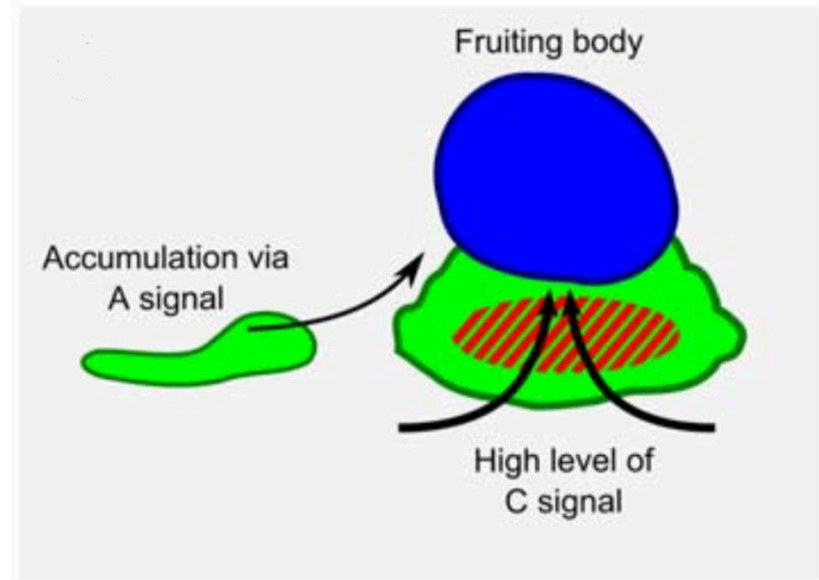
# Division du travail et altruisme

Cyanobacteria



Les cyanobactéries fixent le carbone et l'azote. Cependant la nitrogénase est sensible à l'oxygène. Séparation des fonctions de photosynthèse et de fixation d'azote entre cellules photosynthétiques (en vert) et hétérocystes (en rouge)

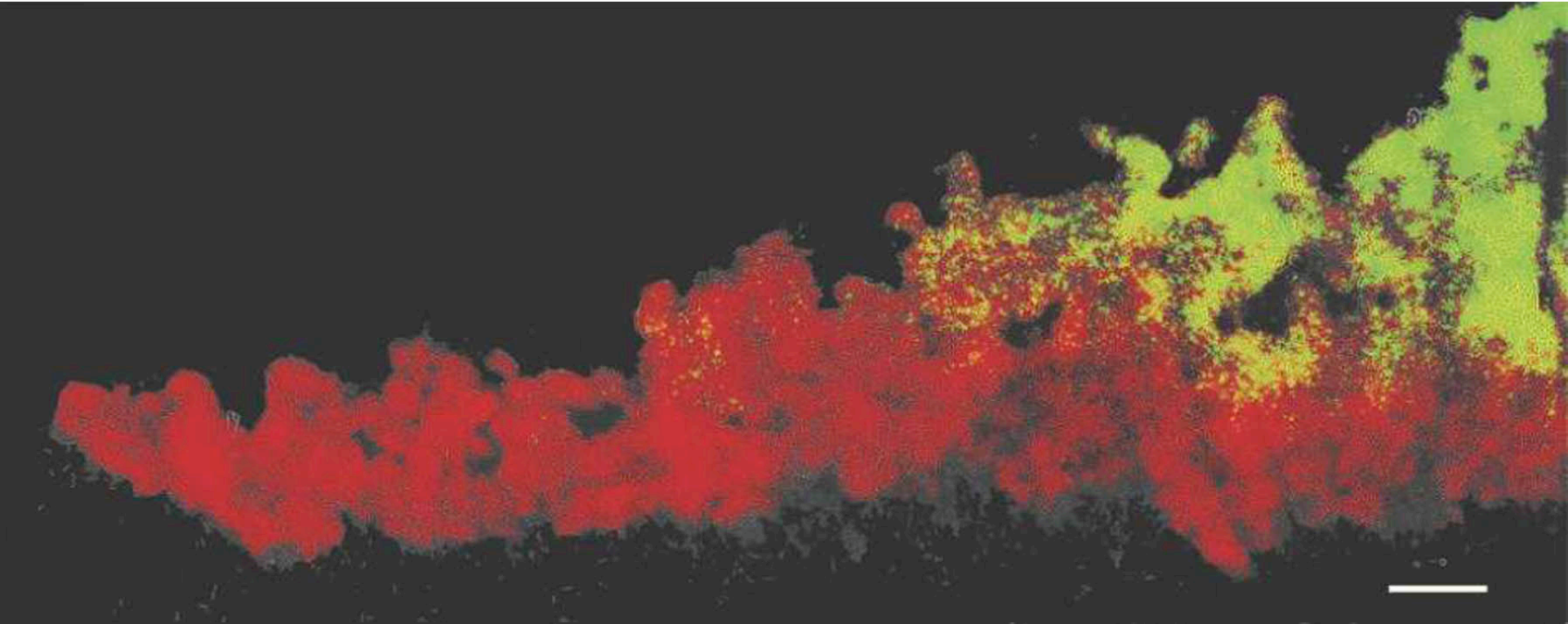
Myxobacteria



Les myxobactéries s'agrègent pour former des biofilms et des 'fruiting bodies'. Les nutriments nécessaires pour la sporulation sont produits par la lyse d'une partie des cellules situées en dehors du fruiting body.

# Différentiation spatiale chez *B. subtilis*

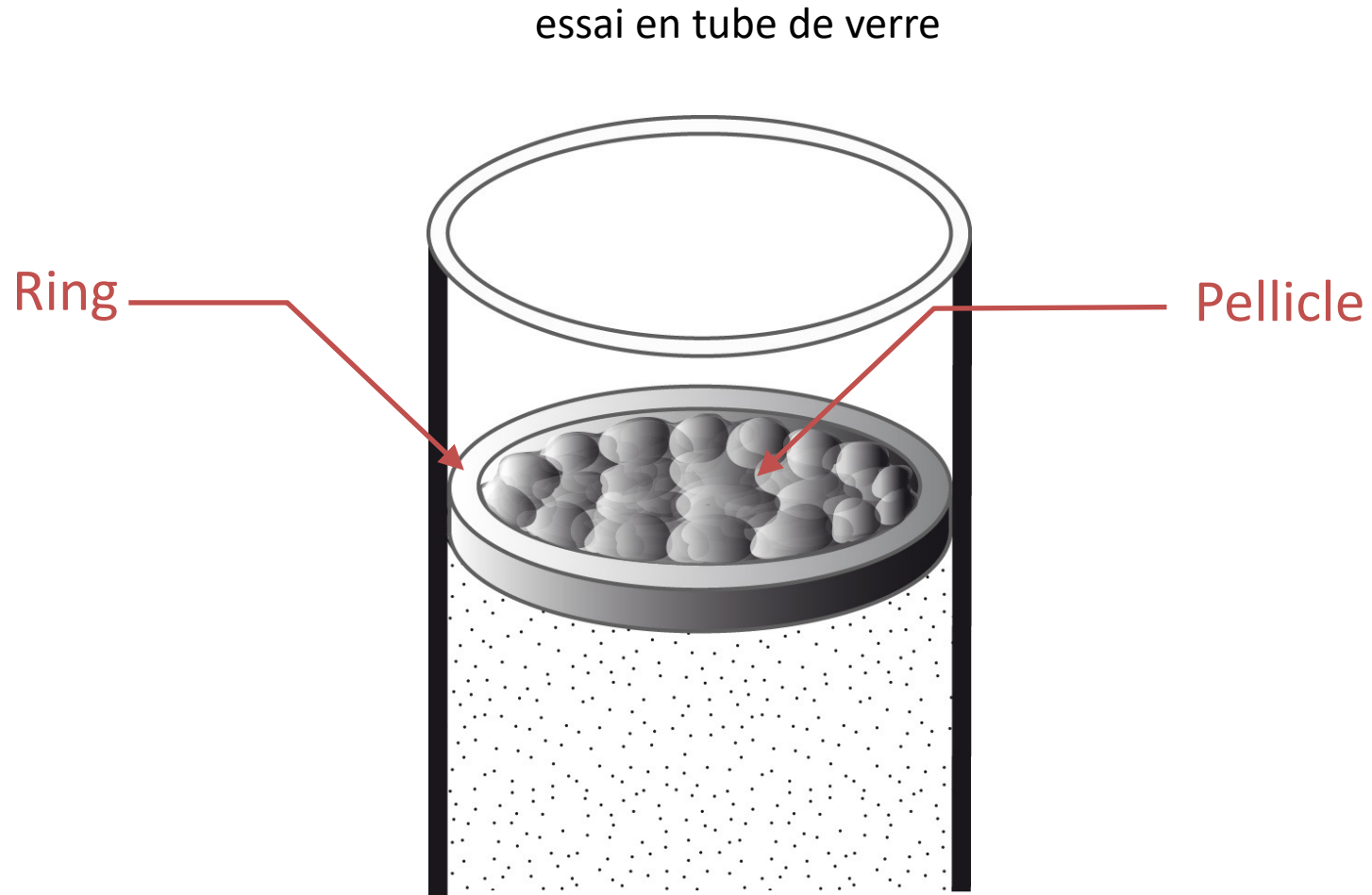
Cryocoupe d'une colonie de *B. subtilis* sur boîte



Vlamakis *et al.*, 2008, *Gene Dev* 22:945-953

rouge = matrice    vert: sporulantes

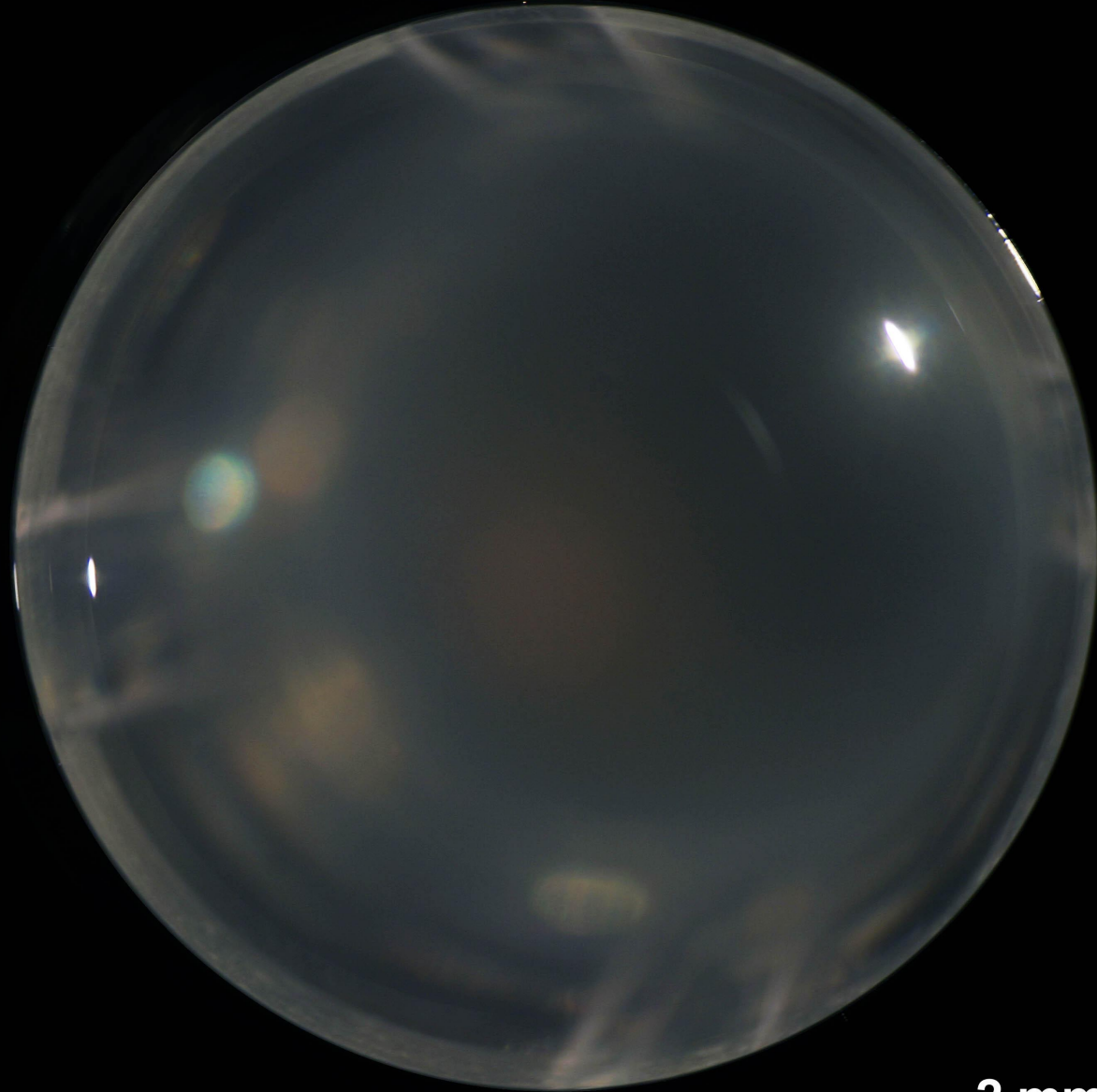
# Différentiation spatiale de la sporulation chez *B. cereus*



light

16 h

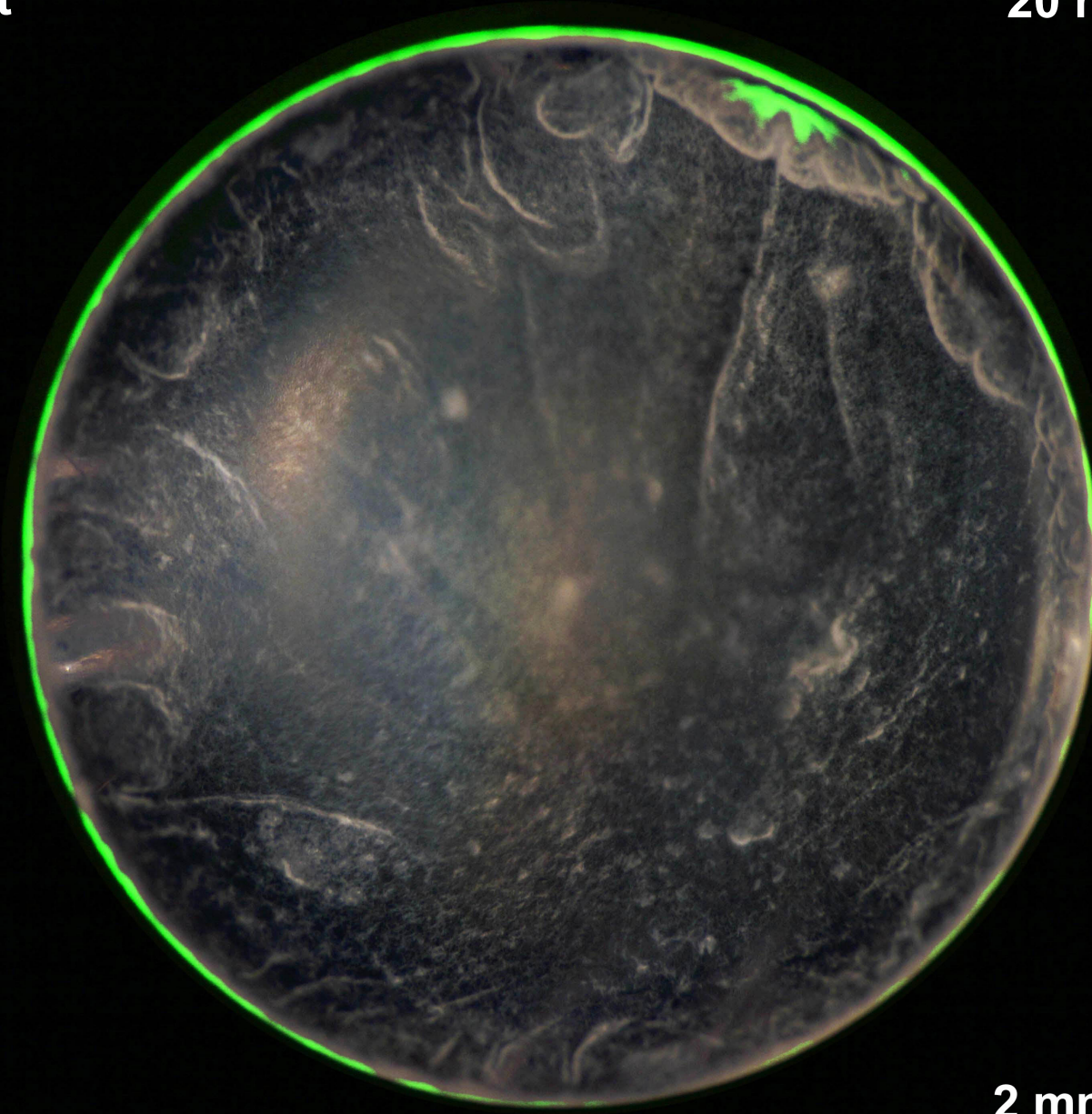
+ YFP



2 mm

light  
+ YFP

20 h

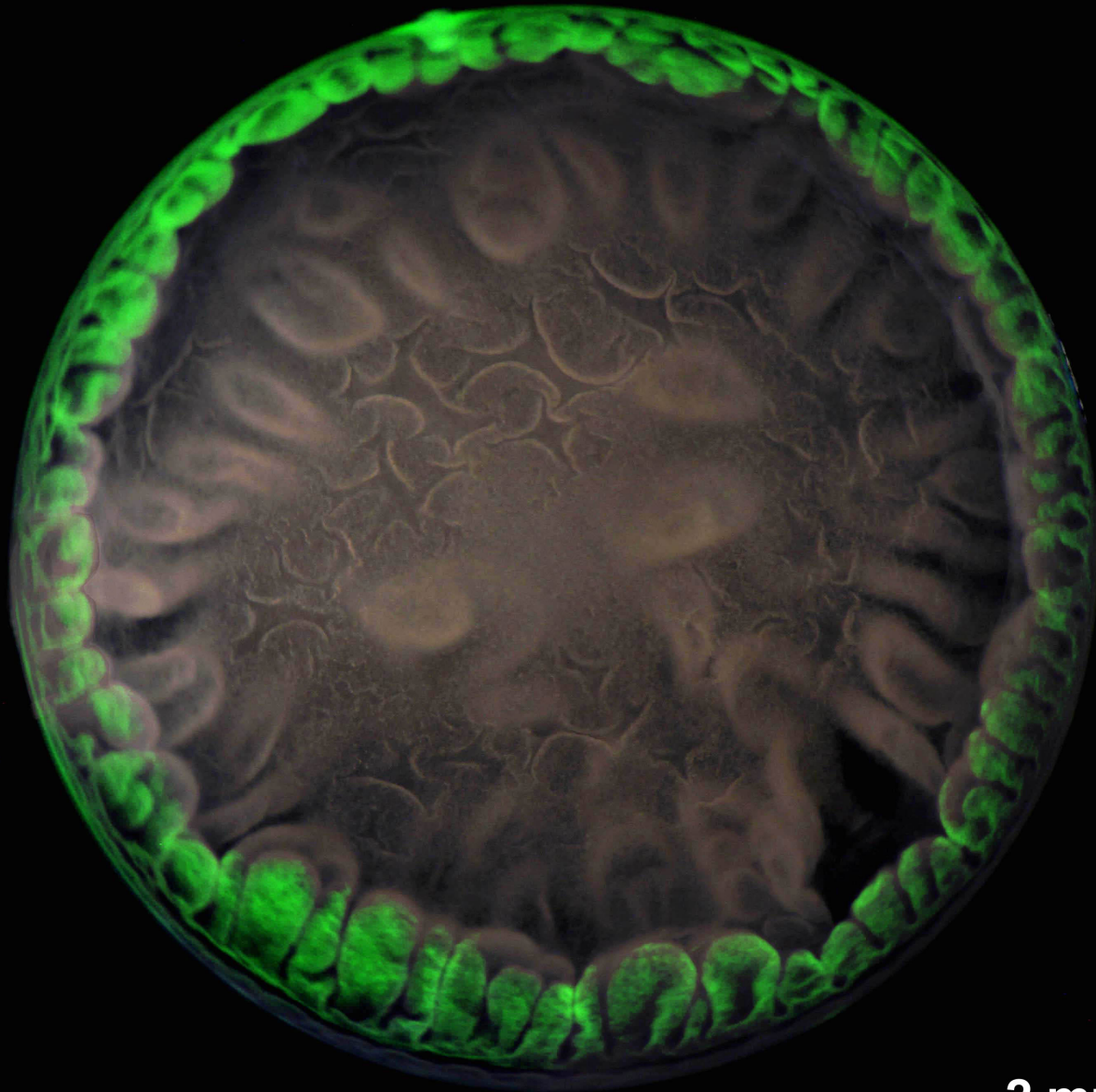


2 mm

light

24 h

+ YFP

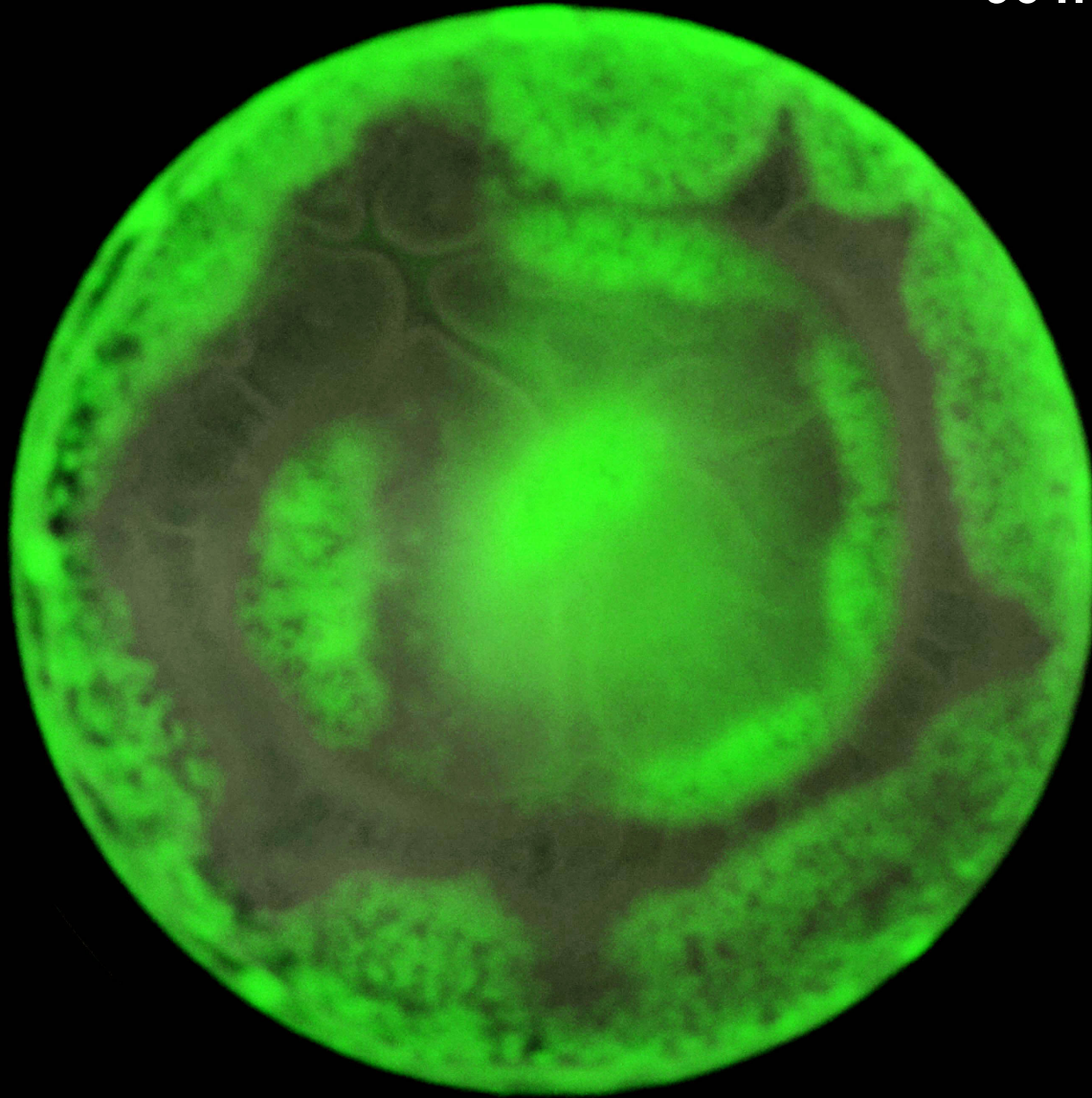


2 mm



light  
+ YFP

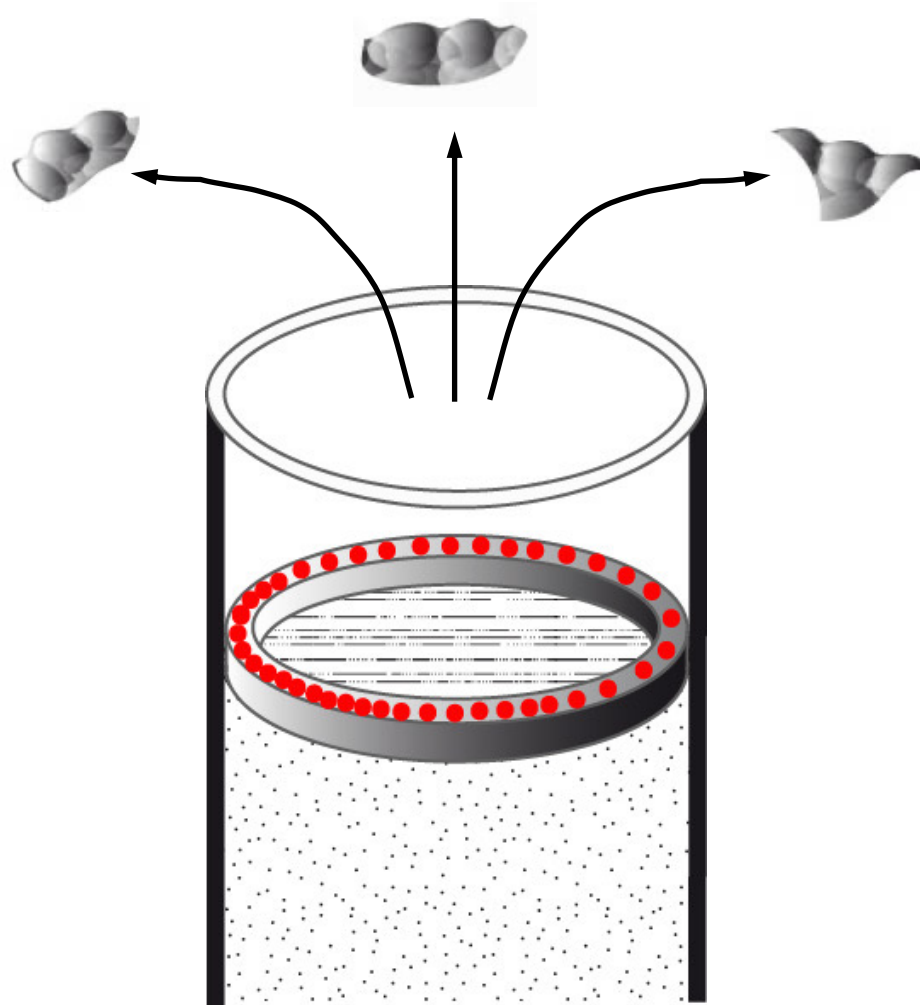
96 h



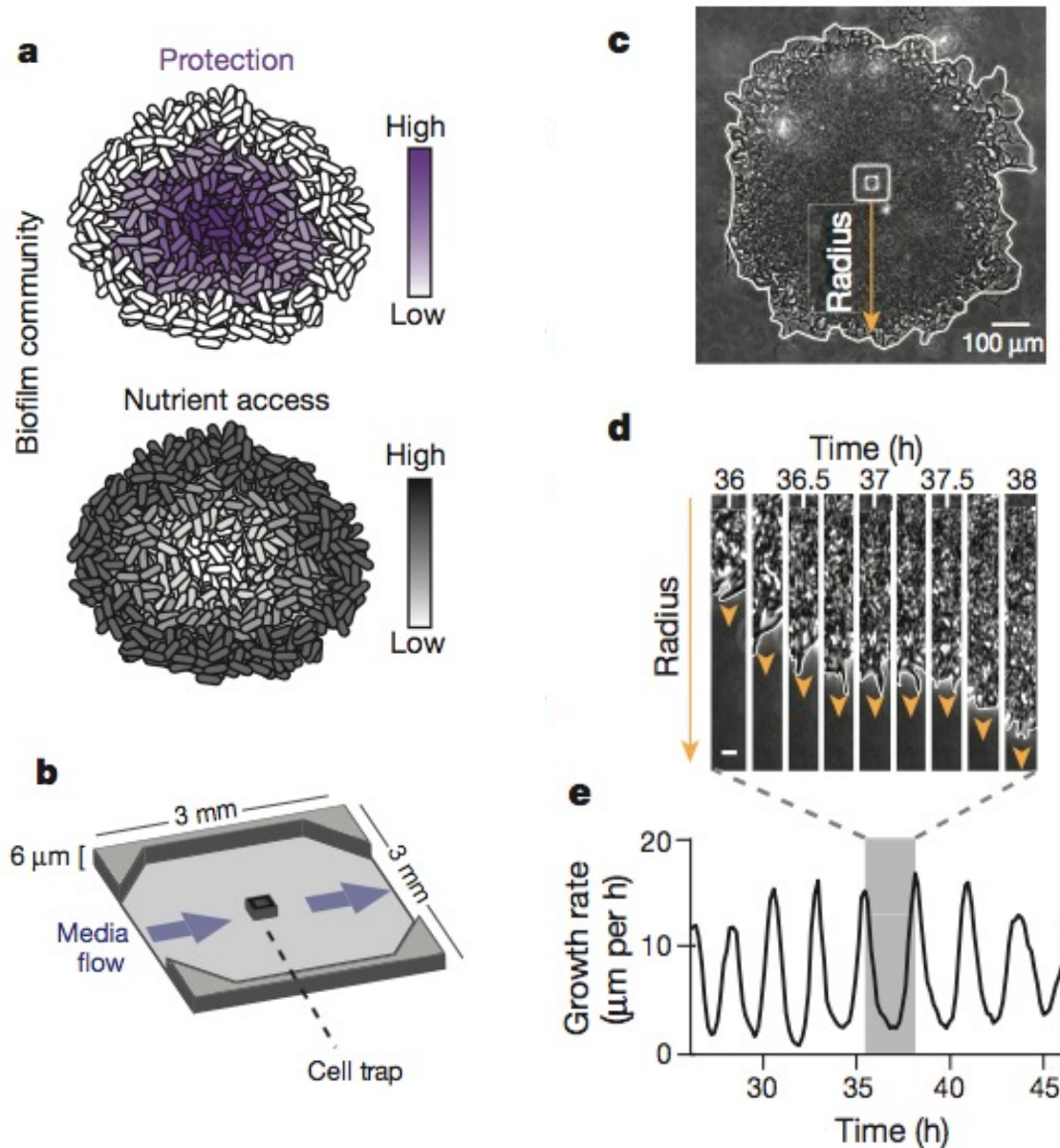
2 mm

# Différentiation spatiale chez *B. cereus*

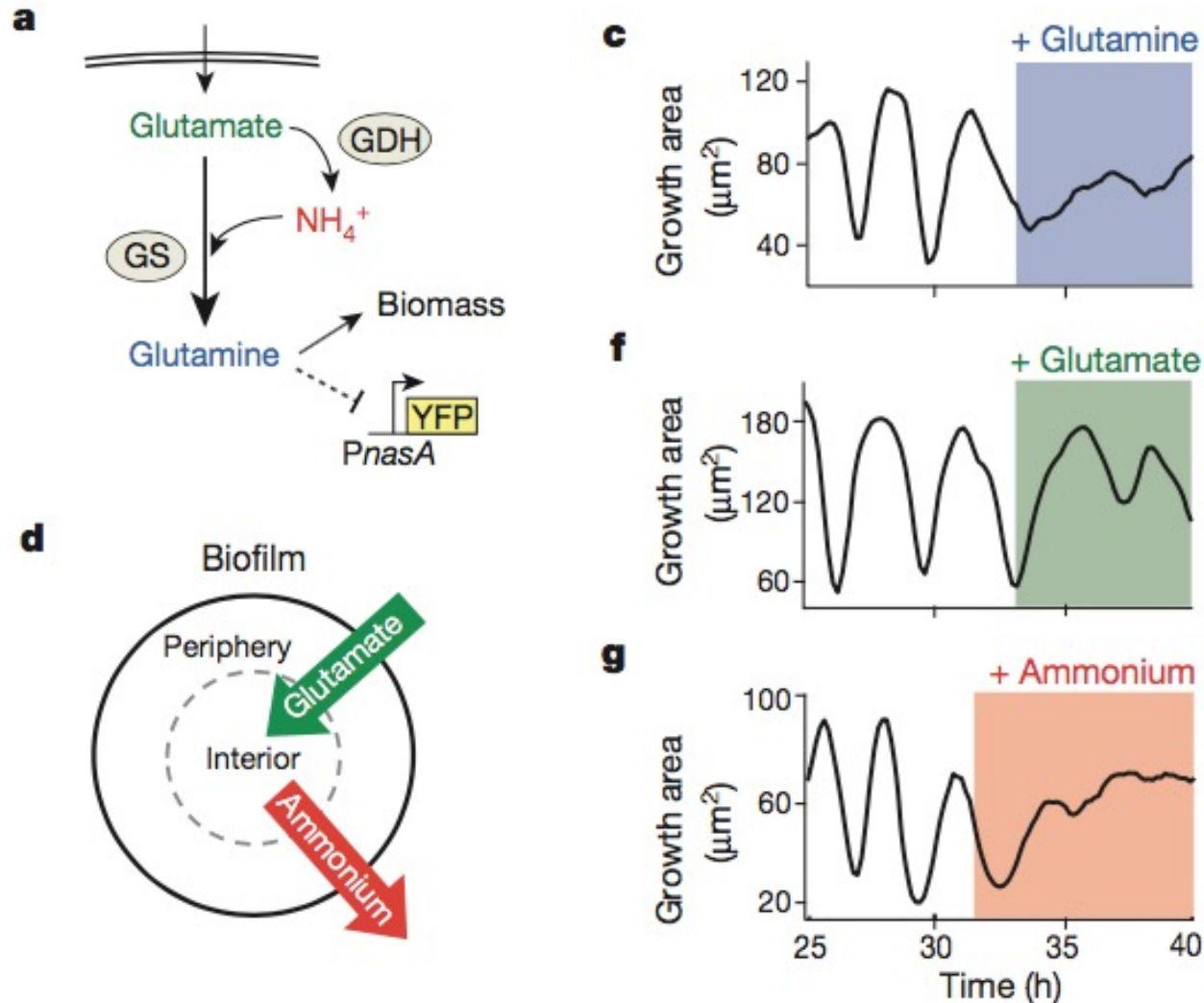
conséquence pour l'industrie alimentaire



# Coopération chez *B. subtilis* : croissance discontinue

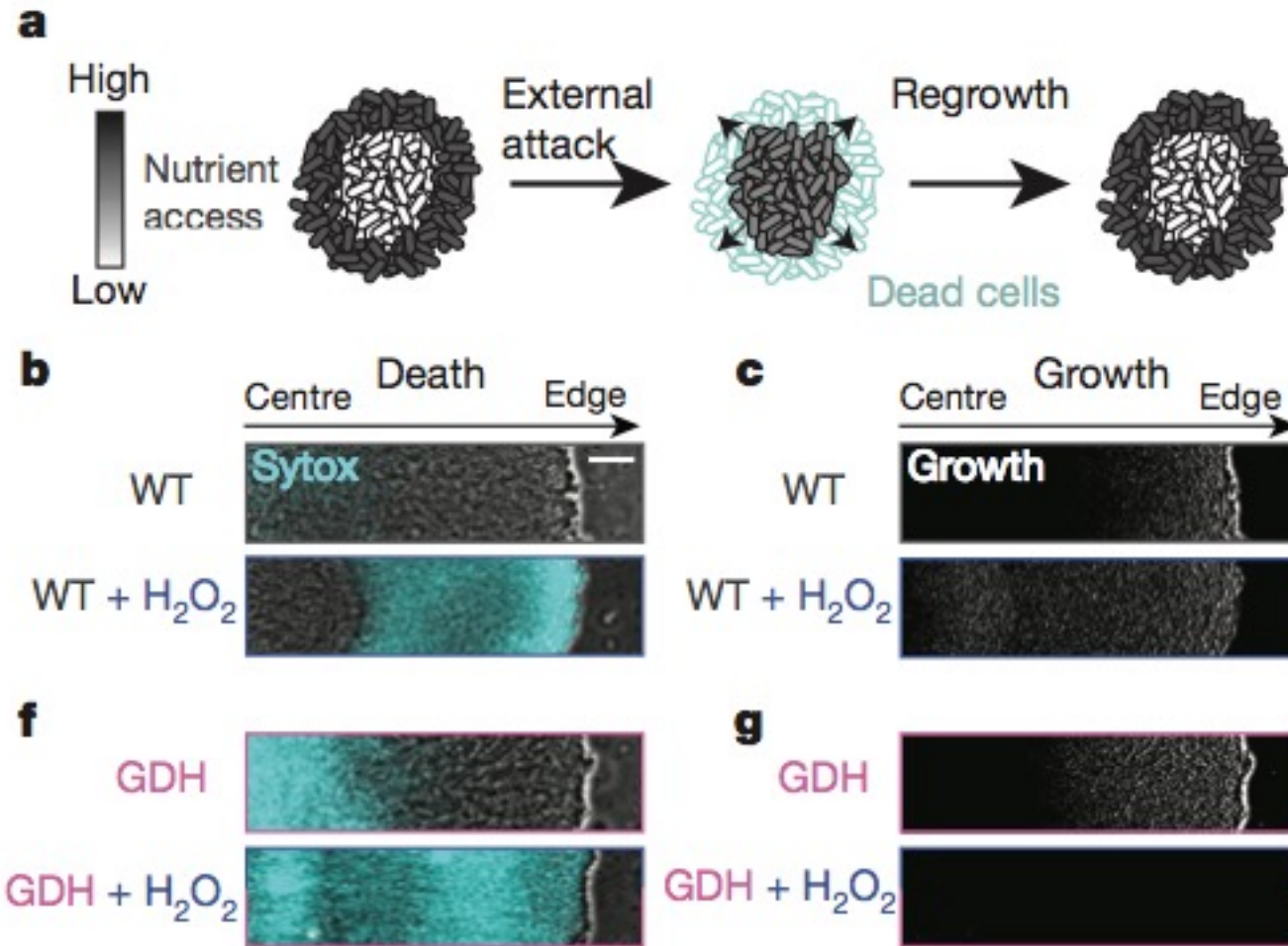


# Coopération chez *B. subtilis* : métabolisme azoté



Liu et al, 2015, Nature 523:550-554

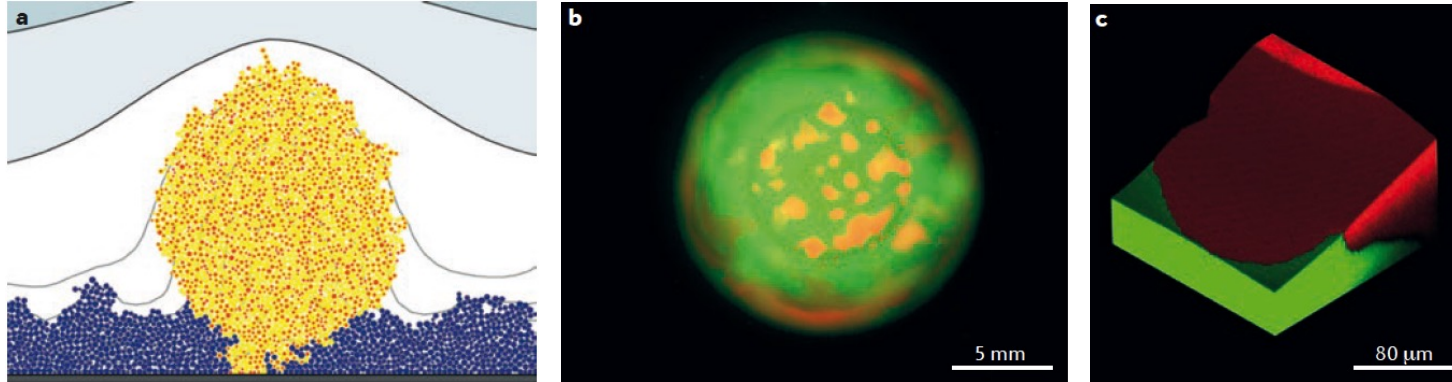
# Coopération chez *B. subtilis* : bénéfiques



Liu et al, 2015, Nature 523:550-554

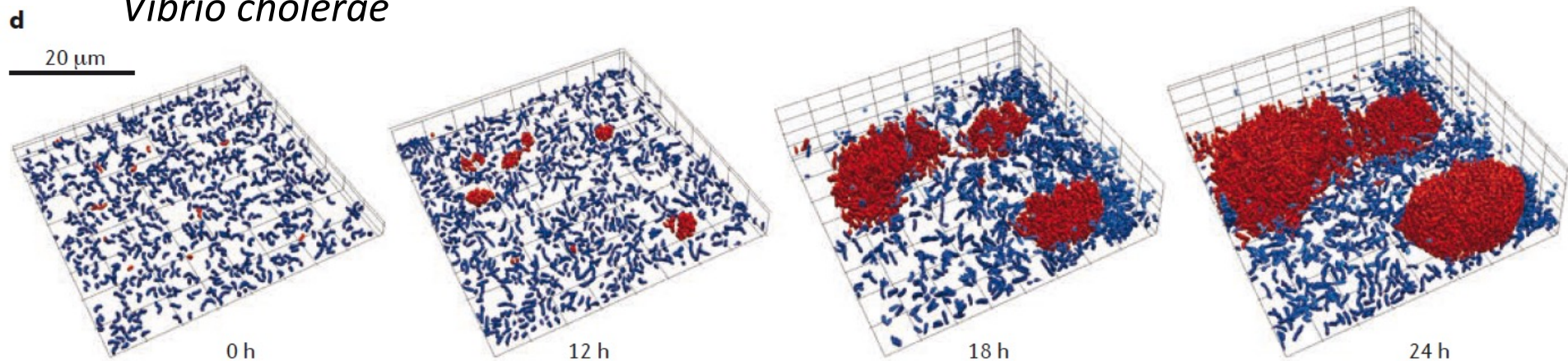
# Profiteurs et biens publics

## *Pseudomonas fluorescens*



simulation

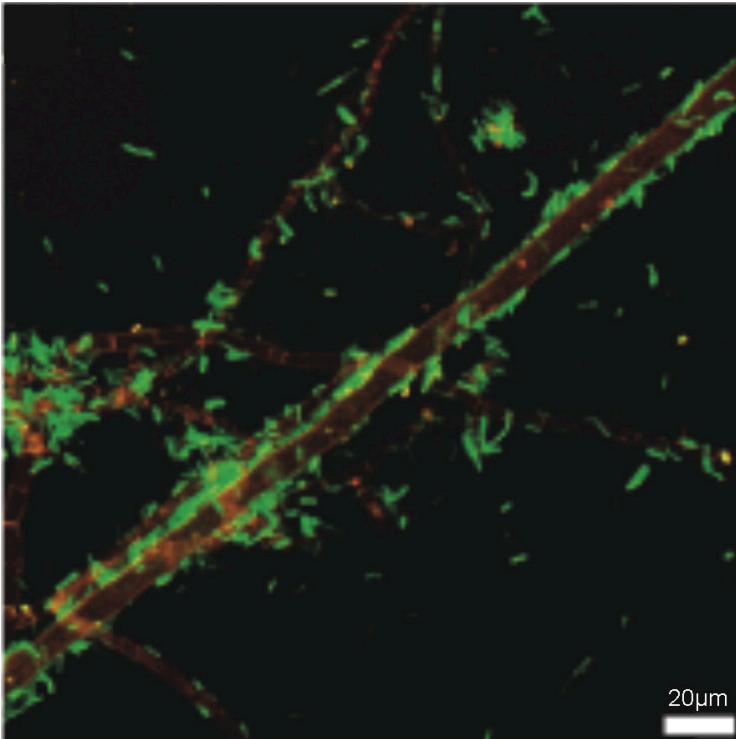
## *Vibrio cholerae*



Nadell *et al.*, 2016, Nature rev Microbiol, 14:589-600

# V – Biofilms environnementaux

# Mycorrhize

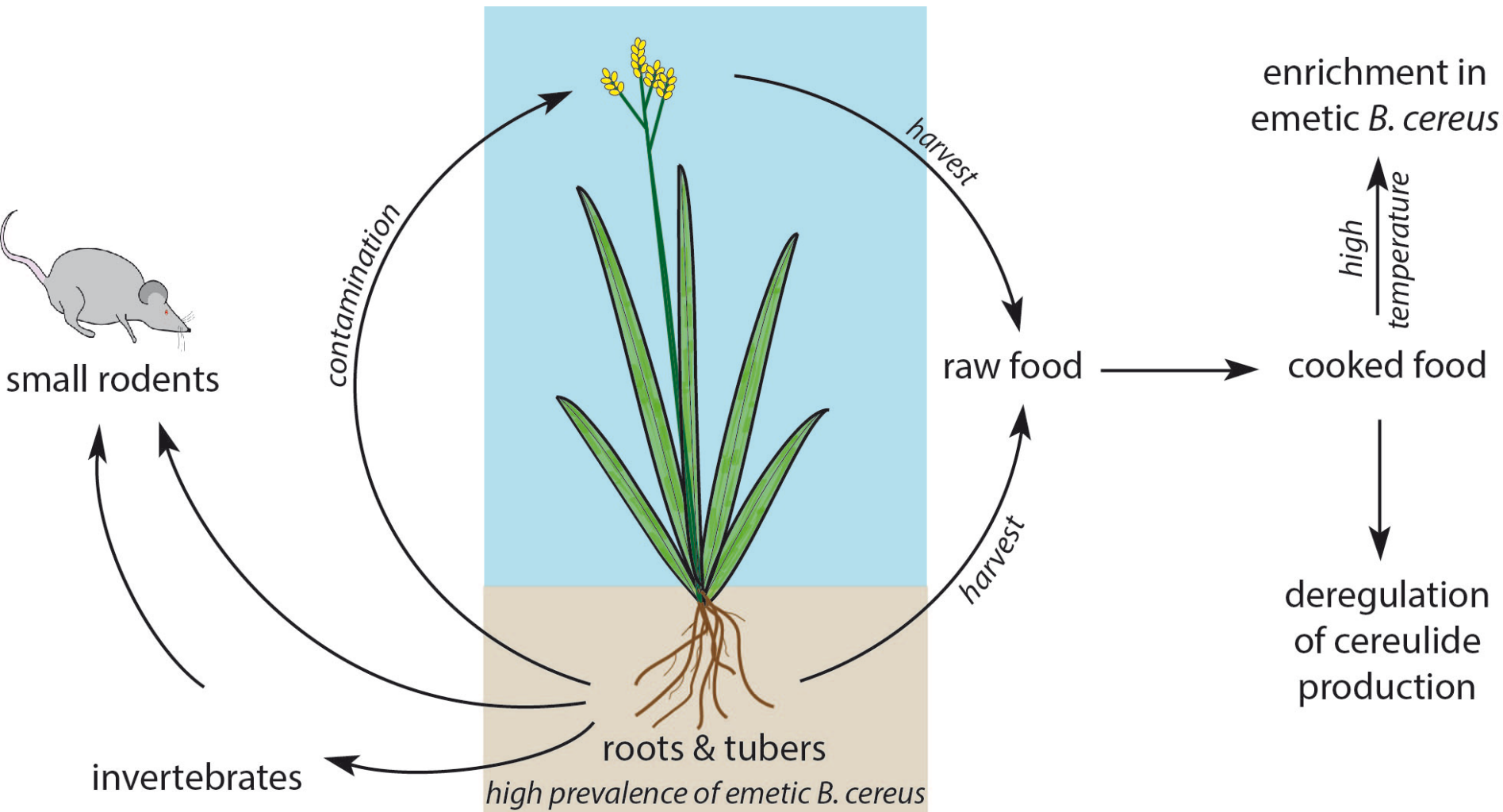


Biofilm de *B. cereus* à la surface d'hyphes de *Glomus sp* associé à des racines de carottes

Toljander *et al.*, 2006, FEMS Microbiol. Letters 254:34-40



# Hypothèse sur la prévalence des souches émétiques de *Bc*



Majed *et al.*, 2015, *Front. Microbiol.*, è:1054

# Biofouling



Le biofouling est l'accrétion de matières organiques sur des surfaces immergées

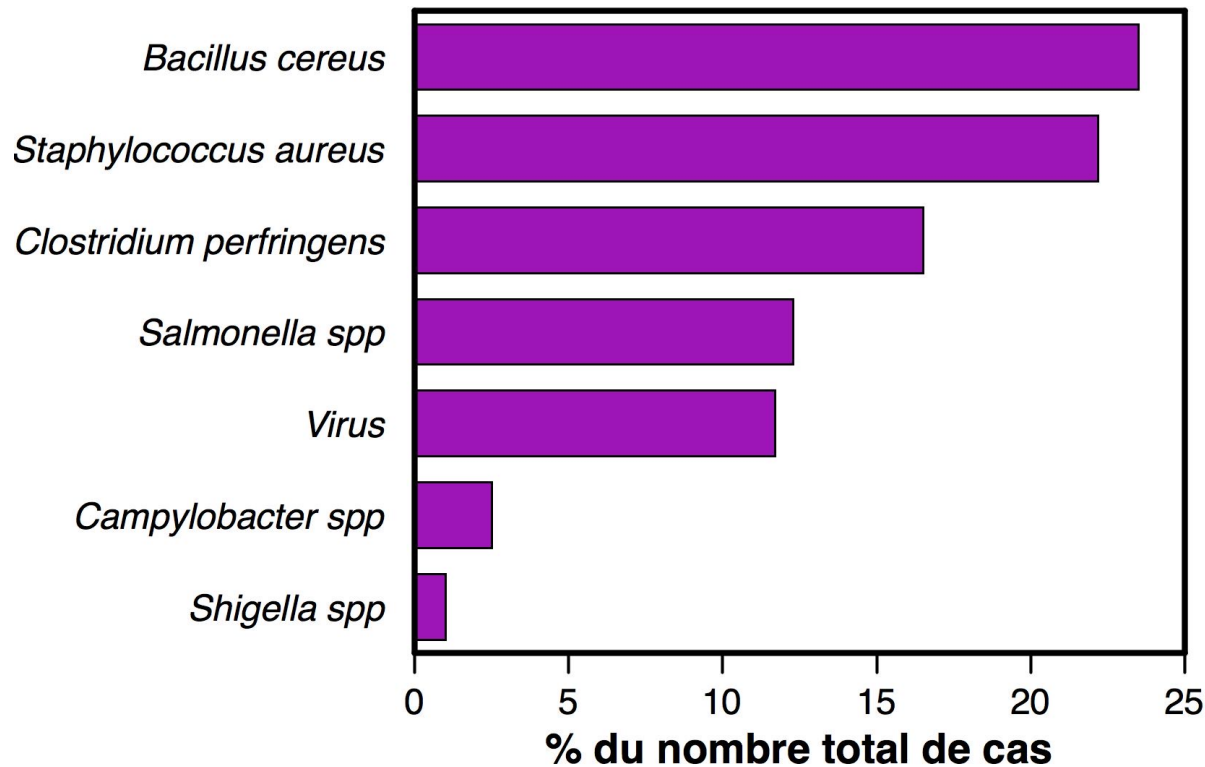


# Biofilms environnementaux ou *in vivo*

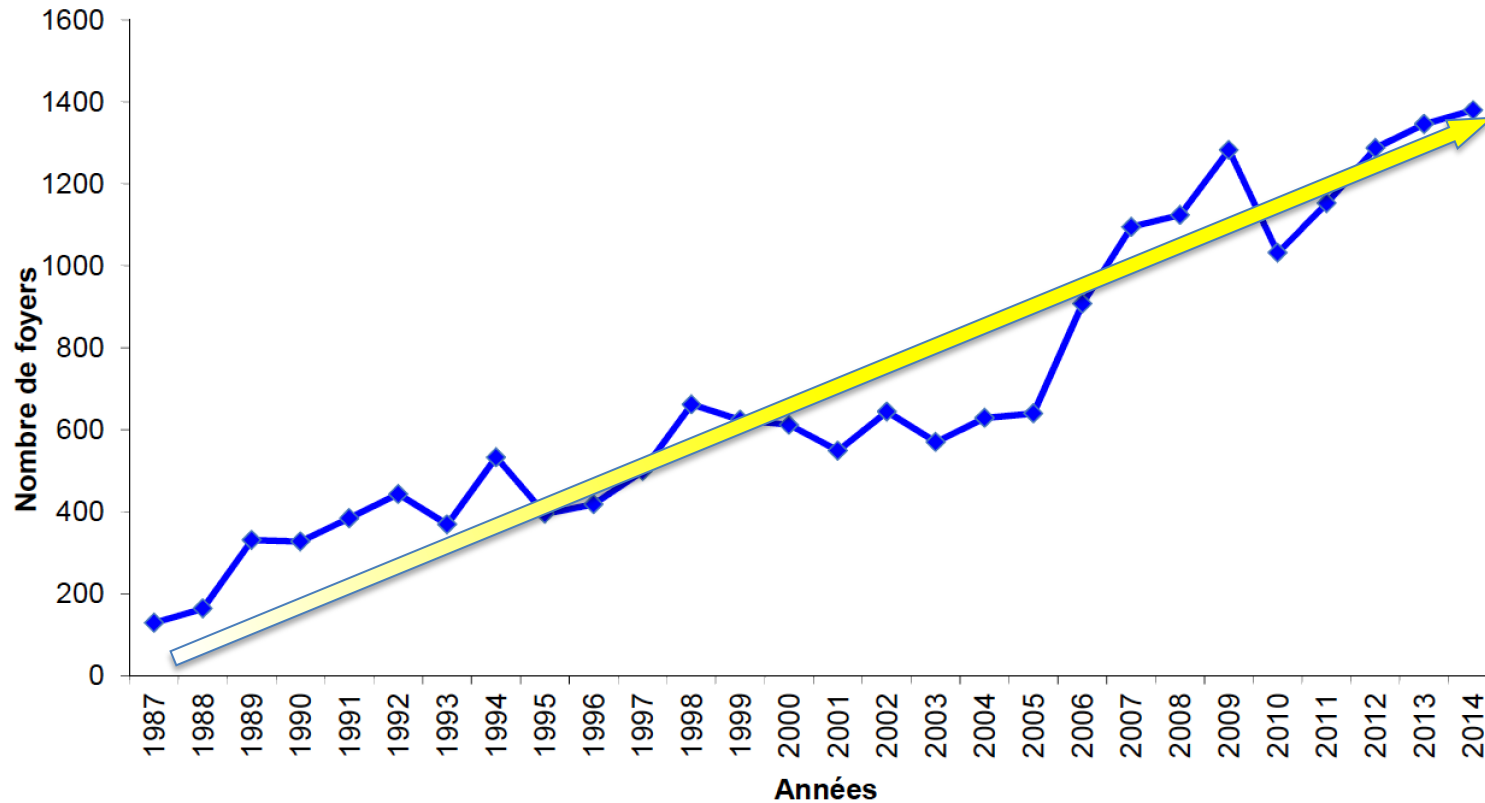
---

- ✿ Des bactéries pathogènes peuvent persister et se multiplier en biofilm dans l'environnement, dans les ateliers de production agro-alimentaires ou sur des dispositifs médicaux
- ✿ Elles peuvent aussi se fixer aux tissus de l'hôte, former des biofilms et être la source d'infections chroniques

# Bactéries impliquées dans des TIAC



# Evolution du nombre de TIAC en France



Nombre de foyers de TIAC déclarés en France aux ARS et/ou aux DD(CS)PP entre 1987 et 2014

# Source de la contamination

Facteurs ayant contribué à l'incident (foyers où au moins 1 facteur a été rapporté), toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France entre 2006 et 2008\*

	Restauration sociale (n=196)	Restauration commerciale (n=192)	Total restauration collective (n=388)	Restauration familiale (n=133)	Type non spécifié (n=87)	Total (n=608)
Matières premières contaminées	15 8%	11 6%	26 7%	38 2%	12 14%	76 13%
Contamination par l'environnement (matériel ou personnel)						
– Personnel	45 23%	51 27%	96 25%	13 10%	16 18%	125 21%
– Équipement	102 52%	136 71%	238 61%	40 30%	38 44%	316 52%
Erreur lors de la préparation	57 29%	79 41%	136 35%	37 28%	27 31%	200 33%
Délai entre préparation et consommation	51 26%	54 28%	105 27%	42 32%	23 26%	170 28%
Non respect des températures réglementaires**	80 41%	85 44%	165 43%	58 44%	36 41%	259 43%
– Chaîne du chaud	27 14%	27 14%	54 14%	15 11%	14 16%	83 14%
– Chaîne du froid	69 35%	73 38%	142 37%	49 37%	29 33%	220 36%

\*Plusieurs facteurs possibles pour une Tiac.

\*\*Un non respect de la chaîne du chaud ET de la chaîne du froid étant possibles dans un même foyer de Tiac.

Delmas *et al.*, 2010, *BEH* 31-32:344–348

Dans 61% des cas d'intoxication en restauration collective, la source de la contamination est l'équipement de production → **biofilms**

# Souches responsables de la contamination

---

- ✿ Les équipements de production sont contaminés de façon récurrente
- ✿ Les souches responsables de cette contamination ont-elles été sélectionnées pour leur capacité à former des biofilms dans cet environnement ?

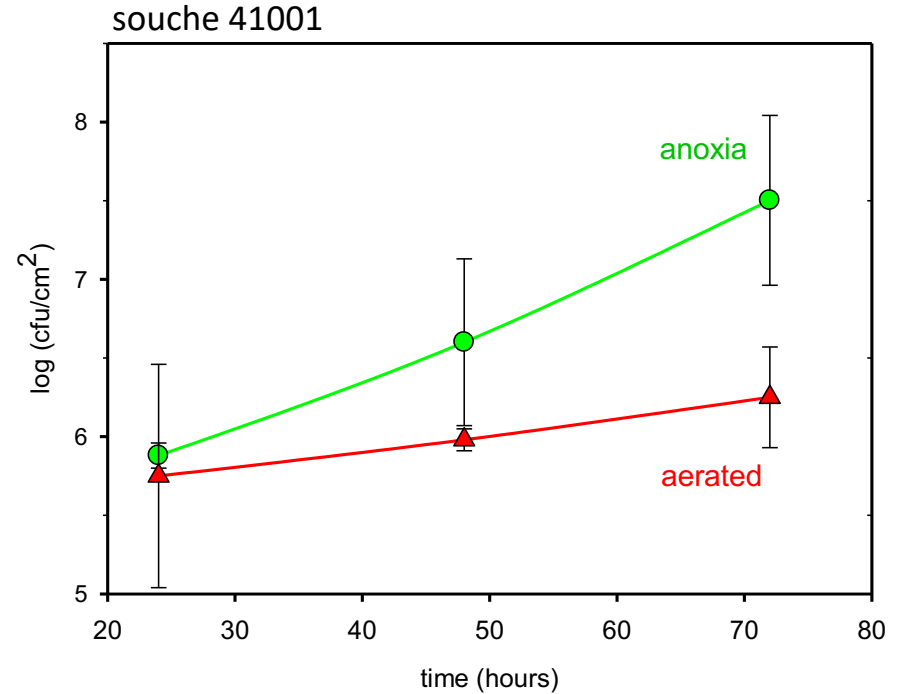
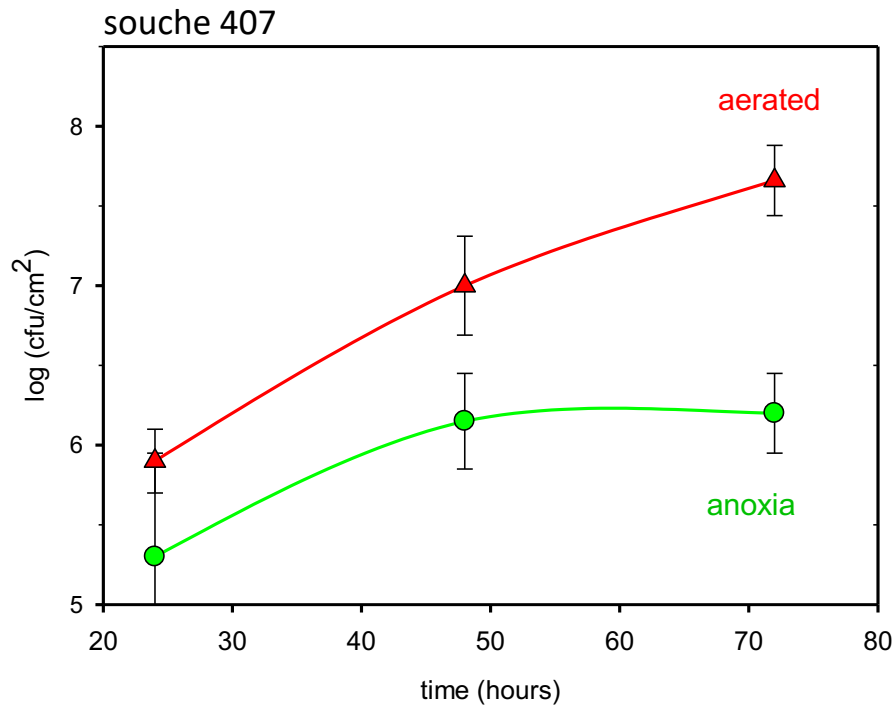
# Cas de *B. cereus*

Comparaison de souches récoltées en milieu industriel et de souches récoltées dans l'environnement

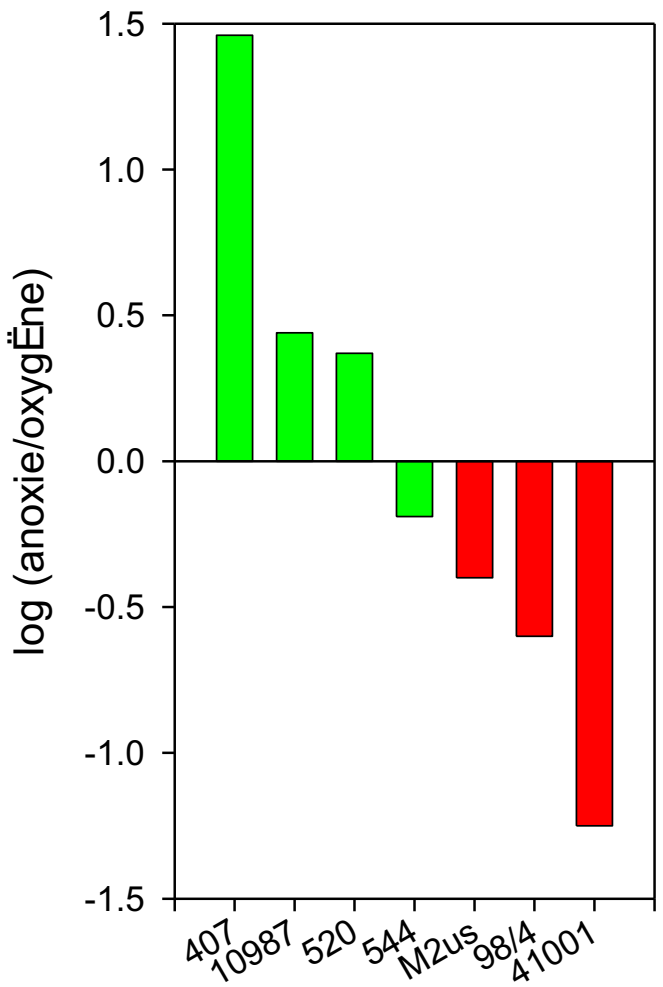
<i>Bacillus cereus</i> 407 :	insecte, Brésil
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987:	fromage, Norvège
<i>Bacillus cereus</i> 520:	sol, France
<i>Bacillus cereus</i> 544:	sol, Chine
<i>Bacillus cereus</i> <b>41001</b> :	manchon en acier
<i>Bacillus cereus</i> <b>98/4</b> :	manchon en acier
<i>Bacillus cereus</i> <b>M2us</b> :	manchon en acier



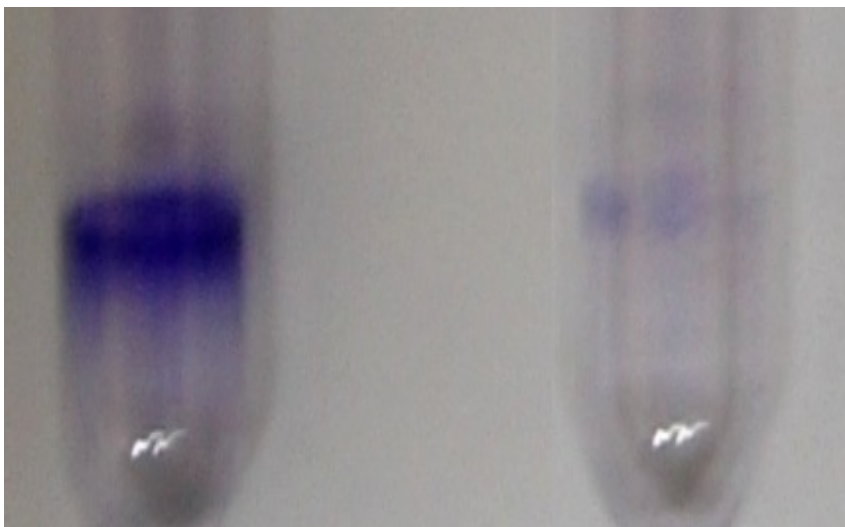
# Biofilms en présence/absence d'oxygène



# Les souches industrielles forment mieux des biofilms en anoxie partielle



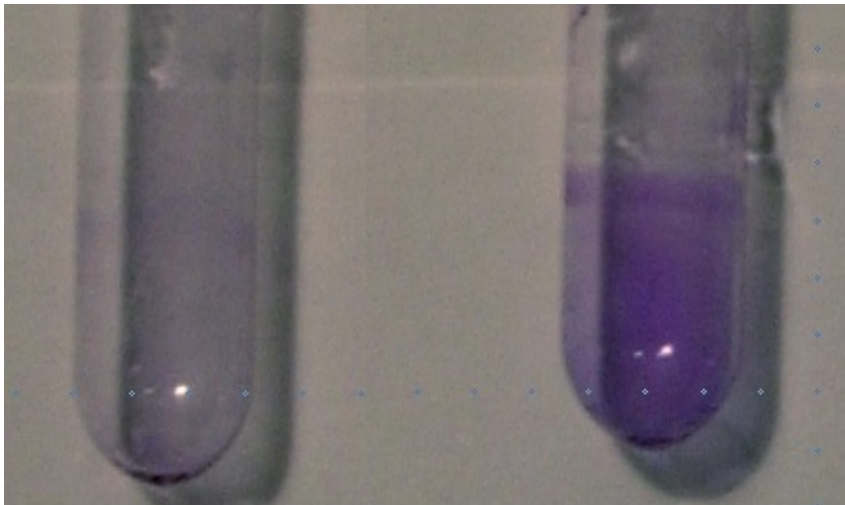
LB 48h



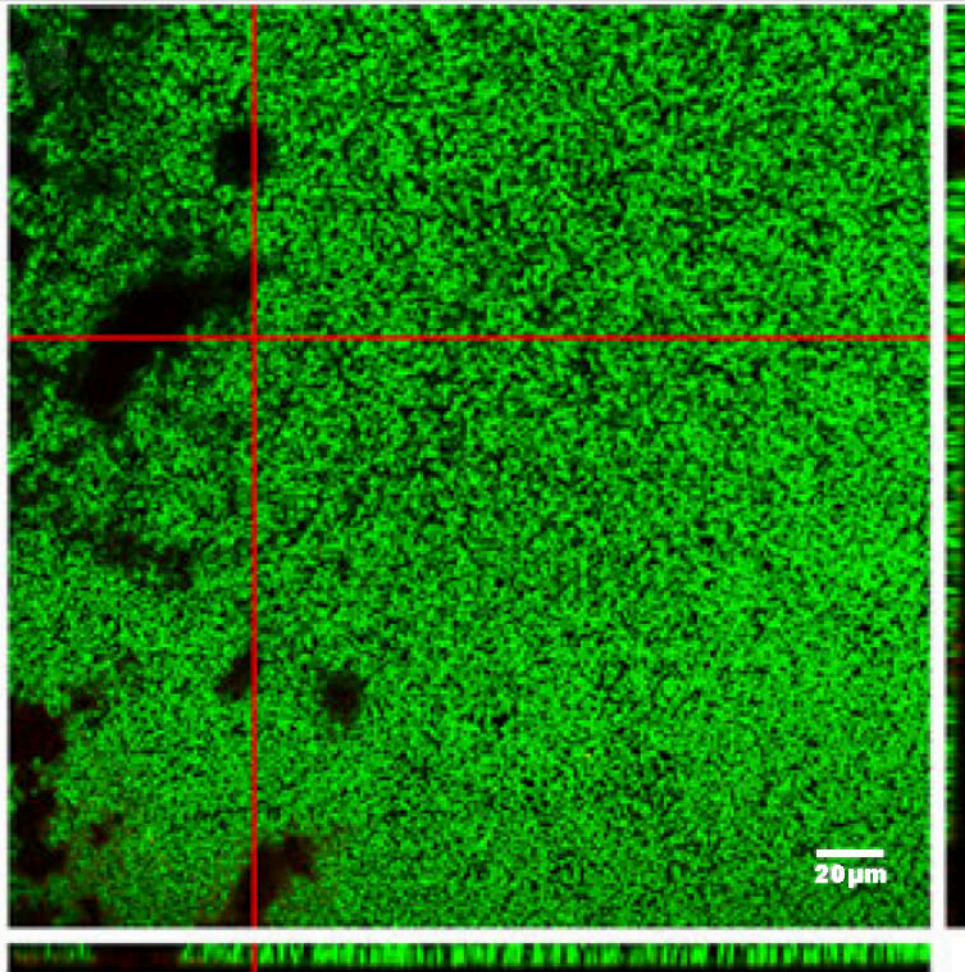
407

41001

EPS 48h



# Biofilm formés par *Listeria monocytogenes*



Flow-cells, 72h,  
37°C, BHI

da Silva & de Martinis, 2013, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:957–968

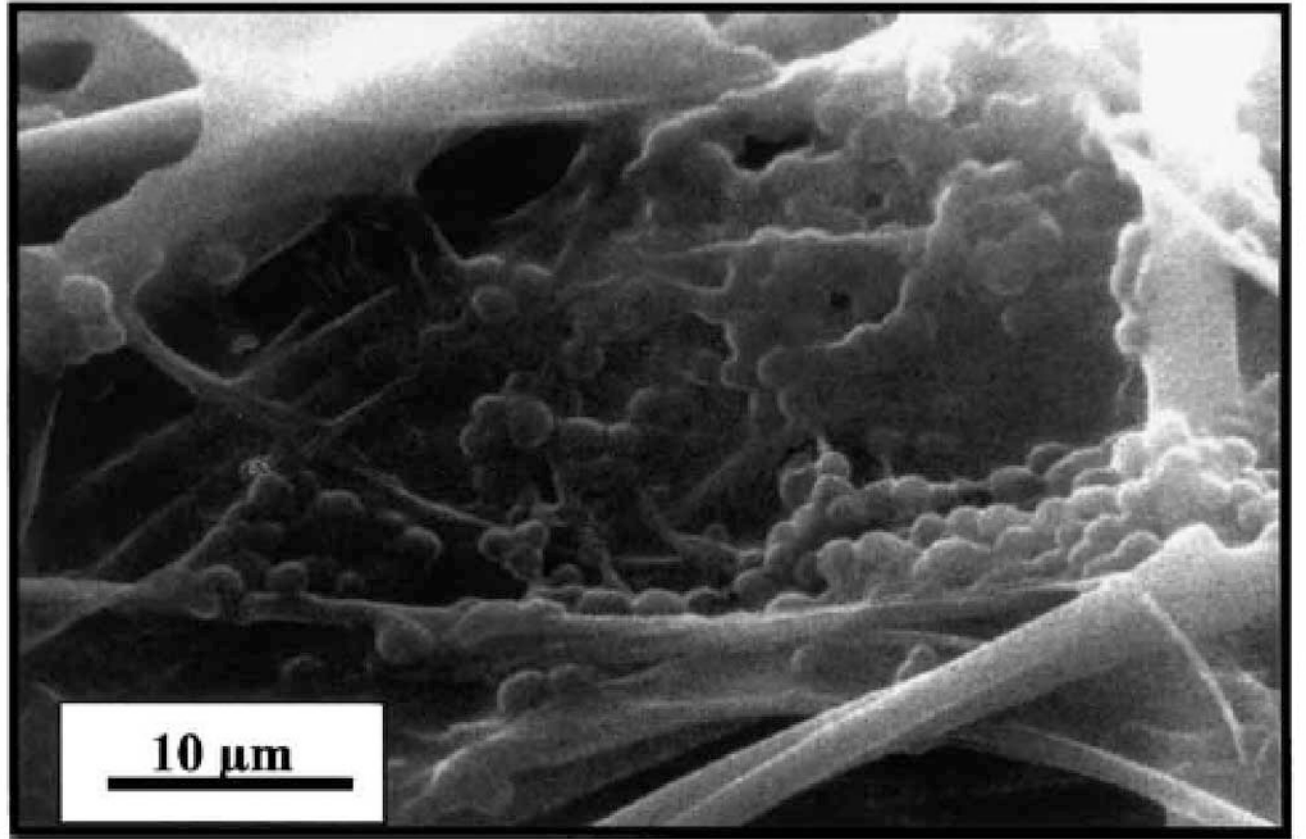
# Biofilm formés par *Listeria monocytogenes*

---

*L. monocytogenes* ne forme pas de biofilm épais (de l'ordre de  $10^9$ – $10^{12}$  cfu/cm<sup>2</sup>, comme d'autres bactéries formatrices de biofilms), mais il adhère aux surfaces avec des populations atteignant  $10^4$ – $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup> (Gram et al. 2007).

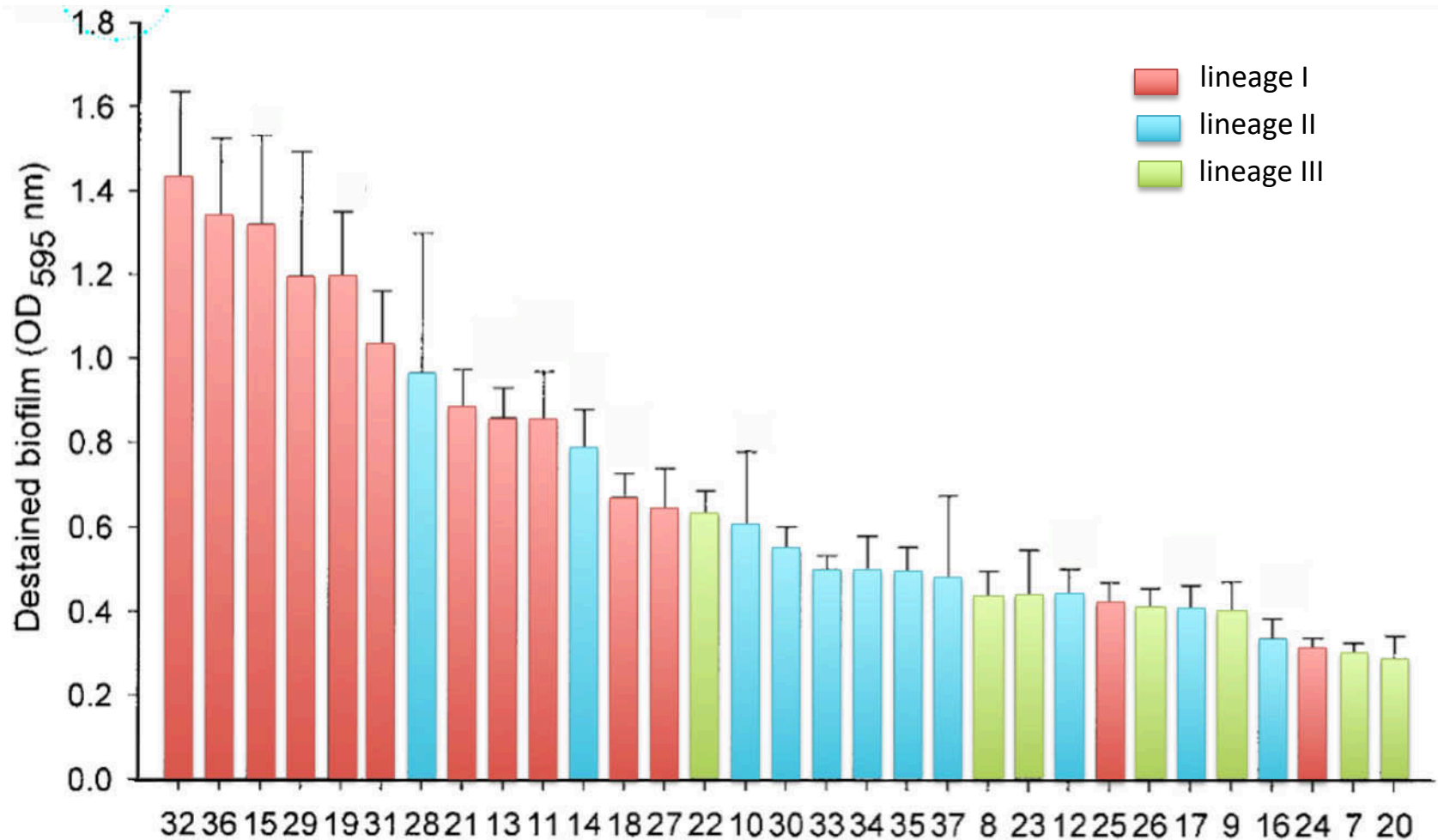
# Biofilm formés par *Listeria monocytogenes*

7j après  
inoculation



Trémoulet et al., 2002, , 2013, *FEMS Microbiol Lett*, 210:25–31

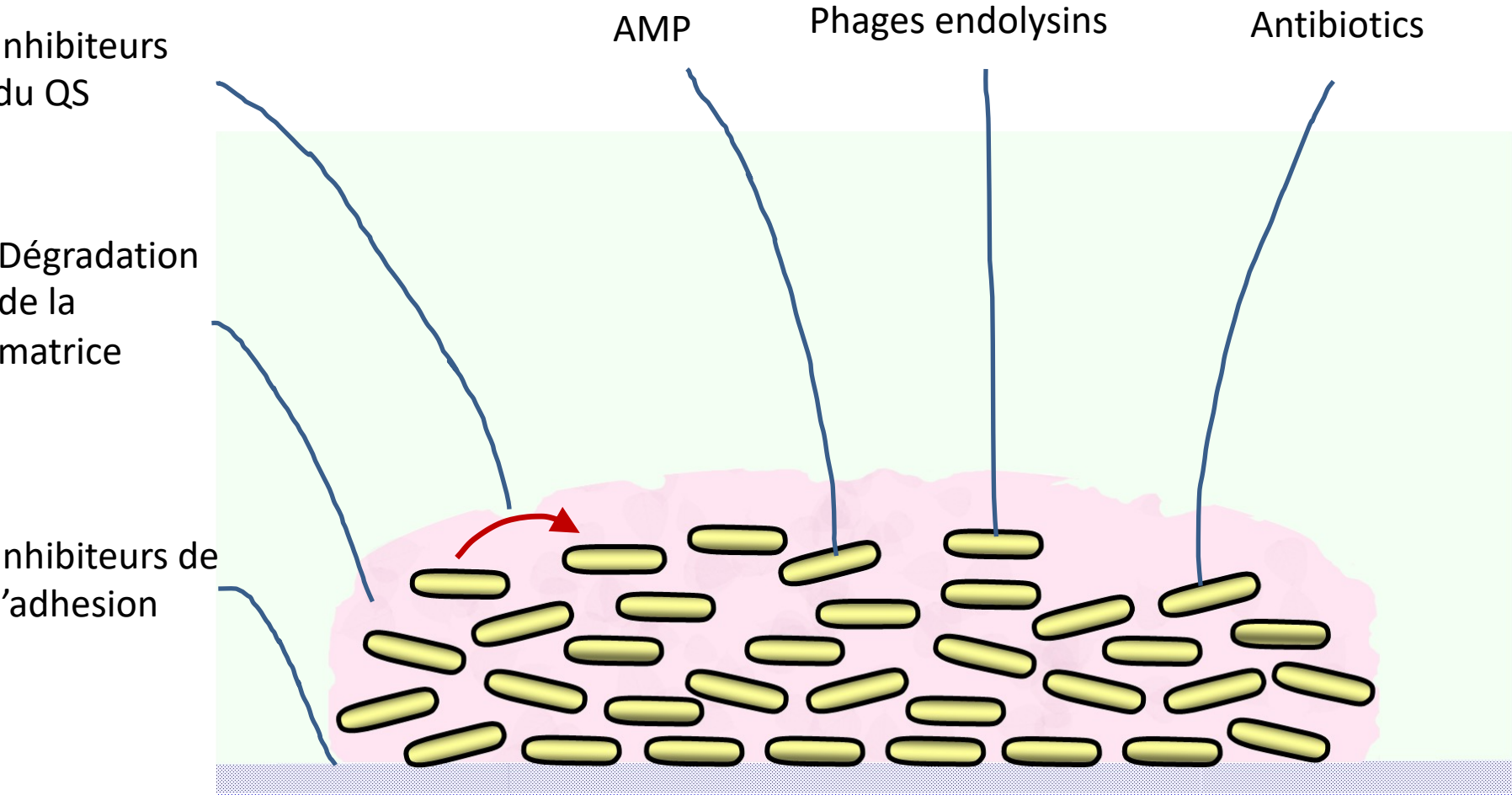
# Comparaisons de souches



Djordjevic et al., 2002, *Appl Environ Microbiol*, 68:2950–2958

lignée 1 : responsable de listériose  
et présente dans l'alimentation

# Stratégies de lutte contre les biofilms – surfaces inertes



# VI – Biofilms *in vivo*

crédit photo : Houry, Meylheuc, Gohar



# Biofilms chez l'homme

---

## Biofilm in the Human Body

The National Institutes of Health estimates that more than 80% of microbial infections in the human body are caused by biofilm, many of them creating chronic and reoccurring problems. Infections from biofilm are extremely difficult to treat. An important attribute of a biofilm is its ability to harbor and protect the organisms within it making them resistant to most antibiotics. The following illustration demonstrates just a few of the many ways biofilm may have an effect on our bodies.

<https://www.educationaldimensions.com/eLearn/biofilm/body.php>

# Biofilms chez l'homme

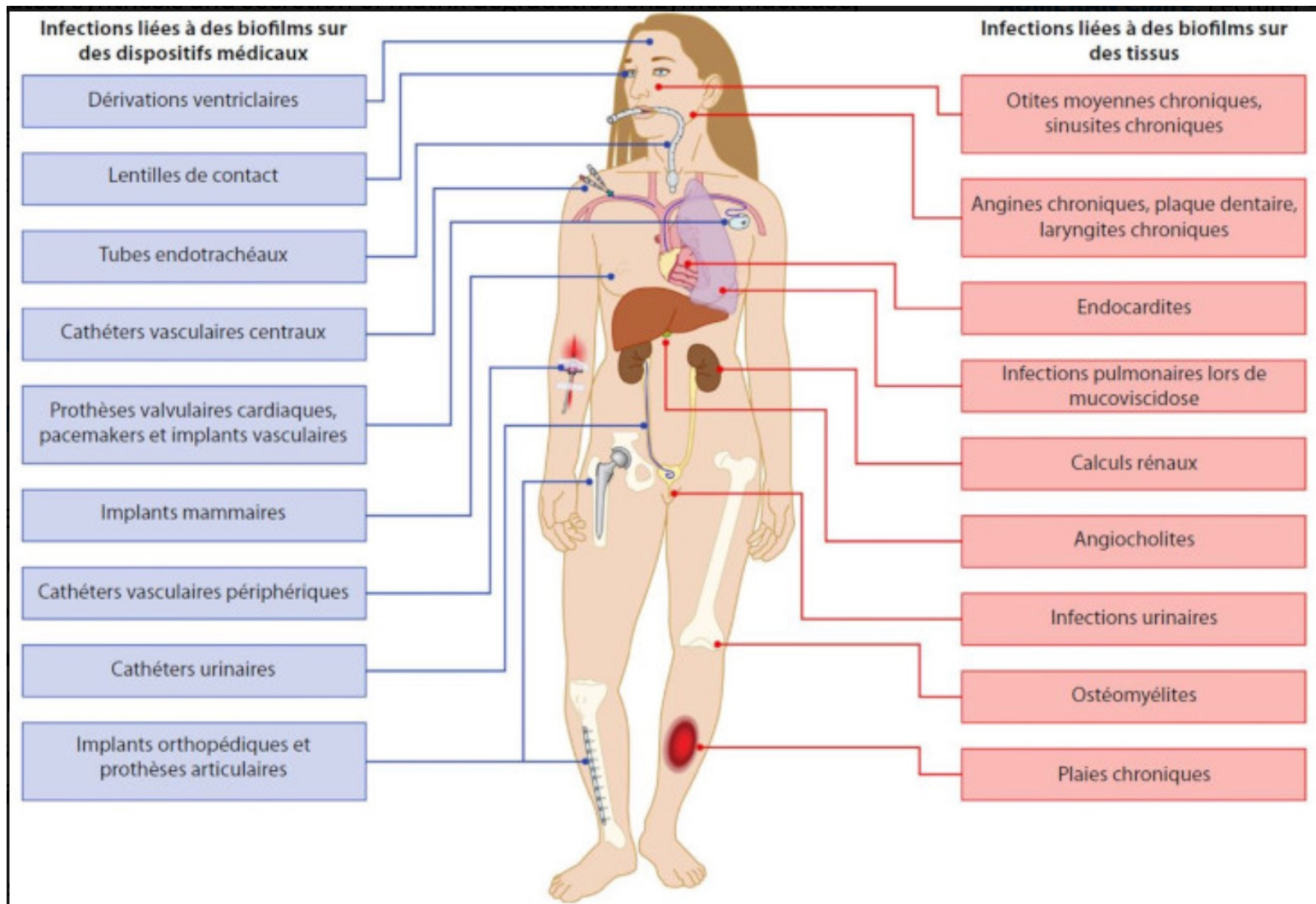


Figure 6. The formation of biofilms on medical devices or in body tissues is associated with infectious forms...

# Plaque dentaire



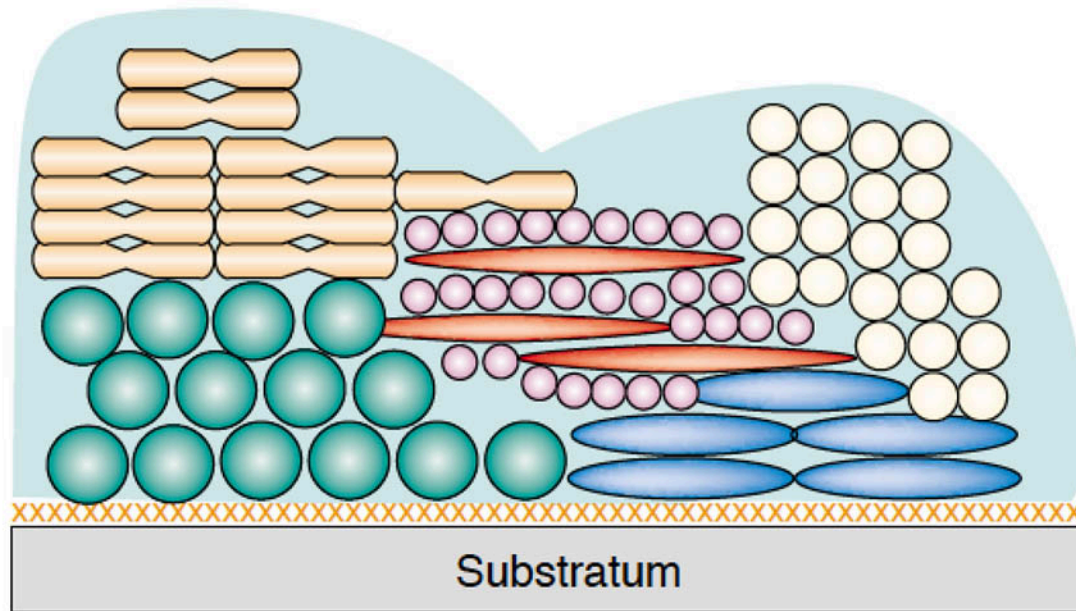
<http://www.straumann.fr>

# Parodontite



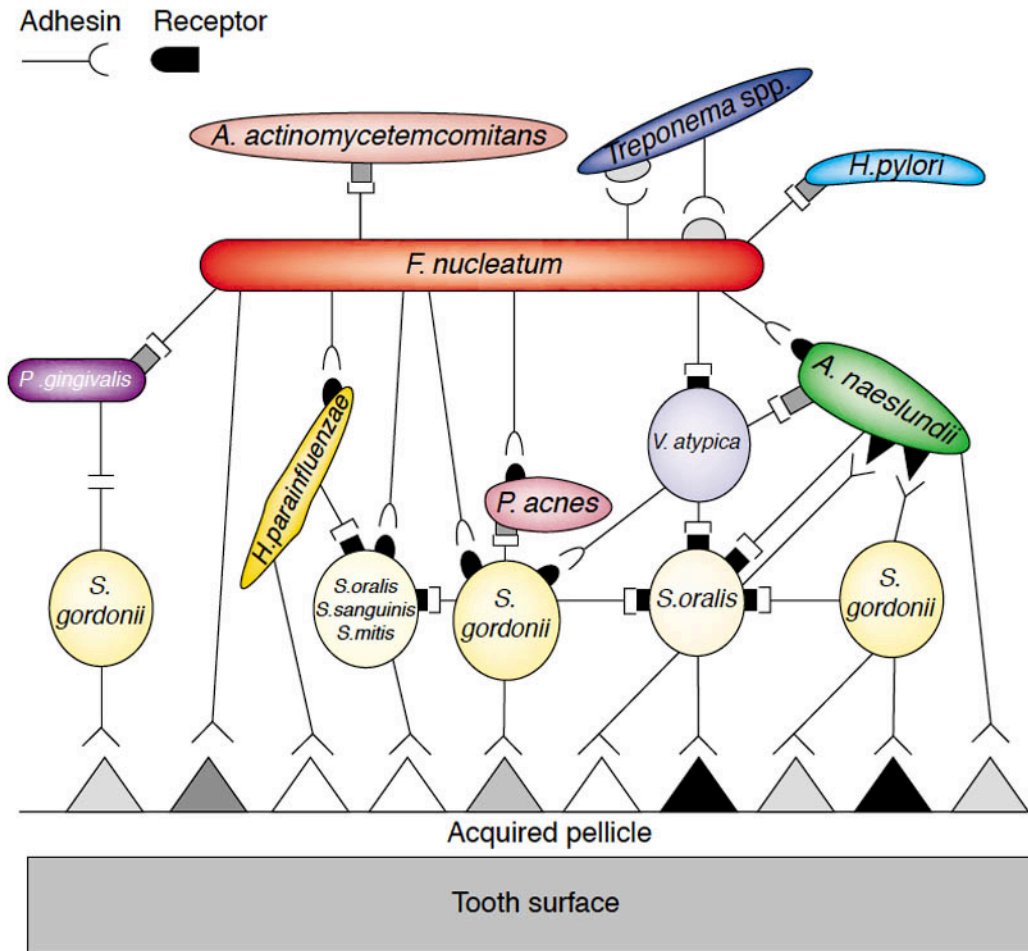
# Biofilm multi-espèce

Mature multi-species biofilm



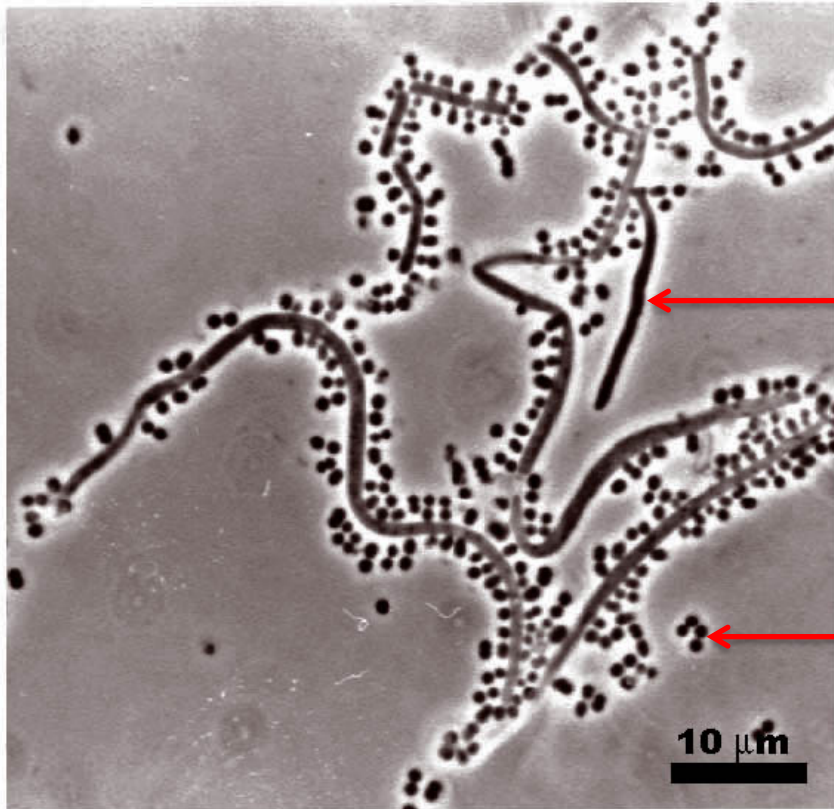
Rickard et al., 2003, *Trends Microbiol.* 11:94-100

# La plaque dentaire : un biofilm multi-espèce



Rickard et al., 2003, *Trends Microbiol.* 11:94-100

# Exemple de coaggrégation



*Corynebacterium matruchotii*

*Streptococcus cristatus* CR311

Rickard et al., 2003, *Trends Microbiol.* 11:94-100

# *Vibrio cholerae*

*V. cholerae* est responsable des épidémies de cholera et est un exemple du lien entre les biofilms bactériens, la transmission environnementale et la pathogénèse.

Les souches pathogènes de *V. cholerae* sont présentes dans diverses niches écologiques où elles forment des biofilms sur des surfaces biotiques. Comme la concentration de *V. cholerae* requise pour induire les symptômes du cholera est estimée à environ  $10^4$ – $10^6$  cellules, l'accumulation sur des surfaces biotiques de bactéries en biofilm, qui peut atteindre des concentrations de cet ordre, augmente le risque d'infection

*V. cholerae* peut former des biofilms sur des organismes marins comme les poissons ou les copépodes.

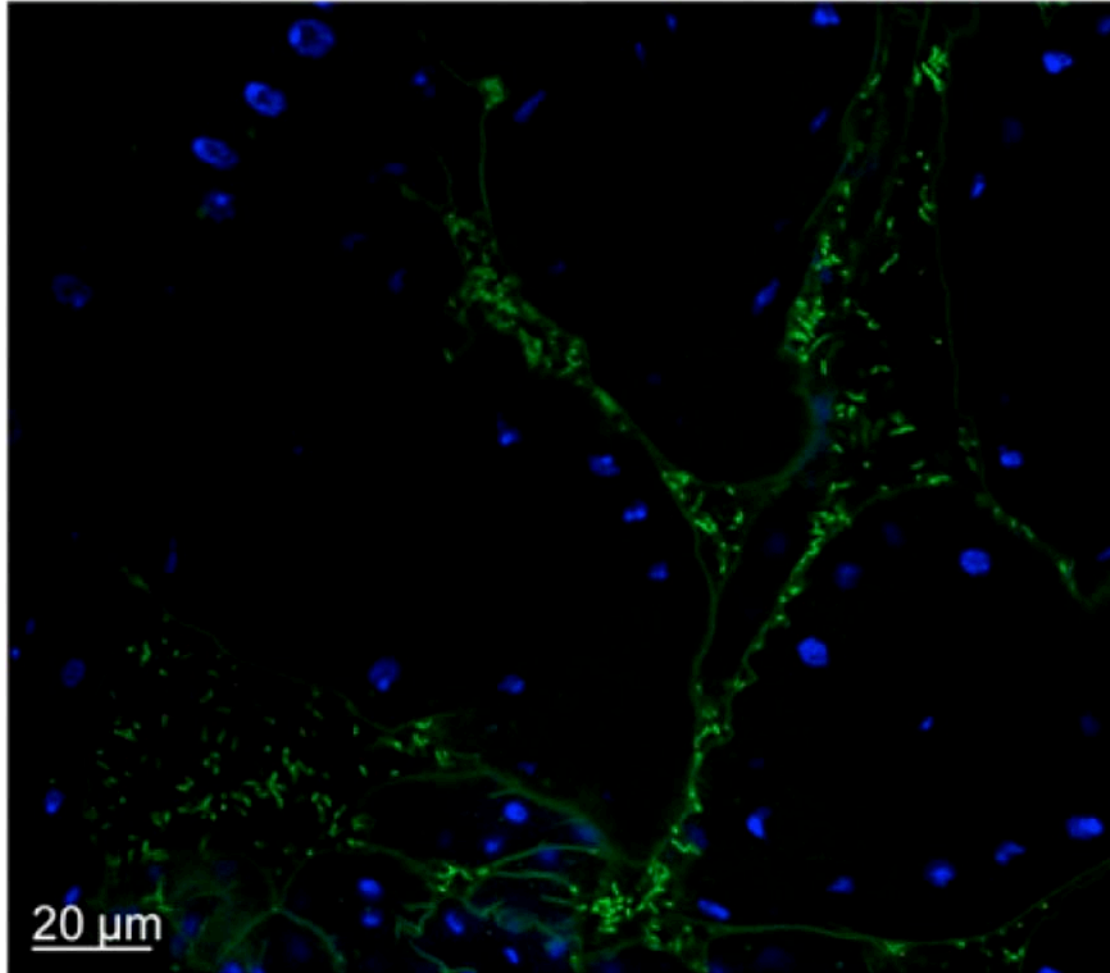


# Biofilm de *Vibrio cholerae* chez *D. melanogaster*

$\Delta$ -*vpsA*

en vert, *V. cholerae*

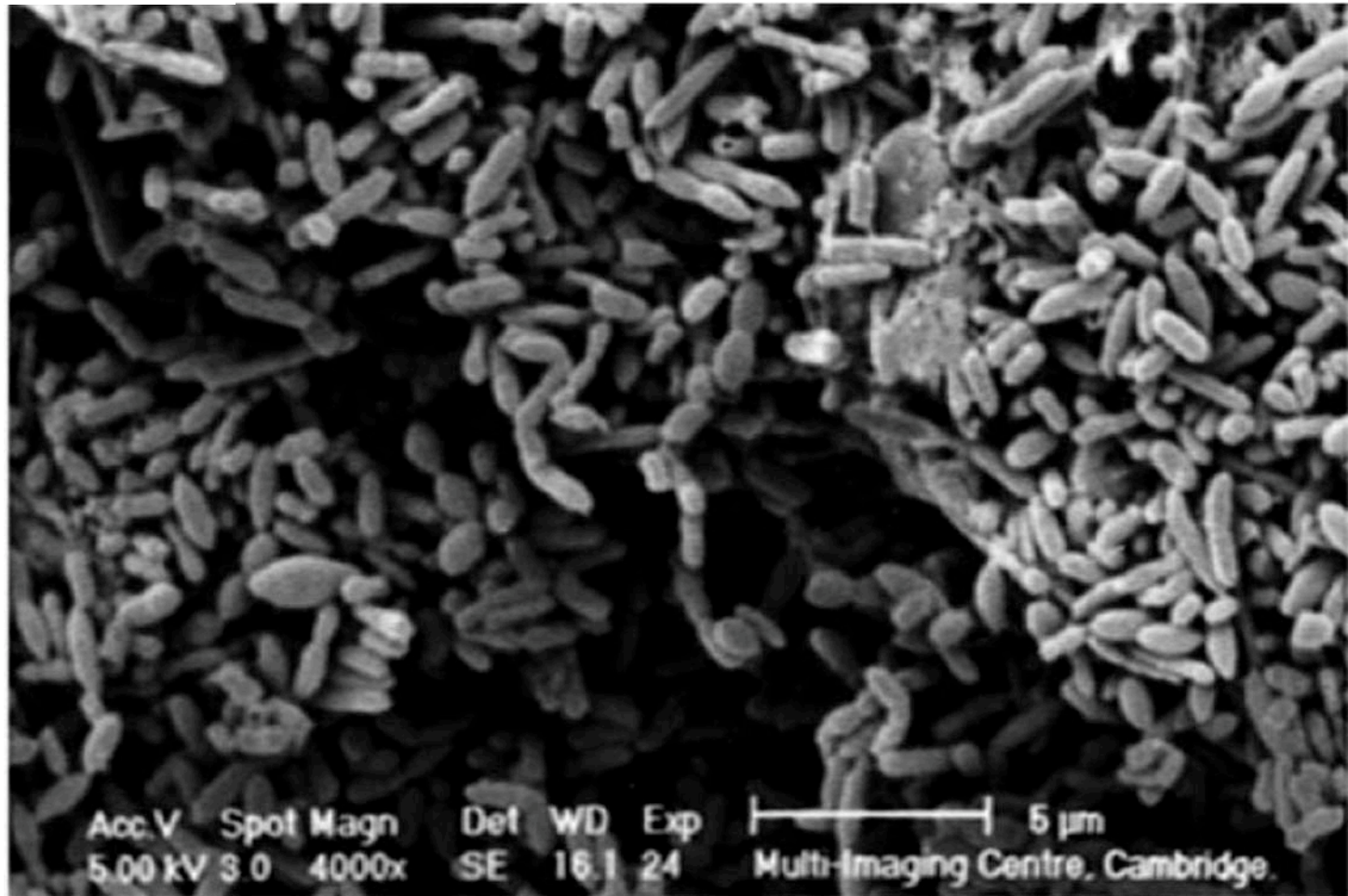
en bleu, noyaux de cellules épithéliales



Purdy & Watnick, 2011, *PNAS*, 108:19737-19742

# Formation de biofilm sur du mucus

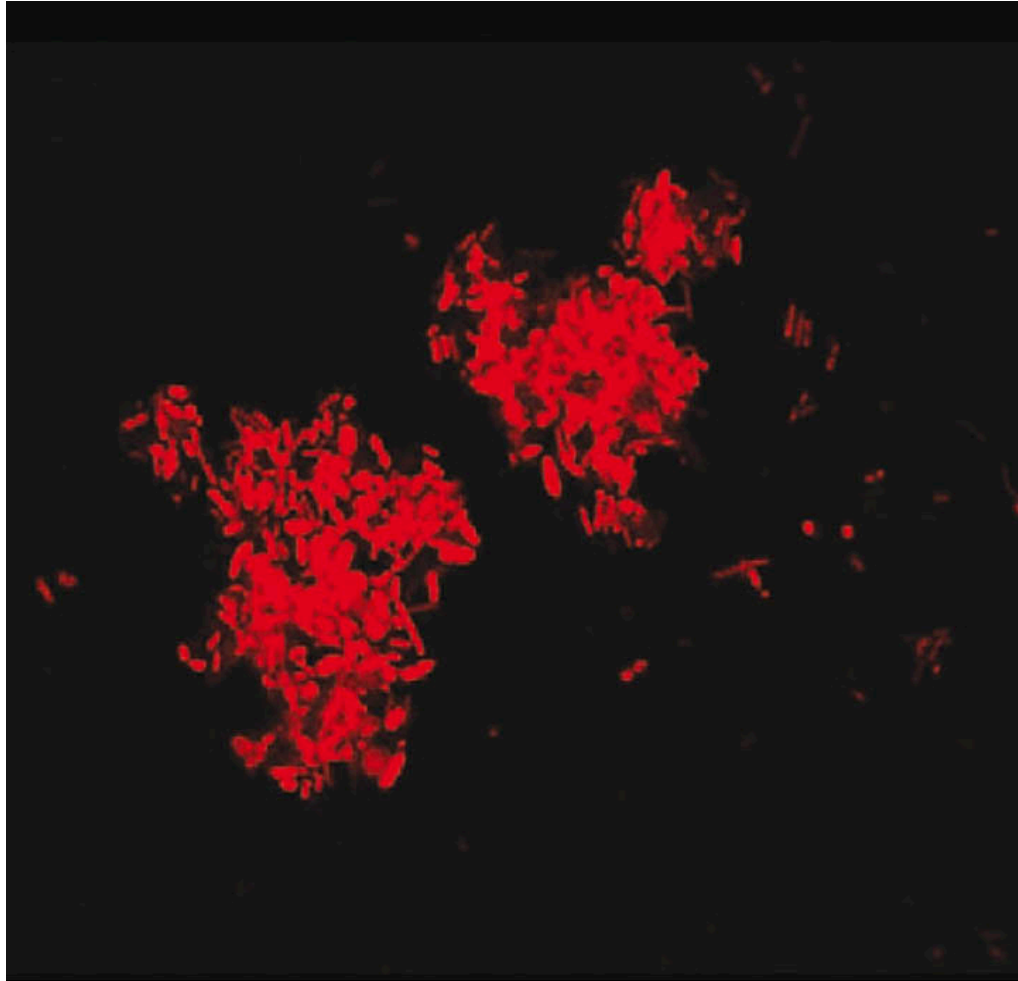
24 h



Macfarlane et al., 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7483-7492

# Formation de biofilm sur du mucus

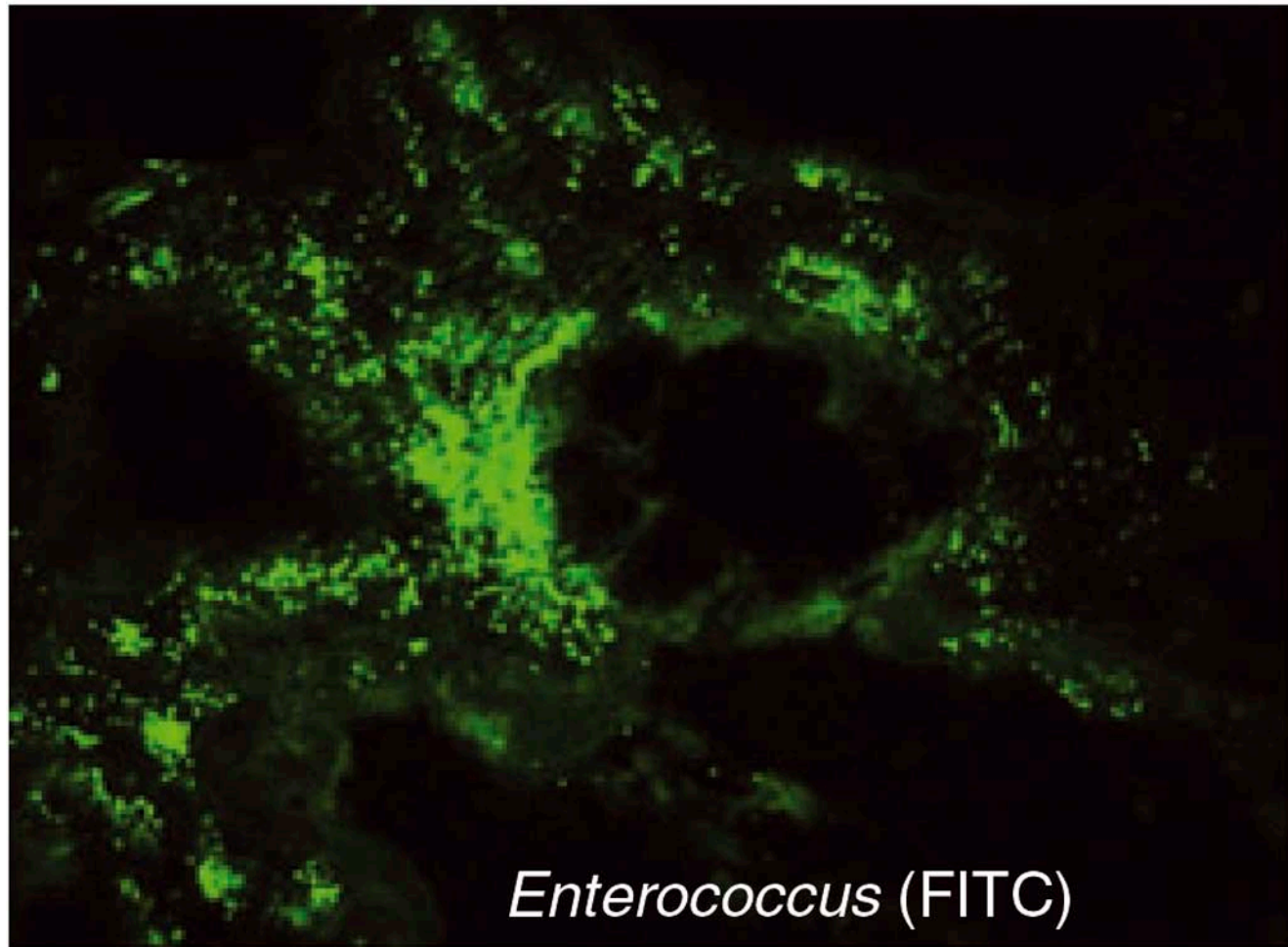
rouge : bacteroides



Macfarlane et al., 2004, *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7483-7492

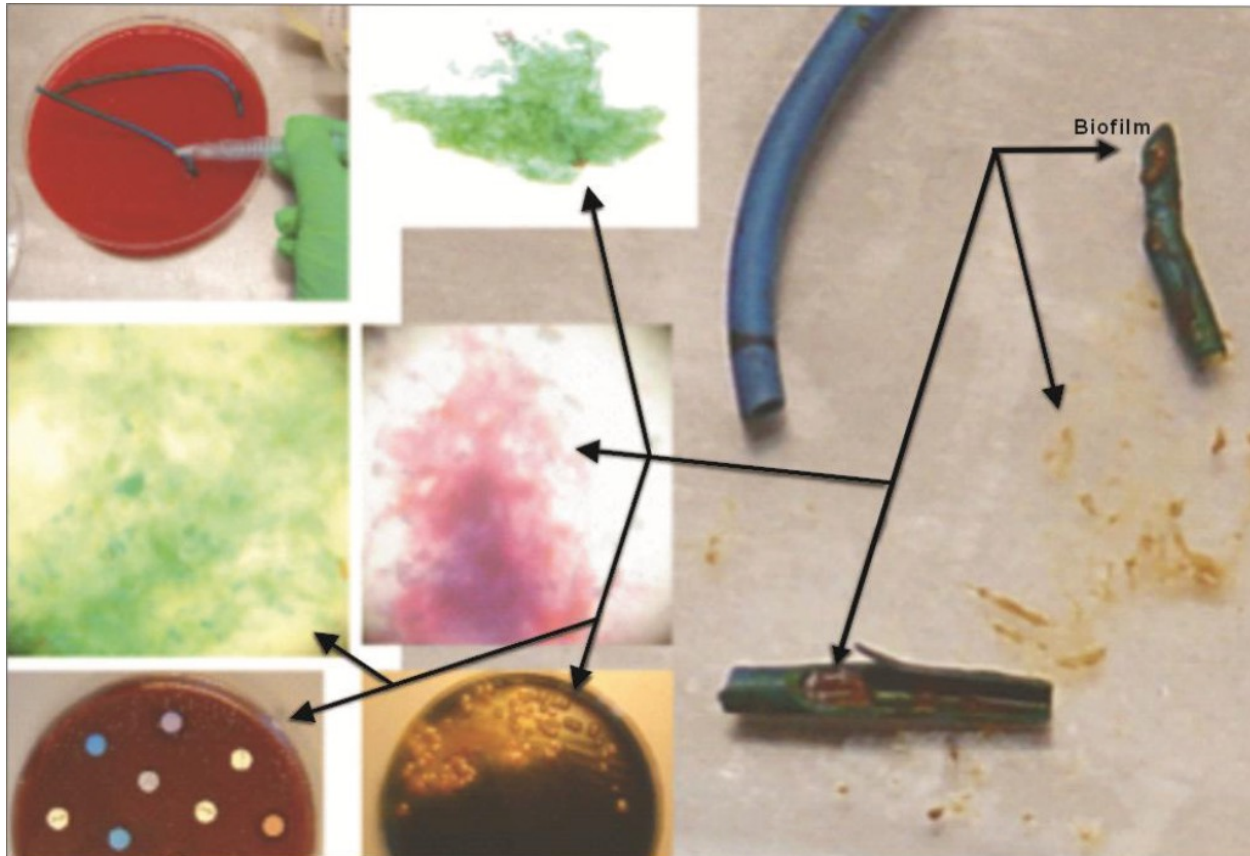
# Formation de biofilms intestinaux

Biofilm sur la muqueuse du colon d'un patient atteint de colite ulcéreuse



Macfarlane et Dillon., 2007, *J. Appl. Microbiol.* 102:1187-1196

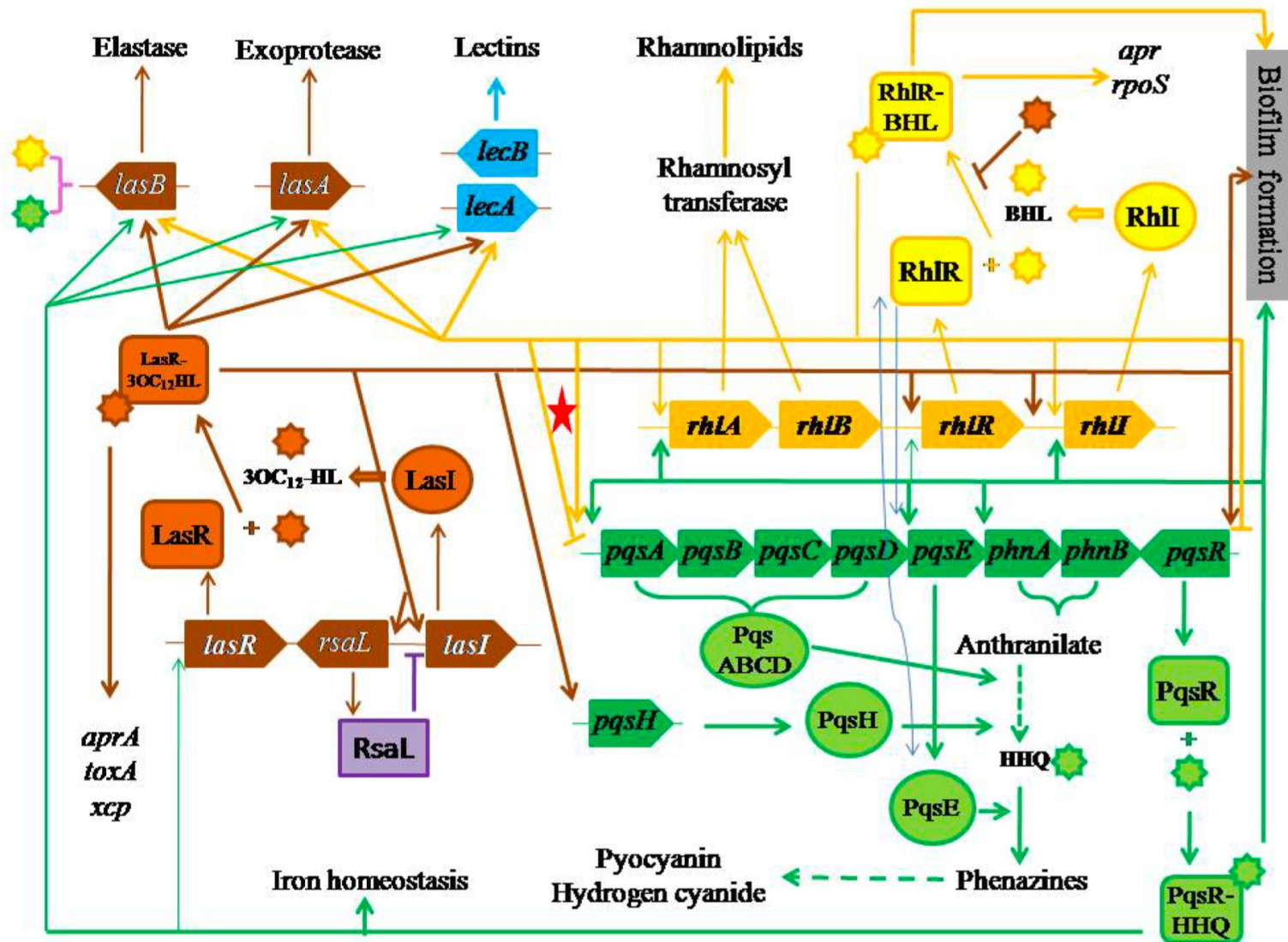
# Formation de biofilm sur un stent biliaire



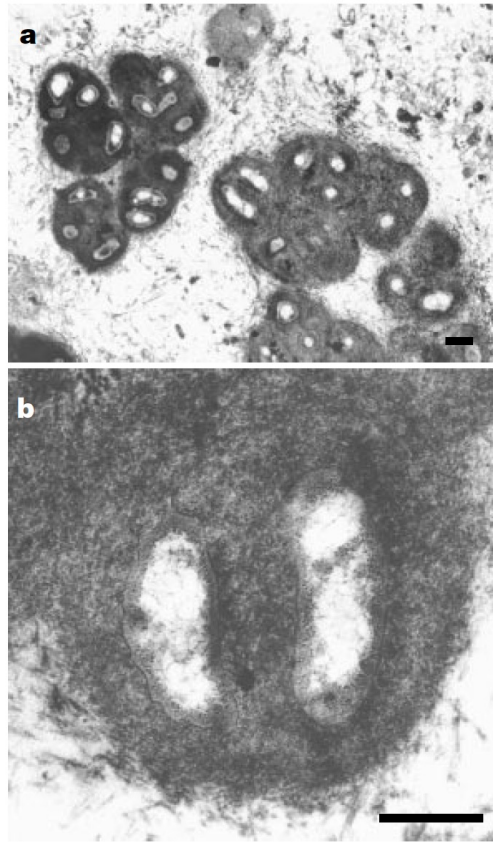
Hoiby et al., 2010, *Int. J. Oral Sci.* 55-65

le même type clonal d'*E. coli* est présent dans le sang et dans le biofilm; septicémie, issue fatale.

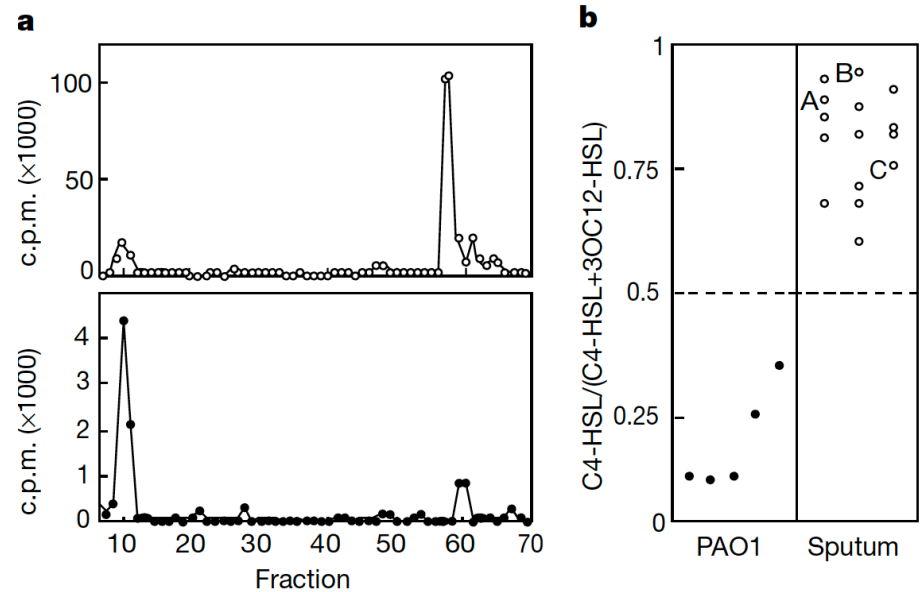
# Quorum sensing et biofilm chez *P. aeruginosa*



# Quorum sensing et biofilm chez *P. aeruginosa*



**Figure 1** Transmission electron microscope images of *P. aeruginosa* in sputum. **a**, Low magnification; **b**, high magnification. *P. aeruginosa* are organized in clusters encased in a densely staining matrix. Scale bars, 1  $\mu$ m.

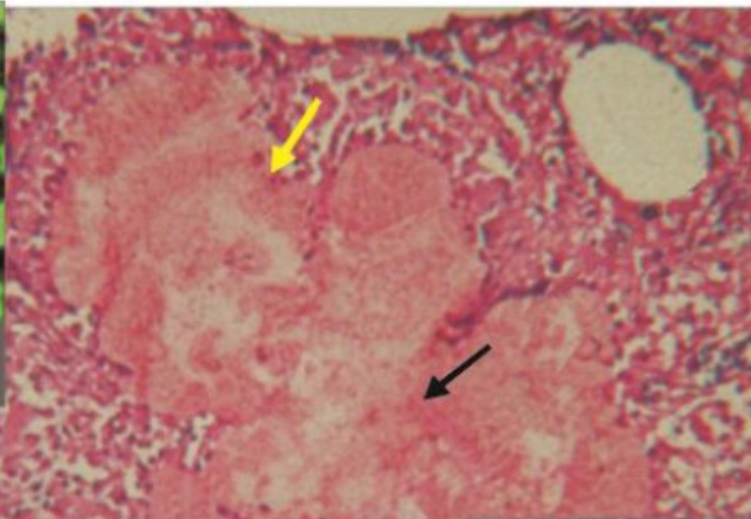
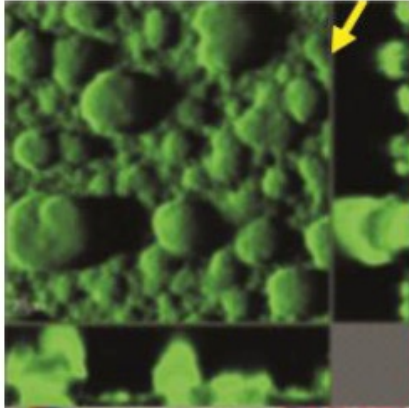


**Figure 2** Acyl-HSL profiles of *P. aeruginosa* broth cultures and CF sputum samples. Examples of *P. aeruginosa* (top) and sputum (bottom) HPLC profiles. C4-HSL elutes in fractions 10–11; 30C12-HSL elutes in fractions 57–61. The analysis of *P. aeruginosa* PAO1 was with a mid-logarithmic phase culture. **b**, C4-HSL as a fraction of the total HSL plus 30C12-HSL. From left to right, *P. aeruginosa* in early logarithmic ( $A_{600} = 5$ ), mid-logarithmic ( $A_{600} = 1$ ), late logarithmic ( $A_{600} = 2$ ), stationary ( $A_{600} = 4$ ) and late stationary phase ( $A_{600} = 6$ ). Sputum samples were analysed as described in Methods. Three samples have been lettered because the predominant *P. aeruginosa* isolates from these samples have been subjected to a more extensive analysis.

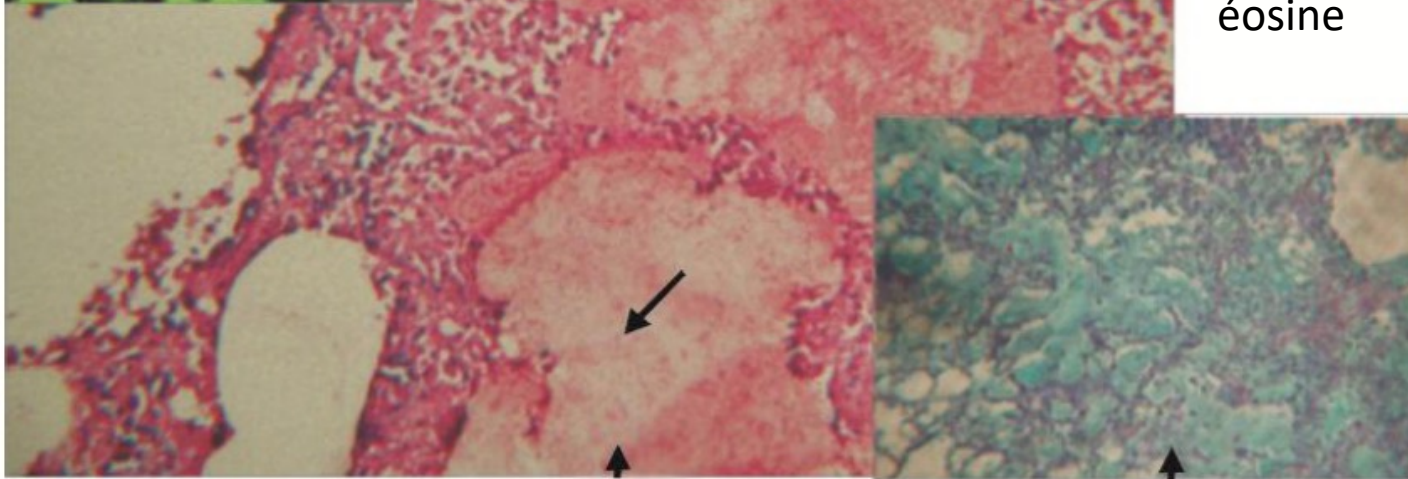
Singh et al., 2000, Nature 407:762-764

# Formation de biofilm in vivo par *P. aeruginosa*

flow-cell,  
CLSM,  
GFP



patient CF  
atteint  
d'infection  
chronique;  
coloration à  
l'hématoxyline-  
éosine



Hoiby et al., 2011, *Int. J. Oral Sci.* 3:55-65

*in vivo*, souris CF;  
coloration au bleu Alcyan



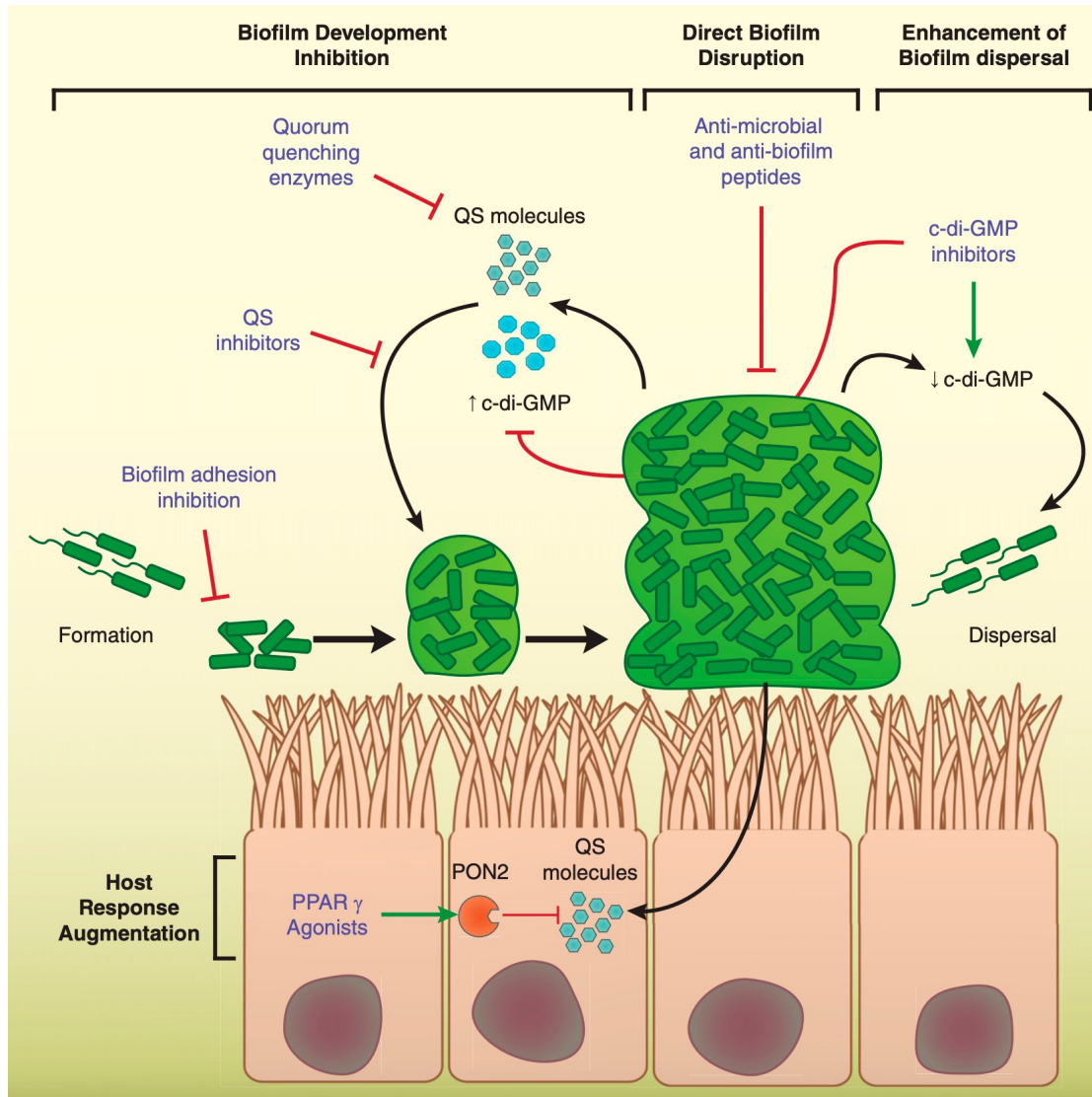
# Souches mucoides/non mucoides de *P. aeruginosa*

propriétés de souches de *P. aeruginosa* isolées des voies respiratoires de patients atteints mucoviscidose

Propriétés	phénotype mucoïde	phénotype non mucoïde
Localisation	zones respiratoire et conductrice du mucus	zone conductrice du mucus
Biofilm in vitro	oui	oui
Biofilm in vivo	oui	non
résistance conventionnelle aux antibiotique	rare	fréquente
résistance due au biofilm	oui	non
dommage au tissu pulmonaire	oui	non
réponse immunitaire importante	oui	non

Hoiby et al., 2010, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35:322-332

# Stratégies de lutte contre les biofilms – in vivo



# VII – Cas d'étude : CalY

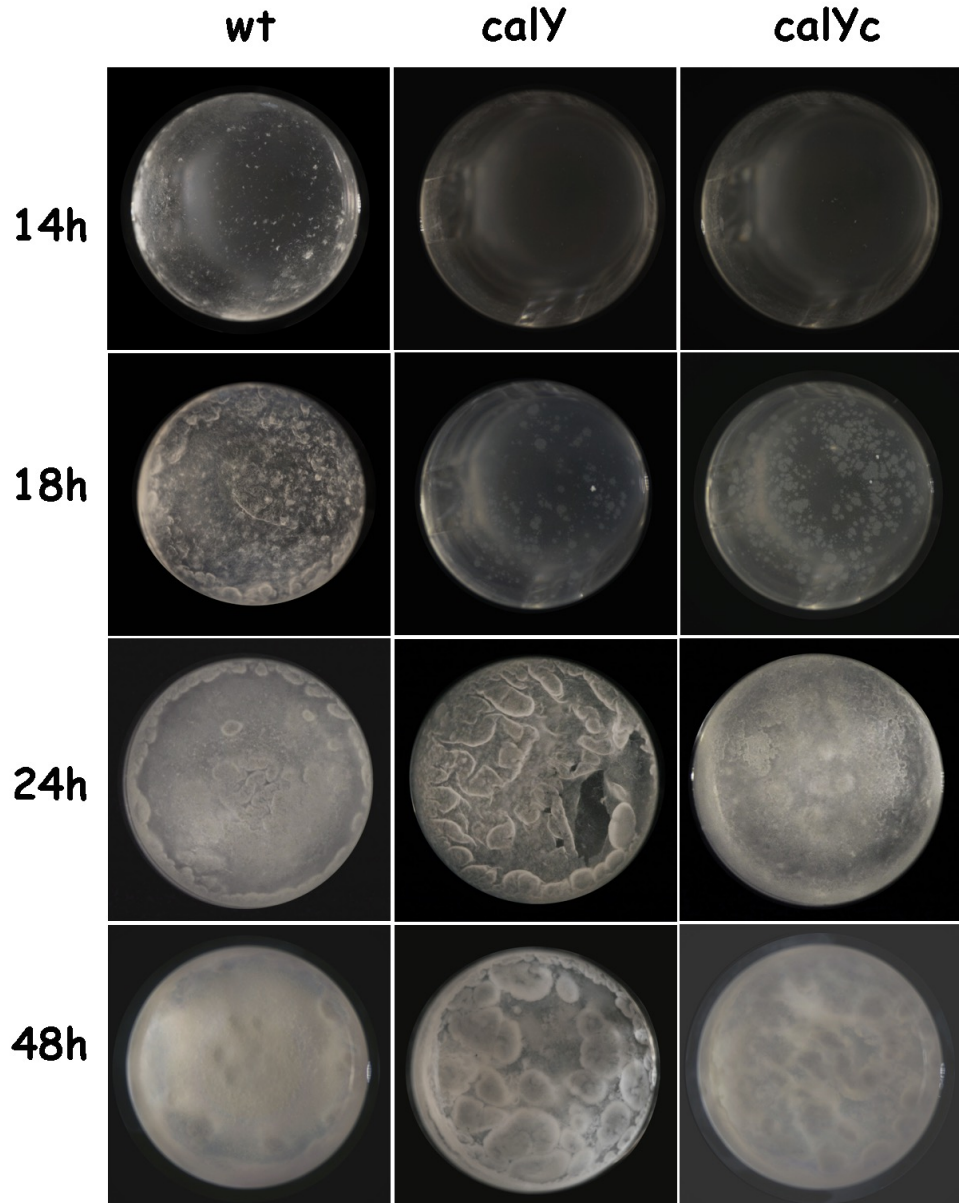
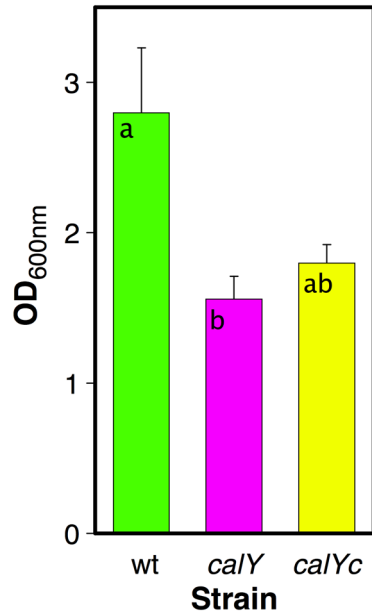
# Camelysine

Comparaison avec *B. subtilis*



# Camelysine

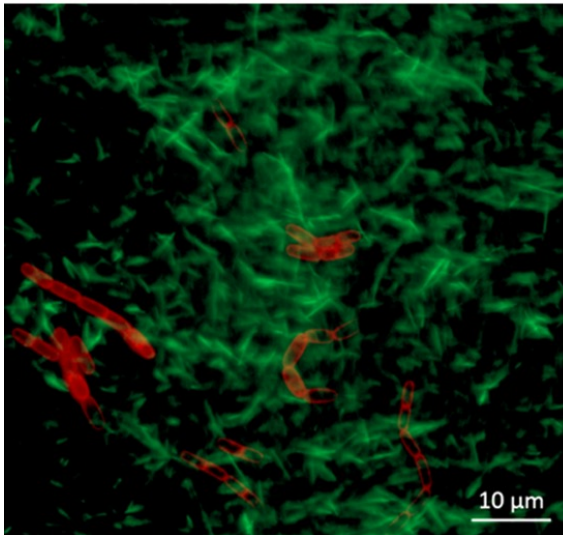
effet de la délétion de *calY*  
sur la formation des biofilms



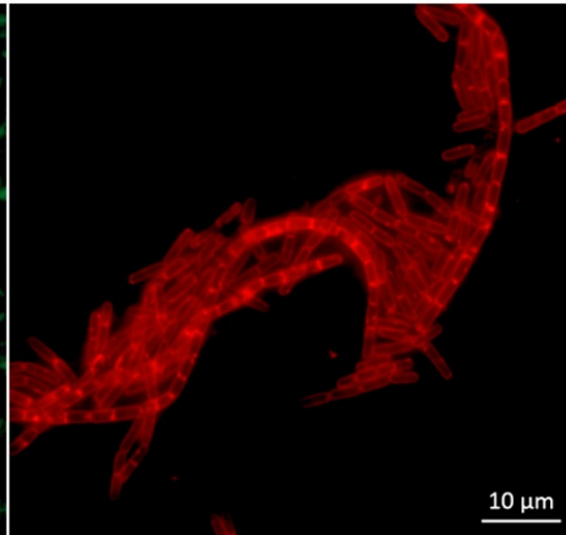
# Camelysine

En biofilm

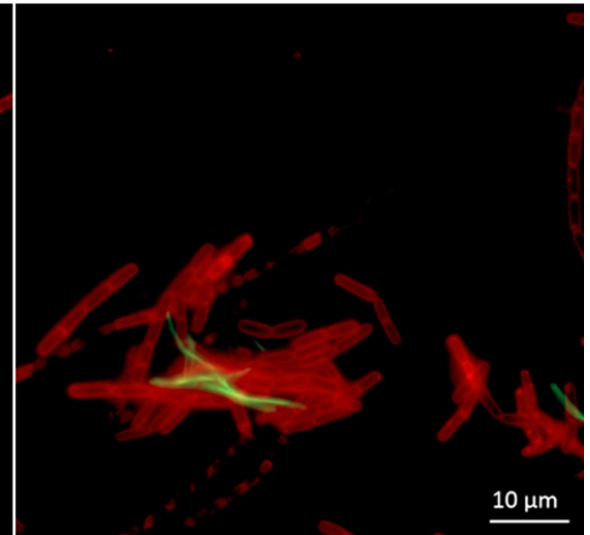
wt



*calY*

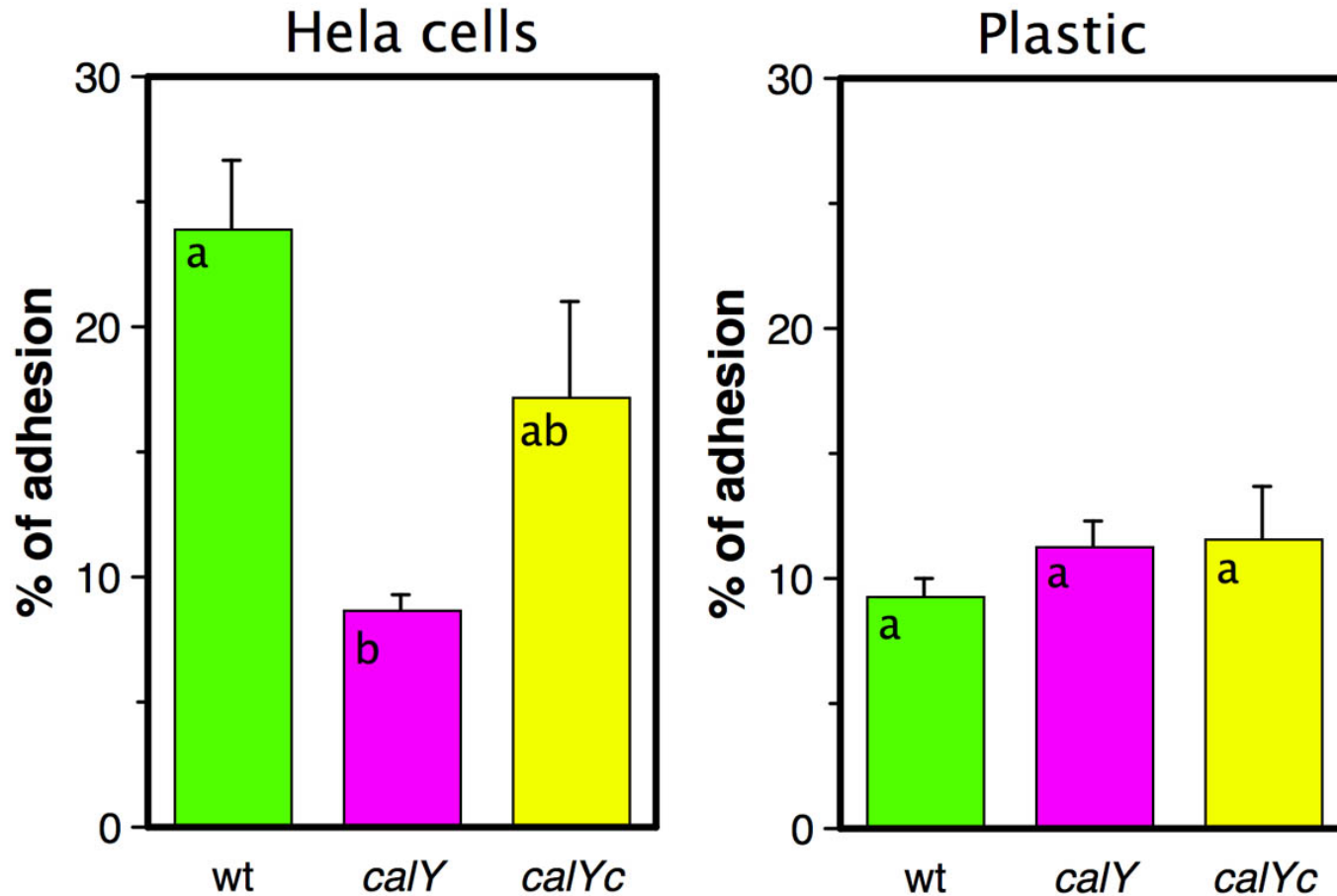


*calYc*



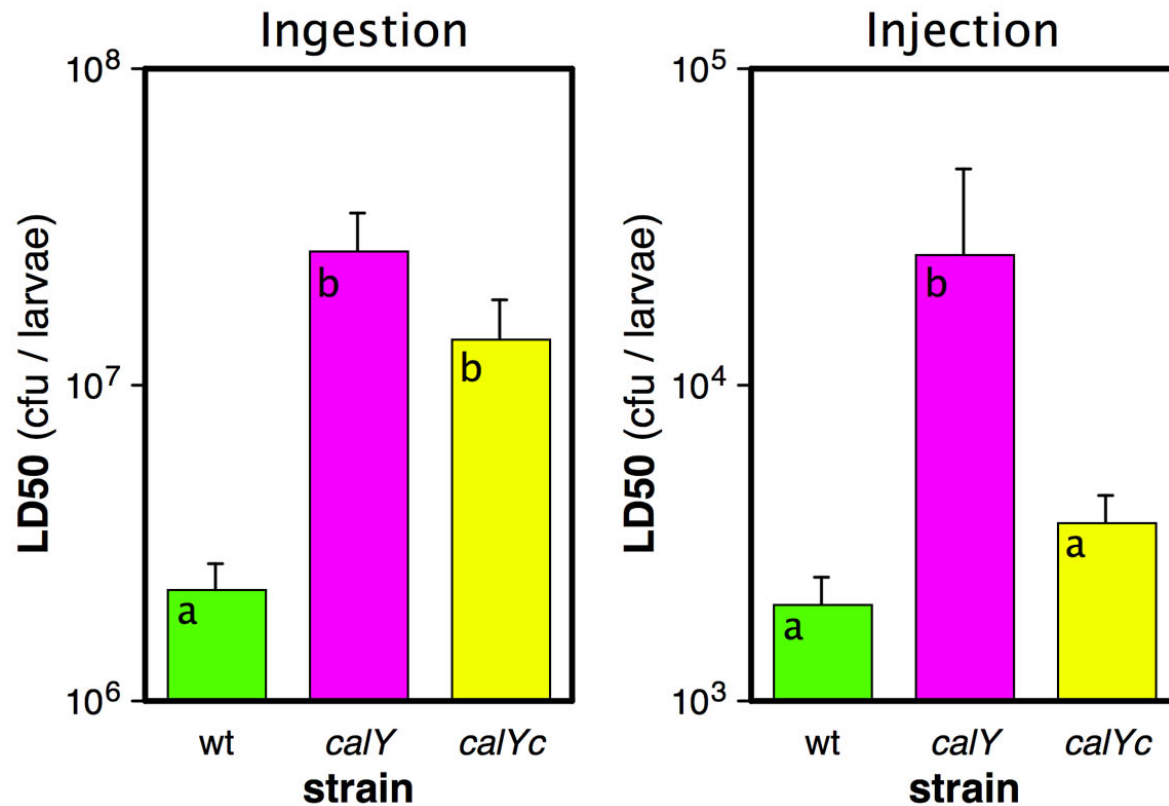
# Camelysine

effet de la délétion de *calY* sur l'adhésion



# Camelysine

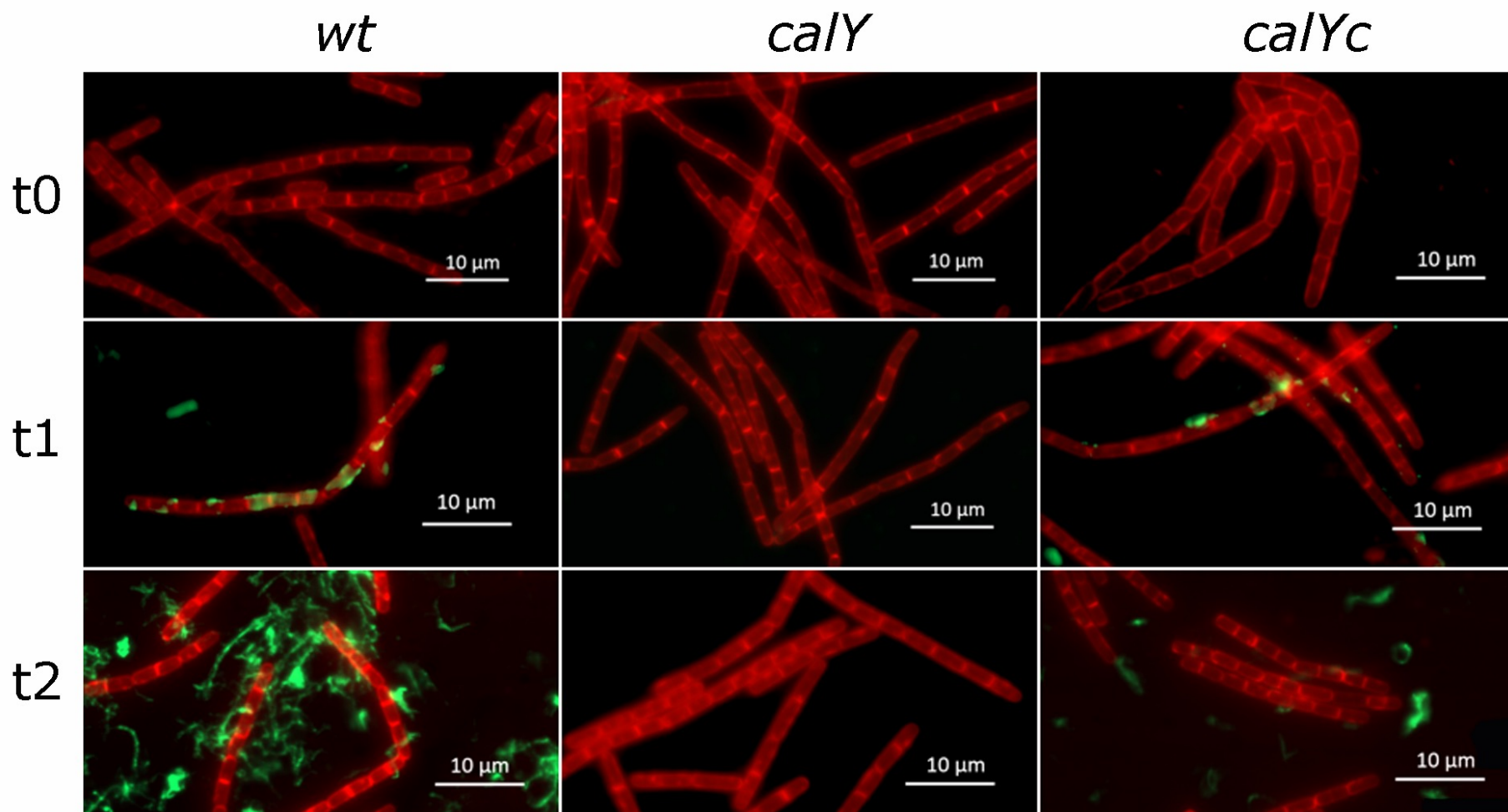
effet de la délétion de *calY* sur la virulence





# Camelysine

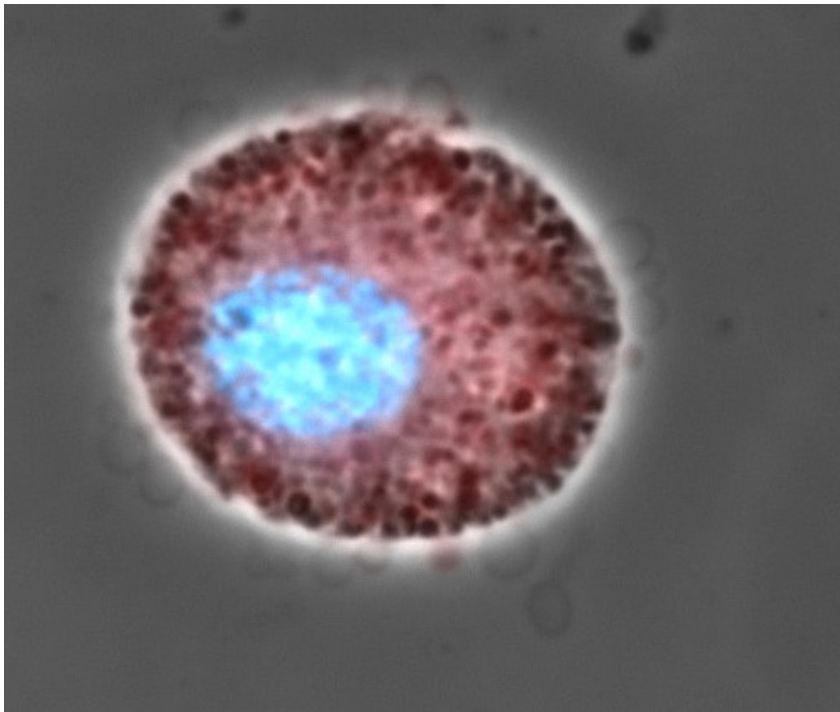
En cultures planctoniques



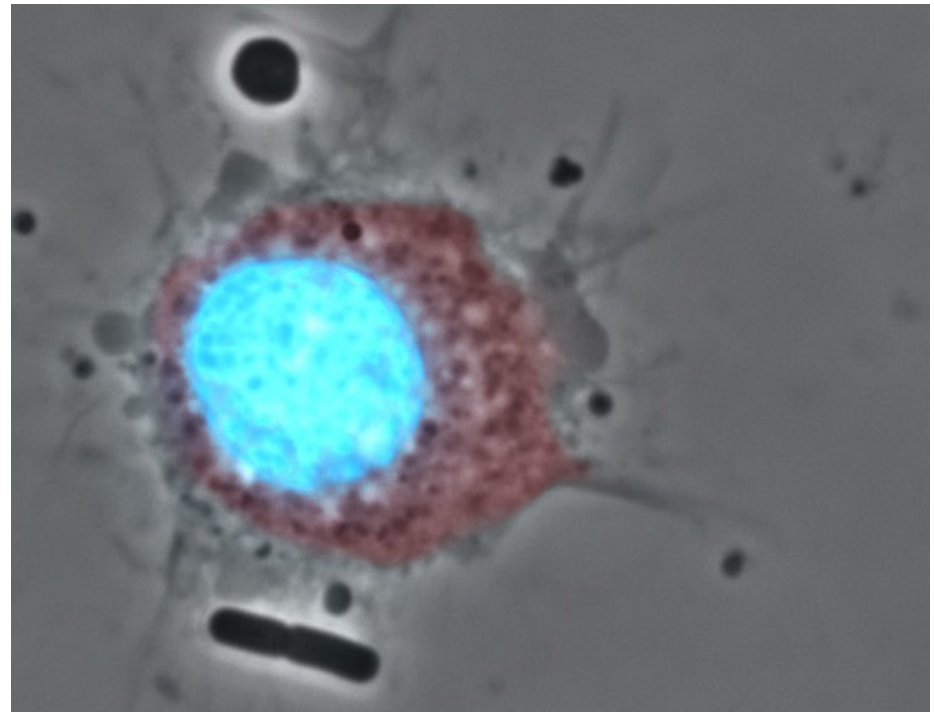
# Camelysine

Cellules hémolymphatiques de *Galleria mellonella*

Granulocytes

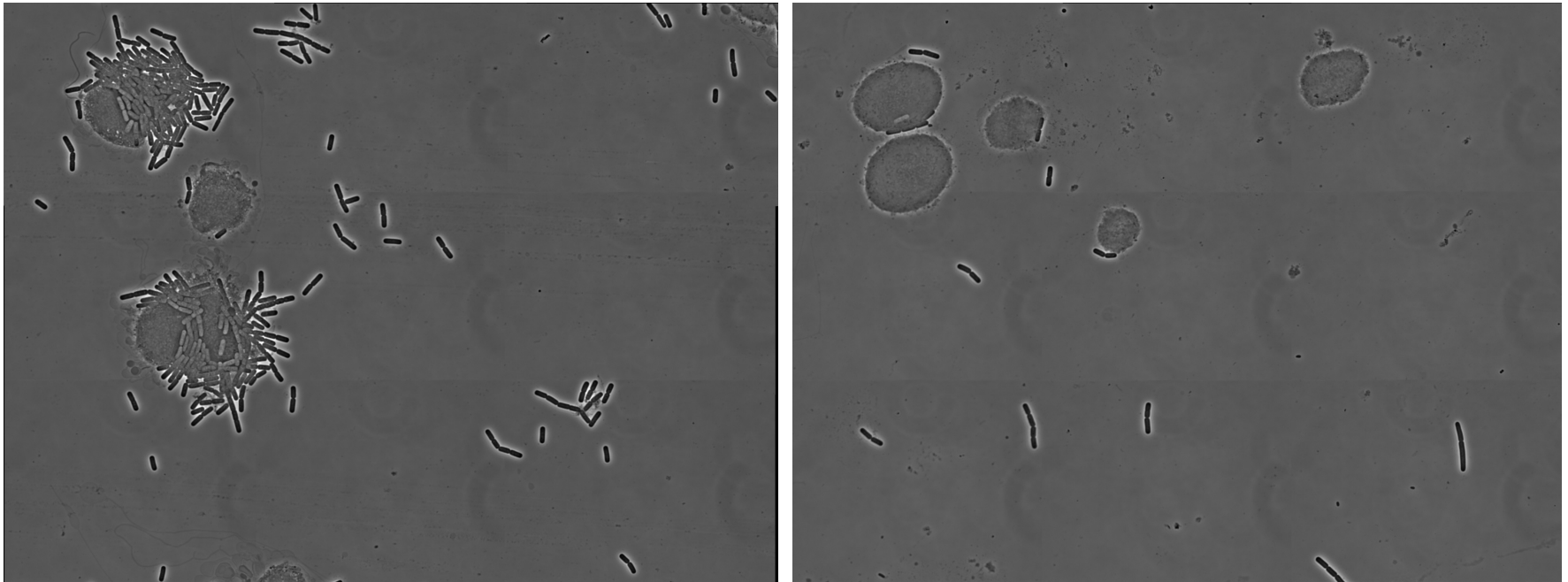


Plasmocytes



# Camelysine

Effet de Caly sur les granulocytes



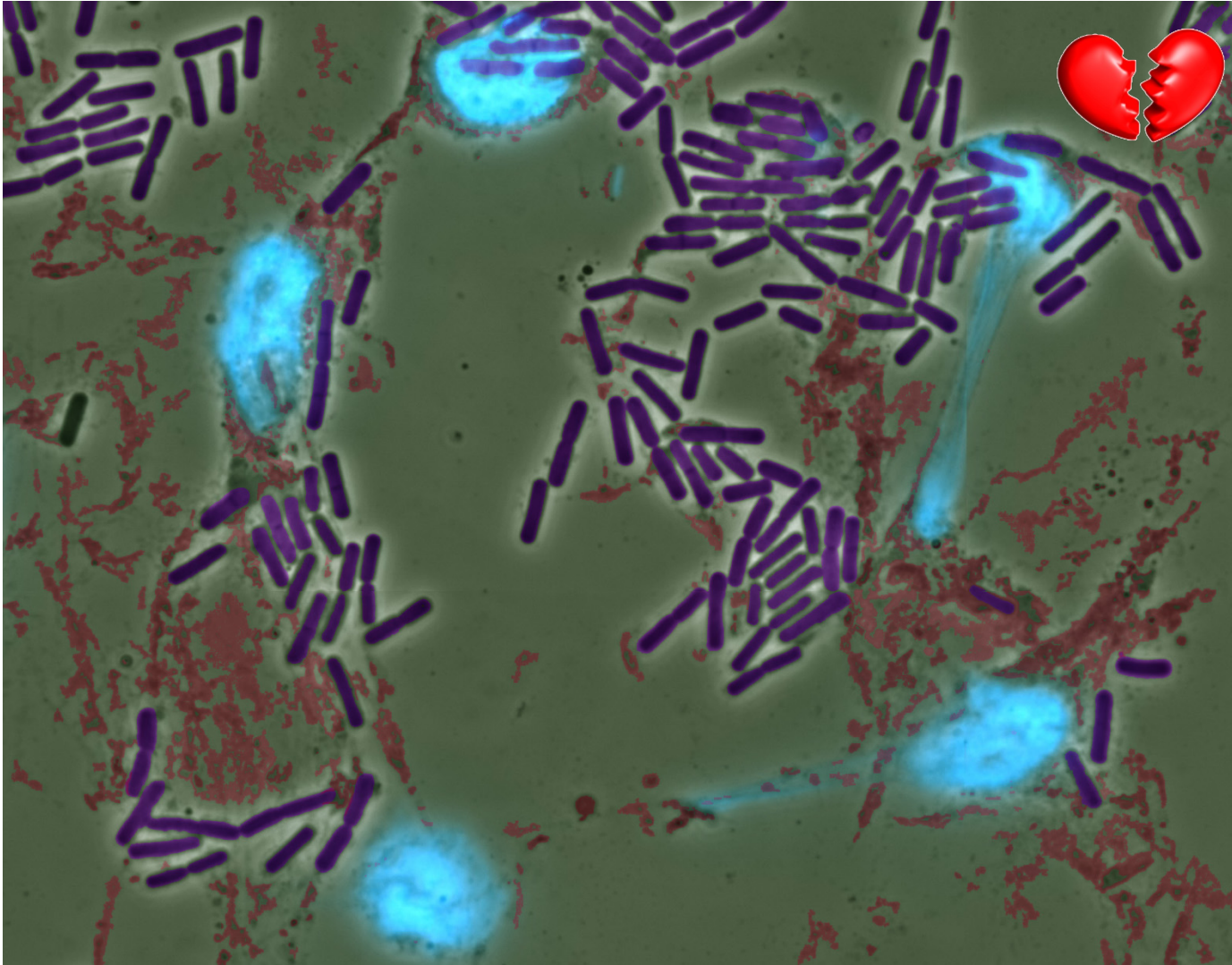
# Camelysine

Adhésion massive de Bt sur les granulocytes



# Camelysine

Cytotoxicité de Bt

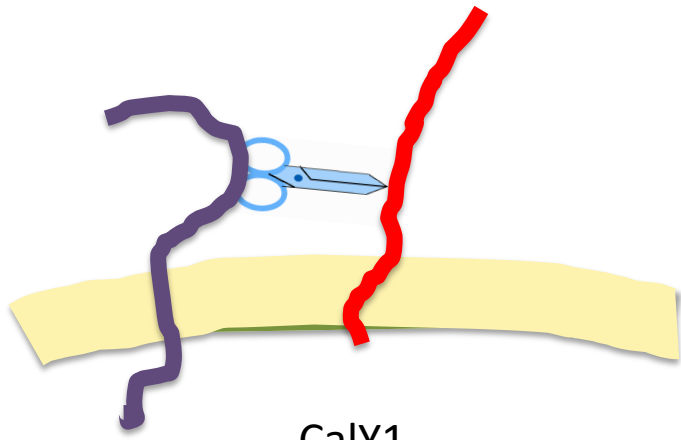


transition phase

virulence



adhesin



SipW

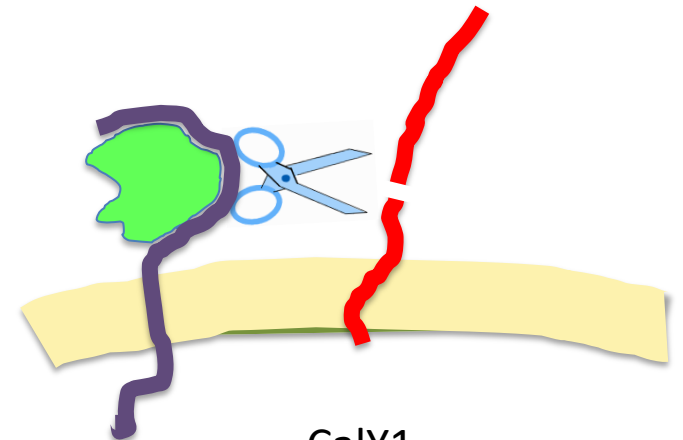
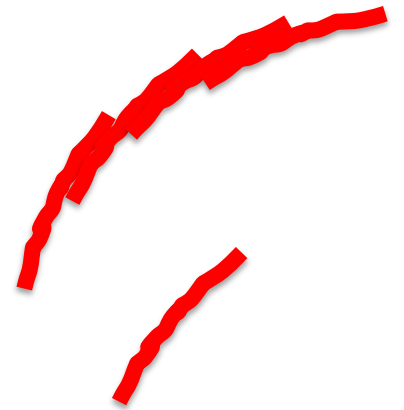
CaY1

stationary phase

biofilm matrix



fibers



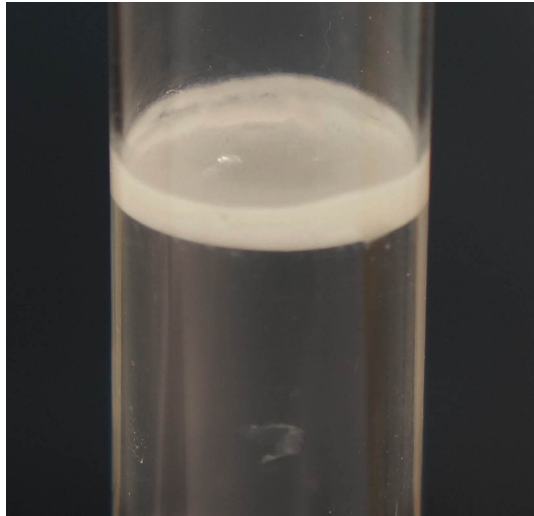
SipW

CaY1

# VIII – Cas d'étude : exopolysaccharides chez Bt

# Biofilms flottants chez Bt

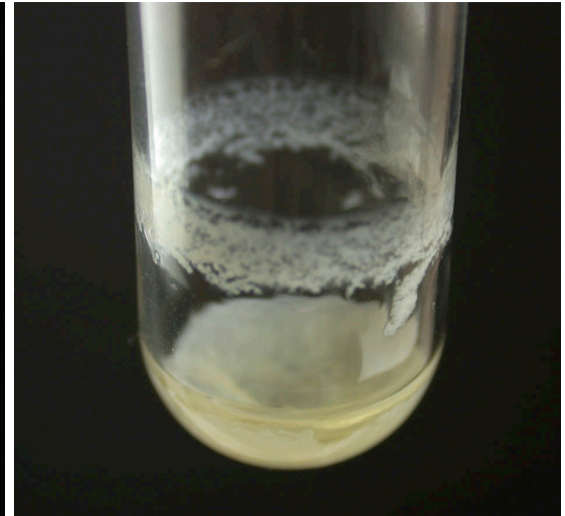
biofilms âgés de 48h produits en milieu HCT– souche Bt 407, essais en tubes de verre



Biofilm entier



Vue de dessus

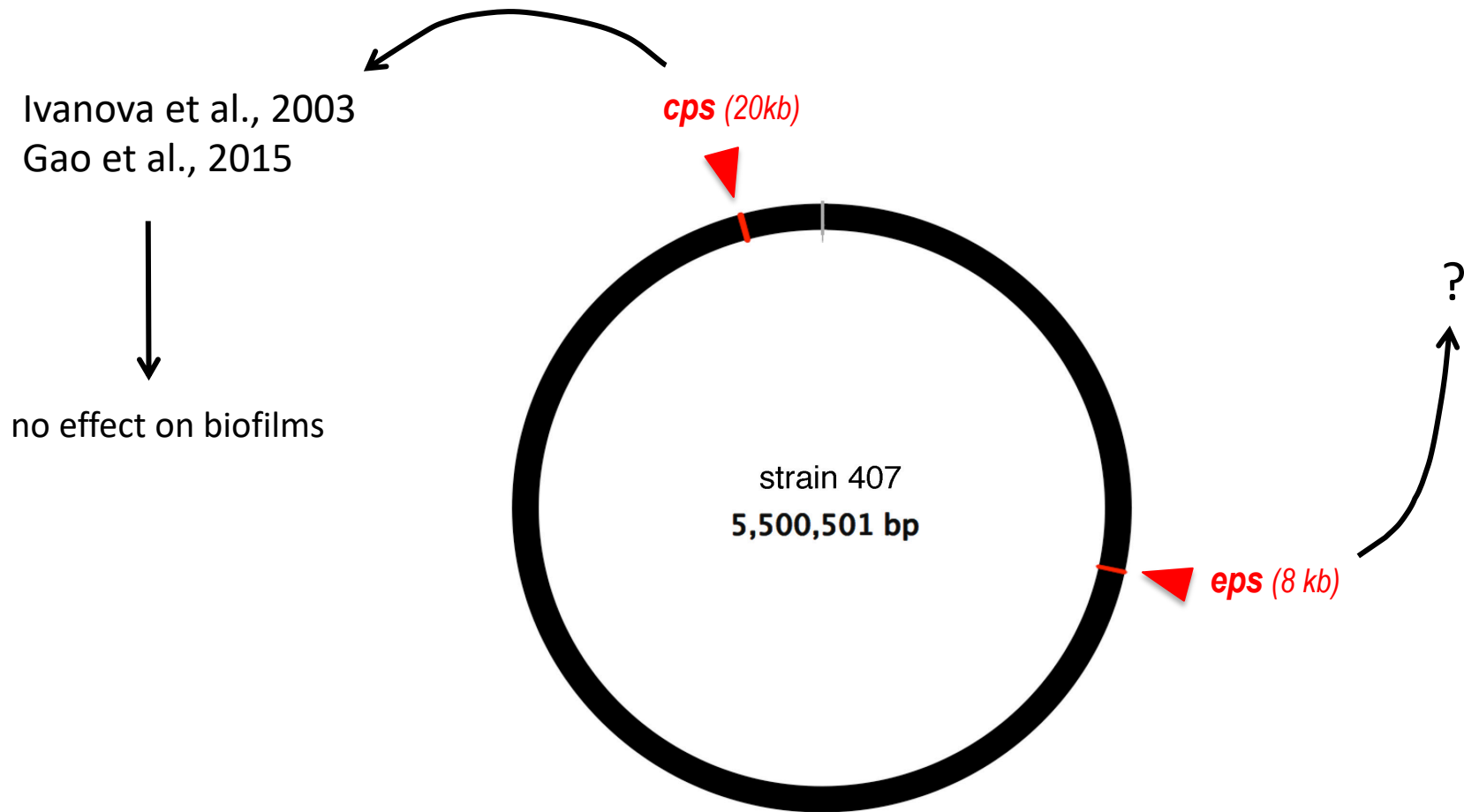


l'anneau et la pellicule



# Genes clusters involved in exopolysaccharides biosynthesis

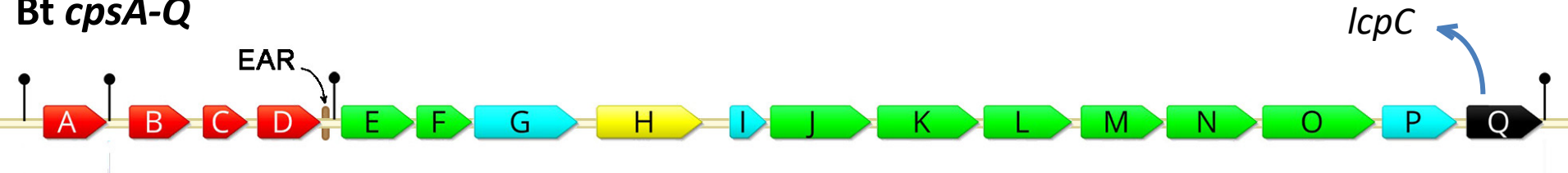
two clusters were found : *cps* and *eps*



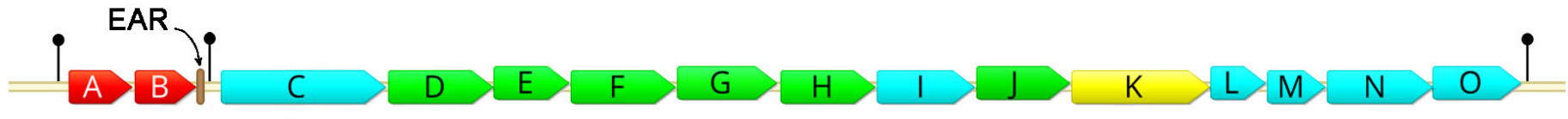
# The *cps* and *eps* genes clusters

■ BY-kinases ■ Glycosyl-transferases ■ Sugar modification ■ flippase

## *Bt cpsA-Q*



## *Bs epsA-O*



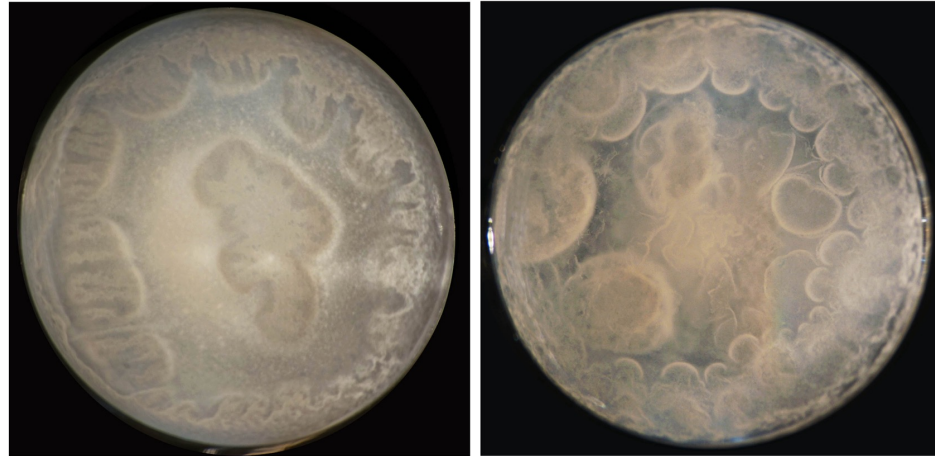
## *Bt epsA-H*



# Effect of *cps* and *eps* on biofilm formation

**wt**

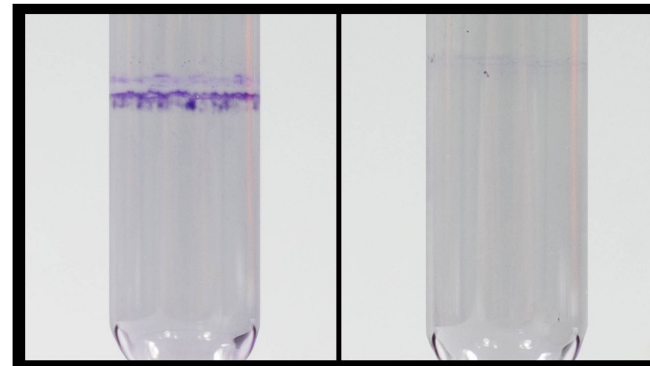
***cps***



plates

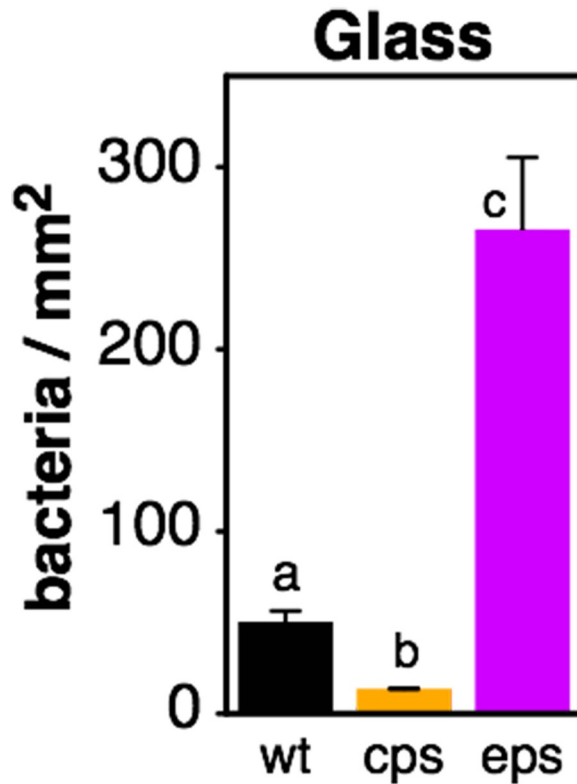
**wt**

***cps***



tubes

# *cps* et *eps* mutant strains adhesion



Bars and error bars represent means & standard errors of the means. Bars with different letters (a, b, c) on their top indicate significant differences in their mean values ( $P < 0.05$ , Wilcoxon test)

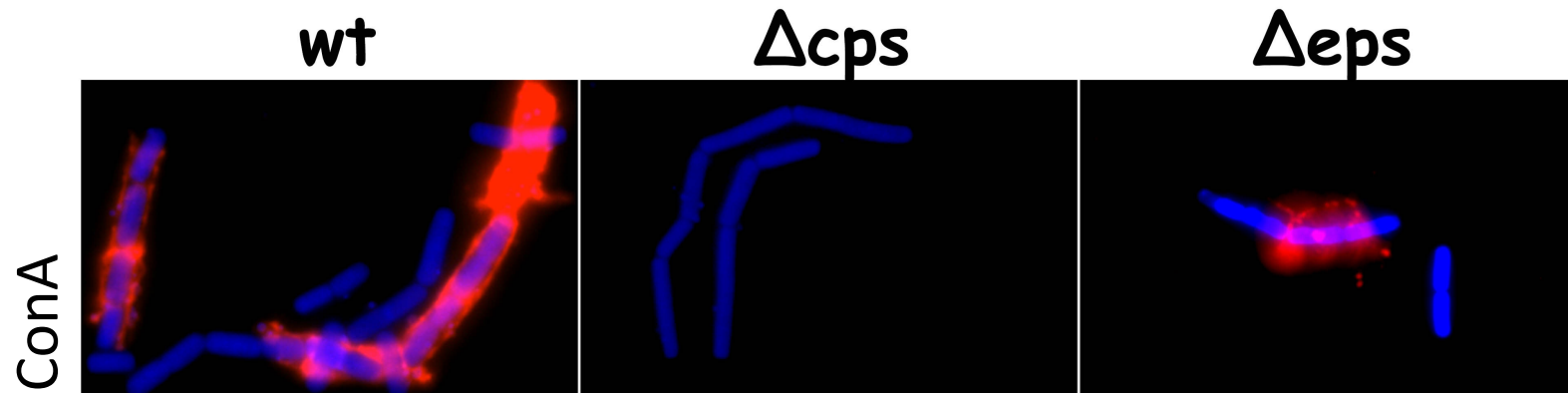
# Are Cps polysaccharides located at the cell surface ?

Different culture conditions and lectins and were screened to induce and determine the subcellular location of Cps.

We found that :

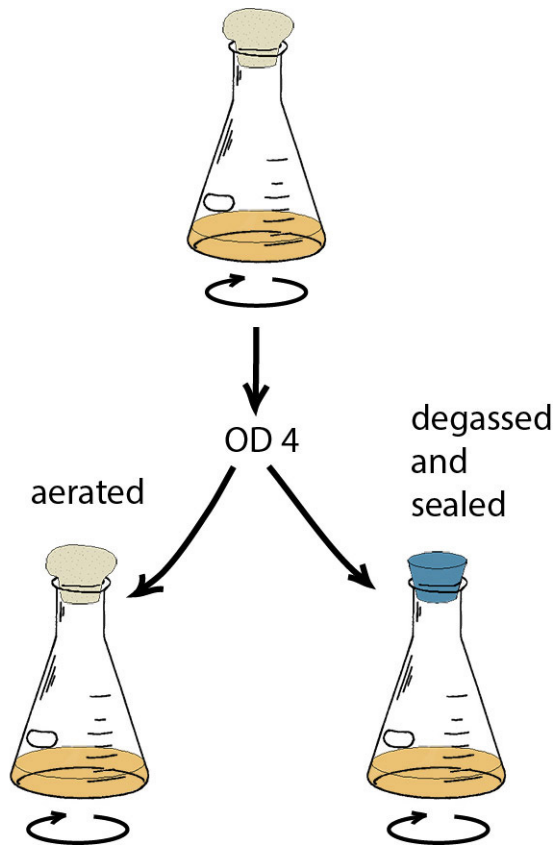
- At OD 6, Cps was induced **when the agitation was stopped for 1 hour**
- **ConA** could reveal Cps

# Cps location on the bacterial surface

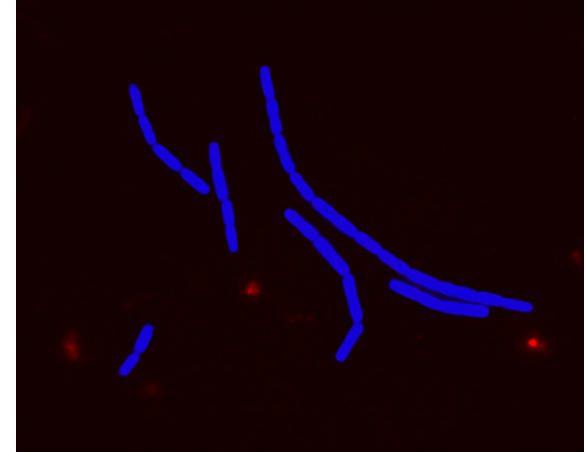


Planktonic cultures harvested at OD 6.0, kept with no agitation for 1 hour, stained with Alexa594-labelled Concanavalin A (red) and DAPI (blue) or with Indian ink

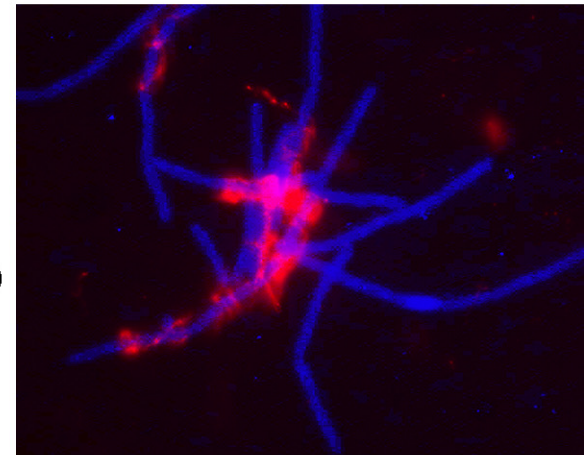
# Agitation or oxygen deprivation ?



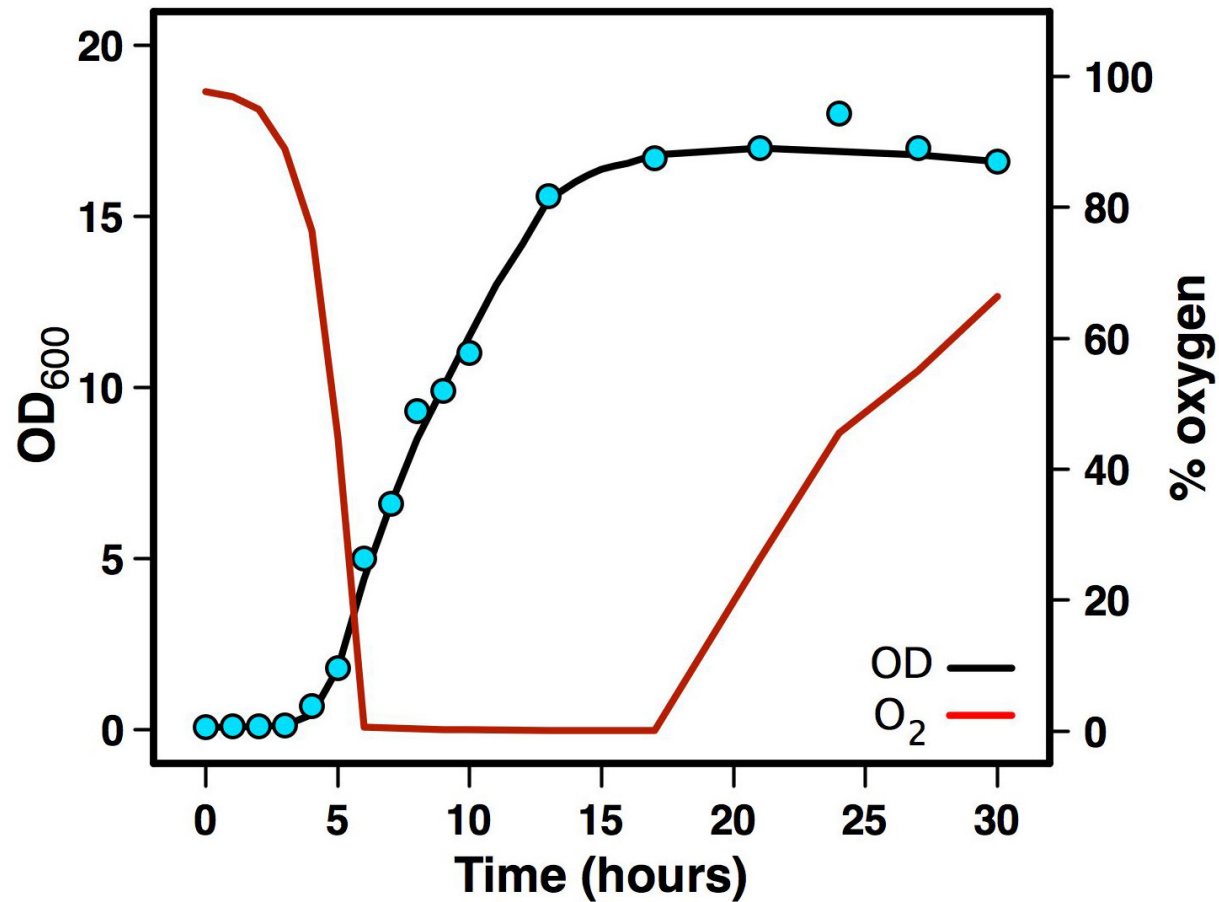
aerated



degassed



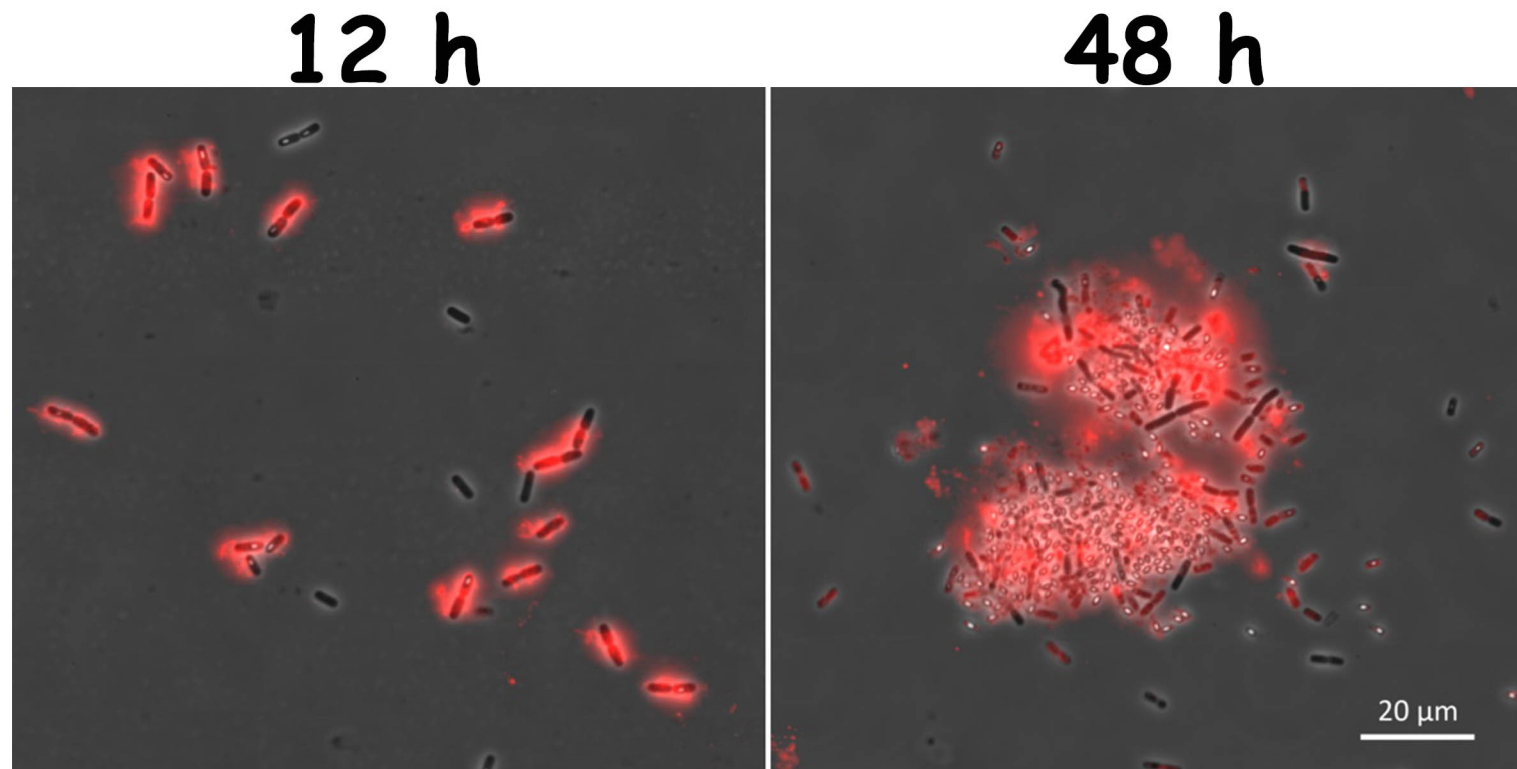
# Oxygen consumption in planktonic cultures



Oxygen concentration was measured with an oxygen electrode in a standard planktonic culture (LB medium, 30°C, 175 rpm) together with the OD.

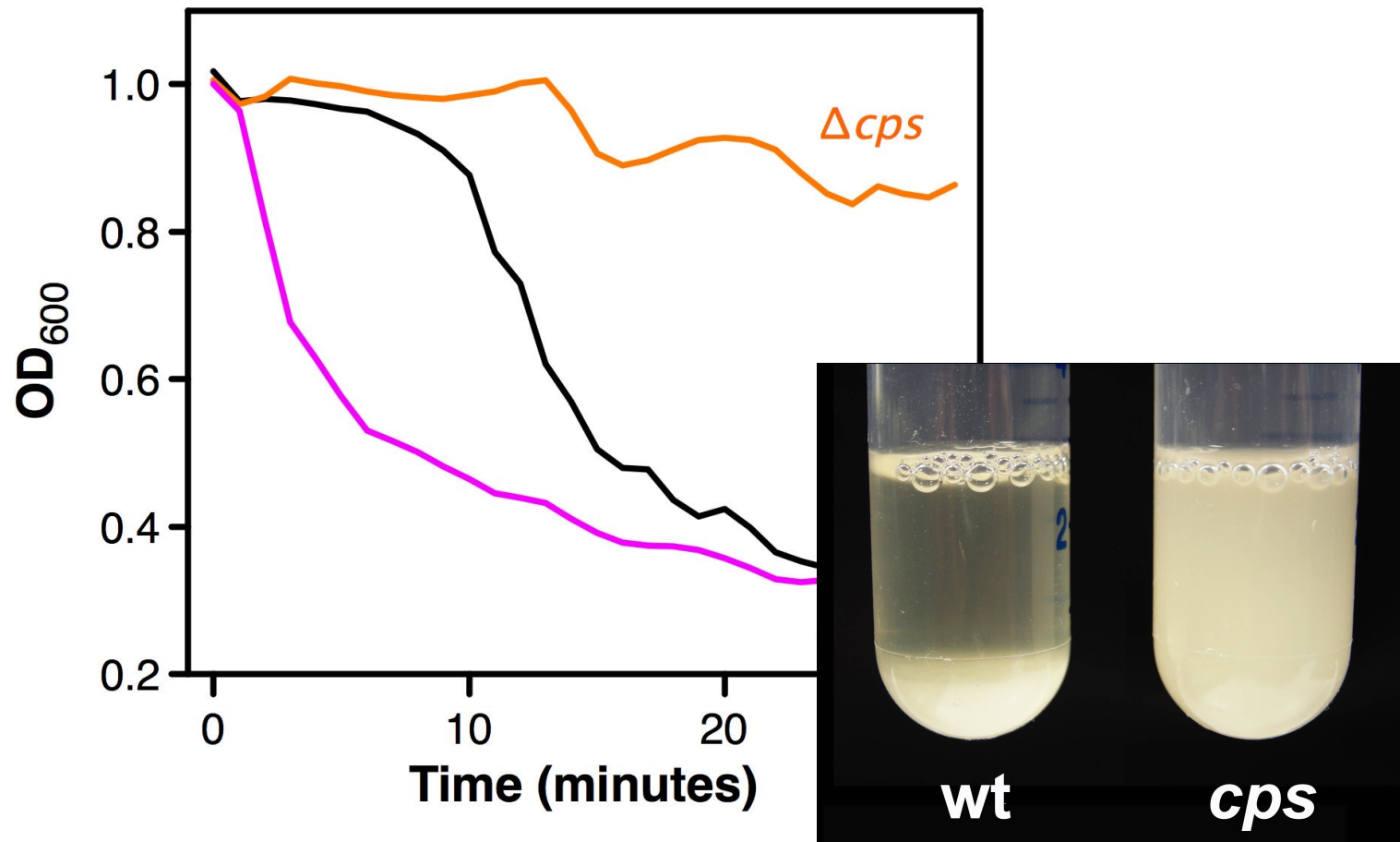


# Cps production in late stationary phase cultures



A planktonic cultures of the wild type strain was harvested after 12 h (left) or 48 h (right) of culture, stained with Alexa594-labelled ConA, and observed in phase-contrast microscopy.

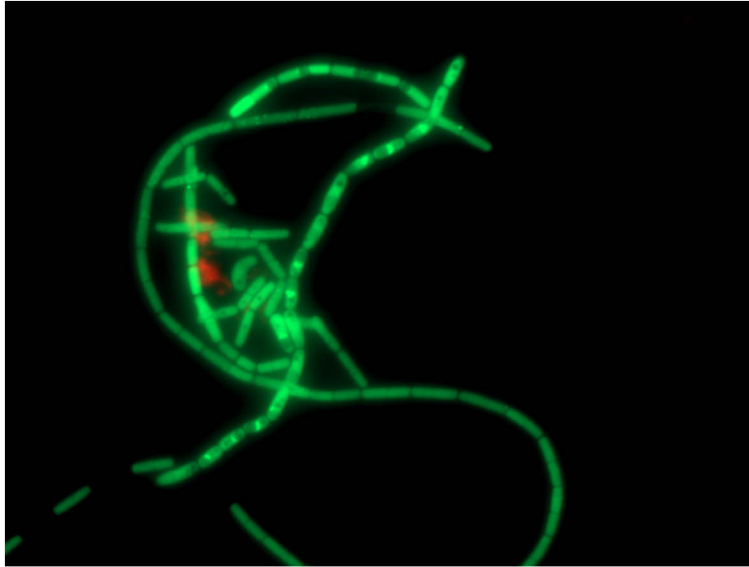
# Aggregation assays : *cps* and *eps* effect



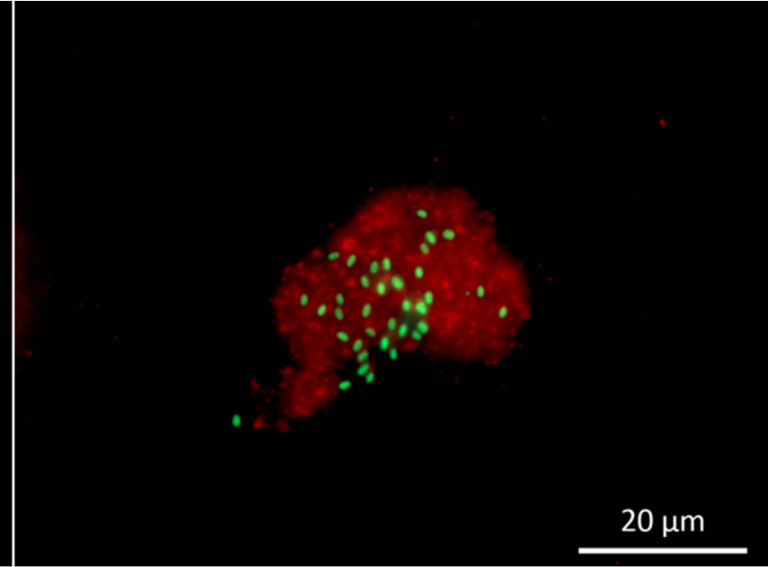
Aggregation was determined by recording the OD<sub>600</sub> of a bacterial suspension every minute for 30 minutes with a spectrophotometer.

# Cps location in the biofilm

pellicle

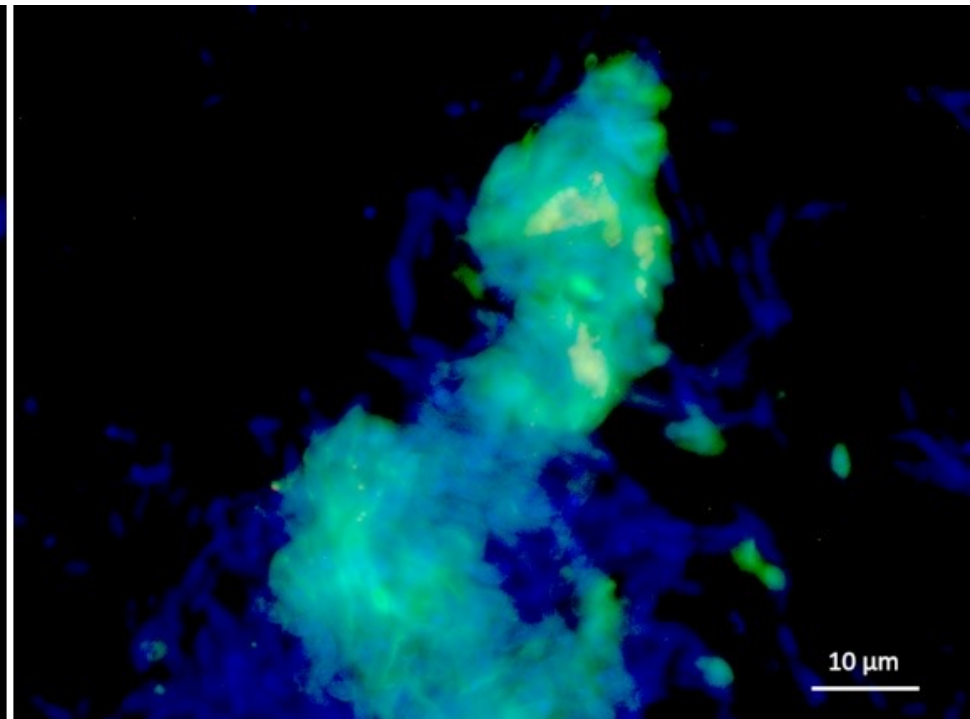
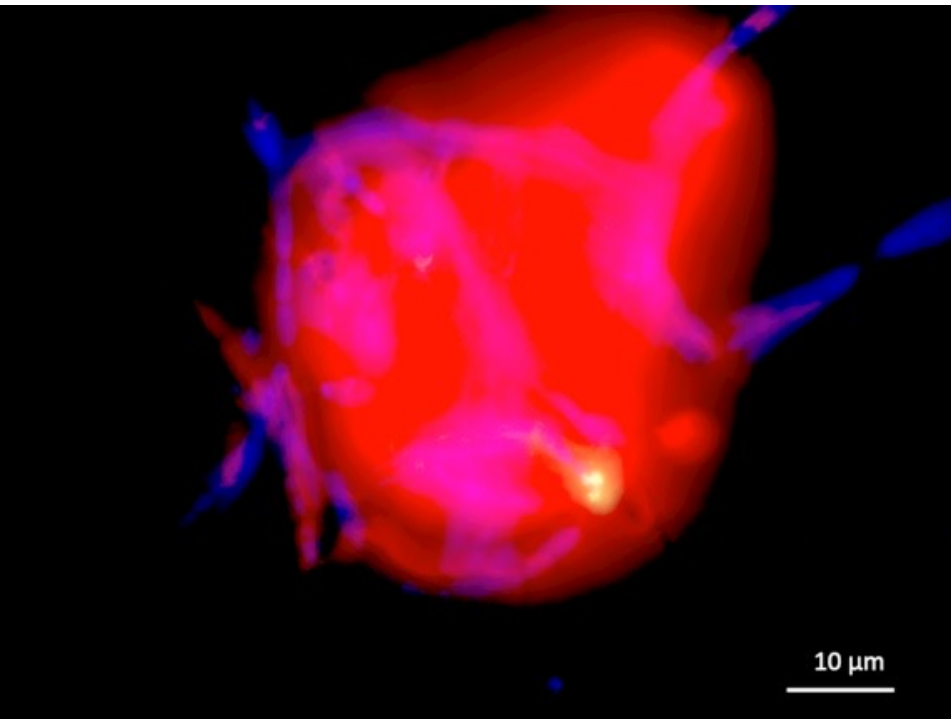


ring



The ring and the pellicle of a 48 h-aged biofilm produced by a GFP-tagged strain in glass tubes in HCT medium at 30°C were harvested separately, stained with Alexa594-labelled ConA, and observed with a fluorescence microscope.

## Cps and eps polysaccharide distribution in biofilm



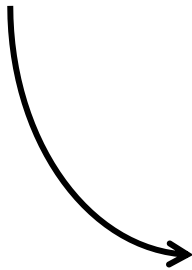
The ring and the pellicle of a 48 h-aged biofilm produced the wild type strain in glass tubes in HCT medium at 30°C were harvested separately, stained with Alexa595-labelled ConA, FITC-labelled Datura lectin and DAPI, and observed with a fluorescence microscope.

# How is Cps produced exclusively in the ring ?

- Cps could be induced by environmental conditions specific to the ring

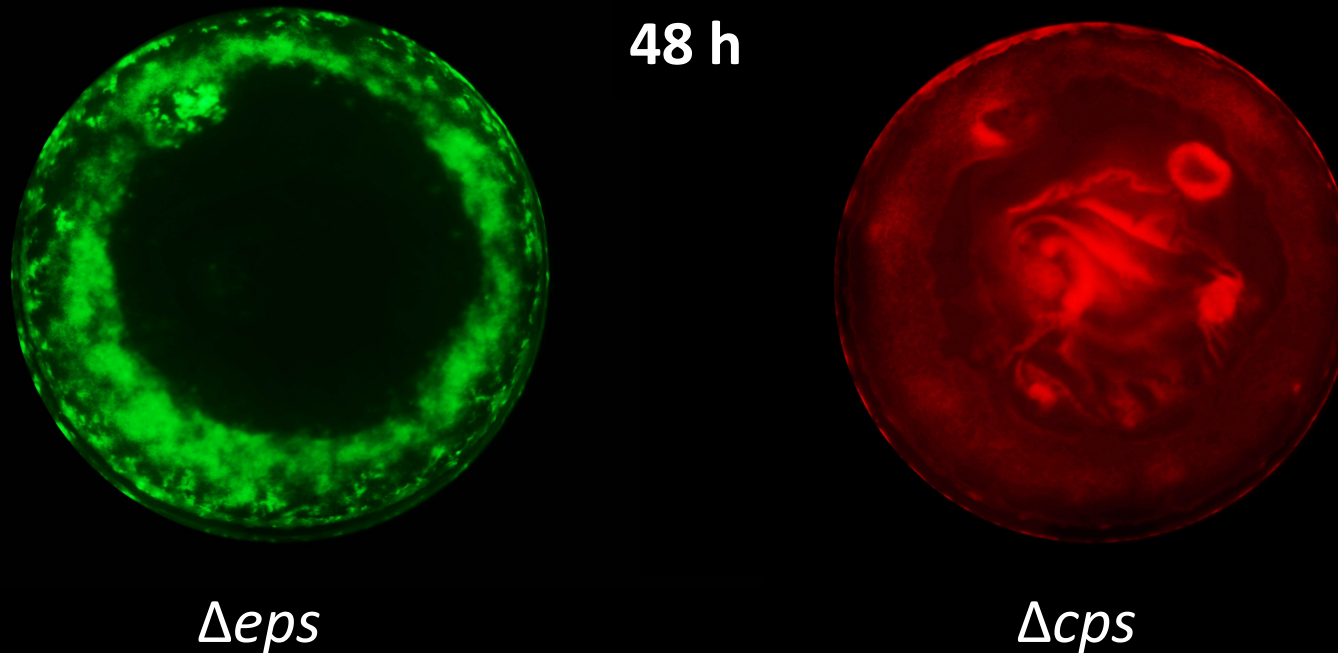
or

- the subpopulation producing Cps is sorted out to the ring location



Co-cultures of tagged  $\Delta cps$  and  $\Delta eps$  strains

# Co-cultures of $\Delta cps$ et $\Delta eps$ strains



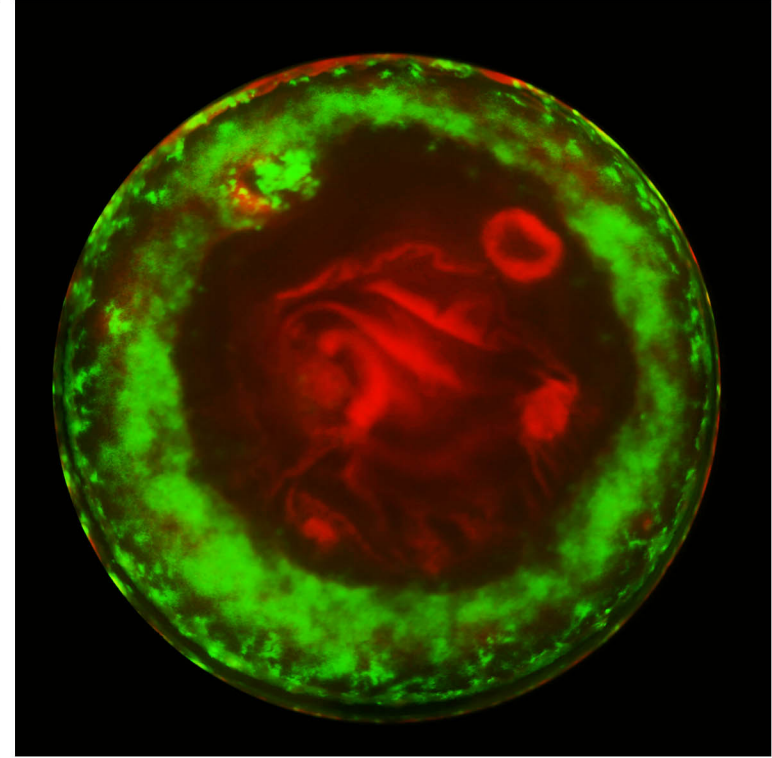
The  $\Delta cps$  strain, producing only Eps, was tagged with mCherry (in red) while the  $\Delta eps$  strain, producing only Eps, was tagged with GFP (in green). Both strains were mixed in a 1:1 ratio and grown in biofilm in 48-wells polystyrene microtiter plate in HCT medium at 30°C, and observed in top-view with a fluorescence stereomicroscope.

# Asymmetric distribution of Cps et Eps in the biofilm

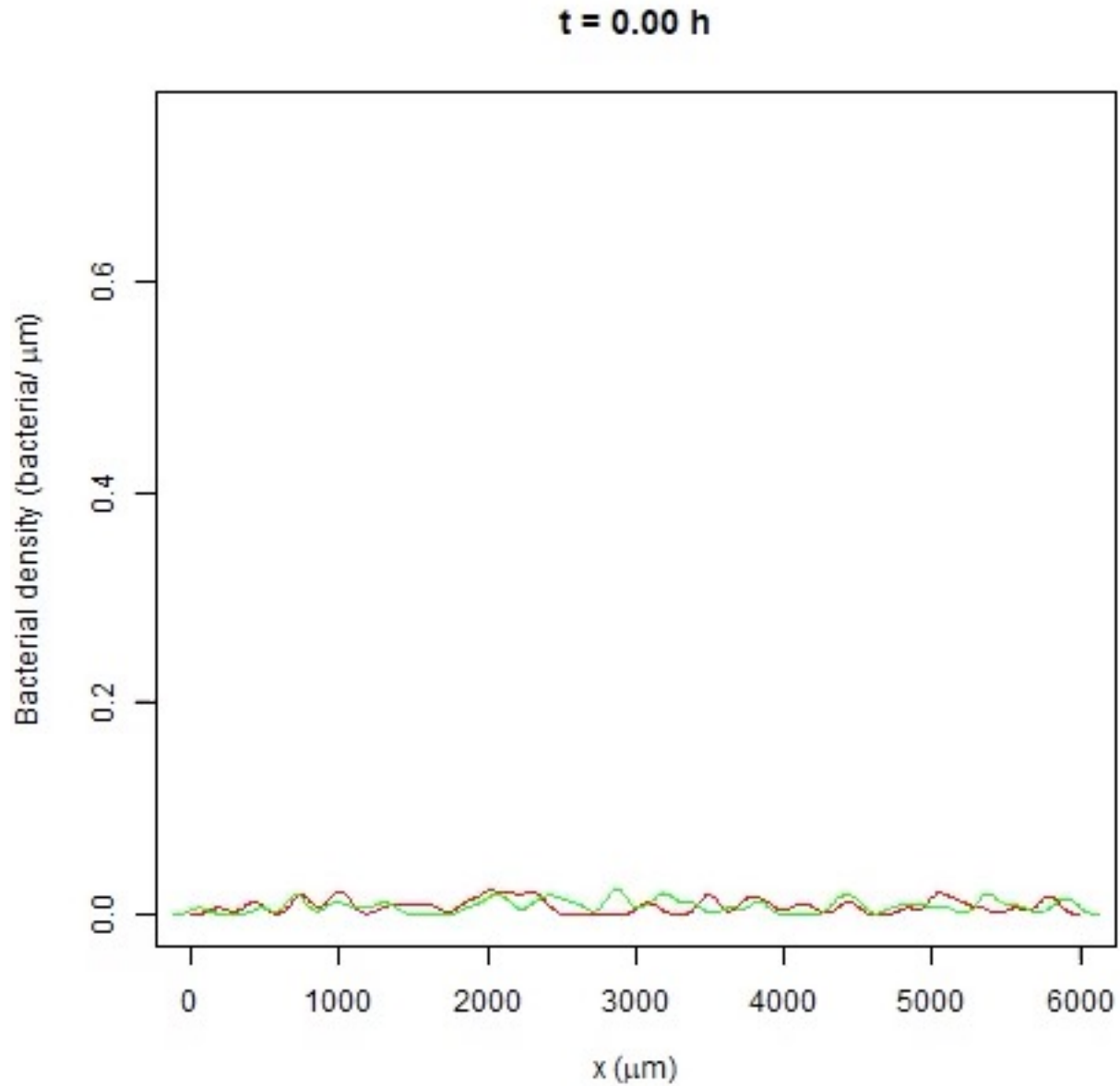
**white light**



**fluorescence**

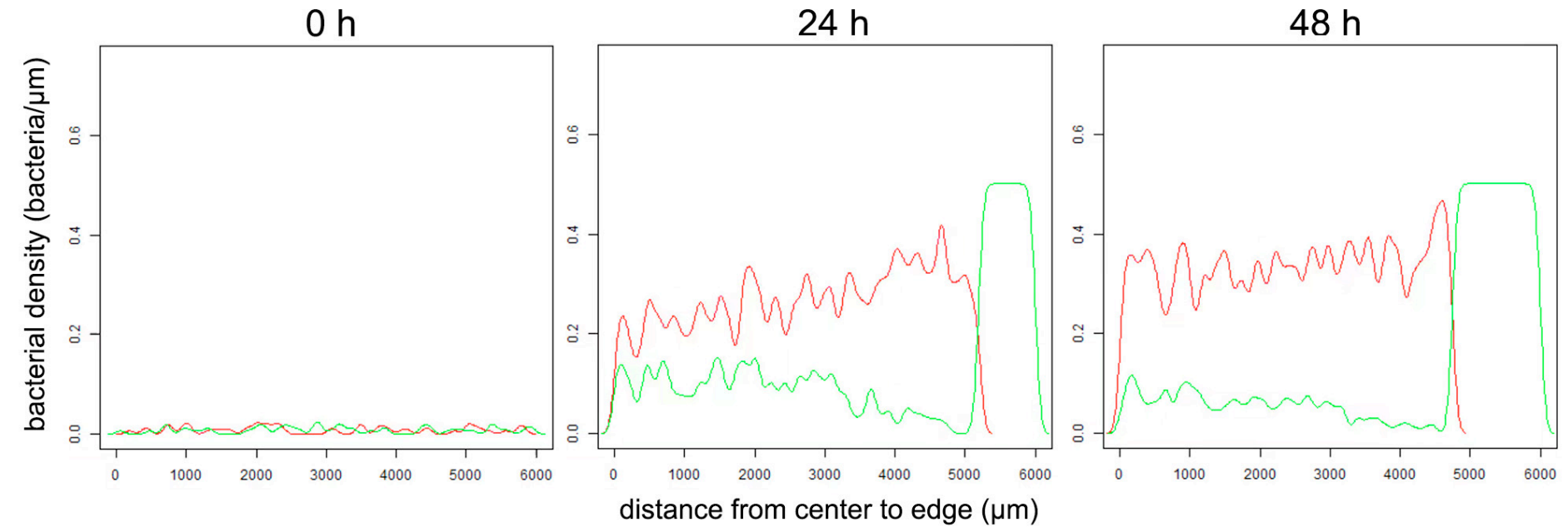


# Hypothesis to explain the mutants sorting

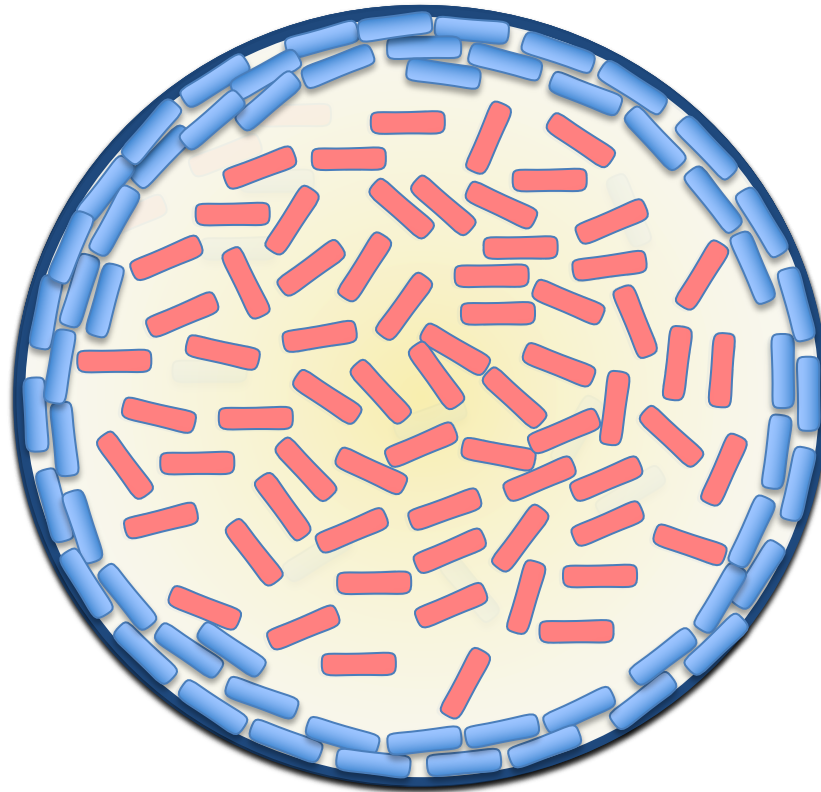
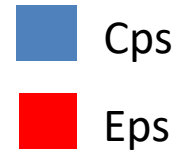




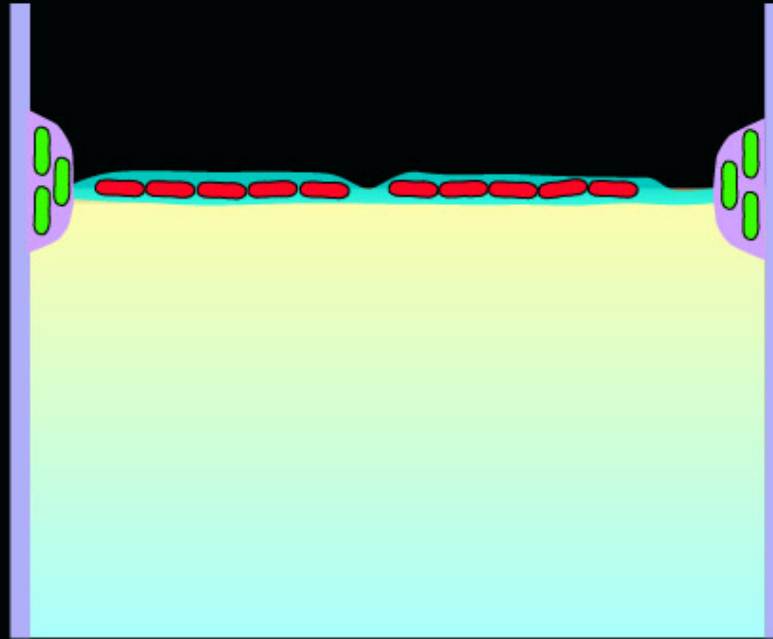
# Hypothesis to explain the mutants sorting



# Hypothetical model explaining strains spatial segregation



# Hypothetical model of Cps and Eps roles in biofilm formation



# Conclusion (1)

- les biofilms constituent la majeure partie de la biomasse des microorganismes dans l'environnement
- ils sont un facteur important de la contamination et de la persistance dans les industries agro-alimentaires
- ils peuvent également jouer un rôle dans le pouvoir pathogène des bactéries, notamment dans les infections chroniques
- les constituants de la matrice du biofilm sont également, dans certains cas, des facteurs de virulence

## Conclusion (2)

- Source d'hétérogénéité
- Quorum sensing
- Division du travail (task distribution)
- Bet-hedging
- Coopération
- Biens publics et biens privés