

« La vie en mode biofilms »

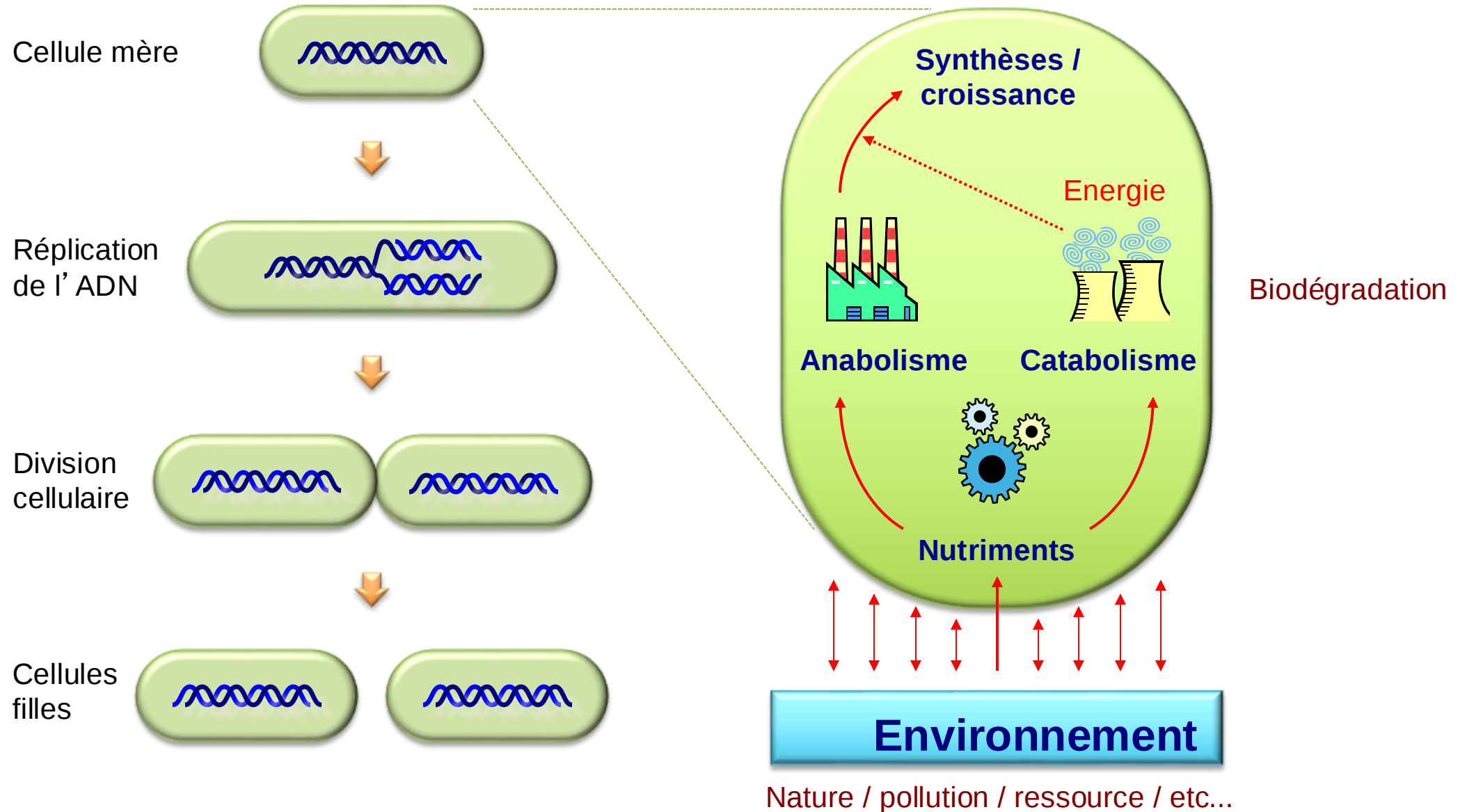
Christophe Merlin (LCPME)

03 72 74 72 40

Christophe.Merlin@univ-lorraine.fr

L'histoire d'une vie bactérienne

Grandes fonctions biologiques



« La vie en mode biofilms »

- Qu' est ce qu' un biofilm?

- Structure & diversité
- Compartiments extracellulaire
- Hétérogénéité

- Formation des biofilms

- Processus de développement des biofilms
- Moyens d'études & approches
- Les circuits de régulation

- L'hétérogénéité du système biofilm

- Stratification physiologique en biofilm
- Diversification génétique

- Quorum sensing et sociobiologie

- communication cellulaire

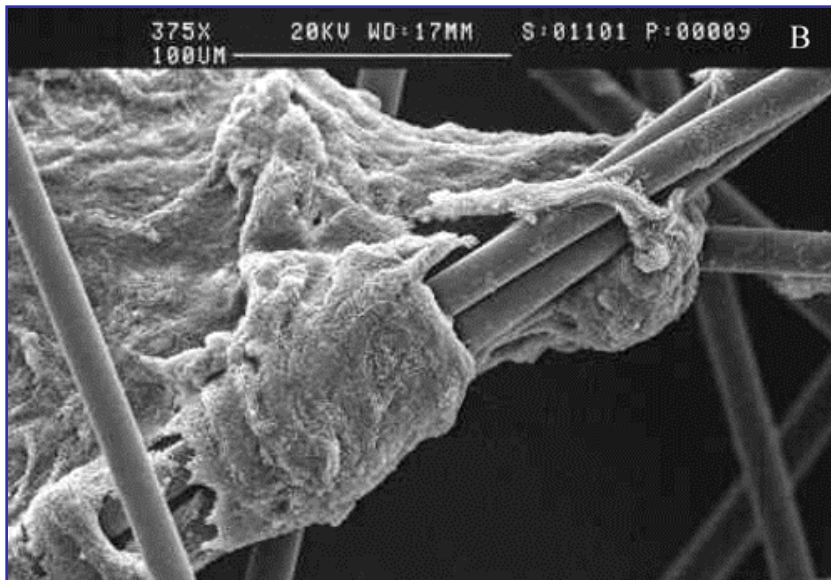
Partie I

Qu'est ce qu'un biofilm?

... biofilms en images

Biofilms de *P. aeruginosa* sur différents supports

sur laine de verre



sur bille d'argile

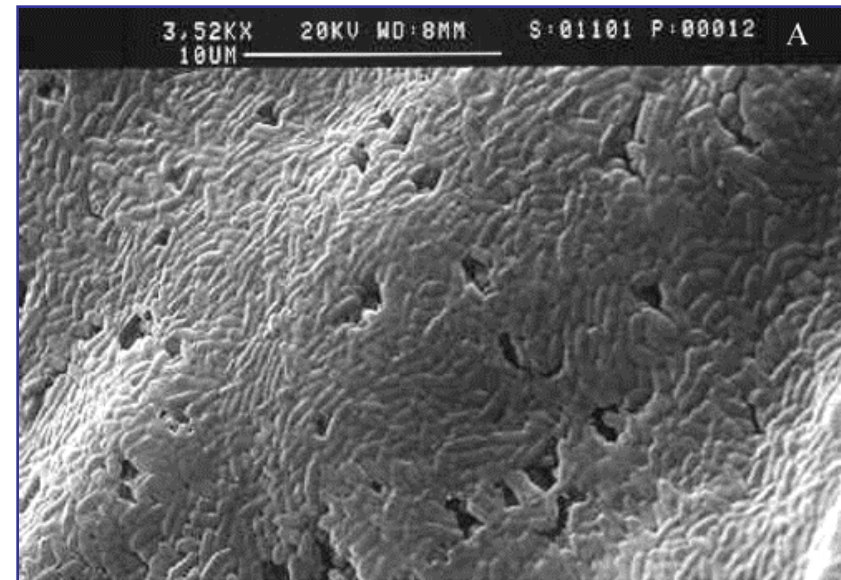


Figure 3: SEM micrograph of (A) a 2-day-old biofilm formed on a CB (magnification: $\times 3520$) and (B) a 2-day-old biofilm formed on GW (magnification: $\times 375$). After incubation for 48 h, bacteria formed a single cell layer on CBs, whereas biofilms grown on GW formed an extensive "canopy".

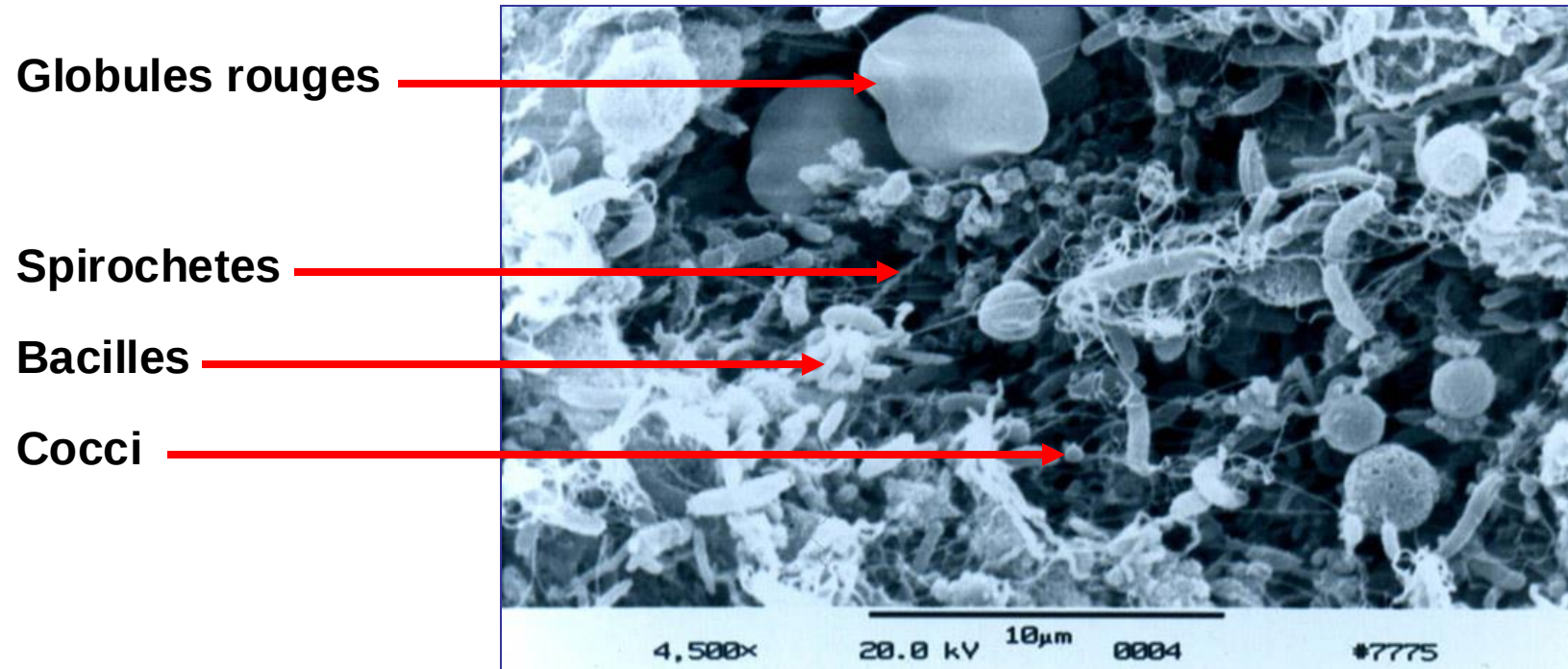
Biofilm de *P. aeruginosa* sur plastique

biofilm = mode de vie communautaire / plusieurs couches



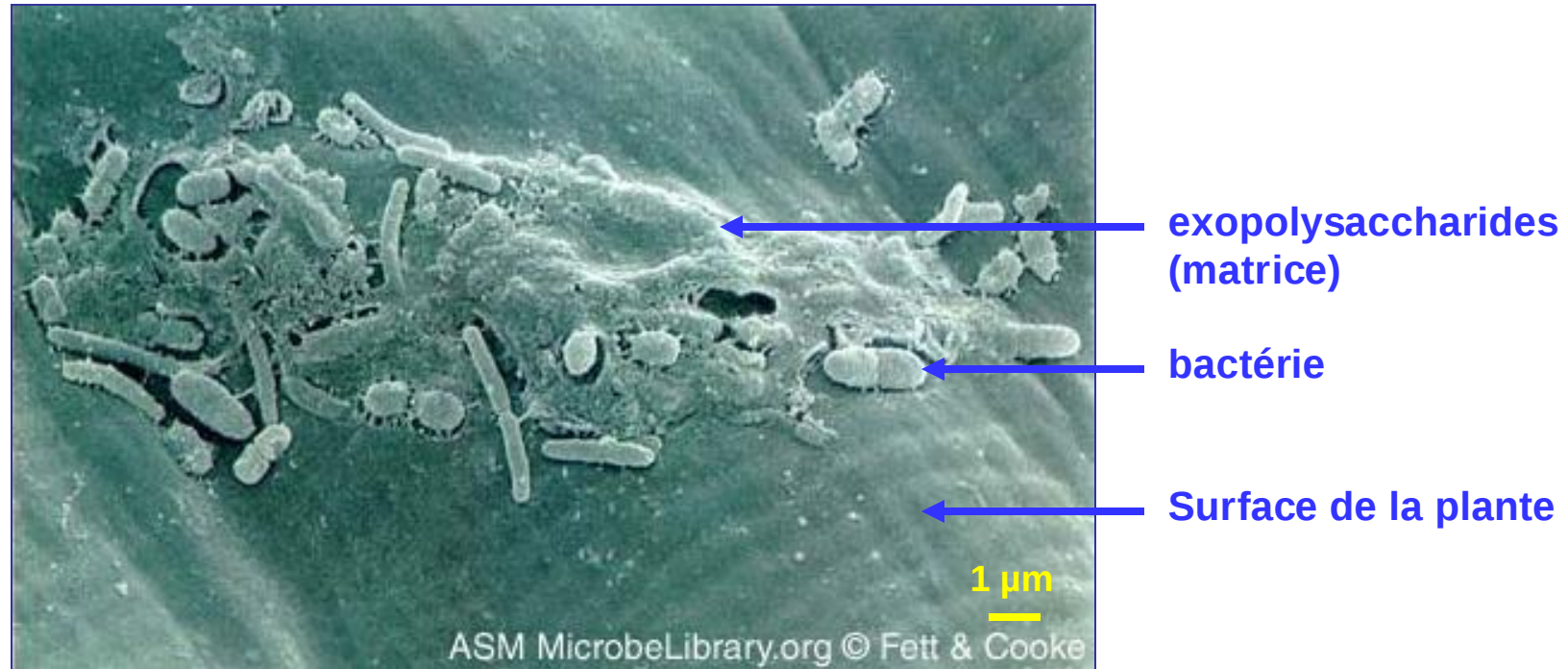
« Electron micrograph of a laboratory-grown *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Bacteria live in multicellular clusters with individual cells in close proximity. The biofilm was grown on a plastic substratum (bottom). Bar=5 μ m. »

Biofilms complexes et diversité microbienne



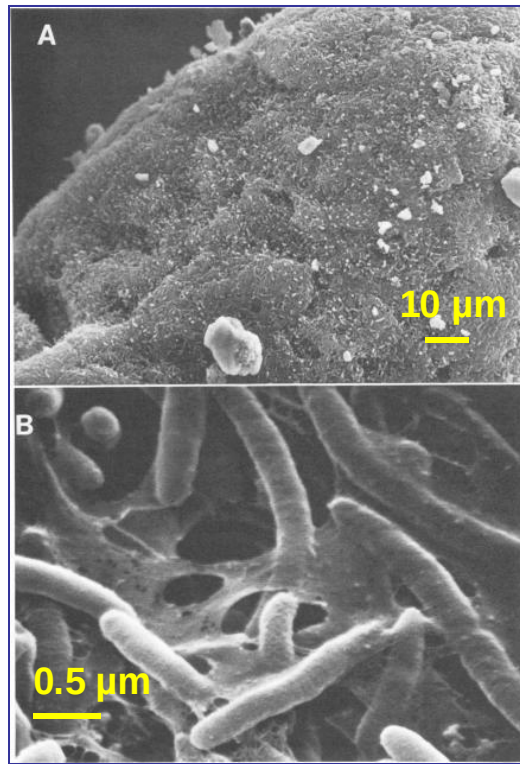
Développement d'un biofilm sur une membrane de polytetrafluoroéthylène (PTFE) utilisée pour la de régénération de tissus dans le cadre de maladies périodontiques.

Biofilm sur tissu végétal

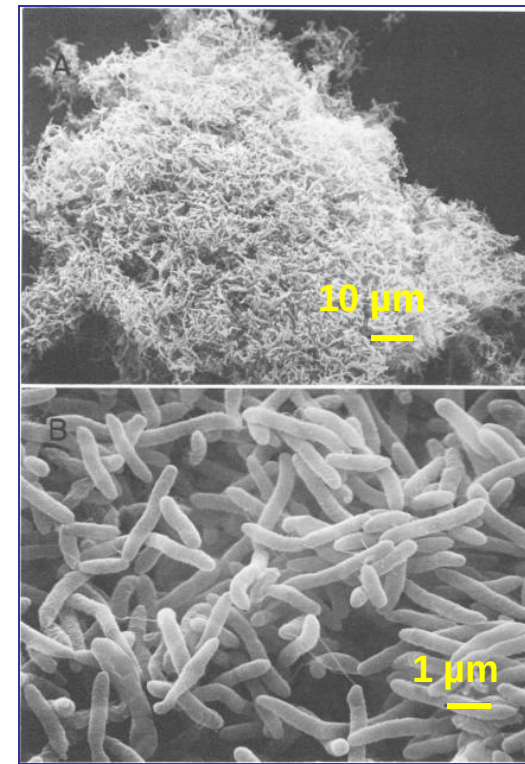


« ...the micrograph depicts a naturally-occurring biofilm on a plant surface... »

Biofilm *versus* cellules libres



Bactéries en biofilm (floc)



Bactéries sous forme libre

(Microscopie électronique à balayage de *Pseudomonas* sp.)

Cellules et matrice extracellulaire

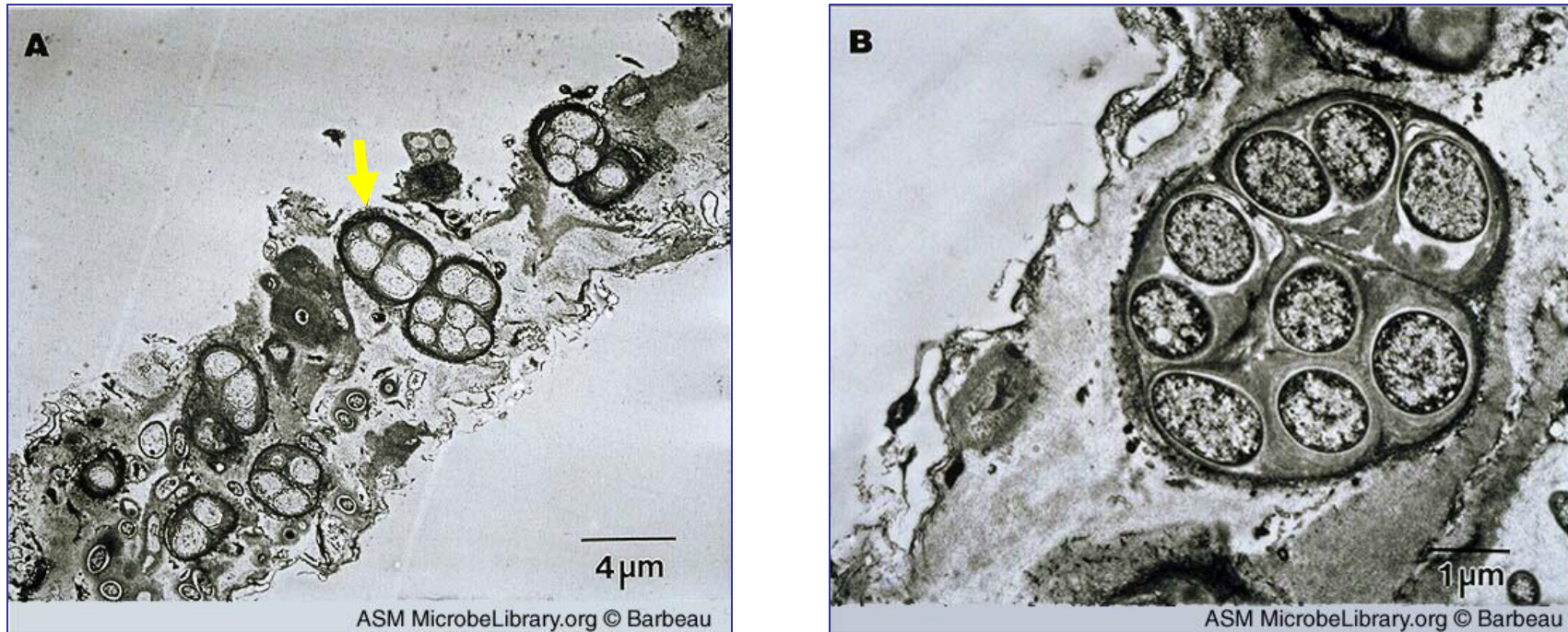
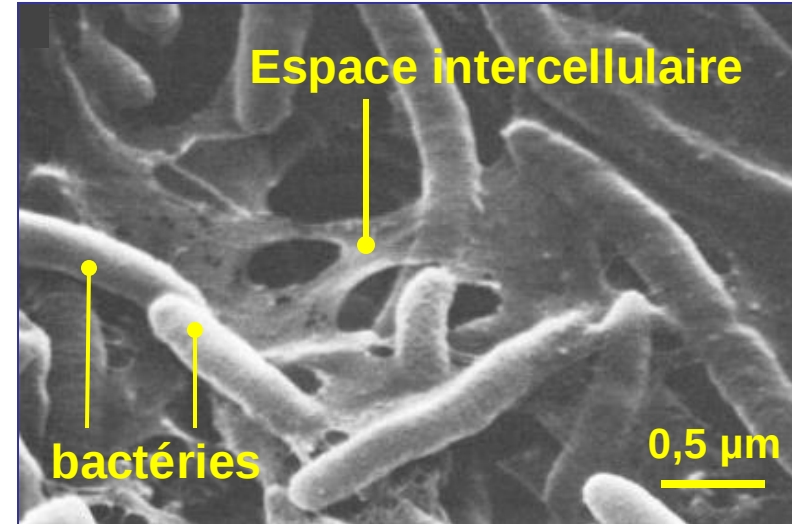
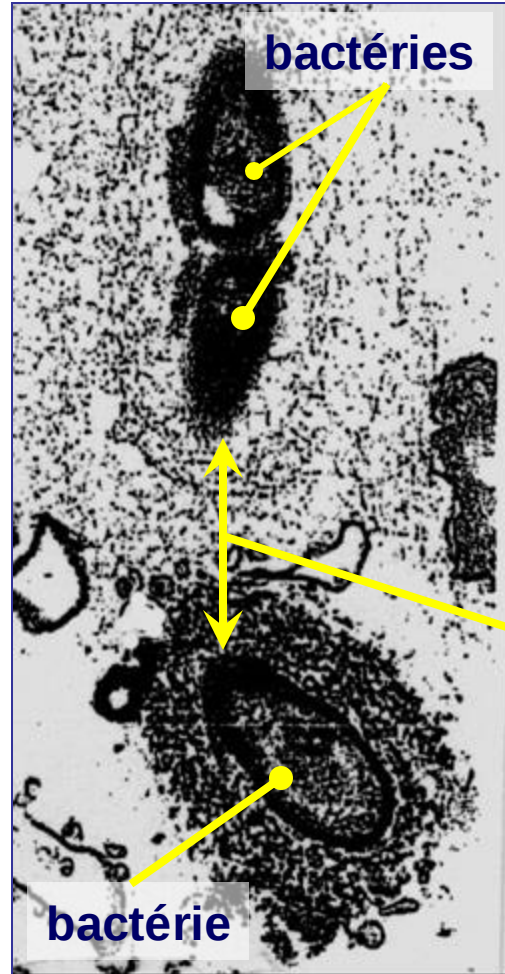


Figure: Electron photomicrograph of a typical freshwater biofilm cross-section showing microcolonies of bacteria embedded in a dense extracellular envelope (arrow).

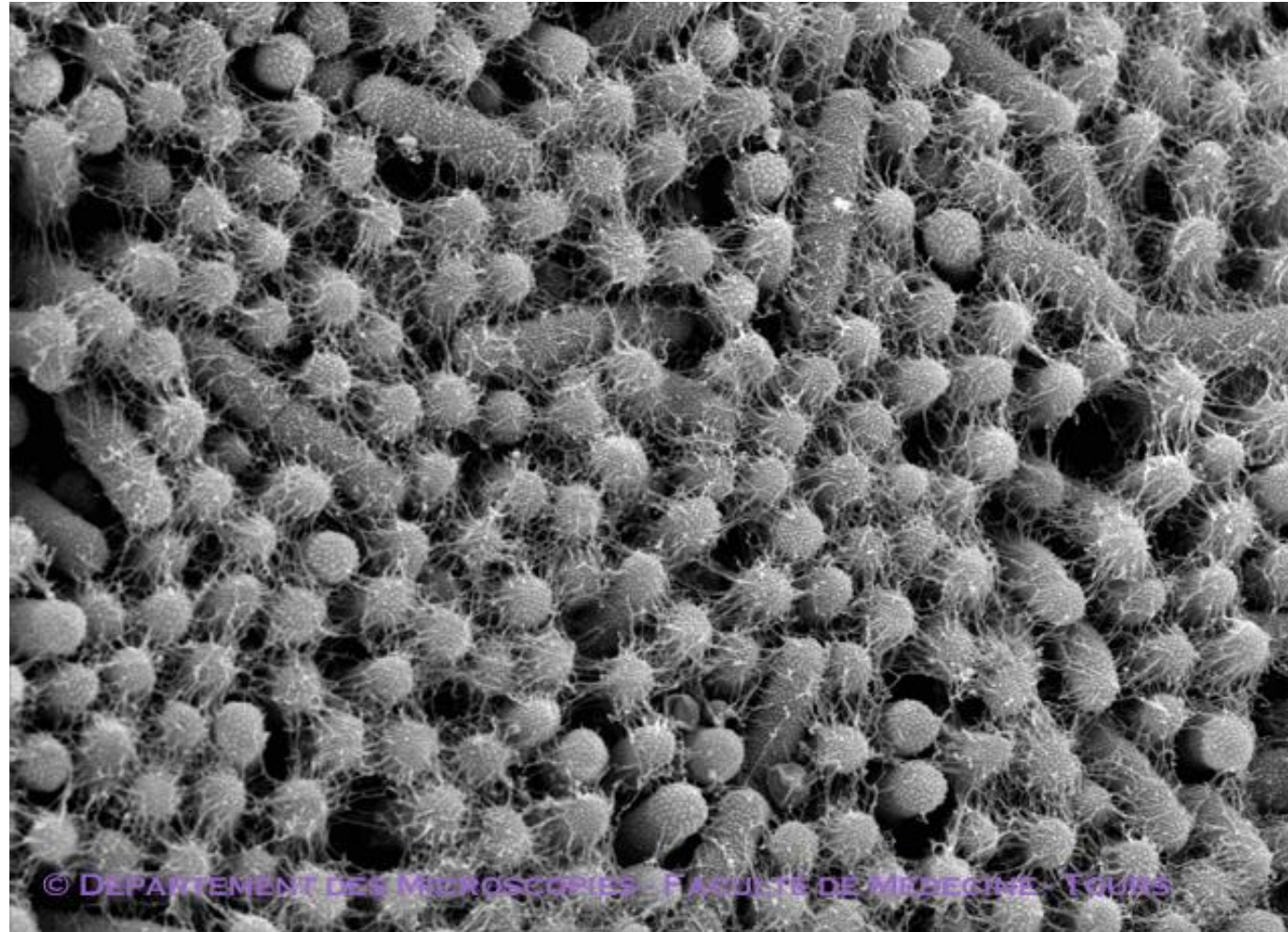
Hétérogénéité de la matrice extracellulaire



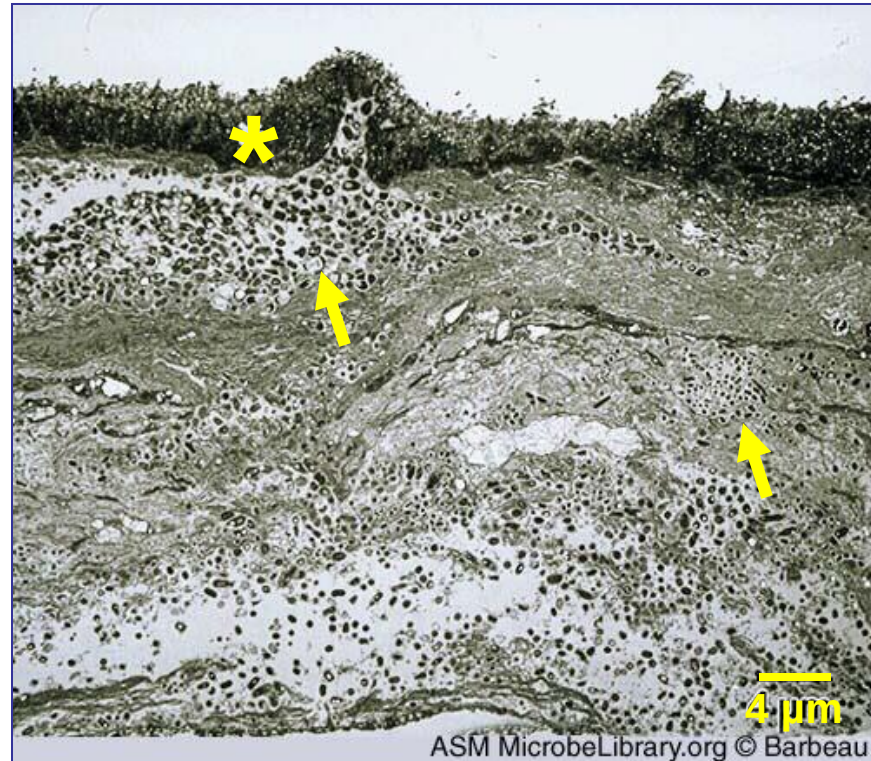
Espace intercellulaire: Exopolymères

- Polysaccharides
- Polypeptides
- Acides nucléiques

Rôle des appendices de surface dans la formation de biofilm

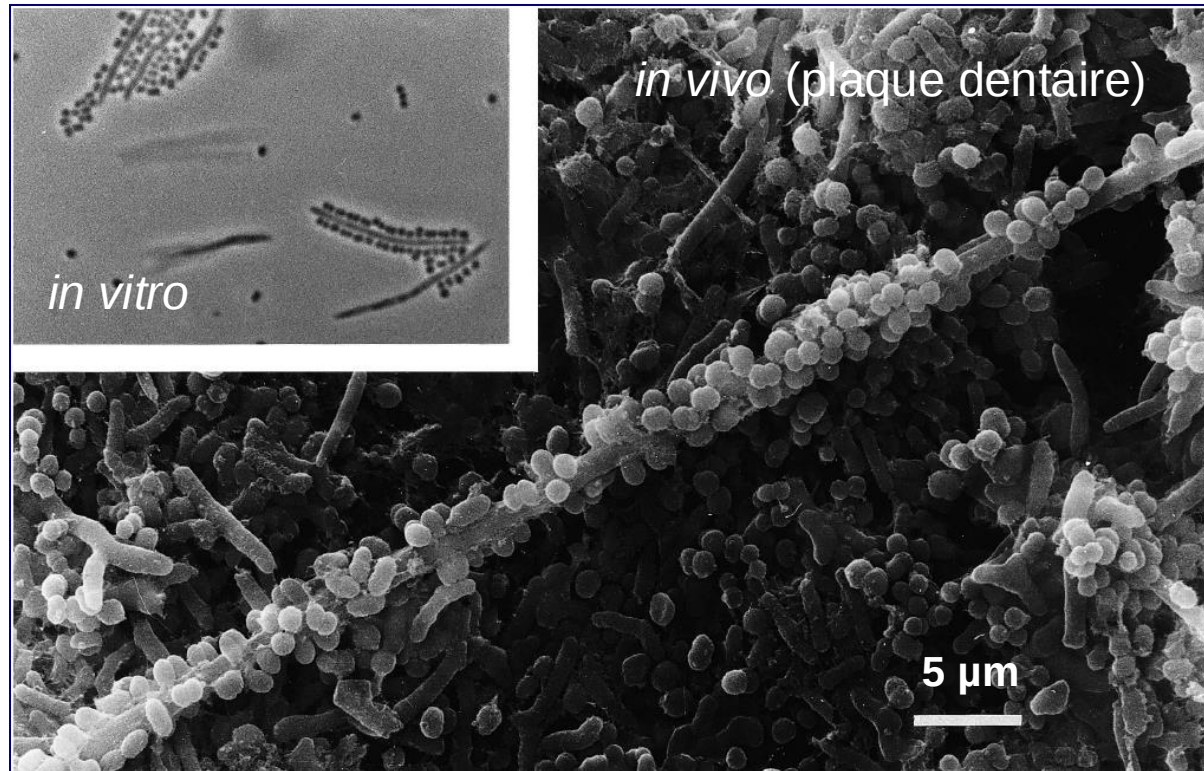


Structure hétérogène & microcolonies



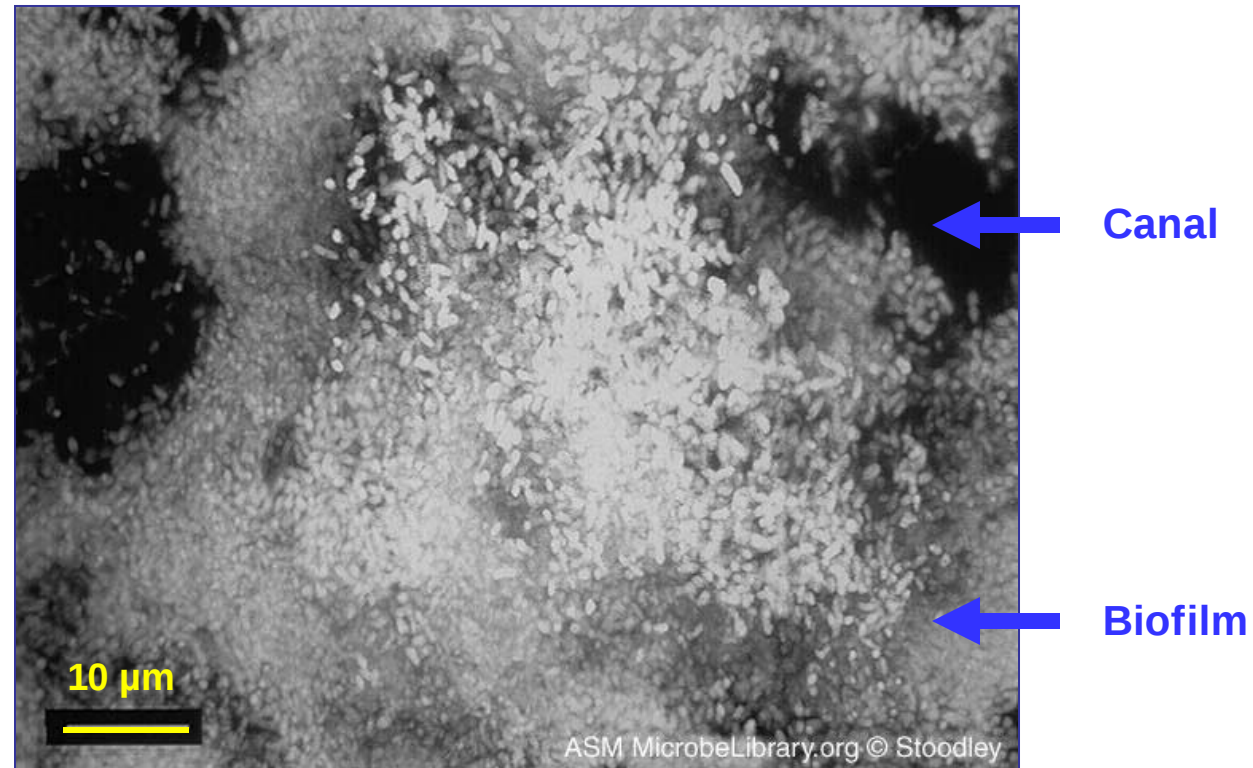
« ... section of the high volume suction line from a dental unit. The deposits on the inner wall (*) of the evacuation line are mainly composed of heterogeneous microcolonies (arrows) composed principally of bacteria and extensive polysaccharide material and tissue debris »

Structure hétérogène & organisée



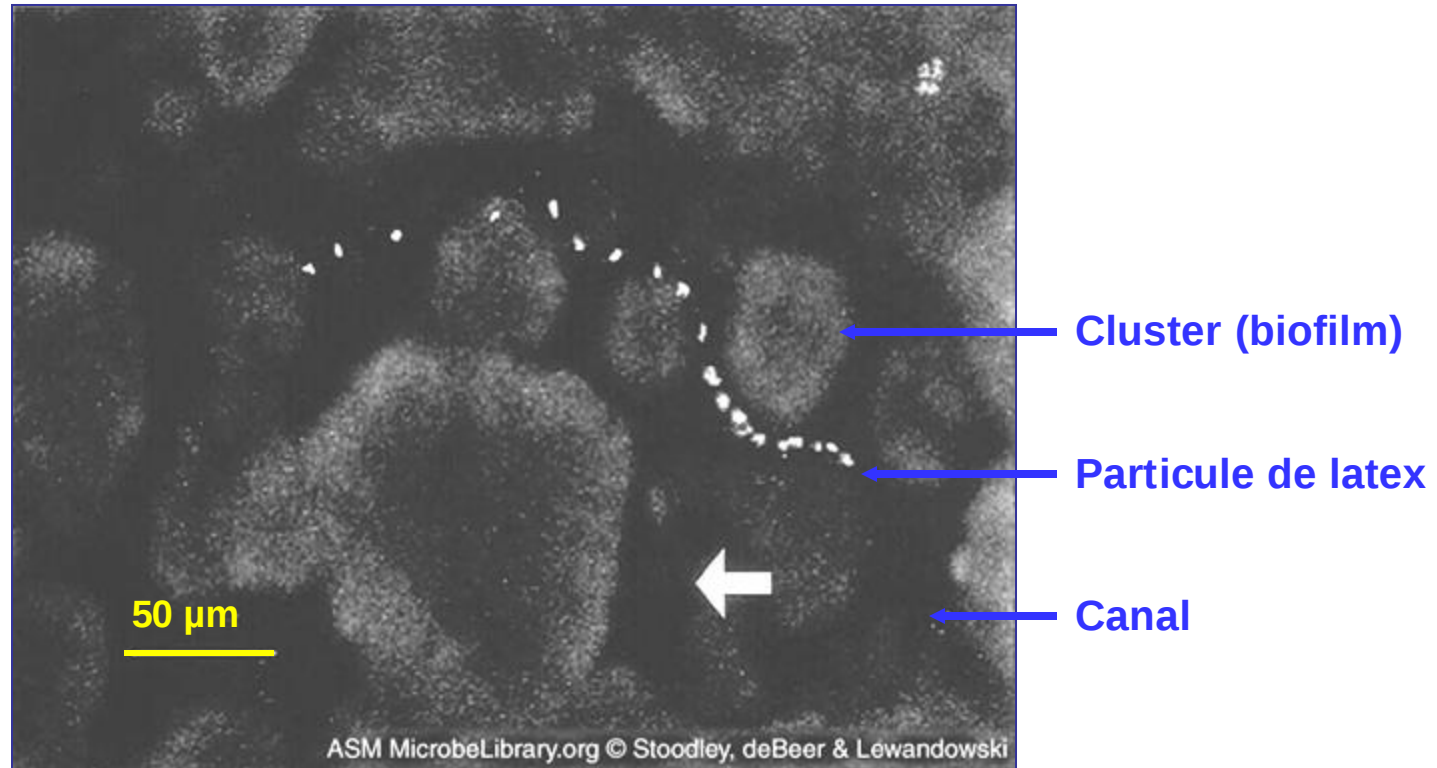
Structure en épi de maïs : coagrégation entre deux types de microorganismes, ex. « fusobactéries » & « streptocoques ».

Structuration du biofilm



« ... Biofilm cluster composed of microbial cells in a slime matrix (not stained)... This open structure allows more nutrients to get to the biofilm microorganisms than was previously thought. ... »

La « vascularisation » du biofilm



Time Exposure (2.3-s intervals) of a Fluorescent Particle (0,28 μm diameter)
Moving Through a Biofilm (10-20 μm / sec)

Biofilms en forme de champignon chez *P.aeruginosa*

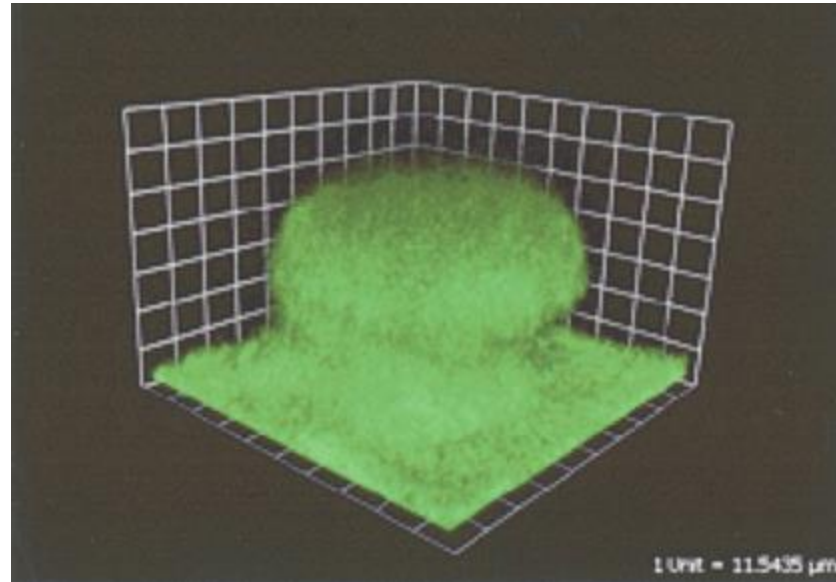


FIG. 4. "The perfect mushroom" Micrograph represents a three-dimensional image of a *P. aeruginosa* PAO1 biofilm grown in a flow cell reactor. The biofilm field has propagated the perception that all species march through a program of gene expression to form mature biofilms with this characteristic structure. Much data presented at the meeting contradicts this: biofilms come in all shapes and sizes, and their architecture is as much a consequence of the environment as it is of gene expression. Cells are expressing GFP. Magnification, x630. Image courtesy of Ehud Banin, University of Iowa.

Biofilms et hétérogénéité physiologique

Cellules synthétisant de la phosphatase alcaline (vert) suite à une carence en phosphate

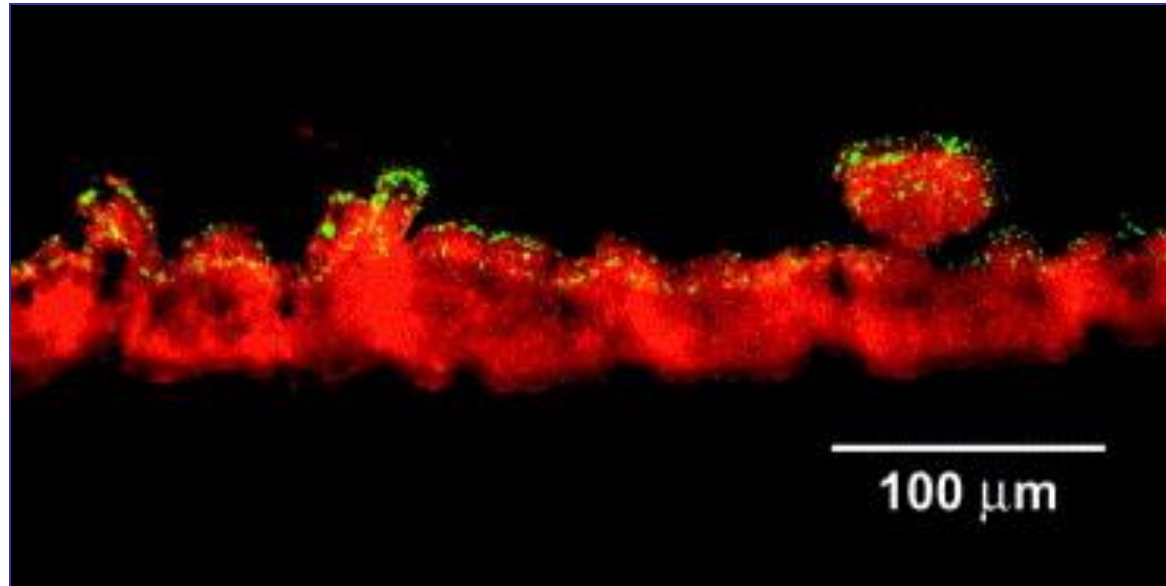


Figure 1. Biofilm-embedded bacteria show non-uniform distributions of physiological activity. In this *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, green indicates cells capable of synthesizing a protein (alkaline phosphatase) in response to an environmental stimulus (phosphate starvation). Red indicates all cells independent of their activity.

Qu'est-ce qu'un biofilm microbien?

Un biofilm est une couche de microorganismes, contenus dans une matrice extracellulaire et adhérant à une surface (ou associés à une interface).

1. Microorganismes sur une surface

- film cellulaire de quelques μm à quelques mm
- colonisation de surfaces et interfaces
- mode de vie communautaire
- peut être composé de plusieurs espèces (procaryotes et eucaryotes)
- mode de vie préférentiel à l'état naturel (plutôt que planctonique)

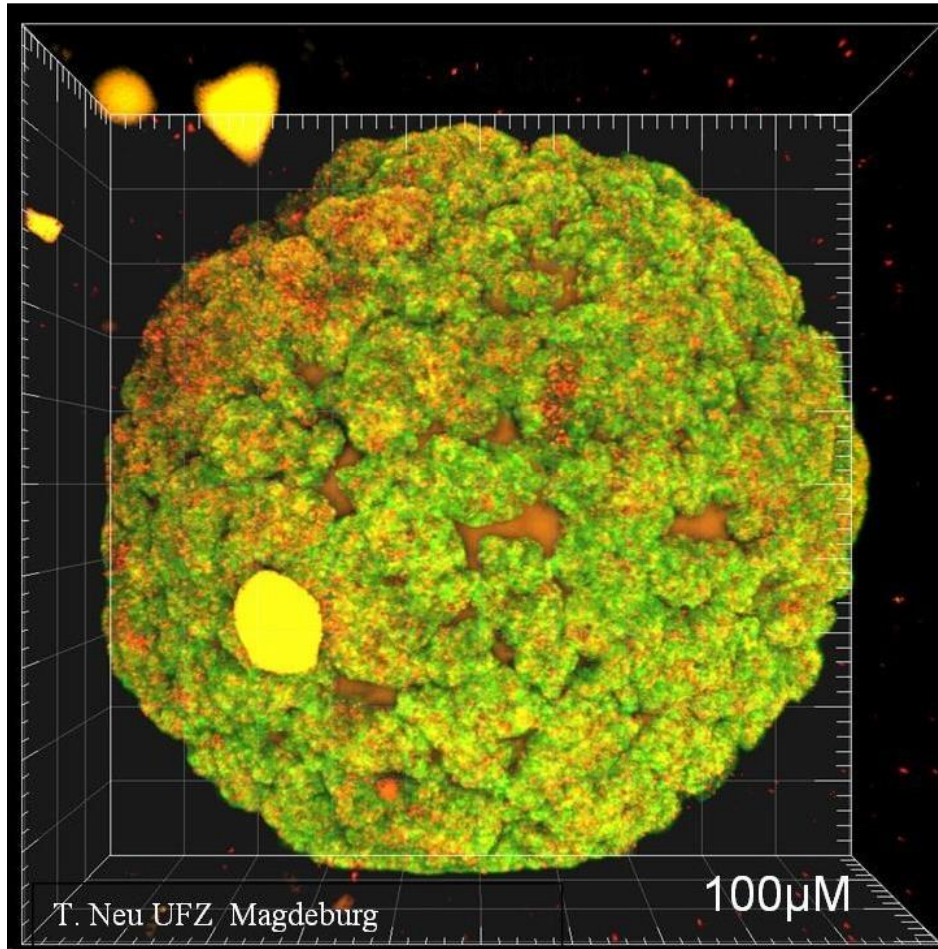
2. Matrice extracellulaire

- riche en biopolymères (EPS = Extracellular PolymERIC Substances)
- rôle des appendices de surface (fimbriae (pili), flagelles,...)
- variable d'un biofilm à l'autre, variable selon la position dans le biofilm
- zone d'échange entre cellules et environnement

3. Organisation structurée

- milieu hétérogène (composition, structure, activité, physiologie,...)
- structures identifiables : « champignons », vascularisation,...
- programme génétique de développement des biofilms ?

Remarque : biofilm sur gouttelette d'alcane chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17



« Durant sa croissance sur les n-alcane, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 forme un biofilm à l'interface alcane/eau. La formation du biofilm serait un processus d'adaptation pour l'utilisation des alcanes à longue chaîne qui sont des composés particulièrement insolubles et hydrophobes. »

biofilm aux interfaces liquide-liquides

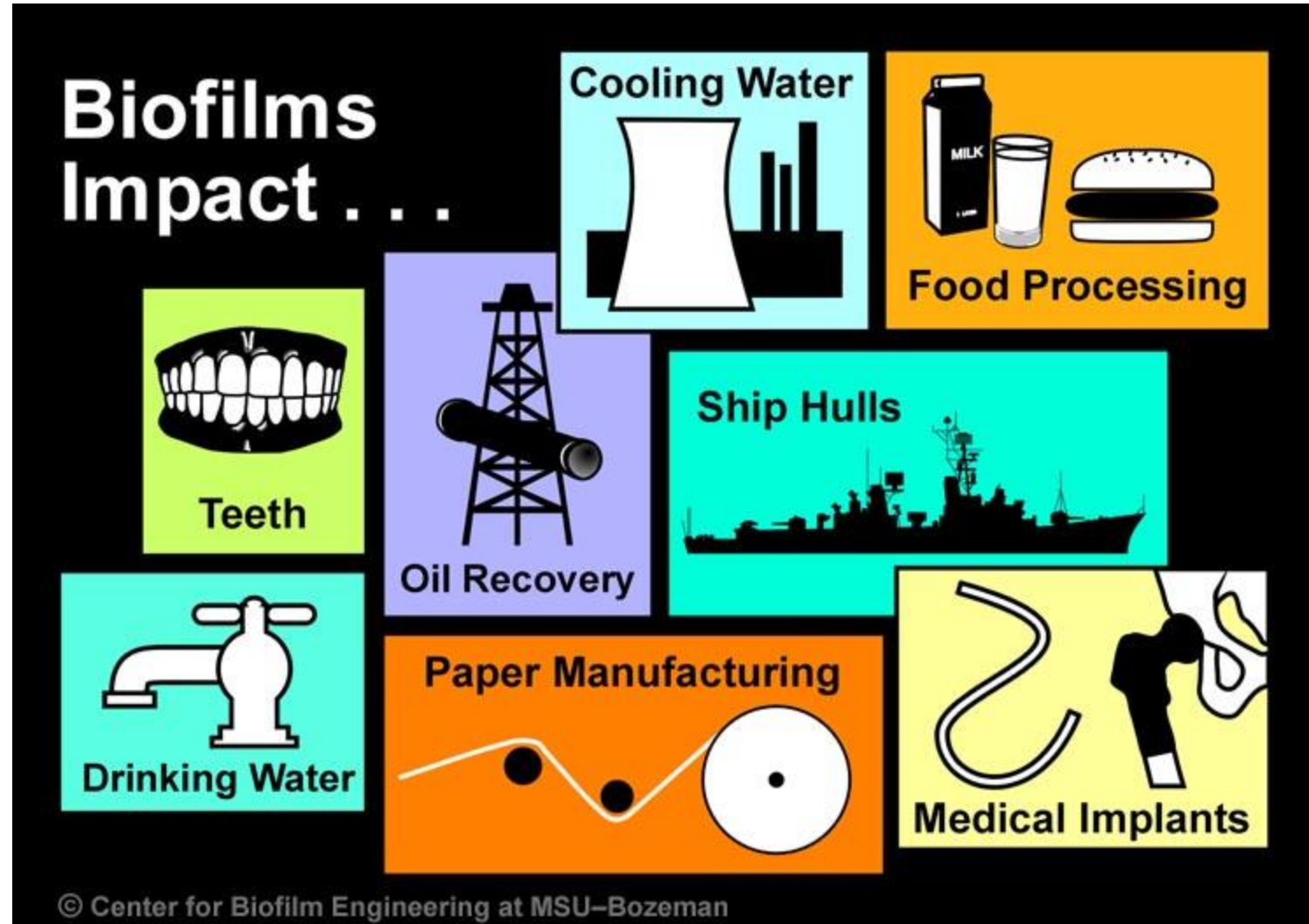
Relation biofilm / métabolisme

Partie I.2

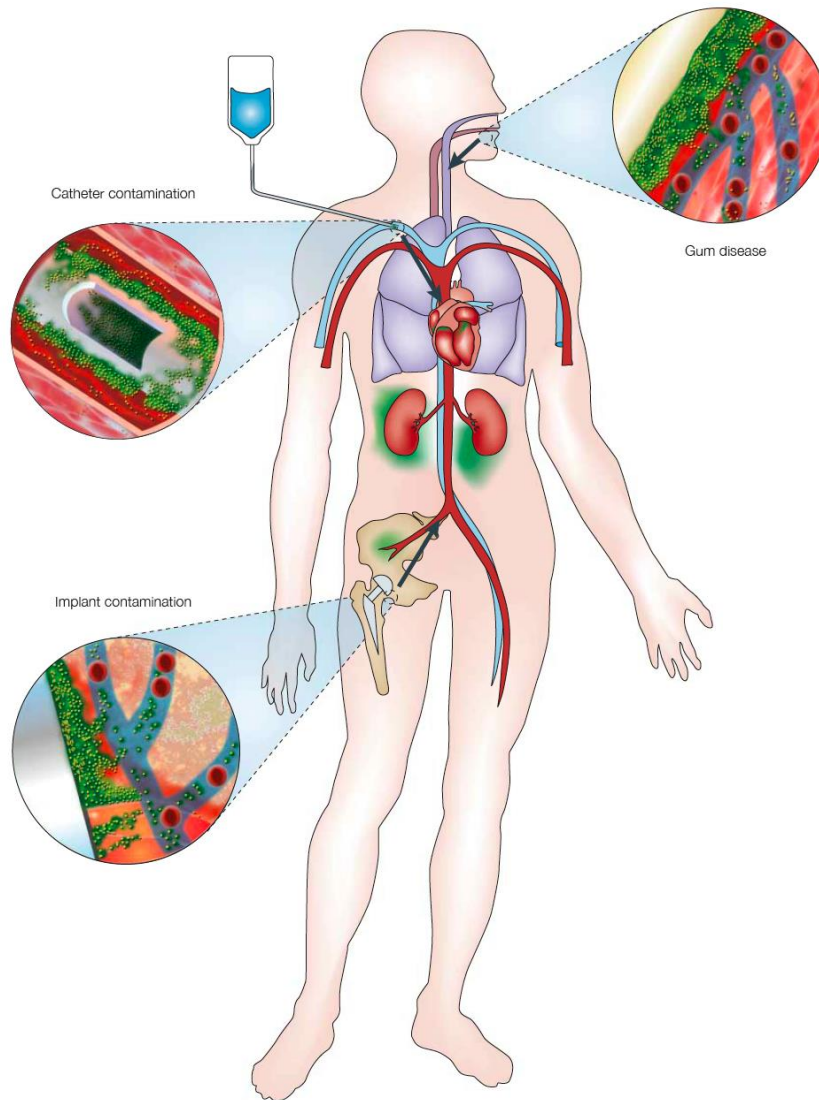
Ou trouve t-on les biofilms?

... partout!!!

Les biofilms sont partout!



« les biofilms à la conquête du corps humain »



<http://www.biofilmsonline.com/cgi-bin/biofilmsonline/00358.html>

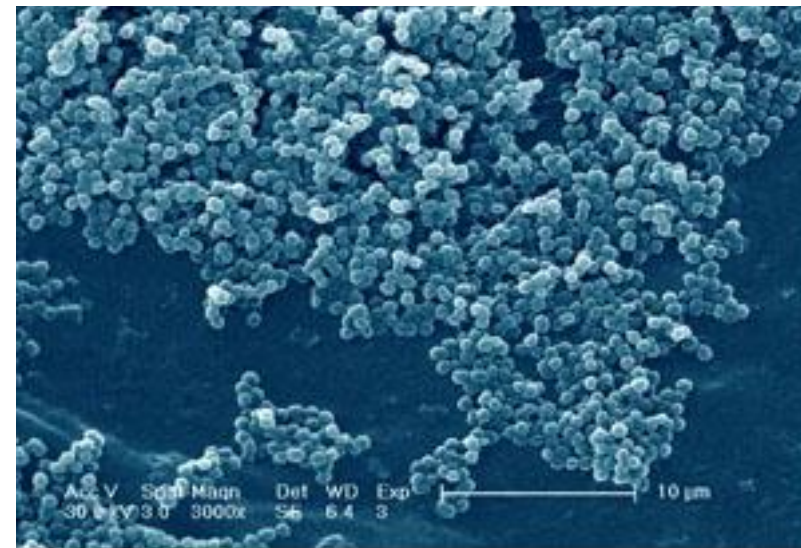


Figure 2a. Scanning electron micrograph of the surface of a hydrogel-coated catheter after biofilm formation by *S. epidermidis* 414 for 24 h (X3000 magnification).

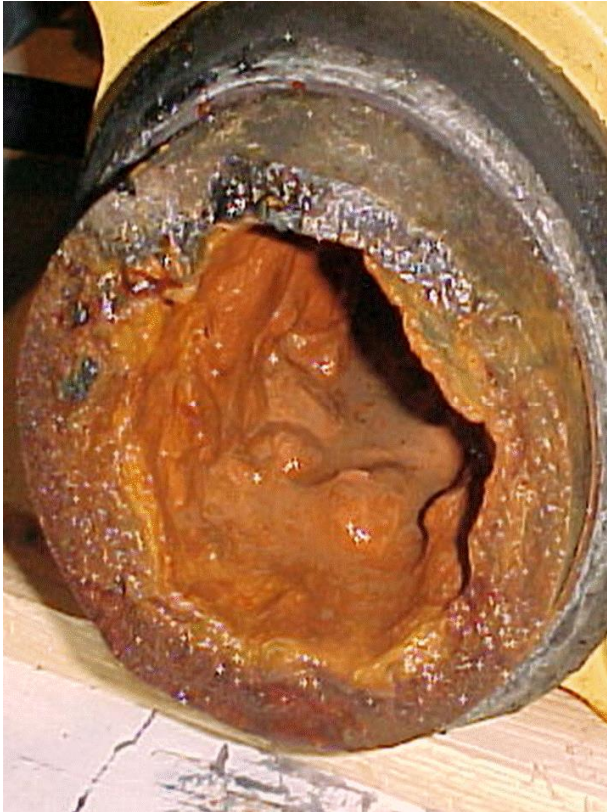
Biofilms et échangeurs



Fig. 2 Heat exchanger of a pump, protected by a biodegradable corrosion inhibitor, after 6 months of operation. The corrosion inhibitor is completely degraded and causes massive biofouling

« The additives can represent nutrients. As an example, chromate has been replaced by other corrosion inhibitors because of its environmentally undesirable properties. A new organic inhibitor was introduced which had excellent properties, including full biological degradability. The system protected by this substance failed after 3 months. Biodegradation of the inhibitor had started during operation and coated the exchanger surfaces with a thick microbial layer (Fig. 2). »

Biofilms et réseaux d' eau



« ... In 2000, heavy rains brought livestock manure laden with *E.coli* 0157:H7 and *Campylobacter jejuni* bacteria into Walkerton, Ontario's water supply. Half of the town's 5,000 residents were sickened and 7 died [31]. Following the incident, it was found that 25 miles of the town's pipeline was filled with biofilm that became a breeding ground for *E.coli* and other pathogens to obtain nutrients and multiply. *E.coli* contained in biofilms are extremely resistant to chlorine, and can be released into the drinking water when there is a significant pressure change in the water distribution system due to an industrial plant turning on a production process or a fire hydrant being opened. ... »



« Biofouling »

- formation d'un biofilm microbien
- fixation d'algues
- fixation de coquillages

Impact

- biocorrosion
- consommation en fuel : 20% en plus à 48 km/h pour un navire moyen américain (soit 400 \$ US/h) (pour un biofilm de plusieurs centaines de μm)



Stromatholithes

Empilements fossiles de cyanobactéries datant du Mésoarchéen (3200Ma – 2800Ma)

- Formations **calcaires** élaborées par l'activité de **cyanobactéries** (structure « biogénique ») qui précipitent le bicarbonate en carbonate de calcium.
- Les stromatolithes récentes sont très rares et forment des récifs en eaux peu profondes et toujours chaudes (plus de 25 ° C).
- Structures en feuillets alternant des doubles couches bactéries (**biofilms**) / minérales (carbonate de Ca)



(crédit : http://www.nature.nps.gov/geology/cfprojects/photodb/Photo_Detail.cfm?PhotoID=204)



(crédit : <http://www.futura-sciences.com/fr/>)



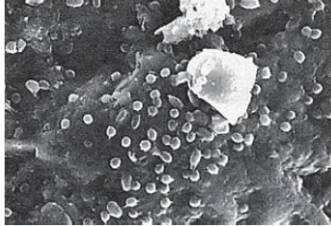
(crédit : <http://microbiologie.spectrosciences.com/>)

Tapis bactériens à Yellowstone

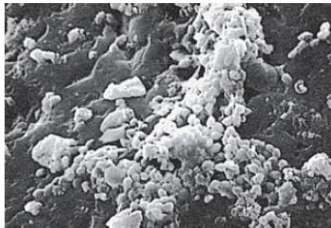


(crédit : <http://antimicrobial.blogspot.com/2009/01/biofilmsthe-good-bad-and-ugly.html>)

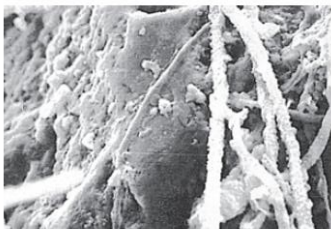
Biofilm dans les sols



T. R. G. Gray

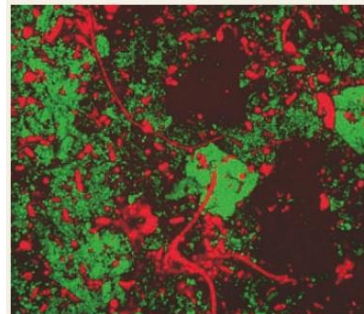
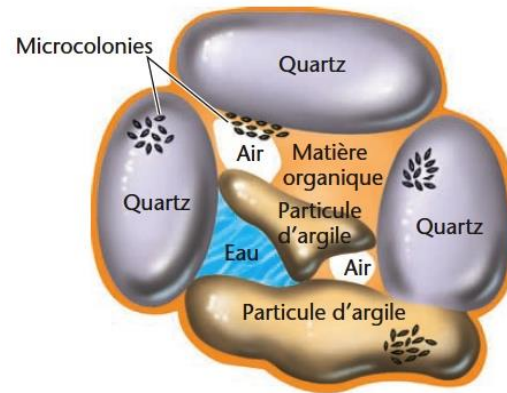


T. R. G. Gray



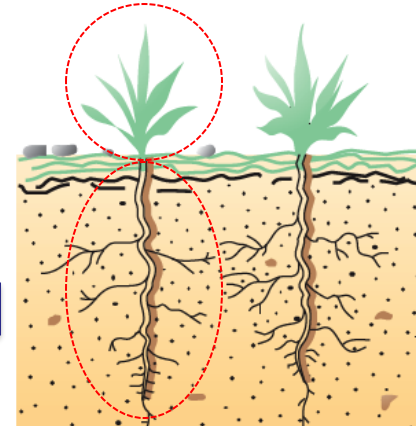
T. R. G. Gray

Biofilm sur particule de sol

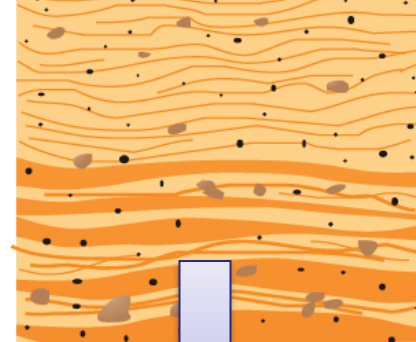


Todd O. Stevens

Phyllosphère



Rhizosphère



(a)

Subsurface

- Horizon O**
Couche de matériel végétal non décomposé
- Horizon A**
Sol superficiel (riche en matière organique, de couleur sombre, convient à l'agriculture ; nombreuses plantes et nombreux micro-organismes ; activité microbienne élevée)
- Horizon B**
Sous-sol (matières minérales, humus, les produits lessivés du sol superficiel s'accumulent ici ; peu de matière organique ; activité microbienne détectable mais plus faible que dans l'horizon A)
- Horizon C**
Base du sol (formé directement à partir des roches sous-jacentes, activité microbienne généralement très faible)

Ex. biofilm (rouge) sur fragment de basalt (vert) (prélèvement à 1500 m de profondeur)

Conclusion intermédiaire (Partie 1)

1. Avantage de la vie en mode biofilm

avantage la survie et la croissance des microorganismes

- Défense : résistance aux forces d'arrachement, phagocytose, toxiques.
- Colonisation de niches favorables en nutriments.
- Collaboration cellulaire : mode de vie en étroite association
- Processus de croissance typique dans la nature

2. Questions ouvertes

- Comment se forme les biofilms?
- Existe-t-il un « programme de développement » du mode biofilm?
- Quels sont les acteurs impliqués (protéines / gènes / régulateurs) ?