



HAL
open science

Ability of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* to form biofilm. Study of a “biofilm-positive strain” by a proteomic approach

Stella Planchon

► **To cite this version:**

Stella Planchon. Ability of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* to form biofilm. Study of a “biofilm-positive strain” by a proteomic approach. *Sciences du Vivant [q-bio]*. 2006. Français. NNT: . tel-02824149

HAL Id: tel-02824149

<https://hal.inrae.fr/tel-02824149v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

UNIVERSITE D'AUVERGNE
N° DU : 1661

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2006

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**
N° d'ordre : 440

Thèse
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Discipline : Sciences des Aliments
Présentée et soutenue publiquement par

Stella PLANCHON

Le 10 Juillet 2006

*Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et
Staphylococcus xylosus à former des biofilms.
Etude d'une souche "biofilm-positif" par une
approche protéomique*

Président	M. G. Prensier - Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II
Rapporteurs	Mme M. Champomier-Vergès - Habilitée à Diriger des Recherches, INRA, Jouy-en-Josas M. S. Jabbouri - Professeur, ULCO, Boulogne-sur-Mer
Membres	M. P. Lejeune - Professeur, INSA de Lyon, Villeurbanne M. M. Hébraud - Chargé de Recherches, INRA, Clermont-FerrandTheix
Directrice de thèse	Mme R. Talon - Directrice de Recherches, INRA, Clermont-FerrandTheix

Unité Microbiologie - Equipe Qualité et Sécurité des Aliments
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand - Theix

Résumé

Staphylococcus xylosus et *Staphylococcus carnosus* sont utilisés comme ferments de salaisons. *S. xylosus* est fréquemment isolé dans l'environnement des ateliers de transformation alimentaire alors que *S. carnosus* l'est rarement. Ainsi, nous avons étudié la capacité de ces deux espèces à former des biofilms sur divers supports abiotiques. Les souches de *S. carnosus* sont hydrophiles, adhèrent à des supports hydrophiles mais ne forment pas de biofilms. Certaines souches de *S. xylosus* sont hydrophiles, d'autres moyennement hydrophobes et elles forment des biofilms quelque soit le support. *S. xylosus* C2a, choisie comme souche d'étude, forme des biofilms denses avec des agrégats intercellulaires séparés par des canaux et englués dans une matrice constituée de polysaccharides dont la synthèse ne semble pas liée au gène *icaA*. Nous avons mis en évidence les gènes *atl* et *bap* codant des protéines de surface impliquées dans la formation de biofilm chez *S. aureus*. Pour étudier l'ensemble des protéines de surface impliquées, nous avons développé une méthode d'analyse des protéines pariétales et membranaires. Un total de 101 protéines a été identifié dont 51 sont prédites comme protéines de surface et seulement 9 sont communes aux deux fractions. La comparaison des profils protéiques des fractions pariétales, membranaires et intracellulaires a révélé une expression différentielle de 115 protéines dont 74 sont surexprimées en mode sessile et 41 en planctonique. Cette étude a révélée la modification de nombreuses voies métaboliques. Leur analyse permettra de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu par *S. xylosus* lors de sa croissance en biofilm.

Ability of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* to form biofilm. Study of a "biofilm-positive strain" by a proteomic approach

Staphylococcus xylosus and *Staphylococcus carnosus* are used as starter cultures for sausage manufacturing. *S. xylosus* is frequently isolated in the food-processing plants environment while *S. carnosus* is rarely isolated. Thus, we have studied the ability of these two species to form biofilms on different abiotic supports. The *S. carnosus* strains are hydrophilic, adhere to hydrophilic supports but do not form biofilm. Some strains of *S. xylosus* are hydrophilic, others are moderately hydrophobic and all form biofilms whatever the support. *S. xylosus* C2a, selected as model strain, forms thick biofilms with intercellular aggregates separated by channels and embedded in a matrix composed of polysaccharides which synthesis seems independent of *icaA* gene. We have highlighted the *atl* and *bap* genes encoding surface proteins involved in biofilm formation in *S. aureus*. To study the whole of surface proteins involved, we have developed a method to analyse membrane and cell wall proteins. A total of 101 proteins was identified whose 51 are predicted as surface proteins and only 9 proteins are common to the two fractions. The comparison of protein patterns of cell wall, membrane and intracellular fractions revealed a differential expression of 115 proteins which 74 are over-expressed in sessile cells and 41 in planktonic cells. This study revealed the modification of several metabolic pathways. Their analysis will allow to better predict the mechanisms taking place in *S. xylosus* during its growth in biofilm.

Discipline : Sciences des Aliments

Mots-clés : *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, adhésion, biofilm, polysaccharides, protéines pariétales, protéines membranaires

Unité Microbiologie – Equipe Qualité Sécurité des Aliments

Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand - Theix

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements au président du jury, aux rapporteurs ainsi qu'aux membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

Ce travail de thèse a été réalisé à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix au sein de l'équipe de microbiologie dirigée par Régine Talon que je remercie pour son accueil.

Je remercie également Régine Talon en tant que directrice de thèse pour son soutien, sa disponibilité et sa confiance tout au long de ce travail de recherche.

Je désire remercier Sabine Leroy pour s'être autant impliquée dans ce travail de thèse, pour son optimisme, ses encouragements et ses nombreux conseils.

Je remercie Michel Hébraud pour sa participation au co-encadrement de cette thèse dans le cadre de la protéomique.

Un grand merci à Ingrid Chafsey pour tous ces bons moments passés ensemble que je n'oublierais jamais et à Nicole Garrel pour m'avoir aidée et prêtée son épaule quand j'en avais besoin. Merci à toutes les deux pour votre soutien et votre bonne humeur au quotidien.

J'exprime toute ma gratitude à Brigitte Duclos pour son aide précieuse en informatique et pour tout ce temps passé à la mise en forme de ce manuscrit.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à toute l'équipe, merci à Isabelle Lebert pour son esprit organisé, à Mickaël Desvaux pour ses conseils avisés et à Jean Labadie pour son transfert de connaissances.

Je tiens également à remercier Marie Claire et Yvette, Stéphane, Patrick et Jérôme, ainsi que tous les thésards, Stéphanie, Véronique, Emilie D et Emilie F.

Je voudrais remercier les personnes avec qui j'ai collaboré au cours de ce travail de recherche. Merci à Marie-Noëlle Bellon-Fontaine de sa patience pour les explications physico-chimiques assez complexes. Merci à Brigitte Gaillard-

Martinie pour les séances sympathiques de projections sur les staphylocoques !!
Merci à Christophe Chambon pour son investissement mais aussi pour sa bonne humeur et ses expressions comiques !! Merci à Martine Morzel de s'être impliquée dans mon travail, de sa simplicité et sa gaieté.

Enfin, je voudrais remercier ma famille et mes amis qui m'ont toujours donné de l'espoir et cru en mes capacités. Je remercie plus particulièrement une personne avec qui je me sens plus forte et plus confiante chaque jour, merci Claude. Merci de m'avoir changé les idées quand il le fallait, merci de ta patience, de ton soutien et de tous tes bons petits plats !!

INTRODUCTION.....	- 7 -
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	- 13 -
CHAPITRE I La formation de biofilm chez les staphylocoques	- 15 -
1 - GENERALITES	- 15 -
2 - HISTORIQUE DE LA FORMATION DE BIOFILM PAR LES STAPHYLOCOQUES.....	- 16 -
3 - LES ETAPES DE FORMATION D'UN BIOFILM	- 17 -
4 - CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DE LA SURFACE DES STAPHYLOCOQUES.....	- 19 -
5 - LES FACTEURS IMPLIQUES DANS L'ADHESION INITIALE	- 21 -
5-1. Les interactions physicochimiques	- 22 -
5-2. Les acides teichoïques	- 23 -
5-3. Les adhésines	- 25 -
5-3.1. <i>Les Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules ou</i>	
<i>MSCRAMMs</i>	- 25 -
5-3.1.1. La protéine A	- 26 -
5-3.1.2. La protéine EbpS	- 27 -
5-3.1.3. Les protéines FnbpA et FnbpB	- 28 -
5-3.1.4. La protéine Cna.....	- 28 -
5-3.1.5. Les protéines ClfA et ClfB	- 28 -
5-3.2. <i>Les autolysines/adhésines</i>	- 29 -
6 - LES FACTEURS IMPLIQUES DANS L'AGREGATION INTERCELLULAIRE	- 33 -
6-1. L'Adhésine Polysaccharidique Intercellulaire (PIA).....	- 33 -
6-1.1. <i>Description du PIA</i>	- 33 -
6-1.2. <i>Les différents polysaccharides décrits</i>	- 33 -
6-1.3. <i>Les gènes responsables de la synthèse du PIA</i>	- 34 -
6-2. La Protéine Associée à l'Accumulation (AAP)	- 37 -
6-3. La protéine Biofilm Associated Protein (BAP)	- 39 -
CHAPITRE II La régulation moléculaire en biofilm chez les staphylocoques - 43 -	
1 - INTRODUCTION	- 43 -
2 - LE SYSTEME "ACCESSORY GENE REGULATOR" (AGR)	- 44 -
3 - LE REGULATEUR "STAPHYLOCOCCAL ACCESSORY REGULATOR" (SAR)	- 48 -
4 - LE SYSTEME "AUTOLYSIS RELATED LOCUS" (ARL R/S).....	- 50 -
5 - LE FACTEUR SIGMA B (SIGB).....	- 52 -
6 - LE REPRESSEUR DE L'ADHESION INTERCELLULAIRE (ICA R).....	- 54 -
7 - LE REGULATEUR DE LA FORMATION DE BIOFILM (RBF).....	- 56 -
8 - LES AUTRES REGULATEURS	- 57 -
9 - CONCLUSION	- 58 -

RESULTATS	- 61 -
PARTIE 1 : Aptitude de <i>Staphylococcus carnosus</i> et <i>Staphylococcus xylosus</i> à former des biofilms (Articles 1 et 2).....	- 63 -
1 - PROBLEMATIQUE.....	- 64 -
2 - STRATEGIE	- 64 -
3 - RESULTATS PRINCIPAUX.....	- 65 -
Article n°1 : Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of <i>Staphylococcus carnosus</i>, a genetically homogeneous species	- 67 -
Article n°2 : Formation of biofilm by <i>Staphylococcus xylosus</i>.....	- 85 -
PARTIE 2 : Etude des sous protéomes de <i>Staphylococcus xylosus</i> C2a (Articles 3 et 4).....	- 97 -
1 - PROBLEMATIQUE.....	- 98 -
2 - STRATEGIE	- 98 -
2-1. L'extraction des protéines pariétales	- 99 -
2-2. L'extraction des protéines membranaires	- 100 -
2-3. Choix de l'électrophorèse bidimensionnelle.....	- 101 -
2-4. Identification et recherche de motifs.....	- 102 -
3 - RESULTATS.....	- 103 -
3-1. Résultats préliminaires.....	- 103 -
3-2. Analyse protéomique des fractions pariétales et membranaires (Article 3).	- 107 -
3-3. Comparaison des fractions pariétales, membranaires et intracellulaires en modes de croissance sessile et planctonique (Article 4).....	- 108 -
Article n°3 : Analysis of cell wall and membrane proteins of <i>Staphylococcus xylosus</i> C2a by a proteomic approach.....	- 111 -
Article n°4 : Comparative proteome of surface and intracellular proteins from planktonic and sessile cells of <i>S. xylosus</i> C2a	- 141 -
DISCUSSION	- 167 -
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	- 181 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 187 -
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	- 217 -
NOMENCLATURE.....	- 235 -

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les facteurs impliqués dans la formation de biofilm chez les staphylocoques.....	- 21 -
Tableau 2 : Principaux régulateurs impliqués dans la régulation des biofilms chez les staphylocoques	- 44 -

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Architecture d'un biofilm bactérien sur une surface abiotique	- 15 -
Figure 2 : Etapes de formation d'un biofilm.....	- 18 -
Figure 3 : Schéma de la paroi et de la membrane des bactéries à Gram positif.....	- 20 -
Figure 4 : Estérification des acides teichoïques	- 24 -
Figure 5 : Organisation structurale des différentes MSCRAMMs chez <i>S. aureus</i>	- 26 -
Figure 6 : Représentation schématique de la topologie de l' « Elastin binding Protein » (EbpS) de <i>S. aureus</i>	- 27 -
Figure 7 A : Organisation structurale des autolysines/adhésines Atl de <i>S. aureus</i> , Aas de <i>S. saprophyticus</i> et d'AtlE de <i>S. epidermidis</i>	- 30 -
Figure 8 : Synthèse de l'adhésine polysaccharidique PIA.	- 35 -
Figure 9 : Organisation structurale de la protéine AAP.	- 38 -
Figure 10 : Organisation structurale de la protéine Bap et localisation des domaines « EF-hand-like » dans la séquence de Bap.....	- 41 -
Figure 11 : Fonctionnement du système agr.	- 46 -
Figure 12 : Organisation strusturale du locus <i>sar</i> de <i>S. aureus</i>	- 48 -
Figure 13 : Interactions entre le locus <i>arl</i> et les autres loci régulateurs.....	- 52 -
Figure 14 : Comparaison de l'organisation structurale de l'opéron sigma B de <i>B. subtilis</i> , <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i>	- 53 -
Figure 15 : Schéma de synthèse faisant intervenir les différents systèmes régulateurs.....	- 58 -

INTRODUCTION

S*taphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* sont des coques à Gram positif et catalase positive, immobiles et non sporulés (Kloos & Schleifer, 1986). Ces coques se présentent sous la forme de cellules uniques, par paires ou en tétrades. Parmi les 36 espèces décrites dans le genre *Staphylococcus* (Nagase *et al.*, 2002), seules ces deux espèces appartenant au groupe des staphylocoques à coagulase négative sont utilisées comme ferments dans la fabrication des produits carnés fermentés.

S. carnosus, longtemps assimilé à *Staphylococcus simulans*, a été confirmé comme formant une nouvelle espèce. Néanmoins, *S. carnosus* appartient au groupe de *S. simulans* qui est formé par ces deux espèces (Schleifer & Fischer, 1982 ; Kloos & Schleifer, 1986). *S. carnosus* a été isolé de saucissons secs, de salamis et de jambons crus (Götz, 1990 ; Wagner *et al.*, 1998). Sa niche écologique n'est pas bien connue, bien qu'elle soit en relation avec les animaux et les produits carnés dont il a été isolé. Aucun isolement lié à des infections humaines ou animales à *S. carnosus* n'a jamais été rapporté et cette espèce produit ni entérotoxine, ni coagulase, ni hémolysine ni « clumping » facteur (Euzéby, 2006).

S. xylosus appartient au groupe de *Staphylococcus saprophyticus* qui contient aussi l'espèce *Staphylococcus cohnii* (Kloos & Schleifer, 1986). *S. xylosus* est communément trouvé sur la peau des animaux et occasionnellement sur la peau humaine. Cette bactérie a été isolée des produits animaux et de sources environnementales (Kloos & Schleifer, 1986). Récemment, *S. xylosus* a été impliqué dans divers cas d'infections humaines telles que des pyélonéphrites aiguës, des infections dentaires et du tractus urinaire (Orrett & Shurland, 1998; Esper *et al.*, 2000 ; Siqueira & Lima, 2002) et d'infections animales telles que des mammites et dermites (Almeida & Oliver, 2001 ; Won *et al.*, 2002 ; Cucarella *et al.*, 2004). Des souches portent des résistances aux antibiotiques notamment à la novobiocine et à la pénicilline G (Kloos & Schleifer, 1986 ; Pinna *et al.*, 1999 ; Ug & Ceylan, 2003). Certaines souches de *S. xylosus* isolées de jambon cru et de lait ont été décrites comme productrices d'entérotoxines (Bautista *et al.*, 1988 ; Valle *et al.*, 1990 ; Rodriguez *et al.*, 1996 ; Bedidi-Madani *et al.*, 1998).

S. carnosus et *S. xylosus* sont commercialisés comme ferments de maturation dans l'élaboration des saucissons dans lesquels ils participent aux qualités sensorielles (Talon *et al.*, 2002). Ces deux espèces, via leur nitrate réductase, contribuent à la formation de la couleur caractéristique des saucissons (Talon *et al.*, 1999). Grâce à leurs propriétés antioxydantes, ils limitent également les processus d'oxydation des lipides (Barrière *et al.*, 2001). Ils dégradent certains acides aminés en composés impliqués dans l'arôme des produits (Talon *et al.*, 2002).

S. xylosus et *S. carnosus* peuvent être isolés des surfaces des environnements de fabrication des produits carnés (Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2006). Leur présence et leur persistance dans de tels environnements pourraient être dues à leur capacité à adhérer à des surfaces abiotiques et à former des biofilms permettant une survie prolongée (Davey & O'toole, 2000). Ce mode de développement est sans doute le plus répandu dans l'environnement (Davey & O'toole, 2000 ; Watnick & Kolter, 2000). Concernant les staphylocoques, certaines espèces dont *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* forment des biofilms sur des matériels médicaux. Les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm sont bien connus chez ces deux espèces qui sont responsables d'infections nosocomiales (Peters *et al.*, 1982 ; Christensen *et al.*, 1985 ; Gotz, 2002). D'autres espèces telles que *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* et *Staphylococcus caprae* sont aussi mentionnées comme formant des biofilms mais les mécanismes qui les sous-tendent sont peu ou pas connus (Cramton *et al.*, 1999 ; Atmaca *et al.*, 2000 ; Leriche & Carpentier, 2000 ; Allignet *et al.*, 2001). Dans le domaine médical, la formation de biofilm par les bactéries pathogènes opportunistes (*S. aureus*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) est indésirable et constitue un facteur de pathogénicité. Dans certaines industries agroalimentaires, la colonisation des surfaces par des bactéries saprophytes peut être, au contraire, utile afin de créer une compétition avec des bactéries d'altération ou pathogènes. Ainsi, certaines souches de *S. sciuri* inhibent l'adhésion et la croissance de *Listeria monocytogenes* sur un support acier (Leriche & Carpentier, 2000).

Concernant *S. xylosus*, seuls Norwood *et al.* (2000 ; 2001) ont mentionné qu'une souche de *S. xylosus*, isolée d'environnement alimentaire, était capable de se multiplier au sein d'un biofilm multi-espèces composé de *Pseudomonas fragi* et *L. monocytogenes*. Concernant *S. carnosus*, une seule souche a été étudiée, la souche TM300 isolée de viande, et décrite comme « biofilm négatif » sur des surfaces de polystyrène mais elle est capable d'adhérer sur le verre (Heilmann *et al.*, 1996b ; Gotz, 2002).

L'objectif de ce travail de thèse était d'une part d'évaluer la capacité de diverses souches de *S. xylosus* et *S. carnosus* à former des biofilms sur des surfaces abiotiques, en particulier sur des matériaux utilisés en agroalimentaire, et d'autre part, de caractériser les mécanismes mis en jeu lors de cette croissance en biofilm.

Le premier volet de ce mémoire est une **étude bibliographique** qui fait une synthèse des connaissances développées sur les biofilms des staphylocoques depuis la première démonstration en 1982 jusqu'à aujourd'hui. Cette synthèse recense les différents facteurs

impliqués dans la formation de biofilms par les staphylocoques ainsi que les réseaux de régulation contrôlant la mise en place ou le détachement des biofilms.

Le deuxième volet présente les **résultats** sous la forme de quatre publications rassemblées en deux parties. La première porte sur la capacité des souches de *S. carnosus* (**Article 1**) et de *S. xylosus* (**Article 2**) à former des biofilms sur des surfaces abiotiques, la deuxième porte sur l'étude des protéines de surface de la souche *S. xylosus* C2a avec la mise au point d'une méthode d'extraction des protéines pariétales et membranaires (**Article 3**). Cette méthodologie a été appliquée pour comparer les sous-protéomes pariétaux, membranaires et cytosoliques, de cellules sessiles et planctoniques de *S. xylosus* C2a (**Article 4**). Cette deuxième partie avait pour but de caractériser les mécanismes mis en jeu par *S. xylosus* au cours de la formation d'un biofilm sur une surface abiotique et de mieux comprendre la survie de cette espèce dans l'environnement.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

La formation de biofilm chez les staphylocoques

1 - GENERALITES

Un biofilm peut être défini comme une communauté microbienne attachée à une surface et fréquemment englobée dans une matrice d'exopolymères. Les cellules sessiles présentent des caractéristiques particulières tant au niveau de la croissance que de l'expression génétique et de la production de protéines (Costerton & Lewandowski, 1995 ; Carpentier, 1999 ; Shirtliff *et al.*, 2002 ; Jefferson, 2004).

Les biofilms des écosystèmes naturels mettent en place une stratégie de colonisation des surfaces conduisant à une architecture tridimensionnelle lorsqu'ils sont matures et dans laquelle des micro-colonies peuvent exister sous la forme de structures rappelant la forme de champignons ou de piliers cylindriques (Figure 1).

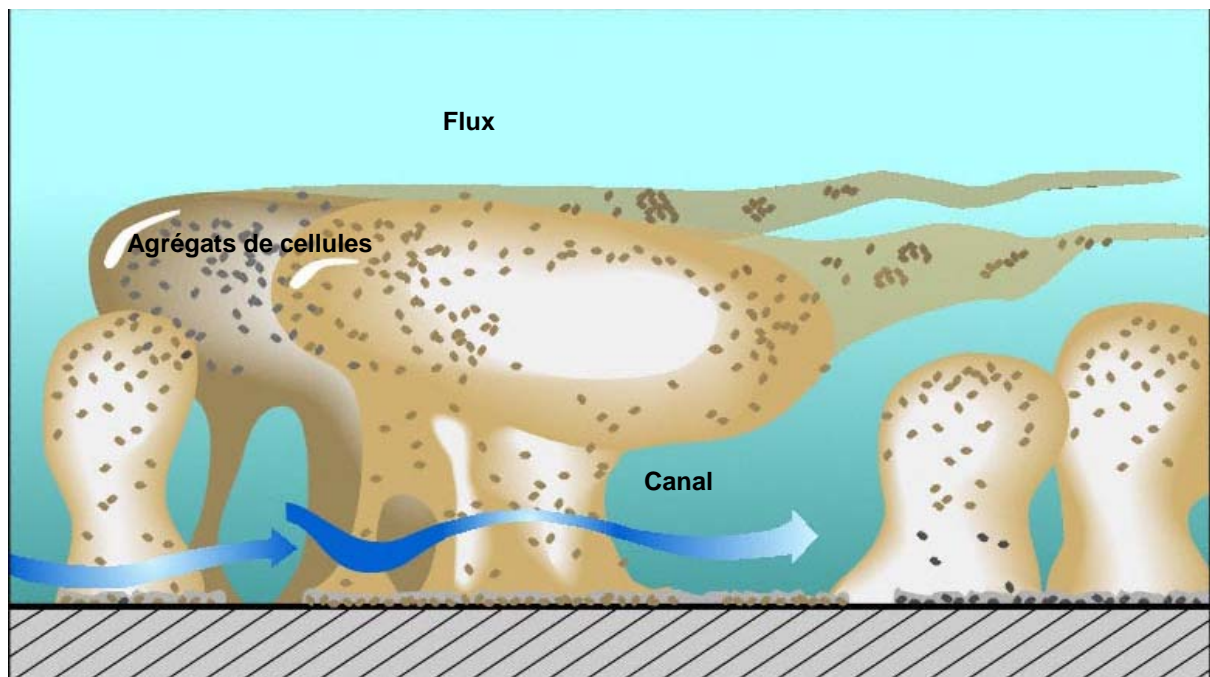


Figure 1 : Architecture d'un biofilm bactérien sur une surface abiotique

Image provenant du site CBE (Center for Biofilm Engineering, 1996).

Un réseau de canaux s'intercale entre ces structures pour fournir un accès aux nutriments et à l'oxygène (Costerton *et al.*, 1999 ; Davey & O'toole, 2000 ; Donlan, 2002). Compte tenu de l'hétérogénéité structurale et microbiologique au sein du biofilm, l'expression des gènes peut être très variable. Elle résulte de nombreux facteurs parmi lesquels la limitation de diffusion dans le biofilm des nutriments et de l'oxygène, les variations de pH et la concentration en métabolites bactériens (Stoodley *et al.*, 2002 ; Jefferson, 2004).

Cependant, la vie en biofilm confère divers avantages. Ainsi, les biofilms, du fait de la forte densité microbienne, sont propices aux échanges de matériel génétique notamment grâce à la conjugaison bactérienne (Davey & O'toole, 2000 ; Watnick & Kolter, 2000). En adoptant un mode de vie sessile, les microorganismes améliorent considérablement la capture et la concentration de nutriments vitaux tels que le carbone, l'azote et le phosphate par la matrice de polymère (Sutherland, 2001a ; Sutherland, 2001b ; Jefferson, 2004). En outre, un autre avantage essentiel de la vie en biofilm concerne les résistances aux antimicrobiens, aux désinfectants, aux défenses de l'hôte et aux agressions environnementales (dessiccation, carence...), qui semblent souvent très accrues chez les microorganismes vivant à l'état fixé (Maris, 1992 ; Schwank *et al.*, 1998 ; Davey & O'toole, 2000). Cet accroissement de résistance est dû à des niveaux métaboliques très bas et des taux de division cellulaire dramatiquement faibles, eux-mêmes étant la conséquence d'une limitation nutritionnelle au sein du biofilm (Costerton *et al.*, 1999 ; Donlan & Costerton, 2002 ; Shirtliff *et al.*, 2002 ; Jefferson, 2004). Cette résistance est aussi due au fait que les biofilms constituent une barrière physique à la diffusion et à la pénétration d'agents antimicrobiens souvent grâce à la présence, en surface des bactéries, d'une matrice amorphe composée principalement d'exopolysaccharides (EPS) (Costerton & Lewandowski, 1995 ; Davey & O'toole, 2000 ; Mah & O'Toole, 2001 ; Dunne, 2002 ; Donlan & Costerton, 2002 ; Shirtliff *et al.*, 2002 ; Vuong *et al.*, 2004a).

2 - HISTORIQUE DE LA FORMATION DE BIOFILM PAR LES STAPHYLOCOQUES

Christensen *et al.* (1982) ont été les premiers à observer la formation d'un biofilm chez une souche de *S. epidermidis* isolée d'un cathéter. Ils ont noté la formation d'un film gluant, filamenteux sur des tubes de culture, puis ils ont visualisé cette substance extracellulaire par une coloration au bleu alcian en microscopie électronique à balayage. Ces auteurs ont noté que la plupart des souches avaient une production variable de cette substance,

qui dépendait du milieu et de la supplémentation en glucose. Ils ont suggéré que la formation de biofilm était un facteur critique dans la pathogénèse de *S. epidermidis*. Ces faits ont été confirmés la même année par Peters *et al.* (1982) qui ont montré une corrélation entre la capacité de colonisation du matériel médical par *S. epidermidis* et les infections nosocomiales.

Christensen *et al.* (1985) ont développé des procédés d'obtention de biofilm en tube plastique et en plaque de microtitration qui sont devenus aujourd'hui des méthodes de référence pour sélectionner des souches formant des biofilms. Les cellules adhérentes sont colorées avec de la safranine, du violet cristal ou du bleu alcian, ce qui permet de quantifier les biofilms formés en raison de la proportionnalité entre le nombre de cellules et la quantité de colorant qu'elles fixent. Cette méthode de dosage a permis de montrer que les souches de *S. epidermidis* responsables d'infections formaient plus de biofilms que les souches de *S. epidermidis* saprophytes (Christensen *et al.*, 1985).

A partir des années 90, de nombreux auteurs ont entrepris l'étude de la composition de la substance extracellulaire des staphylocoques et de justifier sa localisation comme une pseudo-capsule (Tojo *et al.*, 1988 ; Muller *et al.*, 1993 ; McKenney *et al.*, 1998). Cette substance a été diversement nommée et correspondait en fait à l'adhésine intercellulaire polysaccharidique, ou PIA pour « Polysaccharide Intercellular Adhesin », décrite la première fois chez *S. epidermidis* par Mack *et al.* (1992) (cf. section 6.1). Ces observations ont accéléré l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la croissance en biofilm, principalement chez les deux espèces *S. epidermidis* et *S. aureus* qui sont les plus étudiées aujourd'hui.

3 - LES ETAPES DE FORMATION D'UN BIOFILM

Mack *et al.* (1994) ont proposé un modèle de formation de biofilm en deux phases chez les staphylocoques : l'attachement initial et l'accumulation. Ils ont montré que ces deux phases peuvent être génétiquement séparées. La Figure 2 présente les étapes générales observées lors de la formation d'un biofilm.

La première phase est l'adhésion ou attachement initial des cellules à un support solide (**Etape 1**). Ce support est soit le tissu hôte (peau, épithélium...), soit les matériaux utilisés dans le domaine médical (cathéters, prothèses...) ou dans le domaine agroalimentaire (surface de découpe, sols, murs...). L'adhérence initiale est la conséquence d'interactions physico-chimiques non covalentes entre le support et la bactérie telles que les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques, les propriétés acide-base de Lewis et les propriétés

hydrophobes/hydrophiles (cf. section 5.1) (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996 ; Briandet, 1999). L'adhérence est aussi influencée par des composants de la paroi bactérienne tels que les acides teichoïques et des protéines de surface dont des adhésines et des autolysines identifiées chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (cf. sections 5.2 et 5.3) (Oshida *et al.*, 1995 ; Heilmann *et al.*, 1997 ; Foster & Hook, 1998 ; Gross *et al.*, 2001).

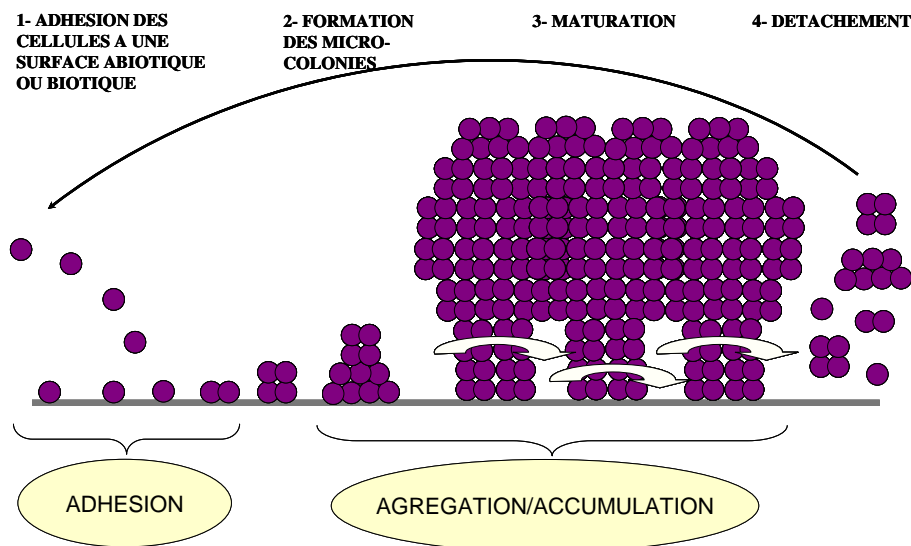


Figure 2 : Etapes de formation d'un biofilm

La deuxième phase est l'agrégation intercellulaire qui conduit à la formation de microcolonies (**Etape 2**). Cette étape inclut la division cellulaire ainsi que la production d'exopolysaccharides et conduit à l'établissement d'un biofilm mature (**Etape 3**). Parmi les facteurs responsables de l'agrégation intercellulaire se trouvent principalement trois composés de surface telles que l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA) décrite chez *S. epidermidis*, *S. aureus* mais également chez *S. caprae* (cf. section 6.1) (Mack *et al.*, 1996 ; Cramton *et al.*, 1999 ; Allignet *et al.*, 2001), la protéine associée à l'accumulation « Accumulation Associated Protein » (AAP) décrite chez *S. epidermidis* (cf. Section 6.2) (Hussain *et al.*, 1997) et la protéine associée au biofilm « Biofilm Associated Protein » (BAP) décrite initialement chez des souches de *S. aureus* d'origine bovine (cf. section 6.3) (Cucarella *et al.*, 2001).

Le vieillissement d'un biofilm est parfois suivi d'une phase de détachement qui permet aux bactéries de coloniser d'autres sites. Ce phénomène est peu étudié chez les staphylocoques. Chez *S. epidermidis*, cette phase a été étudiée en provoquant le détachement par l'utilisation de courants électriques ou par des enzymes qui permettraient d'enrayer les

biofilms établis sur les cathéters (Wu *et al.*, 2003 ; van der Borden *et al.*, 2004). Chez *S. aureus*, la viscoélasticité des biofilms qu'il forme lui permet de résister au détachement causé par des stress mécaniques ou un flux environnant (Rupp *et al.*, 2005). De plus, cette viscoélasticité entraîne un phénomène de « rolling » chez les microcolonies qui leur permettrait de migrer vers d'autres sites. Chez les bactéries, Stoodley *et al.* (2001) ont montré que le détachement spontané de cellules est divisé en 2 processus, l'érosion et le « sloughing ». L'érosion est un détachement continu de cellules uniques et de petits agrégats de cellules tandis que le « sloughing » est la perte massive et rapide du biofilm. L'érosion se produit pendant toute la période de maturation du biofilm tandis que le « sloughing » fait suite à une carence nutritionnelle (Donlan, 2002 ; Stoodley *et al.*, 2002). L'étape de détachement semble être programmée génétiquement, elle faciliterait ainsi la dissémination de l'infection et/ou la colonisation d'autres sites (Wrangstadh *et al.*, 1986 ; Lee *et al.*, 1996 ; Allison *et al.*, 1998 ; Costerton *et al.*, 1999).

La formation de biofilm est un processus dynamique dans lequel les facteurs impliqués dans l'adhésion initiale sont différents de ceux qui favorisent l'accumulation et donc la persistance bactérienne. Mais quelle que soit l'étape, les protéines de surface jouent un rôle important chez les staphylocoques. Nous allons d'abord décrire la structure de la surface des staphylocoques afin de mieux localiser ces protéines. Puis nous exposerons le rôle de ces dernières ainsi que celui des autres facteurs impliqués dans les différentes phases de formation d'un biofilm.

4 - CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DE LA SURFACE DES STAPHYLOCOQUES

Les staphylocoques, bactéries à Gram positif, ont une enveloppe cellulaire composée d'une membrane cytoplasmique unique, entourée par une paroi cellulaire relativement épaisse (Figure 3) (Navarre & Schneewind, 1999 ; Microbiology and Immunology on line, 2002).

La membrane assure de nombreuses fonctions comme le transport de nutriments, le transfert de molécules vers la paroi et le milieu extracellulaire, le métabolisme énergétique, la signalisation cellulaire et les interactions intercellulaires (Kadner, 1981 ; Lodish *et al.*, 2000). Elle est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle viennent s'insérer des protéines (Figure 3). Certaines protéines sont associées à la membrane soit côté cytoplasmique soit côté périsplasmique. Ces protéines sont désignées « protéines de membrane périphérique » ou « protéines de membrane extrinsèques ». Les autres protéines de membrane, qui contiennent

un ou plusieurs domaines transmembranaires, sont nommées « protéines de membrane intrinsèques » ou « protéines de membrane intégrales » (Figure 3).

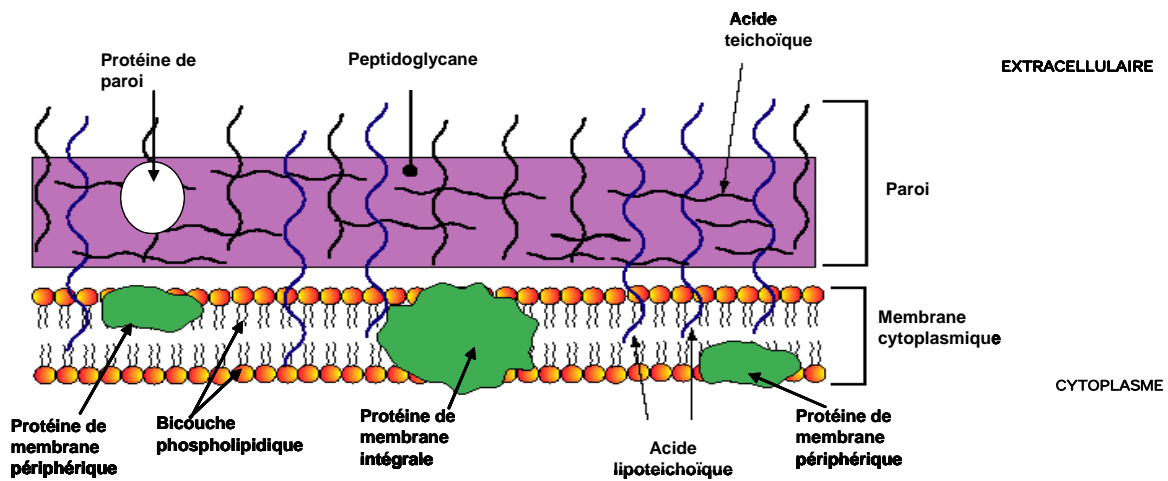


Figure 3 : Schéma de la paroi et de la membrane des bactéries à Gram positif

La paroi recouvrant la membrane assure diverses fonctions telles que la rigidité et la forme des cellules, le transport de nutriments, l'interaction avec l'environnement extérieur et avec les cellules hôtes. Chez certaines souches de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. scirui* et *S. xylosus*, la paroi est entourée d'une capsule polysaccharidique (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Birgersson *et al.*, 1992 ; van der Mei *et al.*, 1997 ; Luong *et al.*, 2002). Elle peut être entourée d'une pseudo-capsule comme le PIA chez *S. epidermidis* (cf. section 6) qui est impliquée dans la virulence (Tojo *et al.*, 1988 ; Muller *et al.*, 1993 ; McKenney *et al.*, 1998). La paroi est composée du peptidoglycane et de polymères anioniques, les acides teichoïques (Figure 3). Le peptidoglycane, substrat des autolysines, est un polymère de sucres aminés liés entre eux par de courts peptides lesquels constituent le composant majeur du squelette de la paroi (Navarre & Schneewind, 1999 ; Gotz, 2004). Les acides teichoïques qui sont liés de façon covalente au réseau du peptidoglycane sont composés en alternance de groupes phosphate et de groupes ribitol. Les acides lipoteichoïques qui sont liés aux glycolipides de la membrane sont composés en alternance de groupes phosphate et de groupes glycérol (Navarre & Schneewind, 1999 ; Peschel *et al.*, 1999 ; Gotz, 2004). Ces polymères anioniques sont responsables de la charge négative de la paroi cellulaire qui jouerait le rôle du périplasma des bactéries à Gram négatif. La paroi renferme des protéines qui sont, pour la plupart d'entre elles, ancrées de façon covalente au peptidoglycane grâce au motif conservé LPXTG chez les bactéries à Gram positif (Antelmann *et al.*, 2002).

Les composants de surface tels que les acides teichoïques et certaines protéines de la paroi et de la membrane ont un rôle bien déterminé dans chaque étape de la formation d'un biofilm (Tableau 1).

Tableau 1 : Les facteurs impliqués dans la formation de biofilm chez les staphylocoques

Protéines	Localisation	Poids moléculaire	Gène	Espèce	Rôle en biofilm
EbpS	Membrane	25 kDa	<i>ebpS</i>	<i>S. aureus</i>	Liaison élastine et tropoélastine solubles
Protéine A (Spa)	Paroi	58 kDa	<i>spa</i>	<i>S. aureus</i>	Liaison immunoglobulines IgG
FnbpA FnbpB	Paroi	108 kDa 103 kDa	<i>fnbA</i> <i>fnbB</i>	<i>S. aureus</i>	Liaison fibronectine
ClfA ClfB	Paroi	97 kDa	<i>clfA</i> <i>clfB</i>	<i>S. aureus</i>	Liaison fibrinogène
Cna	Paroi	133 kDa	<i>cna</i>	<i>S. aureus</i>	Liaison collagène
Atl	Paroi	137 kDa	<i>atl</i>	<i>S. aureus</i>	Attachement primaire
AtIE	Paroi	148 kDa	<i>atIE</i>	<i>S. epidermidis</i>	Attachement primaire Liaison vitronectine
AtIC	Paroi	155 kDa	<i>atIC</i>	<i>S. caprae</i>	Liaison fibronectine
Aas	Paroi	159 kDa	<i>aas</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Attachement primaire Liaison fibronectine
Aae	Paroi	35 kDa	<i>aae</i>	<i>S. epidermidis</i>	Liaison fibronectine, vitronectine et fibrinogène
DltA DltB DltC DltD	Intracellulaire Membrane Intracellulaire Paroi	54 - 56 kDa 47 kDa 9 kDa 44 kDa	<i>dltA</i> <i>dltB</i> <i>dltC</i> <i>dltD</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. xylosus</i>	Attachement primaire Liaison fibronectine
AAP AAP tronquée	Paroi Extracellulaire	220 kDa 140 kDa	<i>aap</i>	<i>S. epidermidis</i>	Accumulation/Agrégation
BAP	Paroi	239 kDa 284 kDa	<i>bap</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Adhésion primaire Accumulation/Agrégation
icaA icaC icaD icaB	Membrane Membrane Membrane Extracellulaire	48 kDa 34 kDa 42 kDa 34 kDa	<i>icaA</i> <i>icaB</i> <i>icaC</i> <i>icaD</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. caprae</i>	Accumulation/Agrégation

5 - LES FACTEURS IMPLIQUES DANS L'ADHESION INITIALE

L'affinité avec laquelle la bactérie adhère à un support est influencée à la fois par les caractéristiques du support et par les propriétés de surface de la cellule bactérienne. L'adhérence initiale est ainsi gouvernée par les interactions physico-chimiques existantes entre ces deux surfaces. Les acides teichoïques sont des composants chargés de la surface qui jouent un rôle clef dans la phase initiale de la formation de biofilm. Les autolysines/adhésines sont des protéines de surface impliquées dans des interactions hydrophobes avec le support lors de l'adhésion.

5-1. Les interactions physicochimiques

La nature de la surface bactérienne détermine les interactions microorganisme-support (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Ainsi, les interactions physicochimiques entre une surface bactérienne et un support résultent d'une combinaison de forces de Van der Waals, de forces électrostatiques, de propriétés acide-base de Lewis et de liaisons hydrophobes (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996 ; Briandet, 1999 ; Krepsky *et al.*, 2003).

Les forces de Van der Waals interviennent entre des molécules neutres. Elles sont de faible intensité contrairement aux liaisons chimiques et généralement attractives (Briandet, 1999 ; Gross *et al.*, 2001). Les forces électrostatiques interviennent entre des molécules chargées. Elles sont répulsives dans le cas où les deux corps interagissant sont de même charge et attractives dans le cas contraire. Les charges de surface des bactéries sont essentiellement dues aux acides teichoïques et aux protéines (Sonohara *et al.*, 1995 ; Briandet, 1999). Les acides teichoïques riches en groupements phosphate sont responsables de la charge négative de surface (cf. sections 4 et 5.2). Les protéines exposent leurs groupements chargés négativement (COO^-) ou positivement (NH_3^+) au niveau de la surface bactérienne résultant ainsi d'une charge globale négative, positive ou neutre. Ces protéines de surface interviennent dans des interactions dites acide-base de Lewis. Ce sont des interactions polaires entre les différents groupements des protéines, plus précisément entre des accepteurs et des donneurs d'électrons. Les interactions polaires sont principalement des liaisons hydrogène mais il existe des interactions secondaires appelées interactions hydrophobes.

Les propriétés de surface du microorganisme et du support vont être influencées par les caractéristiques du milieu environnant telles que la force ionique et la présence de cations divalents (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Barnes *et al.*, 1999 ; Briandet *et al.*, 1999a ; Briandet *et al.*, 1999b). Ainsi, tous les facteurs susceptibles de modifier les propriétés physico-chimiques de surface favorisent ou au contraire limitent l'adhésion bactérienne. Les microorganismes et les supports abiotiques, généralement chargés négativement, sont confrontés aux répulsions électrostatiques dans un milieu de faible force ionique. Or, les forces de Van der Waals peuvent surmonter ces répulsions électrostatiques conduisant ainsi à l'adhésion (Gross *et al.*, 2001). Dans un milieu de force ionique élevée, comme par exemple une solution de NaCl 0.1 M, les interactions électrostatiques deviennent négligeables car les charges des composés en solution masquent celles de la surface cellulaire et du support (Briandet, 1999). Dans ce cas, les interactions sont dominées par les forces de Van der Waals, les propriétés acide-base de Lewis et les liaisons hydrophobes. Ces dernières interviennent entre une surface bactérienne

et un support hydrophobe. L'hydrophobicité de la surface bactérienne peut être due aux acides lipoteichoïques et aux protéines de surface, comme la protéine A et l'autolysine/adhésine AtlE (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Ljungh & Wadstrom, 1995 ; Heilmann *et al.*, 1997). L'encapsulation est impliquée dans l'hydrophobicité de surface contrairement à la production d'exopolysaccharides comme le « slime » qui provoque une hydrophilie de surface chez les staphylocoques (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Heinzelmann *et al.*, 1997 ; van der Mei *et al.*, 1997). Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'hydrophobicité de la surface bactérienne faciliterait la colonisation des cellules épithéliales ainsi que l'adhérence aux matériaux médicaux (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Krepsky *et al.*, 2003).

5-2. Les acides teichoïques

Les acides teichoïques anioniques peuvent séquestrer des cations divalents et/ou fournir une barrière physique pour empêcher la diffusion de certaines substances (Navarre & Schneewind, 1999 ; Peschel *et al.*, 2000). Ils interviennent aussi dans l'attachement des protéines comme les autolysines. Ces polymères de paroi interviennent dans l'adhésion bactérienne à une surface abiotique polaire via les différents mécanismes décrits ci-dessus. Toute modification des acides teichoïques va entraîner des modifications de l'adhésion bactérienne à une surface. En effet, les groupes glycérol ou ribitol de ces acides peuvent être estérifiés sur leurs parties hydroxyles par de la D-alanine et du N-acétyl-glucosamine (Peschel *et al.*, 1999 ; Collins *et al.*, 2002). L'estérification avec de la D-alanine conduit à une diminution dans la charge négative de surface de la bactérie ayant des conséquences sur l'adhésion.

L'opéron *dlt* (Tableau 1) est responsable de l'incorporation de la D-alanine (D-ala) dans les acides teichoïques de l'enveloppe cellulaire chez les staphylocoques (Gross *et al.*, 2001 ; Collins *et al.*, 2002). L'organisation du locus *dlt* est identique chez *S. aureus* et *S. xylosus*, il comprend quatre gènes : *dltA*, *dltB*, *dltC* et *dltD* qui codent des protéines de taille presque similaire chez les deux espèces (Peschel *et al.*, 1999). Des études menées chez *Lactobacillus casei* ont permis de comprendre le rôle de chacune des protéines (Figure 4) (Debabov *et al.*, 1996 ; Peschel *et al.*, 1999).

DltA (A) est une ligase qui active la D-alanine (D-Ala) par hydrolyse de l'ATP et la transfère à un cofacteur, la phosphopantothéine, spécifique de la protéine DltC (C) transporteur de D-alanine dans le cytoplasme. La protéine membranaire hydrophobe DltB (B) semble impliquée dans le transfert de D-alanine à travers la membrane cytoplasmique. DltD

(D) porteuse d'un peptide signal putatif est supposée catalyser l'estérification du groupe ribitol avec la D-alanine.

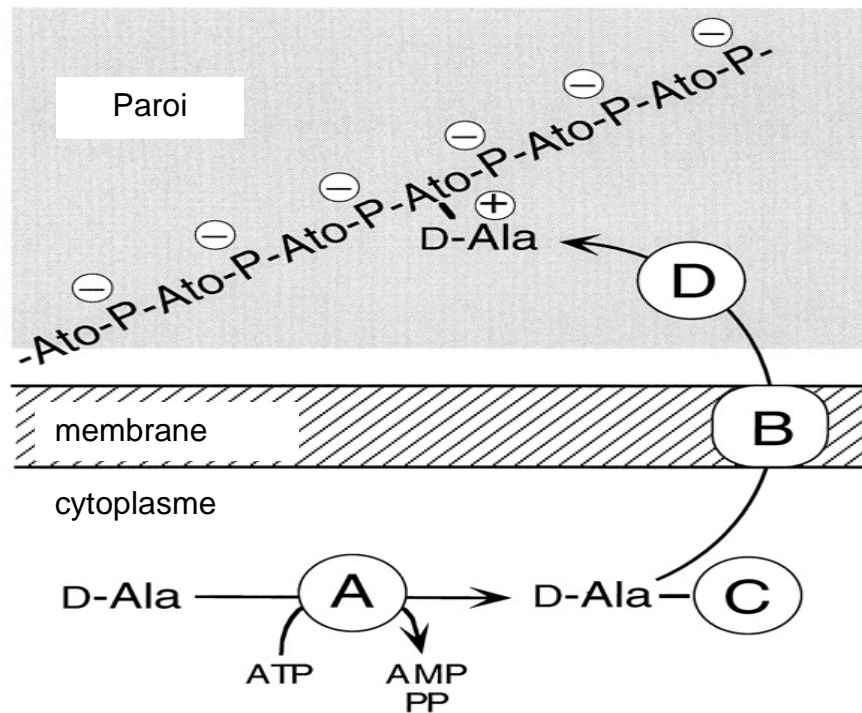


Figure 4 : Estérification des acides teichoïques

Une molécule d'acide teichoïque est composée par alternance de groupements ribitol (Ato) et de groupements phosphate (P), (Peschel *et al.*, 1999).

Chez *S. aureus*, un mutant *dltA*, déficient dans l'incorporation de la D-alanine présente une charge de surface très négative. Cette mutation entraîne une diminution dans l'adhésion à des surfaces polaires (Gross *et al.*, 2001). Ce mutant est uniquement déficient dans le mécanisme d'adhésion primaire, l'adhésion intercellulaire n'étant pas affectée. Le phénotype « biofilm positif » peut être restauré par ajout de cations divalents au milieu qui neutralisent la charge négative à la surface de la cellule du mutant diminuant ainsi la répulsion électrostatique (Gross *et al.*, 2001). Ces résultats confortent le rôle de la charge des acides teichoïques dans l'adhésion bactérienne à des surfaces polaires. D'autres auteurs ont montré que les acides teichoïques amplifiaient l'adhésion de *S. epidermidis* à des surfaces recouvertes de fibronectine (Hussain *et al.*, 2001b). Cette amplification est observée lors de l'addition d'acides teichoïques soit sur la surface recouverte de fibronectine, soit aux cellules de *S. epidermidis*. Elle n'est pas observée lorsque la surface est recouverte directement d'acides teichoïques. Ces observations suggèrent que les acides teichoïques serviraient de liaison entre la surface bactérienne et la fibronectine. Cependant, cette adhésion est sensible à la trypsine et

au périodate suggérant qu'une protéine de surface de type adhésine pourrait être aussi impliquée.

5-3. Les adhésines

Ce sont des protéines de surface permettant à la cellule bactérienne d'adhérer à différentes protéines de l'hôte et à des surfaces abiotiques. Elles regroupent les MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) et les autolysines/adhésines.

5-3.1. Les Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules ou MSCRAMMs

S. aureus se lie à une grande variété de molécules du plasma (fibrinogène, fibrine...) et de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, vitronectine...) : les MSCRAMMs (Foster & Hook, 1998). Ces composés de surface servent de récepteurs aux protéines du plasma adsorbées à la surface du matériel médical (cathéters, prothèses...) expliquant ainsi la colonisation par *S. aureus* (Navarre & Schneewind, 1999). La formation de biofilm se produit aussi lors de l'infection de tissus par l'adhésion bactérienne aux molécules de la matrice extracellulaire de l'hôte (Gotz, 2002).

Parmi les MSCRAMMs, on trouve les protéines liant la fibronectine « Fibronectin Binding Protein » (FnBPA et FnBPB), la protéine liant le collagène (Cna), les protéines liant le fibrinogène (les « clumping » facteurs ClfA et ClfB), la protéine liant l'élastine « Elastin binding protein of S. aureus » (EbpS) et la protéine A (Spa) liant les immunoglobulines (IgG) (Foster & Hook, 1998). Ces protéines, exceptée EbpS, sont liées au peptidoglycane de la paroi de façon covalente grâce à un motif LPXTG (Mazmanian *et al.*, 2001).

Les MSCRAMMs ont une organisation typique des protéines de surface et une organisation structurale assez similaire entre elles (Figure 5) (Navarre & Schneewind, 1999). Elles possèdent toutes une séquence signal (S) en N-terminale requise pour leur translocation vers la paroi via le système de sécrétion Sec. La partie C-terminale contient les régions hydrophobes d'ancrage dans la paroi (W) et dans la membrane (M), une séquence contenant le motif LPXTG qui s'insère entre les domaines W et M, et une queue de résidus chargés positivement (Figure 5). Les MSCRAMMs diffèrent entre elles par l'existence de différents domaines A, B, C, D, E et R correspondants à des répétitions de séquences et par la localisation de leur site de liaison au ligand.

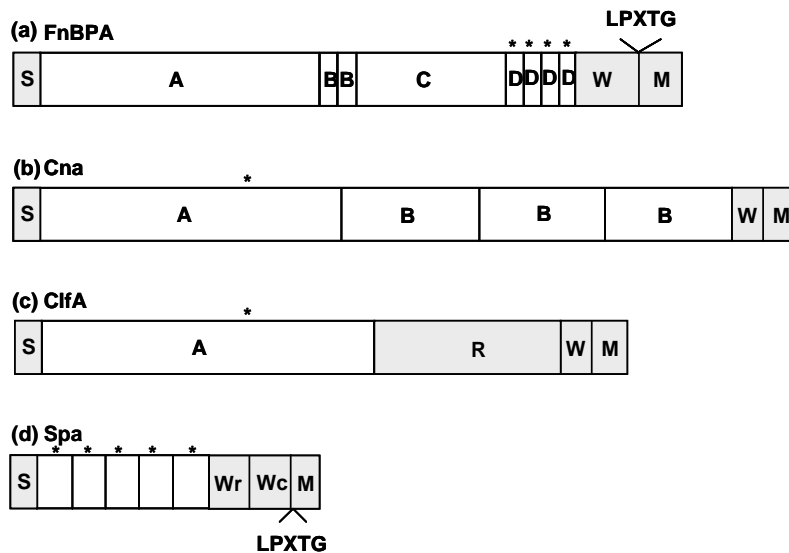


Figure 5 : Organisation structurale des différents MSCRAMMs chez *S. aureus*

Les domaines de liaison au ligand sont surmontés d'une astérisque (Foster & Hook, 1998).

5-3.1.1. La protéine A

La protéine A dénommée Spa pour « Staphylococcal protein A » fut la première MSCRAMM décrite chez *S. aureus*. Elle est composée de cinq domaines extracellulaires désignés E, D, A, B et C et deux domaines d'ancrage à la paroi Wr et Wc (Figure 5) (Lofdahl *et al.*, 1983 ; Uhlen *et al.*, 1984).

Chaque domaine extracellulaire lie les domaines Fc de la molécule d'immunoglobuline (IgG) (Foster & Hook, 1998 ; Navarre & Schneewind, 1999 ; Hartleib *et al.*, 2000 ; Palmqvist *et al.*, 2005). Ainsi, Spa entre en compétition avec les cellules de phagocytose pour les sites Fc des IgG et par conséquent, diminue l'opsonisation provoquée par les IgG (Hartleib *et al.*, 2000). Les domaines D et E de la protéine A sont aussi capables de lier les fragments Fab des IgG et les IgM des lymphocytes B (Hartleib *et al.*, 2000 ; Palmqvist *et al.*, 2005). Chez *S. aureus*, Spa induit aussi l'activation du complément à travers sa liaison avec les IgM et agit comme un facteur de virulence (Palmqvist *et al.*, 2002). La protéine A permet l'attachement de *S. aureus* au facteur de Von Willebrand qui est présent au niveau des sites endommagés de l'épithélium (Navarre & Schneewind, 1999 ; Hartleib *et al.*, 2000). Ainsi, elle joue un rôle d'adhésine pendant la première phase de l'infection endovasculaire. La protéine A peut aussi interagir avec les filaments d'actine au niveau des cellules épithéliales de mammifères ce qui permettrait l'internalisation de *S. aureus* et/ou sa dissémination comme cela a été démontré pour *L. monocytogenes* (Jung *et al.*, 2001).

5-3.1.2. La protéine EbpS

Chez *S. aureus*, la protéine EbpS lie l'élastine présente dans les tissus tels que les poumons, la peau, les vaisseaux sanguins... (Downer *et al.*, 2002). Cette protéine ne possède ni peptide signal, ni de motif LPXTG, ni de domaine hydrophobe dans sa partie C-terminale. EbpS est une MSCRAMM associée à la membrane et non à la paroi comme cela avait été initialement décrit (Park *et al.*, 1996). Le site de liaison de l'EbpS à l'élastine est situé dans sa partie N-terminale (Park *et al.*, 1999). Dans sa partie centrale, EbpS possède trois domaines hydrophobes (H1, H2 et H3) dont les deux premiers présentent 75% d'identité. Seuls les domaines H1 et H3 seraient transmembranaires (Figure 6).

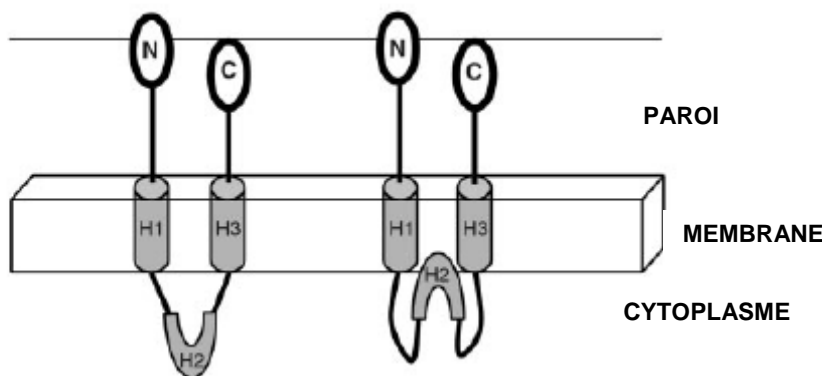


Figure 6 : Représentation schématique de la topologie de l' « Elastin binding Protein » (EbpS) de *S. aureus* (Downer *et al.*, 2002).

Le domaine hydrophobe H2 peut être associé à la membrane. Les domaines C-terminale et N-terminal sont localisés du côté de la paroi cellulaire. Dans sa partie C-terminale, la protéine contient un motif lysine appelé LysM, largement répandu chez les procaryotes ayant une fonction de liaison au peptidoglycane. Ce motif est principalement trouvé dans les enzymes dégradant la paroi telles que les autolysines. Il est aussi présent dans des protéines associées à l'enveloppe telles que la protéine A de *S. aureus* et l'intimine chez *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) qui se lie aux cellules de mammifère (Downer *et al.*, 2002 ; Heilmann *et al.*, 2003). Récemment, une étude a démontré que l'EbpS était impliquée uniquement dans la liaison à l'élastine et à la tropoélastine solubles (Roche *et al.*, 2004). Compte tenu de sa structure atypique de MSCRAMM, EbpS aurait une autre fonction que l'attachement à la matrice extracellulaire (Downer *et al.*, 2002).

5-3.1.3. Les protéines FnbpA et FnbpB

Les protéines FnBPA et FnBPB sont similaires dans leur organisation générale aux protéines liant la fibronectine des autres bactéries à Gram positif (Navarre & Schneewind, 1999). Ces deux protéines diffèrent essentiellement dans leur partie N-terminale, avec seulement 45% de similitude entre FnBPB et FnBPA dans cette partie. Elles diffèrent aussi par le fait que FnBPB est dépourvue du domaine B qui s'insère entre les domaines A et C chez FnBPA (Figure 5). Elles possèdent le site de liaison du ligand dans le domaine D, localisé à proximité du domaine W en C-terminale. Le domaine D lie la fibronectine au niveau de sa partie N-terminale composée de motifs répétés. La mutation d'un des deux gènes *fnbA* ou *fnbB* n'affecte pas significativement l'adhésion de *S. aureus* à des surfaces recouvertes de fibronectine tandis qu'elle est complètement abolie dans le double mutant (Greene *et al.*, 1995). De plus, les protéines FnBPA et FnBPB sont capables de se lier aux tissus contenant l'élastine plus fortement que la protéine EbpS (Roche *et al.*, 2004). En effet, les mutants *EbpS* continuent à adhérer à des surfaces recouvertes d'élastine tandis que les doubles mutants *FnbpA* et *FnbpB* n'adhèrent plus à ces surfaces.

5-3.1.4. La protéine Cna

Chez *S. aureus*, la protéine Cna permet d'adhérer aux tissus contenant du collagène comme le cartilage. Elle contient uniquement les domaines A et B (Figure 5). Son site de liaison au ligand est situé dans la partie N-terminale du domaine A (Foster & Hook, 1998). Le nombre de répétitions dans les deux domaines peut varier d'une souche à l'autre et leur rôle reste à déterminer. Une mutation du gène *cna* entraîne une diminution dans la virulence des souches de *S. aureus* dans un modèle expérimental d'arthrite chez la souris (Patti *et al.*, 1994). En effet, 70% des animaux développent la maladie avec les souches *cna+* contre moins de 27% avec les souches *cna-*.

5-3.1.5. Les protéines ClfA et ClfB

Ces protéines lient le fibrinogène grâce au domaine A contenant le site de liaison au ligand dans la partie N-terminale (Figure 5). Elles appartiennent à une famille multigénique « Sdr » de protéines de surface putatives, caractérisées par un domaine commun, le domaine R. Ce domaine est composé d'une répétition du dipeptide Sérine-Asparagine appelé Sdr pour « SD repeats ». Il existe d'autres protéines Sdr (SdrC, SdrD, SdrE) mais leurs rôles dans l'infection de l'hôte sont mal déterminés aussi bien chez *S. aureus* que chez *S. epidermidis* (Foster & Hook, 1998 ; Josefsson *et al.*, 1998 ; McCrea *et al.*, 2000). Le motif « EF-hand

like » qui est un site de liaison au calcium a été trouvé dans le domaine A démontrant que la liaison de ClfA au fibrinogène est régulée par des concentrations en calcium de l'ordre du millimolaire (Foster & Hook, 1998). Dans le plasma, la liaison de ClfA au calcium empêche sa liaison au fibrinogène ; par contre au niveau des sites de coagulation où le taux de calcium est plus faible, la liaison au fibrinogène peut avoir lieu. La protéine ClfA est présente en surface de *S. aureus* à tous les stades de croissance contrairement à ClfB qui est seulement présente en surface des cellules en phase logarithmique de croissance sous aérobiose. Chez *S. aureus*, ClfA permet aussi l'adhésion à des tubes en polyéthylène ou polyvinyl-chloride suggérant qu'elle est impliquée dans la colonisation de matériels médicaux entraînant des infections (Vaudaux *et al.*, 1995 ; Navarre & Schneewind, 1999 ; Gotz, 2002). Chez *S. epidermidis*, une protéine de liaison à la fibronectine et au fibrinogène appelée Fbe (Nilsson *et al.*, 1998) présente des similitudes structurales avec ClfA de *S. aureus*. De plus, Fbe, tout comme ClfA, est un membre de la famille Sdr (SdrG), (McCrea *et al.*, 2000 ; Vuong & Otto, 2002). Cependant, la contribution de la protéine Fbe, chez *S. epidermidis*, dans la formation de biofilm sur des supports abiotiques n'a pas été étudiée.

D'autres protéines sont capables de lier la matrice extracellulaire de l'hôte telles que Eap pour « Extracellular Adherence Protein » (Harraghy *et al.*, 2003), Ebh pour « Extracellular matrix Binding Homologue Protein » (Clarke *et al.*, 2002) et Emp pour Extracellular matrix binding Protein (Hussain *et al.*, 2001a) chez *S. aureus*, ainsi qu'Embp chez *S. epidermidis* (Williams *et al.*, 2002).

Ces deux espèces sont aussi capables de coloniser des supports abiotiques par la présence de protéines de surface hydrophobes, les autolysines/adhésines.

5-3.2. Les autolysines/adhésines

Les autolysines bactériennes sont des hydrolases du peptidoglycane qui jouent un rôle important dans le « turn-over » de la paroi, dans la division cellulaire, la séparation des cellules et la lyse des cellules bactériennes (Navarre & Schneewind, 1999). Elles contribuent à la virulence en facilitant le relargage de toxines et de composants de la paroi immunologiquement actifs (Hell *et al.*, 1998 ; Heilmann *et al.*, 2003). La liaison des enzymes autolytiques à leurs substrats ainsi que la régulation de leur activité seraient contrôlées par les acides teichoïques et lipoteichoïques (Hell *et al.*, 1998 ; Peschel *et al.*, 2000). Chez *S. epidermidis*, *S. caprae* et *S. saprophyticus*, les autolysines sont responsables de l'attachement à des surfaces plastiques et aux cellules eucaryotes (Heilmann *et al.*, 1997 ; Hell *et al.*, 1998 ; Allignet *et al.*, 2001).

De nombreuses autolysines ont été décrites chez les staphylocoques mais elles possèdent toutes une organisation structurale assez similaire (Figure 7A). Les autolysines décrites chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. caprae* et *S. saprophyticus* contiennent un peptide signal (S) suivi de deux domaines, un domaine alanine amidase (AA) et un domaine glucosaminidase (GL) ainsi que trois répétitions de séquences (R1, R2 et R3) (Heilmann *et al.*, 1997 ; Hell *et al.*, 1998 ; Allignet *et al.*, 2001). Ces deux domaines sont clivés au niveau post traductionnel en deux enzymes fonctionnelles, une N-acétyl-muramyl-L-alanine amidase de 62 kDa et une endo- β -N-acétyl-D-glucosaminidase de 51 kDa. Les répétitions R1 et R2 sont dans la portion C-terminale de l'amidase et la répétition R3 est dans la partie N-terminale de la glucosaminidase (Heilmann *et al.*, 1996a ; Heilmann *et al.*, 1997). La maturation de l'autolysine a lieu après l'incorporation dans la paroi. Les deux enzymes sont associées avec le septum de division cellulaire, démontrant leur implication dans le « turn-over » de la paroi pendant la croissance cellulaire. Les répétitions R1, R2 et R3 semblent avoir un double rôle (Hell *et al.*, 1998). Elles permettent la liaison de l'autolysine aux acides lipoteichoïques et de ce fait, permettent aux enzymes AA et GL d'accéder à leurs substrats. Elles seraient aussi impliquées dans les propriétés adhésives qui seraient dues à la présence de motifs GW (dipeptide Glycine-Tryptophane) dans la partie centrale et à la fin de chaque répétition. En effet, ces motifs GW ont été décrits chez l'autolysine Ami de *L. monocytogenes* comme permettant d'une part, l'ancrage dans la paroi puisque l'autolysine est dépourvue du motif LPXTG et d'autre part, l'adhésion aux cellules eucaryotes (Milohanic *et al.*, 2001).

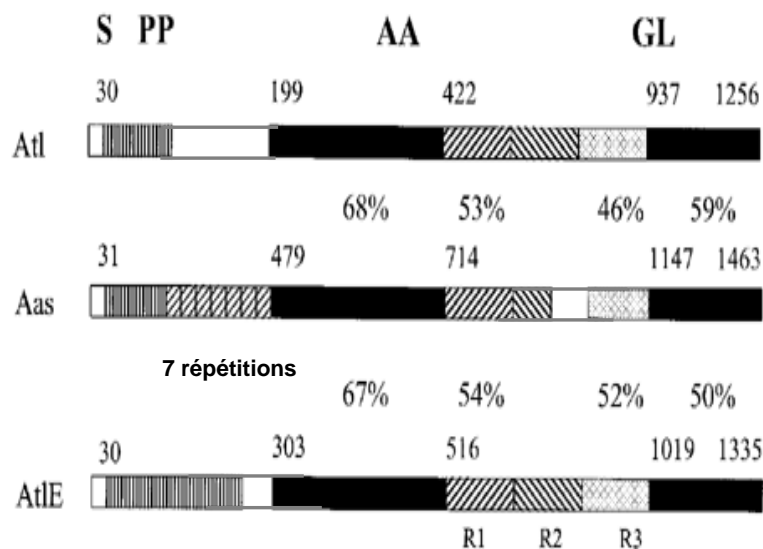


Figure 7 A : Organisation structurale des autolysines/adhésines Atl de *S. aureus*, Aas de *S. saprophyticus* et d'AtIE de *S. epidermidis*

Les similitudes entre les différentes autolysines et ATL sont données en pourcentage. Ces autolysines sont sous la forme d'un propeptide (PP) après le clivage du peptide signal et avant la maturation en deux enzymes fonctionnelles (Hell *et al.*, 1998).

La première autolysine décrite fût Atl chez *S. aureus* qui est codée par le gène *atl* (Oshida *et al.*, 1995). Une mutation dans ce gène a des effets pleiotropiques sur la nature de la surface de la cellule (Takahashi *et al.*, 2002). Le mutant présente une inhibition complète du « turn-over » de la paroi mais aussi une diminution générale du taux de protéines à la surface de la cellule. Or, la fonction d'Atl dans l'adhésion n'a pas été décrite contrairement à l'autolysine AtlE chez *S. epidermidis* (Heilmann *et al.*, 1997). En effet, les domaines répétés d'AtlE révèlent une capacité de liaison à la vitronectine mais pas à la fibronectine ainsi ils seraient impliqués dans la liaison aux protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte (Heilmann *et al.*, 1997). Le mutant *atlE* de *S. epidermidis* montre un défaut dans la séparation des cellules probablement dû au manque d'activité amidase au niveau du septum cellulaire pendant la division cellulaire (Cramton *et al.*, 2001a). D'autres auteurs ont montré que des souches de *S. epidermidis* déficientes dans la production de l'autolysine sont moins virulentes dans un modèle animal causant moins d'infections liées à la présence de cathéters (Rupp & Fey, 2001 ; Rupp *et al.*, 2001). Un autre mutant construit par insertion d'un transposon dans le gène *atlE* présente une déficience dans l'attachement à une surface de polystyrène mais il est encore capable d'adhérer et de former des biofilms sur des surfaces de verre (Heilmann *et al.*, 1997). Chez ce mutant, plusieurs protéines de surface correspondant à différents produits de clivage de la protéine AtlE sont manquantes (Heilmann *et al.*, 1996a ; Heilmann *et al.*, 1996b). Ceci démontre l'implication de l'autolysine AtlE dans l'attachement primaire à une surface hydrophobe.

Une autolysine Aas a été mise en évidence chez *S. saprophyticus* (Hell *et al.*, 1998). Cette autolysine lie la fibronectine, le fibrinogène et le collagène. Aas possède en plus une activité hémagglutinine des érythrocytes. L'ORF *aas* de 4392 bp code une protéine proche des autolysines Atl de *S. aureus* et AtlE de *S. epidermidis* dans sa partie C-terminale. Mais, il n'existe aucune identité dans la partie N-terminale entre Aas et les autres autolysines (Figure 7A). Cette partie contient 7 séquences répétées contigües de 40 acides aminés chez *S. saprophyticus* qui sont absentes chez les autres autolysines de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Hell *et al.*, 1998). Par contre, les 3 répétitions R1, R2 et R3 sont similaires chez les trois autolysines excepté la répétition R2 d'Aas qui a une délétion de 86 acides aminés (Hell *et al.*, 1998).

Une autolysine AtlC a aussi été décrite chez *S. caprae* (Allignet *et al.*, 1999 ; Allignet *et al.*, 2001). Cette autolysine se lie uniquement à la fibronectine. La fonction d'AtlC dans l'attachement initial à une surface abiotique n'a pas été étudiée. Par analogie de structure avec AtlE, les autolysines AtlC et Atl doivent aussi posséder des propriétés adhésives (Figure 7B).

Les autolysines/adhésines de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. caprae* et de *S. saprophyticus* ont évolué à travers la fusion des gènes codant l'amidase, la glucosaminidase et l'adhésine (Oshida *et al.*, 1995 ; Hell *et al.*, 1998).

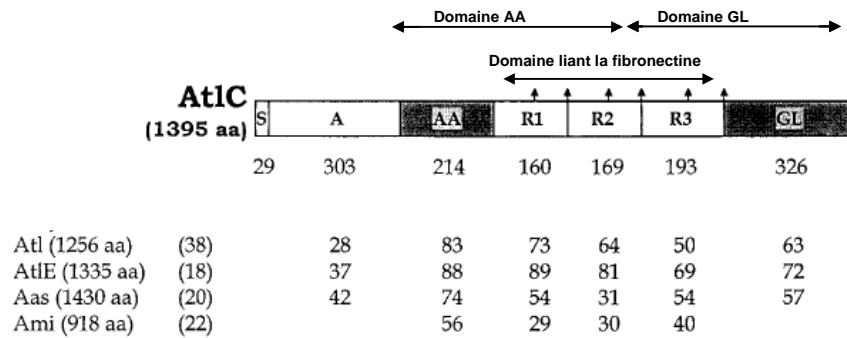


Figure 7B : Comparaison entre l'autolysine AtIC de *S. caprae* et les autres autolysines Atl, AtlE, Aas et également l'autolysine Ami de *L. monocytogenes*

Les similitudes entre les différentes autolysines et ATLC sont données en pourcentage (Allignet *et al.*, 2001).

Une autre autolysine/adhésine Aae a été décrite chez *S. epidermidis* mais elle est structurellement différente d'AtlE (Heilmann *et al.*, 2003). Cette protéine de surface a une activité bactériolytique et se lie aux composés de la matrice extracellulaire (vitronectine, fibronectine et fibrinogène). Le domaine N-terminale d'Aae contient trois séquences répétées qui sont similaires à une séquence consensus LysM (Heilmann *et al.*, 2003). Ce motif est aussi trouvé dans une variété d'enzymes dégradant la paroi cellulaire comme la muramidase chez *L. monocytogenes*, l'autolysine chez *Enterococcus faecalis* et le lysozyme chez *Bacillus subtilis* (Joris *et al.*, 1992). La présence du motif similaire à LysM dans Aae doit être responsable de sa localisation à la surface car Aae ne possède pas de région d'ancrage en C-terminale telle que le motif LPXTG. La partie C-terminale d'Aae est requise pour l'activité bactériolytique mais pas pour ses propriétés adhésives et elle possède des similitudes avec la protéine sécrétée antigénique SsaA « Staphylococcal Secretory Antigen » de *S. epidermidis*.

Il existe des autolysines homologues chez d'autres staphylocoques : *S. simulans* (Bph, Aldous W.K *et al.* unpublished, NCBI), *S. xylosus* (Asx, Hell W. *et al.*, unpublished, NCBI), *S. saprophyticus* (Kuroda M. *et al.*, unpublished, NCBI), *S. cohnii* (Hell W. *et al.*, unpublished, NCBI), *S. capitis*, *S. piscifermentans*, *S. hominis*, *S. condimenti* et *S. schleiferi* (Moretro *et al.*, 2003).

6 - LES FACTEURS IMPLIQUES DANS L'AGREGATION INTERCELLULAIRE

L'agrégation ou adhésion intercellulaire constitue la deuxième étape de formation d'un biofilm. Cette étape fait principalement intervenir des composés de surface comme l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA), la protéine associée à l'accumulation (AAP) et la protéine associée au biofilm (BAP) (Tableau 1).

6-1. L'Adhésine Polysaccharidique Intercellulaire (PIA)

6-1.1. Description du PIA

Le PIA est un polysaccharide découvert chez *S. epidermidis* par Mack et al. (1992) Il est principalement localisé à la surface de la cellule (Heilmann *et al.*, 1996a ; Heilmann *et al.*, 1996b). Il joue un rôle important dans l'adhésion intercellulaire et de ce fait, a été reconnu comme un facteur crucial dans la colonisation de matériel médical par *S. epidermidis* mais également par *S. aureus* (Mack *et al.*, 1996 ; Gerke *et al.*, 1998 ; Cramton *et al.*, 1999). Le PIA pourrait aussi agir en coopération avec une autre protéine ou un autre polysaccharide pour entraîner l'hémagglutination des érythrocytes (Fey *et al.*, 1999 ; Rupp *et al.*, 1999).

Chez *S. epidermidis*, le PIA est un homoglycane de 28 kDa, de structure linéaire, composé de deux fractions (Mack *et al.*, 1996 ; Gotz, 2002). La fraction 1 (80%) est un polymère de N-acétyl-glucosamine dont les unités sont liées entre elles par des ponts β (1-6) glycosidiques. C'est une chaîne moyenne de 130 résidus de 2-désoxy-2-amino-D-glucopyranosyl (Mack *et al.*, 1996). Cette fraction contient 15 à 20% de résidus partiellement déacétylés distribués au hasard le long de la molécule la rendant ainsi positivement chargée. La fraction 2 (20%) est décrite comme modérément anionique, structurellement proche de la fraction 1, mais ayant une proportion plus faible de résidus D-glucosaminyl non acétylés et contenant des groupes phosphate et succinate. D'après sa composition, le PIA est à la fois positivement et négativement chargé et donc peut être lié via des forces ioniques au peptidoglycane ou aux acides teichoïques (Mack *et al.*, 1996). Il n'est pas détruit par digestion à la protéase. Il peut être relargué de la surface bactérienne par des traitements drastiques comme la sonication ou de fortes concentrations en sel (Heilmann *et al.*, 1996b).

6-1.2. Les différents polysaccharides décrits

Plusieurs molécules décrites dans la littérature et nommées différemment sont en fait identiques ou ressemblent au PIA, ce qui entraîne une certaine confusion. Ainsi, certains

auteurs ont décrit une molécule de nature polysaccharidique chez *S. epidermidis* qu'ils ont appelée SAA pour « Slime Associated Antigen ». Elle est localisée à la surface de la cellule grâce à un anticorps spécifique (Christensen *et al.*, 1990 ; Baldassarri *et al.*, 1996 ; Ammendolia *et al.*, 1999). Ce polysaccharide était de composition chimique différente des acides teichoïques (Hussain *et al.*, 1991 ; Hussain *et al.*, 1992 ; Sadovskaya *et al.*, 2004).

De même, Tojo *et al.* (1988) ont isolé une adhésine polysaccharidique capsulaire ou PS/A pour « Polysaccharide Capsular Adhesin » de souches de *S. epidermidis*. Cet antigène de surface est constitué de façon prédominante de galactose et de glucosamine et fonctionnerait comme une capsule polysaccharidique extracellulaire. Plus tard, le PS/A appelé aussi le PNSG pour « Poly-N-Succinyl Glucosamine » a été décrit comme étant composé d'un polymère de haut poids moléculaire de résidus glucosaminyl liés en β 1-6 et substitués au niveau des amines par des groupes succinate et acétate (Mack *et al.*, 1996 ; McKenney *et al.*, 1998). En 2002, ce polysaccharide a été isolé du surnageant de culture d'une souche de *S. aureus* contrairement aux autres études où il est associé à la paroi de la cellule (Mair-Litran *et al.*, 2002). Il est décrit alors comme étant une molécule de N-acétyl-glucosamine liée en β 1-6 et appelée PNAG (poly- β 1,6-N-acétylglucosamine) ayant différentes masses moléculaires.

Tout comme le PIA, le PS/A ou PNSG entraînerait l'adhésion intercellulaire. Il est responsable de l'adhérence initiale précoce aux polymères de surface chez *S. epidermidis* (McKenney *et al.*, 1998). En effet, le PS/A a été décrit comme permettant l'adhésion des bactéries aux surfaces des cathéters en silice et sa présence est associée à la production de « slime » (Tojo *et al.*, 1988 ; Muller *et al.*, 1993 ; Mack *et al.*, 1994 ; McKenney *et al.*, 1998). Le PS/A ou PNSG diffère du PIA par sa taille, par ses propriétés biophysiques telles que la solubilité et l'immunogénicité, et par la présence de groupes succinate (Mack *et al.*, 1996 ; McKenney *et al.*, 1998).

En fait, toutes ces molécules ont le même squelette polysaccharidique que le PIA mais sont substituées différemment produisant ainsi des molécules avec des tailles et des propriétés physicochimiques différentes (Sadovskaya *et al.*, 2005).

6-1.3. Les gènes responsables de la synthèse du PIA

La synthèse du PIA est codée par le locus *ica* pour « InterCellular Adhesion » chez *S. epidermidis*, *S. aureus* et *S. caprae* (Mack *et al.*, 1996 ; Cramton *et al.*, 1999 ; Allignet *et al.*, 2001). Ce locus est aussi responsable de la synthèse du PS/A chez *S. epidermidis*

montrant ainsi que ces deux molécules sont apparentées voire identiques (Mack *et al.*, 1996 ; McKenney *et al.*, 1998).

Le locus *ica* comprend les 4 gènes *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC* qui sont co-transcrits à partir du promoteur d'*icaA* et le gène régulateur *icaR* en amont (Heilmann *et al.*, 1996b ; Gerke *et al.*, 1998 ; Cramton *et al.*, 1999 ; Gotz, 2002). La protéine *icaA* a une activité glucosaminyl transférase augmentée en présence de la protéine *icaD* qui agirait comme une protéine chaperonne dirigeant le repliement et l'insertion d'*icaA* dans la membrane (Figure 8) (Gerke *et al.*, 1998 ; Gotz, 2002).

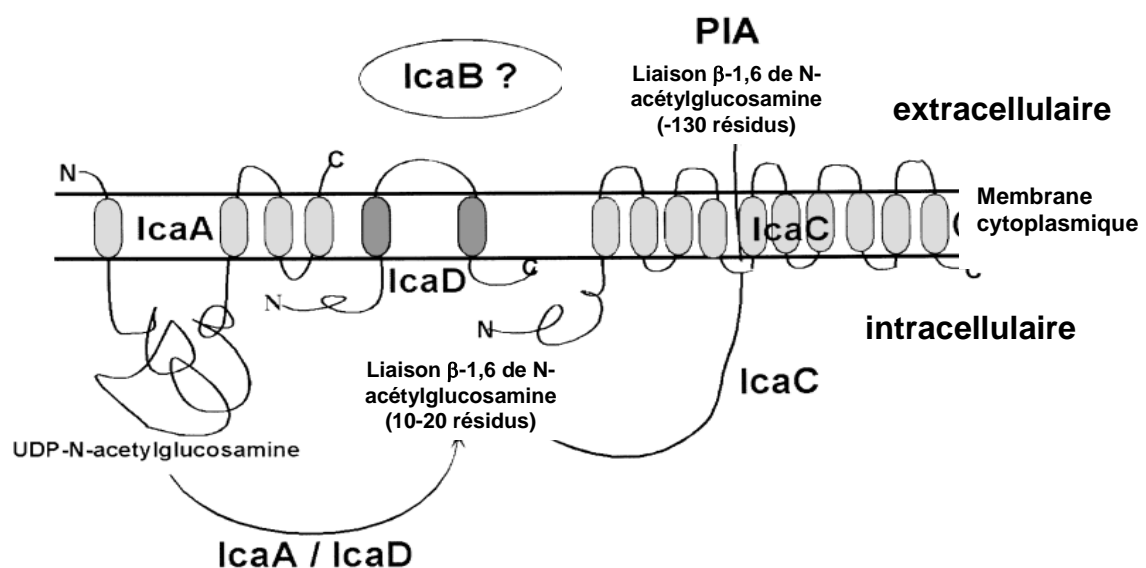


Figure 8 : Synthèse de l'adhésine polysaccharidique PIA (Gotz, 2002).

Le polymère produit par l'activité de ces 2 protéines est composé de 20 résidus d'UDP-N-acétylglucosamine. La protéine *icaC* permet de former de plus longues chaînes d'oligomères, elle doit agir dans la translocation du polysaccharide à travers la membrane cytoplasmique. Les protéines *icaA*, *icaD* et *icaC* sont des protéines de membrane intégrales (Tableau 1) (Gerke *et al.*, 1998). Les trois gènes *icaA*, *icaC* et *icaD* sont indispensables pour la synthèse du PIA. La protéine *icaB* joue un rôle dans la modification du PIA mature en agissant comme un catalyseur de la réaction de déacétylation (Gerke *et al.*, 1998 ; Vuong *et al.*, 2004b). Cette protéine est exportée et attachée à la surface bactérienne de façon non covalente mais n'est pas sécrétée dans le milieu de culture comme cela avait été envisagé (Gerke *et al.*, 1998 ; Vuong *et al.*, 2004b). La déacétylation du polysaccharide est une étape qui conduit à des résidus N-acétylglucosamine positivement chargés et est essentielle pour la

localisation du PIA à la surface chez *S. epidermidis* (Vuong *et al.*, 2004b). La déacétylation du PIA est aussi indispensable à la formation de biofilm sur des surfaces abiotiques, à l'adhésion aux cellules épithéliales, à la virulence dans un modèle animal et également pour échapper au système immunitaire chez *S. epidermidis* (Vuong *et al.*, 2004b).

Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, une mutation dans le locus *ica* entraîne une incapacité à produire le PIA et donc une incapacité à former des biofilms (Cramton *et al.*, 1999). Chez la souche TM300 de *S. carnosus*, les gènes *ica* sont absents et cette souche est incapable de former un biofilm. La transformation de cette souche par un plasmide portant les gènes *ica* entraîne une forte adhérence sur le verre et une plus faible adhérence au polystyrène montrant que le PIA agirait comme une adhésine de surface hydrophile (Heilmann *et al.*, 1996b ; Gotz, 2002).

Le locus *ica* semble être conservé parmi les membres du genre *Staphylococcus* suggérant que l'adhésion intercellulaire est un phénomène général aux staphylocoques (Cramton *et al.*, 1999). En effet, la présence d'un homologue *icaA* a été rapporté chez de nombreuses espèces : *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caseolyticus*, *S. cohnii*, *S. condimenti*, *S. intermedius*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. piscifermentans*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. sciuri* et *S. simulans* (Cramton *et al.*, 1999 ; Moretro *et al.*, 2003). Le gène *icaA* de différentes espèces de staphylocoques a été partiellement séquencé. Ces gènes *icaA* ont ainsi été classés en différents types de A à F, par similitude entre les séquences des différentes souches (Moretro *et al.*, 2003). Cependant, la présence d'*icaA* dans toutes ces espèces est souche dépendante et elle n'est pas toujours corrélée à la formation de biofilm.

L'expression d'*ica*, chez *S. epidermidis*, est sujette à un mode de régulation « on-off ». L'absence de formation de biofilm est en partie due à l'insertion spontanée de l'élément IS256 dans l'opéron *ica* pour 30% des variants « biofilm négatif » chez *S. epidermidis* (Ziebuhr *et al.*, 1997 ; Ziebuhr *et al.*, 1999 ; Arciola *et al.*, 2004 ; Kiem *et al.*, 2004). La transposition dans l'opéron *ica* est un processus réversible et a principalement lieu dans les gènes *icaA* ou *icaC* (Ziebuhr *et al.*, 1997 ; Ziebuhr *et al.*, 1999). La présence de variants « biofilm négatif » est importante pour le détachement des cellules bactériennes du biofilm et pour échapper au système immunitaire de l'hôte (Ziebuhr *et al.*, 1999). Ces variants contribuent ainsi à la survie bactérienne et à la croissance dans des conditions environnementales changeantes. La capacité à s'adapter rapidement est une propriété importante pour les staphylocoques et pour la plupart des bactéries pathogènes (Ziebuhr *et al.*, 1997).

L'expression de l'opéron *ica* dépend aussi des conditions environnementales et de systèmes complexes de réseaux régulateurs. Ces derniers seront développés dans le chapitre suivant. L'expression d'*ica* est induite par des facteurs environnementaux tels que la température, la présence d'oxygène, l'osmolarité et la composition du milieu de croissance chez *S. epidermidis* (Barker *et al.*, 1990 ; Barnes *et al.*, 1999 ; Rachid *et al.*, 2000b ; Cramton *et al.*, 2001b ; Stepanovic *et al.*, 2001). La présence de glucose dans le milieu amplifie la synthèse du PIA chez *S. epidermidis* mais de façon souche dépendante (Mack *et al.*, 1992). En présence de glucose, chez *S. epidermidis*, la transcription d'*ica* est régulée négativement en dépit d'un phénotype « biofilm positif » et une production de PIA. En absence de glucose, la transcription d'*ica* est maximale malgré un phénotype « biofilm négatif » et une absence de synthèse de PIA (Dobinsky *et al.*, 2003). En fait, le glucose agirait comme un substrat pour la synthèse du PIA, ou sur un facteur additionnel indépendant d'*ica* qui activerait l'expression du phénotype « biofilm positif » (Dobinsky *et al.*, 2003). La présence de cations divalents tels que le calcium et le magnésium accroît la production de polysaccharides conduisant à une amplification de la formation de biofilms chez *S. epidermidis* (Dunne & Burd, 1992 ; Elci *et al.*, 1995 ; Ozerdem Akpolat *et al.*, 2003 ; Arrizubieta *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005b). D'autres auteurs ont montré que des concentrations en antibiotiques sous-inhibitrices ainsi qu'une concentration importante en NaCl induisaient fortement l'expression d'*ica* chez *S. epidermidis* et *S. aureus* entraînant une augmentation de la formation de biofilm (Rachid *et al.*, 2000b ; Knobloch *et al.*, 2001 ; Gotz, 2002). L'expression de l'opéron *ica* peut aussi être influencée par d'autres conditions environnementales telles que l'acide oléique (Campbell *et al.*, 1983), l'urée (Hjelm & Lundell-Etherden, 1991) et la limitation en fer (Deighton & Borland, 1993 ; Evans *et al.*, 1994 ; Elci *et al.*, 1995).

Néanmoins, l'absence du locus *ica* chez certaines espèces ou souches ne signifie pas qu'elles ne forment pas de biofilms car d'autres mécanismes peuvent intervenir. Récemment, des auteurs ont montré qu'une mutation ou une absence du locus *ica* dans des isolats cliniques de *S. aureus* n'affectait pas la formation de biofilm (Fitzpatrick *et al.*, 2005 ; Toledo-Arana *et al.*, 2005 ; Kogan *et al.*, 2006). D'autres facteurs pourraient être responsables de la formation de biofilm comme la protéine extracellulaire AAP (cf. section 6.2) et la protéine de surface BAP (cf. section 6.3).

6-2. La Protéine Associée à l'Accumulation (AAP)

AAP est une protéine extracellulaire de 220 kDa décrite chez *S. epidermidis* (Sun *et al.*, 2005). La protéine AAP sous sa forme native n'est pas fonctionnelle, elle doit être clivée

Les souches de *S. epidermidis* produisant la protéine AAP forment de façon plus significative des biofilms que celles qui n'en produisent pas (Hussain *et al.*, 1997). Le développement d'anticorps dirigés contre la protéine AAP tronquée inhibe la formation de biofilm de manière dose dépendante (Sun *et al.*, 2005). La protéine AAP tronquée a été trouvée de façon prédominante dans les surnageants de cultures de *S. epidermidis* RP62A cultivé en mode sessile, mais toutes les souches « biofilm positif » ne produisent pas cette protéine (Hussain *et al.*, 1997). Elle a été retrouvée dans la paroi chez *S. epidermidis* RP62A dans des conditions planctoniques mais n'était pas sécrétée (Sun *et al.*, 2005).

Un mutant de la souche *S. epidermidis* RP62A, déficient dans la production de la protéine tronquée, adhère sur le verre ou sur le polystyrène mais est déficient dans l'accumulation (Schumacher-Perdreau *et al.*, 1994 ; Baldassarri *et al.*, 1996 ; Hussain *et al.*, 1997). D'autres auteurs ont montré qu'une protéine de 200 kDa était présente dans le surnageant de culture de ce mutant (Sun *et al.*, 2005). Cette protéine était similaire à AAP sur une portion de 662 acides aminés sur les 1245 acides aminés d'AAP et serait en fait un dimère de la portion d'AAP (Sun *et al.*, 2005). Cette portion correspondrait à la forme native d'AAP qui n'est pas fonctionnelle. En effet, la transformation de la souche *S. carnosus* TM300 « biofilm négatif » avec un plasmide portant la forme native de la protéine AAP ne conduit pas à l'expression du phénotype « biofilm positif » contrairement à la forme tronquée d'AAP (Rohde *et al.*, 2005).

Deux homologues de la protéine AAP, SasG pour « *Staph. aureus* surface protein G » et Pls pour « Plasmine sensitive surface protein », ont été récemment décrits chez *S. aureus* (Roche *et al.*, 2003 ; Rohde *et al.*, 2005). Ces deux protéines sont des adhésines de surface impliquées dans l'adhérence aux cellules épithéliales nasales desquamées, aux lipides cellulaires et aux glycolipides. Les propriétés adhésives de ces 2 protéines sont localisées dans le domaine A en N-terminale. Elles présentent aussi un domaine B identique à celui d'AAP suggérant qu'elles peuvent aussi fonctionner comme adhésines intercellulaires par un mécanisme indépendant du PIA (Rohde *et al.*, 2005).

6-3. La protéine Biofilm Associated Protein (BAP)

BAP est une protéine associée à la paroi cellulaire d'une masse moléculaire de 239 kDa chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001). Initialement, la protéine Bap a été trouvée dans des isolats de mammites bovines des espèces *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus* et *S. xylosus* puis récemment dans des isolats humains de *S. epidermidis* et *S. xylosus*

(Cucarella *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005b ; Planchon *et al.*, 2006). Bap est responsable de la colonisation et de la persistance de ces souches au niveau de la glande mammaire. La présence de Bap a aussi été corrélée à la formation de biofilm sur des surfaces abiotiques chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001).

La protéine Bap a une architecture multidomaine caractéristique des protéines de surfaces des bactéries à Gram positif (Figure 10). Le domaine N-terminale (819 acides aminés) inclut une séquence signal (S) pour son exportation vers la paroi ainsi que deux régions A et B. La région A (acides aminés 45 à 360) contient deux courtes répétitions de 32 acides aminés chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. hyicus* mais une seule répétition chez *S. chromogenes* (Cucarella *et al.*, 2001 ; Arrizubieta *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005b). La région B (acides aminés 361 à 818) présente une grande similitude avec la protéine de surface Esp d'*Enterococcus faecalis*, responsable de la formation de biofilm chez cette espèce (Tendolkar *et al.*, 2004). Dans les deux régions A et B, la protéine Bap possède des domaines de dimérisation (résidus 227 à 309 et 528 à 548). Ceux-ci peuvent entraîner l'adhésion intercellulaire entre deux molécules de Bap de différentes bactéries agissant ainsi à la fois comme récepteur et ligand. Dans cette région, on trouve aussi trois motifs de liaison au calcium « EF-hand like » (EF1, EF2-3), un autre se trouvant près du motif d'ancrage LPXTG (EF4) (Cucarella *et al.*, 2002 ; Arrizubieta *et al.*, 2004). Ainsi, Bap peut agir comme une lectine et donc lie de manière « calcium dépendante » les parties sucrées des exopolysaccharides des cellules voisines. La région C, région centrale de Bap, commence par une région espaceur (819 à 947 acides aminés) chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001). La région entourant les résidus 948 à 2139 est composée de 13 répétitions en tandem de 86 acides aminés chez *S. aureus* (16 chez *S. epidermidis*, 25 pour *S. hyicus*, 24 pour *S. xylosus*, 5 pour *S. chromogenes* et 6 pour *S. simulans*) (Tormo *et al.*, 2005b). La présence de ces séquences en tandem hautement conservées montre que les différentes espèces de staphylocoque présentent des variations dans le nombre de répétitions comme résultat d'une recombinaison homologue, n'affectant vraisemblablement pas la fonctionnalité de la protéine Bap (Cucarella *et al.*, 2001 ; Cucarella *et al.*, 2004). Cependant, ces différences pourraient être associées à une évolution visant à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, comme observé chez les streptocoques du groupe B avec la protéine alpha C (Madoff *et al.*, 1996). Cucarella *et al.* (2001) émettent l'hypothèse que la région C servirait à projeter la partie N-terminale à la surface qui interagirait avec les surfaces abiotiques. Les répétitions permettraient le repliement en une structure bêta à 7 brins qui appartient vraisemblablement au module HYR pour « Hyalin Repeat module » impliqué dans l'adhésion cellulaire

(Callebaut *et al.*, 2000). La région C doit donc avoir une fonction structurale en aidant à maintenir la conformation allongée de la protéine à la surface cellulaire. La région C représente 52% de la protéine Bap chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001 ; Arrizubieta *et al.*, 2004). La région C de Bap est suivie de la région D composée de trois courtes répétitions de 18 acides aminés chez *S. aureus* (6 chez *S. epidermidis*, 3 pour *S. hyicus*, 9 pour *S. xylosus*, 4 pour *S. chromogenes* et 4 pour *S. simulans*), suivies d'une répétition incomplète de 7 acides aminés. Cette séquence en acides aminés est riche en résidus sérine et acide aspartique, ressemblant aux répétitions SD de la famille Sdr (répétitions sérine-asparagine) des protéines de surface des staphylocoques (Josefsson *et al.*, 1998). Chez *S. xylosus*, la séquence et la taille des répétitions de la région D dans la protéine Bap sont complètement différentes de celles décrites (Tormo *et al.*, 2005b). Suite à la région D, la région C-terminale de Bap contient des motifs d'ancrage à la paroi (W), un domaine qui s'étend dans la membrane (M) et une queue de résidus positivement chargés.

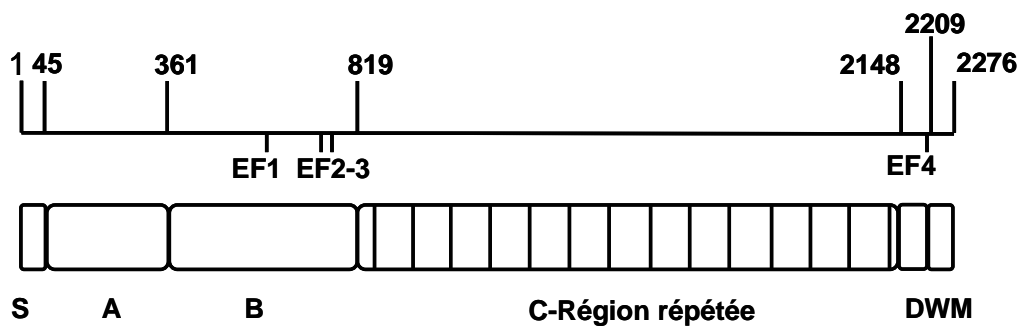


Figure 10 : Organisation structurale de la protéine Bap et localisation des domaines « EF-hand-like » dans la séquence de Bap (Arrizubieta *et al.*, 2004).

Chez *S. aureus*, le gène *bap* a été identifié pour la première fois grâce à l'étude d'un mutant obtenu par insertion du transposon Tn917 (Cucarella *et al.*, 2001). Le gène *bap* est contenu dans un îlot de pathogénicité chez *S. aureus* (SaPIbov2 pour « Staphylococcal Pathogenicity Island Bovine 2 »), dans lequel la région codant la toxine a été remplacée par un transposon incluant le gène *bap*, le gène codant un ABC transporteur et le gène codant la transposase Sip pour « Staphylococcal Integrase Protein » ayant un rôle dans l'excision/intégration (Ubeda *et al.*, 2003). La perte de cet îlot servirait dans le relarguage des cellules du biofilm mais uniquement dans les infections à *S. aureus* car le gène *bap* des espèces *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* et *S. hyicus* n'est pas contenu dans un îlot de pathogénicité (Cucarella *et al.*, 2002 ; Rabello *et al.*, 2005).

Les souches de *S. aureus* hébergeant la protéine Bap sont très adhérentes à des surfaces abiotiques et fortement productrices de biofilms (Cucarella *et al.*, 2001). Cette protéine est impliquée à la fois dans l'adhésion intercellulaire mais aussi dans l'attachement primaire à une surface abiotique. Des expériences d'infections de glandes mammaires bovines ont montré que la colonisation bactérienne augmente quand l'infection est causée par des souches de *S. aureus* mucoïdes, porteuses des gènes *icaABCD* et du gène *bap* (Cucarella *et al.*, 2004). Il semblerait que le PIA et la protéine Bap coopèrent pour l'agrégation intercellulaire. Cependant, Bap inhibe l'attachement bactérien initial aux cellules mammaires en interférant avec la liaison des MSCRAMMS (Cucarella *et al.*, 2004). Cette interaction pourrait être liée directement à l'encombrement stérique dû à la présence de Bap à la surface bactérienne, ou indirectement par une plus forte accumulation de polysaccharides qui se produit en présence de Bap. La présence de Bap réduit l'infectivité à court terme en bloquant l'adhérence précoce dépendante des interactions hôte-MSCRAMMs. Mais sa présence a un effet opposé dans l'adhérence tardive en permettant une plus longue persistance bactérienne dans la glande mammaire (Cucarella *et al.*, 2002). De plus pendant l'infection, il a été montré que la protéine Bap subit fréquemment des changements dans le nombre de répétitions dans la région C-terminale. Mais, aucune relation n'a été établie entre le nombre de répétitions et la formation de biofilm dans les isolats *bap* positifs (Cucarella *et al.*, 2004). Tous les isolats *bap* positifs étaient aussi *ica* positifs, mais en absence d'*ica*, Bap est suffisante pour induire la formation de biofilm sur les surfaces abiotiques chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2004). La présence des cations Ca^{2+} ou Mn^{2+} inhibe la formation de biofilm induite par Bap chez *S. aureus*, tandis que le Mg^{2+} n'a aucun effet (Arrizubieta *et al.*, 2004). Le calcium affecterait l'attachement primaire de *S. aureus*. Les domaines EF2 et EF3 de Bap se lient au calcium entraînant un changement de conformation de Bap, la rendant ainsi incapable d'agrégation intercellulaire. Le calcium agit comme un régulateur de biofilm à travers son interaction avec la protéine de surface Bap (Tormo *et al.*, 2005b).

Bap constitue une nouvelle famille de protéines qui joue un rôle clef dans la formation de biofilm chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, dans la mesure où cette protéine a été retrouvée chez *S. epidermidis* (Bhp pour « Bap Homolog Protein »), *Enterococcus faecalis* (Esp), *Salmonella enterica* (Stm2689) et *Pseudomonas putida* (Mus20) (Cucarella *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005b ; Lasa & Penades, 2006).

CHAPITRE II

La régulation moléculaire en biofilm chez les staphylocoques

1 - INTRODUCTION

Chez la plupart des bactéries formant des biofilms, la différenciation des cellules planctoniques en cellules sessiles et la production d'exopolysaccharides sont dépendantes de l'activation de réseaux régulateurs complexes en réponse aux signaux du quorum-sensing et/ou aux facteurs de stress environnementaux.

Les systèmes régulateurs chez les staphylocoques sont gouvernés principalement par deux loci : l'opéron « accessory gene regulator » (*agr*) et l'opéron « staphylococcal accessory regulator » (*sar*) (Pratten *et al.*, 2001). Ces systèmes sont dit « accessoires » car ils ne sont pas essentiels à la croissance mais ils sont activés à certaines phases de la croissance cellulaire ou lors de certaines conditions environnementales. Des régulateurs additionnels permettent aux microorganismes de répondre aux signaux environnementaux, ce sont des systèmes à deux composantes qui sont au nombre de 17 chez *S. aureus* (Toledo-Arana *et al.*, 2005). Parmi eux, le système arlRS, pour « autolysis related locus », semble jouer un rôle dans la formation de biofilm (Liang *et al.*, 2005 ; Toledo-Arana *et al.*, 2005). Enfin, on trouve des régulateurs de transcription tels que le facteur alternatif sigmaB (SigB), le répresseur « intercellular adhesion repressor » (IcaR) et le facteur « regulator biofilm formation » (rbf), qui influencent la formation de biofilm. Le Tableau 2 résume les régulateurs influençant la formation de biofilm.

Tableau 2 : Principaux régulateurs impliqués dans la régulation des biofilms chez les staphylocoques

Protéines	Localisation	Poids moléculaire	Gène	Espèce	Rôle en biofilm
AgrA AgrB AgrC AgrD	Intracellulaire Membrane Membrane Intracellulaire	28 kDa 26 kDa 46 kDa 5 kDa	<i>agrA</i> <i>agrB</i> <i>agrC</i> <i>agrD</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Régulateur accessoire général des protéines de surface et des facteurs de virulence
SarA SarR	 Intracellulaire	14,5 kDa 13,6 kDa	<i>sarA</i> <i>sarB</i> <i>sarC</i> <i>sarR</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Régulateur accessoire dépendant et indépendant d'Agr Régulateur négatif de Sar
ArlS ArlR	Intracellulaire	52,4 kDa 25,5 kDa	<i>arlS</i> <i>arlR</i>	<i>S. aureus</i>	Régulateur à deux composantes avec un rôle dans l'autolyse
SigmaB RsbW RsbU	Intracellulaire	29,4 kDa 17,9 kDa	<i>sigB</i> <i>rsbW</i> <i>rsbU</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Régulateur de transcription induit en phase stationnaire ou conditions de stress
IcaR	Intracellulaire	22 kDa	<i>icaR</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. caprae</i>	Régulateur négatif du locus <i>ica</i>
Rbf	Intracellulaire	80 kDa	<i>rbf</i>	<i>S. aureus</i>	Régulateur d'une protéine de 190kDa impliquée dans la formation de biofilm

2 - LE SYSTÈME "ACCESSORY GENE REGULATOR" (AGR)

Agr est l'un des deux systèmes du quorum sensing (QS) initialement décrit chez *S. aureus* puis chez *S. epidermidis* (Recsei *et al.*, 1986 ; Otto *et al.*, 1998). Ce système est largement conservé parmi les staphylocoques (Dufour *et al.*, 2002 ; Ji *et al.*, 2005). La communication intercellulaire via ce système affecte l'expression de facteurs de virulence des bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* et *S. aureus* (Pratten *et al.*, 2001 ; Autret *et al.*, 2003 ; Vuong *et al.*, 2003). Agr est aussi présent chez des espèces non pathogènes où il est impliqué dans le contrôle des voies cataboliques, de la capture de nutriments et du métabolisme énergétique (Dufour *et al.*, 2002). Le système agr influence aussi le comportement de *S. epidermidis* et de *S. aureus* en biofilm et contribue de ce fait à la nature chronique des infections associées au biofilm (Yarwood & Schlievert, 2003).

Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, dans la phase initiale de la colonisation où la densité cellulaire est faible, le système agr est quasi inactif et les protéines de surfaces, principalement des adhésines, sont exprimées permettant la colonisation (Pratten *et al.*, 2001 ; Yarwood & Schlievert, 2003 ; Yarwood *et al.*, 2004). Plus tard, quand la densité cellulaire augmente, le système agr devient actif et réprime l'expression des protéines de surface. Il active la production des enzymes de dégradation extracellulaire dont certaines sont nécessaires pour l'acquisition nutritionnelle *in vivo* (Recsei *et al.*, 1986 ; Novick & Muir,

1999 ; Ziebandt *et al.*, 2004). Il active aussi la synthèse d'exotoxines permettant aux staphylocoques de s'échapper du site de l'infection et de s'étendre à de nouveaux sites (Yarwood & Schlievert, 2003 ; Yarwood *et al.*, 2004).

Chez les staphylocoques, le locus *agr* est constitué de 2 opérons divergents exprimés à partir des 2 promoteurs P2 et P3 (Figure 11) (Dufour *et al.*, 2002). L'opéron sous le contrôle de P2 contient les 4 gènes *agrB*, *agrD*, *agrC* et *agrA*, il code le transcrite ARNII. L'opéron sous le contrôle de P3 contient le gène *hld* codant pour la toxine appelée l'hémolysine delta et il code le transcrite ARNIII qui est la molécule régulatrice du système interagissant avec les différents gènes cibles. L'hémolysine delta est traduite à partir d'ARNIII mais ne contribue pas à l'activité régulatrice du système (Yarwood *et al.*, 2004). La molécule ARNIII régulatrice bloque la transcription des gènes codant les protéines de surface et régule positivement celle des facteurs de virulence extracellulaires. Cette régulation transcriptionnelle doit impliquer une ou plusieurs autres protéines régulatrices mais le mécanisme reste inconnu (Shirtliff *et al.*, 2002).

Le système *agr* est activé par un mécanisme autorégulateur impliquant une phéromone peptidique qui signale la densité cellulaire pendant la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Pratten *et al.*, 2001). Les peptides des bactéries à Gram positif sont traduits dans une forme inactive et sont sécrétés sous forme d'octapeptide contenant une structure thioester. Ainsi, le polypeptide, généré à partir du précurseur AgrD, est converti, avant d'être sécrété, en un peptide contenant du thiolactone appelé « Auto Inducing Peptide » (AIP) (Figure 11). La maturation et/ou l'exportation du peptide à travers la membrane requiert l'activité d'AgrB (Novick & Muir, 1999 ; Shirtliff *et al.*, 2002). Le peptide s'accumule dans l'environnement local et agit comme une molécule de signalisation externe. Sa concentration est directement liée à la densité cellulaire. Le peptide interagit avec le récepteur/senseur de la membrane cellulaire AgrC du système régulateur à deux composantes AgrAC. Le senseur transmet le signal au régulateur de réponse intracellulaire AgrA qui active le phénotype dépendant du quorum sensing, c'est-à-dire la transcription à partir des promoteurs P2 et P3 (Lina *et al.*, 1998 ; Dufour *et al.*, 2002). Ce système à deux composantes module la production de la molécule ARNIII régulatrice sous la dépendance de la densité cellulaire, modifiant en amont l'expression des gènes cibles. Les différents gènes régulés par le système *agr* peuvent influencer d'une part l'attachement des cellules à une surface via la régulation de la synthèse des adhésines de surface et d'autre part, la maturation du biofilm via la régulation de l'expression des facteurs extracellulaires (Yarwood *et al.*, 2004). Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, le système *agr* régule la synthèse des MSCRAMMs (cf. section 5.3.1 Chapitre

I), de l'autolysine AtlE (cf. section 5.3.2), de l'hémolysine delta (hld) et de la toxine alpha (hla) qui semble être requise pour les interactions intercellulaires (Shenkman *et al.*, 2001 ; Caiazza & O'Toole, 2003 ; Vuong *et al.*, 2003 ; Yarwood & Schlievert, 2003 ; Otto, 2004).

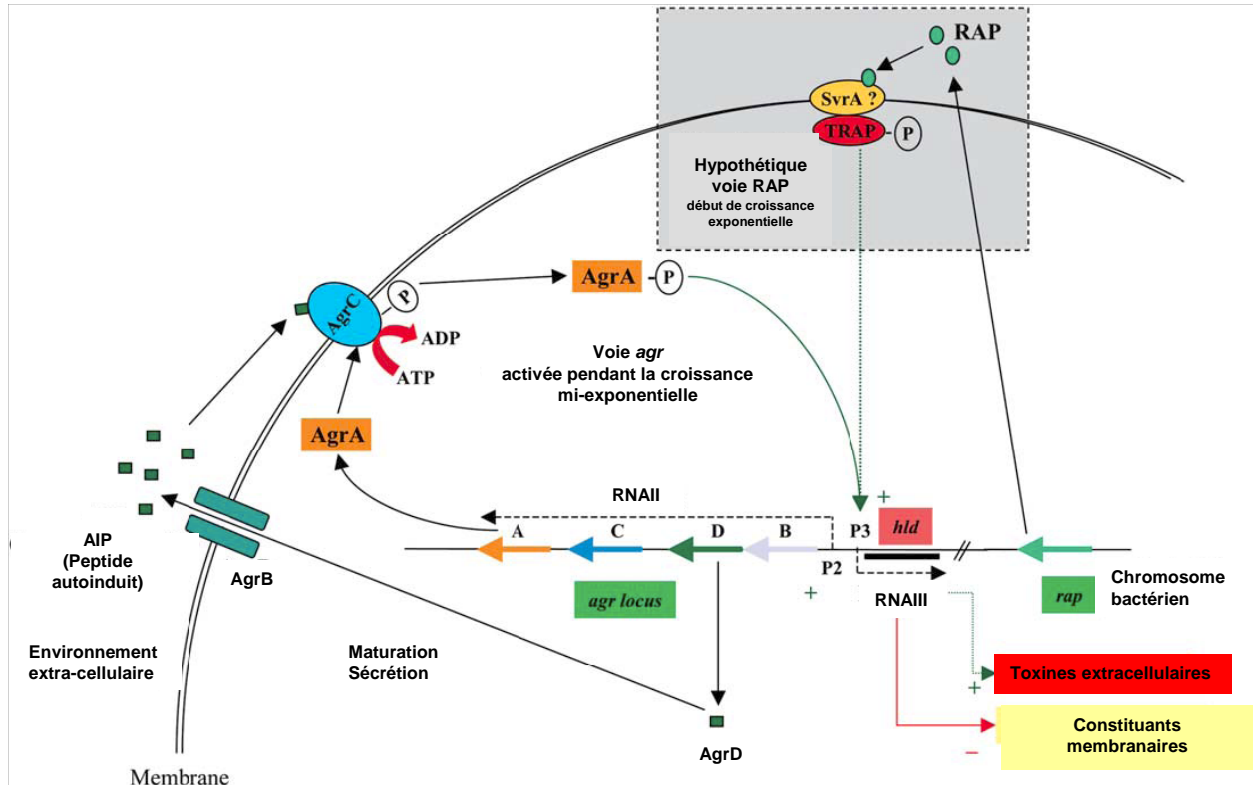


Figure 11 : Fonctionnement du système agr (Bronner *et al.*, 2004).

Chez *S. aureus*, les souches sauvages *agr*⁺ produisent l'hémolysine delta qui agirait comme un surfactant et préviendrait l'adhésion des cellules aux surfaces (Vuong & Otto, 2002). Les mutants *agr*⁻ se produisent naturellement parmi les isolats cliniques de *S. aureus* et ils possèdent une plus forte capacité à former des biofilms *in vitro* (Vuong *et al.*, 2000 ; Pratten *et al.*, 2001). L'expression du phénotype *agr*⁻ contribue aussi à augmenter la persistance de l'infection associée au biofilm *in vivo*. Ainsi, ces mutants possèdent un avantage dans la colonisation de tissu ou de matériel implanté (Vuong *et al.*, 2000).

La contribution du système agr au développement d'un biofilm est dépendante des souches bactériennes et des conditions de croissance du biofilm telles que des conditions statiques ou dynamiques (Shenkman *et al.*, 2001 ; Yarwood *et al.*, 2004).

Un deuxième système de QS a été décrit chez *S. aureus*, il fait intervenir la protéine « RNA III Activating Peptide » (RAP) qui est sécrétée par la bactérie à partir du début de la

phase exponentielle (Figure 11) (Vuong & Otto, 2002). RAP induit la phosphorylation d'une protéine cible cytoplasmique TRAP pour « Target RNA III Activating Peptide ». La protéine membranaire SvrA pour « staphylococcal virulence regulator » assurerait le lien entre les molécules RAP et TRAP (Bronner *et al.*, 2004). La phosphorylation de TRAP entraîne alors, par un mécanisme inconnu, l'activation des deux promoteurs du système agr. Cette activation conduit à la synthèse du peptide AIP qui régule négativement la phosphorylation de TRAP (Gov *et al.*, 2001 ; Korem *et al.*, 2003). Ainsi, les molécules RAP et AIP activent, respectivement, le locus *agr* temporellement, en début et fin de phase exponentielle.

Les deux systèmes de QS sont potentiellement des cibles pour les agents antimicrobiens (Otto *et al.*, 1999 ; Otto, 2004). L'utilisation de substances inhibant le système agr serait bénéfique dans le traitement d'infections aigües car la production de facteurs de virulence extracellulaires serait diminuée, cependant la production des protéines de surface serait augmentée entraînant des risques liés à une infection chronique associée au biofilm (Yarwood & Schlievert, 2003 ; Otto, 2004). Un inhibiteur du QS chez les staphylocoques a été proposé, il s'agit de RIP pour « RNA III Inhibitor Peptide » qui agit sur la molécule régulatrice ARNIII du système agr (Otto, 2004). Le peptide RIP est produit naturellement par les souches de *S. xyloso* et *Staphylococcus warneri* et il est sécrété dans le surnageant de culture (Gov *et al.*, 2001 ; Bronner *et al.*, 2004). RIP possédant une similarité dans sa séquence N-terminale avec RAP, entre en compétition avec RAP. En effet, RIP inhibe la phosphorylation de TRAP ainsi que l'expression d'agr quand il est incorporé dans le milieu de croissance de *S. aureus* (Korem *et al.*, 2003 ; Bronner *et al.*, 2004). D'autres études montrent que RIP inhibe l'adhésion de *S. aureus* et *S. epidermidis* aux kératinocytes humains (Gov *et al.*, 2001 ; Balaban *et al.*, 2003). RIP réduit aussi la formation de biofilm de *S. aureus* aux matériaux plastiques tels que le polystyrène et le polyuréthane et aux surfaces en silicone (Balaban *et al.*, 2001 ; Gov *et al.*, 2001 ; Giacometti *et al.*, 2003). Balaban *et al.* (2003) suggèrent qu'un système dépendant de RIP contrebalancerait et surmonterait l'induction de la formation de biofilms dans une souche *agr*⁻, en régulant les gènes indépendamment du système agr.

La régulation des facteurs impliqués dans la formation de biofilm via le système agr agit souvent en concert avec d'autres systèmes régulateurs tel que le locus *sar* et le facteur sigmaB.

3 - LE RÉGULATEUR "STAPHYLOCOCCAL ACCESSORY REGULATOR" (SAR)

Le locus *sar* active chez *S. aureus*, à la fois la synthèse des protéines extracellulaires et des protéines de surface qui sont impliquées dans la formation de biofilm comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I (Manna *et al.*, 1998 ; Shenkman *et al.*, 2001). De plus, le locus *sar* interagit avec le locus *agr* dans la région entre les 2 promoteurs (Chien *et al.*, 1998 ; Manna & Cheung, 2001 ; Shenkman *et al.*, 2001).

Chez *S. aureus*, le locus *sar* est composé de trois transcrits chevauchants désignés *sarA*, *sarC* et *sarB* issus de trois promoteurs distincts P1, P3 et P2 (Figure 12). Compte tenu de leur nature chevauchante, chacun des transcrits produit SarA qui est une protéine de liaison à l'ADN (Manna *et al.*, 1998 ; Manna & Cheung, 2001). Le transcrit *sarA* code SarA de 124 acides aminés tandis que le transcrit *sarC* code un cadre de lecture putatif supplémentaire, l'ORF3 (« Open Reading Frame »). Le transcrit *sarB* code SarA, l'ORF3 et un ORF additionnel de 18 acides aminés (ORF4) qui semble essentiel à l'expression complète des transcrits ARNII et ARNIII du système *agr* chez *S. aureus* (Chien *et al.*, 1998). Un homologue de *sar* existe chez *S. epidermidis* avec une organisation similaire en multi-promoteurs mais diffère à la fois dans l'ordre de ces promoteurs et par l'absence d'ORFs interpromoteurs (Fluckiger *et al.*, 1998).

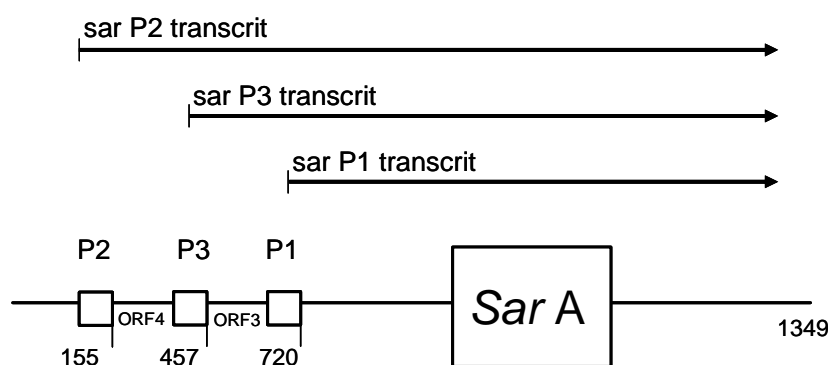


Figure 12 : Organisation structurale du locus *sar* de *S. aureus* (Manna & Cheung, 2001).

L'expression de chaque transcrit varie pendant le cycle de croissance cellulaire chez *S. aureus* (Manna *et al.*, 1998). L'expression des transcrits *sarA* et *sarB* est maximale en phase exponentielle contrairement à celle de *sarC* qui atteint un pic en phase post exponentielle. Le promoteur P1 a une activité transcriptionnelle cinquante fois plus forte que celle du promoteur P3 qui a l'activité la plus faible. Des régulateurs contrôlent l'expression des trois promoteurs

sar en se liant à une région en amont des promoteurs. L'expression des promoteurs est activée par la protéine SarA et régulée négativement par SarR (Manna & Cheung, 2001). Un site de liaison pour le répresseur a été trouvé en amont du promoteur P1 et dans le promoteur P2 (Manna *et al.*, 1998 ; Manna & Cheung, 2001). De plus, chez *S. aureus*, le facteur sigmaB (SigB) régule positivement le promoteur P3 en se fixant à une séquence consensus au niveau du promoteur (Manna *et al.*, 1998). Chez *S. epidermidis*, c'est le promoteur P1 qui porte le motif de liaison à sigB (Fluckiger *et al.*, 1998 ; Knobloch *et al.*, 2004). Les promoteurs de *sigB* sont activés pendant les périodes de stress incluant la phase post exponentielle (Manna *et al.*, 1998).

En phase exponentielle, SarA interagit directement avec les promoteurs des gènes cibles contenant une « SarA box » chez *S. aureus* (Luong *et al.*, 2002 ; Valle *et al.*, 2003). Ainsi, pendant la croissance en phase exponentielle, le locus *sar* induit la synthèse des adhésines de surface impliquées dans les adhésions initiale et intercellulaire comme les protéines de liaison à la fibronectine (FnbpA et FnbpB), l'alpha hémolysine (hla), la protéine A (Spa) (Shenkman *et al.*, 2001 ; Shirtliff *et al.*, 2002 ; Valle *et al.*, 2003 ; Trotonda *et al.*, 2005).

En phase post exponentielle, le système *sar* peut interagir avec le système *agr* pour contrôler l'expression des gènes cibles. SarA est un régulateur positif de l'opéron *agr*, il active la transcription d'*agr* à partir des promoteurs P2 et P3 (Chien *et al.*, 1998). Ceci entraîne une augmentation intracellulaire de ARNIII qui agit en retour en augmentant l'expression de facteurs de virulence sécrétés et diminue celle des adhésines de surface (Yarwood *et al.*, 2004).

En phase stationnaire, l'expression des deux régulateurs SarR et SigB est maximale et ils modulent l'expression de SarA et donc celle des gènes qui sont contrôlés par SarA (Manna & Cheung, 2001). Compte tenu de leurs effets contradictoires, les auteurs suggèrent que d'autres éléments régulateurs seraient impliqués dans le contrôle des déterminants de la virulence. En effet, il existe des régulateurs intermédiaires, SarS, SarT, SarU ainsi que Rot, entre SarA et Agr et les gènes codant pour les facteurs de virulence (Bronner *et al.*, 2004). Ce sont des homologues de SarA présents dans le génome de *S. aureus* qui agiraient sur les promoteurs des gènes cibles et aussi sur ceux des loci régulateurs *agr* et *sar* qui les régulent en retour négativement (Pragman & Schlievert, 2004).

Une mutation dans *sarA* chez *S. aureus* entraîne une réduction de la transcription de l'opéron *ica*, entraînant ainsi une diminution dans la formation de biofilm (Beenken *et al.*, 2003 ; Valle *et al.*, 2003). Ainsi, chez *S. aureus*, SarA est un activateur de l'expression de l'opéron *ica*. Il pourrait agir directement sur le promoteur d'*ica* ou indirectement en

supprimant soit la transcription du répresseur *icaR*, soit la synthèse d'une protéine impliquée dans le turnover du PIA (Valle *et al.*, 2003). Chez *S. epidermidis*, une séquence consensus liant la protéine SarA a été trouvée entre l'opéron *ica* et le régulateur *icaR* révélant que SarA agirait comme un activateur transcriptionnel de l'opéron *icaADBC* conduisant à la formation de biofilm (Tormo *et al.*, 2005a). Dans une autre étude, une mutation *sarA* chez *S. aureus* entraîne une réduction de l'expression de *bap* et donc diminue la formation de biofilms (Trotonda *et al.*, 2005). Chez *S. aureus*, le gène *bap* est positivement régulé par la protéine SarA qui se lie spécifiquement à une séquence consensus du promoteur de *bap* (Trotonda *et al.*, 2005).

Chez *S. aureus*, SarA apparaît comme un régulateur essentiel contrôlant la formation de biofilm et ainsi pourrait être une cible pour contrôler le processus infectieux. Toutefois, des différences « souches dépendantes » ont pu être observées dans les rôles régulateurs de *sarA* et *agr* chez *S. aureus* (Trotonda *et al.*, 2005).

4 - LE SYSTÈME "AUTOLYSIS RELATED LOCUS" (ARL R/S)

ARL R/S est un système régulateur à deux composantes permettant à la bactérie de s'adapter aux variations environnementales (Fournier & Hooper, 2000). ARL R/S est un membre de la famille OmpR-PhoB des régulateurs de réponse, régulé par les loci *agr* et *sar* (Shirtliff *et al.*, 2002). Ce locus est présent chez la plupart des souches de *S. aureus* dans lesquelles il affecte l'adhésion et la formation de biofilm en modifiant l'activité hydrolase du peptidoglycane (Fournier & Hooper, 2000 ; Shirtliff *et al.*, 2002).

Le locus *arlRS* code un senseur transmembranaire arlS pour « autolysis related locus Sensor protein » qui est généralement une histidine kinase et un régulateur de réponse associé arlR « autolysis related locus Regulator protein » (Fournier & Hooper, 2000 ; Liang *et al.*, 2005). La protéine transmembranaire arlS se lie à un ligand entraînant une autophosphorylation sur le résidu histidine. La protéine arlS phosphorylée transfère le groupement phosphate sur le résidu aspartate du régulateur de réponse arlR. Ce dernier va en retour amplifier ou réprimer la transcription des gènes cibles.

Chez *S. aureus*, les mutants *arlR*, *arlS* et *arlRS* forment des biofilms sur une surface en polystyrène, contrairement à la souche sauvage (Shirtliff *et al.*, 2002 ; Liang *et al.*, 2005 ; Toledo-Arana *et al.*, 2005). Chez le mutant *arlRS* de *S. aureus*, la production de l'adhésine polysaccharidique (PIA) est amplifiée. Or le double mutant *arlRS icaADBC* est capable de former un biofilm sous certaines conditions révélant que le PIA n'est pas indispensable. En

fait, le mutant *arlRS* présente une adhérence primaire plus prononcée que la souche sauvage démontrant que le système *arlRS* régule négativement l'étape d'adhésion initiale dans la formation de biofilm de *S. aureus* aux surfaces abiotiques (Toledo-Arana *et al.*, 2005).

Les mutants *arlS* et *arlR* présentent une plus faible agrégation cellulaire due à une altération des hydrolases du peptidoglycane impliquées dans la division cellulaire plutôt que dans l'adhésion intercellulaire car les biofilms des mutants sont organisés en microcolonies séparées par des canaux interstitiels (Liang *et al.*, 2005 ; Toledo-Arana *et al.*, 2005). Les mutants *arlS* et *arlR* présentent aussi une lyse importante en phase stationnaire due à une augmentation dans la sécrétion des autolysines. Ainsi, en affectant les hydrolases du peptidoglycane, le système ArlR-ArlS contrôle l'autolyse ainsi que l'attachement. Chez le mutant *arlRS*, la délétion du gène *atl* codant l'autolysine majeure de *S. aureus* n'a aucun effet sur la formation de biofilm excluant son rôle dans l'accroissement de l'adhésion (Toledo-Arana *et al.*, 2005). En fait, l'augmentation des autolysines chez les mutants *arlS* et *arlR* découle d'une déficience en protéases extracellulaires, ce qui faciliterait l'accumulation de protéines impliquées dans l'adhésion aux surfaces. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse qu'*arlRS*, soit réprimerait l'expression d'une adhésine ou d'autres protéines requises pour la formation de biofilm, soit activerait l'expression d'un facteur délétère pour la formation de biofilm (Toledo-Arana *et al.*, 2005). Pour d'autres auteurs, le régulateur de réponse ArlR agirait directement sur la transcription des gènes codant des protéases ou interagirait avec les loci régulateurs *agr* et *sar* et le système à deux composantes *lytS-lytR* qui module l'activité et/ou l'expression des hydrolases du peptidoglycane (Fournier & Hooper, 2000). En effet, chez le mutant *arlR* de *S. aureus*, l'expression de 77 gènes est amplifiée tandis que l'expression de 37 gènes est réprimée (Liang *et al.*, 2005). Parmi les gènes amplifiés chez le mutant, se trouvent les gènes codant le répresseur de toxines Rot et les diverses protéases. Parmi les gènes réprimés se trouvent notamment les systèmes *lytRS* et *agr* et les gènes codant les hydrolases de la muréine (Figure 13). Ainsi, le double mutant *arlRS agr* forme d'importants biofilms contrairement au double mutant *arlRSsarA* qui en est incapable (Toledo-Arana *et al.*, 2005). Ces résultats corroborent le fait que SarA est un régulateur positif dans le développement de biofilm de *S. aureus* tandis qu'*agr* et *arlRS* jouent un rôle négatif et peuvent agir en synergie. Certains facteurs de virulence impliqués dans la formation de biofilm sont régulés, soit positivement par *arlRS* telles que l'hémolysine delta (*hld*), des protéines de liaison au fibrinogène (famille *Sdr*), soit négativement comme des uréases, des enzymes de synthèse de la capsule polysaccharidique et des protéines de surface

liant la matrice extracellulaire comme Ehb pour « ECM-binding protein homologue » (Clarke *et al.*, 2002).

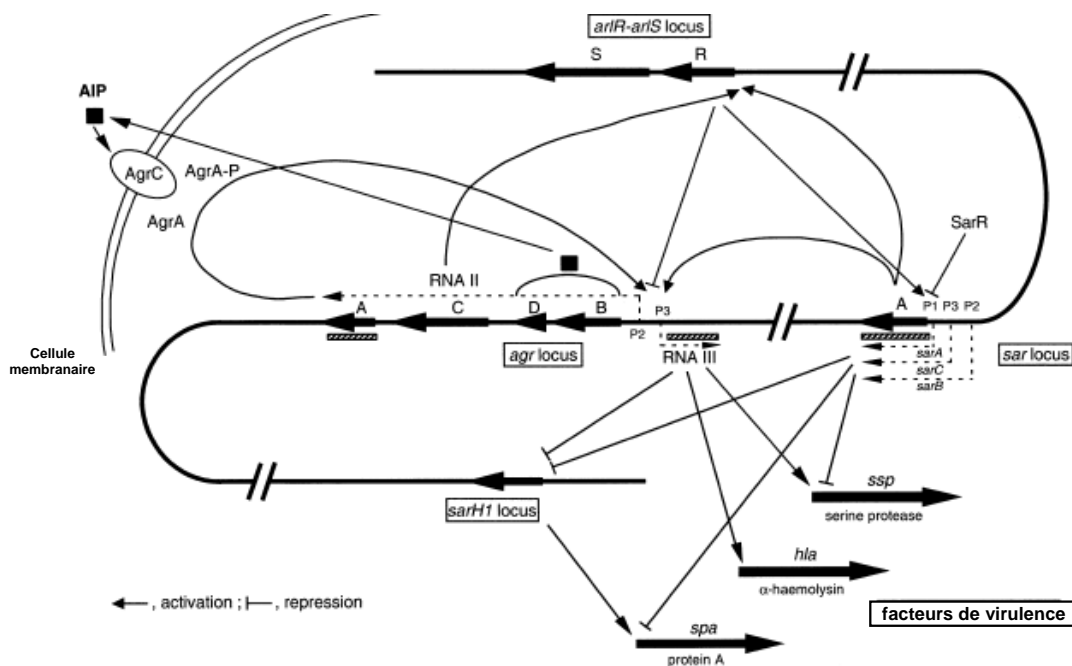


Figure 13 : Interactions entre le locus *arl* et les autres loci régulateurs (Fournier *et al.*, 2001).

Le système ArlRS est un système régulateur des facteurs de virulence qui peut interagir avec d'autres régulateurs pour moduler leur expression (Liang *et al.*, 2005).

5 - LE FACTEUR SIGMA B (SIGB)

Les facteurs sigma sont des régulateurs de transcription eux mêmes régulés au niveau post traductionnel par des facteurs anti-sigma. Les facteurs sigma jouent un rôle important dans les réponses adaptatives (Miyazaki *et al.*, 1999 ; van Schaik & Abee, 2005). Ces facteurs forment des complexes avec l'ARN polymérase qui reconnaissent des éléments spécifiques d'un promoteur. Un groupe de facteurs sigma (sigma A) est requis pour l'expression des gènes de ménage ou « housekeeping genes » et un second (sigma B) est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes suite à des changements environnementaux (phase stationnaire, privation nutritionnelle, chocs thermique et osmotique...) (Bronner *et al.*, 2004 ; van Schaik & Abee, 2005). SigB régule directement et indirectement l'expression des gènes de virulence ainsi que ceux impliqués dans la formation de biofilm chez *S. aureus* (Rachid *et al.*, 2000a).

Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'opéron *sigB* contient quatre gènes *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* et *sigB* (Figure 14).

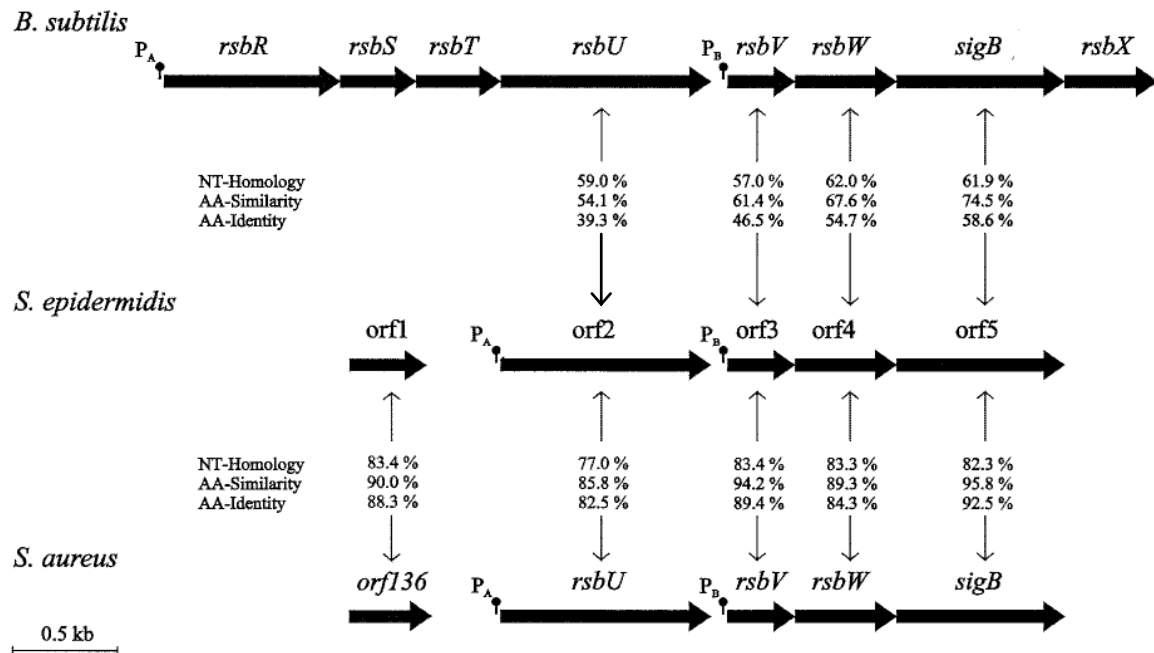


Figure 14 : Comparaison de l'organisation structurale de l'opéron sigma B de *B. subtilis*, *S. epidermidis* et *S. aureus*

Les gènes sont indiqués par des flèches. Les homologies de séquences nucléotidiques (NT), les identités et les similitudes de séquences en acides aminés (AA) sont indiquées en %. Les fonctions putatives des promoteurs sont indiquées (Knobloch *et al.*, 2001).

Cet opéron montre une forte homologie en acides aminés et dans l'ordre des gènes avec l'opéron *sigB* de *Bacillus subtilis*, suggérant ainsi une fonction générale similaire (Miyazaki *et al.*, 1999 ; Knobloch *et al.*, 2001 ; Bronner *et al.*, 2004). RsbW est le facteur anti-sigma qui se lie à SigB pour inhiber sa transcription. RsbU est une phosphatase spécifique activant RsbV et représente ainsi l'activateur de SigB. RsbV est un facteur anti-anti-sigma qui entre en compétition avec la liaison de RsbW sur SigB. Pendant la phase exponentielle de croissance, RsbW inactive RsbV par phosphorylation permettant la formation du complexe RsbW-SigB chez *B. subtilis* et chez *S. aureus* (Dufour & Haldenwang, 1994 ; Miyazaki *et al.*, 1999). Suite à une privation nutritionnelle ou un stress, chez *B. subtilis*, RsbV est déphosphorylée par RsbU et se lie à RsbW entraînant le relargage du facteur SigB actif qui interagit avec l'ARN polymérase pour initier la transcription de gènes cibles. Dans d'autres conditions comme celles qui réduisent le niveau intracellulaire en ATP (phase stationnaire, privation en glucose ou en phosphate), RsbV n'est pas phosphorylée et se lie directement à RsbW qui relargue SigB (Bronner *et al.*, 2004).

Chez *S. aureus*, le facteur SigB régule positivement les gènes codant le « clumping » facteur Clf, la protéine de liaison à la fibronectine FnbpA et la coagulase, tandis qu'il régule négativement les gènes codant les hémolysines alpha et bêta, des toxines et des protéases (Miyazaki *et al.*, 1999 ; Knobloch *et al.*, 2004). La régulation de ces facteurs de virulence peut se faire directement par liaison de sigB aux promoteurs ou indirectement par l'influence de sigB sur des régulateurs additionnels comme SarA et le système agr (Knobloch *et al.*, 2004). En effet, le facteur sigB régule positivement le locus *sar* de manière « phase de croissance dépendante » tandis qu'il régule négativement le locus *agr* chez *S. aureus* (Bischoff *et al.*, 2001). Un rôle possible est de prolonger la production des protéines de surface qui sont positivement régulées par SarA mais négativement par Agr.

Le facteur SigB joue un rôle dans la formation de biofilm en réponse à un stress osmotique et thermique (Rachid *et al.*, 2000a). En effet, chez *S. aureus*, l'activité du promoteur *ica* augmente en conditions de stress (concentration sous-inhibitrice d'antibiotiques, température élevée, forte osmolarité) suggérant que l'expression d'*ica* serait sous le contrôle de SigB (Rachid *et al.*, 2000). Ainsi, le mutant *sigB* chez *S. aureus* possède un phénotype « biofilm négatif » et le chlorure de sodium n'induit pas la formation de biofilm, ce qui serait dû à des changements dans la transcription d'*ica* (Rachid *et al.*, 2000a). De même, l'insertion d'un transposon dans le gène *rsbU* chez *S. epidermidis* conduit à un phénotype « biofilm négatif » et à une très faible production de PIA tandis que l'attachement primaire n'est pas influencé (Knobloch *et al.*, 2001). Dans le cas d'un stress éthanolique, les mutants *rsbU* de *S. epidermidis* peuvent former un biofilm alors qu'ils en sont incapables suite à un stress salin. Ces résultats révèlent la présence de deux voies d'induction des gènes *ica*, l'une par le NaCl qui est sous dépendance fonctionnelle du gène *rsbU* et l'autre par l'éthanol qui est indépendante de *rsbU* (Conlon *et al.*, 2004 ; Knobloch *et al.*, 2004). Puisqu'aucun site de liaison de sigB n'est apparent dans les séquences promotrices du locus *ica*, l'influence de sigB sur la transcription de ce locus est probablement indirecte (Rachid *et al.*, 2000a ; Knobloch *et al.*, 2001). En effet, SigB régulerait négativement *IcaR* entraînant ainsi la transcription d'*ica* (Knobloch *et al.*, 2004).

6 - LE REPRESSEUR DE L'ADHESION INTERCELLULAIRE (ICA R)

IcaR est un répresseur de transcription de l'opéron *ica* chez *S. caprae*, *S. epidermidis* et *S. aureus* (Allignet *et al.*, 2001 ; Conlon *et al.*, 2002a ; Jefferson *et al.*, 2003). Le gène *icaR*

est localisé en amont de l'opéron *icaADBC* et il est transcrit dans le sens opposé aux 4 autres gènes de l'opéron (Allignet *et al.*, 2001 ; Conlon *et al.*, 2002a). Le régulateur *icaR* est un membre de la famille TetR pour « Tetracycline Regulable » des régulateurs transcriptionnels (Conlon *et al.*, 2002a ; Jefferson *et al.*, 2003). La plupart des membres de cette famille régulent l'expression de leur propre gène excepté chez les staphylocoques (Conlon *et al.*, 2002b). Cette famille de protéines est caractérisée par des domaines conservés de liaison à l'ADN dans la partie N-terminale et des domaines C-terminale divergents impliqués dans des interactions avec d'autres protéines qui moduleraient leur activité régulatrice (Conlon *et al.*, 2002a).

Chez *S. epidermidis*, une mutation d'*icaR* entraîne une augmentation de l'expression du locus *icaADBC* (Conlon *et al.*, 2002 ; Gotz, 2002). Ces résultats corroborent le fait qu'*icaR* code un répresseur de l'opéron *ica* mais son activité seule ne réprime pas complètement l'expression de l'opéron. La mutation *icaR* n'affecte pas sa propre régulation suggérant qu'IcaR n'autorégule pas sa transcription (Conlon *et al.*, 2002a ; Conlon *et al.*, 2002b). La transcription d'*icaR* est réprimée par des facteurs environnementaux qui amplifient la formation de biofilm. Ainsi des températures élevées ($\geq 45^{\circ}\text{C}$), l'éthanol ($\geq 4\%$) et le chlorure de sodium à forte concentration ($\geq 10\%$) répriment l'expression d'*icaR* qui de ce fait n'inhibe plus l'opéron *ica* (Conlon *et al.*, 2002a ; Conlon *et al.*, 2002b). Le glucose et le chlorure de sodium à faible concentration ($\leq 4\%$) n'affectent pas l'expression d'*icaR* pourtant l'opéron *ica* est transcrit. Ainsi, il existe deux voies distinctes d'activation de l'opéron *ica*, une voie dépendante d'*icaR* et une indépendante. Le chlorure de sodium, en fonction de sa concentration, influence la transcription d'*icaR* ou d'*ica* (Conlon *et al.*, 2002a ; Conlon *et al.*, 2002b). De même, l'éthanol à forte concentration inhibe l'expression d'*icaR* et à faible concentration active l'opéron *ica* alors qu'*icaR* n'est pas réprimée. Ainsi, les auteurs ont suggéré que des interactions directes entre l'éthanol et la protéine IcaR peuvent interférer empêchant la répression d'*ica*. En absence de glucose, chez *S. aureus*, IcaR jouerait un rôle dans la suppression de la production du PIA. En présence de glucose, la répression exercée par *icaR* est levée conduisant à une augmentation de la transcription d'*ica* responsable en partie de l'augmentation de la synthèse du PIA. Le glucose peut interagir indirectement avec IcaR via d'autres facteurs régulateurs comme par exemple Rbf (cf §7). Par contre, l'effet de concentrations sous-inhibitrices d'antibiotique sur l'activation d'*ica* apparaît souche-dépendante chez *S. epidermidis* (Conlon *et al.*, 2002b). Ainsi, la formation de biofilm n'est pas régulée par les mêmes stimuli environnementaux chez les souches de *S. epidermidis*.

Le régulateur *icaR* est une protéine de liaison à l'ADN qui se lie au promoteur d'*ica* en amont du site initial de transcription. IcaR agirait par encombrement stérique en masquant la liaison du facteur sigma de l'ARN polymérase au promoteur d'*ica*. Ainsi, dans une souche mucoïde de *S. aureus*, la délétion d'une séquence de 5 nucléotides (TATTT) dans la région promotrice du locus *ica* augmente sa transcription. Cependant, cette délétion n'affecte ni la transcription d'*icaR* ni son affinité pour le promoteur d'*ica* (Jefferson *et al.*, 2003 ; Jefferson *et al.*, 2004). Il existe donc une autre protéine qui lie le promoteur *ica* via le motif TATTT. En fait, quatre protéines liant la région promotrice d'*ica* ont été isolées incluant deux facteurs de régulation générale SarA et TcaR (Jefferson *et al.*, 2003). Ce dernier est un régulateur transcriptionnel du locus associé à la teicoplanine appartenant à la famille MarR pour « Multiple antibiotic resistance Regulator » (Jefferson *et al.*, 2003). La délétion de *tcaR* chez *S. aureus* augmente cinq fois la transcription d'*ica* mais la production de PIA et l'adhérence à un polymère de surface ne sont pas affectées (Jefferson *et al.*, 2003). La double mutation *icaRtcaR* chez *S. aureus* augmente la transcription d'*ica* de 500 fois avec une production de PIA environ 100 fois supérieure à celle de la souche sauvage et une adhésion significativement augmentée. TcaR apparaît comme un régulateur négatif de la transcription d'*ica*. La liaison de TcaR serait indépendante du motif de 5 pb et aurait lieu sur des sites de reconnaissance multiples dans le promoteur *ica* ou bien TcaR s'oligomériserait en une dizaine de molécules lorsqu'il se lie à la région promotrice (Jefferson *et al.*, 2003). IcaR apparaît comme un répresseur plus puissant que TcaR car il surmonte les effets d'une délétion de *tcaR*.

7 - LE REGULATEUR DE LA FORMATION DE BIOFILM (RBF)

La protéine Rbf est largement répandue parmi les souches de *S. aureus* ainsi que chez d'autres staphylocoques avec une séquence très conservée suggérant que Rbf est fonctionnellement importante (Lim *et al.*, 2004). Rbf régule positivement une protéine qui est impliquée dans la formation de biofilm. La protéine Rbf contient un motif de liaison à l'ADN similaire à celui de la famille AraC/XylS des régulateurs de transcription. Etant donné que Rbf est impliquée dans l'induction de la formation de biofilm, elle pourrait contenir des domaines fonctionnels de reconnaissance de signaux environnementaux, en plus de ces domaines communs aux membres de cette famille.

Une mutation du gène *rbf* chez *S. aureus* réduit de façon drastique la formation de biofilm sur des surfaces en polystyrène et en verre (Lim *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005a). Le mutant est affecté dans l'étape d'agrégation multicellulaire plutôt que dans l'attachement

initial. Cependant, la mutation du gène *rbf* n'affecte pas l'expression de l'opéron *ica*. Ainsi, la voie de régulation de Rbf contrôlant la formation de biofilm en réponse à différents stimuli environnementaux est différente de celle d'*ica* en réponse aux mêmes stimuli. Le mutant *rbf* est déficient dans la production d'une protéine de 190 kDa qui pourrait correspondre à la protéine AAP (Accumulation associated protein) (Lim *et al.*, 2004). La mutation dans le gène *rbf* entraîne aussi la perte d'induction de formation de biofilm par le glucose et par le chlorure de sodium à des concentrations supérieures à 1,6 %. Ainsi, Rbf interagit soit directement avec l'inducteur de la formation de biofilm, soit à travers un autre facteur. L'effet du sel sur la formation de biofilm est multiphasique, à forte concentration, la formation de biofilm est contrôlée par le facteur Rbf tandis qu'à faible concentration, il semble qu'un autre facteur soit mis en jeu. A des concentrations en sel supérieures à 5,6%, un mécanisme spécifique inhibe la formation de biofilm. Ainsi, un gène régulateur est peut-être induit et il réprime la formation de biofilm soit directement ou via Rbf (Lim *et al.*, 2004). En fait, la régulation de Rbf par les facteurs *sar* et *agr* est envisagée mais reste inexplorée puisqu'ils affectent tous les deux directement ou indirectement la formation de biofilm.

8 - LES AUTRES REGULATEURS

Il existe d'autres systèmes à deux composantes dont le rôle dans la formation de biofilm n'est pas clairement décrit pourtant certains régulent des adhésines de surface impliquées dans la colonisation.

Le système « *S. aureus* exoprotein expression » (SaeRS) est impliqué dans la régulation globale de certains facteurs de virulence telles que l'alpha et la bêta hémolysine, la coagulase et la protéine A, indépendamment d'Agr et de SarA (Giraud *et al.*, 1999 ; Novick & Jiang, 2003).

Le système « Staphylococcal respiratory response » (SrrAB) est impliqué dans la régulation de facteurs influencés par des conditions environnementales en oxygène telles que les protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et dans la croissance en anaérobiose de *S. aureus* (Yarwood & Schlievert, 2003 ; Bronner *et al.*, 2004 ; Pragman *et al.*, 2004). SrrA peut interagir directement avec les promoteurs des gènes *tst* codant la toxine du syndrome du choc toxique (TSST), *spa* codant la protéine A et *agr* ainsi que sur son propre promoteur.

Le système LytRS est impliqué dans l'autolyse donc dans la division et la croissance cellulaire. Son rôle dans la formation de biofilm chez les staphylocoques n'a pas été étudié mais l'étude d'un mutant *lytR* chez *Streptococcus mutans* montre qu'il ne présente ni de

déficience dans l'adhésion à une surface, ni dans la croissance en biofilm (Brunskill & Bayles, 1996 ; Chatfield *et al.*, 2005).

Le système LuxS initialement découvert chez les bactéries à Gram négatif, a été récemment trouvé chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Xu *et al.*, 2006). Chez *S. epidermidis*, le système LuxS limite la formation de biofilm ainsi que la virulence dans une infection associée au biofilm dans un modèle animal. Les deux systèmes de QS (Agr et Lux) ont des effets très similaires sur le mode de croissance en biofilm mais réguleraient des facteurs différents.

D'autres éléments régulateurs pourraient participer à la régulation de certains gènes impliqués dans la formation de biofilm comme le répresseur de protéines Rot. C'est un membre de la famille Sar qui régule positivement certains gènes impliqués dans l'adhésion (Bronner *et al.*, 2004 ; Pragman *et al.*, 2004). Ainsi, il pourrait favoriser la colonisation mais le système Agr peut réprimer Rot par un mécanisme qui reste encore inconnu (Said-Salim *et al.*, 2003 ; Bronner *et al.*, 2004).

9 - CONCLUSION

La régulation de l'expression des gènes implique un réseau complexe de facteurs régulateurs qui interagissent entre eux (Figure 15).

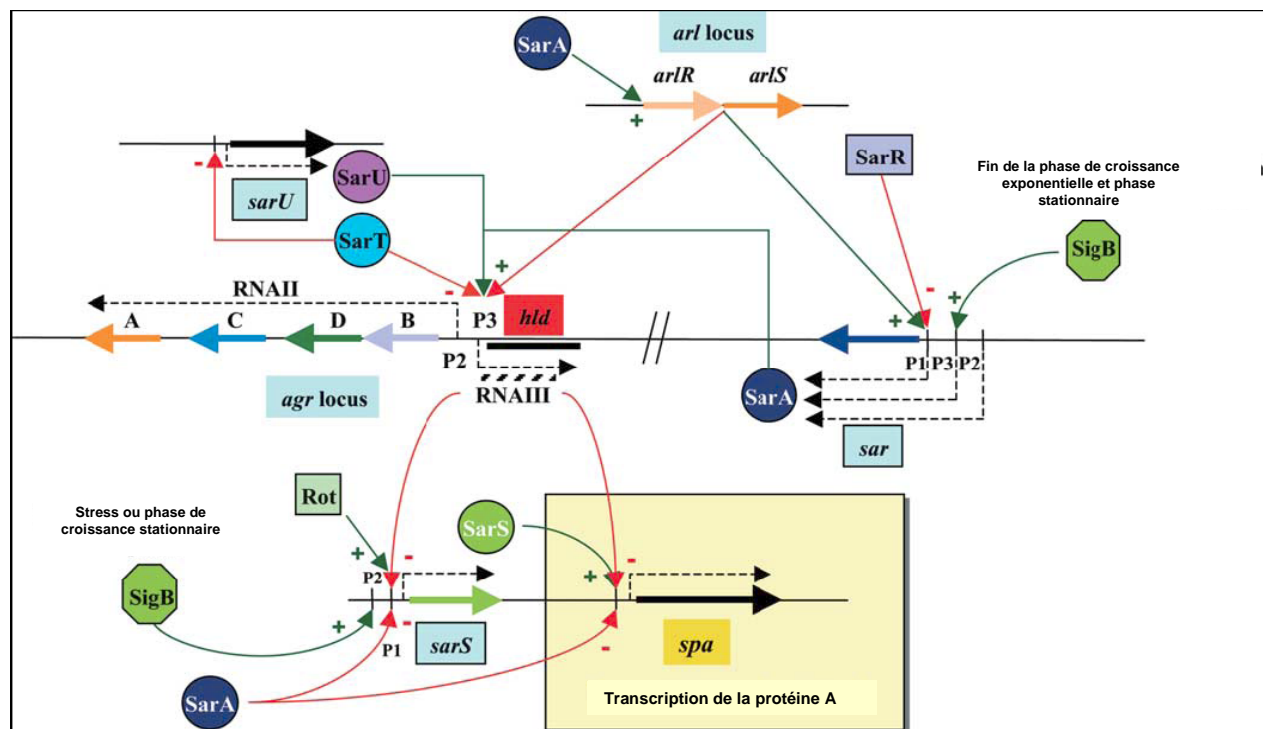


Figure 15 : Schéma de synthèse faisant intervenir les différents systèmes régulateurs (Bronner *et al.*, 2004).

Les systèmes régulateurs sont activés de façon temporelle permettant ainsi une coordination précise dans l'expression des gènes au cours du cycle cellulaire.

En phase exponentielle, RAP est sécrétée par la bactérie et entraîne l'activation du transcrite ARNII de l'opéron *agr* par une cascade de phosphorylation impliquant SvrA, le récepteur membranaire et TRAP, le régulateur de réponse cytoplasmique (Figure 11). Le transcrite ARNII active la synthèse des gènes *agrA*, *agrB*, *agrC* et *agrD* entraînant la synthèse de l'AIP. Durant cette phase, l'expression du locus *sar* est dirigée à partir des promoteurs P1 et P2 et elle est régulée positivement par son propre produit SarA. La protéine SarA va réguler les différents gènes cibles indépendamment d'*agr* via la liaison en amont de leurs promoteurs sur une SarA box. Par exemple, SarA régule positivement les protéines liant la fibronectine et celles codant la synthèse de la capsule polysaccharidique et des toxines (alpha, delta, gamma hémolysines) et négativement la protéine A, la protéine de liaison au collagène et des protéases. Or, l'expression des toxines peut être contrecarrée par le régulateur Rot qui est actif pendant toute la phase exponentielle. En effet, le répresseur Rot régule négativement l'expression de 60 gènes dont ceux codant des toxines et positivement celle de 86 gènes dont ceux codant des adhésines de surface. Pendant cette phase, la protéine SarA régule aussi positivement le locus *Arl* qui agit en retour positivement sur SarA au niveau de son promoteur P1 (Figure 15). Le locus *Arl* est transcrit pendant toute la phase exponentielle et va ainsi réguler les gènes cibles tels que les hémolysines alpha et bêta, la protéine A, la lipase, des protéases... Le locus *Arl* peut agir de façon directe sur des gènes cibles et de façon indirecte à travers les deux régulateurs Sar et Agr (Figure 15). Le locus *Arl* contrôle l'expression de 177 gènes, parmi eux, 37 sont régulés positivement dont les loci *sar* et *agr* et 77 sont régulés négativement dont des protéases et des adhésines de surface. Cependant, les résultats concernant le locus *agr* sont contradictoires avec ceux de Bronner et Fournier qui décrivent une régulation négative par *Arl* (Bronner *et al.*, 2004 ; Pragman *et al.*, 2004).

En phase post-exponentielle, quand la densité cellulaire est devenue importante, l'AIP s'est accumulé dans le milieu extracellulaire. Lorsque sa concentration atteint un certain seuil (relié à la densité cellulaire), l'AIP va d'un côté, inhiber la phosphorylation de TRAP et de l'autre, entraîner l'activation des molécules d'ARNII et d'ARNIII via une cascade de phosphorylation impliquant AgrC (récepteur membranaire) et AgrA (régulateur de réponse). L'ARNIII va réguler positivement l'expression de 104 gènes dont ceux codant les toxines et les protéases et négativement celle de 34 gènes dont ceux codant des adhésines de surface comme par exemple la protéine A, les protéines liant la fibronectine. Pendant cette phase, ARNIII va inhiber l'expression de Rot via la formation du complexe ARNIII/Rot permettant

ainsi l'expression des toxines. Pendant cette phase, l'expression de SarA est dirigée cette fois à partir du promoteur P3 dépendant du facteur SigB (Figure 15). En effet, ce dernier est activé lors de stress et notamment lors du passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Le facteur SigB régule une trentaine de gènes dont *sarA* ainsi que des gènes impliqués dans la formation de biofilm. La protéine SarA régule positivement le locus *agr* et va donc réguler les gènes cibles de façon agr-dépendante. SarA est régulée négativement par SarR qui est exprimée de façon importante en fin de phase post-exponentielle tandis qu'elle est régulée positivement par SigB (Figure 15). Il se peut que sous certaines conditions, un facteur intermédiaire réprime SarR permettant l'activation de *sar*. Ce facteur intermédiaire pourrait être sous le contrôle de SigB. Une autre possibilité est que sous d'autres conditions, un facteur réprimerait SigB empêchant l'activation de *sar*. Les gènes homologues à SarA interviennent alors dans la régulation des gènes cibles.

En phase stationnaire, le facteur SigB active l'expression de SarA qui régule positivement le locus *agr*. Le locus *agr* est aussi régulé positivement par son propre produit AgrA et SarU et négativement par SarT. Ce dernier réprime l'expression de SarU qui est lui-même réprimé par les loci *agr* et *sar*. L'expression de SarS est aussi influencée négativement par *agr* et SarA et positivement régulée par Rot et SigB en phase stationnaire. En effet, SarS possèdent 2 promoteurs dont un est régulé par SigA en phase exponentielle et l'autre par SigB en phase stationnaire.

Nous pouvons conclure que l'expression des gènes est dépendante de la phase de croissance, des conditions environnementales et des souches étudiées qui mettent en jeu des facteurs régulateurs spécifiques. La régulation de l'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm va ainsi conduire soit à son établissement soit à son détachement. La complexité et la spécificité des interactions sont probablement les clefs d'une régulation précise de l'expression des facteurs de virulence, incluant les facteurs responsables de la colonisation et les facteurs extracellulaires responsables de l'infection et/ou de la pathologie. La multiplicité des facteurs régulateurs et des connexions entre ces différents facteurs serait alors requise pour l'adaptation du microorganisme à divers environnements.

RESULTATS

PARTIE 1

*Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus*
à former des biofilms
(Articles 1 et 2)*

1 - PROBLEMATIQUE

Les staphylocoques sont communément trouvés sur la peau des hommes et des animaux, de ce fait ils sont fréquemment isolés des environnements alimentaire et médical. Leur présence et leur persistance dans ces environnements peuvent dépendre de leur capacité à coloniser et à former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques. Dans le domaine médical, la formation d'un biofilm par des bactéries, qu'elles soient pathogènes ou non, est néfaste pour des raisons de santé publique. Dans le domaine alimentaire, la présence de biofilm de bactéries d'altération et pathogènes est indésirable pour des raisons d'hygiène et de sécurité. Cependant, dans certains ateliers de transformation des aliments, la colonisation par des bactéries saprophytes ou utilisées comme ferments serait souhaitable pour inhiber la colonisation par des bactéries pathogènes ou d'altération. Certaines souches de *S. carnosus* et *S. xylosus* sont couramment utilisées comme ferments dans la fabrication des saucissons mais leur capacité à coloniser l'environnement des ateliers de salaison n'est pas connue. Concernant *S. carnosus*, seule la souche TM300 isolée de saucisson, a été décrite comme incapable de former des biofilms. Concernant, *S. xylosus*, il a été montré qu'une souche isolée d'un environnement alimentaire est capable de croître au sein d'un biofilm mixte. La formation de biofilms a été bien étudiée chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, elle est constituée d'une phase d'adhésion suivie d'une phase d'agrégation et de production d'exopolysaccharides. Il est bien établi pour ces espèces de staphylocoques étudiées que la formation d'un biofilm dépend de la souche, de ses propriétés de surface et de divers paramètres environnementaux.

Ainsi, l'objectif de cette première partie est de déterminer la capacité de différentes souches de *S. carnosus* et de *S. xylosus* à adhérer et à former des biofilms, en particulier sur des surfaces abiotiques utilisées en agroalimentaire. En parallèle, leur potentiel d'adhésion a été caractérisé par l'étude de leurs propriétés de surface.

2 - STRATEGIE

Pour analyser les 13 souches de *S. carnosus* et les 12 souches de *S. xylosus*, isolées pour la plupart de saucissons, nous avons effectué un criblage en plaque de microtitration basé sur la coloration des cellules adhérentes, comme décrit dans la littérature pour les staphylocoques. Nous avons testé deux types de plaque, à priori, hydrophobe et hydrophile. Les résultats se

sont révélés difficilement interprétable en raison des faibles adhésions et de la non reproductibilité. De plus, les valeurs obtenues pour les deux types de plaque étaient très proches révélant qu'en fait les matériaux des deux plaques étaient hydrophobes et peu différents. Nous avons alors effectué un criblage en tubes de verre (hydrophile) et de plastique (hydrophobe) pour avoir deux supports bien distincts. Nous avons étudié en parallèle les propriétés de surface des souches par une méthode d'affinité aux solvants. Suite à ce criblage, les souches *S. carnosus* 833 et *S. xylosus* C2a ont été sélectionnées pour étudier leur capacité à croître sur des supports utilisés en industrie agroalimentaire, le téflon et l'acier inoxydable. Cette étude a été réalisée dans différents milieux de culture pour établir les conditions optimales à la croissance et à la stabilité des biofilms. Compte tenu de l'importance des polysaccharides dans la croissance en biofilm, nous avons réalisé un dosage des polysaccharides par la méthode phénol/acide sulfurique. Puis, nous avons visualisé la répartition des cellules bactériennes sur les supports par des observations en microscopie électronique à balayage et en microscopie électronique environnementale. Pour les souches de *S. xylosus*, la présence des gènes *bap* et *ica*, décrits comme important dans la formation de biofilm chez les staphylocoques, a été étudiée.

3 - RESULTATS PRINCIPAUX

3-1. *S. carnosus* (Article 1)

Les 13 souches de *S. carnosus*, caractérisées par leur profil PFGE, forment un groupe homogène du point de vue génétique. Elles présentent aussi une homogénéité au niveau de leurs propriétés de surface qui sont plutôt hydrophiles avec une forte charge négative. Ces souches ne forment pas de biofilm sur les matériaux utilisés (verre, polystyrène) et dans les conditions testées. La souche *S. carnosus* 833 adhère difficilement sur le téflon excepté dans le milieu chimiquement défini de Hussain supplémenté avec du NaCl. Elle adhère modérément sur l'acier et son adhésion est améliorée par l'ajout de NaCl. Cette souche ne se multiplie pas dans les milieux chimiquement définis quelque soit le support. La plus forte croissance a été notée dans les milieux riches, TSB et TSB/NaCl, sur le téflon et dans les milieux TSB et TSB/Ca-Mg sur l'acier. La souche *S. carnosus* 833 ne synthétise pas de polysaccharides pendant toute la durée d'incubation du biofilm. Elle colonise faiblement la surface des coupons d'acier et de téflon après 48 h de croissance et les cellules ne sont pas engluées dans une matrice extracellulaire.

3-2. *S. xylosus* (Article 2)

Les souches de *S. xylosus* présentent une grande diversité génétique comme révélée par l'étude de leur profil PFGE dans notre laboratoire (Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2004). Ces souches sont aussi hétérogènes au niveau de leurs propriétés de surface. Elles sont divisées en deux groupes, l'un contient des souches hydrophiles, dont la souche C2a, et l'autre contient des souches moyennement hydrophobes, mais toutes sont chargées négativement en surface. Les souches de *S. xylosus* forment des biofilms préférentiellement sur des supports hydrophiles, exceptée la souche *S. xylosus* C2a qui forme des biofilms sur des supports hydrophile et hydrophobe. Elles possèdent toutes le gène *bap* mais le gène *icaA* est absent. La souche *S. xylosus* C2a adhère préférentiellement sur l'acier. Cette souche ne croît pas dans les milieux chimiquement définis que ce soit sur l'acier ou sur le téflon. La condition la plus favorable à la croissance de la souche et à la stabilité du biofilm est observée dans le milieu TSB/NaCl indépendamment du support. La souche *S. xylosus* C2a synthétise une quantité croissante de polysaccharides pendant sa croissance sur l'acier. Elle forme un biofilm dense composé de multicouches cellulaires agrégées par une matrice amorphe et séparées par des espaces intercellulaires.

La souche *S. xylosus* C2a a été sélectionnée pour étudier la physiologie de sa croissance en biofilm par une approche protéomique.

Article n°1

S. Planchon, B. Gaillard-Martinie, S. Leroy, M.N. Bellon-Fontaine, S. Fadda, R. Talon

Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species

Accepté pour publication dans Food Microbiology – Mars 2006

**Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*,
a genetically homogeneous species**

S. Planchon¹, B. Gaillard-Martinie¹, S. Leroy¹, M.N. Bellon-Fontaine², S. Fadda³, R. Talon^{1*}

¹Unité de Microbiologie, INRA Clermont-Ferrand /Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

²Unité de Recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, INRA, 91300 Massy, France.

³CERELA, CONICET, Chacabuco 145, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina.

Running title: Behaviour on abiotic surfaces of *S. carnosus*

*Corresponding author. Talon Régine, Unité de Microbiologie, INRA, Centre de Clermont-Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France. Tel.: +33-4-73624170; fax: +33-4-73624268. E-mail address: talon@clermont.inra.fr

Article accepté le 15 mars 2006 dans Food Microbiology

Abstract

This work aimed to characterise the surface properties of *Staphylococcus carnosus* and the influence of different media on their ability to adhere and grow on industrial supports. As their colonization could be dependant of the strain, the genetic diversity of the strains was studied. The diversity of 13 strains analysed by pulsed-field gel electrophoresis revealed that the *S. carnosus* strains formed a homogeneous genetic group. Their surface properties, characterised by studying their affinity to solvents, were hydrophilic with a strong negative surface charge. The *S. carnosus* strain CIT 833 hardly adhered to polytetrafluoroethylene (PTFE) and stainless steel chips. Tryptic soy broth (TSB) was the most favourable medium for growth on stainless steel support while TSB/NaCl was better for growth on PTFE. Scanning electron microscopy showed that this strain weakly colonized both supports and did not form cell aggregates. Indeed, the strain did not synthesize polysaccharides. These results showed that *S. carnosus* adhered on different abiotic surfaces which are used in food factories but was not able to accumulate on these surfaces. The inability of *S. carnosus* to form biofilm could explain why *S. carnosus* is rarely isolated in meat processing environment.

Keywords: genetic diversity, surface properties, bacterial colonisation, scanning electron microscopy, polysaccharides.

1. Introduction

The name of *Staphylococcus carnosus* is derived from its occurrence in meat products (Schleifer and Fischer 1982) but its natural habitat is not determined although it might be expected to be in relation with animals and their products. It is used as a starter culture in combination with lactic acid bacteria for sausage manufacturing in which it contributes to the development of sensorial qualities. In sausage, it reduces nitrate to nitrite, which plays a role in the colour of the products. It produces anti-oxidant enzymes, catalase and superoxide dismutase, that prevent rancidity in food products (Barrière et al. 2001). It contributes to the characteristic flavour of sausage by degrading branched chain amino acids into aromatic compounds: methyl aldehydes, methyl alcohols and methyl acids. It also synthesizes methyl ketones involved in the flavour of sausage (Talon et al. 2002).

The survival of staphylococci in food processing environments is frequently mentioned. Their survival in a food environment could be associated to their capacity to colonise abiotic surfaces (Gerke et al. 1998; Cramton et al. 1999; Moretro et al. 2003). In food industry, biofilm formation may be undesirable for hygienic and safety reasons because of attachment

of food spoilage or pathogenic or opportunistic pathogenic microorganisms to food or food surfaces. Nevertheless, in food systems, colonisation of surface by bacteria used as starters, such as *S. carnosus*, *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* or by the saprophytic species *Staphylococcus sciuri*, could be desirable to inhibit the colonisation by spoilage or pathogenic bacteria. Among these species, *S. sciuri* and *S. xylosus* were described as biofilm positive in abiotic surface usually found in food environment (Leriche and Carpentier 2000; Norwood and Gilmour 2001). Furthermore, *S. sciuri* biofilm was able to prevent adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces (Briandet 1999; Leriche and Carpentier 2000). Concerning *S. carnosus*, only one strain, the UT TM300, has been studied and described as “non-biofilm forming” on plastic and glass supports (Gross et al. 2001; Gotz 2002). But the behaviour of this species is not known in industrial supports such as stainless steel and polytetrafluoroethylene (PTFE, teflon). Moreover, it is well established that the formation of a biofilm is often dependant of the strain inside the same species (Moretro et al. 2003).

Colonization starts by bacterial adhesion to solid surfaces. This adhesion depends partly on the nature of the surfaces and partly on the surface properties of the bacteria such as Van der Waals forces, polar or Lewis acid-base and electrostatic interactions (Bellon-Fontaine et al. 1996). The physiochemical surface properties of bacteria are influenced by the culture conditions (Donlan 2002). In particular the ionic strength of the media modified either by adding sodium chloride or divalent cations played a role in the rate of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus epidermidis* (Dunne and Burd 1992). Furthermore these cations enhanced the production of polysaccharides by *S. epidermidis* (Ozerdem Akpolat et al. 2003). These exopolysaccharides are often associated to bacteria growing in biofilm in which they play a key role in the architecture (Donlan 2002).

The aim of this work was to characterise the surface properties of *S. carnosus* and the influence of different media on their ability to adhere and grow on industrial supports. As their colonization could be dependant of the strain, the genetic diversity of the strains was also studied.

2. Materials and methods

2.1 Macrorestriction typing of the strains

Thirteen strains of *S. carnosus*, all isolated from sausages but from different collections and from different sampling periods, were studied (Table 1). Among these strains, the “non-biofilm forming” UT TM300 strain was included (Gotz 2002). The strains were grown at

37°C in Brain Heart Infusion broth (Difco, Le pont de Claix, France). A suspension of Staphylococcal culture at optical density of 1 at 600 nm was centrifuged and resuspended in 0.5 volume of TEE buffer (Tris 10 mmol l⁻¹ pH 9, EDTA 100 mmol l⁻¹, EGTA 10 mmol l⁻¹). The suspension of bacteria was mixed in a ratio of 1:1 with 1.6 % low-melting-point agarose (GIBCO BRL, Cergy Pontoise, France). Agarose plugs were incubated with 40 µg ml⁻¹ of lysostaphin (Sigma, St Quentin, France), 0.05 % sarkosyl (Fluka) and 5 mg ml⁻¹ of lysozyme (Eurobio, les Ullis, France) at 37°C for 2 h. Then, they were lysed overnight in TEE buffer containing 1 % of sodium dodecyl sulfate and 1 mg ml⁻¹ of proteinase K (Eurobio) at 55°C. Plugs were washed 3 times for 1 h each, once in TE buffer (Tris 10 mmol l⁻¹ pH 8, EDTA 1 mmol l⁻¹) containing 20 mmol l⁻¹ of phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma) and twice in TE buffer. They were stored at 4°C until restriction. DNA within half a plug was digested by 15 U of *Apa*I or *Sma*I (Promega, Lyon Charbonnières, France) for 16 h at 37°C or 25°C, respectively. Pulse field gel electrophoresis was performed in 1 % agarose using a CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad, Ivry, France) in 0.5 X Tris-borate-EDTA buffer (TBE) at 6 V cm⁻¹ at 14°C. Pulse times increased from 10 to 30 s over 23 h. Lambda ladder (Promega) was used as molecular weight marker. Gels were stained with ethidium bromide and digitalized with the Gel Doc 2000 apparatus (Bio-Rad).

2.2 Affinity of the strains for the solvents

The Microbial Adhesion To Solvents (MATS) method which compares the microbial cell affinities for monopolar and nonpolar solvents was used according to Bellon-Fontaine et al. (1996). Two pairs of solvents were used as follows: i) chloroform (acidic solvent and electron-acceptor) and hexadecane (nonpolar *n*-alkane solvent); ii) ethyl acetate (basic solvent and electron-donor) and decane (nonpolar *n*-alkane solvent). The first pair determined the Lewis basic character of the strain and the second the Lewis acid character of the strain.

Three successive subcultures were performed for all strains in the same conditions: orbital shaking (150 rpm) at 30°C for 16 h in Tryptic Soy Broth supplemented with 6 g l⁻¹ of yeast extract (TSB, Difco, Le pont de Claix, France). The third subculture was collected in stationary phase, washed and resuspended in saline water (8.5 g l⁻¹ NaCl) to give an OD=0.6-0.7 at 400 nm (A0). 2.4 ml of this suspension were vortexed for 60 s with 0.4 ml of solvent. The mixture was stored 15 min at room temperature to allow the separation of two phases. OD_{400 nm} was measured in 1 ml of aqueous phase (A). The percentage of cells adherent to each solvent was calculated by: % Affinity = [1- (A/A0)] x 100. Experiments were performed in triplicate with two repetitions for each solvent.

2.3 Electrophoretic mobility

The surface charge was determined by the electrophoretic mobility. Bacterial cells of the third subculture of *S. carnosus* strain CIT 833 were washed in saline water and then suspended at a final concentration of 10^7 Colony Forming Unit (CFU) per ml in a 1.5 mmol l^{-1} NaCl solution (pH 5.7). The pH was adjusted within the range of 2 to 8 by adding nitric acid (0.01 mol l^{-1}) and potassium bromide (0.01 mol l^{-1}). The electrophoretic mobility was measured in a 50-Volt electric field using a laser Zetameter (CAD Instrumentation, Limours, France) coupled to a BX 40 microscope (Olympus) and to an image analysis system. Experiments were performed in duplicate with two repetitions.

2.4 Adhesion and growth on stainless steel and PTFE chips by the *S. carnosus* strain CIT 833

The study was carried out on two supports, stainless steel chip (AISI 304, hydrophilic, 4.5 cm^2) and polytetrafluoroethylene chip (PTFE, hydrophobic, 3.0 cm^2). These two supports are commonly used in food plants.

The third bacterial subculture was diluted in the culture medium to obtain an OD_{600} of 0.6-0.7. Seven ml of this bacterial suspension were poured into a small Petri dish containing one chip of PTFE or stainless steel. After 2 h-incubation at 30°C , the bacterial suspension was removed and replaced by 7 ml of sterile culture medium. Incubation lasted 48, 72 and 120 h at 30°C , with renewing the medium every 24 h.

Cell adhesion after 2 h-incubation and growth after 48, 72, and 120 h-incubation at 30°C were evaluated by cell numeration on the chip. After incubation, the chips were washed twice with 35 ml of sterile Tryptone Salt (TS: 1 g l^{-1} bactotryptone and 8.5 g l^{-1} NaCl) on an orbital shaking table (Belly Dancer, Greensboro, USA) to remove non-adherent cells. Adherent cells were detached in 10 ml of TS in a sonication bath (Deltasonic, Meaux, France) for 3 min at 50 Hz. Serial dilutions were plated on tryptic soy agar (TSA, Difco, Le pont de Claix, France) and incubated for 24 h at 37°C . Cell adhesion was evaluated by cell numeration and expressed by the number of Colony Forming Unit by square centimeter of chip (CFU/cm^2).

Adhesion and growth were studied in the complex medium TSB, or TSB supplemented with CaCl_2 0.03% (w/v) and MgSO_4 0.05% (w/v) (Prolabo, Paris, France) TSB/Ca-Mg, or TSB supplemented with NaCl 2% (w/v) TSB/NaCl, and in the chemical defined media: MCDB medium (Molecular Cellular Development of Biology 202, CryoBiosystem, L'Aigle, France) supplemented with 1% yeast nitrogen base without amino acids (Difco, Le pont de Claix, France) and Hussain medium (Hussain et al., 1991) with or without addition of NaCl 1% (w/v).

For one experiment, adhesion was done in saline water (SW) during 2 h and then the bacterial suspension was removed and replaced by TSB for 48 h- or 120 h- growth at 30°C. This last condition was noted TSB/SW.

Experiments were performed in duplicate, with three stainless steel chips and three PTFE chips per incubation time for each experiment.

2.5 Polysaccharide assay

The *S. carnosus* strain CIT 833 was grown in TSB for 48 h or 120 h on stainless steel strips as described above. The adhered cells were detached from strips by sonication (4 min at 30°C) in SW and population was numerated on TSA. The sonicated suspension was centrifuged at 20 000 g for 30 min at 4°C and the supernatant was filtered on a 0.45 µm membrane. Then the samples were concentrated by centrifugation (3 000 g, 40 min) on a 10 kDa ultrafiltration membrane (Centricon, Millipore). The quantity of polysaccharides was assayed on the concentrated samples by the method of Dubois *et al.* (1956). Results were expressed in µg of polysaccharides per log 10⁸ CFU, and represented the mean of six measures from three independent cultures.

2.6 Observations of the colonization by scanning electron microscopy (SEM)

The *S. carnosus* strain CIT 833 was grown on PTFE and stainless steel chips, in TSB during 48 h at 30°C. Non-adherent cells were removed from the surfaces by washing in TS. Adherent cells were fixed on the strips with a solution of 3% glutaraldehyde in 0.2 mol l⁻¹ sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 1 h and washed in this buffer three times for 10 min each. After post fixation for 30 min with osmic acid vapours, strips were rinsed in cacodylate buffer three times for 10 min each. Cells were dehydrated using a graded ethanol series (70, 95 and 100%), three baths of 10 min each and subjected to an acetone dehydration series of 30, 50, 70% acetone, three baths of 15 min each and three baths in 100% acetone for 10 min each. Strips were coated with gold and observed with a scanning electron microscope (Philips SEM 505) at 25 KeV.

3. Results

3.1 Macrorestriction analysis of the *S. carnosus* strains

Macrorestriction analysis by pulsed-field gel electrophoresis showed that the 13 strains of *S. carnosus* had identical patterns either after *Apa*I or *Sma*I restriction (Fig. 1 A, B). The 13

strains isolated of diverse geographical origins by different laboratories over a period of several years as mentioned in Table 1 were genetically very homogeneous.

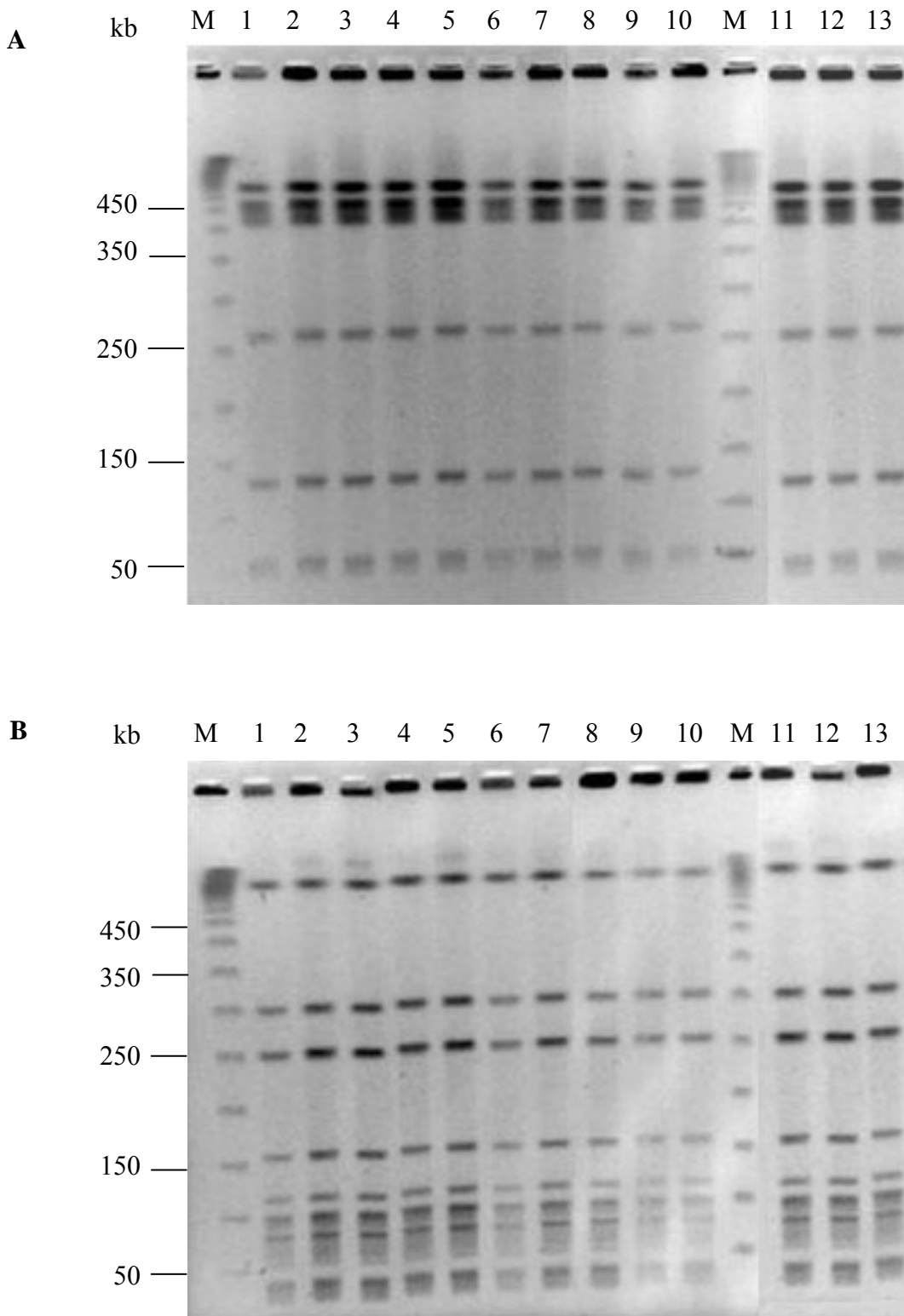


Fig. 1. PFGE profiles of *ApaI* (A) and *SmaI* (B) restricted genomic DNA of *Staphylococcus carnosus* strains
 Lanes M: Lambda ladder (Promega); lane 1: CIT 833; lane 2: DSM 20501; lane 3: CIT S01014; lane 4: CIT S01015; lane 5: CIT S01018; lane 6: UB M427; lane 7: UT TM300; lane 8: UB M431; lane 9: UB M429; lane 10: CIT 836; lane 11: UB M433; lane 12: CIT S01016; lane 13: CIT S01017.

3.2 Physicochemical surface properties

The 13 strains shared similar affinity for the polar and apolar solvents used (Table 1). They had a strong affinity to the chloroform, an acidic solvent and an electron acceptor. Their adhesion to chloroform was higher than to hexadecane, two solvents with similar Van der Waals properties. Moreover, the strains had a low affinity for ethyl acetate, which is a strongly basic solvent and an electron donor. These data showed that the *S. carnosus* strains had hydrophilic properties with a marked basic character surface i.e. an electron donor character.

All the *S. carnosus* strains, including the UT TM300 strain, were genetically homogeneous and showed identical surfaces properties. Consequently, one strain, the *S. carnosus* strain CIT 833 isolated by our laboratory was selected to be representative of the whole *S. carnosus* group.

Table 1: Percentage of affinity to the solvents of *S. carnosus* strains

<i>S. carnosus</i>	Sampling date	Chloroform %	Hexadecane %	Ethyl acetate %	Decane %
^a DSM 20501	1982	95 ± 4	25 ± 4	8 ± 3	33 ± 6
^b UT TM 300	1983	94 ± 3	18 ± 5	7 ± 4	32 ± 2
^c CIT 833	1997	95 ± 3	25 ± 3	12 ± 3	33 ± 5
CIT 836	1997	95 ± 2	17 ± 1	5 ± 2	30 ± 3
CIT S01014	2002	90 ± 8	20 ± 4	9 ± 3	24 ± 3
CIT S01015	2002	99 ± 1	32 ± 5	10 ± 2	41 ± 4
CIT S01016	2002	98 ± 2	21 ± 4	17 ± 5	43 ± 4
CIT S01017	2002	94 ± 2	27 ± 6	12 ± 4	36 ± 3
CIT S01018	2002	92 ± 6	23 ± 3	8 ± 4	34 ± 6
^d UB M427	1995	96 ± 2	20 ± 4	11 ± 1	49 ± 14
UB M429	1995	97 ± 3	17 ± 4	7 ± 5	47 ± 13
UB M431	1995	98 ± 1	17 ± 4	8 ± 3	50 ± 10
UB M433	1995	99 ± 0	19 ± 2	13 ± 4	51 ± 6

Values are means (n=6), ± standard deviations; ^aDSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; ^bUT: University of Tuebingen; ^cCIT: Collection of INRA Theix; ^dUB: University of Bath

The electrophoretic mobility was measured at various pHs ranging from 2 to 8 for *S. carnosus* strain CIT 833 to determine the cell surface net charge (Fig. 2). This strain presented a maximum electronegativity at pH 4, reaching value of $-3.17 \mu\text{m V}^{-1}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$. This negative surface charge progressively decreased with more acidic pH to reach a neutral surface charge at pH 2. The electrophoretic mobility was checked for two other strains at pH 5.0, they had a mobility of $-2.49 (\pm 0.31) \mu\text{mV}^{-1}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the reference strain 20501 and $-2.69 (\pm 0.37) \mu\text{mV}^{-1}\text{s}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the strain TM300. Thus, at this pH no significant difference was noticed

between the 3 strains of *S. carnosus* confirming the choice of one strain representative of the group for the following study.

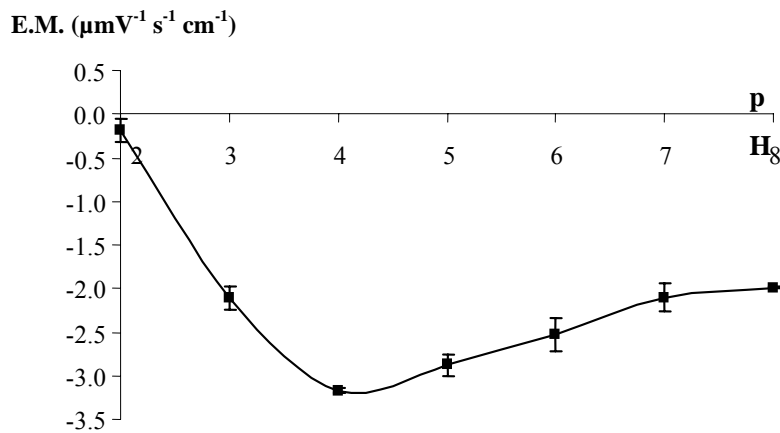


Fig. 2. Electrophoretic mobility (E.M.) of the *S. carnosus* strain CIT 833 (—■—) with standard deviation

3.3 Adhesion and growth on stainless steel and PTFE chips by the *S. carnosus* strain CIT 833

The *S. carnosus* strain CIT 833 did not adhere on PTFE chip except in the Hussain medium with salt (Table 2). Adhesion was moderate on stainless steel, reaching 17% in MCDB and 15% in Hussain media but it was very low in TSB one. Addition of NaCl, to TSB or Hussain media, improved adhesion on stainless steel. Similarly, the adhesion realised in saline water (SW) reached 30% on this support. But addition of divalent cations to TSB did not improve the adhesion.

Table 2: Adhesion (2 h) of the *S. carnosus* strain CIT 833 to stainless steel and PTFE chips

Media	Support	Stainless steel		PTFE	
	Bacteria loaded	Adhered	% Adhesion ^a	Adhered	% Adhesion
Complex media^c					
TSB	10.0	0.1 (0.03) ^b	1	0.1 (0.07)	1
TSB/SW	9.0	2.8 (0.7)	31	0.01 (0.00)	0.1
TSB/NaCl	9.0	2.9 (0.8)	32	0.02 (0.01)	0.2
TSB/Ca-Mg	9.0	0.2 (0.1)	2	0.1 (0.06)	1
Chemical defined media^c					
MCDB	10.0	1.7 (0.5)	17	0.5 (0.2)	5
Hussain	6.8	1.0 (0.4)	15	0.4 (0.03)	6
Hussain/NaCl	7.9	1.6 (0.8)	20	1.7 (0.3)	22

a. Adhesion was calculated by the following equation: adhesion = (bacteria adhered/bacteria loaded) × 100, bacteria adhered is the population expressed as CFU × 10⁷/cm² of chip after 2 h of adhesion, bacteria loaded is the initial population loaded on the chip expressed as CFU × 10⁷/cm² of chip; **b.** Standard deviation, n=6 values; **c.** TSB, Tryptic Soy Broth with yeast extract, TSB/SW adhesion done in saline water (SW) and growth in TSB, MCDB, Molecular Cellular Development of Biology 202 supplemented with 1% yeast nitrogen base without amino acids.

The growth of *S. carnosus* was different on the two supports and also varied according to the media (Table 3). On PTFE chip, growth of 1.2 log and 1.5 log was observed in TSB/SW and TSB/NaCl, respectively after 48 h of incubation. Then the population remained stable. No significant growth was noticed in MCDB and in Hussain media with or without NaCl. In TSB and TSB/Ca-Mg medium, the population increased of 0.6 log and 1.0 log, respectively, in a progressive way during all the incubation.

On stainless steel chip, the opposite behaviour of the strain was noticed in the media TSB/NaCl and TSB/SW, the population dropped of 1.5 log until 48 h and then was stable until 120 h (Table 3). In MCDB and Hussain media, a slight decline (-0.5 log) was noticed at 48 h and the population stayed constant up to 120 h. In Hussain medium with NaCl, no growth was noticed as observed on PTFE chip. In TSB and TSB/Ca-Mg media, the growth of the strain, with a progressive increase of about 1.0 log during all the incubation, was quite similar to the one observed on PTFE.

Table 3: Growth of the *S. carnosus* strain CIT 833 to stainless steel and PTFE chips in different media

Support	Stainless steel			PTFE			
	Time	T 2 h	T 48 h	T 120 h	T 2 h	T 48 h	T 120 h
Complex media ^c							
TSB		5.92 ^a (0.16) ^b	6.48 (0.10)	7.08 (0.13)	6.12 (0.29)	6.59 (0.24)	6.75 (0.02)
TSB/SW		7.41 (0.11)	6.36 (0.20)	6.22 (0.42)	5.18 (0.41)	6.03 (0.31)	6.38 (0.24)
TSB/NaCl		7.46 (0.11)	6.39 (0.44)	6.63 (0.23)	5.08 (0.39)	6.54 (0.31)	6.36 (0.24)
TSB/Ca-Mg		6.29 (0.22)	6.45 (0.15)	7.23 (0.26)	5.96 (0.25)	6.30 (0.19)	7.01 (0.07)
Chemical defined media ^c							
MCDB		7.23 (0.11)	6.66 (0.18)	6.67 (0.16)	6.69 (0.14)	6.85 (0.04)	6.50 (0.28)
Hussain		7.02 (0.16)	6.56 (0.18)	6.65 (0.11)	6.60 (0.03)	6.70 (0.14)	6.70 (0.34)
Hussain/NaCl		7.20 (0.22)	7.34 (0.11)	7.17 (0.02)	7.23 (0.08)	6.79 (0.16)	7.17 (0.05)

a. Mean of six chips (log CFU cm⁻²); **b.** Standard deviation, n=6 values; **c.** TSB, Tryptic Soy Broth with yeast extract, TSB/SW adhesion done in saline water (SW) and growth in TSB, MCDB, Molecular Cellular Development of Biology 202 supplemented with 1% yeast nitrogen base without amino acids.

3.4 Synthesis of exopolysaccharides

The quantity of polysaccharides linked to the *S. carnosus* strain CIT 833 cells was weak and did not vary during all the time of incubation, it was 11.5 ± 1.7 , 10.9 ± 4.4 , 15.8 ± 6.8 µg per log 10⁸ CFU, after 2 h, 48 h and 120 h of incubation, respectively. So, this strain did not synthesize polysaccharides during its growth on stainless steel.

3.5 SEM Observations

These observations showed that the *S. carnosus* strain CIT 833 weakly colonized the surface of the two supports after 48 h of incubation (Fig. 3). Cells were organized in tetrads, in pairs or single on stainless steel (Fig. 3a) and PTFE (Fig. 3b) chips. Cells were isolated and did not aggregate between them. No mucous matrix was visualised confirming the absence of extracellular polymers. Cells of *S. carnosus* strain CIT 833 were not able to aggregate between them to build a three-dimensional structure with multilayer of cells.

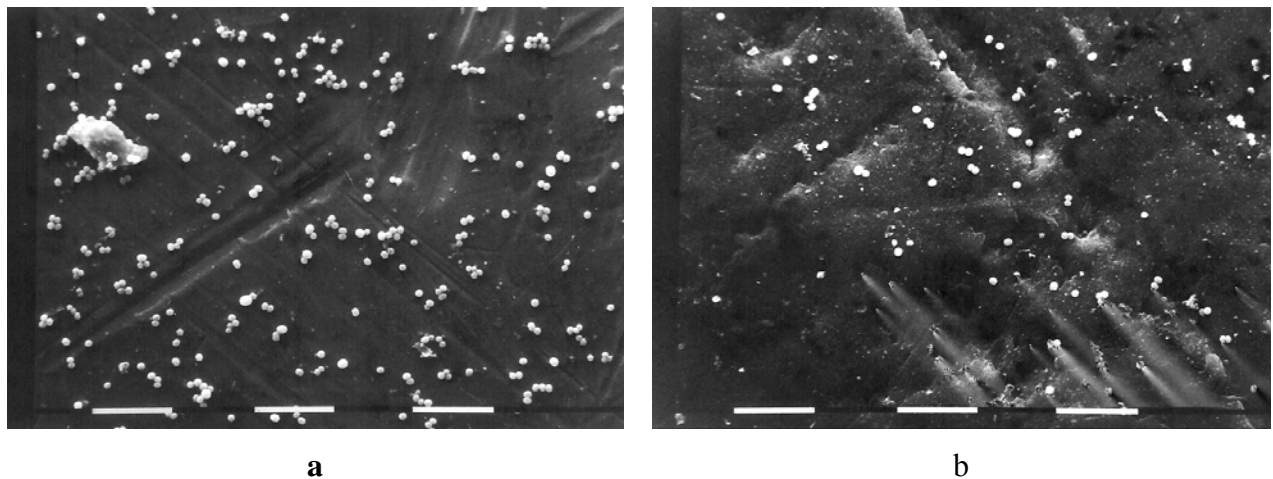


Fig. 3. Observation by scanning electron microscopy of colonization by *S. carnosus* strain CIT 833 on stainless steel chip (a) and on PTFE chip (b) Size bar: 10 μ m

4. Discussion

Genetic diversity analyzed by pulsed-field gel electrophoresis showed that the strains of *S. carnosus* isolated from meat products constituted a remarkably homogeneous genetic group by comparison to others species of *Staphylococcus* such as: *S. xylosus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* (Morot-Bizot et al. 2003; de Mattos et al. 2003; Rabello et al. 2005). For *S. epidermidis*, *S. aureus* and *S. xylosus* diversity in biofilm formation within species was observed (Mack et al. 1992; Planchon et al. 2005). In our study, all the strains of *S. carnosus* had the same physicochemical surface characteristics measured by MATS method which compares the microbial cell affinities for monopolar and apolar solvents. Similarities between strains of the same species with regard to their physicochemical properties lead to think that they have probably similar surface architectures.

Attachment, the first step of biofilm formation, is mainly governed by physicochemical interactions between the support and the bacterial surface including hydrophobicity, Van der Waals forces and Lewis acid-base properties (Bellon-Fontaine et al. 1996; Briandet et al. 1999). The physicochemical surface properties of *S. carnosus* were studied to estimate its

potential of adhesion. *S. carnosus* was hydrophilic with a strong basic character and thus it adhered preferentially on hydrophilic support such as stainless steel. Such results were already observed for some strains of *S. xylosus* (Planchon et al. 2005) and *S. aureus* (Lerebour et al. 2004). While other strains of *S. xylosus*, *Staphylococcus* spp, *S. sciuri* and *S. epidermidis* presented a basic character surface with moderate hydrophobic properties, thus they adhered preferentially on hydrophobic and moderately on hydrophilic supports (Briandet 1999; Leriche and Carpentier 2000; Planchon et al. 2005). This basic character is due to the negatively charged surface of microorganisms. Indeed, most of bacteria are negatively charged in the range of pH usually encountered in food (pH<7). Similarly, negative charges were found for *S. carnosus* with an isoelectric point at pH 2. Some strains of *S. xylosus* and *S. aureus* were found to reach their isoelectric point at pH 2.0 while other strains of *S. xylosus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Staphylococcus* spp isolated from food industry did not reach it between pH 2 and 7 (Sonohara et al. 1995; Briandet 1999; Briandet 1999; Planchon et al. 2005) Bacterial cells generally reached isoelectric points around pH 2 or 3.5. But some staphylococci encapsulated or not, did not have an isoelectric point (Giovannacci et al. 2000). The negative cell surface charge of bacteria is mainly due to the composition of teichoic acids (Gross et al. 2001). They are highly charged cell wall polymers, composed of alternating phosphate and ribitol or glycerol groups, which are substituted with D-alanine and N-acetylglucosamine (Peschel et al. 2000).

Even if bacteria and surfaces are negatively charged, Van der Waals forces can overcome repulsion and lead to adhesion (Cramton et al. 1999). The Van der Waals forces are generally attractive, and ionic forces can be either attractive or repulsive. The repulsive electrostatic interactions between bacterial cells and negative charged surfaces (stainless steel) could be reduced by treatment of the support with positively charged ions. In our study, the addition of NaCl improved significantly the adhesion of *S. carnosus* on stainless steel. Similar results have been shown for *Staphylococcus* spp. (Briandet 1999).

Primary adhesion is followed by growth and accumulation on the surface of the support. We have shown that *S. carnosus* adhered preferentially on hydrophilic support but it grew of approximately 1.0 log both on hydrophilic and hydrophobic supports in TSB medium. Addition of NaCl during growth had contrary effects: release on stainless steel (hydrophilic) and enhancement on PTFE (hydrophobic) supports. Such positive effect of NaCl had been already shown on the biofilm growth of different coagulase negative staphylococci on hydrophobic support (Moretro et al. 2003). For *S. xylosus*, NaCl improved and stabilized the biofilm growth on stainless steel and PTFE supports (Planchon et al. 2005).

Even if growth was observed for *S. carnosus*, no aggregation between cells was observed in scanning electron microscopy and no polysaccharides were assayed by the Dubois method. These results are in agreement with those of Heilmann et al. (1996) which showed that the *S. carnosus* strain UT TM300 achieved the primary attachment to a hydrophilic surface but was unable to accumulate on the surface and so to form aggregates. Authors thought that this adhesion could be mediated by hydrophilic interaction of wall or lipo-teichoic acid.

Absence of synthesis of polysaccharides could explain the lack of formation of three-dimensional network. The polysaccharides play a key role in biofilm formation of staphylococci because they consolidate the adhesion of bacterial cells to surfaces and cell-cell adhesion. The Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) described for *S. epidermidis* and *S. aureus* strains, is responsible for intercellular aggregation and could mediate adherence to hydrophilic surfaces (Heilmann et al. 1996; Cramton et al. 1999). PIA is encoded by *ica* locus and a mutation in this locus resulted for *S. aureus* in a loss of the ability to form biofilm (Cramton et al. 1999). *S. carnosus* UT TM300 strain is devoided of the *icaA* gene, one gene of the locus *ica*, and is described like “non-biofilm forming” strain by several authors (Cramton et al. 1999; Gross et al. 2001; Gotz 2002). Since all the *S. carnosus* strains are genetically homogeneous and exhibit similar surface properties, we can assume that these strains do not have the ability to produce PIA as the UT TM300 strain.

In conclusion, it appeared that *S. carnosus* adhered on different abiotic surfaces which can be encountered in food factories but was not able to accumulate on these surfaces. This observation could explain why *S. carnosus* is rarely isolated in the environment and never mentioned as coagulase negative staphylococci isolated in clinical area.

Acknowledgements

We express our gratitude to the University of Tübingen (F. Götz) for providing the *S. carnosus* strain UT TM300 and the University of Bath for providing four strains. We thank N. Garrel and B. Duclos for their technical assistance. This work was financially supported by a national contract: Aliment Qualité Sécurité, (AQS R01/09) and was a part of ECOS project (A03B02). Stella Planchon has a research fellowship from the French Ministry of “Education Nationale et Recherche”.

References

Barrière, C., Leroy-Sétrin, S. and Talon, R. (2001) Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *J. Appl. Microbiol.* 91(3), 514-

519.

Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. and Van Oss, C. J. (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 747-753.

Briandet, R., (1999) Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms. Aspects physico-chimiques. Thèse de Docteur de l'ENSAR - Mention Physico-chimie et Qualité des bioproduits, Rennes, France.

Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. and Bellon-Fontaine, M. N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12), 5328-5333.

Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. and Götz, F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67(10), 5427-5433.

De Mattos, E. M., Teixeira, L. A., Alves, V. M., Rezenda e Resende, C., Da Silva Coimbra, M. V., Da Silva-Carvalho, M. C., Ferreira-Carvalho, B. T. and Figueiredo, A. M. (2003) Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45(1), 13-22.

Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8(9), 881-90.

Dunne, W. M. and Burd, E. M. (1992) The effects of magnesium, calcium, EDTA, and pH on the *in vitro* adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. *Microbiol. Immunol.* 36(10), 1019-1027.

Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O. and Götz, F. (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273(29), 18586-18593.

Giovannacci, I., Ermel, G., Salvat, G., Venduvre, J. L. and Bellon-Fontaine, M.-N. (2000) Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *J. Appl. Microbiol.* 88, 1-10.

Götz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43(6), 1367-1378.

Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. and Peschel, A. (2001) Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* 69(5),

3423-3426.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. and Götz, F. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20(5), 1083-1091.

Lerebour, G., Cupferman, S. and Bellon-Fontaine, M.-N. (2004) Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *J. Appl. Microbiol.* 97(1), 7-16.

Leriche, V. and Carpentier, B. (2000) Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 88(4), 594-605.

Mack, D., Siemssen, N. and Laufs, R. (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* 60(5), 2048-2057.

Moretro, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K. and Langsrud, S. (2003) Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9), 5648-5655.

Morot-Bizot, S., Talon, R. and Leroy-Sétrin, S. (2003) Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *J. Microbiol. Methods* 55(1), 279-286.

Norwood, D. E. and Gilmour, A. (2001) The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* 33(4), 320-324.

Ozerdem Akpolat, N., Elci, S., Atmaca, S., Akbayin, H. and Gul, K. (2003) The effects of magnesium, calcium and EDTA on slime production by *Staphylococcus epidermidis* strains. *Folia Microbiol. (Praha)* 48(5), 649-653.

Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. and Götz, F. (2000) The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(10), 2845-2847.

Rabello, R. F., Souza, C. R., Duarte, R. S., Lopes, R. M., Teixeira, L. M. and Castro, A. C. (2005) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 88(9), 3211-3219.

Schleifer, K.H. and Fischer, U. (1982) Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. System. Bacteriol.* 32(2), 153-156.

Sonohara, R., Muramatsu, N., Ohshima, H. and Kondo, T. (1995) Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys. Chem.* 55(3), 273-277.

Talon, R., Leroy-Sétrin, S. and Fadda, S. (2002) Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products* (Eds Fidel Toldrá) Chapter 10 pp.175-191. Research Signpost.

Article n°2

S. Planchon, B. Gaillard-Martinie, E. Dordet-Frisoni, M. N. Bellon-Fontaine, S. Leroy,
J. Labadie, M. Hébraud, R. Talon

Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*

Accepté pour publication dans International Journal of Food Microbiology - Février 2006



Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*

S. Planchon^a, B. Gaillard-Martinie^a, E. Dordet-Frisoni^a, M.N. Bellon-Fontaine^b, S. Leroy^a,
J. Labadie^a, M. Hébraud^a, R. Talon^{a,*}

^a INRA Clermont-Ferrand/Theix, UR 454, Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

^b INRA, UR Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, 91300 Massy, France

Received 1 April 2005; received in revised form 24 October 2005; accepted 3 January 2006

Abstract

The ability of 12 *Staphylococcus xylosus* strains to form biofilm was determined through the study of different criteria. Eleven out of the 12 strains were able to form biofilm, 10 preferentially on hydrophilic support (glass) and one, *S. xylosus* C2a, on both hydrophilic and hydrophobic (polystyrene) supports. The determination of bacterial surface properties showed that all strains were negatively charged with five strains moderately hydrophobic and seven hydrophilic. The *bap* and *icaA* genes, important for biofilm formation of some staphylococci, were searched. All strains were *bap* positive but *icaA* negative. Furthermore, *S. xylosus* strain C2a was studied on two supports widely used in the food industry, polytetrafluoroethylene (PTFE, hydrophobic) and stainless steel (hydrophilic) and appeared to adhere preferentially on stainless steel. Addition of 20 g/l of NaCl to Tryptic Soy Broth medium (TSB) did not improve significantly its adhesion but enhanced both bacterial growth and cell survival, which were optimum in this medium. Environmental scanning electron microscopy showed that *S. xylosus* C2a colonized the surface of stainless steel chips with intercellular spaces. The strain formed cell aggregates embedded in an amorphous polysaccharidic matrix. Indeed, synthesis of polysaccharides increased during growth on stainless steel chips in TSB.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus xylosus*; Biofilm; Hydrophobic supports; Hydrophilic supports; Bacterial surface properties; Polysaccharides

1. Introduction

Staphylococcus xylosus, a common bacterial species from the skin microflora of mammals, is frequently isolated from milk, meat, and other food products such as cheeses and sausages (Kloos and Schleifer, 1986; Talon et al., 2002). This species is also used as starter in combination with lactic acid bacteria for sausage and cheese manufacturing, in which it contributes to their flavour (Montel et al., 1996; Talon et al., 2002). In sausages, *S. xylosus* participates through its nitrate reductase activity to the development of the colour and it avoids their rancidity thanks to its anti-oxidant enzymes (Barrière et al., 2001). Furthermore, some strains of *S. xylosus* produced inhibitory substances in laboratory media that prevent devel-

opment of *Listeria monocytogenes* (Villani et al., 1997; Norwood and Gilmour, 2000).

S. xylosus is frequently isolated from soils and surfaces of food-processing plants (Kloos and Schleifer, 1986). Its presence could be linked to its capacity to form biofilm often involved in the colonization of biotic and abiotic surfaces. Several staphylococcal species form biofilms, among them *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* are responsible of infections related to medical devices and therefore are the most threatening (Peters et al., 1982; Christensen et al., 1985; Götz, 2002;). For these two species, the mechanisms involved in biofilm formation are well characterised unlike other staphylococci such as *S. xylosus* (Heilmann et al., 1997; Cramton et al., 1999).

Biofilm formation is a two-step process; it involves first attachment of cells to a solid surface and second the accumulation and aggregation of cells sticking together by intercellular adhesion (Christensen et al., 1985). Biofilm formation is a complex process regulated by diverse

* Corresponding author. Unité de Microbiologie, INRA, Centre de Clermont-Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France. Tel.: +33 4 73 62 41 70; fax: +33 4 73 62 42 68.

E-mail address: talon@clermont.inra.fr (R. Talon).

characteristics of support, bacterial cell surface, growth medium and their interactions (Donlan, 2002). Attachment is governed by physicochemical interactions between the support and the bacterial surface including hydrophobicity, Van der Waals forces and Lewis acid–base properties (Bellon-Fontaine et al., 1996; Briandet et al., 1999; Krepsky et al., 2003). The physicochemical characteristics of the medium such as ionic strength (Barnes et al., 1999) may play a role in the rate of biofilm formation. In particular, sodium chloride induced biofilm formation in *S. aureus* and *S. epidermidis* (Götz, 2002). Also divalent cations such as calcium or magnesium enhanced the adhesion of *S. epidermidis* (Dunne and Burd, 1992). In addition, these divalent cations significantly enhanced slime production by *S. epidermidis* and seemed important in maintaining the biofilm structure (Ozerdem Akpolat et al., 2003). The slime or Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) excreted by *S. aureus* as well as *S. epidermidis* strains participates to biofilm formation (Götz, 2002) and PIA is encoded by the *icaADBC* operon and its presence is associated with strong biofilm formers (Heilmann et al., 1996; Gerke et al., 1998). This polysaccharide is mainly involved in intercellular adhesion (Heilmann et al., 1996). For some staphylococci, another surface component seemed important in biofilm formation: the biofilm associated protein (Bap). The *bap* gene was identified in bovine mastitis isolates of different species, it is involved in primary attachment and intercellular adhesion (Cucarella et al., 2004).

The aim of the present study was to investigate the capacity of *S. xylosus* strains to form biofilm. For 12 strains of *S. xylosus*, development in biofilm was investigated on hydrophobic and hydrophilic supports and their potential of adhesion was characterised by determining their surface properties. Moreover, *bap* and *ica* genes were searched. For *S. xylosus* strain C2a, biofilm development was studied in different growth media and biofilm architecture was visualized by environmental scanning electron microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth medium

Twelve *S. xylosus* strains were studied, including three reference strains DSM 20266, DSM 20267 and C2a (University of Tübingen) isolated from human skin. The nine other strains were isolated from fermented sausages and identified by PCR (Morot-Bizot et al., 2003). Bacteria were subcultured three times with orbital shaking (150 rpm) at 30 °C for 16 h in Tryptic Soy Broth supplemented with 6 g/l of yeast extract (TSB, Difco, Le pont de Claix, France). The third subculture was used in stationary phase for all the experiments.

2.2. Screening for biofilm formation on glass and polystyrene

The 12 strains were screened for their ability to form biofilm on hydrophilic (glass) and hydrophobic (polystyrene) tubes. The third bacterial subcultures (see Section 2.1) were centrifuged at $4000 \times g$ for 10 min (Jouan MR22i, Saint-

Herblain, France). Cells were washed three times in saline water (8.5 g/l NaCl) and were adjusted at an optical density (OD) of 0.1 at 600 nm (UV 160A, Shimadzu Corporation, Japan). One milliliter of culture was distributed in each type of tubes. After a 2-h adhesion step at 30 °C, the bacterial suspension was eliminated and replaced by TSB medium. The tubes were incubated for 48 h at 30 °C. Then, the bacterial suspensions were removed and the tubes were washed three times with 1 ml of 0.01 M phosphate buffer saline ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.45 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.8 g/l, NaCl 7.4 g/l) and air-dried. The adherent bacterial film was stained during 5 min with 1 ml of 0.25% (w/v) safranin O (Merck, Darmstadt, Germany) and rinsed with distilled water and air-dried. The bacterial film was then solubilized with ethanol 95% (v/v) and the colour was quantified by the absorbance at 540 nm. Tubes inoculated with sterile media were used as negative controls. The strains with an $\text{OD} \geq 0.5$ were considered as able to form biofilm (Krepsky et al., 2003). Experiments were performed in triplicate with three repetitions by strain for each experiment.

Data were analysed by the Student *t* test (Microsoft Excel software) to compare biofilm development of the strains on polystyrene and glass tubes.

2.3. Surface properties of the 12 strains

2.3.1. Affinity of the strains for the solvents (MATS)

The Microbial Adhesion To Solvents (MATS) method which compares the microbial cell affinities for monopolar and nonpolar solvents was used according to Bellon-Fontaine et al. (1996). Two pairs of solvents were selected as follows: i) chloroform, an acidic solvent (electron-acceptor), and hexadecane, a nonpolar *n*-alkane and ii) ethyl acetate, a basic solvent (electron-donor), and decane, a nonpolar *n*-alkane. The first pair determined the Lewis basic character of the strain and the second the Lewis acid character of the strain.

The third bacterial subculture was centrifuged, washed and resuspended in saline water to give an $\text{OD}=0.6\text{--}0.7$ at 400 nm (A_{400} , initial absorbance). A volume of 2.4 ml of this suspension was mixed (vortex) for 60 s with 0.4 ml of a solvent. The mixture was stored 15 min at room temperature to allow the separation of two phases. $\text{OD}_{400\text{nm}}$ was measured in 1 ml of aqueous phase (A). The percentage of cells in each solvent was calculated by the following equation: % Affinity = $[1 - (A/A_0)] \times 100$. Experiments were performed in duplicate with three repetitions for each solvent.

2.3.2. Determination of surface charge

The surface charge was determined by the electrophoretic mobility. The third bacterial subculture was centrifuged and suspended in 1.5×10^{-3} M sodium chloride at a final concentration of 10^7 CFU/ml. All strains were studied at pH 6.0 and for 3 strains (20266, 20267, C2a), the pH of the suspension was adjusted within the range of 2 to 8 by adding nitric acid (0.01 N) or potassium bromide (0.01 N). The electrophoretic mobility was measured in a 50 V electric field using a laser Zetameter (CAD Instrumentation, Limours, France). The results were based on an automated video of

about 200 bacterial cells for each measurement. Experiments were performed in duplicate on two independent cultures. The typical standard deviation for the electrophoretic mobility mean was $0.25 \mu\text{m V}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$.

2.4. Research of *bap* and *ica* genes in the 12 strains

2.4.1. PCR amplification of *icaA* and *bap* genes

Total DNA from the *S. xyloso* strains was isolated with the Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, Charbonnières, France). For amplification of *bap* and *icaA* genes, we used the previously described primers *bap6m*–*bap7c* and *ica4f*–*ica2r*, respectively (Cucarella et al., 2001; Moretro et al., 2003). Each PCR mixture contained 50 ng of DNA, $0.4 \mu\text{M}$ of each primer, $200 \mu\text{M}$ of deoxynucleoside triphosphate, 1 M reaction buffer (Promega), 1.5 mM of MgCl_2 (Promega) and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Promega) in a 25 μl total volume. PCR was performed under the following conditions: 5 min at 94°C , then 30 cycles of 30 s at 94°C , 30 s between 40 and 55°C (depending on the primer set), 1 min at 72°C and a final hold of 7 min at 72°C . PCR products were analysed by electrophoresis on 1% agarose gels. Sequencing of amplified product was performed on an ABI Prism 310 genetic sequencer using a BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Searches for sequence homology in Genbank database were performed with the Blast N program. *S. epidermidis* RP62A was used as negative control for *bap* amplification and positive control for *ica* amplification.

2.4.2. Dot blotting and hybridization for *icaA* and *bap* genes

For dot blotting, 50 ng of denatured DNA were spotted onto Hybon N+nylon membrane and treated according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). The PCR products, specific for the *icaA* gene (568 bp long) from *S. epidermidis* RP62A and for the *bap* gene (970 bp long) from *S. xyloso* C2a, were used as a probe. The PCR products were purified with a Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), labelled with the DIG-High Prime system (Roche, Neuilly sur Seine, France) and used as probes. The hybridizations were done in DIG Easy Hyb solution and the hybridized probes were detected by the Dig colour detection kit following the manufacturer's instructions (Roche). *S. epidermidis* RP62A was used as negative control for *bap* detection and positive control for *ica* detection.

2.5. Adhesion and growth of *S. xyloso* C2a on stainless steel and PTFE chips in different media

The biofilm development was investigated on the strain C2a which was the only one able to form biofilm on both glass and polystyrene tubes.

The study was carried out on two supports, AISI 304 stainless steel (hydrophilic, mean roughness=0.064), and polytetrafluoroethylene (PTFE, hydrophobic, mean roughness=0.239) which are materials commonly used in food-processing plants.

The third bacterial subculture was diluted in the culture medium to obtain an OD_{600} of 0.6–0.7. Seven milliliters of this bacterial suspension was poured into a small Petri dish containing one chip of stainless steel or PTFE (Chavant et al., 2002). After 2 h incubation at 30°C , the bacterial suspension was removed and replaced by 7 ml of sterile culture medium. Incubation lasted 48, 72 and 120 h at 30°C , with renewing the medium every 24 h.

Cell adhesion after 2 h incubation and biofilm formation after 48, 72, 120 h incubation at 30°C were evaluated by cell enumeration on the chip. After incubation, the chips were washed twice with 35 ml of sterile Tryptone Salt (TS: 1 g/l bactotryptone and 8.5 g/l NaCl) on an orbital shaking table (Belly Dancer, Greensboro, USA) to remove non-adherent cells. Adherent cells were detached in 10 ml of TS in a sonication bath (Deltasonic, Meaux, France) for 3 min at 50 Hz. Serial dilutions were plated on tryptic soy agar (Difco, Le pont de Claix, France) and incubated for 24 h at 37°C . Cell adhesion was evaluated by cell enumeration and expressed as the number of colony forming units per square centimeter of chip (CFU/cm^2).

Adhesion and biofilm growth were studied in the following media: TSB, TSB supplemented with CaCl_2 0.03% (w/v) and MgSO_4 0.05% (w/v) (Prolabo, Paris, France) TSB/Ca–Mg, TSB supplemented with NaCl (20 g/l) (TSB/NaCl), MCDB medium (Molecular Cellular Development of Biology 202) (CryoBio-system, L'Aigle, France) supplemented with 1% yeast nitrogen base without amino acids (Difco, Le pont de Claix, France), Hussain medium (Hussain et al., 1991) with or without addition of NaCl (10 g/l).

For one experiment, adhesion was done in saline water during 2 h and then the bacterial suspension was removed and replaced by TSB for during 48 h or 120 h growth at 30°C . This last condition was noted TSB/SW.

Experiments were performed in duplicate, with three stainless steel chips and three PTFE chips per strain and per incubation time for each experiment.

Supplementary experiments were done for the *S. xyloso* 20266 and S01008 strains to study their adhesion after 2 h on stainless steel and PTFE chips in TSB medium.

2.6. Polysaccharide synthesis by *S. xyloso* C2a

The strain C2a was grown in TSB for 2 h, 48 h or 120 h on stainless steel chips. The adherent cells were detached from the chips by sonication (as described in Section 2.5) in 10 ml of saline water. This sonicated suspension contained the bacterial cells and the presumed polysaccharides. The population was enumerated on TSA as previously described. To recover the polysaccharides, the sonicated suspension was centrifuged at $20,000\times g$ (Jouan Mr22i) for 30 min at 4°C and the supernatant was filtered on a $0.45 \mu\text{m}$ membrane according to Leriche and Carpentier (2000). Then, the supernatant was concentrated by centrifugation ($3000\times g$ for 40 min at 4°C) on a 10 kDa ultrafiltration membrane (Centricon, Millipore, Molsheim, France). The quantity of polysaccharides was assayed on the concentrated samples by the phenol-sulfuric method of Dubois et al. (1956) using glucose as a standard. Results were expressed

in µg of polysaccharides per 10⁸ CFU. They represent the mean of six measures.

2.7. Biofilm architecture of *S. xylosus* C2a by Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

The strain C2a was grown on stainless steel and PTFE chips, in TSB medium for 48 h at 30 °C. Before observation, adherent bacteria were fixed in 3% (v/v) glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 15 min and rinsed in the same buffer before introduction into the ESEM chamber. The pressure could vary in steps of 200 Pa for an accelerating voltage of 5 kV and of 50 Pa for 10 kV at room temperature without using the Peltier element. Operating parameters such as detector type, accelerating voltage, chamber pressure, magnification and working distance are detailed in the illustrations. Experiments were performed in a Quanta ESEM-FEG in the application laboratory of the FEI Company (Eindhoven, Netherlands).

3. Results

3.1. Ability of the 12 strains of *S. xylosus* to form biofilm

The capacity of 12 *S. xylosus* strains to form biofilm on glass (hydrophilic support) and on polystyrene (hydrophobic support) was studied. Eleven strains formed biofilm (Table 1). Ten strains formed significantly higher biofilm on glass than on polystyrene tubes. Three strains (S01004, 840, 839) were strong biofilm formers on glass and did not develop any biofilm on polystyrene. Two strains (20267, C2a) formed significant

Table 1
Biofilm growth of *S. xylosus* strains on two supports

Supports	Glass tubes hydrophilic	Polystyrene tubes hydrophobic	Probability (Student test)
Strains	OD _{540 nm}		
20266	1.18 ^a (0.20) ^b	0.22 (0.04)	***
20267	2.43 (0.27)	1.56 (0.13)	*
C2a	1.15 (0.19)	1.38 (0.11)	NS
S01001	3.52 (0.41)	0.88 (0.06)	***
S01002	0.23 (0.04)	0.45 (0.07)	**
S01003	1.81 (0.32)	0.78 (0.15)	***
S01004	3.50 (0.25)	0.08 (0.02)	***
S01006	1.58 (0.19)	0.40 (0.07)	***
S01007	2.06 (0.38)	0.45 (0.08)	**
S01008	1.34 (0.32)	0.38 (0.15)	***
839	1.75 (0.33)	0.08 (0.01)	**
840	3.32 (0.49)	0.09 (0.01)	***
Negative control	0.08 (0.01)	0.05 (0.01)	

Values are the measures of OD after staining of the biofilm with safranin.

Biofilm positive strain: OD₅₄₀ ≥ 0.5.

***: $p \leq 0.001$.

** : $0.001 < p \leq 0.01$.

* : $0.01 < p \leq 0.05$.

NS: non significant ($0.05 < p$).

^a Mean of nine repetitions.

^b Standard deviation in brackets.

Table 2
Affinity of *S. xylosus* strains to solvents

% Affinity for:				
Strains	Chloroform	Hexadecane	Ethyl acetate	Decane
20266	100 ^{a±1} ^b	94±6	88±5	89±6
20267	52±3	29±4	9±1	40±5
C2a	71±10	19±7	6±4	16±6
S01001	84±2	31±1	8±2	31±6
S01002	67±7	24±1	8±1	31±9
S01003	96±6	78±15	74±7	71±12
S01004	36±5	7±1	6±1	5±2
S01006	99±1	80±10	71±7	80±7
S01007	97±3	84±1	69±8	74±10
S01008	99±1	88±3	76±10	84±4
839	65±1	26±4	9±2	30±2
840	87±6	36±9	5±1	41±6

See Section 2.3.1 for calculation of % affinity.

^a Mean of six repetitions.

^b Standard deviation.

biofilm on the hydrophilic and hydrophobic supports but only the C2a strain formed similar biofilm on both supports.

3.2. Surface properties of the *S. xylosus* strains

The 12 *S. xylosus* strains can be separated into two groups according to their affinity for different solvents and the electrophoretic mobility of all strains at pH 6 (Tables 2 and 3).

As seen from Table 2, the first group, composed of seven strains (20267, C2a, S01001, S01002, S01004, 839, 840), was characterized by higher affinity for chloroform (an electron acceptor solvent) than to hexadecane (an apolar solvent). These results demonstrated the electron-donor property of the seven strains, indicating hydrophilic characteristics with a marked basic surface character according to their affinity for the chloroform (acidic and polar solvent). In the same way, the bacterial affinity of the seven strains was lower for ethyl acetate (a strong electron-donor solvent) than for decane indicating a weak electron-accepting nature of these strains.

This group was also characterized by strong electronegative values at pH 6, all inferior to $-2.0 \mu\text{m V}^{-1} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-1}$, varying

Table 3
Electrophoretic mobility of *S. xylosus* strains ($\mu\text{m V}^{-1} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

Strains	pH						
	2	3	4	5	6	7	
20266	-0.04	-0.28	-1.01	-1.32	-1.85	-1.95	
20267	-2.36	-3.05	-3.00	-2.34	-2.28	-2.29	
C2a	-2.49	-3.01	-2.90	-2.60	-2.40	-2.30	
S01001	-2.19	ND*	-2.47	ND	-2.54	ND	
S01002	-2.28	ND	-2.29	ND	-2.14	ND	
S01003	ND	ND	ND	ND	-1.82	ND	
S01004	-1.98	ND	-2.14	ND	-2.18	ND	
S01006	ND	ND	ND	ND	-1.87	ND	
S01007	ND	ND	ND	ND	-1.53	ND	
S01008	ND	ND	ND	ND	-1.32	ND	
839	-2.29	ND	-2.33	ND	-2.23	ND	
840	-2.22	ND	-2.75	ND	-2.34	ND	

*ND: not done.

Standard deviation ($0.25 \mu\text{m V}^{-1} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

from -2.14 to $-2.54 \mu\text{m V}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ as seen from Table 3. The electrophoretic mobility was studied from pH 2 to 7 for two strains (20267, C2a), they were always charged negatively with very weak variations in their surface charges (Table 3). Thus, these strains did not have an isoelectric point in this range of pH.

The second group, composed of five strains (20266, S01003, S01006, S01007, S01008), was characterized by a strong affinity for chloroform and also a high affinity for hexadecane (Table 2). The affinity of these strains was also high and similar for ethyl acetate and decane. If we compare the affinity for the two hydrophilic solvents, the affinity was moderately higher for the chloroform. From all these results, these strains presented a moderate hydrophobic character due to their high affinity for apolar solvents, but also a high affinity to polar solvent with a basic character because of the slightly higher affinity for the chloroform.

The second group was also characterized by electronegative value at pH 6, but superior to $-2.0 \mu\text{m V}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$, varying from -1.32 to $-1.87 \mu\text{m V}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Table 3). Only one strain (20266) was studied from pH 2 to 7, its electrophoretic mobility decreased from pH 7 to pH 2, with a surface charge near 0 at pH 2 showing that this strain tended to reach its isoelectric point (Table 3).

To establish a link between the surface properties of the two groups and their adhesion, we studied the adhesion of strains representative of each group, on hydrophobic and hydrophilic supports. In the first group, the strains had hydrophilic properties with a marked basic surface character, so they should preferentially adhere to hydrophilic supports. Indeed, *S. xyloso* C2a grown in TSB adhered more strongly on stainless steel (52%) than on PTFE (3%) (Table 4). In the second group, the strains had moderate hydrophobic properties of surface and also a strong affinity for polar solvents so they should adhere mainly

to hydrophobic supports and also to hydrophilic supports. Indeed, by studying the adhesion of *S. xyloso* 20266 and S01008, we noticed that they adhered preferentially to PTFE support, 59% and 78%, respectively, but also to stainless steel, 29% and 66%, respectively (data not shown).

3.3. Detection of *bap* and *icaA* genes in *S. xyloso* strains

Nine out of the 12 strains yielded a *bap*-specific PCR product of 970 bp (Fig. 1a). This fragment from the strain C2a was sequenced and revealed 75.5% identity with the *bap* nucleotide sequence of the *S. aureus* bovine strain V329 (AY220730). The three remaining strains, 839, 840 (biofilm positive strains) and S01002 (biofilm negative strain), were *bap* negative by PCR (Fig. 1a) but yielded positive hybridization with the *bap* probe from *S. xyloso* C2a (Fig. 1b).

The *icaA* gene was detected neither by PCR amplification nor by hybridization of dot blotting of the 12 strains of *S. xyloso* (data not shown).

3.4. Adhesion and growth of *S. xyloso* C2a on stainless steel and PTFE chips in different media

In all media, the strain C2a adhered preferentially to stainless steel compared to PTFE chips (Table 4). The adhesion varied from 32% in MCDB medium and in saline water to 66% in TSB/Ca–Mg on stainless steel. On PTFE, the adhesion varied from 3% to 20%. Addition of salts (Ca–Mg or NaCl) to the TSB medium did not increase the adhesion on both supports (Table 4).

On stainless steel support, the strain C2a grew up to 48 h in TSB/SW and in TSB/NaCl (Table 5), with the highest growth in this last medium (1.5 log units). After 48 h, the population remained stable in TSB/NaCl, whereas a 1.0 log decrease was observed in TSB/SW. In TSB and TSB/Ca–Mg, the population slowly decreased with time.

On PTFE support, the strain C2a grew up to 48 h in TSB, in TSB/SW and in TSB/NaCl (Table 5). The highest growth was noticed in this last medium with an increase of 2 log units. After 48 h, the population was quite stable in TSB and TSB/NaCl media while a decrease was noticed in TSB/SW. When Ca^{2+} and Mg^{2+} were added to the TSB medium, no growth was observed and the population stayed at the same level in course of incubation (Table 5).

In Hussain medium, the population of the strain C2a on stainless steel and PTFE supports did not vary all along the incubation time (Table 5). Addition of NaCl gave the same results (Table 5). In MCDB medium, no significant growth was observed on PTFE and a decrease of the population was noticed on stainless steel.

3.5. Synthesis of exopolysaccharides by *S. xyloso* C2a

The quantity of polysaccharides formed by *S. xyloso* C2a increased with the time of incubation on stainless steel chip in TSB medium. The quantity of polysaccharides measured was $11.25 \pm 6.75 \mu\text{g}$ per 10^8 CFU after 2 h, $63.25 \pm 14.01 \mu\text{g}$ per 10^8

Table 4
Adhesion of *S. xyloso* C2a to stainless steel and PTFE chips in different media

Media ^a	Support	Stainless steel		PTFE	
	Bacteria loaded	Adhered	% Adhesion ^b	Adhered	% Adhesion
SW	9.3	3.1 (0.5) ^c	33	1.0 (0.7)	11
<i>Complex media</i>					
TSB	9.5	4.9 (1.9)	52	0.3 (1.3)	3
TSB/NaCl	5.3	2.9 (0.4)	55	0.6 (0.4)	11
TSB/Ca–Mg	7.1	4.7 (2.2)	66	1.4 (0.8)	20
<i>Chemical defined media</i>					
MCDB	19.0	6.0 (3.0)	32	0.7 (0.5)	4
Hussain	18.0	10 (0.2)	56	1.9 (1.1)	11
Hussain/NaCl	19.0	11 (0.2)	58	3.8 (0.4)	20

^a SW, saline water; TSB, Tryptic Soy Broth with yeast extract; MCDB, molecular Cellular Development of Biology 202 supplemented with 1% yeast nitrogen base without amino acids.

^b Adhesion was calculated by the following equation: adhesion=(bacteria adhered/bacteria loaded)×100, bacteria adhered is the population expressed as CFU×10⁷/cm² of chip after 2 h of adhesion, bacteria loaded is the initial population loaded on the chip expressed as CFU×10⁷/cm² of chip.

^c Standard deviation (CFU×10⁷/cm² of chip).

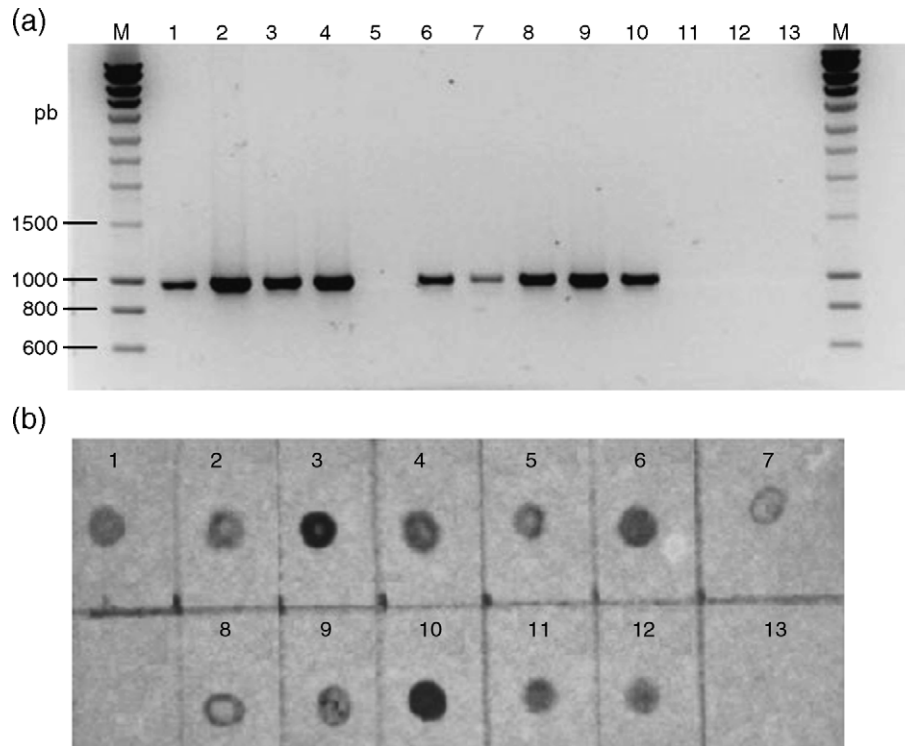


Fig. 1. (a) PCR products obtained by using the primers *bap6m*–*bap7c* and (b) hybridization with *bap* probe from *S. xylosus* C2a on the *S. xylosus* strains. Lane M, Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgium); Lane 1, 20266; Lane 2, 20267; Lane 3, C2a; Lane 4, S01001; Lane 5, S01002; Lane 6, S01003; Lane 7, S01004; Lane 8, S01006; Lane 9, S01007; Lane 10, S01008; Lane 11, 839; Lane 12, 840; Lane 13, *S. epidermidis* RP62A (negative control).

CFU after 48 h and reached $114.50 \pm 14.50 \mu\text{g per } 10^8 \text{ CFU}$ after 120 h.

3.6. Architecture of the *S. xylosus* C2a biofilm by ESEM observations

S. xylosus C2a colonized the complete surface of stainless steel chip at 48 h in TSB medium. On this support, thick aggregates constituted by multiple layers of cells surrounded by voids spaces were observed (Fig. 2a). The aggregate cells

appeared embedded in an amorphous matrix and linked by “filaments” (Fig. 2b), confirming the presence of exopolysaccharides. Same results were noticed on PTFE support (data not shown).

4. Discussion

Diversity in biofilm formation was observed between the 12 *S. xylosus* strains with 9 forming preferentially biofilm on hydrophilic support, two on hydrophobic and hydrophilic

Table 5
Growth of *S. xylosus* C2a on stainless steel and PTFE chips in different media

Support	Stainless steel			PTFE		
	T 2 h	T 48 h	T 120 h	T 2 h	T 48 h	T 120 h
<i>Complex media</i> ^a						
TSB	7.66 ^b (0.23) ^c	7.52 (0.19)	6.51 (0.28)	6.49 (0.23)	8.02 (0.28)	7.58 (0.44)
TSB/SW	7.49 (0.08)	8.31 (0.18)	6.83 (0.35)	6.96 (0.26)	7.90 (0.21)	7.11 (0.31)
TSB/NaCl	7.46 (0.07)	8.71 (0.15)	8.76 (0.21)	6.81 (0.28)	8.94 (0.20)	8.72 (0.19)
TSB/Ca–Mg	7.67 (0.23)	7.50 (0.13)	7.11 (0.02)	7.18 (0.19)	7.20 (0.05)	7.01 (0.04)
<i>Chemical defined media</i> ^a						
MCDB	7.78 (0.26)	7.32 (0.19)	5.93 (0.38)	6.84 (0.31)	7.33 (0.17)	6.98 (0.27)
Hussain	8.00 (0.08)	7.80 (0.26)	7.66 (0.11)	7.28 (0.33)	8.04 (0.08)	7.46 (0.30)
Hussain/NaCl	8.06 (0.08)	8.22 (0.12)	7.65 (0.09)	7.58 (0.05)	8.22 (0.08)	7.83 (0.17)

^a TSB, Tryptic Soy Broth with yeast extract; TSB/SW, adhesion done in saline water (SW) and growth in TSB; MCDB, Molecular Cellular Development of Biology 202 supplemented with 1% yeast nitrogen base without amino acids.

^b Mean of six chips (log CFU cm⁻²).

^c Standard deviation.

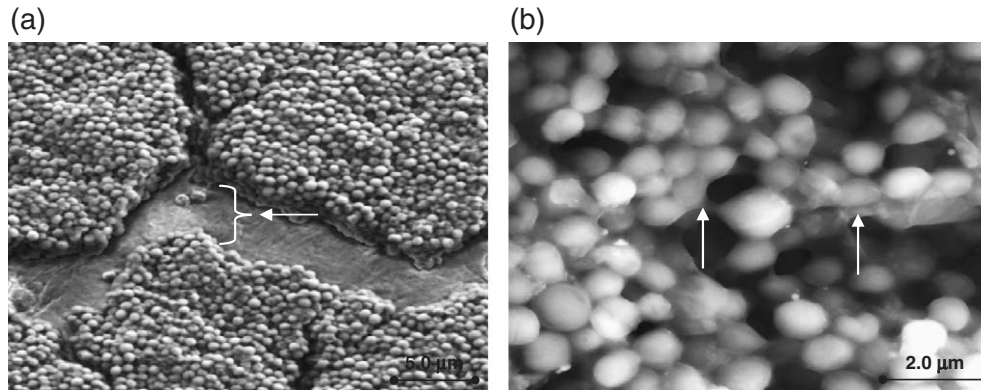


Fig. 2. Observation of the *S. xylosus* C2a biofilm by environmental scanning electron microscopy at 48 h on stainless steel chip in TSB medium. (a) Intercellular spaces between cell aggregates (arrow). (b) Amorphous matrix surrounded cells and filaments between cells (arrows).

supports and one biofilm negative. Such diversity has already been observed for *S. epidermidis* biofilms on plastic support (Mack et al., 1992).

Biofilm formation is a complex process regulated by the physicochemical properties of the support, the bacterial cell surface and the growth medium. Bacterial cell surface properties play a key role in the adhesion of microorganisms to solid supports. Regarding the 12 *S. xylosus* studied, they can be divided into two groups according to their cell surface properties. The first group composed of seven strains, including two strains isolated from the human skin and five strains isolated from sausages, was hydrophilic. The C2a strain belonging to this first group, adhered preferentially on hydrophilic support. These seven strain cells were negatively charged and they did not have an isoelectric point between pH 2 and 8. Similar results were already mentioned for staphylococci strains isolated from dairy plants (Briand et al., 1999).

The second group composed of five strains, including one strain isolated from the human skin and four strains isolated from sausages, was moderately hydrophobic with a basic character. The strains 20266 and S01008 belonging to this group adhered on hydrophobic and hydrophilic supports. The 20266 strain reached its isoelectric point at pH 2. A similar result was observed by Sonohara et al. (1995) with a *S. aureus* strain.

The negative surface charge of the 12 *S. xylosus* studied is a property shared of the *Staphylococcus* spp. (Briand et al., 2001), *S. aureus* strains and most of the bacteria (Gross et al., 2001). These electrical characteristics are linked to the nature of the chemical groups of the bacterial surface and thus to the wall composition. For Gram-positive bacteria, teichoic acids, which are anionic polymers, have many phosphate groups that are negatively charged at $\text{pH} > 2.5$. Together, with carboxylic groups and proteins, their presence mainly explains the negative charge on the surface of bacteria (Briand et al., 1999). The key role of teichoic acid net charge was also underlined in *S. aureus* colonization on abiotic negatively charged supports (Gross et al., 2001). Repulsive electrostatic forces between the negative charge of staphylococci and the supports (stainless steel and glass) could reduce staphylococcal biofilm formation. However, interactions between bacteria and supports is also dependent on

Van der Waals forces, which are generally attractive, and ionic forces, which can be either attractive or repulsive (Gross et al., 2001). Thus, if bacteria and support are similarly charged, as in our study for *S. xylosus* strains and hydrophilic supports, Van der Waals forces can overcome repulsion and lead to adhesion.

The numerous components of the growth medium, which interact with the surface properties of the bacteria and of the supports, largely influenced the biofilm development (Briand et al., 1999; Donlan, 2002). In particular, salts could impair electrostatic repulsions between the negatively charged bacteria and negatively charged support, because they linked to teichoic acids of bacterial wall and/or masked surface charges (Briand et al., 1999; Giovannacci et al., 2000). In our study, the addition of salts to the medium (Ca^{2+} , Mg^{2+} or NaCl) did not improve the adhesion of *S. xylosus* C2a to hydrophobic and hydrophilic supports. On the contrary, previous authors have shown that the addition of NaCl improved the adhesion of *Staphylococcus* spp. strains on stainless steel (Briand et al., 1999). In the same way, the presence of calcium and magnesium enhanced the adhesion of *S. epidermidis* on plastic (Dunne and Burd, 1992) and *S. aureus* on stainless steel (Barnes et al., 1999). In our study, the addition of NaCl to the medium improved and stabilized the biofilm growth of *S. xylosus* C2a on stainless steel and PTFE. Our results agree with those of Moretto et al. (2003) which showed that NaCl had a positive effect on biofilm growth of *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis* strains. As for the adhesion step, salts can act by masking the surface charge during the growth and/or by inducing stress genes (Rachid et al., 2000). Other components of the media such as lactic acid influenced biofilm formation by modifying the bacterial surface properties (Briand et al., 1999).

The general description of bacterial biofilms consists in very heterogeneous structures, containing microcolonies of cells embedded in an EPS matrix and separated from the other microcolonies by interstitial voids (water channels) (Donlan, 2002). This description is in complete agreement with the architecture observed for the *S. xylosus* C2a biofilm. Indeed, the structural organization of *S. xylosus* C2a biofilms showed an amorphous matrix that embedded and aggregated

cells with spaces between the cellular aggregates. According to previous observations (Donlan and Costerton, 2002), these spaces could correspond to “water channels” that allow the distribution and circulation of nutrients and oxygen inside the biofilm.

The polysaccharides play a key role in biofilm formation, they consolidate the adhesion of bacterial cells to surfaces and cell–cell adhesion. The synthesis of exopolysaccharide by *S. xyloso* C2a increased with the age of the biofilm as for *Staphylococcus sciuri* (Leriche and Carpentier, 2000). In *S. aureus* and *S. epidermidis* strains, the synthesis of polysaccharide (PIA) is encoded by the *icaABCD* locus (Cramton et al., 1999). For *S. epidermidis* and *S. aureus*, these authors have found that a mutation in the *ica* locus resulted in a loss of the ability to form biofilms. They also showed that *S. xyloso* C2a lacks the *icaA* gene. We confirmed that C2a strain and the 11 other *S. xyloso* strains did not have *icaA* gene. In the same way, several other *Staphylococcus* species (*Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus gallinarum*, *S. sciuri*) are also devoided of the *ica* genes, whereas they are able to form biofilm in vitro (Cramton et al., 1999; Moretro et al., 2003). The *S. xyloso* C2a would synthesize polysaccharides via a different way from that of the *ica* locus that remains to be identified.

Other mechanisms could participate to biofilm formation such as the Bap surface protein. We have shown that the *bap* gene was present in the three *S. xyloso* strains of human origin and in the nine isolated from sausages. These results disagree with those of Cucarella et al. (2004) who showed that the *bap* gene was only present among bovine mastitis isolates of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* and *S. xyloso* and absent in *Staphylococcus* spp. human isolates. Moreover, these authors reported that all *bap* positive *S. aureus* strains were *icaABCD* positive. In this work, we have found that the *bap* gene can be present in the absence of the *icaA* gene. In *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis, the *ica* positive and *bap* negative strains were less efficient to form biofilm underlying the essential role of the Bap protein in biofilm formation (Cucarella et al., 2004). As *ica* negative and *bap* positive strains formed biofilm similar to the wild-type isolate, it is clear that for *S. aureus* strains isolated from mastitis bovine, the Bap protein was sufficient to promote biofilm formation on abiotic surfaces. However, concerning other *S. aureus* strains devoided of *bap* gene, other mechanisms are involved in biofilm formation.

Biofilm formation by *S. xyloso* strains could explain their presence and their persistence in food plants. Proteomic and molecular works are in progress to a better understanding of the respective role of the polysaccharides and proteins in biofilm formation in *S. xyloso*.

Acknowledgements

This work was financially supported by a national contract: “Aliment Qualité Sécurité number AQS R01/09” and was a part of ECOS number A03B02 project. We thank A. Lebert and I.

Lebert for helpful discussion, and N. Garrel and B. Duclos for their technical assistance.

References

- Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R., Chamberlain, A.H., 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4543–4548.
- Barrière, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Sétrin, S., Berdagué, J.L., Talon, R., 2001. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xyloso* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 181–185.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., Van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloids Surf., B Biointerfaces* 7, 47–53.
- Briandet, R., 1999. Maitrise de l’hygiène des surfaces par la création de biofilms. Aspects physico-chimiques. PhD Thesis. ENSAR, Rennes.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M.N., 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5328–5333.
- Briandet, R., Herry, J., Bellon-Fontaine, M., 2001. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids Surf., B Biointerfaces* 21, 299–310.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N., Hébraud, M., 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 728–737.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996–1006.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Götz, F., 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67, 5427–5433.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R., 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183, 2888–2896.
- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R., 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72, 2177–2185.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Dunne Jr., W.M., Burd, E.M., 1992. The effects of magnesium, calcium, EDTA, and pH on the in vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. *Microbiol. Immunol.* 36, 1019–1027.
- Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., Götz, F., 1998. Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273, 18586–18593.
- Giovannacci, I., Ermel, G., Salvat, G., Vendevue, J.L., Bellon-Fontaine, M.N., 2000. Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *J. Appl. Microbiol.* 88, 1–10.
- Götz, F., 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43, 1367–1378.
- Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., Peschel, A., 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* 69, 3423–3426.

- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20, 1083–1091.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., Götz, F., 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 24, 1013–1024.
- Hussain, M., Hastings, J.G., White, P.J., 1991. A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 34, 143–147.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H., 1986. Genus *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18^{AL}. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 1013–1035.
- Krepesky, N., Rocha Ferreira, R.B., Ferreira Nunes, A.P., Casado Lins, U.G., Costa, e., Silva Filho, F., de Mattos-Guaraldi, A.L., Netto-dosSantos, K.R., 2003. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr. Microbiol.* 46, 280–286.
- Leriche, V., Carpentier, B., 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 88, 594–605.
- Mack, D., Siemssen, N., Laufs, R., 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* 60, 2048–2057.
- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J.L., Rousset-Akrim, S., 1996. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiol.* 13, 489–499.
- Moreto, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K., Langsrud, S., 2003. Biofilm formation and the presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5648–5655.
- Morot-Bizot, S., Talon, R., Leoy-Setrin, S., 2003. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosum*, a species used in food fermentation. *J. Microbiol. Methods* 55, 279–286.
- Norwood, D.E., Gilmour, A., 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* 88, 512–520.
- Ozerdem Akpolat, N., Elci, S., Atmaca, S., Akbayin, H., Gul, K., 2003. The effects of magnesium, calcium and EDTA on slime production by *Staphylococcus epidermidis* strains. *Folia Microbiol (Praha)* 48, 649–653.
- Peters, G., Locci, R., Pulverer, G., 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J. Infect. Dis.* 146, 479–482.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., Ziebuhr, W., 2000. Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J. Bacteriol.* 182, 6824–6826.
- Sonohara, R., Muramatsu, N., Ohshima, H., Kondo, T., 1995. Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys. Chem.* 55, 273–277.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S., 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In: Toldrá, Fidel (Ed.), *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*. Vol. Chapter 10, Research Signpost, pp. 175–191.
- Villani, F., Sannino, L., Moschetti, G., Mauriello, G., Pepe, O., Amodio-Cocchieri, R., Coppola, S., 1997. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosum* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. *Food Microbiol.* 14, 555–566.

PARTIE 2

Etude des sous protéomes de *Staphylococcus xylosus* C2a
(Articles 3 et 4)

1 - PROBLEMATIQUE

La formation de biofilm chez les staphylocoques fait intervenir aussi des protéines de surface, c'est-à-dire les protéines pariétales et membranaires. Ces protéines interviennent dans l'attachement à des cellules ou à des surfaces, dans la virulence des souches pathogènes mais aussi dans la résistance aux antibiotiques, dans le transport des nutriments, la signalisation et la communication intercellulaire. Jusqu'à récemment (2005), les protéines de surface chez les bactéries à Gram-positif étaient peu étudiées et ceci pour plusieurs raisons. Leur extraction est difficile en raison de la présence d'une épaisse paroi composée de peptidoglycane et d'acides teichoïques, et du fait que les protéines membranaires sont enchâssées dans la bicouche lipidique. De plus, ces protéines sont peu solubles en raison de leur hydrophobicité et certaines présentent un point isoélectrique alcalin directement corrélé à la présence de domaines transmembranaires. Elles sont moins abondantes par rapport à l'ensemble des protéines puisqu'elles représentent environ 30% du protéome total bactérien. Compte-tenu de ces observations, l'objectif était d'abord de mettre au point un protocole d'extraction des protéines pariétales et membranaires chez *S. xylosus* (Article 3). Puis nous avons appliqué ce protocole pour caractériser la physiologie de la croissance en biofilm de *S. xylosus* par comparaison avec un mode de croissance planctonique. Cependant la croissance en biofilm s'accompagne aussi de modifications métaboliques que nous avons étudiées via le protéome cytoplasmique (Article 4).

2 - STRATEGIE

Pour les raisons évoquées précédemment, nous avons effectué un sous fractionnement cellulaire et élaboré un protocole pour extraire et caractériser plus spécifiquement les sous protéomes pariétaux et membranaires. Les cellules bactériennes étaient récupérées en phase stationnaire, ce qui permettait de mieux maîtriser un stade de développement parallèle entre les modes de croissance sessile et planctonique et d'obtenir une biomasse plus importante en biofilm en vue d'extraire une plus grande quantité de protéines pour leur analyse en électrophorèse bidimensionnelle (EBD).

2-1. L'extraction des protéines pariétales

Après culture dans un milieu riche, les cellules sont lavées pour éliminer les protéines sécrétées et les résidus du milieu. L'efficacité de trois méthodes d'extraction des protéines pariétales, décrites dans la littérature, a été évaluée en parallèle sur une même culture de *S. xylosus* en phase stationnaire. Seule la dernière méthode a été retenue pour l'extraction des protéines pariétales de *S. xylosus* (Article 3).

La première méthode utilise du SDS pour décrocher les protéines en surface sans altérer l'intégrité de la cellule (Muller *et al.*, 1998). Dans cette méthode, le culot cellulaire est repris dans 2 ml de PBS contenant 2% de SDS et incubé 30 minutes sous agitation. Le mélange est ensuite centrifugé pour récupérer les protéines de paroi dans le surnageant. La quantité de protéines dosées étant pratiquement nulle, la concentration en SDS dans le tampon d'incubation a été augmenté à 9% (seuil de tolérance du dosage 10%) mais ceci n'a permis d'obtenir qu'une très faible quantité de protéines. L'analyse en électrophorèse monodimensionnelle (SDS PAGE) suivie d'une coloration au bleu de Coomassie n'a pas permis de révéler des protéines, cette méthode a donc été exclue.

La deuxième méthode utilise du chlorure de lithium (LiCl). Nous avons incubé les cellules bactériennes pendant 15 minutes dans la glace dans une solution de LiCl 3 M dont la quantité a été calculée à partir du protocole décrit chez *S. aureus* pour des cellules en phase exponentielle (Allignet *et al.*, 2001). Cette technique a permis l'obtention d'une quantité suffisante de protéines pour leur séparation en SDS PAGE. La coloration du gel au bleu de Coomassie colloïdal a révélé la présence de nombreuses bandes protéiques. D'autres auteurs ont utilisé ce sel avec des conditions d'incubation différentes que nous n'avons pas testées (Hussain *et al.*, 1999 ; Antelmann *et al.*, 2002). Cependant, d'après ces derniers auteurs, la méthode au LiCl ne permettrait pas d'extraire les protéines liées de façon covalente à la paroi comme les protéines contenant un motif LPXTG.

La troisième méthode utilise une enzyme qui détruit l'intégrité de la paroi cellulaire et permet le relargage de protéines ancrées de façon covalente à la paroi (Vytvytska *et al.*, 2002). Dans cette méthode, les cellules sont incubées dans un tampon contenant de la lysostaphine qui clive spécifiquement le peptidoglycane des staphylocoques ainsi que du saccharose pour éviter la lyse des cellules. Ce traitement a permis d'isoler séparément les protéines de paroi et de récupérer les protoplastes dans le culot cellulaire. Les protéines de paroi contenues dans le surnageant ont été finalement récupérées par précipitation au TCA pour exclure le saccharose.

Cette méthode a donné de bons rendements et nous a permis une première analyse en SDS PAGE puis une analyse en EBD.

2-2. L'extraction des protéines membranaires

Les protoplastes sont lysés par un traitement mécanique utilisant des billes de verre pour recueillir un extrait brut contenant les protéines cytoplasmiques et membranaires (Article 3). Ces dernières sont séparées par ultracentrifugation. Le surnageant contient les protéines solubles dans le tampon Tris base c'est-à-dire les protéines cytoplasmiques. Le culot membranaire est lavé plusieurs fois afin d'éliminer les protéines liées à la membrane par de simples interactions et les protéines cytoplasmiques. Puis il est soumis à une délipidation afin de relarguer les protéines enchâssées dans la membrane et d'éliminer les lipides. Cette délipidation est aussi nécessaire parce que les lipides liés aux protéines altèrent la migration pendant l'isoélectrofocalisation (IEF) créant ainsi des traînées sur les gels d'EBD. Dans la littérature, plusieurs méthodes de délipidation sont décrites utilisant différents solvants. Nous en avons testé trois pour extraire les protéines membranaires de *S. xylosus* (Article 3).

La première méthode utilise un mélange de bicarbonate d'ammonium, de chloroforme et de trifluoroéthanol (TFE) et permet une séparation en trois phases (Deshusses *et al.*, 2003). Le bicarbonate d'ammonium retient tous les composés insolubles tandis que le chloroforme solubilise les lipides et le TFE solubilise les protéines membranaires dans la phase supérieure qui est prélevée et concentrée par centrifugation sous vide. Cette méthode, décrite chez une bactérie à Gram-négatif, s'est révélée difficilement reproductible sur *S. xylosus*, bactérie à Gram-positif. De plus, les quantités de protéines extraites étaient assez faibles.

La deuxième méthode utilise le triton X100 qui est un détergent zwitterionique (Gerke *et al.*, 1998 ; Santoni *et al.*, 2000). Le triton casse les interactions entre les lipides et surtout entre les protéines et les lipides. Cette technique n'a permis qu'une délipidation partielle des protéines membranaires de *S. xylosus* avec pour conséquence la présence de traînées sur les gels qui altèrent la qualité de résolution des protéines en EBD.

La troisième méthode utilise un mélange de tri-n-butylphosphate, d'acétone et de méthanol. Le tri-n-butylphosphate (TnBP) est un solvant lipophile qui extrait les lipides en formant des micelles et améliore ainsi l'efficacité de la délipidation acétone/méthanol (Mastro & Hall, 1999). De plus, ce solvant lipophile, en combinaison avec les autres constituants, permet simultanément la précipitation et le dessalage des protéines. Cette méthode, décrite chez les eucaryotes, donne des résultats reproductibles et des rendements permettant une analyse en EBD, a de ce fait été retenue pour la suite de l'étude.

Nous avons ensuite procédé à la solubilisation des protéines membranaires. Ces protéines sont difficiles à solubiliser du fait de leur nature hydrophobe et elles forment des agrégats en IEF réduisant ainsi le transfert en seconde dimension lors de l'électrophorèse. Dans de nombreuses études, l'incorporation d'ASB14 a permis d'augmenter la solubilité de ces protéines de façon qualitative et quantitative. L'ASB14 est un détergent qui recrée l'environnement d'une protéine membranaire afin de lui permettre de rester en solution. Nous avons alors comparé ce détergent au CHAPS, détergent classique utilisé en protéomique pour solubiliser des extraits totaux de protéines, et au TFE₂ solvant organique utilisé en chromatographie pour garder les peptides en solution. Ces trois détergents ont été utilisés pour les extraits protéiques de différents organismes et leur efficacité semble dépendre de l'échantillon. Pour notre étude, nous avons choisi l'ASB14 qui nous a permis d'obtenir une meilleure résolution et un nombre de spots plus importants, spécialement dans la région basique qui comprend généralement des protéines membranaires (Article 3).

2-3. Choix de l'électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse monodimensionnelle est très utilisée pour l'étude des protéines de surface chez les bactéries à Gram-positif. En effet, le tampon d'électrophorèse contient du SDS qui est un détergent avec un fort pouvoir de solubilisation des protéines, y compris les protéines très hydrophobes. Cette électrophorèse en une seule étape permet d'éviter l'agrégation des protéines qui se produit en isoélectrofocalisation. Nous avons utilisé cette électrophorèse pour déterminer l'efficacité des protocoles d'extraction des protéines pariétales et membranaires chez *S. xylosus*. Une analyse de quelques protéines pariétales a été réalisée en spectrométrie de masse à trappe ionique (ESI-MS). Cependant l'identification s'est révélée difficile du fait de la contamination des différentes bandes par la lysostaphine présente en quantité très importante dans le tampon d'extraction.

Ainsi, l'électrophorèse bidimensionnelle a été choisie pour éviter la contamination par la lysostaphine et pour améliorer la séparation et la résolution des protéines pariétales. De plus, cette technique permet de réaliser des études quantitatives d'expression protéique différentielle, ce qui nous a permis de comparer les sous-protéomes de cellules planctoniques et sessiles. L'analyse de deux gradients de pH (3-10 non linéaire et 4-7) nous a conduits à sélectionner le gradient 4-7 qui permettait d'augmenter considérablement la résolution de la majorité des protéines de l'échantillon et de séparer les différentes isoformes de certaines d'entre elles. Compte tenu des faibles quantités de protéines extraites en particulier pour les protéines pariétales, notre choix s'est porté vers une coloration à l'argent compatible avec la

spectrométrie de masse afin de pouvoir identifier les protéines d'intérêt. Par contre, la coloration au bleu de Coomassie colloïdal a été utilisée pour les protéines membranaires qui étaient extraites en quantité raisonnable avec la méthode choisie.

2-4. Identification et recherche de motifs

Les protéines analysées par électrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle ont été identifiées par LC-MS/MS et MALDI-TOF/MS, respectivement. Les identifications par spectrométrie de masse se sont révélées difficiles compte tenu de l'indisponibilité du génome de *S. xylosus* C2a ; nous avons donc procédé à différents essais d'identification lors de l'année 2005. Dans un premier temps, les identifications ont été faites en recherchant dans les banques de données des homologues avec les séquences des génomes de staphylocoques disponibles. Les résultats n'étaient pas très concluants et révélaient un éloignement phylogénétique important avec les espèces *S. epidermidis* et *S. aureus*. Dans un deuxième temps, les identifications ont été faites en recherchant des homologues avec les séquences du génome de *S. saprophyticus* disponible en septembre 2005 (Kuroda *et al.*, 2005). Les identifications ont été meilleures révélant une proximité de l'espèce *S. xylosus* avec celle de *S. saprophyticus*. Cependant, la plupart des résultats ne pouvaient pas être validés en raison d'un score hors de la zone de significativité du à un faible nombre de peptides appariés avec ceux de *S. saprophyticus* et donc d'un faible pourcentage de recouvrement de séquence. Finalement, les identifications ont été faites avec le génome de la souche *S. xylosus* C2a partiellement disponible en Décembre 2005 (non publié), grâce à une collaboration entre notre laboratoire, le génoscope d'Evry et les unités MIG et FLEC (INRA Jouy en Josas). Les recherches effectuées avec le génome de *S. saprophyticus* ont alors pu être validées grâce aux fortes homologues de séquences avec le génome de *S. xylosus* C2a. Les protéines non identifiées avec le génome de *S. saprophyticus* l'ont été avec celui de *S. xylosus*. Les séquences correspondantes ont alors été déposées dans la banque NCBI et des numéros d'identifications leur ont été attribués.

Une fois les protéines identifiées, une recherche de motifs sur les protéines pariétales et membranaires a été effectuée à l'aide de divers logiciels disponibles en ligne sur internet. La valeur du GRAVY (Grand AVerage HYdropathy) qui est fonction du degré d'hydrophobicité des protéines membranaires a été recherchée. La présence de peptide signal, nécessaire à l'exportation des protéines hors du cytoplasme c'est-à-dire soit à la translocation vers la membrane ou la paroi, soit à la sécrétion vers le milieu extracellulaire a été déterminée. Cependant, certaines protéines exportées n'en possèdent pas et sont transportées

hors de la cellule via d'autres mécanismes. La recherche de domaines transmembranaires a été effectuée à l'aide de six logiciels différents : TMPred, SOSUI, TMHMM, PredTMR2, HMMTOP et PSORT. Ces logiciels utilisent des critères différents pour la prédiction de domaines transmembranaires et fournissent ainsi des résultats souvent différents qui rendent l'interprétation difficile. Par exemple, la protéine liant l'élastine a un Gravy fortement négatif et ne possède pas de peptide signal. Sa localisation est prédite dans la membrane cytoplasmique par PSORT avec un nombre variable de domaines transmembranaires : 4 pour TMPred, 3 pour PredTMR2, 2 pour HMMTOP et 1 pour SOSUI et TMHMM. Compte tenu de l'utilisation prépondérante dans la littérature des données issues des logiciels TMPred et PSORT, seuls les résultats obtenus avec ces deux outils informatiques ont été conservés et complétés par une étude bibliographique pour analyser la pertinence ces protéines identifiées.

3 - RESULTATS

3-1. Résultats préliminaires

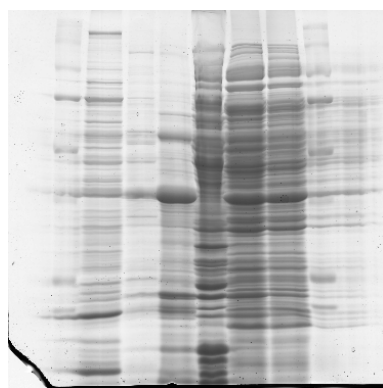
Les protéines de paroi ont été extraites sur des cellules en mode de culture planctonique par l'action de différents agents : SDS, LiCl et Lysostaphine. La méthode au SDS a été exclue car les rendements d'extraction des protéines étaient extrêmement faibles. Les deux autres méthodes se sont avérées beaucoup plus efficaces et ont permis d'extraire des quantités importantes de protéines (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison de l'efficacité d'extraction des protéines pariétales, membranaires et intracellulaires par différentes méthodes

METHODE D'EXTRACTION		PROTEINES	QUANTITE (μg)*
Lysostaphine (20 μg)	Essai 1	Paroi	1066,5 \pm 105
Lysostaphine (120 μg)	Essai 2	Paroi	1520,0 \pm 268
LiCl 3M	Essai 1	Paroi	410,0 \pm 56
LiCl 3M	Essai 2	Paroi	528,0 \pm 30
Triton X100	Essai 1	Membrane Intracellulaire	104,3 \pm 8 476,0 \pm 62
Triton X100	Essai 2	Membrane Intracellulaire	77,5 \pm 23 372,0 \pm 39
TFE/CHCl ₃	Essai 1	Membrane Intracellulaire	6,6 \pm 2 319,2 \pm 24
TFE/CHCl ₃	Essai 2	Membrane Intracellulaire	1,5 \pm 0 276,2 \pm 54

* Quantités de protéines rapportées à une culture initiale de 10 ml d'une DO_{600 nm} de 15.

La séparation et l'analyse des extraits par électrophorèse monodimensionnelle a révélé la présence de multiples bandes protéiques (Figure 1). L'identification de quelques protéines pariétales en ESI-MS s'est révélée difficile compte-tenu de la forte contamination par la lysostaphine et par l'indisponibilité du génome de *S. xylosus* C2a.

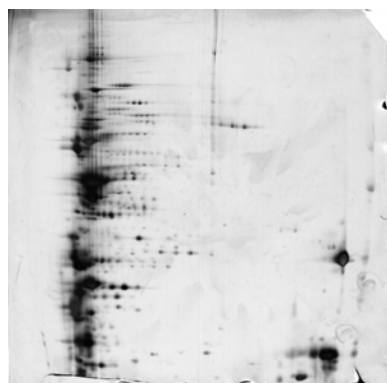


Puits 1 et 8 : Marqueurs moléculaires
 Puit 2 : Extrait pariétal à la lysostaphine
 Puit 3 : Extrait pariétal au LiCl
 Puit 4 : Extrait membranaire au TFE
 Puit 5 : Extrait membranaire au triton
 Puits 6 et 7 : Extrait intracellulaire

Figure 1 : Analyse par électrophorèse monodimensionnelle des protéines pariétales, membranaires et intracellulaires extraites avec différentes méthodes

Une analyse par électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée pour améliorer la résolution des protéines pariétales et éviter leur contamination par la lysostaphine. Dans un premier temps, un gradient de pH large (3-10 non linéaire) a été choisi afin de visualiser la répartition des protéines extraites des cellules planctoniques (Figure 2, gel A). Dans un deuxième temps, le gradient de pH 4-7 a été testé et conservé car il permettait d'améliorer considérablement la résolution dans une zone de pH contenant la quasi-totalité des protéines de l'échantillon (Figure 2, gel B). Puis, une étude comparative des protéines pariétales a été menée entre des cellules en mode de croissance planctonique et sessile (Article 4).

A



B

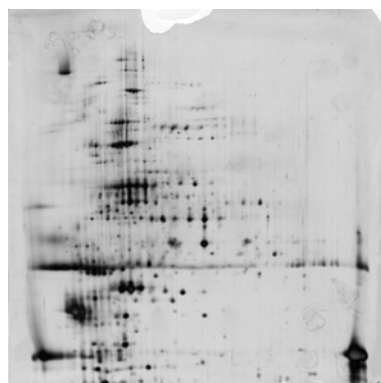


Figure 2 : Analyse des protéines pariétales avec un gradient 3-10 NL (gel A) et 4-7 (gel B)

Pour les protéines membranaires, l'action du Triton et du TFE-CHCl₃ permettent d'extraire des protéines mais avec une efficacité bien plus importante pour la méthode au triton (Tableau 1). Cependant, les profils en électrophorèse monodimensionnelle ou bidimensionnelle sont qualitativement très différents entre les deux méthodes d'extraction (Figures 1 et 3)

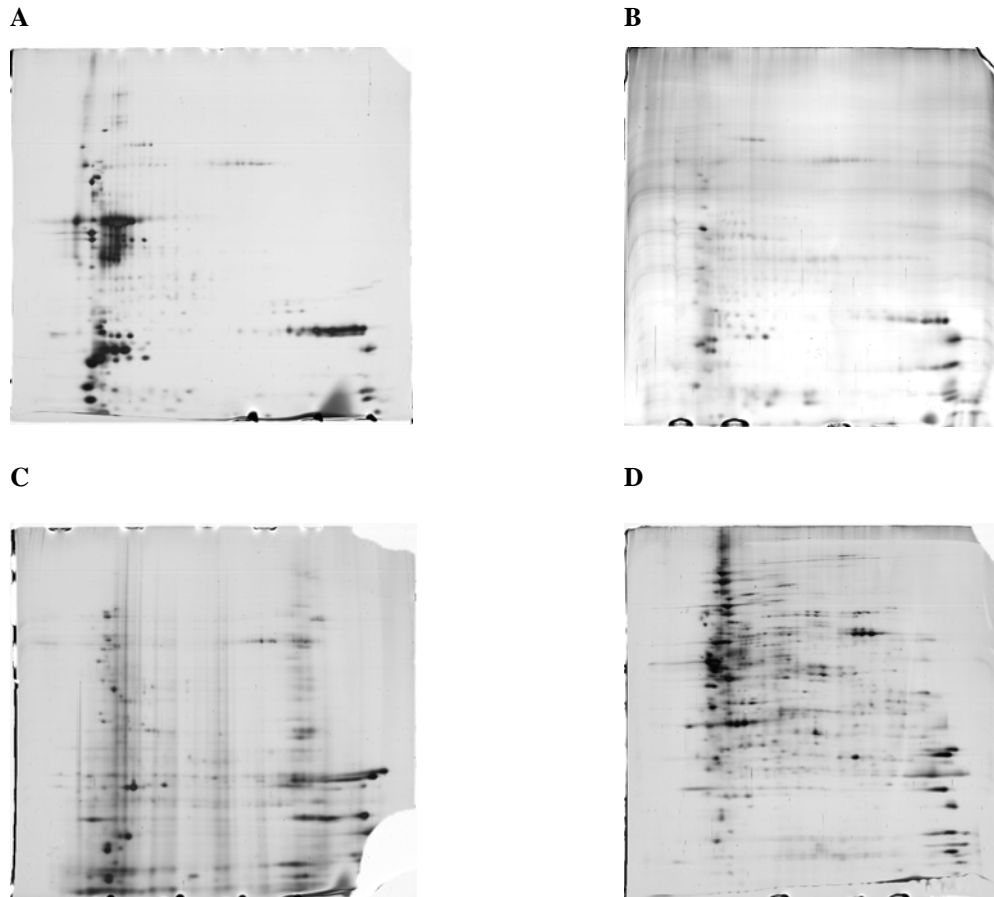


Figure 3 : Analyse des protéines membranaires extraites par la méthode au TFE (gels A et B) et au Triton (gels C et D)

L'extraction au TFE montre une assez bonne résolution et une répartition des protéines plutôt vers les pH acides et quelques protéines au niveau du pI basique (Figure 3). Le problème dans cette méthode réside dans le faible rendement d'extraction des protéines et dans sa non reproductibilité (gels A et B). Pour l'extraction au triton, en dépit de son bon rendement d'extraction des protéines, la 2D montre une mauvaise reproductibilité et la présence de larges traînées dues au triton et/ou aux lipides résultant d'une délipidation partielle des échantillons (gels C et D). De plus, une incubation prolongée avec le triton résultait en une perte totale de protéines membranaires observée par une absence de culot après ultracentrifugation. Ainsi, une autre méthode de délipidation a été testée combinant le dessalage et la précipitation grâce

à un mélange d'acétone, de méthanol et de tributyl phosphate (Mastro and Hall, 1999). L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée directement sur ces échantillons (Figure 4, gel A) et comparée à des échantillons membranaires extraits au triton (Figure 4, gel B).

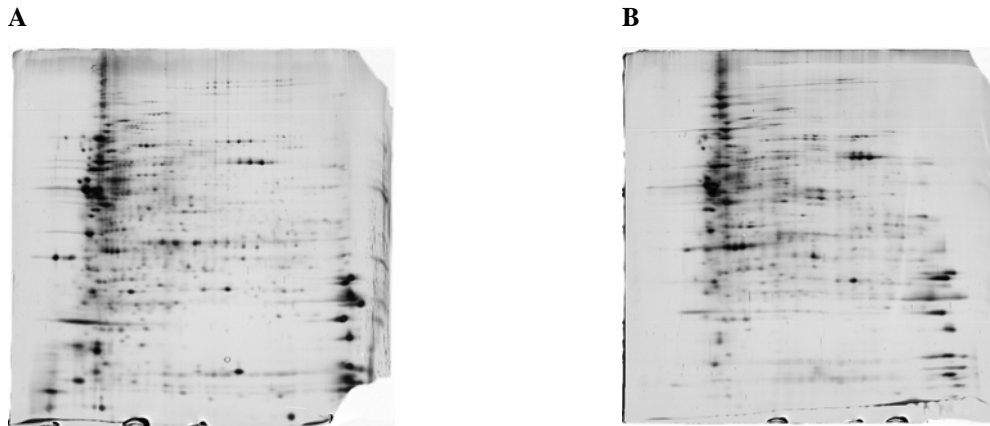


Figure 4: Analyse des protéines membranaires extraites avec la méthode de Mastro and Hall (gel A) et avec le Triton (gel B)

Les extraits protéiques étant qualitativement et quantitativement mieux séparés avec la méthode de Mastro and Hall, ce protocole de délipidation a été retenu pour la suite des expériences. L'efficacité de trois tampons contenant du TFE, du CHAPS ou de l'ASB14 sur la solubilisation des extraits protéiques membranaires a été évaluée par électrophorèse bidimensionnelle. L'ASB14 a été retenu pour son efficacité supérieure et la meilleure qualité de séparation et de résolution des protéines dans le gel.

Le protocole finalement validé comprenait donc une extraction des protéines pariétales à la lysostaphine. Le cassage des protoplastes par des billes de verre suivi d'une ultracentrifugation permet de séparer les protéines membranaires et cytosolubles. La fraction membranaire a subi un traitement par un mélange TnBP/acétone/méthanol pour extraire les protéines enchassées dans la bicouche lipidique et l'ASB14 a été utilisé pour optimiser leur solubilisation. Les extraits protéiques pariétaux et membranaires ont été séparés en EBD avec des gradients de pH 3-10 NL et 4-7. Ce protocole a été appliqué pour comparer les protéines de cellules bactériennes en modes de croissance planctonique et sessile.

3-2. Analyse protéomique des fractions pariétales et membranaires (Article 3)

La méthode d'analyse développée au laboratoire a permis d'obtenir pour la première fois des profils des protéines pariétales et membranaires d'un staphylocoque à coagulase-négative, *S. xylosus*.

Cent une protéines ont été identifiées dont 34 dans la fraction pariétale et 67 dans la fraction membranaire. Parmi ces protéines, seules 9 étaient présentes dans les deux fractions. Elles comprenaient 2 protéines de paroi, 3 avec un domaine transmembranaire et 4 avec une fonction cytoplasmique mais retrouvées en surface.

Dans la fraction pariétale, 64 spots protéiques ont été identifiés par spectrométrie de masse. Ces 64 spots représentent en fait 34 protéines car certaines d'entre elles sont présentes sous plusieurs isoformes. Parmi ces 34 protéines :

- 8 protéines possèdent une séquence signal nécessaire à leur exportation ainsi qu'une localisation prédite en surface par le logiciel Psort.
- 8 protéines possèdent des domaines transmembranaires prédits par le logiciel TMPred.
- 3 protéines n'ont pas de peptide signal ni de domaine transmembranaire mais ont une localisation en surface.
- 15 protéines ont une fonction cytoplasmique mais 9 ont déjà été décrites à la surface bactérienne par certains auteurs.

Dans la fraction membranaire, 113 spots protéiques ont été identifiés par spectrométrie de masse. Ces 113 spots représentent 67 protéines différentes. Parmi ces 67 protéines :

- 7 protéines possèdent une séquence signal nécessaire à leur exportation ainsi qu'une localisation prédite en surface par le logiciel Psort.
- 18 protéines possèdent des domaines transmembranaires prédits par le logiciel TMPred.
- 7 protéines n'ont pas de peptide signal ni de domaine transmembranaire mais ont une localisation en surface.
- 8 protéines interagissent avec d'autres composants de la membrane.
- 27 protéines ont une fonction cytoplasmique mais 7 ont déjà été décrites à la surface bactérienne par certains auteurs.

3-3. Comparaison des fractions pariétales, membranaires et intracellulaires en modes de croissance sessile et planctonique (Article 4)

La comparaison de la physiologie de la croissance en modes sessile et planctonique de *S. xylosus* C2a a révélé une expression différentielle de 115 protéines dont 74 sont surexprimées en mode sessile et 41 en planctonique.

3-3.1. Physiologie en biofilm

Parmi les 74 protéines surexprimées en biofilm, 18 se trouvent dans la fraction pariétale, 33 dans la fraction membranaire, 28 dans la fraction intracellulaire et 5 de ces protéines sont communes aux différentes fractions. L'étude de ces protéines nous a permis d'ébaucher la physiologie en mode sessile de *S. xylosus*.

- *S. xylosus* dégrade les substrats carbonés via la voie des pentoses et la glycolyse. Le substrat semble être d'abord dégradé par la voie des pentoses qui est connecté à la glycolyse par le fructose-6-phosphate. Le pyruvate, issu de la glycolyse, est transformé en lactate ou en alanine. Les deux enzymes catalysant les réactions peuvent être aussi impliquées dans la synthèse de la paroi.
- L'acétyl CoA semble provenir du catabolisme des acides aminés à chaîne latérale ramifiée. Il est utilisé pour la synthèse des acides gras. Il entre aussi dans le cycle du citrate qui génère du fumarate.
- La synthèse des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés est importante en biofilm. Certaines sont impliquées dans la synthèse des acides aminés aromatiques et d'autres dans le catabolisme telle que l'arginase.
- Le métabolisme des protéines met en jeu des protéines impliquées dans la traduction, dans la sécrétion et dans le repliement assisté par des chaperonnes. Ces chaperonnes contribuent également à la dégradation de protéines altérées. Elles sont synthétisées dans des conditions de stress. D'autres protéines sont induites en conditions de stress pendant la croissance en biofilm.
- La synthèse des protéines est sous le contrôle de régulateurs. L'un, SigB, régule la réponse au stress et la formation de biofilm chez les staphylocoques. Un autre, HTH Mar, contrôle un grand nombre de fonctions biologiques incluant des multi-résistances. Le dernier, CcpA, est impliqué dans la répression catabolique des glucides.
- Deux ABC transporteurs impliqués dans le transport d'ions ont été mis en évidence mais ils semblent aussi avoir d'autres fonctions.

- Les différentes voies métaboliques conduisent à la production d'énergie et de cofacteurs. Les cofacteurs sont régénérés via des réactions d'oxydoréductions mettant en jeu des oxydoréductases. Les cofacteurs NADH et FADH₂ transfèrent leurs électrons à la chaîne de transport dans la membrane. L'énergie générée sert à la synthèse d'ATP qui peut être aussi produit à partir du métabolisme des purines aussi amplifié chez *S. xylosus* C2a.

3-3.2. Physiologie en planctonique

Parmi les 41 protéines surexprimées en planctonique, 6 sont dans la fraction pariétale, 26 dans la fraction membranaire, 12 dans la fraction intracellulaire et 3 de ces protéines sont communes aux différentes fractions. Les protéines identifiées sont impliquées dans différentes voies.

- Les substrats carbonés sont dégradés uniquement par la glycolyse. Le pyruvate, issu de la glycolyse, est transformé en acétyl-CoA ou en acétyl-phosphate qui rejoint le métabolisme de l'acétate.
- L'acétyl CoA est utilisé pour la synthèse des acides gras.
- Des protéines sont impliquées dans la synthèse de la paroi.
- La synthèse des pyrimidines et purines est connectée à la synthèse de riboflavine et de folate.
- Des protéines sont impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, des acides aminés et des protéines mais de façon moins importante que dans les cellules sessiles de *S. xylosus* C2a.
- Des protéines de stress oxydatifs sont induites pendant la croissance planctonique.
- Des protéines impliquées dans la virulence des staphylocoques ont été mises en évidence.
- Un régulateur, CodY, est induit et régule des gènes impliqués en phase stationnaire mais il semble aussi être impliqué dans la régulation des gènes de virulence.
- Comme les cellules sessiles, les réactions métaboliques produisent de l'énergie et des cofacteurs qui sont régénérés via des oxydoréductases.

Article n°3

S. Planchon, C. Chambon, I. Chafsey, S. Leroy, R. Talon and M. Hébraud

Analysis of cell wall and membrane proteins of *Staphylococcus xylosus* C2a by a proteomic approach

Soumis pour publication dans Proteomics - Avril 2006

Analysis of cell wall and membrane proteins of *Staphylococcus xylosus* C2a by a proteomic approach

Stella Planchon¹, Christophe Chambon², Ingrid Chafsey¹, Leroy Sabine¹, Régine Talon¹ and Michel Hébraud^{1, 2*}

¹Unité Microbiologie – Equipe Qualité et Sécurité des Aliments, ²Plate Forme protéomique, INRA, Centre Clermont-Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

***Correspondence:** Dr Michel Hébraud, Unité Microbiologie – Equipe QuaSA, INRA site de Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France.

E-mail: hebraud@clermont.inra.fr

Fax: +33(0)-4-73-62-45-81

Keywords: Cell wall proteins / Membrane proteins / *Staphylococcus xylosus* / 2-DE / MALDI-TOF MS.

Article soumis le 15 avril 2006 dans Proteomics.

ABSTRACT

The study aimed at developing a method to analyse the surface proteins of *Staphylococcus xylosus*. A lysostaphin treatment was chosen to recover cell wall associated proteins (CWP). Protoplasts were broken with glass beads and membrane proteins (MBP) were recovered by ultracentrifugation. MBP were delipidated with a mixture of tributyl phosphate, methanol and acetone and solubilized with a buffer containing ASB14. Proteins from the two subproteomes were separated by 2-DE and identified by mass spectrometry. In the cell wall fraction, 64 spots, representing 34 proteins, were identified. Among these, 8 contained a signal peptide with a surface localization, 8 had transmembrane domains and 3 were membrane located without peptide signal or transmembrane domain. The 15 other proteins had a cytoplasmic function but 9 were already described on bacterial surface. In the membrane fraction, 113 spots, representing 67 proteins, were identified. 7 contained a signal peptide, 18 had transmembrane domains and 7 were membrane associated proteins with no transmembrane domain. Among the other proteins, 8 interacted with other membrane components and 27 had a cytoplasmic localization but 7 were previously described on bacterial surface. The method developed gives the first protein pattern of CWP and MBP of *S. xylosus*, a coagulase-negative *Staphylococcus*.

1 Introduction

Staphylococcus xylosus is a “non-motile” Gram-positive coccus, which belongs to the *Staphylococcus saprophyticus* group. *S. xylosus* is commonly found on the skin of a variety of mammals and occasionally on human skin [1]. Consequently, it has been isolated from dairy and meat products. Some strains are used as a starter culture in cheese and sausage manufacturing, in which they contribute to the flavour and the colour of the products [2]. This species is also isolated from environmental sources like soil and surfaces of processing lines [1, 3]. Its capacity to colonise the skin and various surfaces is probably due to its ability to form biofilm [4, 5]. The process of biofilm formation is mediated by cell surface associated macromolecules. Thus, surface proteins play key roles in bacterial interaction and adaptation to the environment, in adhesion to abiotic or biotic surfaces, to host cells or to other bacterial cells and in invasion process [6-8].

The term of “surface proteins” includes cell wall and membrane proteins. The study of these proteins is a real challenge because they are difficult to extract, to solubilize and to analyse due to their intrinsic hydrophobic nature, alkaline pI and the number of transmembrane spanning regions [6, 9]. Extraction of the cell wall proteins (CWP) has been previously

described in Gram-positive bacteria. One method used high salt concentrations, such as LiCl for *S. aureus* [9] and *B. subtilis* [10] and Tris and KSCN for *L. monocytogenes* [11]. Another method used SDS to release surface proteins in *S. aureus* [9] and *L. monocytogenes* [12, 13]. Finally, a method used enzymes that destroyed the cell wall integrity and released covalently anchored cell wall proteins [14-16]. Authors have used the lysostaphin alone [14], or combined with mutanolysin [17] to recover surface proteins in *S. aureus*. Extraction of membrane proteins (MBP) was also performed by lysostaphin treatment followed by ultracentrifugation in *S. aureus* [9, 18]. MBP are entrapped in lipid bilayer and a delipidation step allows to release them and to solubilize and remove lipids [19, 20]. Several delipidation solvents were described in the literature, (i) a mixture of methanol and chloroform [21], (ii) a mixture of tri-n-butylphosphate, acetone and methanol [19], (iii) the Triton X100 [22] and (iv) a mixture of ammonium bicarbonate, chloroform and TFE [23]. Many detergents have been used to solubilize membrane proteins such as (i) a conventional zwitterionic surfactant CHAPS, (ii) an organic solvent trifluoroethanol TFE, and (iii) the amidosulfobetaine ASB14 [24, 25].

Subsequent analyses of surface proteins in Gram-positive bacteria, by using various proteomic techniques, have been reported. In staphylococci, studies of surface proteins concerned mainly the opportunist pathogen *S. aureus*. Authors have used 2-DE classical techniques [9], 1-DE combined to LC-MS/MS [18] and 2-D nanoliquid chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry [8]. Recently, Gatlin *et al.* [17] have successfully isolated 48 cell envelope proteins by combining anion chromatography to either IEF and SDS-PAGE or LC-MS/MS. To date, this study represents the most extensive description of cell surface proteins in *S. aureus* and in staphylococci. However, they did not separate CWP and MBP subproteomes. Furthermore few data are available on surface proteins of coagulase-negative staphylococci such as *S. xylosus*.

The aim of the present study was to evaluate different methods and to develop the most appropriate to extract and analyse separately cell wall and membrane proteins of *S. xylosus*.

2 Material and methods

2.1 Bacterial strain and culture conditions

The strain *S. xylosus* C2a isolated from human skin (University of Tübingen) was grown under shaking (150 rpm) at 30°C, in tryptic soya broth medium supplemented with 0.6 g/L yeast extract (TSB, Difco, France). Overnight cultures were centrifuged at $7\,500 \times g$ for 15 min at room temperature. Cells were resuspended in TSB supplemented with 20 g/L sodium

chloride at initial absorbance at 600 nm (OD_{600}) of 0.6-0.7 and incubated under shaking (150 rpm) at 30°C during 48 h. The cultures were centrifuged at $7\,500 \times g$, 15 min at 20°C. Cell pellets were washed twice with the buffer 1 pH 7.5 (Tris 20 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 5 mM) then resuspended in the buffer 2, corresponding to the buffer 1 adjusted at pH 9.0, and stored frozen at -20°C until required.

2.2 Preparation of cell wall proteins (CWP)

Frozen cells were centrifuged and resuspended in digestion buffer containing 50 mM Tris-HCl, 20 mM $MgCl_2$, 30% sucrose, cocktail of protease inhibitor according to the manufacturer's instructions (Roche, Germany) and 120 µg lysostaphin (Sigma, Saint Louis, MO, USA) for 1 mL of sample at OD_{600} of 40 according to Vytvytska et al. [14]. The suspension was incubated at 37°C for 35 min under shaking at 150 rpm. Then, protoplasts were sedimented by centrifugation at $6\,000 \times g$ for 30 min at 4°C and frozen at -20°C in 2 mL of buffer 2. The supernatant containing CWP was filtered and treated with DNase and RNase (20 µg/mL of each) at room temperature during 15 min. It was precipitated with TCA 20% (v/v) at 4°C. The precipitate was harvested by a $13\,000 \times g$ centrifugation for 45 min at 4°C. The pellet was rinsed three times with glacial absolute ethanol and centrifuged at $13\,000 \times g$, 15 min at 4°C. The pellet was air-dried and resuspended with buffer 3 containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2 mM tributyl phosphine (TBP), 10 mM Tris and 1% ASB14. CWP fractions were stored at -80°C until use.

2.3 Preparation of membrane proteins (MBP)

Frozen protoplasts in buffer 2 were thawed and vortexed three times for 1 min with glass beads (145 µm diameter, Sigma, Saint Louis, MO, USA). Unbroken cells were sedimented by centrifugation at $3\,500 \times g$, 15 min at room temperature and the supernatant was collected. This step was repeated three times and supernatants from different steps were pooled and treated with DNase and RNase (20 µg/mL of each) during 15 min at room temperature. MBP were harvested by ultracentrifugation at $200\,000 \times g$ for 30 min at 4°C. The pellet was washed twice with Tris base buffer (40 mM, pH 8.5) and submitted to delipidation according to Mastro *et al.* [19]. The membrane pellet was resuspended in 500 µL of Tris base buffer and a delipidation solution composed of tributyl-phosphate, acetone and methanol (ratio 1/12/1) was added. The mixture was left at least 90 min at 4°C and centrifuged at $3\,000 \times g$ for 15 min at 4°C. The precipitate was washed twice with the delipidation solution and air dried. To

evaluate the efficiency of different solubilisation buffers, the pellet was dissolved either in (i) buffer 3 containing 1% ASB14 (see 2.2), or (ii) buffer 4 corresponding to buffer 3 in which 4% CHAPS replace ASB14, or (iii) buffer 5 containing 5 M Urea, 2 M thiourea, 2 mM TBP, 2% CHAPS, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) in 50% trifluoroethanol (TFE). Samples of MBP were stored frozen at -80°C.

The amount of proteins was measured by the Bradford method using BSA as a standard. Samples in buffer 3 were diluted by 1/10 for assay compatibility.

2.4. DE and image analysis

The first dimension was performed with the IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) system and pH 4-7 or non linear pH 3-10, 17 cm IPG strips (Bio-Rad). The samples were mixed with 2 mM TBP, 0.3% ampholytes 4-6 and 5-7 or 3-10 for CWP and MBP, respectively, and completed to 400 µL with rehydration buffer (3, 4 or 5). After passive rehydration (9 h), IEF was carried out at 19°C for a total of 48 000 Vh. Second dimension was performed overnight in 10% acrylamide gels. Analytical gels were carried out with 60 µg of proteins and silver stained according to Rabilloud *et al.* [26]. Six 2-DE gels with samples from two different cultures were performed to evaluate the reproducibility of the methods. The gels were compared by using Image Master 2-D Platinum software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Proteins were identified from semi-preparative gels loaded with either 600 µg of MBP and stained with colloidal Coomassie Blue [27] or 200 µg of CWP and silver stained according to Yan *et al.* [28].

2.5 Protein identification by MALDI-TOF MS and bioinformatic analysis

Proteins of interest were excised from the semi-preparative gels. Silver stained spots were washed with 100 µL of 30 mM KFE and 100 mM Na₂S₂O₃ (v/v) for 2 min, and then were rinsed twice with milliQ water. Spots were washed with 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃/5% ACN for 30 min followed by 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃/ACN (v/v) twice 30 min and dehydrated in 100% ACN. Further complete drying was achieved using a speed vac. The dried gel volume was evaluated, then three volumes of 10 ng/µL trypsin (V5111, Promega, USA) in 25 mM NH₄HCO₃ were added and digestion was performed at 37°C overnight. Eight µL of 100% ACN were subsequently added to the hydrolysate to extract peptides. The mixture was sonicated for 5 min and centrifuged. 0.9 µL of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5 mg/mL CHCA in 50% ACN/0.1% TFA) was added immediately and allowed to dry at room temperature. Positive ion MALDI mass

spectra were recorded in reflectron mode of a MALDI-TOF MS (Voyager DE-Pro, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA, USA). The spectra were calibrated externally using standard peptides. Internal calibration was also performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin. Monoisotopic masses were assigned and used for searches with the Mascot software. Proteins were identified by homology searches in Gram-positive bacteria. The database search in Mascot was conducted using a mass accuracy of 25 ppm, carbamidomethyl modification of cysteine residues and oxidation of methionine residues were allowed. A protein was successfully identified when a significant Mascot score was achieved. When necessary, results were confirmed with the genomic sequence of *S. xylosus* C2a (unpublished). Because the genome sequence of this strain is in progress in our laboratory, we used the protein sequences deduced from *S. xylosus* partial sequences to identify the spots that did not match with proteins from databases. The *S. xylosus* database search was performed in Protein Prospector with the same parameters as used in Mascot. The identified proteins were classified according to functional categories of *S. saprophyticus* genome [29].

Subcellular localization of the identified proteins was determined using Psort (www.psort.org/psortb/index.html), the presence of predicted signal peptides using the SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), the GRAVY using the ProtParam tool (www.expasy.org/tools/protparam.html). The transmembrane domain search was conducted using the TMPred program (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form).

2.6 Nucleotide sequence accession numbers

The GenBank accession numbers for the sequences of *S. xylosus* C2a reported in this paper are DQ498883-DQ498912.

3 Results and Discussion

3.1 Cell wall proteins (CWP)

The different methods previously described for extraction of CWP in Gram-positive bacteria displayed major disadvantages. The use of high salt does not release covalently anchored proteins in the cell wall as shown in *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and *L. monocytogenes* [9-11]. The SDS treatment cannot be used prior to 2-DE because of its deleterious effects on IEF due to aggregation of proteins after replacing SDS by non-ionic detergents, as observed in *S. aureus* [9]. Considering the data from the literature and because the lysostaphin allows to release proteins covalently attached to the cell wall by cleaving specifically the cross bridges

of the staphylococcal peptidoglycan, we therefore selected the lysostaphin for CWP extraction of *S. xylosus*.

A total 67 of proteins spots were identified including three spots corresponding to the lysostaphin enzyme used in the extraction buffer (Figure 1, Table 1). Numerous proteins were resolved as two or more spots on the 2-DE which may be caused by post translational processing. The 64 protein spots corresponded finally to 34 distinct proteins (Table 1). The CWP of *S. xylosus* can be divided into four classes: (I) presence of signal peptide and transmembrane domains, (II) presence of transmembrane domains without signal peptide, (III) absence of transmembrane domains but surface localization, (IV) others including cytoplasmic proteins.

In class I, 8 proteins had a signal sequence predicted by the SignalP software and at least one transmembrane domain predicted by TMPred software (Table 1). All these proteins were predicted to be localized in the cell wall with Psort software except the protein similar to the immuno-dominant antigen A (category 17) which had an extracellular predicted location. This class of proteins consisted of transporters, proteins responsible of the virulence of *S. aureus* and those involved in the hydrolysis and synthesis of the peptidoglycan (Table 1).

In class II, 8 proteins contained transmembrane domains but no sequence signal like the components of the pyruvate dehydrogenase complex and the L-lactate dehydrogenase (category 5). These two proteins were usually found in the bacterial membrane preparation (see below in membrane fraction). However, since L-lactate is a component of the staphylococcal cell wall, L-lactate dehydrogenase could be involved in the cell wall biogenesis [30]. Some glycolytic enzymes have transmembrane domains such as glucose-6-phosphate isomerase which could be involved in cell wall and lipopolysaccharide synthesis as shown in *Mycobacterium smegmatis* and *Salmonella typhimurium*, respectively [31, 32], and enolase which was often found on bacterial surface [33, 34]. This class also included cytosol aminopeptidase which may have different locations [35, 36], protease ClpP which can be recruited to the surface by its role [9] and purine nucleoside phosphorylase found on bacterial surface [33, 37].

In class III, three proteins had no predicted transmembrane domain because they are peripheral membrane proteins. These were the hypothetical protein (category 18) which is a membrane component in *Bacillus halodurans*, the ATPase component of ABC transporter (category 6) which showed a predicted membrane localization with Psort and the F₀F₁ ATP synthase (category 5).

In class IV, the nine proteins are known as cytoplasmic proteins, but are often found in the cell surface of bacteria. This class contained proteins induced in stress conditions like the chaperone GroES (category 6), alkyl hydroperoxide reductase which displayed membrane localization in *Bacillus anthracis* [38] and superoxide dismutase (category 9) which was described as intracellular protein in *S. xylosus* [39] but was found on the bacterial cell surface [40-42] and secreted by an alternative secretory pathway SecA2 [43, 44]. Glycolysis enzymes (category 9) were found on streptococcal surface by several authors like fructose-bisphosphate aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [33, 40, 45]. GAPDH was also found on the surface of *L. monocytogenes* and *S. aureus* [11, 17, 46]. Other enzymes (category 11) were described on bacterial surface such as alanine dehydrogenase which is generally located in the plasma membrane of prokaryotes [47, 48] and arginase which is an ubiquitous enzyme with a common cytoplasmic localization but was associated with the cell wall fraction in *Helicobacter pylori* [49]. Finally, some proteins may have different subcellular localizations such as urease and the metallo-beta-lactamase family protein (categories 11 and 16). Indeed, urease, ordinarily cytoplasmic in bacteria, can be extracellular [50] or periplasmic and membrane-bound [51,52]. The metallo-beta-lactamase family protein was predicted with multiple locations by Psort. In Gram-positive species, beta-lactamases may have multiple locations. They are largely extracellular but may adhere to the cytoplasmic membrane [53].

The six remaining cytoplasmic proteins have not been previously described in the bacterial surface (Class IV*, Table 1). Nevertheless, some of them could be present at the cell surface like glucose-1-dehydrogenase which takes part in an alternative mechanism of glucose uptake through the membrane of *S. xylosus* [54] and glucosamine-6-phosphate isomerase which is a precursor for cell wall and polysaccharide synthesis in *S. aureus* [55].

3.2. Membrane proteins (MBP)

The extraction of MBP of *S. xylosus* was based on the combination of techniques described in the literature. In bacteria, ultracentrifugation is a basic technique for membrane separation [24, 25, 56, 57]. Tris base buffer is commonly used to remove cytoplasmic proteins and protein complexes associated with membrane by non-covalent interaction. Indeed, cytoplasmic proteins are soluble in this buffer in opposition to membrane proteins [7, 58]. Membrane delipidation was described by several authors using different solvents. The method of Molloy *et al.* [21] extracted hydrophobic proteins but failed to dissolve the phospholipids bilayer and to release transmembrane proteins. Thus, this technique was not tested in *S.*

xylosus. Deshusses *et al.* [23] described a method allowing the separation of the mix into three phases. This method was evaluated in *S. xylosus* with some modifications but did not yield reproducible gels and so was not considered further (data not shown). Delipidation using triton X100 was usually applied for plants [22, 59] but also tested in staphylococci [60, 61]. Triton X100 does not solubilize membrane proteins but breaks the lipids-proteins and lipids-lipids interactions. We have tested this method for *S. xylosus* but it resulted sometimes in smears on 2-DE gels and no reproducible patterns (data not shown). Finally, the method of Mastro *et al.* [19] used the tri-n-butylphosphate lipophilic solvent which is thought to extract lipids by forming micelles. This solvent, combined with acetone/methanol solution, allows the precipitation and desalting of proteins. This method used for eukaryotes [20, 62] was finally chosen for its reproducibility, efficiency and feasibility for delipidation of membrane proteins in *S. xylosus*.

The three buffers containing TFE, CHAPS or ASB14 were used to solubilize membrane proteins from different organisms and their efficiency seemed to be sample-dependent [59, 63, 64]. Thus, their efficiency was evaluated to solubilize the membrane proteins of *S. xylosus* after the delipidation treatment.

The three different buffers containing TFE, CHAPS or ASB14 allowed to separate 482 ± 28 spots, 493 ± 33 or 548 ± 17 , respectively (Figure 2, gels A, B and C). The number of spots, corresponding to the mean of four gels from two independent cultures and protein extractions, increased as the resolution was improved and the best separation was obtained with the ASB14 buffer (gel C). Most spots were common to the three conditions except for acid and high molecular weight proteins which were poorly separated with TFE buffer *vs.* ASB14 buffer (gels A and C). Solubilization of low molecular weight proteins in acidic region was better with TFE buffer (gel A) while the solubilization of basic proteins was improved with ASB14 buffer (gel C). Consequently, ASB14 buffer was chosen to solubilize membrane proteins of *S. xylosus*.

A total of 113 protein spots were identified and corresponded to 67 distinct proteins (Figure 3, Table 2). A high number of trains of spots were observed that are indicative of multiple forms of the same protein. The MBP can be divided into five classes: (I) presence of signal peptide and transmembrane domains, (II) presence of transmembrane domains, (III) absence of transmembrane domains but membrane localization, (IV) proteins interacting with membrane or membrane components and (V) proteins with cytoplasmic function.

Classes I and II gathered 25/67 proteins with at least one transmembrane domain predicted by TMPred, suggesting that these proteins could be integral or peripheral membrane

proteins often associated with integral membrane proteins which have a more hydrophobic character. The overall hydrophobicity of the membrane proteins is known as the GRand AVerage HYdropathy measure (GRAVY). In this study, all the identified proteins of *S. xylosus* have a negative GRAVY value (Table 2) as already shown for *S. aureus*. The protein spot 95 appeared as the most hydrophobic protein with a gravity value of -0.02 while it had no predicted transmembrane domain. On the contrary, spot 1 was the least hydrophobic protein with a gravity value -1.71 while it contained 4 predicted transmembrane domains. In fact, these proteins exhibited domains of high hydrophobicity allowing them to associate with the lipid bilayer rather than an overall hydrophobicity.

In class I, 7 MBP contained signal peptides for their exportation through the membrane (Table 2). These proteins had a membrane location except for protein spots 27 and 23 (categories 6 and 17) which are cell wall and extracellularly located, respectively, as predicted by Psort. This class consisted of: (i) proteins involved in secretion like type-I signal peptidase B (category 4) and peptidyl-prolyl isomerase (category 6) and (ii) periplasmic substrate-binding subunits of ABC transporters (categories 9 and 11). The putative sulfatase (category 1) which is an integral membrane protein, the succinate dehydrogenase (category 5) which is a membrane-bound dehydrogenase [65, 66] and the surface immuno-dominant antigen A (category 17) were also included in this class.

In class II, 18 MBP had no signal peptides but transmembrane domains allowing them to insert in the cytoplasmic bilayer. Among them, 12 proteins had accurate membrane localization including the protein involved in peptidoglycan synthesis MurG and the penicillin binding protein (category 1). This class contained also several dehydrogenases such as: (i) two glycerol-3-phosphate dehydrogenases (category 5), a membrane-associated enzyme in *S. aureus* [67, 68], (ii) lactate dehydrogenase, found in membrane preparations [65, 67, 69] and involved in the respiratory chain [70] and (iii) pyruvate dehydrogenase, isolated from the membrane fractions [71, 72]. Class II also contained several oxidoreductases like the protein similar to oxidoreductase ion channel (category 5), putative malate-quinone oxidoreductase which displayed membrane associated location, and the protein similar to quinine/NADP dependent oxidoreductase (category 16). Finally, homolog to stress protein (category 6) which had predicted multiple locations like the unknown protein (category 18) and the protein similar to elastin binding protein (category 17) belonged also to this class. The 6 other MBP in class II containing a predicted transmembrane domain have usually a cytoplasmic function but have been already described on bacterial surface, such as the chaperone GroEL and the ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (category 6) [9, 73, 74]. We also found

proteins involved in lipid metabolism such as: (i) phosphate starvation-inducible protein (category 2), functionally linked to the phospholipid turnover in different bacteria such as *L. monocytogenes* and *S. epidermidis* [75], (ii) acetyl-CoA carboxylase (category 7), found on the surface of *S. aureus* with a lipoP motif [17] and (iii) the inositol monophosphatase family protein (category 8), found on the surface of *Mycobacterium smegmatis* [76] and secreted by *Salmonella typhimurium* [77].

Class III contained 7 membrane associated proteins which have no predicted transmembrane domain. This class comprised the putative NADH-flavin reductase (category 1) which is a membrane-bound electron carrier of the electron transport chain, the F₀-F₁ ATP synthase subunits (category 5) which are localized in the membrane of bacteria such as *Clostridium thermoaceticum* and *Bacillus* sp. [78, 79] and the ATPase components of ABC transporters (categories 3, 6 and 9).

Class IV contained 7 proteins which interact with other membrane components like the two response regulators of two-component systems (category 2) interacting with the membrane sensor and diverse ribosomal proteins (category 15). The two-component SrrAB system is involved in the global regulation of staphylococcal virulence factors [80, 81] and the YycFG system controls virulence and cell wall metabolism in *S. aureus* [82, 83]. Ribosomal proteins are linked to the plasma membrane for the translocation of membrane proteins during translation in prokaryotes [84]. The genes encoding these proteins constitute approximately 20% of the genome of *S. aureus* [18]. Moreover, ribosomal proteins are relatively abundant which could mask low abundant proteins in the basic region like the membrane proteins.

Class V contained 27 proteins with a cytoplasmic function but 7 have already been described on bacterial surface (Table 2). This class concerned DnaK and FKBP peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase, category 6). PPIase is abundant in a variety of species and different cell types with different localizations [85]. The categories 8 and 11 contained proteins already identified in cell wall (glucosamine phosphate isomerase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, fructose bisphosphate aldolase and urease) which could be exported through the membrane to be inserted in the cell wall by unknown mechanisms.

The 20 cytoplasmic remaining proteins (class V*, Table 2) can be subdivided into three sub-classes: (i) proteins which could be localized in surface by their function, but this remains to be demonstrated, (ii) proteins involved in cell wall synthesis and the fatty acid biosynthesis and are consequently in the vicinity of the membrane and (iii) proteins with a unique cytoplasmic function.

4 Concluding remarks

This study represents the first proteomic analysis of cell wall and membrane proteins of *S. xylosum*, a coagulase-negative *Staphylococcus*. We have identified 105 distinct proteins, 51 were surface proteins of which 19 were found in the cell wall fraction and 32 in the membrane fraction. We have pointed out numerous membrane proteins but most of them have a single transmembrane domain. Integral membrane proteins may be present at low abundance in our protein extract and so, they are not detected in 2-DE gels. In bacteria, the genome encloses approximately 30% of membrane proteins and 25% of predicted membrane proteins have a single transmembrane domain in *S. aureus* [18].

We have isolated CWP and MBP with two different protocols and only 9 proteins were common to the two fractions. These were (i) two cell wall proteins (IsaA and ABC periplasmic component) which crossed the membrane, (ii) three proteins with transmembrane domains such as lactate dehydrogenase, Clp protease which could move towards the cell wall and the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex with an unknown role in the cell surface, and (iii) four cytoplasmic proteins which have already been described on bacterial surface and so, could be also exported to the cell wall.

The 54/105 remaining proteins, identified in one or the other of the two fractions are reported as located in the cytoplasmic compartment, although they may be found associated with bacterial surface. These results suggest that these proteins can transit between the cytosol and the membrane compartments and consequently that their localization, rather than to be strictly compartmentalized, is dependent on the phase of growth and environmental conditions.

Our approach allows to separate and localize efficiently proteins from the two subproteomes, *i.e.* CWP and MBP, in a Gram-positive bacterium. From the identification within these two fractions of several proteins probably involved in bacterial virulence and multidrug resistance, our method appears useful for the study of such proteins in opportunistic pathogens belonging to the coagulase-negative staphylococci as well as other Gram-positive bacteria.

Acknowledgments

Stella Planchon received a Ph.D grant from the French Ministry of National Education and Research. We would like to thank Nicole Garrel and Brigitte Duclos for their technical assistance, Sibille Farrer for her assistance with MALDI-TOF MS analyses, Thierry Sayd for his advices regarding membrane protein extraction and Martine Morzel for helpful discussions about this manuscript.

5 References

- [1] Kloos, W. E., Schleifer, K. H., in: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams Wilkins Co., Baltimore, 1986, pp. 1013-1035.
- [2] Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S., in: Toldra, F (Eds) *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, Research Signpost, 2002, pp. 175-191.
- [3] Corbiere Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R., *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 108, 210-217.
- [4] Norwood, D. E., Gilmour, A., *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 33, 320-324.
- [5] Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Dordet-Frisoni, E., Bellon-Fontaine, M. N. *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.* 2006, in press.
- [6] Nouwens, A. S., Cordwell, S. J., Larsen, M. R., Molloy, M. P. *et al.*, *Electrophoresis* 2000, 21, 3797-3809.
- [7] Silveira, M. G., Baumgartner, M., Rombouts, F. M., Abee, T., *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 2748-2755.
- [8] Xiang, R., Shi, Y., Dillon, D. A., Negin, B. *et al.*, *J. Proteome Res.* 2004, 3, 1278-1283.
- [9] Nandakumar, R., Nandakumar, M. P., Marten, M. R., Ross, J. M., *J. Proteome Res.* 2005, 4, 250-257.
- [10] Antelmann, H., Yamamoto, H., Sekiguchi, J., Hecker, M., *Proteomics* 2002, 2, 591-602.
- [11] Schaumburg, J., Diekmann, O., Hagendorff, P., Bergmann, S. *et al.*, *Proteomics* 2004, 4, 2991-3006.
- [12] Tabouret, M., de Rycke, J., Dubray, G., *J. Gen. Microbiol.* 1992, 138, 743-753.
- [13] Muller, S., Hain, T., Pashalidis, P., Lingnau, A. *et al.*, *Infect. Immun.* 1998, 66, 3128-3133.
- [14] Vytvytska, O., Nagy, E., Bluggel, M., Meyer, H. E. *et al.*, *Proteomics* 2002, 2, 580-590.
- [15] Wright, A., Wait, R., Begum, S., Crossett, B. *et al.*, *Proteomics* 2005, 5, 2443-2452.
- [16] Jonquieres, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., Cossart, P., *Mol. Microbiol.* 1999, 34, 902-914.
- [17] Gatlin, C. L., Pieper, R., Huang, S. T., Mongodin, E. *et al.*, *Proteomics* 2006, 6, 1530-1549.
- [18] Scherl, A., Francois, P., Bento, M., Deshusses, J. M. *et al.*, *J. Microbiol. Methods* 2005, 60, 247-257.
- [19] Mastro, R., Hall, M., *Anal. Biochem.* 1999, 273, 313-315.
- [20] Candiano, G., Musante, L., Bruschi, M., Ghiggeri, G. M. *et al.*, *Electrophoresis* 2002, 23, 292-297.

- [21] Molloy, M. P., Herbert, B. R., Williams, K. L., Gooley, A. A., *Electrophoresis* 1999, 20, 701-704.
- [22] Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F., Rabilloud, T., *Electrophoresis* 2000, 21, 3329-3344.
- [23] Deshusses, J. M., Burgess, J. A., Scherl, A., Wenger, Y. *et al.*, *Proteomics* 2003, 3, 1418-1424.
- [24] Hermann, T., Finkemeier, M., Pfefferle, W., Wersch, G. *et al.*, *Electrophoresis* 2000, 21, 654-659.
- [25] Schluesener, D., Fischer, F., Kruip, J., Rogner, M., Poetsch, A., *Proteomics* 2005, 5, 1317-1330.
- [26] Rabilloud, T., *Methods Mol Biol* 1999, 112, 297-305.
- [27] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., *Electrophoresis* 88, 9, 255-262.
- [28] Yan, J. X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R. A. *et al.*, *Electrophoresis* 2000, 21, 3666-3672.
- [29] Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2005, 102, 13272-13277.
- [30] Schleifer, K. H., Schumacher-Perdreau, F., Gotz, F., Popp, B., *Arch. Microbiol.* 1976, 110, 263-270.
- [31] Tuckman, D., Donnelly, R. J., Zhao, F. X., Jacobs, W. R. Jr *et al.*, *J. Bacteriol.* 1997, 179, 2724-2730.
- [32] Chatterjee, A. K., Ross, H., Sanderson, K. E., *Can. J. Microbiol.* 1976, 22, 1549-1560.
- [33] Hughes, M. J., Moore, J. C., Lane, J. D., Wilson, R. *et al.*, *Infect. Immun.* 2002, 70, 1254-1259.
- [34] Cole, J. N., Ramirez, R. D., Currie, B. J., Cordwell, S. J. *et al.*, *Infect. Immun.* 2005, 73, 3137-3146.
- [35] Gonzales, T., Robert-Baudouy, J., *FEMS Microbiol. Rev.* 1996, 18, 319-344.
- [36] Blanc, B., Laloi, P., Atlan, D., Gilbert, C., Portalier, R., *J. Gen. Microbiol.* 1993, 139, 1441-1448.
- [37] Page, M. G., Burton, K., *Biochem. J.* 1978, 174, 717-725.
- [38] Ariel, N., Zvi, A., Makarova, K. S., Chitlaru, T. *et al.*, *Infect. Immun.* 2003, 71, 4563-4579.
- [39] Barrière, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Sétrin, S. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 201, 181-185.

- [40] Wilkins, J. C., Beighton, D., Homer, K. A., *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 5290-5296.
- [41] Escuyer, V., Haddad, N., Frehel, C., Berche, P., *Microb. Pathog.* 1996, 20, 41-55.
- [42] Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., *Infect. Immun.* 1996, 64, 3512-3517.
- [43] Gerlach, D., Reichardt, W., Vettermann, S., *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 160, 217-224.
- [44] Braunstein, M., Espinosa, B. J., Chan, J., Belisle, J. T., Jacobs, W. R., *Mol. Microbiol.* 2003, 48, 453-464.
- [45] Ling, E., Feldman, G., Portnoi, M., Dagan, R. *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 2004, 138, 290-298.
- [46] Goji, N., Potter, A. A., Perez-Casal, J., *Vet. Microbiol.* 2004, 99, 269-279.
- [47] Andersen, A. B., Andersen, P., Ljungqvist, L., *Infect. Immun.* 1992, 60, 2317-2323.
- [48] Raynaud, C., Etienne, G., Peyron, P., Laneelle, M. A., Daffe, M., *Microbiology* 1998, 144(Pt 2), 577-587.
- [49] McGee, D. J., Radcliff, F. J., Mendz, G. L., Ferrero, R. L., Mobley, H. L., *J. Bacteriol.* 1999, 181, 7314-7322.
- [50] Clemens, D. L., Lee, B. Y., Horwitz, M. A., *J. Bacteriol.* 1995, 177, 5644-5652.
- [51] Mobley, H. L., Hausinger, R. P., *Microbiol. Rev.* 1989, 53, 85-108.
- [52] McLean, R. J., Cheng, K. J., Gould, W. D., Costerton, J. W., *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 49, 253-255.
- [53] Livermore, D. M., *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8, 557-584.
- [54] Fiegler, H., Bassias, J., Jankovic, I., Bruckner, R., *J. Bacteriol.* 1999, 181, 4929-4936.
- [55] Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Nishi, H., Yamada, S. *et al.*, *Mol. Microbiol.* 2004, 53, 1221-1231.
- [56] Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G. *et al.*, *Electrophoresis* 2001, 22, 4404-4422.
- [57] Klein, C., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Scheffer, B. *et al.*, *Proteomics* 2005, 5, 180-197.
- [58] Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I. *et al.*, *Electrophoresis* 1998, 19, 837-844.
- [59] Luche, S., Santoni, V., Rabilloud, T., *Proteomics* 2003, 3, 249-253.
- [60] Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., Gotz, F., *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 18586-18593.
- [61] Cramton, S. E., Gerke, C., Gotz, F., *Methods Enzymol.* 2001, 336, 239-255.
- [62] Carboni, L., Piubelli, C., Righetti, P. G., Jansson, B., Domenici, E., *Electrophoresis* 2002, 23(24), 4132-4141.

- [63] Henningsen, R., Gale, B. L., Straub, K. M., DeNagel, D. C., *Proteomics* 2002, 2, 1479-1488.
- [64] Churchward, M. A., Butt, R. H., Lang, J. C., Hsu, K. K., Coorsen, J. R., *Proteome Sci* 2005, 3, 5.
- [65] Kubak, B. M., Yotis, W. W., *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 649, 642-650.
- [66] Johnson, A. S., van Horck, S., Lewis, P. J., *Microbiology* 2004, 150, 2815-2824.
- [67] Lascelles, J., *J. Bacteriol.* 1978, 133, 621-625.
- [68] Nishihara, M., Koga, Y., *J. UOEH* 2000, 22, 13-18.
- [69] Linder, L., Andersson, C., Sund, M. L., Shockman, G. D., *Infect. Immun.* 1983, 40, 1146-1154.
- [70] Bott, M., Niebisch, A., *J. Biotechnol.* 2003, 104, 129-153.
- [71] Adler, L. A., Arvidson, S., *J. Bacteriol.* 1988, 170, 5337-5343.
- [72] Vilhelmsson, O., Miller, K. J., *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2353-2358.
- [73] Hennequin, C., Collignon, A., Karjalainen, T., *Microb. Pathog.* 2001, 31, 255-260.
- [74] Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F. *et al.*, *Infect. Immun.* 2006, 74, 425-434.
- [75] Kazakov, A. E., Vassieva, O., Gelfand, M. S., Osterman, A., Overbeek, R., *In Silico Biol* 2003, 3, 3-15.
- [76] Parish, T., Liu, J., Nikaido, H., Stoker, N. G., *J. Bacteriol.* 1997, 179, 7827-7833.
- [77] Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B., Galan, J. E., *Mol. Microbiol.* 2001, 39, 248-259.
- [78] Das, A., Ljungdahl, L. G., *J. Bacteriol.* 1997, 179, 3746-3755.
- [79] Cook, G. M., Keis, S., Morgan, H. W., von Ballmoos, C. *et al.*, *J. Bacteriol.* 2003, 185, 4442-4449.
- [80] Pragman, A. A., Yarwood, J. M., Tripp, T. J., Schlievert, P. M., *J. Bacteriol.* 2004, 186, 2430-2438.
- [81] Bronner, S., Monteil, H., Prevost, G., *FEMS Microbiol. Rev.* 2004, 28, 183-200.
- [82] Ng, W. L., Robertson, G. T., Kazmierczak, K. M., Zhao, J. *et al.*, *Mol. Microbiol.* 2003, 50, 1647-1663.
- [83] Dubrac, S., Msadek, T., *J. Bacteriol.* 2004, 186, 1175-1181.
- [84] Finean, J., Michell, R., *News Comprehensive Biochemistry - Vol 1: Membrane Structure*, Elsevier 1981.
- [85] Pahl, A., Keller, U., *J. Bacteriol.* 1992, 174, 5888-5894.

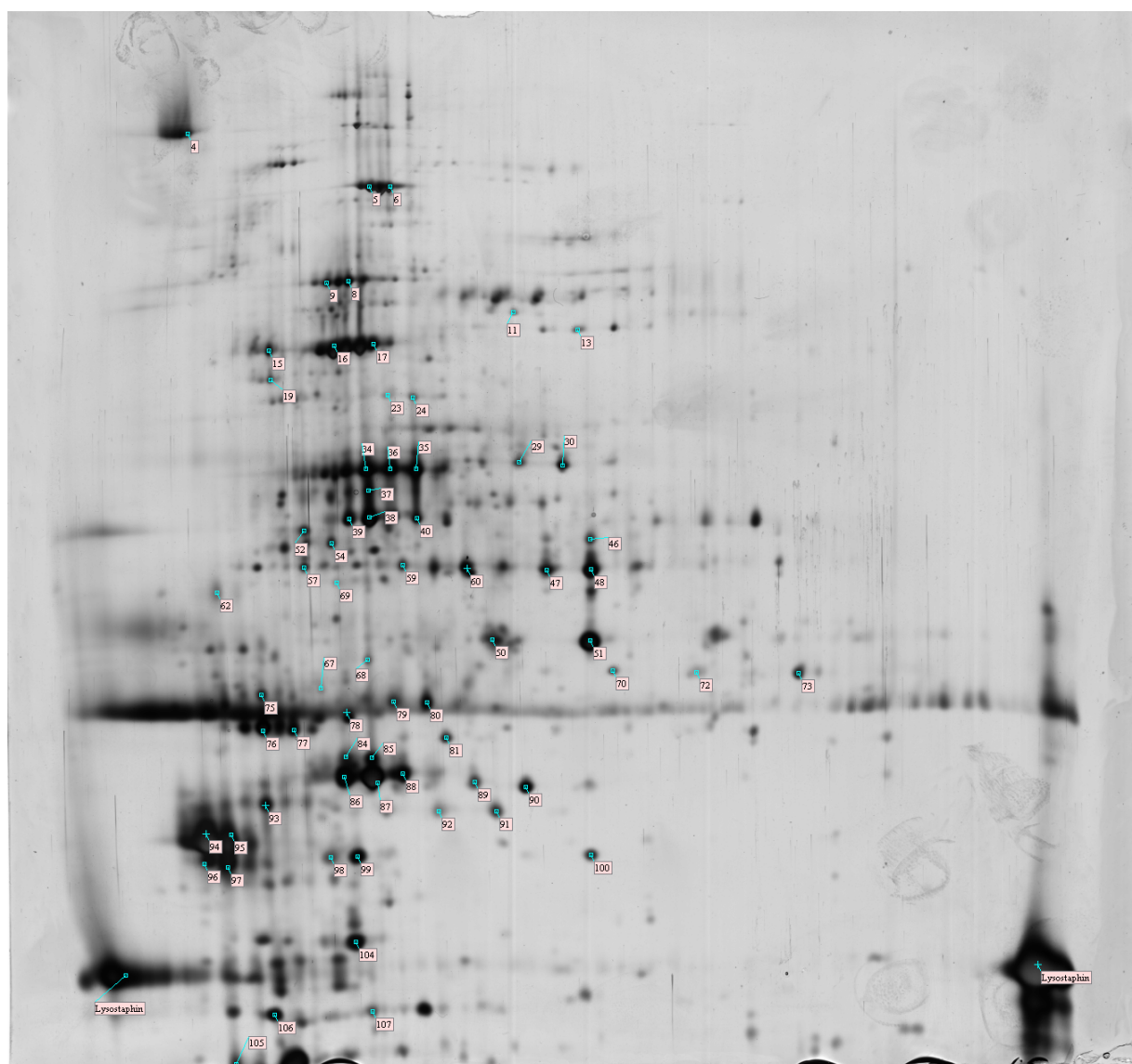


Figure 1: 2-DE patterns of *S. xylosus* C2a cell wall extracts. The extracts were harvested after lysostaphin treatment of cells grown under shaking until late stationary phase. Protein extracts (200 µg) were separated by IEF over a linear pH gradient 4 to 7 followed by a 10% SDS-PAGE. Proteins were revealed with silver staining. The spot numbers were listed in Table 1

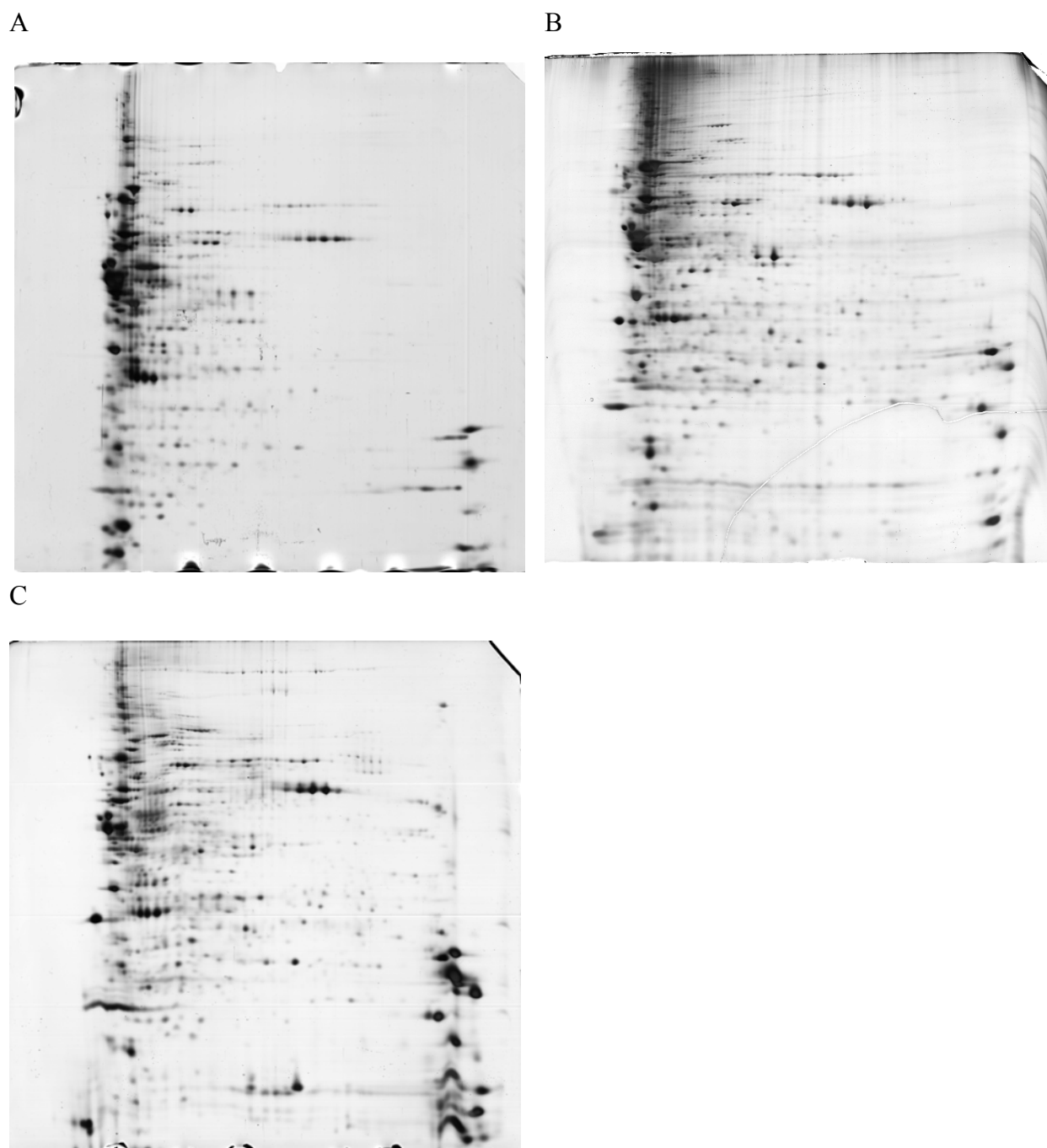


Figure 2: Comparative patterns of membrane proteins delipidated using a mixture of tributylphosphate, acetone and methanol, and solubilized using buffers containing: trifluoroethanol (A), zwitterionic surfactant CHAPS (B) or amidosulfobetaine ASB14 (C). Protein extracts (60 µg) were separated by IEF over a non linear pH gradient 3 to 10 followed by a 10% SDS-PAGE and revealed with silver staining

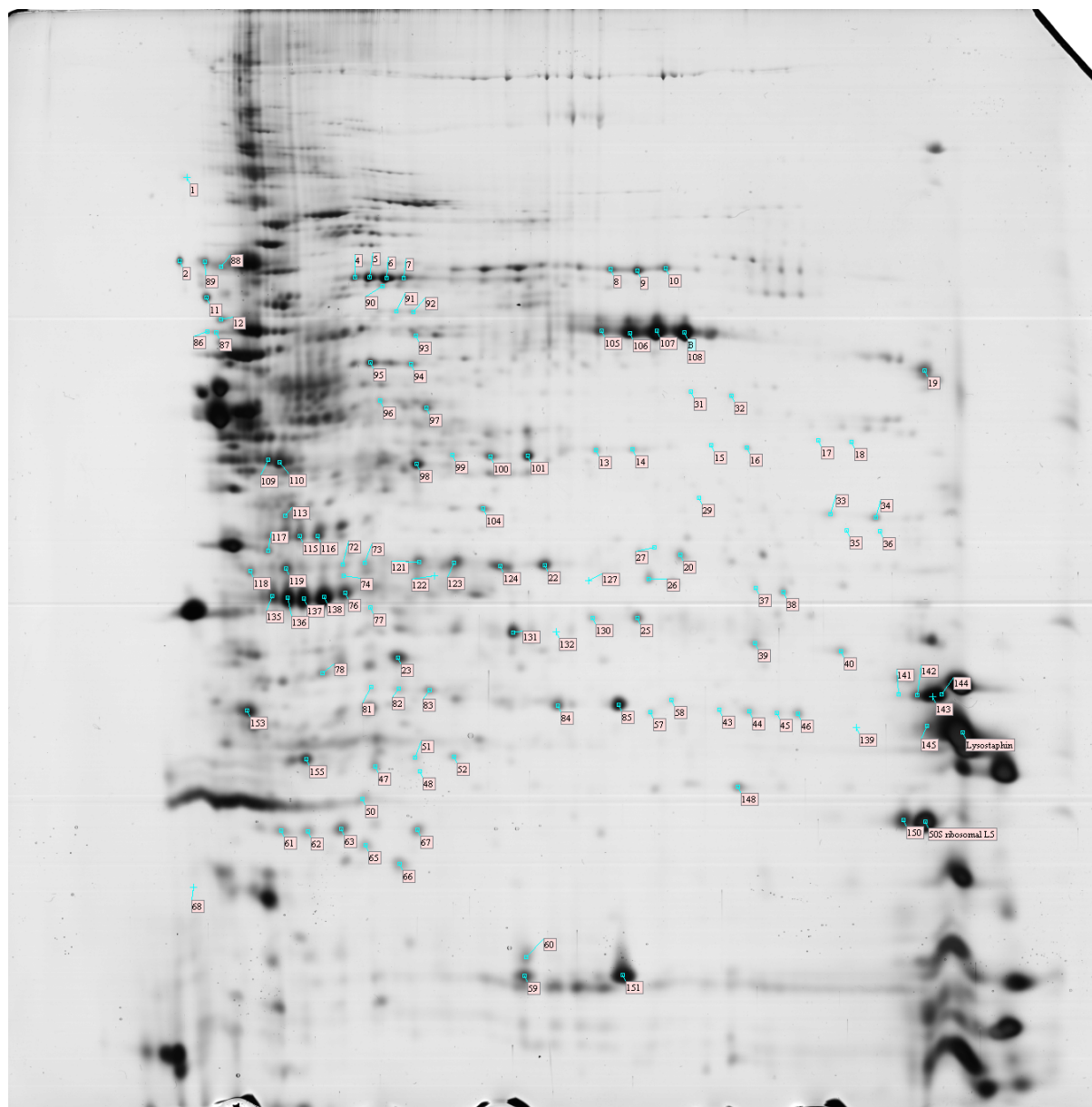


Figure 3: 2-DE of membrane proteins from *S. xylosus* after delipidation with a mixture of tributyl-phosphate, acetone and methanol and solubilization in buffer 3 containing ASB14. Protein extracts (1 mg) were separated by IEF over a non linear pH gradient 3 to 10 followed by a 10% SDS-PAGE. Proteins were revealed with Coomassie blue staining and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. The spot numbers were listed in Table 2

Table 1: Identification of cell wall proteins by MALDI TOF mass spectrometry

Spot id	Protein	Accession number	Function in cell-surface	pI/PM theoretical	Sequence coverage %	Motifs ^(a) Signal P TMD	Class ^(b)
1-Cell wall/membrane biogenesis genes							
23	RND family efflux transporter, MFP component	DQ498883	Drug export	5.33	21	SP 1 TMD	I
24			Multidrug resistance	40535.4			
70	Putative cell-shape determining protein	gi 73662419	Shape determining	5.76	26	SP 1 TMD	I
72			in rod-shaped cells	30992			
73							
5-Energy production and conversion genes							
8	Dihydrolipoamide dehydrogenase	gi 49483259	Membrane-associated	4.95	20	2 TMD	II
9			dehydrogenase	49421			
15	F0F1-type ATP synthase beta subunit	gi 73662090	Membrane associated ATPase	4.65 51188	26		III
57	Phospho-trans-acetylase	gi 73663433	Protein acylation	4.69 35165	31		IV*
59	L-lactate dehydrogenase	DQ498885	Possible role in	5.00	11	1 TMD	II
60			cell wall biogenesis	34780.8	28		
6- Post translational modification, protein turn over, chaperonnes genes							
67	Putative Iron-regulated ABC transporter ATPase component	DQ498886	ATP binding of ABC transporter	4.73 28242.3	77		III
91	ATP-dependent	DQ498887	Cellular scavenger	4.98	21	2 TMD	II
92	Clp protease proteolytic subunit		of degradable proteins	21225.3	21		
93	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	DQ498888	Reduction of organic hydroperoxides, Role in oxidative stress	4.51 21042.6	47		IV
106	Co-chaperonin GroES	gi 73662156	Carrier of proteins to their cellular location	4.83 10325	45		IV
7-Lipid transport and metabolism genes							
79	Glucose-1-dehydrogenase	gi 2226002	Possible role in	4.92	21		IV*
80			glucose uptake	28580			
8-Carbohydrate transport and metabolism genes							
16	Glucose-6-phosphate isomerase A	gi 73663122	Cell wall and	4.84	42	2 TMD	II
17			lipopolysaccharide synthesis	49765	42		
5	Transketolase	gi 73662725	Unknown	4.95	29	2 TMD	II
6				72138	29		
19	Enolase	gi 70727110	Possible role in binding to plasminogen	4.55 47106	17	1 TMD	II
34-35	Glyceraldehyde-3-	gi 73663225	Possible role in	4.89	39		IV

36-37	phosphate		binding to	36180	39		
38-39-40	dehydrogenase		plasminogen		39		
52	Fructose- biphosphate aldolase class I	DQ498889	Unknown	4.74 33145.6	23		IV
75	Putative	gi 73662291	Unknown	4.51	20		IV*
76	transaldolase			25532	51		
77					27		
89	Glucosamine-6-	DQ498890	Precursor for cell	5.22	30		IV*
90	phosphate isomerase putative		wall and polysaccharide biosynthesis	22398.5	44		
9-Inorganic ion transport and metabolism genes							
46	Putative ABC-type	gi 73663397	Mn Zn-binding	5.41	38	SP	I
47	Mn Zn transporter		protein	34908		1 TMD	
48	system periplasmic						
84-85	Superoxide	gi 45861254	Role in resistance	4.88	39		IV
86-87	dismutase		to oxidative stress	22303	35		
88					76		
104	Starvation-inducible DNA-binding protein	gi 73662054	Protection of DNA in oxidative or nutritional stress	4.60 16970	38		IV*
11-Amino acid transport and metabolism genes							
13	Cytosol aminopeptidase	DQ498891	Protein degradation	5.23 54171.7	13	1 TMD	II
29	Alanine	gi 73662366	Possible role in	5.02	26		IV
30	dehydrogenase		cell wall synthesis	39878			
54	Arginase	gi 73662030	Unknown	4.82 32840	18		IV
100	Urease beta subunit	gi 410515	Virulence factor in <i>S. saprophyticus</i>	5.29 15423	63		IV
12-Nucleotide transport and metabolism genes							
78	Purine nucleoside phosphorylase	gi 73662055	Possible role in harvesting nucleotides of damaged proteins	4.75 26124	22	1 TMD	II
14-Transcription genes							
68	Transcriptional regulator, putative	DQ498892	Similar to transcription antiterminator LytR of <i>S. aureus</i> , role in peptidoglycan hydrolysis	5.58 34765.3	15	SP 1 TMD	I
16- General function prediction only genes							
11	Hypothetical protein	gi 27467882	Predicted HD superfamily hydrolase	5.28 58661	11	SP 1 TMD	I
81	Metallo-beta- lactamase family protein	DQ498893	Antibiotic resistance	4.95 23112.2	30		IV

17-Not in COGs genes

4	Fibronectin-binding protein A	DQ498894	Virulence factor in <i>S. aureus</i> , binding to fibronectin	4.58 75890.1	33	SP 2 TMD LPXTG	I
50 51	Similar to immunodominant antigen	DQ498895	Imunodominant antigen A	5.94 25378.6	20 34	SP 1 TMD	I

18-Function unknown

94 95 96 97	Similar to immunodominant antigen B	DQ498896	Surface antigen, virulence factor in <i>S. aureus</i> , transglycosylase	4.65 21640.6	37 37 37 24	SP 1 TMD	I
98 99	Alkaline shock protein 23	gi 73662013	Response to alkaline stress	4.82 18508	18 24		IV*
107	Hypothetical Protein SH0949	gi 70725950	Similar to mercuric transport system protein of <i>Bacillus halodurans</i>	4.35 7853	52		III

a) CWP were separated in four classes: (I) presence of signal peptide and transmembrane domains, (II) presence of transmembrane domains, (III) absence of transmembrane domains but membrane localization, (IV) proteins with cytoplasmic function and surface localization and (IV*) proteins with cytoplasmic function.

b) Motifs were predicted by TMPred for the detection of transmembrane domains (TMD) and SignalP for the search of signal peptide (SP).

Table 2: Identification of membrane proteins by MALDI-TOF mass spectrometry

Spot id	Protein	Accession number	Function in cell surface	pI / PM theoretical	Sequence coverage %	GRAVY ^(c)	Motifs ^(b) SP TMD	Class ^(a)
1- Cell wall/membrane biogenesis genes								
17	Similar to Penicillin binding protein 4	DQ498897	Transpeptidase involved in the cross-linking of the peptidoglycan	7.76 36635.9	21 42	-0.487	1 TMD	II
31	Putative UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthase	gi 73662208	Peptidoglycan biosynthesis, Mur E ligase	7.64 49117	21 24	-0.338		V*
33	UDP-N-acetylglucosamine N-acetylmuramyl-pentapeptide pyrophosphoryl-undecaprenol transferase	gi 73662630	Peptidoglycan biosynthesis, Mur G transferase	6.63 40214	31	-0.339	2 TMD	II
95	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyl transferase	gi 57634647	Peptidoglycan biosynthesis, Mur A transferase	5.62 44968	14	-0.021		V*
96	Putative sulfatase	DQ498898	Hydrolyze various sulphate esters	6.50 74827.5	35	-0.401	SP 5 TMD	I
81	Putative NADH-flavin reductase	DQ498899	Oxidoreductase, role in electron transport	5.21 23694.1	38	-0.277		III
2- Signal transduction mechanisms genes								
77	Staphylococcal respiratory response protein	gi 73662569	Signal receiver domain SrrA of SrrAB system (staphylococcal respiratory response protein)	5.14 28039	55	-0.549		IV
78	Response regulator	gi 70725018	Response regulator VicR of VicRK system, homolog to YycFG	5.05 27132	54	-0.562		IV
26	Phosphate starvation-inducible protein	gi 73662494	Possible role in phospholipids turnover	6.33 34798	23 30	-0.259	1 TMD	II
3- Defence mechanisms genes								
20	ABC-type multidrug transport system ATPase component	DQ498900	ATP binding, involved in multidrug resistance	6.19 33993.5	52	-0.372		III
43	ABC transporter, ATP binding protein VraD	DQ498901	ATP binding, involved in lipoprotein release	6.39 28002.0	26	-0.408		III
4- Intracellular trafficking and secretion genes								
65	Type-I signal peptidase B	DQ498902	Cleavage of hydrophobic, N-	5.40 22373.5	51	-0.450	SP 1 TMD	I

terminal signal or leader sequences from secreted and periplasmic proteins

5-Energy production and conversion genes

8	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	gi 73662768	Glycero-phospholipid metabolism and component of lipoteichoic acid polymers for some Gram-positive bacteria	6.05 62221	31 14	-0.572	1 TMD	II
122	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	gi 49483661	Interaction with E2 component	5.94 36105	15	-0.173	3 TMD	II
109	Pyruvate dehydrogenase E1 component	gi 70726860	Membrane associated dehydrogenase	4.98 41502	27 27			IV
86	Dihydrolipoamide transferase E2 component	gi 70726494	TCA cycle and electron transport	4.86 46220	18	-0.611		II
87								
88								
90	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	gi 57866658	Possible role in cell wall biogenesis of staphylococci	5.59 65590	34	-0.425	SP 1 TMD	I
76	L-lactate dehydrogenase	gi 73662310	Membrane associated ATPase	5.02 34502	25 25	-0.143	1 TMD	II
135								
136								
13-138								
25	F0F1 ATP synthase gamma subunit	gi 73662089	Membrane associated ATPase	6.2 31858	15 27	-0.371		III
130								
119	Similar to oxidoreductase ion channel	DQ498903	Membrane oxidoreductase	4.94 35331.9	59	-0.490	1 TMD	II

6- Post translational modification, protein turnover, chaperones genes

2	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	gi 73662398	Trigger factor, protein folding	4.23 48849	27	-0.657		V
27	Peptidyl-prolyl cis trans isomerase	gi 73662267	Protein secretion helping the post-translocational extracellular folding	8.58 37403	24	-1.028	SP 1 TMD	I
11	Chaperonin GroEL	gi 27468547	Carrier of proteins to their cellular location	4.6 57714	25	-0.184	1 TMD	II
89	Chaperone protein DnaK	DQ498904	Response to stress	4.50 66507.3	20	-0.557		V
59	Similar to general stress protein	DQ498905	Cellular scavenger of degradable proteins	6.41 18132.5	48 48	-0.341	1 TMD	II
60								
151								
61	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	DQ498887	ATP binding of ABC transporter	4.98 21225.3	38 21	-0.255	2 TMD	II
62								
63								
153	Putative Iron-regulated ABC transporter component	gi 73663170		4.77 28205	54	-0.395		III

7- Lipid transport and metabolism genes

72	Acetyl-CoA carboxylase alpha subunit	gi 73662376	Fatty acid metabolism	5.05 35323	12	-0.463	1 TMD	II
131	Trans-2-enoyl-ACP reductase	gi 70726948	Catalyze a key regulatory step in fatty acid synthesis	5.7 28059	13	-0.235		V*
132	Similar to DegV family protein	DQ498911	Function of fatty-acid binding, possible role in cellular functions of fatty acid transport or metabolism	5.75 30703.1	34	-0.146		V*

8- Carbohydrate transport and metabolism genes

12	Alpha-D-1.4-glucosidase	gi 474177	Hydrolyze oligosaccharides, polysaccharides	4.63 63917	42	-0.695		V*
102	Xylose isomerase	gi 48835	Interconversion of xylose	4.99 50109	17			V*
103					17			
50	Glucosamine-6-phosphate isomerase putative	DQ498890	Precursor of cell wall synthesis	5.22 22398.5	35	-0.373		V
82	Inositol monophosphatase family protein	DQ498906	Glycero-phospholipid metabolism	5.46 30146.5	45	-0.212	1 TMD	II
83					52			
117	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 20799606	Possible role in binding to plasminogen	4.66 33343	26	-0.364		V
118	Fructose bisphosphate aldolase class I	DQ498889	Unknown	4.74 33145.6	50	-0.400		V

9- Inorganic ion transport and metabolism genes

45	Putative ABC-type Mn Zn transport system ATPase component	gi 73663395	ATP binding of ABC transporter	6.3 27222	14	-0.293		III
73	Putative ABC-type Mn Zn transport system periplasmic Mn Zn-binding protein	gi 73663397	Mn Zn-binding of ABC transporter	5.41 34908	29	-0.662	SP 1 TMD	I
139	ABC transporter ATP binding protein	DQ498907	ATP binding	7.91 24831.5	40	-0.546		III
91	Catalase B	gi 68137816	Protection of cells from the toxic effects of peroxides	5.43 57092	43	-0.839		V*
92					53			
93					52			

10- Coenzyme transport and metabolism genes

13	Putative phosphopantothenoyl cysteine synthetase decarboxylase	gi 73662869	Unknown	6.24 44412	23	-0.377	1 TMD	II
14					20			
74	Putative pyridoxine biosynthesis protein	gi 73663546	Probable resistance to oxidative stress	5.13 31886	30	-0.188		V*

11- Amino acid transport and metabolism genes

4	Urease α -subunit	gi 410516	Virulence factor in	5.33	39	-0.266		V
5			<i>S. saprophyticus</i>	61774	39			
6					51			
7					49			
66	Urease beta subunit	gi 410515	Virulence factor in	5.29	70	-0,839		V
	Urea amidohydrolase		<i>S. saprophyticus</i>	15423				
35	Putative allophanate	gi 73663311	Unknown	6.44	19	-0.493		V*
36	hydrolase subunit2			37889	23			
100	DAHPh synthetase-chorismate mutase	gi 1177684	Unknown	5.41	31	-0.516		V*
				29453				
141	ABC-type amino acid transport system	gi 73661551	Periplasmic substrate binding	9.14	28	-0.632	SP	I
142	periplasmic component			29500	28		1 TMD	

13- Replication recombination and repair genes

98	RecA recombinase	gi 70726629	Unknown	5.27	26	-0.359		V*
99				37758				
15	ATPase AAA family	gi 57867117	ATPases associated with different cellular activities, including membrane fusion and proteolysis	8.26	16	-0.318		V*
16				47133	28			

14- Transcription genes

19	Transcription termination factor	gi 27468637	Rho factor, regulation of transcription	7.77	30	-0.546		V*
				49762				
67	Transcription antitermination factor	gi 73663528	Transcriptional elongation factor, similar to nusG <i>S. carnosus</i>	5.17	49	-0.188		V*
				20610				
57	Transcriptional regulator	gi 73663589	Similar to DNA-binding protein, Spo0J-like protein of <i>S. epidermidis</i> (plasmid partitioning)	5.77	18	-0.199		V*
				27747				
84	Transcription pleiotropic repressor	gi 70726660	CodY factor, repressor of gene expression in stationary phase	5.61	28	-0.228		V*
85				28619				

15- Translation genes

44	SpoU methylase protein	rRNA family	gi 73663533	Unknown	6.31	30	-0.138	V*
46					27047	25		
94	Putative ATP-dependent helicase	ATP-RNA	gi 70725957	Unknown	9.45	26	-0.617	V*
					56994			
22	30S ribosomal protein S2		gi 73662821	Protein synthesis	5.52	27	-0.543	IV
29					29729	30		
121						33		
123						35		
51	30S ribosomal protein S4		gi 73662353	Protein synthesis	9.69	45	-0.736	IV
52					23130	45		
145-146						46-51		

143	50S ribosomal protein L1	gi 73663526	Protein synthesis	9.14	36				IV
144				24949	32				
47	50S ribosomal protein L4	gi 73661973	Protein synthesis	10.16	42	-0.323			IV
48				22427	42				
150	50S ribosomal protein L5	gi 73661984	Protein synthesis	8.73	56				IV
				20203					

16- General function prediction only genes

37	Putative GTPase	gi 73662498	Hydrolyze of GTP	6.77	35	-0.358			V*
38				34484	35				
105	Probable malate:quinone oxidoreductase 2	DQ498908	Electron transport and TCA cycle	6.32	56	-0.507	2 TMD		II
106				55881.1	61				
107					57				
108					57				
113	Similar to	DQ498909	Oxidoreductase, zinc binding	4.98	28	-0.312	2 TMD		II
115	quinone/NADP-dependent oxidoreductase			36758.8	57				
116					57				
155	Putative phosphohydrolase	gi 49483013	Hydrolase activity	5.02	24	-0.527			V*
				25589					

17- Not in COGs genes

1	Similar to elastin binding protein	DQ498910	Binding to elastin	4.55	31	-1.707	4 TMD		II
				57724.3					
23	Similar to immunodominant antigen	DQ498895	Imunodominant antigen A	5.94	26	-0.445	SP 1 TMD		I
				25378.6					

18- Function unknown

134	Similar to unknown protein	DQ498912	Unknown	6.25	41	-0.414	1 TMD		II
				33257.8					

a) MBP were separated in five classes: (I) presence of signal peptide and transmembrane domains, (II) presence of transmembrane domains, (III) absence of transmembrane domains but membrane localization, (IV) proteins interacting with membrane or membrane components, (V) proteins with cytoplasmic function and surface localization and (V*) proteins with cytoplasmic function.

b) Motifs were predicted by TMPred for the detection of transmembrane domains (TMD) and SignalP for the search of signal peptide (SP).

(c) GRAVY is the Grand AVerage HYdropathy obtained with the ProtParam tool from Expasy.

Article n°4

S. Planchon, S. Leroy, C. Chambon, I. Chafsey, M. Hébraud and R. Talon

Comparative proteome of surface and intracellular proteins from planktonic and sessile cells of *S. xylosus* C2a

A soumettre pour publication dans Proteomics

Comparative proteome of surface and intracellular proteins from planktonic and sessile cells of *S. xylosus* C2a

Stella Planchon¹, Sabine Leroy¹, Christophe Chambon², Ingrid Chafsey¹, Michel Hébraud^{1, 2} and Régine Talon^{1*}

¹Unité Microbiologie – Equipe Qualité et Sécurité des Aliments, ²Plate Forme protéomique, INRA, Centre Clermont-Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

***Correspondence:** Dr. Régine Talon, Unité de Microbiologie – Equipe QuaSA. INRA, Centre de Clermont-Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

E-mail: talon@clermont.inra.fr

Fax: +33(0)-473-624268.

Article en préparation pour soumettre dans Proteomics.

Abstract

S. xylosus species form biofilm on hydrophobic and hydrophilic surfaces. To understand the mechanisms involved, a comparative proteomic study between sessile and planktonic cells was performed. The protein patterns were compared in the different sub-cellular fractions, cell wall, membrane and intracellular, by 2-DE. Proteins differently expressed were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. This study revealed differences in expression level in 115 proteins with 74 proteins in sessile cells and 41 proteins in planktonic cells.

In sessile cells, up-regulated proteins belonged to different metabolic pathways such as pentose phosphate and glycolysis pathways, citrate cycle, and fatty acid, purines and pyrimidines, amino acids and proteins synthesis. Sessile cells were also characterised by different proteins involved in stress, regulation, transport and oxydoreduction.

In comparison to biofilm cells, up-regulated proteins in planktonic cells belonged to glycolysis pathway, pyruvate metabolism and cell wall, fatty acid, purine and pyrimidines, amino acids and proteins synthesis. Planktonic cells were also characterised by proteins involved in stress, virulence, regulation and oxydoreduction.

Keywords: cell wall proteins / membrane proteins / intracellular proteins / planktonic cells / sessile cells / *Staphylococcus xylosus* C2a.

1- Introduction

Staphylococcus xylosus is a Gram-positive cocci belonging to the *Staphylococcus* genus which enclose pathogenic opportunistic and saprophytic species [1]. *S. xylosus* colonises commonly the skin of a variety of mammals but occasionally the human skin [1]. It is also frequently isolated from environmental sources like soil and surfaces of processing lines [1, 2]. Some strains are used as starter cultures in sausage manufacturing [3]. However, recently, some strains of *S. xylosus* were involved in animal (mastitis, dermatitis...) and in human (acute pyelonephritis, root canal infection, urinary tract infections...) infections [4-9]. Furthermore, some strains become more resistant to antibiotics and metals used in disinfectant [10].

In a previous study, we have shown that strains of *S. xylosus*, isolated from human skin and sausages, colonized abiotic supports and formed multilayered biofilm in which cells were embedded in an exopolysaccharide matrix [11]. The mechanism of biofilm formation in *S. xylosus* is linked to polysaccharides which seemed be synthesised via a mechanism independent of *ica*. The *bap* gene was also found and contribute to biofilm formation [11].

However, other surface components described in biofilm formation of staphylococci, could be involved. Teichoic acids, autolysins and Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) are responsible of the adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [12-14]. While, the accumulation associated protein (AAP), the biofilm associated protein (BAP) and the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) are responsible of the aggregation-accumulation in *S. aureus* and *S. epidermidis* [15-17].

To study the whole surface proteins involved in biofilm formation of *S. xylosus*, a global approach was chosen. Recently, we have developed a proteomic study of cell wall and membrane proteins of *S. xylosus* to give insight into protein accumulation and/or protein synthesis [18]. By this proteomic study, we identified 51 proteins predicted as surface proteins. Among them, the presence of adhesins such as fibronectin and elastin binding proteins corroborate with the adhesive and binding properties of staphylococci.

In the literature, recent data about comparison of planktonic and sessile cells in staphylococci concerned *S. aureus*. Global gene expression had been studied in biofilm cells of *S. aureus* by a transcriptomic approach [19, 20]. Recently, a proteomic approach together with transcriptomic one were performed in *S. aureus* biofilm and planktonic cells and correlated study [21]. These authors have compared the cell wall and secreted proteins synthesised by biofilm and planktonic cells of *S. aureus*. To date, no global study either proteomic or transcriptomic approaches, concerns coagulase negative staphylococci.

The aim of the study was to determine the mechanisms taking place during the development of *S. xylosus* on an abiotic surface and so to understand its survival in the environment. Thus, we have compared the physiology of *S. xylosus* C2a in planktonic and sessile growth. This comparison concerns cell wall, membrane proteins and intracellular proteins.

2- Material and methods

2.1- Bacterial strain and culture conditions

The strain *S. xylosus* C2a was grown in tryptic soya broth medium supplemented with 0.6 g/l of yeast extract (TSB-YE) with agitation 150 rpm at 30°C. Overnight cultures were centrifuged at 7500 g during 15 min at room temperature. They were washed twice and diluted in physiological saline at an OD_{600nm} of 0.6-0.7. This bacterial suspension was divided in two parts; one part was incubated 2 h under shaking (150 rpm) and represented the planktonic culture. The other part was dispersed in Petri dishes containing stainless steel discs and incubated without shaking which corresponded to the biofilm culture [11]. After 2 h-

incubation, the planktonic culture was centrifuged and resuspended in TSB supplemented with 20 g l⁻¹ of chloride sodium (TSB-NaCl). The biofilm culture was removed of the disc and replaced by TSB-NaCl. The planktonic and the biofilm cultures were incubated at 30°C during 48 h, with and without agitation, respectively. After washing, the cultures were sonicated in an ultrasonic bath and centrifuged in order to remove extracellular polymers as previously described [11]. The supernatants were discarded and the cell pellets were washed twice with buffer 1 (pH 7.5) then resuspended in buffer 2 (pH 9) and frozen for store at -80°C until required.

2.2- Preparation of cell wall, cytosoluble and membrane proteins

Cell wall proteins (**CWP**) were recovered by lysostaphin treatment as described [18]. Protoplasts were broken with glass beads and unbroken cells were pelleted by a final centrifugation 3500 g, 15 min at room temperature. Then, cytosoluble proteins (**CSP**) were separated from membrane by ultracentrifugation at 200 000 g during 30 min at 4°C. Supernatant containing CSP were precipitated with 3 volumes of acetone at -20°C overnight. After a 13 000 g centrifugation during 40 min at 4°C, the pellet was air dried. Soluble proteins were dissolved in a solution containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 10 mM Tris. Membrane proteins (**MBP**) were delipitated according to the Mastro technique and reswollen in the buffer containing 7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 mM TBP, 10 mM Tris and 1 % ASB as already described [18].

2.3- First dimension IEF, 2-D PAGE and image analysis

The different samples were mixed with 2mM Tributyl phosphine (TBP), 0.3% Ampholytes 4-6 and 5-7 for cell wall, cytosoluble and membrane proteins and completed to 400 µl with rehydration buffer. Samples (400µl) were loaded using the “in-gel-reswelling procedure” with passive rehydration during 9h at 20°C. Then IEF was carried out at 65000Vh for CSP or 48000Vh for CWP and MBP.

The IPG were placed on the top of the gel and embedded with agarose (1%). Second dimension SDS-PAGE (12%) was performed at 40V, 15mA per gel, 250W for 1h and 100V, 15mA per gel, 250W for 15h. Gels were loaded with 60µg of proteins and silver stained (Rabilloud et al) for image analysis with Image Master 2D Platinum (Biorad software). Six gels from two independent cultures were compared in order to evaluate the “intraclass” variation in the planktonic and the biofilm cultures in the different fractions: cell wall, soluble

and membrane proteins. Then the planktonic gels were compared to the biofilm gels in each fraction in order to estimate the “interclass” variation.

Gels loaded with 600 µg of membrane proteins were stained with Colloidal Coomassie Blue or 100 µg of cell wall proteins were stained with the silver nitrate protocol compatible with mass spectrometry (Yann et al.) for analysis of proteins with MALDI-TOF (Matrix Assisted Desorption Ionisation - Time Of Flight) mass spectrometry.

2.4- Protein identification with MALDI -TOF/MS

Proteins of interest were excised from the semi-preparative gels. Silver stained spots were washed with 100 µL of 30 mM KFE and 100 mM Na₂S₂O₃ (v/v) for 2 min, and then were rinsed twice with milliQ water. Spots were washed with 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃/5% ACN for 30 min followed by 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃/ACN (v/v) twice 30 min and dehydrated in 100% ACN. Further complete drying was achieved using a speed vac. The dried gel volume was evaluated, then three volumes of 10 ng/µL trypsin (V5111, Promega, USA) in 25 mM NH₄HCO₃ were added and digestion was performed at 37°C overnight. Eight µL of 100% ACN were subsequently added to the hydrolysate to extract peptides. The mixture was sonicated for 5 min and centrifuged. 0.9 µL of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5 mg/mL CHCA in 50% ACN/0.1% TFA) was added immediately and allowed to dry at room temperature. Positive ion MALDI mass spectra were recorded in reflectron mode of a MALDI-TOF-MS (Voyager DE-Pro, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA, USA). The spectra were calibrated externally using standard peptides. Internal calibration was also performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin. Monoisotopic masses were assigned and used for searches with the Mascot software. Proteins were identified by homology searches in Gram-positive bacteria. The database search in Mascot was conducted using a mass accuracy of 25 ppm, carbamidomethyl modification of cysteine residues and oxidation of methionine residues were allowed. A protein was successfully identified when a significant Mascot score was achieved. When necessary, results were confirmed with the genomic sequence of *S. xylosus* C2a (unpublished). Because the genome sequence of this strain is in progress in our laboratory, we used the protein sequences deduced from *S. xylosus* partial sequences to identify the spots that did not match with proteins from databases. The *S. xylosus* database search was performed in Protein Prospector with the same parameters as used in Mascot. The identified proteins were classified according to functional categories of *S. saprophyticus* genome.

3- Results and discussion.

Analysis of cell wall, membrane and cytoplasmic proteins was performed by 2-DE (70 gels) with IEF in the pH range of 4-7. Proteins differentially expressed in biofilm vs. planktonic cells of *S. xylosus* C2a were analysed by MALDI-TOF mass spectrometry (Tables 1 and 2, Figure 1). Among the three different sub-proteomes, 115 proteins displayed a difference in expression level. Among them, in the sessile mode of growth, 74 proteins were up-regulated including 18 in the cell wall fraction, 33 in the membrane fraction and 28 in the intracellular fraction with 5 proteins found in the different fractions (Table 1). In the planktonic mode of growth, 41 proteins were up-regulated including 6 in the cell wall fraction CWP, 26 in the membrane fraction and 12 in the intracellular fraction with 3 proteins found in the different fractions (Table 2).

3.1- Physiology of *S. xylosus* cells in biofilm.

By comparison to the planktonic cells, the sessile cells of *S. xylosus* appeared to degrade carbohydrates by both pentose and glycolysis pathways. It seemed that the first steps belonged to the pentose phosphate pathway with three over-expressed enzymes (Table 1, Figure 1). The first enzyme of this pathway, the glucose-1-dehydrogenase, belongs to a non-PTS glucose uptake protein in *S. xylosus*. The last enzyme of this pathway, the transaldolase, produces fructose 6-phosphate that enters in the glycolysis cycle. Then from this step, most of enzymes of the glycolysis were highly expressed in biofilm. As observed in *S. xylosus*, the pentose and glycolysis pathways were higher expressed in biofilm cells than planktonic ones in *S. aureus* [21]. According to these authors, these pathways are necessary in *S. aureus* to produce energy in biofilm. Among the glycolytic enzymes, enolase and GAPDH have been described as human plasminogen-binding in *Listeria monocytogenes*, in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus pneumoniae* [22-24]. Enolase also binds salivary mucin MG2 in *S. mutans* and to laminin-containing extracellular matrix in *S. aureus* suggesting a role in the colonisation of these bacteria [23, 25].

The phosphomannomutase/phosphoglucomutase, involved in both pentose phosphate and glycolysis pathways, was overexpressed in biofilm cells of *S. xylosus*. In *Pseudomonas aeruginosa*, the enzyme is also bifunctional, the phosphomannomutase is involved in the formation of exopolysaccharides (alginate) and the phosphoglucomutase is involved in the production of lipopolysaccharide [26]. In *B. subtilis*, the deficiency in phosphoglucomutase was correlated with altered cell morphology and impaired biofilm formation [27]. Thus, the

biofilm formation deficiency may be due to an absence of UDP-Glucosamine which may be a precursor of a putative compound required for biofilm formation [27].

Pyruvate, generated from glycolysis, can be catalysed to lactate in anaerobic condition by the lactate dehydrogenase which was overexpressed in *S. xylosus* sessile cells. This result was already observed in *Bacillus cereus* biofilm [28]. In *Bacillus subtilis*, the anaerobic induction of lactate dehydrogenase indicated a central role for the regeneration of NAD⁺ during fermentative growth [29]. This enzyme could be also involved in the cell wall biogenesis as lactate is a component of the staphylococcal cell wall [30]. Furthermore, alanine dehydrogenase involved in cell wall synthesis was also upregulated in the cell wall fraction of biofilm cells of *S. xylosus*. In *Mycobacterium tuberculosis*, this enzyme is secreted across the cell membrane in order to participate to the synthesis of the cell wall skeleton [31]. The surface location of the alanine dehydrogenase in pathogenic species of *Mycobacterium* was linked to a possible role in the virulence [32]. The synthesis of the alanine dehydrogenase was also found upregulated in the intracellular fraction of *S. xylosus* sessile cells. Alanine dehydrogenase catalyzes the NAD-dependent reversible reductive amination of pyruvate into alanine. This enzyme can be induced by stress such as saline stress as observed in *L. monocytogenes* [33].

In *S. xylosus* biofilm cells, acetyl CoA seemed to be synthesized from branched chained amino acids degradation by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase which was up-regulated. Then, acetyl CoA can be used for the fatty acids biosynthesis as three enzymes involved in this pathway were over-expressed (Table 1). The acetyl CoA carboxylase is involved in the first step of the long-chain fatty acid biosynthesis, the 3-oxoacyl-ACP reductase in an intermediary step while the trans-2-enoyl-ACP reductase catalyzes the last step. However, acetyl CoA can also enter in the citrate cycle (TCA) in which most of the enzymes were over-expressed in *S. xylosus* biofilm cells. These results were in agreement with those of Resch *et al.* (2006) in *S. aureus* sessile cells. TCA cycle activity is enhanced at the end of the exponential growth phase and when expression of secreted virulence factors is maximal in *S. aureus* [34]. TCA activity is controlled by the rate of oxygen and it has been reported that oxygen transfer is limited in deeper layers of biofilms [28]. Many authors suggested that biofilms can contain a mixture of aerobic and anaerobic bacteria (Ventullo and Rowe 1982; Sang Sun Yoon, Robert F. Hennigan 2002). In *S. aureus*, TCA cycle activity was repressed when cells grew under conditions of low oxygen availability or in nutrient-replete conditions [35]. Additionally, in *S. epidermidis*, stress-inducing stimuli such as heat, ethanol, and high concentrations of salt repressed TCA activity while they increase production of PIA

and biofilm formation [35]. These authors hypothesized that impairment of TCA cycle function shunts metabolites toward PIA production. In a precedent study [11], we have shown that biofilm cells of *S. xylosus* synthesized polysaccharides but the mechanism was probably independent of *ica* genes responsible of PIA synthesis, so we cannot established a relation between the TCA cycle and the polysaccharides production.

Proteins involved in amino acids metabolism were upregulated in *S. xylosus* biofilm (Table 1). Some of them are involved in aromatic amino acid synthesis (tryptophane, phenylalanine and tyrosine) as observed in *S. aureus* biofilm [21]. While, others proteins are involved in amino acids catabolism such as arginase which degrades arginine in ornithine and urea. The arginase is usually expressed in aerobic condition. This enzyme was associated with the cell wall fraction in *Helicobacter pylori* to contribute to the survival at acid exposure [36]. In *S. aureus* biofilm cells, the arginine deiminase (ADI) pathway, composed of three enzymes, was over-expressed in anaerobic condition [19-21]. These authors suggested that the production of ammonium was necessary to maintain pH homeostasis i.e. stability and survival of sessile cells.

Proteins involved in translation were enhanced in *S. xylosus* biofilm (Table 1). One of them, the elongation factor Tu seems also to have multiple roles in stress situations such as during nutritional deprivation [37]. In cell surface, this factor may also have an ability to bind human plasminogen as shown in *L. monocytogenes* [22]. Ribosomal proteins and elongation factor were also found more abundant under biofilm growth conditions of *S. pneumoniae* [38].

The signal peptidase, involved in secretion, was over-expressed in biofilm cells of *S. xylosus* as observed in *B. subtilis* [39, 40]. These authors suggest that the role of the signal peptidase, in biofilm formation, is to process a secreted protein that has a role in allowing surface-adhered cells to form a mature biofilm. The signal peptidase-processed protein may have a role in producing an intercellular adhesin or a motility structure in *B. subtilis* [39, 40].

A peptidyl prolyl isomerase, involved in the folding process assisted by chaperones DnaK and GroES were over-expressed in biofilm cells of *S. xylosus* (Table 1). In *S. aureus*, DnaK was necessary in both biofilm and planktonic cells but GroES was only found in 48 h planktonic cells [21]. In *S. mutans*, a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (RopA) is a trigger factor which is a key regulator of acid and oxidative stress tolerance, genetic competence, and biofilm formation, all critical virulence properties [41].

The two chaperones DnaK and GroES can also assist to the degradation of misfolded proteins by the ClpP protease which was over expressed in biofilm cells of *S. xylosus*. ClpP is the

proteolytic subunit of the Clp complex associated with a Clp ATPase such as ClpA or ClpX or ClpC [42, 43]. In *L. monocytogenes*, ClpP was also up regulated in biofilm (P. Folio unpublished). In *S. mutans*, the *clpP* mutant strain showed a reduced capacity to form biofilms [44]. These authors suggested that ClpP may act by controlling the stability or activity of transcriptional regulators of biofilm maturation. However, in *S. aureus*, ClpP was found down-expressed in biofilm cells [21]. Frees *et al.* (2004) have shown that biofilm formation by *S. aureus* was enhanced in presence of ClpX or ClpC and in absence of ClpP which repressed ClpC. Nevertheless, ClpP and ClpX were both required for cell-to-cell interactions but only ClpX and ClpC were required for biofilm formation in *S. aureus* [42, 45]. These authors concluded that Clp proteolytic complexes are important for survival and ClpP contributes to virulence by controlling the activity of major virulence factors in *S. aureus*. Moreover, Chatterjee *et al.* (2005) have shown that *clpC* inactivation in *S. aureus* resulted in significantly enhanced stationary-phase survival compared to that of the wild-type strain. Thus, ClpC was important for recovery from the stationary phase and also for entering the death phase [43].

Proteins ClpP, DnaK and GroES are often induced by stress conditions [37, 45, 46]. In biofilm cells of *S. xylosus*, other proteins related to the stress response were over-expressed such as the superoxide dismutase (SOD) in the intracellular fraction which is an enzyme induced by oxidative stress [37]. SOD contributes to the survival of bacteria in various stress conditions; amino acid limitation and acid stress for *S. aureus* [21]. The choline dehydrogenase catalysing the conversion of choline into betaine, a potent osmoprotectant, was over expressed in sessile cells of *S. xylosus*. This choline converting pathway had been already highlighted in the strain *S. xylosus* C2a we studied [47]. These authors showed that this pathway was induced by choline and NaCl. These data suggest an osmotic stress in biofilm cells of *S. xylosus*. The cold shock protein and the alkaline shock protein 23 were up-regulated in biofilm cells of *S. xylosus*. These proteins were often induced in different stress but their role is unknown. The alkaline shock protein 23 was also up regulated in *S. aureus* biofilm [21]. This protein is under the control of the sigma B (*sigB*) factor which is involved in the stress response, especially in stationary phase in *S. aureus* [48, 49]. *SigB* is also an important regulator of staphylococcal biofilm growth [21, 49]. A protein belonging to the *sigB* regulon, *RsbV*, was up-regulated in biofilm cells of *S. xylosus*. During the exponential growth phase, *RsbV* is phosphorylated and thus cannot interact with *RsbW* which inactivates *sigB* through the complex *RsbW*–*sigB* [50, 51]. In response to environmental stress, *RsbV* is dephosphorylated by *RsbU*, leading to the formation of the highly specific *RsbV*–*RsbW*

complex and the release of activated sigB factor. In *S. aureus*, no difference in the levels of synthesis of SigB was noticed in biofilm cells but the strain used carried a mutation in *rsbU* gene [21]. In *S. xylosus* biofilm, in stationary phase, we can suppose that the RsbV over-expressed could interact with RsbW and then turn on SigB factor.

Two other transcriptional regulators were over-expressed in biofilm cells of *S. xylosus*. The first belongs to the “helix turn helix multiple antibiotic resistance” (HTH MAR) regulator family. Regulators with the marR-type HTH domain are present in bacteria and archaea and control a variety of biological functions, including resistance to multiple antibiotics and oxidative stress agents and regulation of the virulence factor synthesis in human pathogens (IPR000835). In *L. monocytogenes*, this regulator was also up-regulated in biofilm cells (P. Folio, unpublished). In *Escherichia coli*, authors suggested *mar* expression would be greatest within the depths of a biofilm where growth rates are suppressed [52].

The second regulator is the catabolite control protein A (CcpA) which is found in Gram-positive bacteria involved in repressing carbohydrate utilization genes and in activating genes involved in transporting excess carbon from the cell [53]. In *S. mutans*, inactivation of *ccpA* had important effects on cellular physiology [54]. Firstly, it resulted in about a 60% decrease in the ability to form biofilms on an abiotic surface. Secondly, it could cause disruption of the normal flow of carbohydrate that lead to an imbalance of intra- and extra-cellular pH, or alter the ability of the organisms to respond to environmental stresses, all of which could contribute, directly or indirectly, to the observed impairment in biofilm formation. Thirdly, CcpA also appears to be involved in regulation of the oxidoreduction state and in general stress responses [54]. In *B. subtilis*, CcpA inhibited biofilm formation in the presence of a rapidly metabolized carbon source such as glucose [55]. Under conditions of catabolite repression, CcpA represses a gene that either increases the rate of attachment of cells to a biofilm or decreases the rate of detachment of cells from the biofilm [55]. Thus, the depth of the mature biofilm appears to be regulated to allow for maximal nutrient acquisition [56].

These different pathways lead to the production of energy (ATP and GTP) and cofactors (NADH, NAD, FADH₂ and FAD). Most of up-regulated enzymes in biofilm cells of *S. xylosus* catalyze the reactions with simultaneous oxidation/reduction of NADH/NAD which are essential cofactors participating in a multitude of redox reactions. Thus, several oxidoreductases or dehydrogenases were found over-expressed in biofilm cells of *S. xylosus*. Moreover, NADH and FADH transfer their electrons towards the transport chain in the membrane through NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase and ubiquinone, all over expressed in sessile cells of *S. xylosus*. Then the protons gradient generated is used for the

synthesis of ATP by the F₀F₁ ATP synthetase, over expressed in biofilm. This enzyme was also observed in biofilm cells of *S. pneumoniae* [38].

ATP synthesis was also produced by purine metabolism pathway, in which 4 enzymes were over expressed in biofilm cells of *S. xylosus* (Table 1). One of these enzymes was also involved in pyrimidines synthesis. The purines synthesis increased in biofilm cells of Gram positive bacteria such as *S. aureus* [19] and Gram negative bacteria such as *Shewanella oneidensis* [57]. The pyrimidine pathway was induced as the level of UMP was severely limited in biofilm of *S. aureus* [19] and UDP can be used for polysaccharide or PIA synthesis in *S. aureus* [58].

Two transport systems were up-regulated in biofilm cells of *S. xylosus* (Table 1). The first one is a periplasmic metal binding protein PsaA which functions as initial receptor in ABC transport of Mn²⁺ and as surface adhesin in some eubacterial species (Pfam). Several authors have established that PsaA could be involved in host pathogens interactions and virulence in *S. pneumoniae* and in Gram-positive bacteria [59-62]. The second one is an ATP binding component of ABC transporter regulated named SufC in *S. epidermidis* and *S. aureus* (NCBI, BlastP). SufC is a part of the SUF system, shown in *E. coli* to consist of six proteins and believed to act in Fe-S cluster formation during oxidative stress. SufC belongs to the ATP-binding cassette transporter family but is no longer thought to be part of a transporter [63]. It has been reported that biofilm cells showed increased expression of iron uptake systems under conditions of iron limitation and oxidative stress in *Thermotoga maritime*, *E. coli* K-12 and *Erwinia chrysanthemi* [64-66]. Moreover, iron-restricted conditions induced biofilm formation in *S. aureus* via a Fur-independent mechanism [67].

Finally, one protein over expressed in sessile cells of *S. xylosus* belonged to a phage. Phage-release is a frequent event in biofilms of *S. aureus* [20]. These authors suggested that resulting lysis of cells in a biofilm might promote the persistence and survival of the remaining cells, as they gain a nutrient reservoir from their dead and lysed neighboring cells. The higher expression levels of prophage genes in biofilm cells were apparent in *B. subtilis* as in *Pseudomonas aeruginosa* [55]. Thus, the induction of prophage genes may represent another general phenotype of bacteria in biofilms.

3.2- Physiology of *S. xylosus* cells in planktonic growth.

By comparison to the sessile cells, planktonic cells of *S. xylosus* seemed to use only the glycolysis pathway for the degradation of carbon substrate with over-expression of three enzymes (Table 2, Figure 1). The first enzyme of this pathway, the glucose-6-phosphate

isomerase, was also more abundant under planktonic growth conditions in *S. pneumoniae* [38]. However, this enzyme was over-expressed in biofilm cells of *S. aureus* [21].

Planktonic cells of *S. xylosus* had a high pyruvate metabolism due to over-expression of the pyruvate oxidase (POX) and of the three components (E1, E2, E3) of Pyruvate dehydrogenase complex (PDHC). Thus, pyruvate is transformed in acetyl-phosphate by the POX. This enzyme is involved in acetate metabolism and its transcription, dependent on sigB, is induced in the stationary phase [68]. Thus, POX provides energy and acetyl groups under conditions that overcome between exponential and stationary phases. Although it is expressed maximally during aerobic growth, some expression does occur during anaerobic growth [68]. In *S. pneumoniae*, the POX was found to be most abundant under biofilm growth conditions and contributed to resistance to hydrogen peroxide and to cytotoxic effects on host cells and tissues [38]. Pyruvate can be also converted in acetyl coA by PDHC yielding 1 mol of NADH. This complex does not operate under anaerobiosis that does not favour the rapid reoxidation of NADH to NAD and that represses transcription of genes encoding PDHC [68]. Contrary to *S. xylosus*, pyruvate metabolism was very active in biofilm cells of *S. aureus* and not in planktonic ones [21].

In *S. xylosus* planktonic cells, acetyl coA enters in the fatty acid metabolism in which the fatty oxidation complex composed of two enzymes 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and enoyl-CoA hydratase was upregulated. This complex is involved in the elongation step of fatty acid. Moreover, the inositol monophosphatase involved in glycerol-phospholipids metabolism was up-regulated.

Some proteins involved in cell wall synthesis were over-expressed in planktonic cells of *S. xylosus* (Table 2, Figure 1). The cell shape determining protein, similar to MreC (murein formation C), is involved in the rod shape determination of bacteria (Pfam). In *B. subtilis*, the MreC protein is involved in the control of septal versus long-axis peptidoglycan synthesis [69]. Moreover, this protein is essential for the viability of *B. subtilis* and *E. coli* and its depletion altered the pattern of peptidoglycan synthesis and caused cell lysis [70]. The glutamine synthase, from the glutamate pathway, is involved in the synthesis of glutamine that could be converted to glucosamine-6-phosphate. This last reaction is linked to NAD synthesis by NAD synthetase which was upregulated in planktonic cells of *S. xylosus*. However, glutamine can be directly involved in cross linking of the peptidoglycan before the last step which consists of the pentapeptide incorporation. This result was contradictory with those of Resch *et al.* (2006) who have shown that several enzymes involved in the glutamate pathway were up-regulated in biofilm cells of *S. aureus*.

Two proteins involved in synthesis of purines and pyrimidines were upregulated in planktonic cells of *S. xylosus* (Table 2). Purine metabolism is connected to the riboflavin metabolism producing FAD, in which one protein was up-regulated. Purine metabolism is also connected to the folate biosynthesis (Vitamin B) in which a protein was up-regulated in planktonic cells. Synthesis of purines is necessary for nucleic acids synthesis with two acetyl transferases up-regulated in planktonic cells which could have a role in DNA repair and transcription. Moreover, the putative hydrolase, belonging to the HD (histidines or aspartates conserved residues) superfamily of hydrolases which appear to be involved in the nucleic acid metabolism, was also up-regulated. Two other hydrolases were over expressed in planktonic cells but belonged to the peptidase family M20/M25/M40 involved in proteolysis. One protein involved in branched chain amino acids anabolism as well catabolism, and two proteins involved in protein synthesis were up-regulated in planktonic cells of *S. xylosus*. Moreover, the ATPase involved in chromosome partitioning up-regulated, seemed to be involved in proteins secretion by participation to the SRP-dependent co-translational protein targeting to membrane (Expasy).

Proteins involved in stress were over-expressed in surface fractions of *S. xylosus* planktonic cells. The universal stress protein (Usp) family putative was found in membrane and intracellular fractions of *S. xylosus*. This protein is ordinarily a small cytoplasmic protein which was discovered and named “universal stress protein” in 1992 by Nyström and Neidhardt because its synthesis was induced in response to a large number of stresses in *E. coli*. These authors have shown that the transcriptional induction of the *uspA* gene of *E. coli* occurred whenever conditions cause growth arrest [71] and cells deficient in UspA survive poorly in stationary phase [72]. Thus, UspA enhances the rate of cell survival during prolonged exposure to conditions such as heat shock, nutrient starvation, stress or DNA-damaging agents which arrest cell growth [71-73]. Moreover, Usp proteins were required in the defence against superoxide generating agents in *E. coli* [74].

This defence is usually ensured by the superoxide dismutase (SOD) which was also found in higher amounts at the surface of planktonic cells of *S. xylosus*. This result was already observed in planktonic cells of *S. aureus* after 48 h of growth [21]. This enzyme was highly expressed in stationary phase of *S. xylosus* [75]. Some authors suggest that bacteria with surface-associated SOD would be more resistant to oxidative killing by neutrophils and this may be the case for *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* and *Nocardia asteroides* [76, 77]. These last authors have demonstrated a relationship among the production of a surface-associated and secreted SOD, high levels of catalase, phase of growth, virulence,

and resistance of *N. asteroides* to the microbicidal activities of human polymorphonuclear leukocytes [77]. In *S. aureus*, there was no correlation between cytoplasmic SOD and the virulence, but there was a relationship between catalase and staphylococcal virulence [77-79]. In our study, the catalase was also found in higher amounts at the surface of planktonic cells as observed in *S. aureus* [21]. In *S. xylosus*, the catalase (*katA*) expression was induced upon entry into stationary phase, by oxygen and hydrogen peroxide [80]. Its main function is to protect cells from the toxic effects of hydrogen peroxide.

Proteins involved in virulence of staphylococci were found in cell wall fractions of *S. xylosus*. The protein similar to immuno-dominant antigen A (IsaA) was expressed in higher amounts in planktonic cells as observed in *S. aureus* [21]. Several authors considered that this surface protein is associated with the virulence of *S. aureus* [21, 81, 82]. This antigen as the immuno-dominant antigen B had unclear functions but because of its lytic transglycosylase domain in its C-terminal region, IsaA could be involved in bacterial cell separation through a preferential interaction with peptidoglycan chain [83]. The urease was also overexpressed in planktonic cells of *S. xylosus* contrary to *S. aureus* in which it was found upregulated in 48 h biofilm cells [21]. Urease may be involved in several functions. This enzyme may play a role in the virulence of several bacteria such as *Enterobacteriaceae* and staphylococci [84-86]. It may also play a role in host-pathogen interaction in *Mycobacteria* and *Corynebacteria* because the urease activity was highest in pathogenic species [87]. It may have roles in nitrogen acquisition as shown in *M. tuberculosis* [88] and in ammonium production, necessary to establish pH homeostasis which can be important in biofilm [19, 21]. Thus, ammonium production could neutralize directly acidity of the surrounding environment as shown in *H. pylori* [89].

A transcription pleiotropic repressor was over-expressed in planktonic cells of *S. xylosus*. This repressor named CodY regulator is highly conserved among low G+C Gram positive bacteria. In *B. subtilis*, it regulates several genes involved in the transition from the exponential to the stationary growth phase and in sporulation [37]. This transition is associated with a decrease in the GTP concentration and by binding GTP, CodY evaluates its intracellular concentration which is indicative of nutritional conditions of the environment.

The planktonic cells of *S. xylosus* use different pathways vs. sessile cells to produce energy (ATP and GTP) and cofactors (NADH, NAD, FAD, FADH₂). Cofactors are regenerated by oxidoreductase to maintain the redox potential of cells. Thus, three oxidoreductases were up-regulated in planktonic cells of *S. xylosus* (Table 2).

Acknowledgements

This work was a part of the Ph.D. awarded to Stella Planchon by the French Minister of National Education and Research. We wish to thank Nicole Garrel and Brigitte Duclos for their technical assistance. We are grateful to Farrer Sibille for her assistance with MS/MS analyses.

5- References

1. Kloos, W.E.a.S.K.H., Genus *Staphylococcus*. Rosenbach 1884, 18^{AL}, p. 1013-1035, 1986.
2. Corbiere Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R., *Int J Food Microbiol* 2006, 108, 210-217.
3. Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S. *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, Research Signpost, 2002, pp. 175-191.
4. Esper, R. C., Morales, M. T., Ruiz, S. S., *Rev Med Hosp Gen Mex* 2000, 63, 107-111.
5. Almeida, R. A., Oliver, S. P., *Microb Pathog* 2001, 31, 205-212.
6. Cucarella, C. *et al.*, *Infect Immun* 2004, 72, 2177-2185.
7. Won, Y. S. *et al.*, *Microbiol Immunol* 2002, 46, 629-632.
8. Siqueira, J. F. Jr, Lima, K. C., *Aust Endod J* 2002, 28, 61-63.
9. Orrett, F. A., Shurland, S. M., *Conn Med* 1998, 62, 199-203.
10. Ug, A., Ceylan, O., *Arch Med Res* 2003, 34, 130-136.
11. Planchon, S. *et al.*, *Int J Food Microbiol* 2006.
12. Gross, M., Cramton, S. E., Gotz, F., Peschel, A., *Infection and Immunity* 2001, 69, 3423-3426.
13. Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., Gotz, F., *Molecular Microbiology* 1997, 24, 1013-1024.
14. Foster, T. J., Hook, M., *Trends Microbiol* 1998, 6, 484-488.
15. Hussain, M. *et al.*, *Infection and Immunity* 1997, 65, 519-524.
16. Cucarella, C. *et al.* , *Journal of Bacteriology* 2001, 183, 2888-2896.
17. Cramton, S. E. *et al.*, *Infection and Immunity* 1999, 67, 5427-5433.
- 18.
19. Beenken, K. E. *et al.*, *J Bacteriol* 2004, 186, 4665-84.
20. Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., Gotz, F., *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 2663-76.

21. Resch, A. *et al.*, *Proteomics* 2006, 6, 1867-77.
22. Schaumburg, J. *et al.*, *Proteomics* 2004, 4, 2991-3006.
23. Ge, J., Catt, D. M., Gregory, R. L., *Infect Immun* 2004, 72, 6748-52.
24. Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S., *Infect Immun* 2004, 72, 2416-9.
25. Carneiro, C. R. *et al.*, *Microbes Infect* 2004, 6, 604-8.
26. Davies, D. G., Geesey, G. G., *Appl Environ Microbiol* 1995, 61, 860-7.
27. Lazarevic, V. *et al.* , *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 39-45.
28. Oosthuizen, M. C. *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* 2001, 194 , 47-51.
29. Marino, M. *et al.*, *Microbiology* 2000, 146 (Pt 1), 97-105.
30. Schleifer, K. H., Schumacher-Perdreau, F., Gotz, F., Popp, B., *Arch Microbiol* 1976, 110, 263-70.
31. Andersen, A. B., Andersen, P., Ljungqvist, L., *Infect Immun* 1992, 60, 2317-23.
32. Raynaud, C. *et al.*, *Microbiology* 1998, 144 (Pt 2), 577-87.
33. Duche, O., Tremoulet, F., Glaser, P., Labadie, J., *Appl Environ Microbiol* 2002, 68, 1491-8.
34. Somerville, G. A. *et al.*, *Infect Immun* 2002, 70, 6373-82.
35. Vuong, C. *et al.*, *J Bacteriol* 2005, 187, 2967-73.
36. McGee, D. J. *et al.*, *J Bacteriol* 1999, 181, 7314-22.
37. Helloin, E., Jansch, L., Phan-Thanh, L., *Proteomics* 2003, 3, 2052-64.
38. Allegrucci, M. *et al.*, *J Bacteriol* 2006, 188, 2325-35.
39. Branda, S. S. *et al.* , *J Bacteriol* 2004, 186, 3970-9.
40. Hamon, M. A. *et al.*, *Mol Microbiol* 2004, 52, 847-60.
41. Wen, Z. T., Suntharaligham, P., Cvitkovitch, D. G., Burne, R. A., *Infect Immun* 2005, 73, 219-25.
42. Frees, D., Qazi, S. N., Hill, P. J., Ingmer, H., *Mol Microbiol* 2003, 48, 1565-78.
43. Chatterjee, I. *et al.*, *J Bacteriol* 2005, 187, 4488-96.
44. Lemos, J. A., Burne, R. A., *J Bacteriol* 2002, 184, 6357-66.
45. Frees, D. *et al.*, *Mol Microbiol* 2004, 54, 1445-62.

46. Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K., Vogensen, F. K., *Appl Environ Microbiol* 1997, 63, 1826-37.
47. Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D., Gotz, F., *J Bacteriol* 1999, 181, 2273-8.
48. Rachid, S. *et al.*, *Journal of Bacteriology* 2000, 182, 6824-6826.
49. Gotz, F., *Curr Opin Microbiol* 2004, 7, 477-87.
50. Dufour, A., Haldenwang, W. G., *J Bacteriol* 1994, 176, 1813-20.
51. Bronner, S., Monteil, H., Prevost, G., *FEMS Microbiol Rev* 2004, 28, 183-200.
52. Maira-Litran, T., Allison, D. G., Gilbert, P., *J Appl Microbiol* 2000, 88, 243-7.
53. Egeter, O., Bruckner, R., *Mol Microbiol* 1996, 21, 739-49.
54. Wen, Z. T., Burne, R. A., *Appl Environ Microbiol* 2002, 68, 1196-203.
55. Stanley, N. R., Britton, R. A., Grossman, A. D., Lazazzera, B. A., *J Bacteriol* 2003, 185, 1951-7.
56. Stanley, N. R., Lazazzera, B. A., *Mol Microbiol* 2004, 52, 917-24.
57. De Vriendt, K. *et al.*, *Proteomics* 2005, 5, 1308-16.
58. Gotz, F., *Molecular Microbiology* 2002, 43, 1367-1378.
59. Novak, R., Braun, J. S., Charpentier, E., Tuomanen, E., *Mol Microbiol* 1998, 29, 1285-96.
60. Claverys, J. P., *Res Microbiol* 2001, 152, 231-43.
61. McAllister, L. J. *et al.*, *Mol Microbiol* 2004, 53, 889-901.
62. Johnston, J. W. *et al.*, *Infect Immun* 2004, 72, 5858-67.
63. Rangachari, K. *et al.*, *FEBS Lett* 2002, 514, 225-8.
64. Pysz, M. A. *et al.*, *Appl Environ Microbiol* 2004, 70, 6098-112.
65. Storz, G., Imlay, J. A., *Curr Opin Microbiol* 1999, 2, 188-94.
66. Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D., Barras, F., *EMBO J* 2003, 22, 427-37.
67. Johnson, M., Cockayne, A., Williams, P. H., Morrissey, J. A., *J Bacteriol* 2005, 187, 8211-5.
68. Wolfe, A. J., *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, 69, 12-50.
69. Lee, J. C., Stewart, G. C., *J Bacteriol* 2003, 185, 4490-8.
70. Stewart, G. C., *Mol Microbiol* 2005, 57, 1177-81.

71. Nystrom, T., Neidhardt, F. C., *Mol Microbiol* 1994, 11, 537-44.
72. Freestone, P., Nystrom, T., Trinei, M., Norris, V., *J Mol Biol* 1997, 274, 318-24.
73. Sousa, M. C., McKay, D. B., *Structure* 2001, 9, 1135-41.
74. Nachin, L., Nannmark, U., Nystrom, T., *J Bacteriol* 2005, 187, 6265-72.
75. Barrière, C., Leroy-Sétrin, S., Talon, R., *Journal of Applied Microbiology* 2001, 91, 514-519.
76. Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., *Infect Immun* 1996, 64, 3512-7.
77. Beaman, B. L. *et al.*, *J Biol Chem* 1983, 258, 91-6.
78. Mandell, G. L., *J Clin Invest* 1975, 55, 561-6.
79. Kanafani, H., Martin, S. E., *J Clin Microbiol* 1985, 21, 607-10.
80. Barrière, C., Brückner, R., Centeno, D., Talon, R., *FEMS Microbiology Letters* 2002, 216, 277-283.
81. Lorenz, U. *et al.*, *Adv Exp Med Biol* 2000, 485, 273-8.
82. Cassat, J. E. *et al.*, *J Bacteriol* 2005, 187, 576-92.
83. Sakata, N., Terakubo, S., Mukai, T., *Curr Microbiol* 2005, 50, 47-51.
84. Gatermann, S., John, J., Marre, R., *Infect Immun* 1989, 57, 110-6.
85. Kuroda, M. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102, 13272-7.
86. Males, B. M., Rogers, W. A. Jr, Parisi, J. T., *J Clin Microbiol* 1975, 1, 256-61.
87. Nolden, L. *et al.*, *FEMS Microbiol Lett* 2000, 189, 305-10.
88. Clemens, D. L., Lee, B. Y., Horwitz, M. A., *J Bacteriol* 1995, 177, 5644-52.
89. Phadnis, S. H. *et al.*, *Infect Immun* 1996, 64, 905-12.

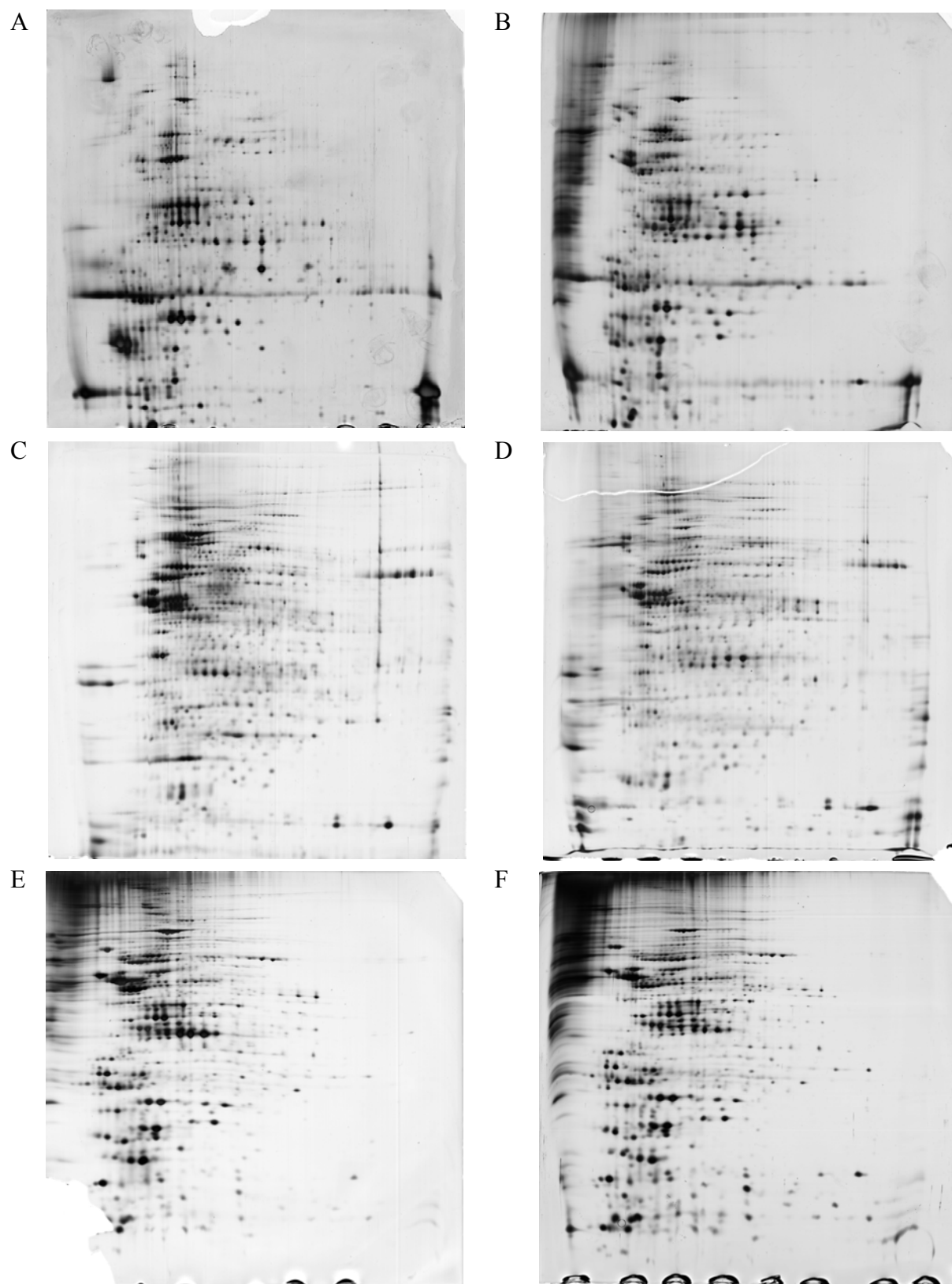


Figure 1: 2-DE of *S. xylosus* C2a proteins after 48 h of growth under planktonic conditions (A, C, E) and biofilm conditions (B, D, F). (A, B) cell wall associated proteins, (C, D) membrane proteins, (E, F) cytoplasmic proteins, in the pH range of 4-7

Table 1: Proteins synthesized in higher amounts in biofilm cells after 48 h of growth in TSB/NaCl medium without shaking and in the different fractions studied: Cell Wall (CW), Membrane (MB) and Intracellular (CI)

Spot id	Protein name	Accession number and Gene	Protein function	pI / PM theoretical	Pep matching and sequence coverage	Cellular fraction
Cell wall/membrane biogenesis genes						
ID 862	Putative NADH-flavin reductase	>SC#1555 similar to SSP1301	Oxidoreduction, electron transport	5.21 23694.1	8/53 - 35%	CW
ID 1118	Similar to	>SC#1014	Unknown	4.51	14/82 - 65%	MB
ID 1120	hypothetical protein	similar to SSP0737		23251.9	10/81 - 36%	
ID 748	Similar to hypothetical protein	>SC#2302 similar to SSP2063	Unknown	7.72 35526.2	4/49 - 19%	CI
Intracellular trafficking and secretion genes						
ID 1208	Type-I signal peptidase B	>SC#2070 similar to SSP1810	Secretion of proteins	5.40 22373.5	11/52 - 51%	MB
Signal transduction mechanisms genes						
ID 717	Anti-anti-sigma regulatory factor rsbV	gi 82751669 similar to SSP0811	Regulation	4.35 12211	5/65 - 69%	CI
Energy production and conversion genes						
ID 338	Dihydrolipoamide dehydrogenase	SC#1960 similar to SSP1693	Synthesis of lipoamide, TCA	4.80 49472.6	10/81 - 27%	CW
ID 425	F0F1 ATP synthase alpha subunit	SC#2556 similar to SP0777	Synthesis of ATP	4.77 54561.5	18/83 - 43%	CW
ID 572	putative NADH dehydrogenase	gi 72495658	Oxidative phosphorylation	5.51	8/73 - 33%	CW
ID 838	FAD-containing subunit	SSP1834		44200	8/64 - 18%	MB
ID 669	Putative dehydrogenase	gi 72494430 SSP0606	Similar to glycerate dehydrogenase	5.12 34952	6/84 - 22%	CW
ID 931		>SC#900 similar to SSP0606		5.14 34981.0	18/76 - 74%	MB
ID 748	L-lactate dehydrogenase	gi 72494825 SSP1001	Formation of lactate	5.02 34502	8/57 - 25%	CW
ID 209	2-oxoglutarate dehydrogenase E1	gi 72495149 SSP1325	TCA	5.34 105413	12/81 - 19%	MB
ID 461	Succinate dehydrogenase	gi 72495471 SSP1647	TCA and oxidative phosphorylation	5.25 65285	24/103- 35%	MB
ID 472	flavoprotein subunit				33/92 - 44%	
ID 834	NADH:flavin oxidoreductase	>SC#2081 similar to SSP1819	Electron transport	5.30 42397.9	30/94 - 43%	MB
ID 757	Isocitrate dehydrogenase	gi 72494896 SSP1072	TCA	4.88 46315	21/108- 67%	MB
ID 768					13/93 - 30%	MB
ID 771					13/57 - 29%	
ID 867	Citrate synthase II	gi 72494895 SSP1071	TCA	5.63 42348	14/74 - 30%	MB
ID 888					9/71 - 23%	MB
ID 887	Isopentenyl diphosphate isomerase	gi 72494380 SSP0556	Terpenoids synthesis	4.99 38574	12/72 - 23%	CI
ID 1020	Putative oxidoreductase	>SC#1506 similar to SSP1252	Oxido-reduction	4.90 34047.3	9/69 - 23%	MB
ID V	Putative oxidoreductase	>SC#2358 similar to SSP2118	Oxido-reduction	4.94 35331.9	8/134 - 36%	MB
ID Vbis					11/75 - 42%	MB
ID Y					20/75 - 74%	
ID Z					20/73 - 68%	
ID 360	Pyruvate	gi 72495520	Pyruvate	4.79	14/97 - 49%	CI

	dehydrogenase E1 component alpha subunit	SSP1696	metabolism	41421		
Lipid transport and metabolism genes						
ID 876	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase	>SC#44 similar to SSP0324	Synthesis of acetyl coA	4.56 43457.8	12/66 - 39%	MB
ID 1051	Trans-2-enoyl-acyl-carrier protein reductase	gi 72495598 SSP1774	Fatty acids biosynthesis	5.44 28094	5/35 - 24%	MB
ID 1170 ID 1171	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase	>SC#1797 similar to SSP1538	Fatty acids biosynthesis	5.32 25917.8	7/37 - 48% 7/69 - 47%	MB
ID 455	Acetyl-CoA carboxylase alpha subunit	>SC#1330 similar to SSP1067	Fatty acids biosynthesis	5.18 35460.3	19/88 - 48%	CI
ID 577	Glucose-1-dehydrogenase	gi 2226002 SSP0656	Glucose uptake, pentose phosphate	4.92 28580	12/67 - 52%	CI
Carbohydrate transport and metabolism genes						
ID 489	Enolase	gi 72495736 SSP1912	Glycolysis	4.55 47046	18/65 - 55%	CW
ID 517 ID 525	Phosphoglycerate kinase	>SC#2177 similar to SSP1915	Glycolysis	4.68 42416.5	9/111 - 37% 8/91 - 30%	CW
ID 708 ID 960 ID 961 ID1342	Fructose biphosphate aldolase class I	gi 72494015 similar to SSP0191	Glycolysis	4.81 33178	10/27 - 30% 10/28 - 32% 14/195 -42% 11/60 - 33%	CW MB
ID 517	Putative phosphomannomutase	SC#2002 similar to SSP1737	Pentose phosphate pathway	4.96 62160.6	24/122 - 50%	MB
ID1153 ID 1154 ID 1155	Putative transaldolase	gi 72494806 SSP0982	Glycolysis	4.51 25532	10/124- 42% 10/78- 41% 11/86- 41%	MB
ID 436 ID 440	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 72495740 SSP1916	Glycolysis	4.89 36180	10/59 - 30% 13/71 - 34%	CI
Inorganic ion transport and metabolism genes						
ID 949 ID 977 ID 980 ID 1008 ID 1338	Putative ABC-type Mn Zn transport system periplasmic Mn Zn-binding protein	gi 72495912 SSP2088	Binding of Mn and Zn	5.41 34908	9/49- 29% 7/41- 25% 10/48- 34% 12/99- 38% 14/80 - 38%	MB
ID 629	Superoxide dismutase	gi 45861289 SSP1203	Oxidative stress	4.88 22521	8/66 - 62%	CI
Coenzyme transport and metabolism genes						
ID 547	Dihydroxy naphthoic acid synthase	gi 72495570 SSP1746	Ubiquinone synthesis	5.38 30371	12/58 - 38%	CI
Nucleotide transport and metabolism genes						
ID 568	Phosphoribosyl aminoimidazole carboxamide formyltransferase;	>SC#1983	Purine metabolism	5.08 53900.3	19/79- 45%	MB

IMP cyclohydrolase						
ID 347	Adenylosuccinate synthase	>SC#493 SSP0017	Purine metabolism	5.19 47086.4	7/58 - 24%	CI
ID 603 ID 606	Adenylate kinase	gi 72494508 SSP0684	Purine metabolism	4.87 24202	13/75- 52% 17/75 - 65%	CI
ID 709	Nucleoside diphosphate kinase	gi 72495101 SSP1277	Purine and Pyrimidine metabolism	5.69 16732	8/39 - 57%	CI
Amino acid transport and metabolism genes						
ID 616 ID 617 ID 355	Alanine dehydrogenase	gi 72494881 SSP1057	Synthesis of alanine	5.02 39878	8/36 - 30% 13/60 - 50% 8/63 - 32%	CW CW CI
ID 726	Arginase	SC#999 similar to SSP0721	Synthesis of arginine	4.88 32866.3	12/72 - 53%	CW
ID 503	Urocanate hydratase	gi 72494396 SSP0572	Histidine metabolism	5.32 60611	11/127 -21%	MB
ID 787	Putative PLP-dependent aminotransferase	>SC#1107 similar to SSP0853	Aspartate and Tyrosine metabolism	4.66 48579.1	13/103 -42%	MB
ID 1018	Choline dehydrogenase	>SC#727 SSP0196	Glycine, Serine and Threonine metabolism	7.10 62354.0	4/36 - 13%	MB
ID 1135	Dihydro-dipicolinate reductase	>SC#1625 SSP1354	Lysine biosynthesis	4.96 26733.4	8/36 - 35%	MB
ID 811	Chorismate synthase	gi 72494850 SSP1278	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	5.53 40586	11/87 - 30%	MB
ID 775 ID 320 ID 322	DAHP synthetase-chorismate mutase	>SC#1292 gi 72494850 SSP1026	Phenylalanine, tyrosine, tryptophan biosynthesis	5.55 40645.5 5.53 40586	5/81 - 22% 7/ 46 - 20% 7/67- 20%	MB CI
ID 269	Putative leucyl aminopeptidase	>SC#2095 SSP1833	Proteolysis	5.23 54171.7	9/57 - 30%	CI
ID 313 ID 331	Serine hydroxymethyl transferase	gi 72494595 SSP0771	Glycine, Serine and Threonine metabolism	5.38 45245	9/55 -20% 12/73 - 25%	CI
ID 350	Putative aminotransferase	>SC#1305 SSP0294	Serine-pyruvate and aspartate aminotransferase	5.29 42833.1	10/48 - 30%	CI
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism genes						
ID 1019	Fumaryl acetoacetate hydrolase family protein	gi 72495630 SSP1806	Phospho-inositide 3-kinase	4.87 33097	6/68 - 21%	MB
Transcription genes						
ID 659	Probable catabolite control protein A	gi 1177685 SSP1027	Regulation	5.09 36235	15/77 - 64%	CW
ID 738	Putative transcriptional regulator	gi 72495856 SSP2032	“HTH Mar” Regulator	5.92 16929	8/70 - 42%	CI
ID 984	putative RNA ligase	gi 72495594 SSP1770	RNA synthesis	5.23 19422	6/36 - 38%	CW
ID 482	30S ribosomal protein S1	>SC#1524 SSP1270	Protein synthesis	4.46 43113.2	15/65 - 47%	CW

ID 502	Elongation factor Tu	gi 72496031 SSP2207	Protein synthesis	4.65 43195	14/111 - 50%	CW
ID 734	Elongation factor Tu	>SC#2481 Similar to SSP2207	Protein synthesis	4.68 43235.0	4/43 - 15%	CI
ID 323	Polyribonucleotide nucleotidyl-transferase	gi 72495315 SSP1491	RNA synthesis	5.03 76624	11/81 - 20%	MB
ID 950	30S ribosomal protein S2	gi 72495336 SSP1512	Protein synthesis	5.52 29729	11/48 - 36%	MB
ID 357	Tyrosyl-tRNA synthetase	gi 72494858 SSP1034	Synthesis of Tyrosyl-tRNA	5.30 47585	7/71 - 20%	CI
ID 765	30S ribosomal protein S6	>SC#327	Protein synthesis	4.94 11926.4	10/44 - 81%	CI
ID 766					8/64 - 80%	
ID 774	Ribosome-binding factor A	>SC#1761 similar to SSP1495	Protein synthesis	5.90 13180.3	4/40 - 28%	CI
Post translational modification						
ID 854	Putative Iron-regulated ABC transporter ATPase component	gi 72495685 SSP1861	Similar to SufC,	4.77 28205	11/67 - 49%	CW
ID 967	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	>SC#2186 Similar to SSP1923	Degradation of misfolded proteins	4.98 21225.3	4/40 - 21%	CW
ID 394	Chaperone protein dnaK	gi 72495001 SSP1177	Chaperonne activity	4.51 66545	21/91 - 39%	MB
ID 617	Putativepeptidyl-prolyl cis-trans isomerase	gi 72495645 SSP1821	Folding of proteins	4.57 21670	5/54 - 23%	CI
ID 739	Co-chaperonin GroES	gi 72494671 SSP0847	Chaperonne activity	4.83 10325	4/53 - 43%	CI
ID 789	Similar to hypothetical protein	>SC#1561 SSP1309	Unknown	4.19 9685.9	5/47	CI
ID 805	Cold shock protein	gi 72496136 SSP2312	Stress	4.47 7202	5/30 - 87%	CI
General function prediction only genes						
ID 813	Putative intracellular protease amidase	>SC#1644 Similar to SSP0918	ATP-independent protease	4.44 23964.7	7/38 - 39%	CW
ID 1058	Putative hydrolase	>SC#1009 SSP0276	Hydrolysis activity	4.98 32446.6	14/67 - 52%	MB
ID 780	Similar to hypothetical protein: "Antibiotic biosynthesis monooxygenase"	>SC#2537 similar to SSP0713	Antibiotic biosynthesis	4.97 12142.6	7/45 - 40%	CI
Function unknown genes						
ID 979	Alkaline shock protein 23	gi 72494528 SSP0704	Stress	4.80 18508	6/56 - 24%	CW
ID 1021	Lin2576 protein	>SC#1891	Phage protein	4.55 49519.0	7/64 - 19%	MB
ID 1029					8/57 - 20%	
ID 652	Similar to hypothetical protein	>SC#875 similar to SSP0579	Unknown	4.93 20853.8	7/60 - 42%	CI
ID 777	Similar to hypothetical protein	>SC#1967 similar to SSP1700	Unknown	5.34 8609.6	4/58 - 69%	CI

Table 2: Proteins synthesized in higher amounts in planktonic cells after 48 h of growth in TSB/NaCl medium with shaking, respectively, and in the different fractions studied: Cell Wall (CW), Membrane (MB) and Intracellular (CI)

Spot id	Protein name	Accession number and Gene	Protein function	pI / PM theoretical	Pep match and Sq coverage	Cellular fraction
Cell wall/membrane biogenesis genes						
ID 827	Putative cell-shape determining protein	gi 73662419 SSP1110	rod shape determination	5.76 30992	5/57-26%	CW
ID 549	Similar to	SC#1014		4.51	13/54 -51%	CI
ID 557	hypothetical protein	similar to SSP0737		23251.9	12/69- 51%	
ID 691	Putative acetyl transferase	SC#2356 similar to SSP0370		5.26 18527.1	12/59-61%	CI
ID 879	Putative acetyl transferase	SC#796 similar to SSP0472		5.37 19721.1	11/59-62%	CI
Signal transduction mechanisms genes						
ID 1238	Universal stress	SC#647	Stress	4.90	11/71-50%	MB
ID 682	protein family	similar to SSP1056		15951.1	7/38-42%	CI
ID 683	putative				4/33-30%	CI
Energy production and conversion genes						
ID 927	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	gi 72495519 SSP1695	Pyruvate oxydation	4.62 35216	12/56-46%	MB
ID 378	Dihydrolipoamide S-	gi 73663003	Pyruvate	4.79	14/40-33%	MB
ID 382	acetyl	SSP1694	oxydation	46559	12/61-30%	
ID 356	transferase E2				14/41-33%	
ID 340	Dihydrolipoamide	gi 72495517	Pyruvate	4.80	11/78-30%	MB
ID 538	dehydrogenase E3	SSP1693	oxydation	49480	9/126-25%	
ID 417	Succinate	gi 72495471		5.25	30/103-37%	MB
ID 420	dehydrogenase flavoprotein subunit	SSP1647		65285	25/95-43%	
ID 435	Putative oxidoreductase	SC#667 similar to SAV0339		5.58 39281	11/85-28%	CI
Lipid transport and metabolism genes						
ID 256	Putative fatty oxidation complex protein	SC#365 similar to SSP2424	Fatty acid metabolism	5.34 84353.4	28/126-47%	
ID 1124	2 deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	SC#126 similar to SSP0413		5.32 28016.8	4/51-27%	MB
ID 1101	Putative short chain	SC#160		4.87	8/111-33%	MB
ID 545	dehydrogenase	similar to SSP0436		29160	12/64-46%	CI
ID 548					6/25-25%	
Carbohydrate transport and metabolism genes						
ID 487	Glucose-6-phosphate isomerase A	gi 73663122 SSP1813	Glycolysis	4.84 49765	15/77 - 42%	CW
ID 1167	Fructose-bisphosphate aldolase class I	SC#723 similar to SSP0191	Glycolysis	33145.6 4.74	6/41 - 23%	CW
ID 498	Enolase	gi 72495736	Glycolysis	4.55	18/47 - 58%	MB
ID 500		SSP1912		47046	19/53 - 56%	
ID 643					16/59 - 52 %	

ID 545	Alpha-D-1,4-glucosidase	gi 474177 malA		4.63 63917	10/82 - 28%	MB
ID 1066	Inositol mono-phosphatase family protein	SC#1949 similar to SSP1682		5.46 30146.5	9/35 - 52%	MB
ID 376	Xylose isomerase	gi 48835 ORF xylA		4.99 50109	6/43 - 23%	CI
Inorganic ion transport and metabolism genes						
ID 925	Superoxide dismutase	gi 45861254 SSP1203	Stress	4.88 22303	5/87 - 39% 6/38 - 35% 11/32 - 76%	CW
ID 338	Catalase	SC#295	Stress	5.16	25/100 - 43%	MB
ID 328	(EC 1.11.1.6)	similar to SSP1432		75488.5	23/106 - 41%	
Coenzyme transport and metabolism genes						
ID 895	Riboflavin specific deaminase	SC#1259 similar to SSP0995	Synthesis of FAD	5.73 38672.2	19/86 - 63%	MB
ID 926	NAD synthetase	SC#1132	Synthesis of NAD	5.51	10/93 - 50%	MB
ID 929		similar to SSP0879		30556.7		
ID 880	Dihydrofolate reductase	gi 72495137 SSP1313	Synthesis of folate	6.14 18318	4/57 - 29%	CI
Nucleotide transport and metabolism genes						
ID 552	Phosphoribosyl aminoimidazole carboxamide formyltransferase, IMP cyclohydrolase	SC#1983	Purines metabolism	5.08	14/82 - 44%	MB
ID 553		similar to SSP1717		53900.3	8/95 - 25%	
Amino acid transport and metabolism genes						
ID 989	Urease beta subunit	gi 410515	Virulence	5.29	8/49 - 63%	CW
ID 1219	Urea amidohydrolase	UreB (SSP0264)		15423	15/226 - 90%	MB
ID 384	Pyruvate oxidase	SC#53 similar to SSP0333	Pyruvate oxydation	5.65 63981.7	9/64 - 23%	MB
ID 689	Glutamine synthase	gi 72495275 SSP1451	Cell wall synthesis	5.11 50843	12/123 - 34%	MB
ID 407	Branched-chain amino acid amino-transferase 4-amino-4-deoxychorismate lyase	SC#2417 similar to SSP2163	Branched chain amino acids metabolism	4.72 40099.2	10/74 - 35%	CI
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism genes						
ID 502	Fumarylaceto-acetate hydrolase family protein	gi 72495630 SSP1806	???	4.87 33097	6/95 - 22%	CI
ID 506						
Transcription genes						
ID 1119	Transcription pleiotropic repressor	gi 72495337 SSP1513	Regulation	5.44 28525	12/28 - 52%	MB
ID 691	Putative acetyl transferase	SC#2356 similar to SSP0370		5.26 18527.1	12/59-61%	CI
ID 879	Putative acetyl transferase	SC#796 similar to SSP0472		5.37 19721.1	11/59-62%	CI
Translation genes						
ID 298	Translation initiation factor IF-2	gi 72495323 SSP1499	Initiation of proteins	5.01 77423	13/122 - 29%	MB
ID 299					12/122 - 22%	

			synthesis			
ID 1146	30S ribosomal protein S4	SC#1309 similar to SSP1044	Proteins synthesis	9.69 23132.4	13/128 - 57%	MB
Post translational modification						
ID 303	Ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain	gi 72495810 SSP0145	Purine and pyrimidine metabolism	5.22 80050	19/118 - 28%	MB
Cell cycle control, mitosis and meiosis genes						
ID 406	Putative ATPase, chromosome partitioning	gi 72494544 SSP0720		4.71 38468	8/71 - 23%	CI
General function prediction only genes						
ID 457	Putative hydrolase	gi 72495303 SSP1479		5.20 58270	14/100 - 32%	MB
ID 460					12/90 - 24%	
845	Putative aminoacid amidohydrolase	SC#871 similar to SSP0575		4.83 42077.4	11/103 - 45%	MB
764	Lmo2817 protein similar to « metal-dependent amidase »	SC#410 similar to SSP0316		4.99 43697.5	8/116 - 31%	MB
ID 524	Aldo keto reductase family protein	SC#1246 similar to SSP0978		4.61 31413.5	7/38 - 29%	CI
Not in COGs genes						
ID 800	Similar to immunodominant antigen	SC#9 similar to SSP0293	Probable function in virulence	5.94 25378.6	9/61 - 34%	CW
ID 808					6/19 - 20%	
ID 1207	Putative lipoprotein	SC#297 similar to SSP0535		6.85 23480.7	12/233 - 53%	MB



DISCUSSION

Les staphylocoques sont largement répandus dans la nature et sont communément trouvés sur la peau des hommes et des animaux dont ils constituent une part des écosystèmes microbiens (Kloos, 1986 ; Nagase *et al.*, 2002). Leur présence et leur persistance dans ces niches écologiques pourraient être dues à leur capacité à coloniser des surfaces et à former des biofilms (Costerton & Lewandowski, 1995 ; Donlan, 2002 ; Midelet & Carpentier, 2002). Parmi les 36 espèces de staphylocoques identifiées à ce jour, 16 sont décrites comme capables de former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (Pfaller *et al.*, 1988 ; Ammendolia *et al.*, 1999 ; Cramton *et al.*, 1999 ; Norwood & Gilmour, 2001 ; Moretro *et al.*, 2003). Le potentiel pathogène de certaines espèces de staphylocoques est directement lié à leur capacité à former des biofilms. En particulier, les deux espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* colonisent les surfaces de matériaux médicaux et sont à l'origine d'infections nosocomiales. En ce qui concerne l'espèce *S. xylosus*, certaines souches sont impliquées dans des dermatites et des mammites qui ont pour point de départ une colonisation de la peau (Almeida & Oliver, 2001 ; Won *et al.*, 2002 ; Cucarella *et al.*, 2004). Cependant, en industrie agroalimentaire, d'autres souches non pathogènes de *S. xylosus* sont utilisées comme ferments bactériens et/ou sont isolées de surfaces d'environnements alimentaires (Kloos, 1986 ; Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2006). Nous avons montré que des souches de *S. xylosus* isolées de peau humaine et de produits carnés formaient des biofilms (Planchon *et al.*, 2006b). Un résultat similaire avait été précédemment mentionné pour une souche de *S. xylosus* provenant d'environnement alimentaire (Norwood & Gilmour, 2000 ; Norwood & Gilmour, 2001). Comme *S. xylosus*, *S. carnosus* est utilisé comme ferment mais a été précédemment décrit comme "biofilm négatif" sur la base d'une souche étudiée (Heilmann *et al.*, 1997 ; Cramton *et al.*, 1999 ; Gross *et al.*, 2001 ; Gotz, 2002). Nous avons montré en nous basant sur l'étude de 13 souches d'origine carnée qu'elles adhéraient à des surfaces hydrophiles mais qu'elles étaient toutes incapables de former un biofilm tridimensionnel (Planchon *et al.*, 2006a). De nombreuses espèces de staphylocoques à coagulase négative isolées d'environnements alimentaires sont capables de former des biofilms mais leur potentiel à causer des infections cliniques est inconnu (Moretro *et al.*, 2003). On peut supposer que des souches isolées d'environnement alimentaire et des souches isolées de milieu médical ne posséderont pas les mêmes facteurs génétiques. Concernant *S. xylosus*, des souches isolées d'environnements alimentaires, de la peau (C2a), de dermatites et de mammites seront comparées afin de caractériser cette diversité (Thèse E. Dordet-Frisoni).

La formation de biofilm est un processus complexe régulé par de nombreux facteurs. L'adhésion est conditionnée, entre autre, par les propriétés de la surface bactérienne et par

celle du support ; elle dépend aussi des conditions environnementales (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996 ; Briandet, 1999 ; Arciola *et al.*, 2001). Nous avons montré que les souches de *S. carnosus* et *S. xylosus* ont une charge de surface négative comme cela a été observé pour d'autres souches de staphylocoques ainsi que pour la plupart des bactéries (Sonohara *et al.*, 1995 ; Briandet *et al.*, 1999b ; Gross *et al.*, 2001 ; Chavant *et al.*, 2002 ; Cerca *et al.*, 2005). Cependant, *S. carnosus* possède une charge de surface plus négative que *S. xylosus* et atteint son point isoélectrique (pI) tandis que certaines souches de *S. xylosus* ne l'atteignent pas dans la gamme de pH 2-8 (Planchon *et al.*, 2006a ; Planchon S. *et al.*, 2006b). L'absence de pI a déjà été observée pour des souches de staphylocoques isolées d'industries alimentaires ainsi que pour des souches encapsulées ou non (Briandet, 1999 ; Giovannacci *et al.*, 2000). Cette différence dans les caractéristiques des souches peut être reliée à la nature des groupements chimiques présents à leur surface et par conséquent à la composition de leur paroi (Briandet, 1999). En effet, la charge de surface est principalement due aux acides teichoïques qui sont des polymères anioniques. Ces polymères peuvent être substitués par des groupements d'alanine et de sucres, ce qui diminue la charge négative de surface et ainsi conditionne l'adhésion bactérienne à des supports polaires (Briandet, 1999 ; Gross *et al.*, 2001).

Nous avons noté que, contrairement aux souches de *S. carnosus* qui forment un groupe homogène tant sur le plan génétique qu'au niveau de leurs propriétés de surface (Planchon S. *et al.*, 2006a), les souches de *S. xylosus* présentent une grande diversité d'un point de vue génétique (Morot-Bizot *et al.*, 2003), mais aussi en ce qui concerne leurs propriétés de surface et leur capacité à former des biofilms (Planchon *et al.*, 2006b). Les souches de *S. epidermidis* et de *S. aureus* montrent également une grande diversité tant sur le plan génétique (de Mattos *et al.*, 2003 ; Rabello *et al.*, 2005), que de leurs propriétés de surface (Birgersson *et al.*, 1992 ; Reifsteck *et al.*, 1987 ; van der Mei *et al.*, 1997 ; Krepsky *et al.*, 2003) et de leur capacité à former des biofilms (Mack *et al.*, 1992 ; Moretro *et al.*, 2003). Concernant les propriétés de surface des souches de *S. xylosus* que nous avons étudiées, certaines adhèrent fortement à des supports hydrophiles tandis que d'autres adhèrent préférentiellement au support hydrophobe (Planchon *et al.*, 2006b). Cette diversité a déjà été mentionnée chez *S. xylosus*, avec des souches de laboratoire hydrophobes contrairement à des souches isolées de mammites bovines qui étaient plutôt hydrophiles (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Birgersson *et al.*, 1992).

Les propriétés de surface de la bactérie peuvent être influencées par la présence d'exopolysaccharides (Briandet, 1999). La présence d'une capsule polysaccharidique est reliée à l'hydrophobicité de surface tandis que la présence d'une substance mucoïde est

corrélée à l'hydrophilie de surface chez les staphylocoques (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Birgersson *et al.*, 1992 ; van der Mei *et al.*, 1997).

Les polysaccharides peuvent être chargés ou neutres influençant ainsi l'adhésion des cellules au support ainsi que l'agrégation intercellulaire (Sutherland, 2001a ; Sutherland, 2001b). Leur charge électrique peut varier suite à la modification du milieu due à la consommation des nutriments, aux rejets cellulaires et à la capture d'ions par la matrice de polysaccharides (Briandet *et al.*, 1999a ; Peschel *et al.*, 2000). Dans notre étude, *S. xylosus* C2a forme des biofilms denses accompagnés de la présence d'une matrice amorphe composée de polysaccharides (Planchon *et al.*, 2006b). De plus, la synthèse de polysaccharides augmente pendant sa croissance en biofilm comme cela a été montré chez *S. sciuri* (Leriche & Carpentier, 2000 ; Leriche *et al.*, 2000). La synthèse de polysaccharides (PIA) chez *S. epidermidis* et *S. aureus* est liée à l'expression du locus *ica*. Or, nous n'avons pas détecté le gène *icaA* codant l'enzyme responsable de la synthèse du polysaccharide dans les souches de *S. xylosus* (Planchon *et al.*, 2006b). Ce résultat est en accord avec celui de Cramton *et al.* (1999) qui n'avait pas détecté ce gène dans une souche de *S. xylosus*. Le locus *ica* est pourtant assez conservé dans le genre *Staphylococcus* et décrit comme ayant une fonction générale pour leur survie dans divers environnements (Cramton *et al.*, 1999). Un homologue d'*icaA* a été trouvé dans 17 espèces de staphylocoques (Cramton *et al.*, 1999 ; Moretro *et al.*, 2003). Ces derniers auteurs ont classé les gènes *icaA* des différentes souches en six catégories de A à F en fonction de la similarité entre les séquences. Ces résultats révèlent une variabilité dans la séquence du gène *icaA* au sein du genre *Staphylococcus*. Chez les souches de *S. xylosus* que nous avons étudiées, le gène *icaA* est soit trop éloigné pour être détecté, compte tenu de la distance phylogénétique existant entre les diverses espèces de staphylocoques, soit absent. *S. xylosus* pourrait aussi synthétiser des polysaccharides via d'autres mécanismes.

Chez *S. epidermidis*, un polymère, composé d'une partie polysaccharidique, assimilé à des acides teichoïques extracellulaires, représente un composant essentiel dans les biofilms (Sadovskaya *et al.*, 2004 ; Sadovskaya *et al.*, 2005 ; Vinogradov *et al.*, 2006). Ces acides teichoïques extracellulaires ont une structure chimique identique aux acides teichoïques de la paroi, ce sont des polymères de glycérol phosphate substitués par divers résidus dont de la N-acétyl glucosamine (Kogan *et al.*, 2006). Sadovskaya *et al.* (2005) ont montré que les conditions environnementales, telles que le milieu de croissance et les conditions de croissance statiques ou dynamiques, favorisaient la production du PIA ou celle des acides teichoïques extracellulaires. D'autres gènes sont impliqués dans la synthèse de polysaccharides. Chez *S. aureus*, la synthèse d'une capsule de nature polysaccharidique est

codée par les gènes *cap1* à *cap8* (O'Riordan & Lee, 2004). Ces gènes présentent une certaine identité avec les gènes *eps* requis pour la synthèse des exopolysaccharides (EPS) dans les genres *Streptococcus* (Skurnik *et al.*, 1995 ; Stingle *et al.*, 1996) et *Lactococcus* (van Kranenburg *et al.*, 1999 ; Welman & Maddox, 2003). Cependant, le rôle de ces gènes dans la formation de biofilm n'est pas établi.

Néanmoins, les polysaccharides peuvent aussi être source de détachement cellulaire dans le biofilm. Dans des biofilms mixtes de *S. sciuri* et *L. monocytogenes*, la synthèse de polysaccharides par *S. sciuri* induisait son détachement ainsi que celui de *L. monocytogenes* (Leriche & Carpentier, 2000). Dans notre étude, nous avons constaté des détachements lors de la croissance de *S. xylosus* C2a en biofilm dans un milieu riche où la synthèse de polysaccharides était importante (Planchon *et al.*, 2006b). Les polysaccharides extracellulaires peuvent constituer des biosurfactants réduisant l'adhésion des cellules environnantes (Leriche & Carpentier, 2000 ; Mireles *et al.*, 2001). Le détachement cellulaire peut être dû aux polysaccharides qui permettent la formation d'agrégats cellulaires volumineux (Chavant *et al.*, 2002) et/ou à la synthèse d'une exopolysaccharide lyase (Allison *et al.*, 1998). Il peut aussi être dû à la mort cellulaire, à une carence nutritionnelle au sein du biofilm (Allison *et al.*, 1998) et/ou à un processus normal invasif dans lequel les cellules détachées sont à l'origine de la colonisation d'autres surfaces (Stoodley *et al.*, 2001).

Pour certains staphylocoques, les polysaccharides ne sont pas indispensables à la formation de biofilm (Fitzpatrick *et al.*, 2005 ; Toledo-Arana *et al.*, 2005 ; Kogan *et al.*, 2006). Les protéines de surface des bactéries jouent aussi un rôle important dans l'attachement à des cellules de l'hôte ou à des surfaces. Parmi les protéines de surface, l'autolysine est conservée chez les staphylocoques et présente chez 10 espèces (Oshida *et al.*, 1995 ; Heilmann *et al.*, 1997 ; Hell *et al.*, 1998 ; Allignet *et al.*, 2001 ; Moretro *et al.*, 2003). Nous avons montré que le gène *atlE*, codant l'autolysine chez *S. epidermidis*, hybride avec le gène *asx* dans toutes les souches de *S. xylosus* étudiées (résultats non publiés). Le gène *asx* code une autolysine bi-fonctionnelle de 170 kDa (Hell W. unpublished) comme les autolysines décrites chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. caprae* et *S. saprophyticus* qui sont responsables de l'adhésion aux surfaces hydrophobes et aux composés de la matrice extracellulaire de l'hôte (Oshida *et al.*, 1995 ; Heilmann *et al.*, 1997 ; Hell *et al.*, 1998 ; Allignet *et al.*, 2001). Par analogie de structure avec ces autolysines, *Asx* pourrait aussi posséder des propriétés adhésives qui seraient en partie responsable de l'adhésion aux surfaces hydrophobes chez certaines souches de *S. xylosus*. La protéine *Bap*, initialement trouvée dans des souches de *S. aureus* isolées de mammites bovines (Cucarella *et al.*, 2001),

est aussi présente dans différentes espèces de staphylocoques à coagulase négative et notamment dans des souches de *S. xylosus* isolées de mammites bovines (Cucarella *et al.*, 2004) ainsi que dans des isolats de *S. epidermidis* d'origine humaine (Tormo *et al.*, 2005). Nous avons aussi mis en évidence le gène *bap* dans des souches de *S. xylosus* isolées de peau humaine et de produits carnés (Planchon *et al.*, 2006b). De façon plus générale, la protéine Bap est retrouvée au sein des bactéries à Gram positif (Lasa & Penades, 2006).

D'autres protéines de surface peuvent être impliquées dans la formation de biofilm. Ainsi, il est nécessaire d'avoir une approche globale pour étudier l'expression des protéines de surface chez *S. xylosus*. Cette approche globale peut être réalisée par des analyses transcriptomiques et/ou protéomiques. L'analyse transcriptomique permet de révéler l'expression des gènes à un moment précis de la croissance cellulaire. Cependant, la quantité d'ARNm n'est pas nécessairement corrélée avec l'expression protéique. Par contre, l'analyse protéomique permet une étude qualitative et quantitative des protéines contenues dans les cellules à un moment précis de la croissance cellulaire. Ainsi, ces deux approches peuvent être combinées pour fournir des informations complémentaires au niveau de la régulation de l'expression de gènes et de la physiologie cellulaire. L'approche transcriptomique n'a pas été choisie dans notre étude car le génome de *S. xylosus* n'était pas disponible au démarrage de ce travail. Nous avons opté pour une approche protéomique dans le but de travailler par homologie de séquences avec les différents génomes de staphylocoques publiés dont ceux de *S. saprophyticus* (Kuroda *et al.*, 2005) et *S. haemolyticus* (Takeuchi *et al.*, 2005) qui se sont révélés être les espèces les plus proches de *S. xylosus*.

Etant donné la sous-représentation des protéines de surface dans des extraits de protéines totales, nous avons choisi d'effectuer des fractionnements cellulaires. Ceci a été réalisé dans le but de focaliser notre étude sur certains compartiments cellulaires, de réduire la complexité des profils protéiques et d'augmenter la résolution des protéines ciblées. L'étude des protéines de surface chez les bactéries à Gram-positif représentait un défi en raison des difficultés d'extraction, de solubilisation et d'analyse. Leur étude était peu abordée lorsque nous avons commencé ce travail sur *S. xylosus*. Dans des publications récentes, soit les protéines pariétales, soit les protéines membranaires sont étudiées (Vytvytska *et al.*, 2002 ; Scherl *et al.*, 2005) ou alors les deux fractions ne sont pas séparées (Nandakumar *et al.*, 2005 ; Gatlin *et al.*, 2006 ; Resch *et al.*, 2006). Les premières études, décrivant l'extraction de protéines pariétales chez *S. aureus* après traitement à la lysostaphine (Vytvytska *et al.*, 2002) et chez *B. subtilis* après un traitement au LiCl (Antelmann *et al.*, 2002), nous ont fourni des bases pour élaborer un protocole pour la souche *S. xylosus* C2a. Pour l'extraction des

protéines membranaires, nous avons testé trois méthodes de délipidation décrites dans la littérature (Gerke *et al.*, 1998 ; Mastro & Hall, 1999 ; Deshusses *et al.*, 2003). Seule la méthode basée sur l'emploi d'un mélange méthanol, acétone et tributyl phosphate utilisée habituellement pour des cellules eucaryotes et jamais décrite pour des cellules procaryotes, s'est révélée reproductible. Puis, différents tampons de solubilisation ont été testés dont l'ASB14 que nous avons choisi pour solubiliser les protéines membranaires et pariétales de *S. xylosus* C2a. Ces protéines ont ensuite été analysées en électrophorèse bidimensionnelle et identifiées par spectrométrie de masse. Dans les fractions pariétales et membranaires de *S. xylosus*, 101 protéines ont été identifiées dont 34 dans la fraction pariétale et 67 dans la fraction membranaire (Planchon S. *et al.*, 2006c).

La moitié des protéines identifiées (51/101) sont prédites comme des protéines de surface dont 19 appartiennent à la fraction pariétale et 32 à la fraction membranaire. Parmi ces 51 protéines de surface, 41 possèdent soit un peptide signal, soit un domaine transmembranaire, soit les deux. Une seule protéine ayant un motif LPXTG a été identifiée dans la fraction pariétale de *S. xylosus* (Planchon S. *et al.*, 2006c). Chez différentes espèces de staphylocoques, plusieurs protéines de paroi avec un motif LPXTG ont été mises en évidence (Foster & Hook, 1998 ; Mazmanian *et al.*, 2001 ; McCrea *et al.*, 2000). Ceci laisse supposer que *S. xylosus* doit en contenir d'avantage mais nous ne les avons pas détectées. Récemment, Gatlin *et al.* (2006) ont trouvé 14 protéines avec un motif LPXTG chez *S. aureus* après traitement à la lysostaphine dont 12 ont été identifiées par la technique classique de 2D. De plus, ces auteurs ont utilisé une séparation bidimensionnelle liquide avec une colonne échangeuse de cation suivie d'une colonne phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (2D nano LC-MS/MS). Cette méthode a permis d'identifier 2 protéines supplémentaires avec un motif LPXTG (Gatlin *et al.*, 2006). D'autres auteurs ont extrait les protéines de paroi chez *L. monocytogenes* par chauffage en présence de SDS (Calvo *et al.*, 2005). Ces auteurs ont aussi utilisé la technique de 2D nano LC-MS/MS et ont ainsi isolé 30 protéines de paroi dont 20 portent un motif LPXTG.

Chez *S. xylosus* C2a, la majorité des protéines de surface identifiées ont un seul domaine transmembranaire. Selon différents auteurs, l'électrophorèse bidimensionnelle semble surtout appropriée à l'analyse des protéines de surface ne contenant qu'un domaine transmembranaire (Hecker *et al.*, 2003 ; Nandakumar *et al.*, 2005). Ainsi, d'autres techniques d'étude de ces protéines ont été développées récemment. L'une utilise l'électrophorèse monodimensionnelle suivie d'une analyse en spectrométrie de masse à trappe ionique (ESI-MS/MS). Cette technique a permis l'identification de protéines intrinsèques de membrane

chez *Halobacterium salinarum* (Klein *et al.*, 2005). Une autre technique consiste à remplacer l'isoélectrofocalisation par la chromatographie suivie d'une électrophorèse en SDS PAGE (Bunai *et al.*, 2004 ; Schluesener *et al.*, 2005). La chromatographie permet de séparer et d'analyser les différentes fractions. De plus, certains auteurs mentionnent que les protéines intrinsèques de membrane s'adsorbent dans la matrice de l'IPG strip et/ou qu'elles ne sont pas transférées en 2D (Klein *et al.*, 2005). Enfin, la technique de 2D nano LC-MS/MS utilisée tout récemment chez *S. aureus*, a permis d'identifier 5 protéines de surface supplémentaires par rapport à la 2D classique (Gatlin *et al.*, 2006).

La fraction membranaire de *S. xylosus* contient des protéines ribosomales qui interagissent avec la membrane (Planchon S. *et al.*, 2006c). Une proportion importante de protéines ribosomales a aussi été identifiée dans l'étude des protéines de surface chez *S. aureus* (Scherl *et al.*, 2005). Ces protéines sont parmi les constituants cellulaires les plus abondants chez *B. subtilis* et *S. aureus* (Bae *et al.*, 2003 ; Scherl *et al.*, 2005). Elles constituent jusqu'à 20% du protéome chez *S. aureus* (Scherl *et al.*, 2005). Ces protéines contaminent fortement les extraits membranaires et empêchent la détection de protéines peu abondantes. Klein *et al.* (2005) ont contourné le problème en séparant les protéines membranaires de ces larges complexes par centrifugation en gradient de saccharose. Ils ont testé au préalable une extraction alcaline fréquemment utilisée pour éliminer les contaminants liés de façon non spécifique aux membranes mais cette extraction a conduit à la perte de protéines membranaires chez *Halobacterium* (Klein *et al.*, 2005).

Les fractions pariétales et membranaires de *S. xylosus* contiennent aussi une proportion importante (42/101) de protéines cytoplasmiques dont 16 ont déjà été trouvées en surface chez d'autres bactéries par différents auteurs. La fraction membranaire est plus contaminée par les protéines cytoplasmiques que la fraction pariétale (27/42). Cette observation a également été faite chez *S. aureus* (Hecker *et al.*, 2003 ; Nandakumar *et al.*, 2005). Cette contamination a lieu lors de l'ultracentrifugation qui est la méthode standard pour collecter les protéines de membrane. Cependant, dans la littérature, la plupart des études sur les protéines de surface révèlent aussi une forte proportion de protéines sans peptide signal de sécrétion détectable, ni motif d'ancrage dont la majorité est active dans le cytoplasme (Antelmann *et al.*, 2002 ; Schaumburg *et al.*, 2004 ; Gatlin *et al.*, 2006). Schaumburg *et al.* (2004) suggèrent que ces protéines appelées "moonlighting proteins" ont une fonction additionnelle en surface. De plus, les protéines cytoplasmiques sont relarguées par la plupart des organismes eucaryotes et procaryotes et notamment pendant la phase stationnaire (Schaumburg *et al.*, 2004).

L'approche protéomique que nous avons développée a été appliquée pour comparer la physiologie de *S. xylosus* en modes sessile et planctonique (Planchon S. *et al.*, 2006d). La comparaison des profils protéiques des cellules planctoniques et sessiles des trois fractions cellulaires, pariétale, membranaire et intracellulaire, a révélée une physiologie différente dans les deux modes de culture.

Tout d'abord, au niveau du métabolisme carboné, les cellules planctoniques de *S. xylosus* C2a utilisent la voie de la glycolyse pour dégrader les sucres contrairement aux cellules sessiles qui utilisent d'abord la voie des pentoses phosphate suivie de la glycolyse par l'intermédiaire du fructose-6-phosphate. Chez *S. xylosus*, deux systèmes de transport des sucres sont décrits, le système PTS pour « PhosphoTransférase System » et le système GlcU « Glucose uptake ». Avec le système PTS, le glucose est importé dans la cellule et est phosphorylé en même temps (Jankovic & Bruckner, 2002). Avec le système GlcU, le glucose entre sous sa forme non phosphorylé puis il est phosphorylé dans la cellule (Fiegler *et al.*, 1999). Le système GlcU est couplé avec la glucose-1-déshydrogénase (gdh) qui est surexprimée dans les cellules sessiles de *S. xylosus* C2a (Planchon S. *et al.*, 2006d). Les cellules sessiles de *S. xylosus* C2a internalisent le glucose par le système GlcU puis il est métabolisé par la gdh en gluconate fournissant une voie alternative pour obtenir de l'énergie. La présence de glucose active le répresseur catabolique CcpA qui est surexprimé en biofilm. Ce répresseur est activé via la phosphorylation de la protéine HPr du système PTS et via le système GlcU (Egeter & Bruckner, 1996 ; Jankovic *et al.*, 2001 ; Stanley & Lazazzera, 2004). CcpA est impliqué dans la répression des gènes utilisant les sources de carbone secondaires (Seidl *et al.*, 2006). Cependant CcpA pourrait être impliquée dans la formation de biofilm de *S. xylosus* car chez *Streptococcus mutans*, son inactivation résulte dans une diminution de 60% dans la capacité à former des biofilms sur une surface abiotique après 24 h (Wen & Burne, 2002).

La voie de la glycolyse conduit à la formation de pyruvate qui peut être utilisé pour différentes réactions. Dans les cellules planctoniques de *S. xylosus* C2a, le pyruvate est transformé en acétyl-phosphate par la pyruvate oxydase qui est impliquée dans le métabolisme de l'acétate. Cette enzyme est généralement induite pendant la phase stationnaire de croissance (Wolfe, 2005). Le pyruvate est aussi transformé en acétyl CoA par la pyruvate déshydrogénase qui fonctionne uniquement en aérobiose. Tandis que dans les cellules sessiles de *S. xylosus* C2a, le pyruvate est dégradé par la lactate déshydrogénase en acide lactique, réaction qui se déroule en anaérobiose. Le pyruvate peut être aussi dégradé par l'alanine déshydrogénase en alanine et fournit ainsi un lien entre la voie de la glycolyse et le

métabolisme des acides aminés comme décrit chez *Mycobacterium smegmatis* (Feng *et al.*, 2002). Ces auteurs suggèrent que l'alanine déshydrogénase joue un rôle important dans la croissance anaérobie. Ces deux enzymes peuvent aussi jouer un rôle dans la synthèse du peptidoglycane puisque l'alanine et le lactate sont deux composants de la paroi des staphylocoques (Schleifer *et al.*, 1976). Par contre, dans les cellules planctoniques de *S. xylosus* C2a, d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi sont surexprimées telles que la protéine impliquée dans la forme "coccoïde", la glutamine et la NAD synthase.

Dans les cellules planctoniques de *S. xylosus* C2a, l'acétyl CoA, généré à partir du pyruvate, entre dans le métabolisme des acides gras. Tandis que dans les cellules sessiles, l'acétyl CoA semble provenir de la dégradation des acides aminés à chaînes latérales ramifiées. Mais il entre aussi dans la voie de synthèse des acides gras, différente de celle induite dans les cellules planctoniques. Dans les cellules sessiles, l'acétyl CoA peut aussi être utilisé dans le cycle du citrate ou cycle de Krebs (TCA). Le TCA est contrôlé par le stade physiologique de croissance et par divers paramètres environnementaux. Ainsi, il est fortement activé en phase stationnaire mais il est réprimé par des conditions de croissance limitées en oxygène et en nutriments (Vuong *et al.*, 2005). Le TCA est essentiel pour le catabolisme des sources de carbone secondaires par la cellule bactérienne (Vuong *et al.*, 2005). De même, Resch *et al.* (2006) ont montré que le TCA était actif dans les cellules sessiles de *S. aureus*. Ce résultat suggère aussi que les cellules sessiles de *S. xylosus* ne sont pas en carence nutritionnelle ni en conditions limitantes en oxygène.

Le métabolisme des acides aminés semble plus intense dans les cellules sessiles que dans les cellules planctoniques de *S. xylosus* C2a. On note surtout la présence de protéines impliquées dans la synthèse d'acides aminés aromatiques dans les cellules sessiles de *S. xylosus* comme cela a été observé chez *S. aureus* (Resch *et al.*, 2006). Dans les cellules sessiles de *S. xylosus*, l'arginase, est surexprimée. Cette enzyme, synthétisée en aérobiose, appartient au cycle de l'urée qui permet de générer de l'énergie supplémentaire pour la cellule bactérienne. On peut supposer que les autres enzymes du cycle de l'urée sont présentes chez *S. xylosus*. Dans les cellules sessiles de *S. aureus*, une autre enzyme dégrade l'arginine, l'arginine deiminase qui fait partie de la voie ADI qui fonctionne en anaérobiose (Beenken *et al.*, 2004 ; Resch *et al.*, 2006 ; Resch *et al.*, 2005). Le cycle de l'urée est responsable de la production d'ammonium qui est nécessaire au maintien du pH quand les cellules se développent en biofilm afin de neutraliser les acides générés à partir de la fermentation (Beenken *et al.*, 2004 ; Resch *et al.*, 2005).

Le métabolisme des protéines semble aussi plus intense dans les cellules sessiles que dans les cellules planctoniques de *S. xylosum* C2a. En effet, une seule protéine ribosomale ainsi que le facteur d'initiation de la traduction sont surexprimés dans les cellules planctoniques contrairement aux cellules sessiles qui surexpriment de nombreuses protéines ribosomales ainsi que le facteur d'élongation (Planchon S. *et al.*, 2006d). De plus, les cellules sessiles surexpriment des enzymes impliquées dans la sécrétion, le repliement et la dégradation des protéines qui peuvent être importantes dans la formation de biofilm de *S. xylosum*. Comme observé chez *S. xylosum* C2a, la signal peptidase était surexprimée dans *B. subtilis* en biofilm (Branda *et al.*, 2004 ; Hamon *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans la maturation d'une adhésine intercellulaire ou d'une structure de mobilité. Dans les cellules sessiles de *S. xylosum* C2a, d'autres protéines, récemment décrites comme ayant des potentialités de liaison, ont été mises en évidence (Planchon S. *et al.*, 2006d). Il s'agit l'énolase, la GAPDH et le facteur d'élongation Tu qui peuvent lier le plasminogène comme décrit chez *L. monocytogenes*, *S. mutans* et *S. pneumoniae* (Bergmann *et al.*, 2004 ; Ge *et al.*, 2004 ; Schaumburg *et al.*, 2004). De plus, chez *S. mutans*, l'énolase peut aussi se lier à la mucine trouvée dans la salive et chez *S. aureus*, elle peut lier la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte suggérant un rôle de l'énolase dans la colonisation de ces bactéries (Carneiro *et al.*, 2004 ; Ge *et al.*, 2004). Dans notre précédente étude (Planchon S. *et al.*, 2006c), l'élastine et la fibronectine, appartenant aux MSCRAMMs, ont été identifiées dans les protéines de surface de *S. xylosum* C2a mais elles ne sont pas surexprimées dans les biofilms de 48 h.

Dans les cellules planctoniques comme dans les cellules sessiles de *S. xylosum* C2a, une réponse au stress est induite. Dans les cellules planctoniques, la protéine Usp est impliquée dans la survie en phase stationnaire tandis que la superoxyde dismutase et la catalase contribuent à la résistance au stress oxydatif. Dans les cellules sessiles, la protéase ClpP assistée par les chaperonnes DnaK et GroES sont aussi induites en conditions de stress comme observé chez d'autres bactéries à Gram-positif (Kilstrup *et al.*, 1997 ; Helloin *et al.*, 2003). La choline déshydrogénase impliquée dans la résistance au stress osmotique, la superoxyde dismutase ainsi que deux protéines de chocs alcalin et thermique sont aussi induites.

Dans les cellules sessiles de *S. xylosum* C2a, un régulateur de la réponse au stress a notamment été identifié comme surexprimé, il s'agit de RsbV qui appartient au régulon de sigma B (SigB). Chez *S. aureus*, l'organisation de l'opéron sigB est similaire à celle de *B. subtilis* (Miyazaki *et al.*, 1999). Selon des études menées chez *B. subtilis*, RsbU, un autre

gène du régulon SigB, est l'activateur du système (Bronner *et al.*, 2004 ; Dufour & Haldenwang, 1994). En conditions de stress, la déphosphorylation de RsbV par RsbU, permet la formation du complexe RsbV-RsbW conduisant au relarguage de SigB et donc à son activation. Le facteur sigma B n'a pas été détecté dans notre étude mais on peut penser que la surproduction de RsbV va neutraliser RsbW pour permettre au facteur sigB de réguler l'expression des gènes.

Deux autres régulateurs sont induits dans les cellules sessiles de *S. xylosus* C2a, CcpA, que nous avons précédemment évoqué, et HTH Mar. En plus de son rôle dans la régulation du métabolisme carboné, CcpA semble avoir une fonction comme modulateur dans l'expression des gènes de virulence (Seidl *et al.*, 2006). Le régulateur de la famille Mar peut aussi contrôler de nombreuses fonctions. Il peut être impliqué dans la régulation de facteurs de virulence, dans la résistance au stress oxydatif ainsi que dans la résistance antibiotique (Maira-Litran *et al.*, 2000). La croissance en biofilm est souvent associée à une réponse au stress oxydatif et à une résistance antibiotique amplifiée, ainsi, ce régulateur contribuerait à la survie de *S. xylosus* C2a en biofilm.

Dans les cellules planctoniques de *S. xylosus* C2a, le régulateur CodY est surexprimé. CodY régule des gènes impliqués dans la transition en phase stationnaire. Il est capable d'évaluer le statut nutritionnel de la bactérie en liant le GTP produit (Helloin *et al.*, 2003). Ce régulateur semble aussi impliqué dans l'expression des gènes de virulence chez des bactéries à Gram-positif (Batzilla *et al.*, 2006). Cod Y semble être influencé par Agr qui est un régulateur global de l'expression de facteurs de virulence par un mécanisme inconnu (Batzilla *et al.*, 2006). De plus, les cellules planctoniques de *S. xylosus* C2a surexpriment des protéines impliquées dans la virulence des staphylocoques telles que l'antigène immuno-dominant A (IsaA) et l'uréase. La fonction de IsaA n'est pas clairement défini contrairement au rôle de l'uréase qui est fortement impliqué dans la virulence de *S. saprophyticus* (Kuroda *et al.*, 2005).

Dans les cellules sessiles de *S. xylosus* C2a, deux transporteurs sont surexprimés dont un est régulé par le fer et l'autre est impliqué dans le transport du manganèse. Le premier transporteur SufC semble avoir un rôle dans la formation des clusters Fe-S pendant les stress oxydatifs (Outten *et al.*, 2003). Les systèmes de transport du fer sont souvent induits dans les cellules en biofilm qui présentent une carence en fer (Storz & Imlay, 1999 ; Nachin *et al.*, 2003 ; Pysz *et al.*, 2004). Ce transporteur pourrait être impliqué dans la perception environnementale du fer et donc dans un système de signalisation pour la formation de biofilm chez *S. xylosus* C2a. De plus, la carence en fer est un inducteur de la formation de

biofilm chez les staphylocoques (Elci *et al.*, 1995). Le deuxième transporteur a été précédemment décrit comme une adhésine de surface chez *S. pneumoniae* puis comme impliquée dans la régulation de l'adhérence à des cellules humaines (Novak *et al.*, 1998)

L'ensemble de ces résultats suggère qu'au sein du biofilm de *S. xylosus* C2a, il y a une hétérogénéité où des cellules en aérobiose cohabitent avec des cellules en anaérobiose. Il est bien établi que l'expression des gènes dans un biofilm est très hétérogène compte-tenu de la limitation de diffusion dans le biofilm des nutriments, de l'oxygène, des variations du pH et des concentrations en métabolites bactériens. Il existe donc un gradient au sein du biofilm où les couches les plus profondes sont soumises à des carences. Nous avons montré que le biofilm de la souche *S. xylosus* C2a était organisé en multicouches avec la présence de canaux intercellulaires pour la diffusion des nutriments et de l'oxygène (Planchon *et al.*, 2006). Dans notre étude, le biofilm a été réalisé à 48 h de croissance dans un milieu riche et il semblerait que les substrats carbonés ne soient pas épuisés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Staphylococcus xylosus et *Staphylococcus carnosus* sont utilisés comme ferments de salaisons. *S. xylosus* est fréquemment isolé dans l'environnement des ateliers de transformation alimentaire alors que *S. carnosus* l'est rarement. Ainsi, l'objectif de ce travail était d'évaluer la capacité de différentes souches de *S. carnosus* et de *S. xylosus* à former des biofilms sur divers supports abiotiques. En parallèle, les propriétés de surface de ces souches ont été étudiées afin d'évaluer leur potentiel d'adhésion sur les supports abiotiques.

Nous avons montré que les souches de *S. carnosus* sont hydrophiles, adhèrent à des supports hydrophiles mais ne forment pas de biofilms. Par contre, les souches de *S. xylosus* forment des biofilms sur des supports hydrophobes et hydrophiles. La suite du travail a été ciblée sur l'étude de la souche *S. xylosus* C2a. Nous avons observé que cette souche forme des biofilms denses avec une architecture tridimensionnelle typique, à savoir des agrégats cellulaires enchâssés dans une matrice amorphe constituée de polysaccharides.

Comme observé chez les staphylocoques, la formation de biofilm par *S. xylosus* C2a est multifactorielle et fait appel à des polysaccharides ainsi qu'à des protéines de surface.

Chez *S. xylosus* C2a, nous avons constaté que la synthèse de polysaccharides ne semble pas liée au gène *icaA* puisque la sonde *icaA* de *S. aureus* n'hybride pas. Cependant, différentes séquences d'*icaA* sont actuellement décrites au sein des staphylocoques. Notamment, chez *S. saprophyticus*, espèce proche de *S. xylosus* sur le plan phylogénétique, il existe deux séquences (*icaA* F et *icaA* D) qui pourraient être utilisées pour rechercher le gène *icaA* chez *S. xylosus*. Cependant, *S. xylosus* pourrait synthétiser des polysaccharides via d'autres mécanismes. Pour vérifier cette hypothèse, les gènes *cap* impliqués dans la synthèse d'une capsule chez certains staphylocoques et les gènes *eps* requis pour la synthèse de polysaccharides chez certaines bactéries à Gram-positif pourraient être recherchés. Une autre approche pourrait consister à extraire le polysaccharide excrété par *S. xylosus* et à l'analyser par des techniques de RMN ou de spectrométrie de masse. Le polysaccharide identifié sera alors comparé aux polysaccharides décrits chez d'autres microorganismes. Cette approche permettra d'identifier les gènes impliqués et de vérifier leur rôle dans la formation de biofilm de *S. xylosus*.

Chez *S. xylosus* C2a, nous avons mis en évidence la présence de deux gènes, *asx* et *bap*, codant des protéines de surface impliquées dans la formation de biofilm.

Le gène *asx* de *S. xylosus* hybride avec le gène *atlE* codant l'autolysine de *S. epidermidis*. Ainsi, comme *AtlE*, l'autolysine *Asx* pourrait être responsable de l'adhésion de *S. xylosus* C2a à des supports hydrophobes mais aussi aux composés de la matrice extracellulaire de

l'hôte. De plus, *S. xylosus* a été récemment décrit comme impliqué dans des mammites et des dermatites, se pose alors la question du rôle de l'autolysine.

Le gène *bap*, codant la protéine Bap nécessaire à l'agrégation intercellulaire, a été retrouvé chez toutes les souches de *S. xylosus*. La présence de Bap pourrait expliquer la survie de ces souches sur des surfaces alimentaires et dans l'environnement. Son implication dans la formation de biofilm de *S. xylosus* devra être vérifiée.

D'autres protéines de surface pourraient participer à la formation des biofilms de *S. xylosus* C2a. Pour les étudier, nous avons opté pour l'approche protéomique qui est une approche globale.

Nous avons mis au point un protocole d'extraction des protéines pariétales et membranaires. Ces protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse bidimensionnelle (EBD) et analysées par spectrométrie de masse. Cette méthode d'extraction s'est révélée concluante puisque la moitié des protéines identifiées sont prédites comme protéines de surface et peu de protéines sont communes aux deux fractions. Cependant, la méthode d'extraction développée pourrait être améliorée. Les protéines ribosomales pourraient être éliminées par des gradients de densité de saccharose. La contamination par certaines protéines cytoplasmiques pourrait être réduite par l'utilisation d'un tampon à base de carbonate de sodium solubilisant uniquement les protéines cytoplasmiques comme décrit chez les bactéries à Gram-négatif.

La méthode de séparation de ces protéines pourrait être améliorée. La plupart des protéines de surface que nous avons détectées contenaient un seul domaine transmembranaire. Les protéines de membrane ont généralement un pI alcalin et ce pI serait directement corrélé au nombre de domaines transmembranaires. La séparation de ces protéines pourrait être mieux résolue en réalisant un gradient de pH alcalin.

Cependant, l'étude de protéines membranaires contenant plus d'un domaine transmembranaire reste difficile en EBD. Pour palier à ces difficultés, une autre méthode d'analyse pourrait être développée. La séparation des protéines pourrait être réalisée par chromatographies liquides (LC/LC) couplées à la spectrométrie de masse (MS/MS).

En s'appuyant sur l'approche protéomique développée, la physiologie en biofilm de la souche *S. xylosus* C2a a été étudiée dans un milieu riche en phase stationnaire. La comparaison des profils protéiques des cultures en biofilm et planctonique a révélé la surexpression en biofilm de 74 protéines qui sont impliquées dans différentes voies métaboliques, dans la biosynthèse des protéines, dans l'oxydoréduction. La physiologie en mode sessile s'accompagne aussi d'une induction de protéines impliquées dans le stress et de régulateurs transcriptionnels. Il serait intéressant d'étudier le rôle des régulateurs RsbV et

CcpA dans la formation de biofilm de *S. xylosus*. Deux transporteurs ont été mis en évidence lors de la croissance sessile de *S. xylosus* C2a. Ces transporteurs pourraient avoir un rôle dans la formation de biofilm de *S. xylosus*. En parallèle, nous avons mis en évidence chez *S. xylosus* C2a la présence de protéines décrites comme impliquées dans l'adhésion à des cellules hôtes chez *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Il s'agit de la protéine liant la fibronectine et celle liant l'élastine, de l'énolase et de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase. Leur rôle dans la formation de biofilm sur des supports biotiques et abiotiques devra être évalué.

Etant donné que l'expression des protéines de surface est influencée par le stade de croissance de la bactérie, il serait alors intéressant d'étudier la physiologie en biofilm de la souche *S. xylosus* C2a au stade d'adhésion et en phase exponentielle. Par ailleurs, l'étude des protéines de surface de *S. xylosus* C2a, isolée de peau humaine, nous a permis de mettre en évidence la présence de protéines impliquées dans la virulence et dans la résistance chez *S. aureus*, telles que les deux antigènes immuno-dominants (IsaA, IsaB), l'uréase, la protéine de transport impliquée dans la résistance «multidrug» (RND-MFP) et trois protéines impliquées dans la résistance antibiotique : une liant la pénicilline, une appartenant à la famille des bêta-lactamases et l'autre à la famille Mar. Ainsi, il serait intéressant de connaître leur rôle dans la virulence et la résistance à diverses molécules de *S. xylosus* C2a. Il faudrait vérifier si les souches de *S. xylosus* utilisées comme ferments ou isolées de produits alimentaires possèdent ces gènes. Un projet ANR est en cours dans notre laboratoire avec pour objectif de déterminer l'innocuité des souches isolées d'aliments.

Lorsque la séquence complète du génome de *S. xylosus* C2a sera établie, une approche génétique globale pour étudier sa physiologie en biofilm sera mise en œuvre selon différentes stratégies :

- la première consistera à rechercher “in silico” des gènes impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm chez les staphylocoques voir chez d'autres bactéries à Gram positif. Le rôle de ces gènes et des gènes mis en évidence au cours de mon travail de thèse dans la formation de biofilm par *S. xylosus* sera déterminé par la construction de mutants et la caractérisation physiologique de ces mutants.
- la deuxième consistera à construire une banque de mutants par transposition. Cette banque sera ensuite criblée afin d'isoler les mutants ne formant pas de biofilm et de déterminer les gènes disruptés par l'insertion du transposon. Le criblage sur la capacité des mutants de *S. xylosus* à former des biofilms sera réalisé grâce au système développé par “Biofilm Control” qui est une société hébergée par notre laboratoire.

- la troisième consistera à étudier l'expression des gènes dans le biofilm via une approche transcriptomique. Cette approche sera possible dans l'avenir car une puce à ADN sera développée dans le cadre d'un projet ANR.

L'ensemble de ces études permettra de caractériser la physiologie de la croissance en mode sessile de *S. xylosus* et d'apporter des éléments de réponse sur l'innocuité de certaines souches de *S. xylosus*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- A** **Allignet, J., Galdbart, J.O., Morvan, A., Dyke, K.G., Vaudaux, P., Aubert, S., Desplaces, N. & el Solh, N.** (1999). Tracking adhesion factors in *Staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material. *Microbiology*. 145(Pt 8), 2033-2042.
- Allignet, J., Aubert, S., Dyke, K.G. & El Solh, N.** (2001). *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. *Infect Immun*. 69, 712-718.
- Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A. & Gilbert, P.** (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. 167, 179-184.
- Almeida, R.A. & Oliver, S.P.** (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog*. 31, 205-212.
- Ammendolia, M.G., Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, C.R. & Baldassarri, L.** (1999). Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 37, 3235-3238.
- Antelmann, H., Yamamoto, H., Sekiguchi, J. & Hecker, M.** (2002). Stabilization of cell wall proteins in *Bacillus subtilis*: a proteomic approach. *Proteomics*. 2, 591-602.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Rizzi, S., Donati, M.E., Baldassarri, L. & Montanaro, L.** (2004). Search for the insertion element IS256 within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials*. 25, 4117-4125.
- Arrizubieta, M.J., Toledo-Arana, A., Amorena, B., Penades, J.R. & Lasa, I.** (2004). Calcium Inhibits Bap-Dependent Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 186, 7490-7498.
- Atmaca, S., Elci, S. & Akpolat, N.O.** (2000). Differential production of slime by *Staphylococcus saprophyticus* under aerobic and anaerobic conditions. *J Med Microbiol*. 49, 1051-1052.
- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P. & Charbit, A.** (2003). Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect Immun*. 71, 4463-4471.
- B** **Bae, S.H., Harris, A.G., Hains, P.G., Chen, H., Garfin, D.E., Hazell, S.L., Paik, Y.K., Walsh, B.J. & Cordwell, S.J.** (2003). Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics*. 3, 569-579.

- Balaban, N., Goldkorn, T., Gov, Y., Hirshberg, M., Koyfman, N., Matthews, H.R., Nhan, R.T., Singh, B. & Uziel, O.** (2001). Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). *J Biol Chem.* 276, 2658-2667.
- Balaban, N., Gov, Y., Bitler, A. & Boelaert, J.R.** (2003). Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney Int.* 63, 340-345.
- Baldassarri, L., Donnelli, G., Gelosia, A., Voglino, M.C., Simpson, A.W. & Christensen, G.D.** (1996). Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermis* clinical isolates. *Infect Immun.* 64, 3410-3415.
- Barker, L.P., Simpson, W.A. & Christensen, G.D.** (1990). Differential production of slime under aerobic and anaerobic conditions. *J Clin Microbiol.* 28, 2578-2579.
- Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R. & Chamberlain, A.H.** (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 65, 4543-4548.
- Barrière, C., Leroy-Sétrin, S. & Talon, R.** (2001). Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *J Appl Microbiol.* 91, 514-519.
- Bateman, A., Holden, M.T. & Yeats, C.** (2005). The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics.* 21, 1301-1303.
- Batzilla, C.F., Rachid, S., Engelmann, S., Hecker, M., Hacker, J. & Ziebuhr, W.** (2006). Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, codY expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. *Proteomics.*
- Bautista, L., Gaya, P., Medina, M. & Nunez, M.** (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl Environ Microbiol.* 54, 566-569.
- Bedidi-Madani, N., Greenland, T. & Richard, Y.** (1998). Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. *Vet Microbiol.* 59, 139-145.
- Beenken, K.E., Blevins, J.S. & Smeltzer, M.S.** (2003). Mutation of sarA in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun.* 71, 4206-4211.
- Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S. & Smeltzer, M.S.** (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 186, 4665-4684.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & Van Oss, C.J.** (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. In *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, pp.47-53.

Bergmann, S., Rohde, M. & Hammerschmidt, S. (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun.* 72, 2416-2419.

Birgersson, A., Jonsson, P. & Holmberg, O. (1992). Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. *Vet Microbiol.* 31, 181-189.

Bischoff, M., Entenza, J.M. & Giachino, P. (2001). Influence of a functional sigB operon on the global regulators sar and agr in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 183, 5171-5179.

Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Dervyn, E., Ehrlich, S.D., Losick, R. & Kolter, R. (2004). Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 186, 3970-3979.

Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. & Bellon-Fontaine, M.N. (1999a). *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl Environ Microbiol.* 65, 5328-5333.

Briandet, R., Leriche, V., Carpentier, B. & Bellon-Fontaine, M.N. (1999b). Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *J Food Prot.* 62, 994-998.

Briandet, R., 1999. Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms. Aspects physico-chimiques, Thèse de Docteur de l'ENSAR - Mention Physico-chimie et Qualité des bioproduits, Rennes, France.

Bronner, S., Monteil, H. & Prevost, G. (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 28, 183-200.

Brunskill, E.W. & Bayles, K.W. (1996). Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 178, 5810-5812.

Bunai, K., Ariga, M., Inoue, T., Nozaki, M., Ogane, S., Kakeshita, H., Nemoto, T., Nakanishi, H. & Yamane, K. (2004). Profiling and comprehensive expression analysis of ABC transporter solute-binding proteins of *Bacillus subtilis* membrane based on a proteomic approach. *Electrophoresis.* 25, 141-155.

C

Caiazza, N.C. & O'Toole, G.A. (2003). Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 185, 3214-3217.

Callebaut, I., Gilges, D., Vigon, I. & Mornon, J.P. (2000). HYR, an extracellular module involved in cellular adhesion and related to the immunoglobulin-like fold. *Protein Sci.* 9,

1382-1390.

Calvo, E., Pucciarelli, M.G., Bierne, H., Cossart, P., Albar, J.P. & Garcia-Del Portillo, F. (2005). Analysis of the *Listeria* cell wall proteome by two-dimensional nanoliquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Proteomics*. 5, 433-443.

Campbell, I.M., Crozier, D.N., Pawagi, A.B. & Buivids, I.A. (1983). *In vitro* response of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis patients to combinations of linoleic and oleic acids added to nutrient medium. *J Clin Microbiol*. 18, 408-415.

Carneiro, C.R., Postol, E., Nomizo, R., Reis, L.F. & Brentani, R.R. (2004). Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect*. 6, 604-648.

Carpentier, B. (1999). Les biofilms dans l'industrie agro-alimentaire. *Bull Soc Fr Microbiol*. 14, 105-111.

Cerca, N., Pier, G.B., Vilanova, M., Oliveira, R. & Azeredo, J. (2005). Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res Microbiol*. 156, 506-514.

Chatfield, C.H., Koo, H. & Quivey, R.G. Jr. (2005). The putative autolysin regulator LytR in *Streptococcus mutans* plays a role in cell division and is growth-phase regulated. *Microbiology*. 151, 625-631.

Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N. & Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 728-737.

Chien, Y., Manna, A.C. & Cheung, A.L. (1998). SarA level is a determinant of agr activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 30, 991-1001.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. & Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*. 37, 318-326.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. & Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 22, 996-1006.

Christensen, G.D., Barker, L.P., Mawhinney, T.P., Baddour, L.M. & Simpson, W.A. (1990). Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*. 58, 2906-2911.

- Clarke, S.R., Harris, L.G., Richards, R.G. & Foster, S.J.** (2002). Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 70, 6680-6687.
- Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K.P., Van Strijp, J.A., Gotz, F., Neumeister, B. & Peschel, A.** (2002). *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J Infect Dis.* 186, 214-219.
- Conlon, K.M., Humphreys, H. & O'Gara, J.P.** (2002a). *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 184, 4400-4408.
- Conlon, K.M., Humphreys, H. & O'Gara, J.P.** (2002b). Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 216, 171-177.
- Conlon, K.M., Humphreys, H. & O'Gara, J.P.** (2004). Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 186, 6208-6219.
- Corbiere Morot-Bizot, S., Talon, R. & Leroy, S.** (2004). Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *J Appl Microbio.* 97, 1087-1094.
- Corbiere Morot-Bizot, S., Leroy, S. & Talon, R.** (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol.* 108, 210-217.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284, 1318-1322.
- Costerton, J.W. & Lewandowski, Z.** (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49, 711-745.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W. & Gotz, F.** (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 67, 5427-5433.
- Cramton, S.E., Gerke, C. & Gotz, F.** (2001a). *In vitro* methods to study staphylococcal biofilm formation. *Methods Enzymol.* 336, 239-255.
- Cramton, S.E., Ulrich, M., Gotz, F. & Doring, G.** (2001b). Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 69, 4079-4085.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. & Penades, J.R.** (2001). Bap, a

Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 183, 2888-2896.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, I., Foster, T.J. & Penades, J.R. (2002). Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun.* 70, 3180-3186.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I. & Penades, J.R. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72, 2177-2185.

D

Davey, M.E. & O'toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 847-867.

De Mattos, E.M., Teixeira, L.A., Alves, V.M., Rezenda e Resende, C., Da Silva Coimbra, M.V., Da Silva-Carvalho, M.C., Ferreira-Carvalho, B.T. & Figueiredo, A.M. (2003). Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 45, 13-22.

Debabov, D.V., Heaton, M.P., Zhang, Q., Stewart, K.D., Lambalot, R.H. & Neuhaus, F.C. (1996). The D-Alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: cloning, sequencing, and expression of dltC. *J Bacteriol.* 178, 3869-3876.

Deighton, M. & Borland, R. (1993). Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun.* 61, 4473-4479.

Deshusses, J.M., Burgess, J.A., Scherl, A., Wenger, Y., Walter, N., Converset, V., Paesano, S., Corthals, G.L., Hochstrasser, D.F. & Sanchez, J.C. (2003). Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. *Proteomics.* 3, 1418-1424.

Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A. & Mack, D. (2003). Glucose-related dissociation between icaA/BC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol.* 185, 2879-2886.

Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15, 167-193.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8, 881-890.

Downer, R., Roche, F., Park, P.W., Mecham, R.P. & Foster, T.J. (2002). The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem.* 277, 243-250.

Dufour, A. & Haldenwang, W.G. (1994). Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J Bacteriol.* 176, 1813-1820.

Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J. & Lina, G. (2002). High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus species*. *J Bacteriol.* 184, 1180-1186.

Dunne, W.M. Jr & Burd, E.M. (1992). The effects of magnesium, calcium, EDTA, and pH on the *in vitro* adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. *Microbiol Immunol.* 36, 1019-1027.

Dunne, W.M. Jr. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 15, 155-166.

E

Elci, S., Atmaca, S. & Gul, K. (1995). Effect of iron limitation on the amount of slime produced by strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Cytobios.* 84, 141-146.

Egeter, O. & Bruckner, R. (1996). Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol Microbiol.* 21, 739-749.

Esper, R.C., Morales, M.T. & Ruiz, S.S. (2000). *Staphylococcus xylosus*: una bacteria emergente. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 63, 107-111.

Euzéby, J.P. (2006) Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire (www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html).

Evans, E., Brown, M.R. & Gilbert, P. (1994). Iron chelator, exopolysaccharide and protease production in *Staphylococcus epidermidis*: a comparative study of the effects of specific growth rate in biofilm and planktonic culture. *Microbiology.* 140 (Pt 1), 153-157.

F

Feng, Z., Caceres, N.E., Sarath, G. & Barletta, R.G. (2002). *Mycobacterium smegmatis* L-alanine dehydrogenase (Ald) is required for proficient utilization of alanine as a sole nitrogen source and sustained anaerobic growth. *J Bacteriol.* 184, 5001-5010.

Fey, P.D., Ulphani, J.S., Gotz, F., Heilmann, C., Mack, D. & Rupp, M.E. (1999). Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 179, 1561-1564.

Fiegler, H., Bassias, J., Jankovic, I. & Bruckner, R. (1999). Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *J Bacteriol.* 181, 4929-4936.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H. & O'Gara, J.P. (2005). Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 43, 1973-1976.

Fluckiger, U., Wolz, C. & Cheung, A.L. (1998). Characterization of a sar homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 66, 2871-2878.

Foster, T.J. & Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6, 484-488.

Fournier, B. & Hooper, D.C. (2000). A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 182, 3955-3964.

Fournier, B., Klier, A. & Rapoport, G. (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 41, 247-261.

G

Gatlin, C.L., Pieper, R., Huang, S.T., Mongodin, E., Gebregeorgis, E., Parmar, P.P., Clark, D.J., Alami, H., Papazisi, L., Fleischmann, R.D. and others authors. (2006). Proteomic profiling of cell envelope-associated proteins from *Staphylococcus aureus*. *Proteomics.* 6, 1530-1549.

Ge, J., Catt, D.M. & Gregory, R.L. (2004). *Streptococcus mutans* surface alpha-enolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen. *Infect Immun.* 72, 6748-6752.

Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O. & Gotz, F. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem.* 273, 18586-18593.

Giacometti, A., Cirioni, O., Gov, Y., Ghiselli, R., Del Prete, M.S., Mocchegiani, F., Saba, V., Orlando, F., Scalise, G., Balaban, N. and others authors. (2003). RNA III inhibiting peptide inhibits in vivo biofilm formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 1979-1983.

Giovannacci, I., Ermel, G., Salvat, G., Vendevre, J.L. & Bellon-Fontaine, M.N. (2000). Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *Journal of Applied Microbiology.* 88, 1-10.

Giraud, A.T., Calzolari, A., Cataldi, A.A., Bogni, C. & Nagel, R. (1999). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol Lett.* 177, 15-22 .

Gotz, F. (1990). *Staphylococcus carnosus*: a new host organism for gene cloning and protein production. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 19, 49S-53S.

Gotz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 43, 1367-1378.

Gotz, F. (2004). Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol.* 7, 477-487.

Gov, Y., Bitler, A., Dell'Acqua, G., Torres, J.V. & Balaban, N. (2001). RNAIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. *Peptides.* 22, 1609-1620.

Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. & Foster, T.J. (1995). Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol.* 17, 1143-1152.

Gross, M., Cramton, S.E., Gotz, F. & Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun.* 69, 3423-3426.

H

Hamon, M.A., Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D. & Lazazzera, B.A. (2004). Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 52, 847-860.

Harraghy, N., Hussain, M., Haggar, A., Chavakis, T., Sinha, B., Herrmann, M. & Flock, J.I. (2003). The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology.* 149, 2701-2717.

Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., Foster, T.J. , Peters, G., Kehrel, B.E. & Herrmann, M. (2000). Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood.* 96, 2149-2156.

Hecker, M., Engelmann, S. & Cordwell, S.J. (2003). Proteomics of *Staphylococcus aureus*-current state and future challenges. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 787, 179-195.

Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F. & Gotz, F. (1996a). Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun.* 64, 277-282 .

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. & Gotz, F.

- (1996b). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 20, 1083-1091.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. & Gotz, F.** (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol.* 24, 1013-1024.
- Heilmann, C., Thumm, G., Chhatwal, G.S., Hartleib, J., Uekotter, A. & Peters, G.** (2003). Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 149, 2769-2778.
- Heinzelmann, M., Herzig, D.O., Swain, B., Mercer-Jones, M.A., Bergamini, T.M. & Polk, H.C. Jr.** (1997). Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *CDLI.* 4, 705-710.
- Hell, W., Meyer, H.G. & Gatermann, S.G.** (1998). Cloning of aas, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol Microbiol.* 29, 871-881.
- Helloin, E., Jansch, L. & Phan-Thanh, L.** (2003). Carbon starvation survival of *Listeria monocytogenes* in planktonic state and in biofilm: a proteomic study. *Proteomics.* 3, 2052-2064.
- Hjelm, E. & Lundell-Etherden, I.** (1991). Slime production by *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect Immun.* 59, 445-448.
- Hussain, M., Hastings, J.G. & White, P.J.** (1991). A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol.* 34, 143-147 .
- Hussain, M., Collins, C., Hastings, J.G. & White, P.J.** (1992). Radiochemical assay to measure the biofilm produced by coagulase- negative staphylococci on solid surfaces and its use to quantitate the effects of various antibacterial compounds on the formation of the biofilm. *J Med Microbiol.* 37, 62-69.
- Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F. & Peters, G.** (1997). A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun.* 65, 519-524.
- Hussain, M., Peters, G., Chhatwal, G.S. & Herrmann, M.** (1999). A lithium chloride-extracted, broad-spectrum-adhesive 42-kilodalton protein of *Staphylococcus epidermidis* is ornithine carbamoyltransferase. *Infect Immun.* 67, 6688-6690.
- Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G. & Herrmann, M.** (2001a). Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of

Staphylococcus aureus with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol.* 183, 6778-6786.

Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G. & Herrmann, M. (2001b). Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog.* 31, 261-270.

J

Jankovic, I., Egeter, O. & Bruckner, R. (2001). Analysis of catabolite control protein A-dependent repression in *Staphylococcus xylosus* by a genomic reporter gene system. *J Bacteriol.* 183, 580-6.

Jankovic, I. & Bruckner, R. (2002). Carbon catabolite repression by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4, 309-314.

Jefferson, K.K., Cramton, S.E., Gotz, F. & Pier, G.B. (2003). Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol Microbiol.* 48, 889-899.

Jefferson, K.K., Pier, D.B., Goldmann, D.A. & Pier, G.B. (2004). The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186, 2449-2456.

Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* 236, 163-173.

Ji, G., Pei, W., Zhang, L., Qiu, R., Lin, J., Benito, Y., Lina, G. & Novick, R.P. (2005). *Staphylococcus intermedius* produces a functional agr autoinducing peptide containing a cyclic lactone. *J Bacteriol.* 187, 3139-3150.

Joris, B., Englebert, S., Chu, C.P., Kariyama, R., Daneo-Moore, L., Shockman, G.D. & Ghuyssen, J.M. (1992). Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 70, 257-264.

Josefsson, E., McCrea, K.W., Ni Eidhin, D., O'Connell, D., Cox, J., Hook, M. & Foster, T.J. (1998). Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 144(Pt 12), 3387-3395.

Jung, K.Y., Cha, J.D., Lee, S.H., Woo, W.H., Lim, D.S., Choi, B.K. & Kim, K.J. (2001). Involvement of staphylococcal protein A and cytoskeletal actin in *Staphylococcus aureus* invasion of cultured human oral epithelial cells. *J Med Microbiol.* 50, 35-41.

K

- Kadner, R.J.** (1981) Cell Membrane: Structure and Function. In *Encyclopédie de la Microbiologie* (Second Edition), Academic Press.
- Kiem, S., Oh, W.S., Peck, K.R., Lee, N.Y., Lee, J.Y., Song, J.H., Hwang, E.S., Kim, E.C., Cha, C.Y. & Choe, K.W.** (2004). Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS 256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *J Korean Med Sci.* 19, 779-782.
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K. & Vogensen, F.K.** (1997). Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 63, 1826-1837.
- Klein, C., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Scheffer, B., Zischka, H., Pfeiffer, F., Siedler, F. & Oesterhelt, D.** (2005). The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics.* 5, 180-197.
- Kloos, W.E. & Schleifer, K.H.** (1986). Genus *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, The Williams Wilkins Co., Baltimore. pp.1013-1035.
- Knobloch, J.K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H. & Mack, D.** (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol.* 183, 2624-2633.
- Knobloch, J.K., Jager, S., Horstkotte, M.A., Rohde, H. & Mack, D.** (2004). RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR. *Infect Immun.* 72, 3838-3848.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. & Jabbouri, S.** (2006). Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett.* 255, 11-16.
- Korem, M., Sheoran, A.S., Gov, Y., Tzipori, S., Borovok, I. & Balaban, N.** (2003). Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 223, 167-175.
- Krepesky, N., Rocha Ferreira, R.B., Ferreira Nunes, A.P., Casado Lins, U.G., Costa, e. Silva Filho F, de Mattos-Guaraldi, A.L. & Netto-dosSantos, K.R.** (2003). Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol.* 46, 280-286.

Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H. and others authors. (2005). Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 13272-13277.

Lasa, I. & Penades, J.R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol.* 157, 99-107.

Lee, S.F., Li, Y.H. & Bowden, G.H. (1996). Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun.* 64, 1035-1038.

Lehner, I., Niehof, M. & Borlak, J. (2003). An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. *Electrophoresis.* 24, 1795-1808.

Leriche, V., Sibille, P. & Carpentier, B. (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 66, 1851-1856.

Leriche, V. & Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J Appl Microbiol.* 88, 594-605.

Liang, X., Zheng, L., Landwehr, C., Lunsford, D., Holmes, D. & Ji, Y. (2005). Global regulation of gene expression by arlrs, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 187, 5486-5492.

Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T. & Lee, C.Y. (2004). Control of glucose- and nacl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186, 722-729.

Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., Novick, R.P. & Vandenesch, F. (1998). Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 28, 655-662.

Ljungh, A. & Wadstrom, T. (1995). Growth conditions influence expression of cell surface hydrophobicity of staphylococci and other wound infection pathogens. *Microbiol Immunol.* 39, 753-757.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). In *Molecular Cell Biology* (Fourth Edition), Eds H. Freeman.

Lofdahl, S., Guss, B., Uhlen, M., Philipson, L. & Lindberg, M. (1983). Gene for staphylococcal protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 697-701.

Luong, T., Sau, S., Gomez, M., Lee, J.C. & Lee, C.Y. (2002). Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide expression by agr and sarA. *Infect Immun.* 70, 444-450.

M

Mack, D., Siemssen, N. & Laufs, R. (1992). Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun.* 60, 2048-2057.

Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J. & Laufs, R. (1994). Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun.* 62, 3244-3253.

Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. & Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* 178, 175-183.

Madoff, L.C., Michel, J.L., Gong, E.W., Kling, D.E. & Kasper, D.L. (1996). Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4131-4136.

Mah, T.F. & O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34-39.

Maira-Litran, T., Allison, D.G. & Gilbert, P. (2000). Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J Appl Microbiol.* 88, 243-247.

Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G. 3rd, Goldmann, D.A. & Pier, G.B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun.* 70, 4433-4440.

Manna, A.C., Bayer, M.G. & Cheung, A.L. (1998). Transcriptional analysis of different promoters in the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 180, 3828-3836.

Manna, A. & Cheung, A.L. (2001). Characterization of sarR, a modulator of sar expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 69, 885-896.

Maris, P. (1992). Biofilms and Disinfection. Development of a micro-organism carrier-surface method. *Sci Alim.* 12, 721-728.

Mastro, R. & Hall, M. (1999). Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two-dimensional gel

electrophoresis. *Anal Biochem.* 273, 313-315.

Mazmanian, S.K., Ton-That, H. & Schneewind, O. (2001). Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 40, 1049-1057.

McCrea, K.W., Hartford, O., Davis, S., Eidhin, D.N., Lina, G., Speziale, P., Foster, T.J. & Hook, M. (2000). The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 146 (Pt 7), 1535-1546.

McKenney, D., Hubner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D.A. & Pier, G.B. (1998). The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun.* 66, 4711-4720.

Microbiology and Immunology on line (2002) Part two: Bacteriology. University of South Carolina - School of Medecine (pathmicro.med.sc.edu/book/bact-sta.htm).

Midelet, G. & Carpentier, B. (2002). Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology.* 68, 4015-4024.

Milohanic, E., Jonquieres, R., Cossart, P., Berche, P. & Gaillard, J.L. (2001). The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol.* 39, 1212-1224.

Mireles, J.R. 2nd, Toguchi, A. & Harshey, R.M. (2001). *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol.* 183, 5848-5854.

Miyazaki, E., Chen, J.M., Ko, C. & Bishai, W.R. (1999). The *Staphylococcus aureus* rsbW (orf159) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J Bacteriol.* 181, 2846-2851.

Moretro, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K. & Langsrud, S. (2003). Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among *Staphylococci* from Food and Food Processing Environments. *Appl Environ Microbiol.* 69, 5648-5655.

Morot-Bizot, S., Talon, R. & Leroy-Setrin, S. (2003). Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *J Microbiol Methods.* 55, 279-286.

Muller, E., Hubner, J., Gutierrez, N., Takeda, S., Goldmann, D.A. & Pier, G.B. (1993). Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun.* 61, 551-558.

Muller, S., Hain, T., Pashalidis, P., Lingnau, A., Domann, E., Chakraborty, T. & Wehland, J. (1998). Purification of the inlB gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infection and Immunity*. 66, 3128-3133.

N

Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. & Barras, F. (2003). SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for Fe-S clusters. *EMBO J*. 22, 427-437.

Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. & Kawano, J. (2002). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J Vet Med Sci*. 64, 245-250.

Nandakumar, R., Nandakumar, M.P., Marten, M.R. & Ross, J.M. (2005). Proteome analysis of membrane and cell wall associated proteins from *Staphylococcus aureus*. *J Proteome Res*. 4, 250-257.

Navarre, W.W. & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63, 174-229.

Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J.I., Pei, L., Lindberg, M. & Guss, B. (1998). A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*. 66, 2666-2673.

Norwood, D.E. & Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J Appl Microbiol* . 88, 512-520.

Norwood, D.E. & Gilmour, A. (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Lett Appl Microbiol*. 33, 320-324.

Novak, R., Braun, J.S., Charpentier, E. & Tuomanen, E. (1998). Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol Microbiol*. 29, 1285-1296.

Novick, R.P. & Muir, T.W. (1999). Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2, 40-45.

Novick, R.P. & Jiang, D. (2003). The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology*. 149, 2709-2717.

O

O'Riordan, K. & Lee, J.C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*. 17, 218-234.

Orrett, F.A. & Shurland, S.M. (1998). Significance of coagulase-negative staphylococci in urinary tract infections in a developing country. *Connecticut Medicine*. 62, 199-203.

- Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y.M., Suginaka, H. & Tomasz, A.** (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 285-289.
- Otto, M., Sussmuth, R., Jung, G. & Gotz, F.** (1998). Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. *FEBS Lett.* 424, 89-94.
- Otto, M., Sussmuth, R., Vuong, C., Jung, G. & Gotz, F.** (1999). Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* agr pheromone and derivatives. *FEBS Lett.* 450, 257-262.
- Otto, M.** (2004). Quorum-sensing control in Staphylococci -- a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett.* 241, 135-141.
- Outten, F.W., Wood, M.J., Munoz, F.M. & Storz, G.** (2003). The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 278, 45713-45719.
- Ozdem Akpolat, N., Elci, S., Atmaca, S., Akbayin, H. & Gul, K.** (2003). The effects of magnesium, calcium and EDTA on slime production by *Staphylococcus epidermidis* strains. *Folia Microbiol (Praha).* 48, 649-653.
- P** **Palmqvist, N., Foster, T., Tarkowski, A. & Josefsson, E.** (2002). Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb Pathog.* 33, 239-249.
- Palmqvist, N., Silverman, G.J., Josefsson, E. & Tarkowski, A.** (2005). Bacterial cell wall-expressed protein A triggers supraclonal B-cell responses upon in vivo infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 7, 1501-1511.
- Park, P.W., Rosenbloom, J., Abrams, W.R., Rosenbloom, J. & Mecham, R.P.** (1996). Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 271, 15803-15809.
- Park, P.W., Broekelmann, T.J., Mecham, B.R. & Mecham, R.P.** (1999). Characterization of the elastin binding domain in the cell-surface 25-kDa elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS). *J Biol Chem.* 274, 2845-2850.
- Patti, J.M., Bremell, T., Krajewska-Pietrasik, D., Abdelnour, A., Tarkowski, A., Ryden, C. & Hook, M.** (1994). The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun.* 62, 152-161.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. & Gotz, F.** (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and

- other antimicrobial peptides. *J Biol Chem.* 274, 8405-8410.
- Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. & Gotz, F.** (2000). The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 2845-2847.
- Peters, G., Locci, R. & Pulverer, G.** (1982). Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* . 146, 479-482.
- Pfaller, M., Davenport, D., Bale, M., Barrett, M., Koontz, F. & Massanari, R.M.** (1988). Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 7, 30-33.
- Pinna, A., Zanetti, S., Sotgiu, M., Sechi, L.A., Fadda, G. & Carta, F.** (1999). Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *Br J Ophthalmol.* 83, 771-773.
- Planchon S.; Gaillard-Martinie B.; Leroy S.; Bellon-Fontaine, M. N.; Fadda S., and Talon R.** (2006a). Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiology.* In press.
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Dordet-Frisoni, E., Bellon-Fontaine, M.N., Leroy, S., Labadie, J., Hébraud, M. & Talon, R.** (2006b). Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Int J Food Microbiol.* In press.
- Planchon S.; Chambon C.; Chafsey I.; Leroy S.; Talon R., and Hébraud M.** (2006c). Analysis of cell wall and membrane proteins of *Staphylococcus xylosus* C2a by a proteomic approach. *Proteomics.* Submitted in April 2006.
- Planchon S.; Leroy S., Chambon C.; Chafsey I.; Hébraud M and Talon R.** (2006d). Comparative proteome of cell wall, membrane and intracellular proteins from planktonic and sessile cells of *Staphylococcus xylosus* C2a. (In preparation).
- Pragman, A.A. & Schlievert, P.M.** (2004). Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: the need for *in vivo* analysis of virulence factor regulation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 42, 147-154.
- Pragman, A.A., Yarwood, J.M., Tripp, T.J. & Schlievert, P.M.** (2004). Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186, 2430-2438.
- Pratten, J., Foster, S.J., Chan, P.F., Wilson, M. & Nair, S.P.** (2001). *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes Infect.* 3, 633-637.

Pysz, M.A., Connors, S.B., Montero, C.I., Shockley, K.R., Johnson, M.R., Ward, D.E. & Kelly, R.M. (2004). Transcriptional analysis of biofilm formation processes in the anaerobic, hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Appl Environ Microbiol.* 70, 6098-6112.

R

Rabello, R.F., Souza, C.R., Duarte, R.S., Lopes, R.M., Teixeira, L.M. & Castro, A.C. (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 88, 3211-3219.

Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M. & Ziebuhr, W. (2000a). Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol.* 182, 6824-6826.

Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J. & Ziebuhr, W. (2000b). Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 3357-3363.

Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. & Novick, R.P. (1986). Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet.* 202, 58-61.

Reifsteck, F., Wee, S. & Wilkinson, B.J. (1987). Hydrophobicity-hydrophilicity of staphylococci. *J Med Microbiol.* 24, 65-73.

Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C. & Gotz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol.* 71, 2663-2676.

Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pasztor, L., Jakob, A., Gotz, F. & Nordheim, A. (2006). Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics.* 6, 1867-1877.

Roche, F.M., Meehan, M. & Foster, T.J. (2003). The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology.* 149, 2759-2767.

Roche, F.M., Downer, R., Keane, F., Speziale, P., Park, P.W. & Foster, T.J. (2004). The N-terminale A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem.* 279, 38433-38440.

Rodriguez, M., Nunez, F., Cordoba, J.J., Bermudez, E. & Asensio, M.A. (1996). Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl Environ Microbiol.* 62, 1897-1902.

Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A.,

- Knobloch, J.K., Heilmann, C., Herrmann, M. & Mack, D.** (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol.* 55, 1883-1895.
- Rupp, C.J., Fux, C.A. & Stoodley, P.** (2005). Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl Environ Microbiol.* 71, 2175-2178.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D. & Mack, D.** (1999). Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun.* 67, 2656-2659.
- Rupp, M.E., Fey, P.D., Heilmann, C. & Gotz, F.** (2001). Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis.* 183, 1038-1042.
- Rupp, M.E. & Fey, P.D.** (2001). *In vivo* models to evaluate adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Enzymol.* 336, 206-215.

S

- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J. & Jabbouri, S.** (2004). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr Res.* 339, 1467-1473.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G. & Jabbouri, S.** (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun.* 73, 3007-3017.
- Said-Salim, B., Dunman, P.M., McAleese, F.M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P.J., Arvidson, S., Foster, T.J., Projan, S.J. & Kreiswirth, B.N.** (2003). Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol.* 185, 610-619.
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. & Rabilloud, T.** (2000). Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis.* 21, 3329-3344.
- Schaumburg, J., Diekmann, O., Hagendorff, P., Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Jansch, L., Wehland, J. & Karst, U.** (2004). The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics.* 4, 2991-3006.

- Scherl, A., Francois, P., Bento, M., Deshusses, J.M., Charbonnier, Y., Converset, V., Huyghe, A., Walter, N., Hoogland, C., Appel, R.D. and others authors.** (2005). Correlation of proteomic and transcriptomic profiles of *Staphylococcus aureus* during the post-exponential phase of growth. *J Microbiol Methods*. 60, 247-257.
- Schleifer, K.H., Schumacher-Perdreau, F., Gotz, F. & Popp, B.** (1976). Chemical and biochemical studies for the differentiation of coagulase-positive staphylococci. *Arch Microbiol*. 110, 263-270.
- Schleifer, K.H. & Fischer, U.** (1982). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int J System Bacteriol*. 32, 153-156.
- Schluesener, D., Fischer, F., Kruij, J., Rogner, M. & Poetsch, A.** (2005). Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics*. 5, 1317-1330.
- Schumacher-Perdreau, F., Heilmann, C., Peters, G., Gotz, F. & Pulverer, G.** (1994). Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. *FEMS Microbiol Lett*. 117, 71-78.
- Schwank, S., Rajacic, Z., Zimmerli, W. & Blaser, J.** (1998). Impact of bacterial biofilm formation on *in vitro* and *in vivo* activities of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 42, 895-898.
- Seidl, K., Stucki, M., Ruegg, M., Goerke, C., Wolz, C., Harris, L., Berger-Bachi, B. & Bischoff, M.** (2006). *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 50, 1183-1194.
- Shenkman, B., Rubinstein, E., Cheung, A.L., Brill, G.E., Dardik, R., Tamarin, I., Savion, N. & Varon, D.** (2001). Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: roles of agr and sar loci, platelets, and plasma ligands. *Infect Immun*. 69, 4473-4478.
- Shirtliff, M.E., Mader, J.T. & Camper, A.K.** (2002). Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol*. 9, 859-871.
- Siqueira, J.F.J. & Lima, K.C.** (2002). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosum* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. *Australian Endodontic Journal: J Austr Soc Endodontol Inc*. 28, 61-63.
- Skurnik, M., Venho, R., Toivanen, P. & al-Hendy, A.** (1995). A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. *Mol Microbiol*. 17, 575-594.
- Sonohara, R., Muramatsu, N., Ohshima, H. & Kondo, T.** (1995). Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic

mobility measurements. *Biophys Chem.* 55, 273-277.

Stanley, N. R.; Britton, R. A.; Grossman, A. D., and Lazazzera, B. A. (2003). Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol.* 185, 1951-1957.

Stanley, N.R. & Lazazzera, B.A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.* 52, 917-924.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Jezek, P., Pavlovic, M. & Svabic-Vlahovic, M. (2001). Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20, 502-504.

Stingle, F., Neeser, J.R. & Mollet, B. (1996). Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol.* 178, 1680-1690.

Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 67, 5608-5613.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56, 187-209.

Storz, G. & Imlay, J.A. (1999). Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.* 2, 188-194.

Sun, D., Accavitti, M.A. & Bryers, J.D. (2005). Inhibition of Biofilm Formation by Monoclonal Antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A Accumulation-Associated Protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12, 93-100.

Sutherland, I. (2001a). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 147, 3-9.

Sutherland, I.W. (2001b). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9, 222-227.

T

Takahashi, J., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Nishida, T., Labischinski, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Yamagishi, J. & Sugai, M. (2002). Molecular characterization of an atl null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 46, 601-612.

Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A. and others authors. (2005). Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol.* 187, 7292-7308.

Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barriere, C. & Montel, M.C. (1999). Effect of nitrate

and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *Int J Food Microbiol.* 52, 47-56.

Talon, R., Leroy-Sétrin, S. & Fadda, S. (2002). Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, Eds Fidel Toldrá, Research Signpost. pp.175-191.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S. & Shankar, N. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 72, 6032-6039.

Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D.A. & Pier, G.B. (1988). Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 157, 713-722.

Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Debarbouille, M., Penades, J.R. & Lasa, I. (2005). *Staphylococcus aureus* Develops an Alternative, ica-Independent Biofilm in the Absence of the arlRS Two-Component System. *J Bacteriol.* 187, 5318-5329.

Tormo, M.A., Marti, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I. & Penades, J.R. (2005a). SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol.* 187, 2348-2356.

Tormo, M.A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I. & Penades, J.R. (2005b). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology.* 151, 2465-2475.

Trotonda, M.P., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I. & Penades, J.R. (2005). SarA positively controls bap-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 187, 5790-5798.

U

Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I. & Penades, J.R. (2003). Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol.* 49, 193-210.

Ug, A. & Ceylan, O. (2003). Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Arch Med Res.* 34, 130-136.

Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L. & Lindberg, M. (1984). Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem.* 259, 1695-1702.

- V** Valle, J., Gomez-Lucia, E., Piriz, S., Goyache, J., Orden, J.A. & Vadillo, S. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl Environ Microbiol.* 56, 1323-1326.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.M., Amorena, B., Penades, J.R. & Lasa, I. (2003). SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 48, 1075-1087.
- van der Borden, A.J., van der Mei, H.C. & Busscher, H.J. (2004). Electric-current-induced detachment of *Staphylococcus epidermidis* strains from surgical stainless steel. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 68, 160-164.
- van der Mei, H.C., van de Belt-Gritter, B., Reid, G., Bialkowska-Hobrzanska, H. & Busscher, H.J. (1997). Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties. *Microbiology.* 143 (Pt 12), 3861-3870.
- van Kranenburg, R., van Swam, I.I., Marugg, J.D., Kleerebezem, M. & de Vos, W.M. (1999). Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *J Bacteriol.* 181, 338-340.
- van Schaik, W. & Abee, T. (2005). The role of sigma (B) in the stress response of Gram-positive bacteria - targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol.* 16, 218-224.
- Vaudaux, P.E., Francois, P., Proctor, R.A., McDevitt, D., Foster, T.J., Albrecht, R.M., Lew, D.P., Wabers, H. & Cooper, S.L. (1995). Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect Immun.* 63, 585-590.
- Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Li, J. & Jabbouri, S. (2006). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr Res.* 341, 738-743.
- Vuong, C., Saenz, H.L., Gotz, F. & Otto, M. (2000). Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 182, 1688-1693.
- Vuong, C. & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 4, 481-489.
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R. & Otto, M. (2003). Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 188, 706-718.
- Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R. & Otto, M. (2004a). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus*

epidermidis against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 6, 269-275.

Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R. & Otto, M. (2004b). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 279, 54881-54886.

Vuong, C., Kidder, J.B., Jacobson, E.R., Otto, M., Proctor, R.A. & Somerville, G.A. (2005). *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin Production Significantly Increases during Tricarboxylic Acid Cycle Stress. *J Bacteriol.* 187, 2967-2973.

Vytvytska, O., Nagy, E., Bluggel, M., Meyer, H.E., Kurzbauer, R., Huber, L.A. & Klade, C.S. (2002). Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics.* 2, 580-590.

W

Wagner, E., Doskar, J. & Gotz, F. (1998). Physical and genetic map of the genome of *Staphylococcus carnosus* TM300. *Microbiology.* 144(Pt 2), 509-517.

Watnick, P. & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 182, 2675-2679.

Welman, A.D. & Maddox, I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 21, 269-274.

Wen, Z.T. & Burne, R.A. (2002). Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 68, 1196-203.

Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J. & Nair, S.P. (2002). Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 70, 6805-6810.

Wolfe, A.J. (2005). The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69, 12-50.

Won, Y.S., Kwon, H.J., Oh, G.T., Kim, B.H., Lee, C.H., Park, Y.H., Hyun, B.H. & Choi, Y.K. (2002). Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-Nos2(tm1Lau) mice with dermatitis. *Microbiol Immunol.* 46, 629-632.

Wrangstadh, M., Conway, P.L. & Kjelleberg, S. (1986). The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. *Arch Microbiol.* 145, 220-227.

Wu, J.A., Kusuma, C., Mond, J.J. & Kokai-Kun, J.F. (2003). Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 3407-3414.

X

Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M. & Gao, Q. (2006). Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 74, 488-496 .

Y

Yarwood, J.M. & Schlievert, P.M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 112, 1620-1625.

Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M. & Greenberg, E.P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 186, 1838-1850.

Z

Ziebandt, A.K., Becher, D., Ohlsen, K., Hacker, J., Hecker, M. & Engelmann, S. (2004). The influence of agr and sigmaB in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics.* 4, 3034-3047.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E. & Hacker, J. (1997). Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun.* 65, 890-896.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F. & Hacker, J. (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol.* 32, 345-356.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS:

Chapitre d'ouvrage non publié: **“Coagulase-negative staphylococci in food: diversity and potential risk”**. Sabine Leroy *et al.* Rédaction de la partie : **“Biofilm formation by Coagulase Negative Staphylococci”**.

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRES :

“Capacité de *Staphylococcus carnosus* et de *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms”. Colloque Microorganismes et Environnement 2^{ème} édition, Pôle Agronomique de Rennes, France, 9-10 Décembre 2003. p. 219.

“Croissance en biofilm des souches de *Staphylococcus carnosus* et de *Staphylococcus xylosus* et Caractérisation de leurs propriétés de surface”. Participation au projet Aliment Qualité Sécurité (AQS), INRA Theix, France, Juillet 2003. p. 222.

“Formation de biofilms par les souches de *Staphylococcus xylosus*”. Journées de l'école doctorale, Clermont-Ferrand, France, 4 Mars 2004. p. 225.

“Formation de biofilms par la souche *Staphylococcus xylosus* C2a”. VIème Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, France, 10-12 Mai 2004. p. 226.

“La formation de biofilm par les Staphylocoques”. IIème Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, Clermont-Ferrand, France, 01 Avril 2005. p. 227.

“Physiological and molecular study of *Staphylococcus xylosus* in biofilm”. Présentation du travail de thèse, CERELA, San Miguel de Tucumán, Argentine. 25 octobre 2005.

LISTE DES COMMUNICATIONS ECRITES DANS DES CONGRES :

“Proteomic analysis of surface and soluble proteins from *Staphylococcus xylosus*”. Affiche présentée aux Xèmes Journées de Gerland : Proteomics: “New insights and prospects”, France, 8-9 Novembre 2004. p. 228-229.

“Formation de biofilms par la souche de *Staphylococcus xylosus* C2a”. Affiche présentée au Colloque Produits alimentaires et fermiers, Clermont-Ferrand, France. p. 230.

“Analyse protéomique des fractions pariétale et membranaire de *Staphylococcus xylosus* C2a afin de caractériser sa physiologie en biofilm”. Affiche en préparation qui sera présentée aux Rencontres des Microbiologistes de l’INRA, Dourdan, France, 28-30 juin 2006. p. 231.

“Capacité de *Staphylococcus carnosus* et de *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms”. Colloque Microorganismes et Environnement 2^{ème} édition, Pôle Agronomique de Rennes, France, 9-10 Décembre 2003.

Planchon Stella, Hébraud Michel, Leroy-Sétrin Sabine, Talon Régine
INRA Centre Clermont-Ferrand-Theix, Station de Recherches sur la Viande, Microbiologie,
63122 Saint-Genès Champanelle.

Résumé

Staphylococcus carnosus et *Staphylococcus xylosus* sont utilisés comme ferments de salaison et sont capables de coloniser l’environnement des ateliers de fabrication. Leur capacité à faire des biofilms sur différents matériaux (polystyrène, plastique, verre, téflon et acier inoxydable) a été évaluée. *S. carnosus* 833 ne forme pas de biofilm sur les surfaces en polystyrène, plastique et verre. Cette souche colonise faiblement les supports en téflon et acier inoxydable. *S. xylosus* C2a adhère fortement à tous les supports mais est capable de former des biofilms sur téflon et acier inoxydable comme le confirment les observations en microscopie électronique à balayage. Elle possède des propriétés de surface hydrophile et une charge globale de surface négative. De plus, cette souche synthétise des polysaccharides qui ont un rôle dans la formation des biofilms. Ces polysaccharides et les autres facteurs impliqués dans l’aptitude à former des biofilms sont en cours de caractérisation.

Résultats

Staphylococcus xylosus et *Staphylococcus carnosus* sont utilisés comme ferments dans la fabrication des saucissons. Les staphylocoques sont retrouvés dans l’environnement des ateliers de fabrication de salaison. Ainsi, la capacité des souches de *S. carnosus* et de *S. xylosus* à faire des biofilms a été évaluée sur différents matériaux.

21 souches de *S. carnosus* et 13 souches de *S. xylosus* ont été criblées sur leur aptitude à former des biofilms en plaque de microtitration en polystyrène, avec deux degrés d’hydrophobicité différents. Aucune souche de *S. carnosus* ne forme de biofilm dans ces conditions de culture sur les deux supports testés. Sept souches de *S. xylosus*, dont la souche *S. xylosus* C2a, forment un biofilm dans diverses conditions de culture. La souche C2a forme préférentiellement des biofilms en milieu de culture riche, sur le support le moins hydrophobe après 48 h d’incubation, avec un renouvellement du milieu après 24 h.

Toutes les souches ont été testées ensuite sur deux supports : un hydrophile (tubes en verre) et un hydrophobe (tubes en polystyrène). Les souches de *S. carnosus* ne forment pas de biofilm dans ces conditions mais ont une légère préférence pour le support hydrophile. Toutes les souches de *S. xylosus* forment préférentiellement des biofilms sur le support hydrophile, excepté la souche *S. xylosus* C2a qui forme des biofilms sur les deux supports.

Les propriétés de surface de 2 souches, *S. carnosus* 833 et *S. xylosus* C2a, ont été étudiées par la méthode MATS basée sur l'affinité pour des solvants apolaires, polaires acides ou polaires basiques. Leur capacité d'adhésion et de croissance en biofilm a été évaluée sur deux supports utilisés en industrie agroalimentaire, le polytétrafluoroéthylène (téflon) et l'acier. Différents milieux de culture ont été testés : MCDB, Hussain avec ou sans addition de sel, du Bouillon de Soja Tryptique supplémenté avec de l'Extrait de Levure (TSB-YE), ainsi que du TSB-YE supplémenté avec du calcium et du magnésium (TSB-YE/Ca-Mg) et du TSB-YE supplémenté avec du sel (TSB-YE/NaCl). L'étape d'adhésion a été réalisée soit dans le milieu de culture, soit en eau physiologique pendant 2 h suivie d'une croissance en TSB-YE (TSB-YE/WPhy).

La souche *S. carnosus* 833 possède une forte affinité pour le solvant polaire acide et une affinité presque nulle pour les solvants apolaires. De ce fait, cette souche possède des propriétés de surface très hydrophiles avec un caractère basique marqué.

S. carnosus 833 adhère difficilement sur les deux supports quel que soit le milieu de croissance. Une plus grande adhésion est notée sur le support acier (17% et 15%) dans les milieux chimiquement définis MCDB et Hussain. Cependant, l'addition de sel au milieu de Hussain améliore significativement son adhésion sur les deux supports (20% et 22%). La plus forte adhésion a lieu sur le support acier (28%) avec des cellules resuspendues en eau physiologique (TSB-YE/WPhy).

S. carnosus 833 ne se multiplie pas en biofilm dans tous les milieux testés, excepté dans le milieu TSB-YE avec ou sans Ca-Mg. On constate même un relargage de cellules qui se produit sur le support acier. Pour les milieux TSB-YE et TSB-YE/Ca-Mg, la plus forte croissance a lieu au bout de 120 h d'incubation quel que soit le support. L'addition de Ca-Mg dans le milieu n'a aucun effet sur la formation de biofilm. L'addition de sel au milieu de Hussain stabilise le biofilm sur le support acier.

La souche *S. xylosus* C2a possède un caractère hydrophile marqué mais de façon moins importante que *S. carnosus* 833, car elle possède une légère affinité pour les solvants apolaires (environ 20%).

S. xylosus C2a adhère fortement au support acier par rapport au téflon ce qui est en accord avec ses propriétés de surface. Le taux d'adhésion atteint 66% en TSB-YE/Ca-Mg et 58 % en

Hussain/NaCl. L'addition de sels (Ca-Mg ou NaCl) dans le milieu TSB-YE a augmenté l'adhésion sur les 2 supports mais de façon plus importante sur le support téflon.

Nous avons constaté globalement une meilleure croissance sur le support téflon à 48 h d'incubation. Il y a de légers décrochages pour les différents milieux testés, excepté pour les 2 milieux TSB-YE/WPhy et TSB-YE/NaCl. Pour le milieu TSB-YE/WPhy, le relargage de cellules est plus important. Avec l'addition de NaCl dans le milieu TSB-YE, le biofilm se stabilise après 48 h. L'addition de Ca-Mg a inhibé la croissance sur le téflon. *S. xylosus* C2a croît uniquement jusqu'à 48 h sur le support acier si du NaCl est rajouté aux milieux TSB-YE et Hussain ou bien quand les cellules sont resuspendues en eau physiologique. Mais après 48 h, un fort décrochage est observé sur l'acier, excepté pour les milieux TSB/NaCl et TSB-YE/Ca-Mg.

Les biofilms obtenus à 48 h sur les deux types de support ont été observés par microscopie électronique à balayage pour les deux souches, ainsi qu'en microscopie environnementale pour la souche *S. xylosus* C2a. Les cellules de *S. carnosus* 833 sont organisées par paire ou isolées sur l'acier et le téflon, elles ne s'agrègent pas entre elles. La souche *S. xylosus* C2a a colonisé toute la surface du support acier. Sur le support téflon, nous observons une colonisation irrégulière avec de multiples agrégats de cellules ainsi que des cellules isolées. Ces agrégats sont constitués par de multiples couches de cellules entourées par des espaces vides. Ces espaces intercellulaires peuvent être apparentés à des canaux permettant de laisser diffuser l'oxygène et les nutriments au sein du biofilm. Les cellules sont entourées d'une matrice amorphe qui peut être constituée de polysaccharides, ils ont donc été dosés par la méthode de Dubois.

La souche *S. carnosus* 833 synthétise des polysaccharides en quantité faible et constante pendant le développement en biofilm jusqu'à 120 h sur le support acier. Par contre, la souche *S. xylosus* C2a synthétise des quantités croissantes de polysaccharides au cours de sa croissance jusqu'à 120 h sur le support acier.

Les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm par la souche *S. xylosus* C2a seront caractérisés par le biais d'une approche protéomique et d'une approche génomique.

“Croissance en biofilm des souches de *Staphylococcus carnosus* et de *Staphylococcus xylosus* et Caractérisation de leurs propriétés de surface”. Bilan du projet Aliment Qualité Sécurité (AQS R01/09), INRA Theix, France, Juillet 2003.

Intitulé du projet : Mises en œuvre de procédures de décontaminations sélectives adaptées aux ateliers producteurs de salaisons fermières.

Responsables du projet : Talon Régine et Hébraud Michel, Equipe Microbiologie, Unité de Recherches sur la Viande, Centre INRA Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle.

Partenaires du projet :

- Chambre d’Agriculture de Haute Loire, 16 Bd Bertrand, 43012 Le Puy en Velay, Volle Nadine.
- Degussa Ferments d’Aromatisation France SAS, 16 rue de la Gare, BP 10, 77 260 La Ferté sous Jouarre, Molimard Pascal.
- Ecole Nationale d’Ingénieurs des travaux Agricoles de Clermont-ferrand (ENITAC). Site de Marmilhat, 63 370 Lempdes, Dufour Eric, Chevallier Isabelle.
- INRA, Massy, 25 avenue de la République, 91 744 Massy cedex, Bellon-Fontaine Marie Noëlle.

Contexte :

La production fermière de charcuterie salaisons concerne, en France, à peu près 12000 exploitations (SIDAM, 1996) qui sont pour une large part localisée en région de moyenne montagne, essentiellement dans le Massif Central, les Alpes, le Jura. Ces exploitations jouent un rôle essentiel dans la survie de l’économie de régions souvent en voie de dépeuplement où elles contribuent à la pérennisation des exploitations des méthodes de fabrication traditionnelle. Cependant, ces produits traditionnels, très appréciés des consommateurs, ne répondent pas toujours aux critères microbiologiques requis pour en garantir leur innocuité.

Objectifs :

Pour garantir les qualités hygiéniques et sensorielles des salaisons, nous avons proposé de développer des procédures de décontaminations sélectives adaptées aux ateliers producteurs de salaisons fermières.

Pour atteindre l'objectif, nous avons :

- développer des solutions de décontaminations sélectives sur des bactéries cultivées en biofilms mixtes.
- évaluer l'aptitude des flores technologiques à inhiber des souches pathogènes ou d'altération, en considérant aussi des cultures en biofilm.
- étudier la croissance en biofilm de souches technologiques (bactéries lactiques et staphylocoques).
- étudier les propriétés de surface des bactéries technologiques pour caractériser leur potentiel d'adhésion sur des surfaces.
- caractériser les propriétés technologiques des souches.

Résumé des résultats :

Les divers essais de décontamination sélective ont montré que les solutions alcalines additionnées de 10 % Na₂SO₄ pourraient permettre d'atteindre cet objectif. En particulier les flores d'altération (*Pseudomonas*, Entérobactéries), souvent décrites dans les ateliers fermiers et provoquant des accidents de fabrication (poissage, défaut d'odeurs...), sont sensibles à ce traitement alcalin. Ainsi le traitement avec le produit alcalin industriel Ecolab additionné de 10% de Na₂SO₄ réduit cette flore d'altération cultivée en biofilm mixte d'un facteur supérieur à 5 log. Ce même traitement réduit plus faiblement les flores technologiques à savoir environ 2.5 log pour *Lactobacillus sakei* et inférieur à 1 log pour les deux staphylocoques : *S. xylosus* et *S. carnosus*. Par contre ce même traitement n'est pas assez efficace contre les flores pathogènes étudiées : *S. aureus* et *L. monocytogenes*. Ces flores pathogènes représentant des contaminations sporadiques dans les ateliers fermiers.

La sélection de flore de barrière suppose des flores technologiques capables de coloniser l'environnement voir d'inhiber le développement de flore d'altération ou et pathogène. Parmi les staphylocoques, aucune souche de *S. xylosus* et *S. carnosus* n'a de pouvoir inhibiteur. Cependant certaines souches de *S. xylosus* forment des biofilms sur des surfaces (inox, téflon) utilisées en industrie agroalimentaire et peuvent de ce fait limiter la colonisation par d'autres souches moins compétitives. Par contre certaines bactéries lactiques ont des propriétés inhibitrices intéressantes. En particulier des souches de *Carnobacterium piscicola*, espèce souvent isolée d'ateliers fermiers de salaison, ont un pouvoir inhibiteur contre *Listeria* et *S. aureus* en particulier lors de cultures mixtes en biofilm. Des souches de *L. sakei* ont aussi un pouvoir inhibiteur mais uniquement contre *Listeria*.

La sélection de ferments pour salaison doit inclure aussi des propriétés technologiques. Pour les bactéries lactiques, l'acidification reste un critère déterminant. Deux souches de *L. sakei* répondent à la cinétique d'acidification recherchée en industrie. Pour les staphylocoques, un rôle dans le développement dans la couleur est recherché via l'activité nitrate réductase, les deux souches étudiées semblent avoir des activités faibles.

“Formation de biofilms par les souches de *Staphylococcus xylosus*”. Journées de l'école doctorale, Clermont-Ferrand, France, 4 Mars 2004.

Stella PLANCHON (2^{ème} année de thèse), Directeur et responsable de thèse : Dr TALON Régine, INRA Clermont-Ferrand/Theix, Station de Recherches sur la Viande, Equipe Microbiologie, 63122 Saint Genès Champanelle.

Staphylococcus xylosus est utilisé comme ferment dans la fabrication des saucissons et des fromages. Les staphylocoques sont largement répandus dans l'environnement des ateliers de fabrication. La capacité des souches de *S. xylosus* à coloniser les surfaces a été évaluée sur différents matériaux. Douze souches ont été criblées sur leur aptitude à former des biofilms sur des supports hydrophile (tubes en verre) et hydrophobe (tubes en polystyrène). Neuf souches forment préférentiellement des biofilms sur support hydrophile et une souche (C2a) sur les deux supports. Les propriétés de surface des 10 souches biofilm positives ont été étudiées par la méthode MATS. Globalement, les souches de *S. xylosus* ont des propriétés de surface moyennement hydrophobes, exceptée la souche C2a, qui est plutôt hydrophile. L'étude de la mobilité électrophorétique a révélé que toutes les souches étaient chargées négativement en surface. De plus, la souche C2a ne possède pas de point isoélectrique entre pH 2 et 8. La capacité d'adhésion et de croissance en biofilm de la souche C2a a été évaluée sur deux supports utilisés en industrie agroalimentaire, le polytétrafluoroéthylène (PTFE ou téflon) et l'acier inoxydable, dans différents milieux. La souche C2a adhère fortement au support acier par rapport au téflon. L'addition de sels (Ca-Mg ou NaCl) dans le milieu de culture augmente l'adhésion sur les 2 supports. Nous avons constaté globalement une meilleure croissance sur le support téflon à 48 h d'incubation. La condition la plus favorable à la formation du biofilm et à sa stabilité est un milieu riche supplémenté avec 20 g/l de NaCl quel que soit le support. Par microscopie électronique, on constate que la souche C2a colonise toute la surface du support acier, formant des agrégats de cellules qui sont constitués par de multiples couches de cellules entourées par des espaces vides. Les cellules sont entourées d'une matrice amorphe notamment constituée de polysaccharides, qui ont été dosés par la méthode de Dubois. Le taux de polysaccharides liés aux cellules de C2a augmente au cours du temps de l'incubation du biofilm sur le support acier. Les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm par la souche *S. xylosus* C2a seront caractérisés par le biais d'une approche protéomique et génomique.

“Formation de biofilms par la souche *Staphylococcus xylosus* C2a”. VIème Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Bordeaux, France, 10-12 Mai 2004.

Planchon Stella, Hébraud Michel, Leroy-Sétrin Sabine, Talon Régine.

INRA, Centre Clermont-Ferrand Theix, Station de Recherches sur la Viande, Equipe Microbiologie, Saint-Genès Champanelle, France.

Staphylococcus xylosus est utilisé comme ferment dans la fabrication des saucissons et dans les fromages. Cette espèce est retrouvée de façon prédominante sur les surfaces des ateliers en agroalimentaire. Le but de notre étude est de caractériser l’aptitude des souches de *S. xylosus* à faire des biofilms. Le criblage de 13 souches de *S. xylosus* en plaque de microtitration a permis de sélectionner 6 souches pour leur aptitude à faire des biofilms dans des conditions de croissance standard. La souche *S. xylosus* C2a a été étudiée de manière plus approfondie. L’adhésion et la croissance de cette souche ont été testées sur des surfaces en acier inoxydable et en téflon, immergées dans différents milieux de culture, pendant des durées d’incubation variables. L’étude de ses propriétés de surface a montré qu’elle était moyennement hydrophile et chargée négativement. Ainsi, la souche *S. xylosus* C2a adhère préférentiellement sur l’acier inoxydable quel que soit le milieu. Cependant, la croissance sur ce support n’est possible qu’avec le milieu TSB-YE supplémenté avec du NaCl ou, lorsque l’adhésion est réalisée en eau physiologique suivie d’une incubation de 48 h en milieu TSB-YE. Un décrochement cellulaire important est systématiquement observé après 48 h excepté pour le milieu TSB-YE/NaCl. Par contre, malgré une adhésion moins importante des cellules sur le téflon, une meilleure croissance est obtenue avec des décrochements moins importants après 48 h de colonisation. La croissance à 48 h a été visualisée en microscopie électronique à balayage et en microscopie environnementale. Les observations ont montré une colonisation dense des deux supports avec une architecture tridimensionnelle complexe et la présence d’une matrice amorphe polysaccharidique englobant les agrégats cellulaires. Le dosage des polysaccharides liés aux cellules a montré un taux croissant de polysaccharides durant le développement. Les facteurs impliqués dans la formation de biofilms sont en cours de caractérisation par des approches génétique et protéomique.

“**La formation de biofilm par les Staphylocoques**”. IIème Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, Clermont-Ferrand, France, 01 Avril 2005.

Planchon S., Martinie B., Dordet-Frisoni E., Leroy S., Labadie J., Hébraud M., Talon R.
INRA, Centre Clermont/Theix, Unité de Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle

Les staphylocoques coagulase-négatifs font partis de la flore commensale cutanée humaine et/ou animale. De ce fait, ils contaminent facilement l’environnement dans les domaines médical et agroalimentaire. Le genre *Staphylococcus* comprend des espèces pathogènes opportunistes et d’intérêt technologique. Les espèces pathogènes opportunistes peuvent être responsables d’infections nosocomiales liées à l’utilisation de matériel médical comme les prothèses ou les cathéters. La formation de biofilm représente un facteur essentiel dans la pathogénèse de ces souches. Parmi les souches d’intérêt technologique, *Staphylococcus xylosus* est utilisé comme ferment dans la fabrication des saucissons et des fromages, dans lesquels il contribue à leur saveur. Il est fréquemment isolé dans l’environnement des ateliers de transformation de produits alimentaires. La formation de biofilm est responsable de la persistance et de la survie des microorganismes en industrie alimentaire. Dans ce contexte, nous avons étudié la capacité de différentes souches de *S. xylosus* isolées de produits carnés à former des biofilms sur divers supports utilisés en agroalimentaire. Les gènes *icaA* et *bap*, impliqués dans la formation de biofilm chez *S. epidermidis* et *S. aureus*, ont été recherchés mais seul le gène *bap* a été mis en évidence. Chez la souche *S. xylosus* C2a, les protéines de surface, principalement impliquées dans l’adhésion des microorganismes, ont été étudiées par une approche protéomique. Les profils protéiques des cultures en biofilm ont été comparés à ceux obtenus en culture planctonique. La comparaison des 2 subprotéomes a révélé un certain nombre de protéines d’intérêt dont la nature est en cours d’identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

“Proteomic analysis of surface and soluble proteins from *Staphylococcus xylosus*”.

Affiche présentée aux Xèmes Journées de Gerland : Proteomics: “New insights and prospects”, France, 8-9 Novembre 2004.

S. Planchon,¹ I. Chafsey,¹ S. Leroy,¹ M. Hébraud,^{1,2} R. Talon¹.

Unité de Recherches sur la Viande - Microbiologie,¹ Plate-forme protéomique,² INRA site de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

ABSTRACT

Staphylococcus xylosus is used as starter culture in meat and cheese products. It is frequently isolated in the environment of these food-processing plants. Moreover, it is mentioned in animal (mastitis) and human infections (acute pyelonephritis, dermatitis). We have studied its ability to form biofilm. We have shown that *S. xylosus* is able to adhere and to form biofilm, more particularly on hydrophilic surfaces. So, it colonized all the surface of stainless steel strips and formed aggregates embedded in an amorphous polysaccharidic matrix, as visualised by Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM). It is well established that the surface proteins play an important role in the colonization of supports. So, in order to understand mechanisms involved in biofilm formation of *S. xylosus*, we studied the surface and soluble proteins by a proteomic approach. We evaluated different methods to optimise the extraction and the separation of these protein samples. Cells were first treated by using either LiCl or lysostaphin to recover cell wall proteins, and then broken with glass beads. The membrane and soluble proteins were separated by ultracentrifugation. At this level, different methods were assayed to solubilize the membrane proteins. The different fractions obtained were separated by two-dimensional gel electrophoresis to evaluate the efficiency of the methods of extraction. Some proteins spots will be further identified by MALDI-TOF mass spectrometry to ascertain their localization. The best method will be applied to compare the different fractions from sessile and planktonic cells.



Proteomic analysis of surface and soluble proteins from *Staphylococcus xylosum*

S. Planchon,¹ I. Chafsey,
S. Leroy,¹ M. Hébraud,^{1,2}
R. Talon¹

Unité de Recherches sur la Viande - Microbiologie,¹
Plate-forme protéomique,²
INRA site de Theix, 63122
Saint-Genès Champanelle,
France.

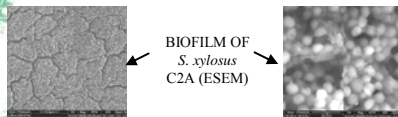
Conclusion

We have chosen to recover cell wall proteins by lysostaphin treatment. Membrane proteins were harvested after a delipidation with tributyl phosphate and solubilisation with the ASB detergent. After identification of some membrane proteins, the best method will be applied to compare the different fractions from planktonic and sessile cells.

Introduction

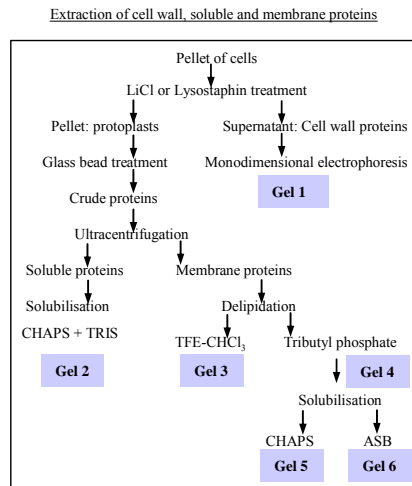
Staphylococcus xylosum, used as starter culture in meat and cheese products, frequently colonizes the environment of the food-processing plants. Moreover, it is mentioned in animal (mastitis) and human (acute pyelonephritis) infections in which its capacity of colonization could participate. We have already shown that *S. xylosum* formed biofilm, more particularly on hydrophilic surfaces. It formed aggregates embedded in an amorphous polysaccharidic matrix visualised by Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM).

It is well established that the surface proteins play an important role in the colonization of supports. In order to understand mechanisms involved in biofilm formation of *S. xylosum*, the soluble and surface proteins were studied by a proteomic approach. We optimised the extraction and the separation of these proteins.



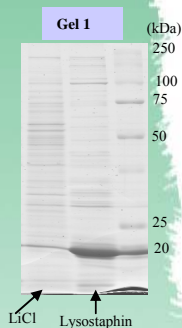
Methods

The strain *S. xylosum* C2a was grown 48 h at 30°C under 150 rpm in tryptic soy broth with yeast extract.



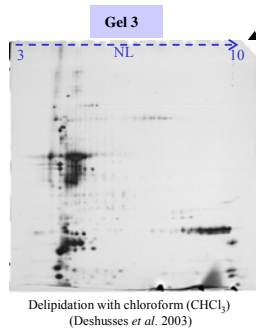
Results

CELL WALL PROTEINS

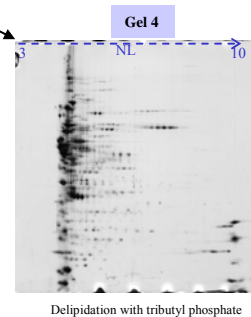


MEMBRANE PROTEINS

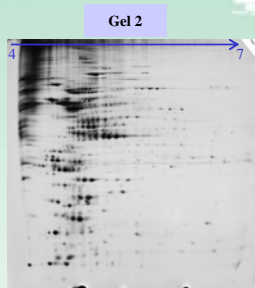
Effect of delipidation



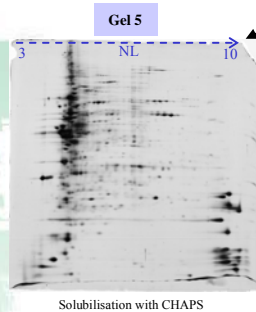
- Pattern of protein expression differed with the two methods of delipidation
- The method using trifluoroethanol (TFE) and chloroform extracted a low number of proteins (Gel 3)
- Delipidation with tributyl phosphate allowed the best extraction of membrane proteins



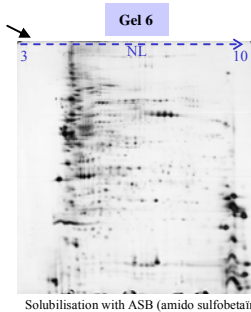
SOLUBLE PROTEINS



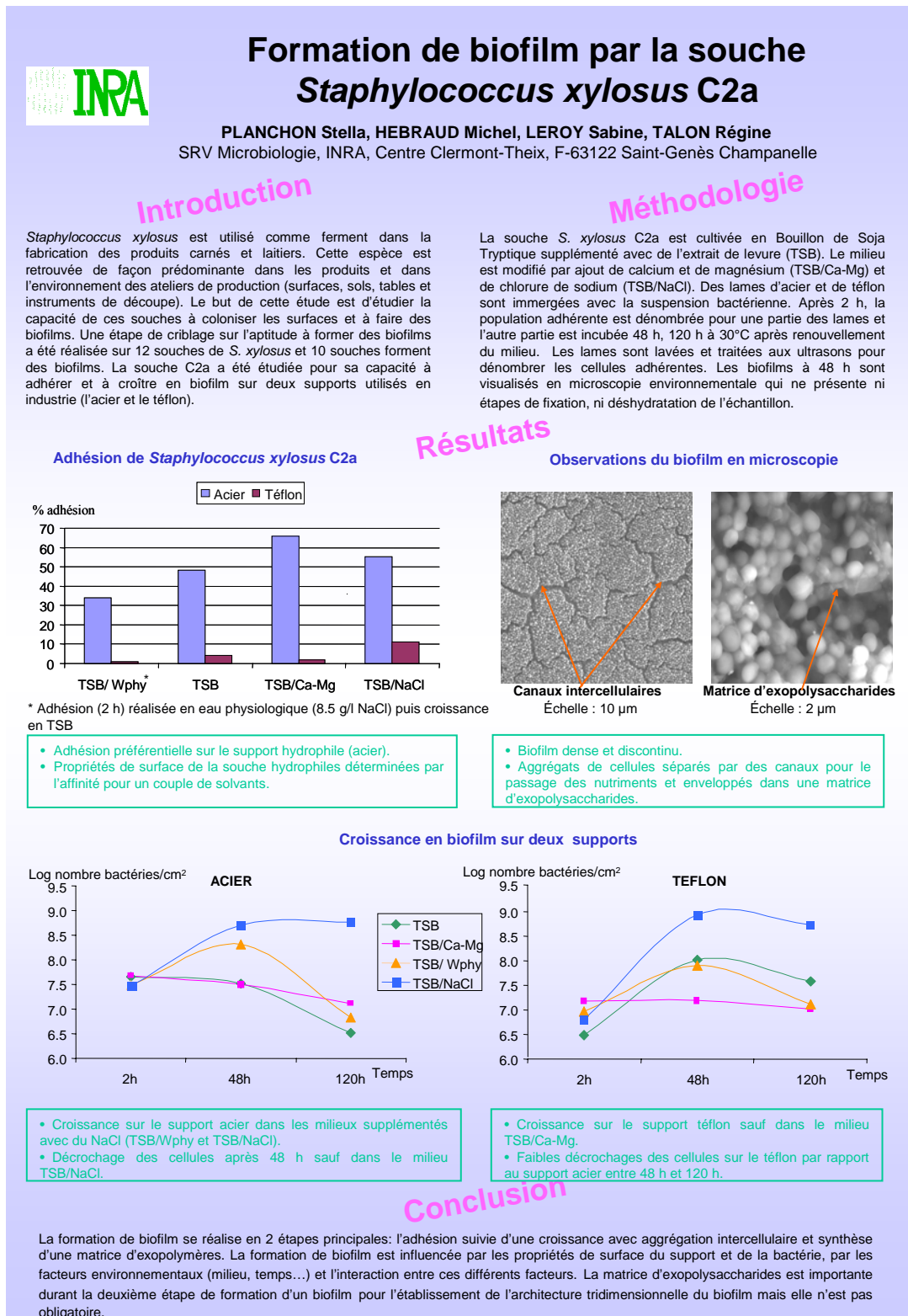
Effect of solubilisation



- Solubilisation with CHAPS gave better results than with TFE buffer (Gels 4 and 5)
- The detergent ASB was the best method for solubilisation of membrane proteins (Gel 6)
- Some protein spots will be further identified by MALDI-TOF mass spectrometry to ascertain their localization.



“Formation de biofilms par la souche de *Staphylococcus xylosus* C2a”. Affiche présentée au Colloque Produits alimentaires et fermiers, Clermont-Ferrand, France.



“Analyse protéomique des fractions pariétale et membranaire de *Staphylococcus xylosus* C2a afin de caractériser sa physiologie en biofilm”. Affiche en préparation qui sera présentée aux Rencontres des Microbiologistes de l’INRA, Dourdan, France, 28-30 juin 2006.

Stella Planchon¹, Christophe Chambon², Ingrid Chafsey¹, Leroy Sabine¹, Michel Hébraud^{1,2*},
Régine Talon¹

¹Unité Microbiologie, ²Plate Forme protéomique, Unité Qualité des Produits Animaux, INRA, Centre Clermont-Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

Staphylococcus xylosus est un coque à Gram positif fréquemment isolé de la peau des mammifères et occasionnellement de la peau humaine. Ainsi cette espèce est fréquemment isolée dans l’environnement des ateliers de transformation en agroalimentaire et des produits carnés et laitiers. Elle est d’ailleurs utilisée comme ferment dans la fabrication de ces produits ou elle contribue à leurs qualités sensorielles. Sa capacité à coloniser la peau et l’environnement est certainement due à son aptitude à former des biofilms. En effet, nous avons montré que *S. xylosus* colonise divers supports utilisés en agroalimentaire. Les gènes *icaA* et *bap*, impliqués dans la formation de biofilm chez *S. epidermidis* et *S. aureus*, ont été recherchés mais seul le gène *bap* a été mis en évidence. Comme les protéines de surface jouent un rôle clé dans la formation des biofilms, nous avons développé une méthode d’analyse des protéines pariétale et membranaire de *S. xylosus* par une approche protéomique. L’étude des protéines de surface est un réel challenge car elles sont difficiles à extraire, solubiliser et analyser due à leur nature hydrophobe. Les protéines pariétales ont été isolées à partir d’un traitement des cellules à la lysotaphine et solubilisées grâce à l’addition d’un détergent. Les protéines membranaires ont été isolées à partir d’une lyse mécanique des protoplastes, suivie d’une ultracentrifugation, d’une délipidation et d’une solubilisation avec un détergent. Dans la fraction pariétale, nous avons identifiés 67 spots protéiques correspondant à 36 protéines. Parmi ces protéines, 9 contiennent un signal peptide, 8 ont un domaine transmembranaire, 4 ont une localisation membranaire et 15 sont cytosoliques dont 9 ont déjà été décrites en surface bactérienne. Dans la fraction membranaire, 115 spots protéiques ont été identifiés correspondant à 69 protéines. Parmi ces protéines, 7 contiennent un signal peptide, 19 ont un domaine transmembranaire, 7 ont une localisation membranaire, 8 interagissent avec des composants membranaires, 28 sont cytosoliques dont 6 ont déjà été

décrites en surface bactérienne. Les deux techniques d'extraction se sont révélées spécifiques puisque 9 protéines seulement sont communes aux deux fractions.

Les méthodes développées nous ont permis d'obtenir pour la première fois les profils protéiques de la paroi et de la membrane de *S. xylosus*, seul staphylocoque à coagulase négative étudié par une approche protéomique. La comparaison des profils protéiques de cultures en biofilm et planctonique a révélée que 126 spots protéiques dont 82 sont surexprimées et 44 sont sous exprimées en biofilm. Leur analyse permettra de comprendre les mécanismes mis en jeu par *S. xylosus* lors de sa croissance en biofilm.

NOMENCLATURE

AAP	Accumulation Associated Protein
Agr	accessory gene regulator
AIP	Auto Inducing Peptide
Arl	autolysis related locus
ArlR	autolysis related locus Regulator protein »
ArlS	autolysis related locus Sensor protein
ATL	Autolysine
BAP	Biofilm Associated Protein
Clf	clumping facteurs
Ebh	ECM-binding protein homologue
Ebp	Elastin binding protein
FnBP	Fibronectin Binding Protein
Hla	hémolysine alpha
Hld	hémolysine delta
Ica	InterCellular Adhesion
IcaR	intercellular adhesion repressor
MarR	Multiple antibiotic resistance Regulator
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
ORF	Open Reading Frame
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PNAG	Poly- β 1,6-N-acétylglucosamine
PNSG	Poly-N-Succinyl Glucosamine
PS/A	Polysaccharide Capsular Adhesin
QS	Quorum Sensing
RAP	RNA III Activating Peptide
Rbf	Regulator biofilm formation
RIP	RNA III Inhibitor Peptide
Rot	Repressor of toxines
SAA	Slime Associated Antigen
SaeRS	<i>S. aureus</i> exoprotein expression
Sar	staphylococcal accessory regulator
Sdr ou SD repeats	répétitions Sérine-Asparagine
SigB	sigmaB
Spa	Staphylococcal protein A (protéine A)
SrrAB	Staphylococcal respiratory response
SvrA	Staphylococcal virulence regulator
TcaR	régulateur transcriptionnel de la teicoplanine
TetR	Tetracycline Regulable
TRAP	Target RNA III Activating Peptide