

Partie II

***... biofilms : formation et
moyens d'étude***

Etude des biofilms : approches

- **Le biofilm au laboratoire**

- Différents modèles

- **Observations microscopiques**

- Structures et sous-structures des biofilms
- Dynamique du biofilm: programme de développement?

- **Approches de génétique traditionnelle**

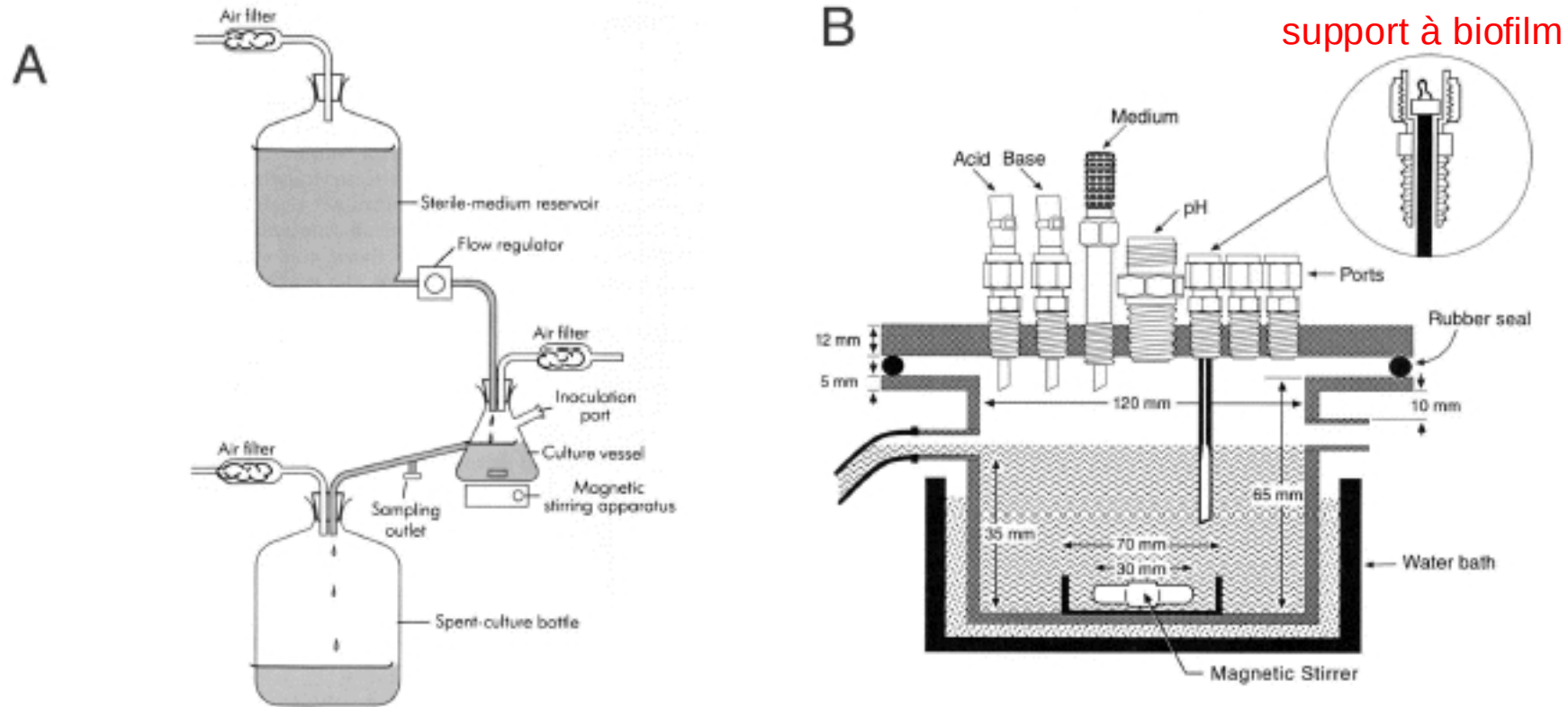
- Mutagenèse
- IVET (In Vivo Expression Technology)

- **Approches globales**

- Transcriptomique (« DNA microarray »)
- Protéomique (Electrophorèse 2D & spectrométrie de masse)

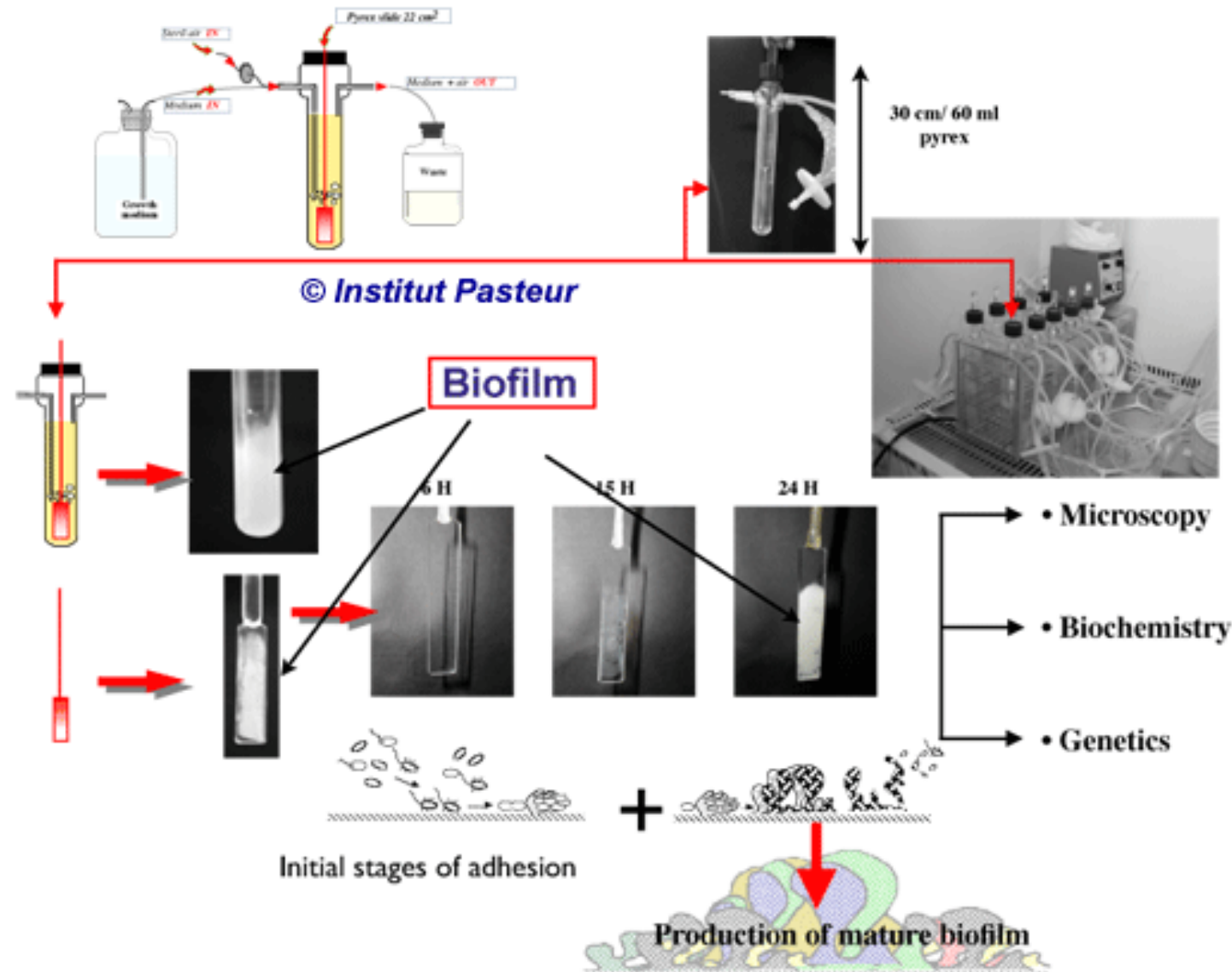


Fermenteurs et culture continue



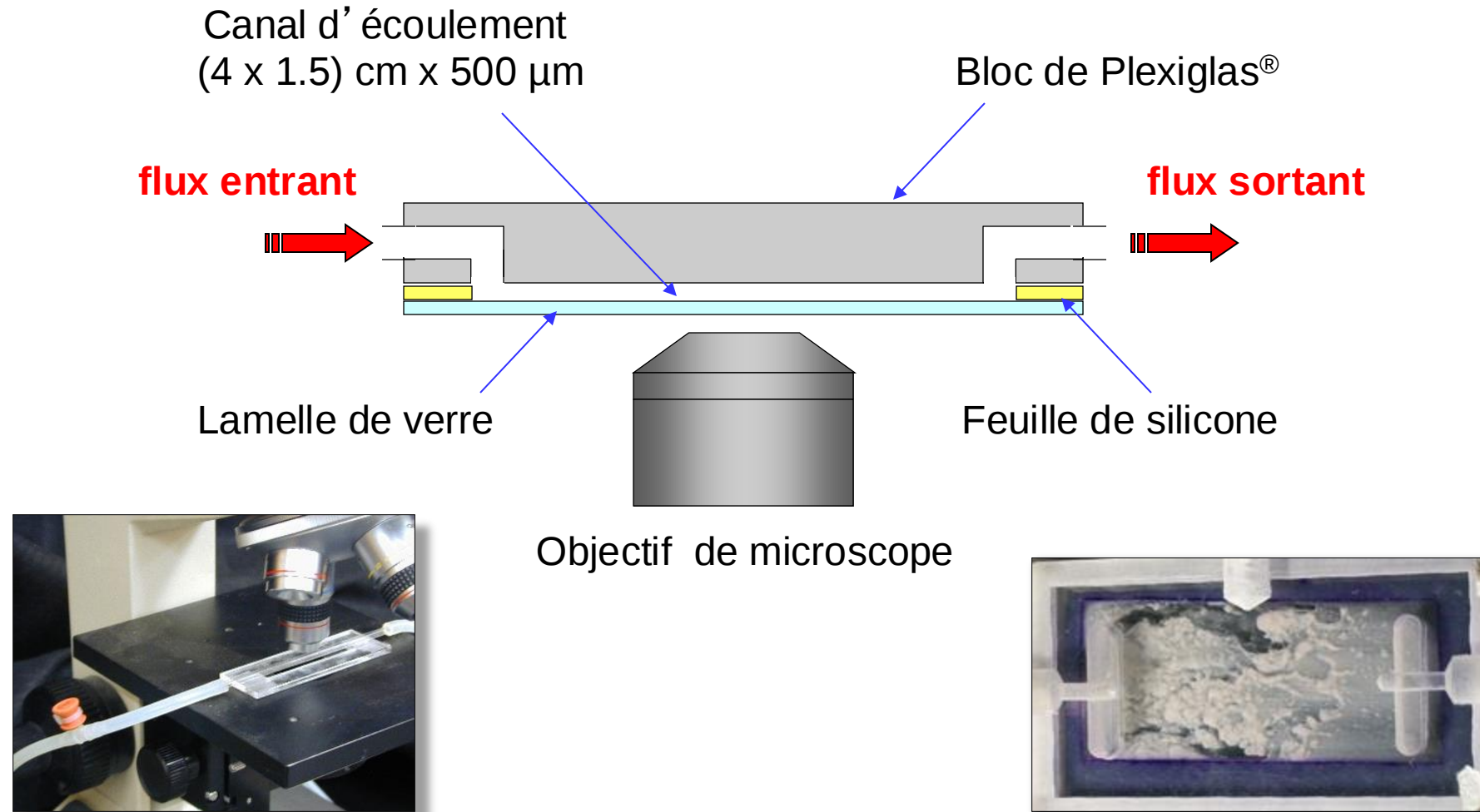
A general setup to grow microorganisms in continuous culture (A) and a basic fermentor vessel (B) containing substratum ports and support rods for biofilm accumulation. In this setup, cultures in the vessel are fed with a nutrient solution to maintain bacterial populations in the exponential or log phase of growth. The culture volume and the cell concentration are both kept constant by allowing fresh, sterile medium to enter the culture vessel at the same rate that "spent" medium, containing cells, is removed from the growing culture. Figures are reproduced from reference 49 with permission from McGraw Hill (A) and from reference 1 with permission from Academic Press (B).

Micro-fermenteurs (Institut Pasteur)



Chambres d'écoulement : observer en direct

source: LEMTA (Nancy)

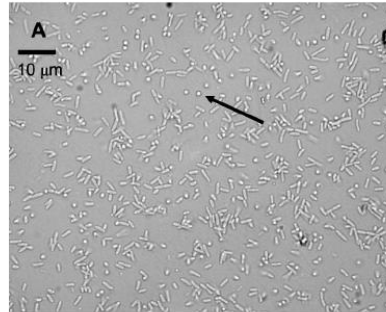


Suivi du biofilm in situ par microscopie et analyse d'images - Ecoulement très confiné

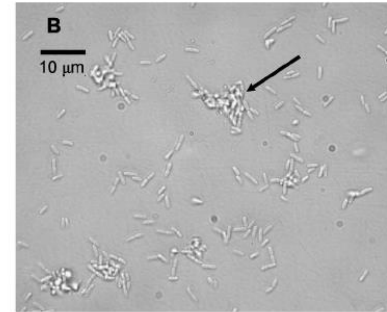
Etapes de formation d'un biofilm

(biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 en flow cell)

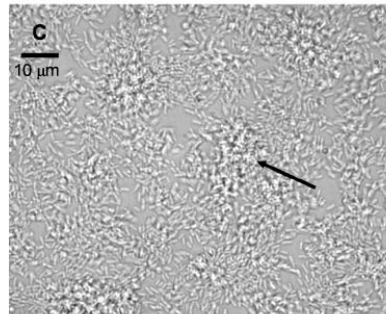
- Attachement réversible au substratum par un pôle cellulaire



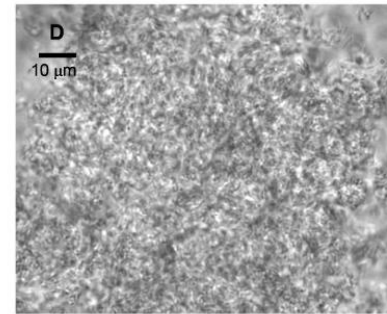
- Attachement irréversible au substratum et formation de « clusters » (micro-colonies)



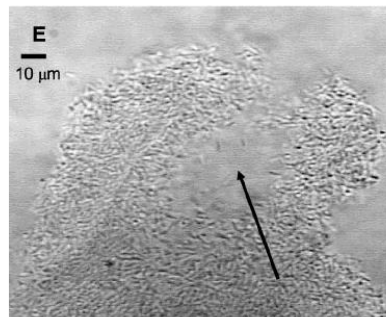
- « Clusters » matures (plusieurs cellules d'épaisseur + matrice)



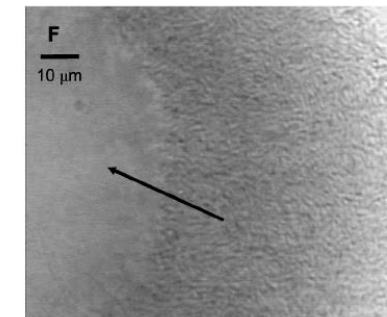
- Biofilm mature (épaisseur maximum)



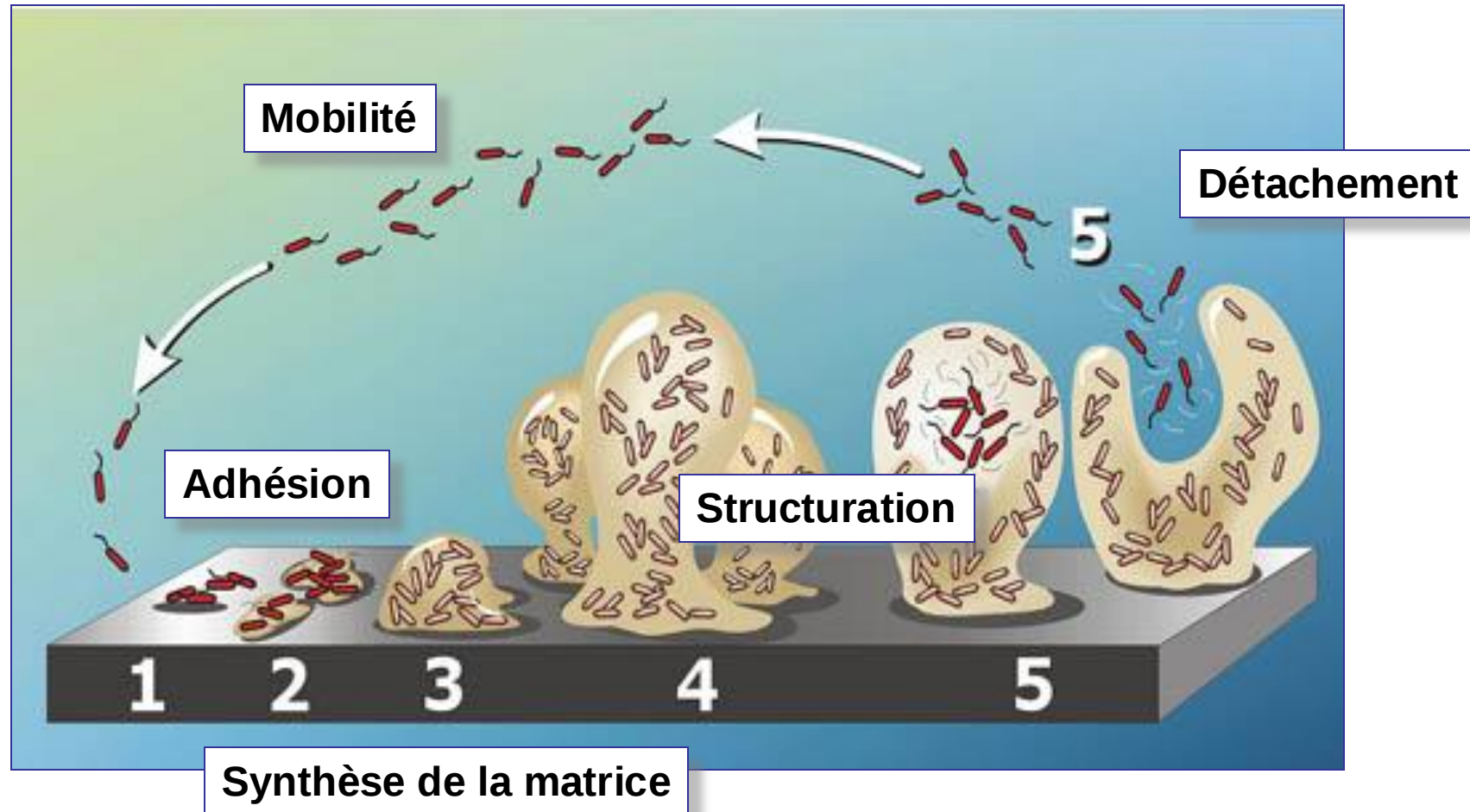
- Dispersion, départ de cellules et formation d'espaces vides



- Dispersion, départ de cellules et formation d'espaces vides



Modèle de développement d'un biofilm

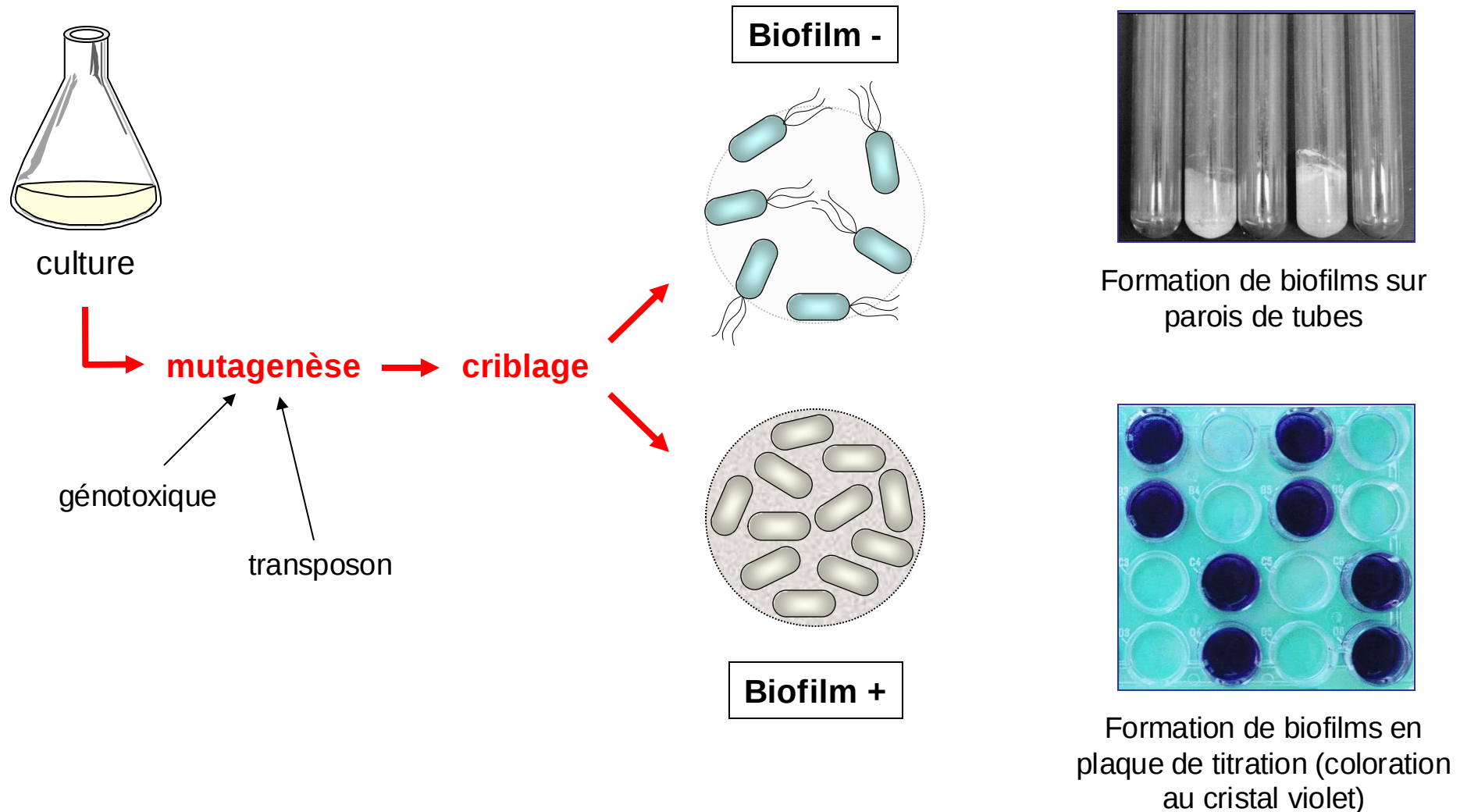


Gènes impliqués?

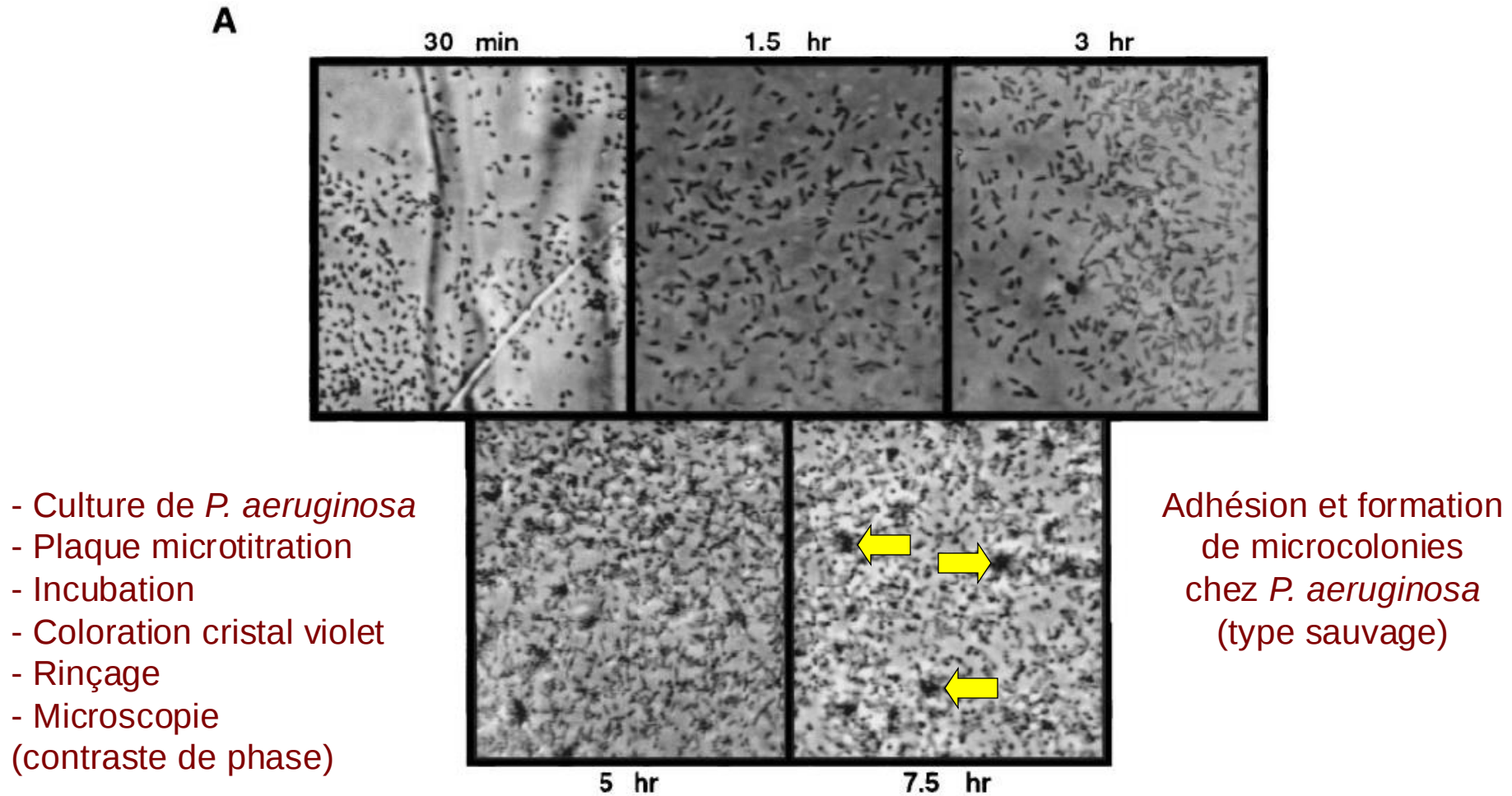
Programme?

Signalisation?

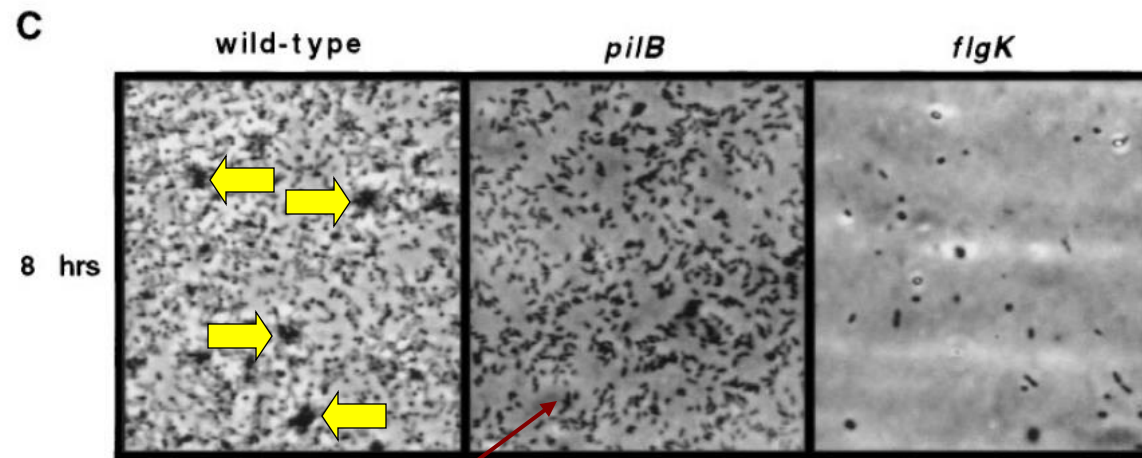
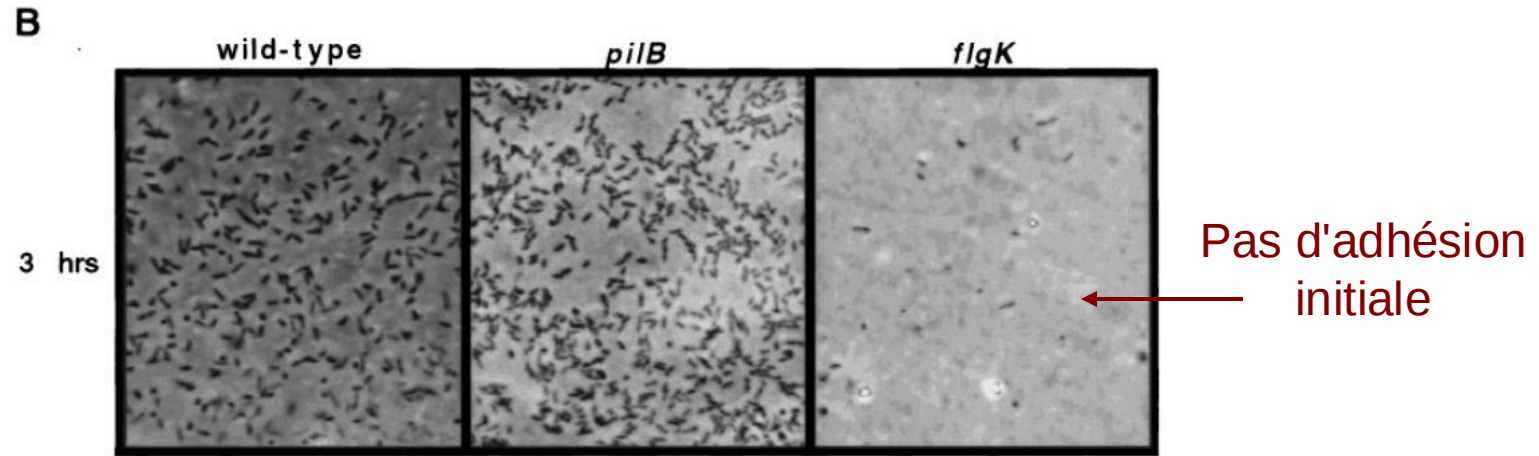
Approche de génétique classique



Adhésion et formation de microcolonies chez *Pseudomonas aeruginosa*



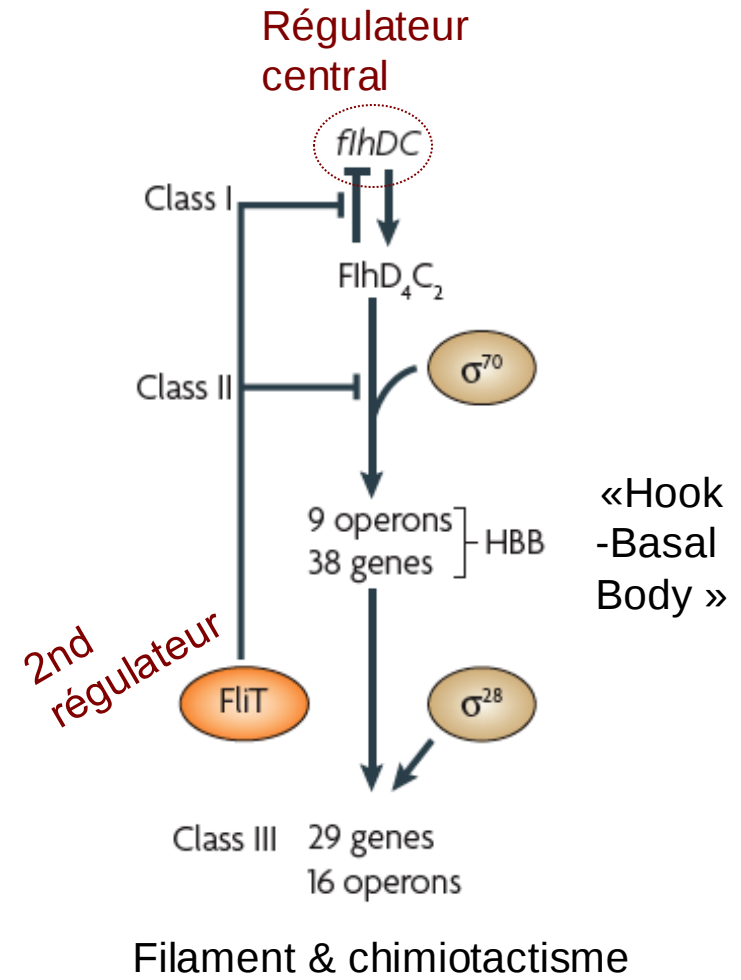
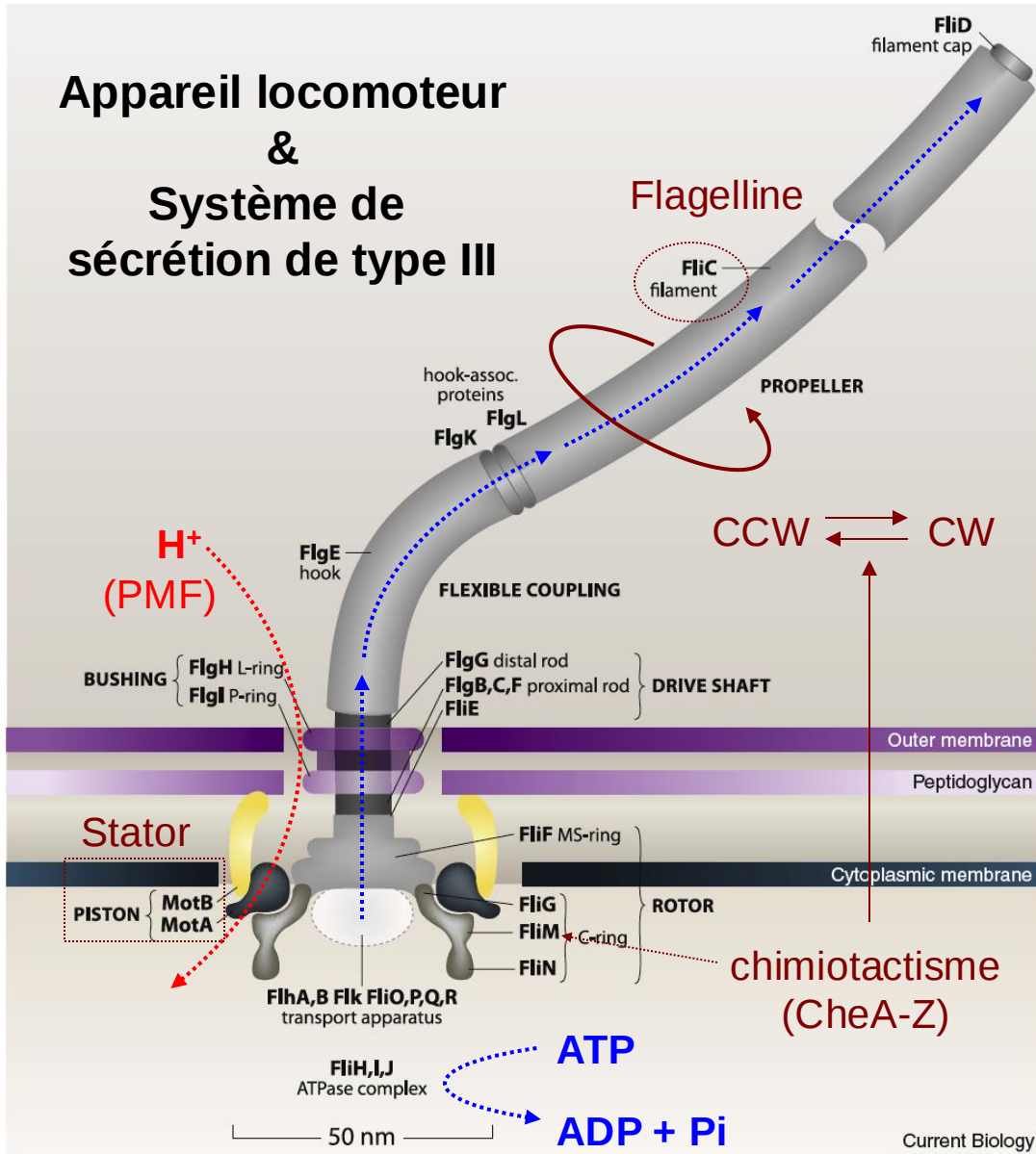
Adhésion et formation de microcolonies chez *Pseudomonas aeruginosa*



Approche de génétique classique (2)

- O' Toole & Kolter (1998) Mol. Microbiol. 28(3)449-461
 - *Pseudomonas fluorescens* WCS365 sur PVC
 - mutants biofilm⁻ : **flagelle** (*fliP*, *flaE*, *flgK*), **protéase** (*clpP*), gènes « **inconnus** »
 - Pas de biofilm si synthèse protéique inhibée
- Pratt & Kolter (1998) Mol. Microbiol. 30(2)285-293
 - *Escherichia coli* 2K1056 (dérivée de K12)
 - mutants biofilm⁻ : **fimbriae** (*fimH*, *fimA1*), **flagelle** (*fliC*, *flhD*, *motAB*)
 - la chemotaxie n' est pas impliquée
- O' Toole & Kolter (1998) Mol. Microbiol. 30(2)295-304
 - *Pseudomonas aeruginosa* PA14 sur PVC
 - mutants biofilm⁻ : **flagelle** (*flgK*) & **pili de type IV** (*pilBC*)
- Watnick & Kolter (1999) Mol. Microbiol. 34(3)586-595
 - *Vibrio cholerae* El Tor sur PVC
 - mutants biofilm⁻ : **flagelle**, **pili de type IV** & production d' **EPS**

Le flagelle chez les Gram-



Berg - Current Biology Vol 18 No 16

Chavance (2008) Nat. Rev. Microbiol. 6:455-465

Rôle du flagelle dans l'adhésion initiale

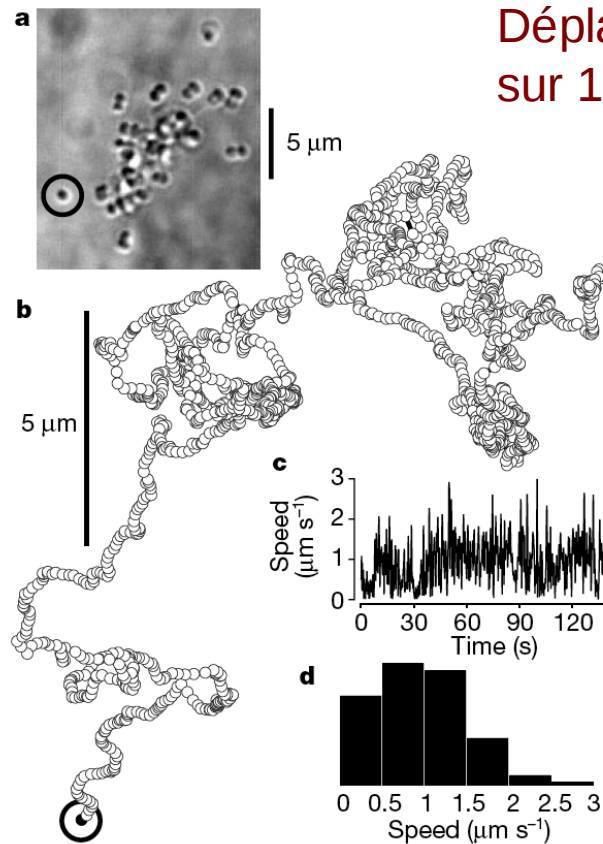
(essais d'adhésion sur mutants d' *E. coli*)

- Pratt & Kolter (1998) Mol. Microbiol. 30(2)285-293
 - *flhd::kan* - absence de flagelle (pas de régulateur central) => Biofilm -
 - *fliC::kan* - déficience en flagelline (pas de filaments) => Biofilm -
 - Δ *motAB* - non mobile (absence de « piston ») => Biofilm -
 - Δ *cheA-Z::kan* - absence de chimiotactisme => Biofilm +
- (1) l'adhésion initiale requiert un flagelle complet (structure) et fonctionnel (cellule mobile).
- (2) l'adhésion initiale par les flagelles ne répond pas à un phénomène chimiotactique.
- Karatan & Watnick (2008) Microbiol. Mol. Biol. Rev. Microbiol. 73:310-347
 - surmonter les forces de répulsion du support ?
 - substrat d'adhésion ?
 - senseur de surface (rôle déclencheur de l'arrêt de rotation) ?

The diagram illustrates the flagellar motor assembly and retraction cycle. At the top, the flagellum consists of a **coiffe** (C1/Y1) and a long **fibre (PilA)** composed of **(12-15 composants)**. The fibre passes through a **canal** in the cell envelope. The motor is embedded in the envelope and consists of several parts: **PilQ** (green), **PilC** (blue), **PilB** (green), **PilT** (red), and **PilD** (green). The **PilB** and **PilT** are associated with **ATP**. The **PilC** is a **protéine**. The **PilD** is involved in **leader peptide cleavage**. The **PilA** is the **leader peptide**. The **PilE, PilV, PilW, PilX, FimU** are **(pré-pilines mineures - base)**. The cycle involves **assembly** and **retraction** of the flagellum.

- PilB - ATPase assemblage
- PilT - ATPase rétractation
- PilC protéine membranaire

« Twiching mobility » (crawl)



Déplacement de *Neisseria gonorrhoeae* (diplocoques)
sur 140s (prise de vue toutes les 67 ms)

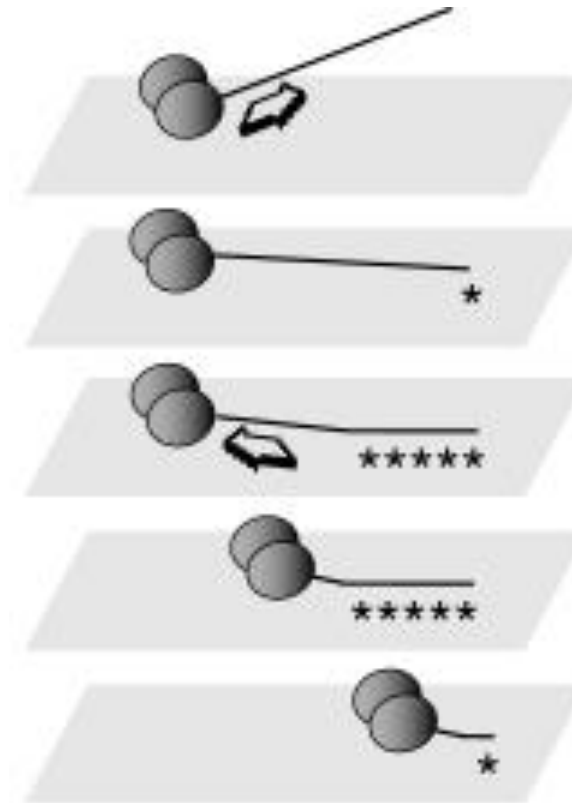
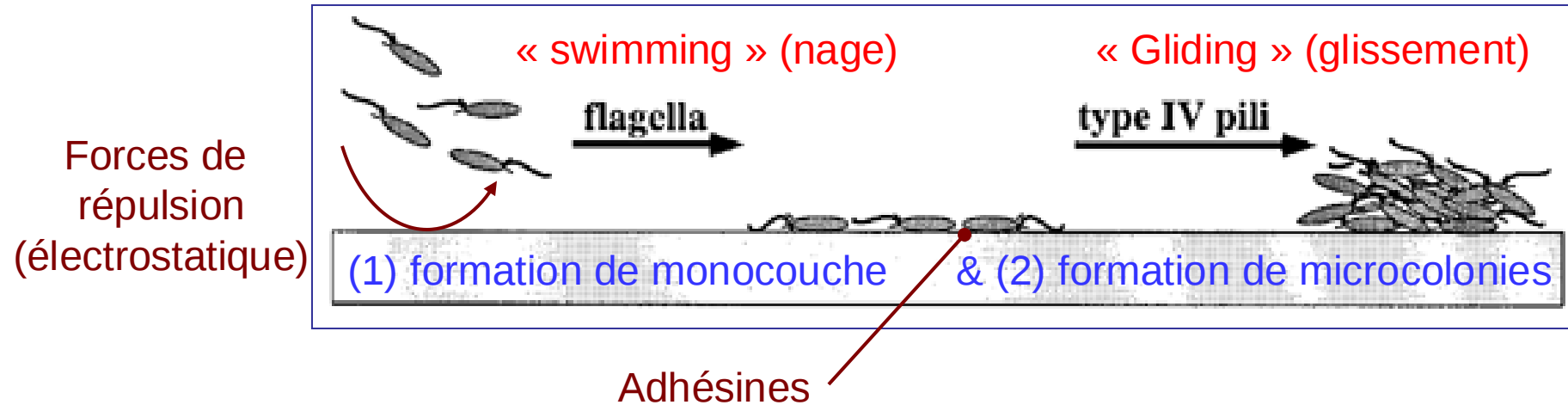


Figure 1 Piliated *N. gonorrhoeae* cells crawl on an inert surface. **a**, Cells crawling on a glass coverslip. This is the first frame of the sequence analysed in **b–d**, and the tracked diplococcus is circled. Note that most cells are present as diplococci. **b**, Tracking of the diplococcus indicated in **a** during an interval of 140 s. Small circles show the position of the tracked diplococcus at intervals of 67 ms. Large circle indicates the start point. **c**, Plot of velocity against time for the same track. **d**, Histogram of the velocities shown in **c**.

Formation de biofilms et appareils locomoteurs

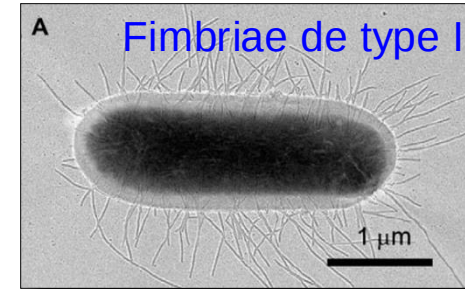


Adhésine: molécule de surface, typiquement une protéine (mais pas que, dans certains cas il peut s'agir de polysaccharides), qui permet à une bactérie de s'attacher à une surface et/ou une autre bactérie.

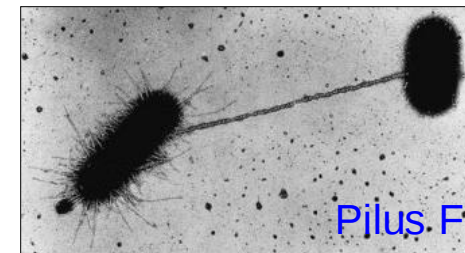
Adhésines

Table 1. Appendages and envelope structures involved in abiotic surface colonization

Species	Structure	Refs
<i>Escherichia coli</i>	Flagella	[13]
	Type I fimbriae	[13]
	Lipopolysaccharide	[28]
	Curli	[18]
	Conjugative fimbriae	[29]
	NpLE lipoprotein	[23]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Type III fimbriae	[30]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flagella	[31]
	Type IV fimbriae	[31]
	Putative organelle (CupA)	[32]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Flagella	[33]
<i>Salmonella enterica</i>	Curli	[34,35]
	Flagella	[26]
	Lipopolysaccharide	[26]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bap adhesin	[36]
	Teichoic acids	[37]
	AtlE autolysin	[38]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SSP1 adhesin	[39]
<i>Streptococcus gordonii</i>	Peptidoglycan	[40]
<i>Vibrio cholerae</i>	Flagella	[41]
	Mannose-sensitive hemagglutinin fimbriae	[42]

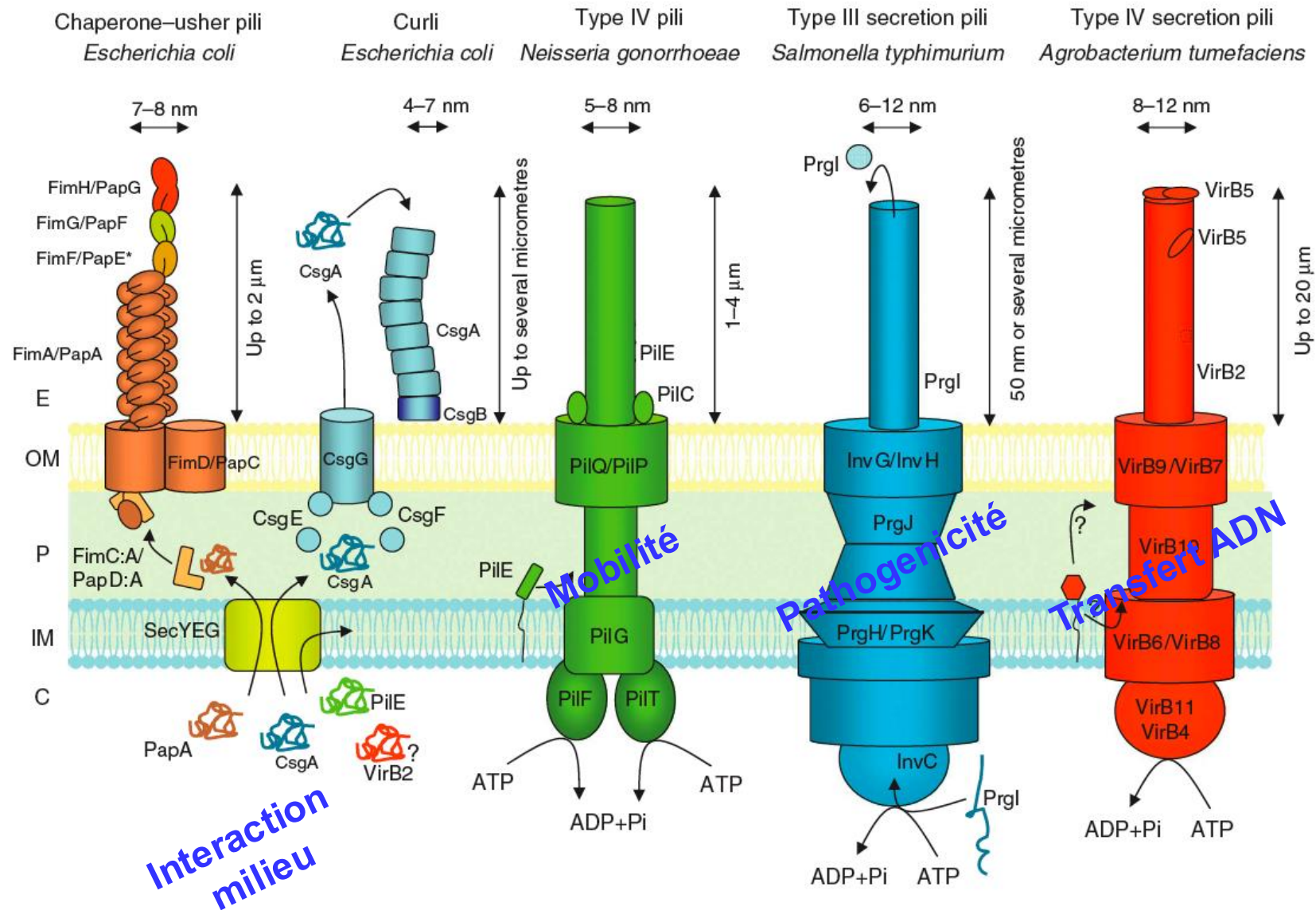


Capitani *et al.* (2006) *Microbes and Infection* 8:2284-2290



Lejeune (2003) *Trends in Microbiol.* 11(4)179-184

pili et fibres



Adhésion / Adhésines et régulation

Stade monocouche (étape initiale)

- Adhésion et adhésines
 - Classe 1 : les adhésines préformée (ex. flagelle, pili)
 - Classe 2 : les adhésines conditionnelles (ex. LapA chez *P. fluorescens*)
 - Classe 3 : les adhésines spécifiques (ex. intimine chez *E. coli*)

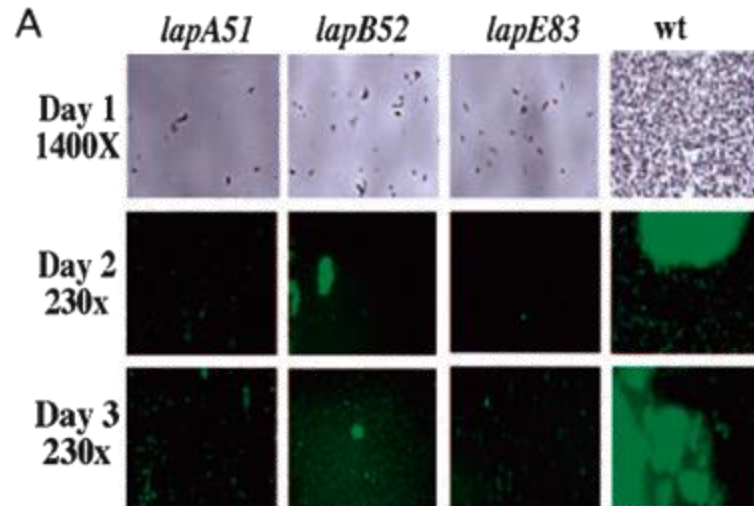
Stade multicouches

- Production de la matrice extracellulaire

Adhésines conditionnelles

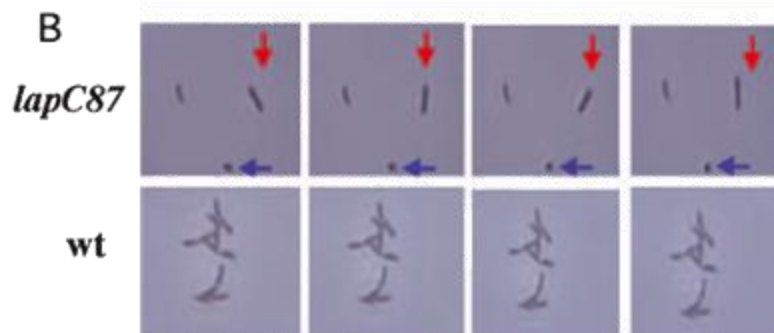
cas de LapA chez *P. fluorescens*

Mutagenèse *P. fluorescens* → Biofilm- → Séquençage → morphologie biofilm



biofilm en flow cell

le locus *lap* est essentielle pour la formation d'un biofilm mature



séquence à intervalle de 3s
(à t=4h00 après inoculation)

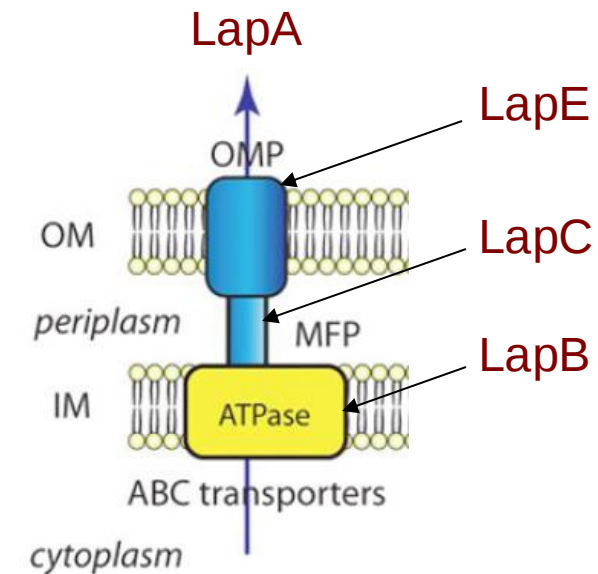
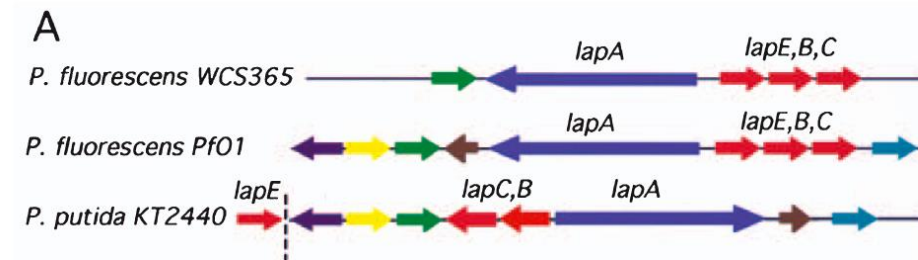
LapA (ou sa sécrétion par LapBCE) est essentielle pour le passage d'une adhésion réversible à une adhésion irréversible



Adhésines conditionnelles

cas de LapA chez *P. fluorescens*

- **Lap A** : protéine associée à la surface bactérienne (= adhésine).
- **LapBCE** : système de sécrétion de type I (transporteur ABC):
 - LapB = membranaire + ATPase
 - LapE = protéine mb. ext. (OMP)
 - LapC = protéine de fusion mb. (MFP)
- Mutants *lap* affectés dans les étapes précoces de formation du biofilm (transition attachement réversible / irréversible).
- L'adhésion LapA-dépendante est régulée par le niveau de phosphate inorganique environnemental ($\downarrow[\text{Pi}] \Rightarrow \downarrow\text{biofilm}$).

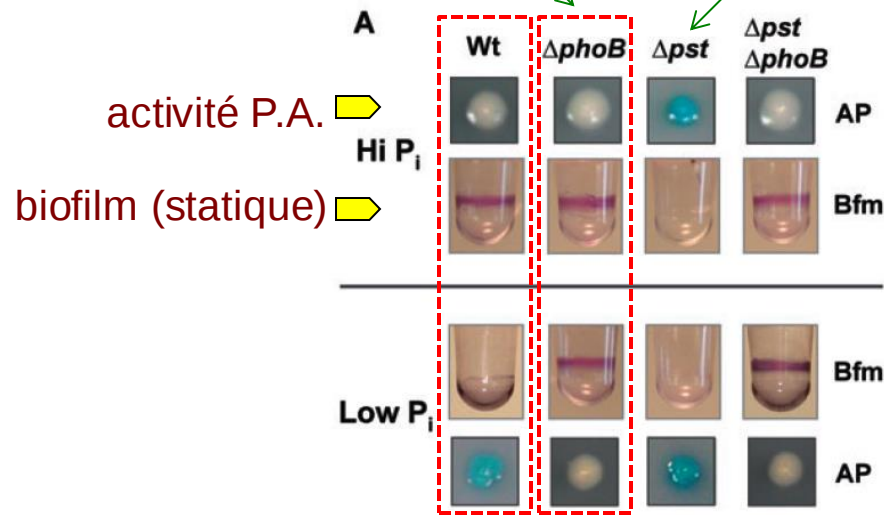


Le régulon phosphate module la formation de biofilm chez *P. fluorescens*

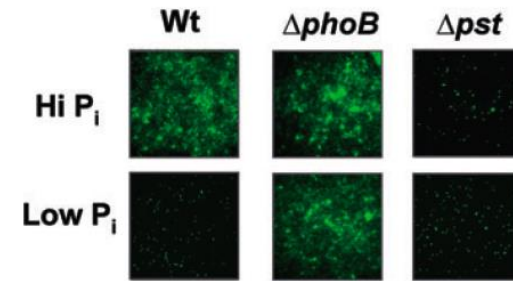


ne sent pas la carence en Phosphate

ne transporte plus le Phosphate



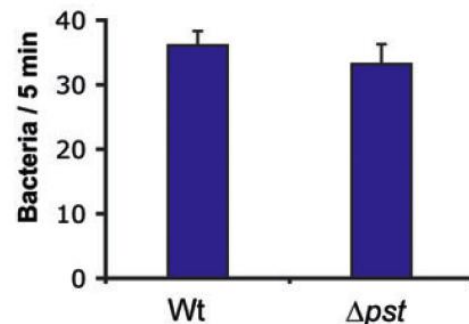
B formation de biofilm en condition agitée



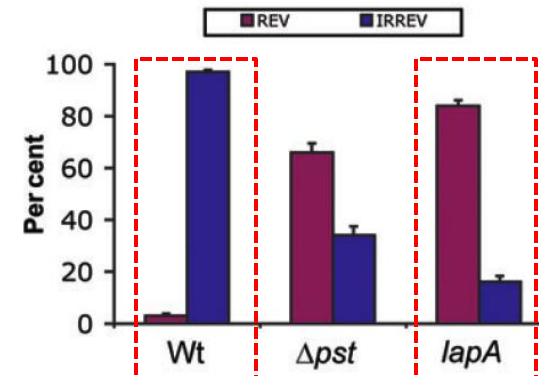
La bactérie ne forme pas de biofilm si carencée en phosphate

C Initial Attachment

Attachement initial
(= nombre de
cellules adhérentes
en 5 min)

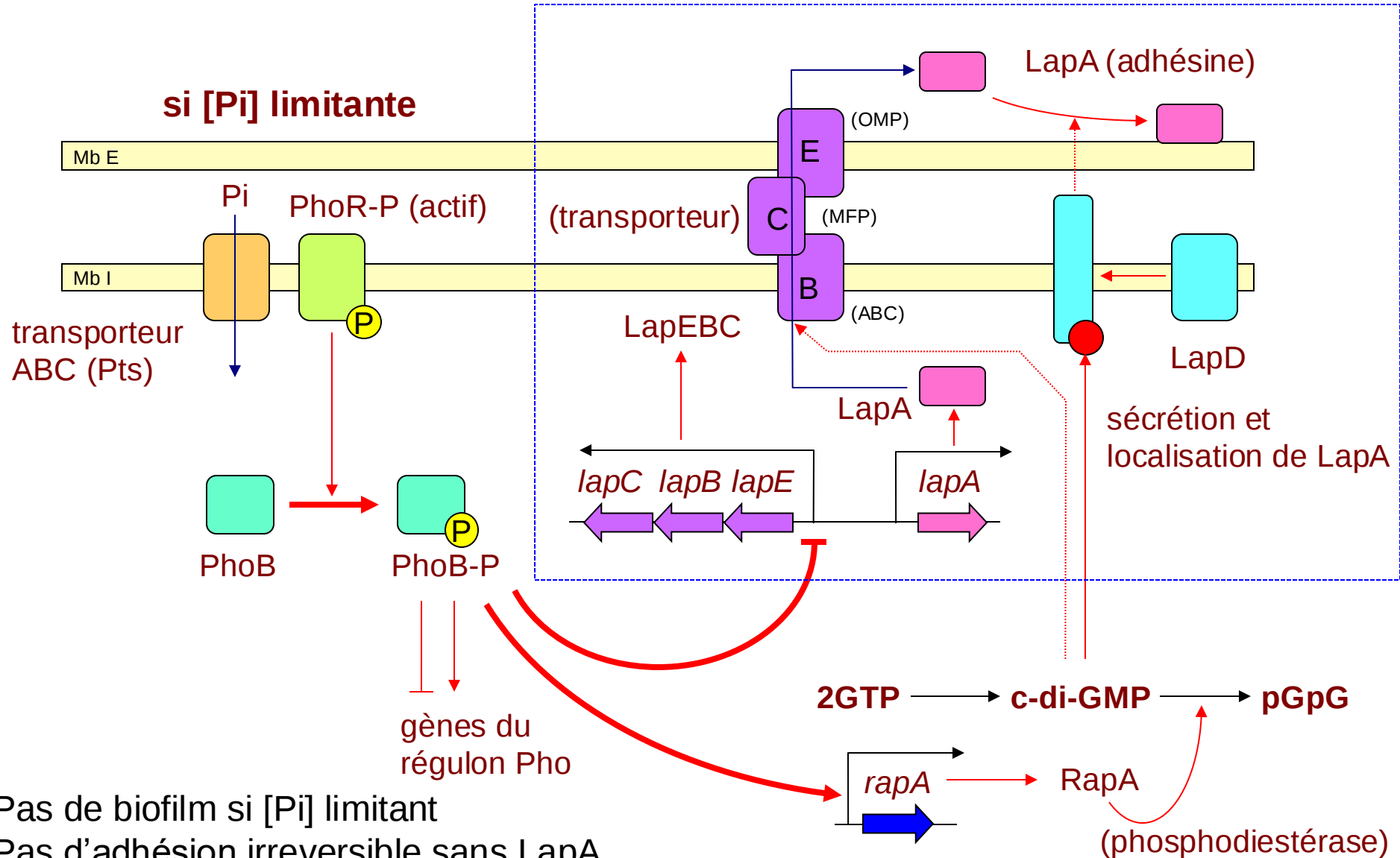


D Reversible to Irreversible



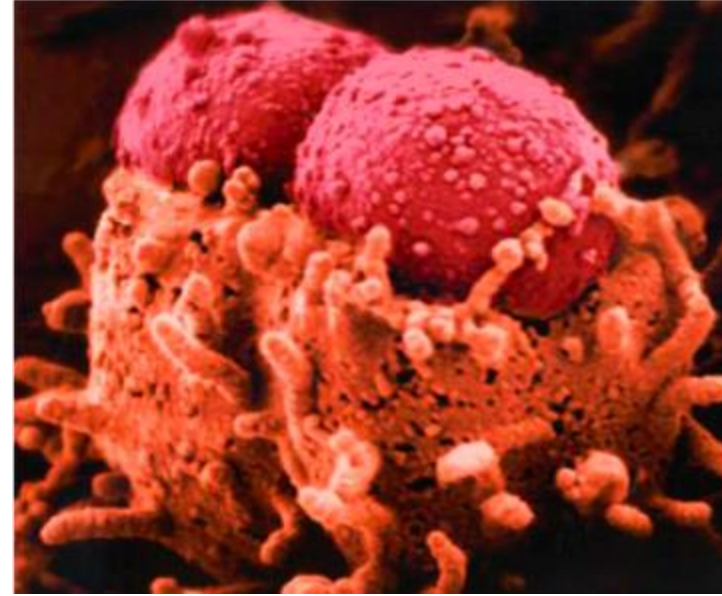
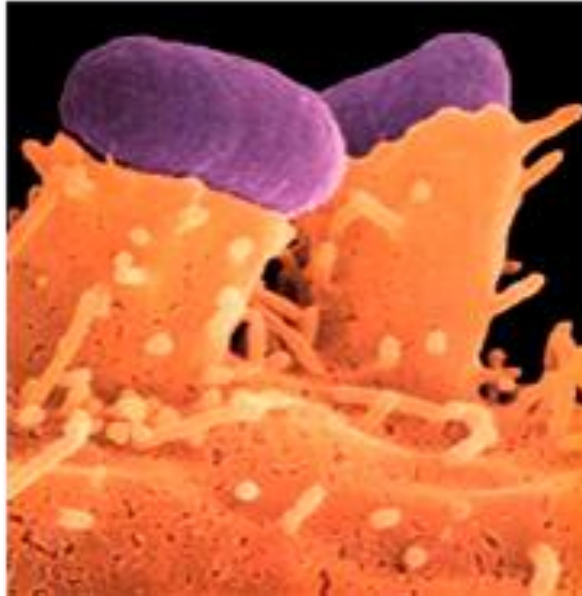
Le mutant *lapA*
reste bloqué
au stade
adhésion
réversible

Attachement irréversible bloqué à basses $[Pi]_{\text{extracellulaire}}$ chez *P. fluorescens*



Les adhésines spécifiques

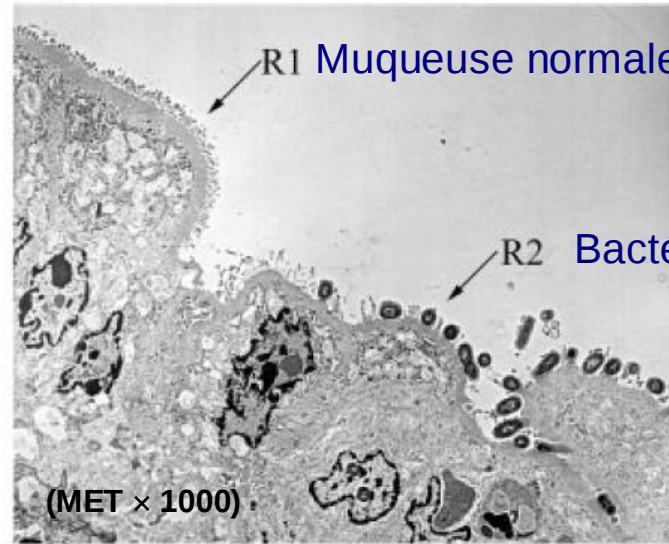
cas de l'intimine chez les *E. coli* EPEC & EHEC



formation d'une lésion « d'attachement et d'effacement » chez des *Escherichia coli* entéropathogène (« EPEC ») et entérohémorragiques (« EHEC ») qui conduit à la formation d'un piédestal

Lésions d'attachement et d'effacement

(A)



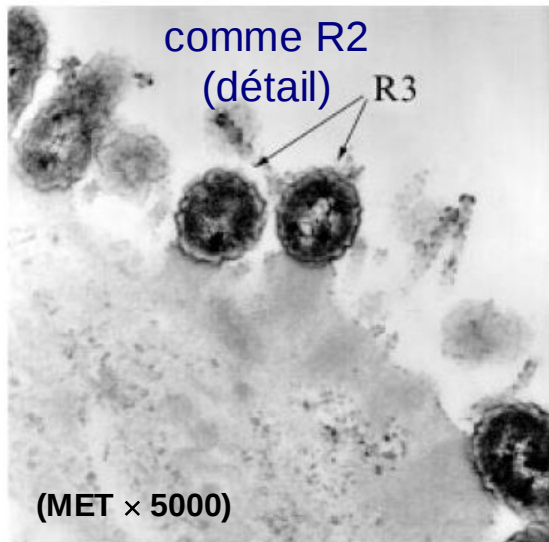
R1 Muqueuse normale avec microvillosités

R2 Bactéries attachées et microvillosités effacées

(MET × 1000)

**Muqueuse rectale infectée
par
E. coli O157 (MET)**

(B)

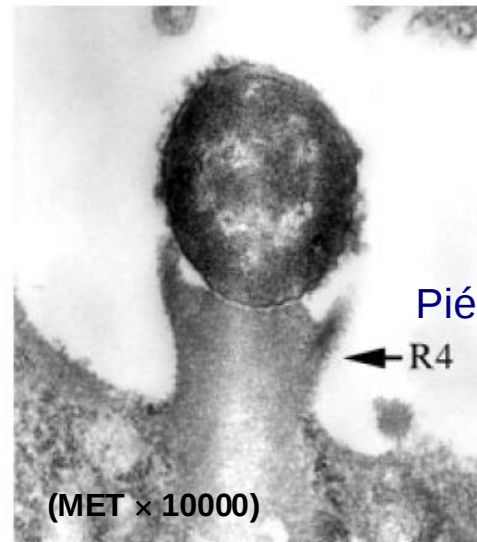


comme R2
(détail)

R3

(MET × 5000)

(C)

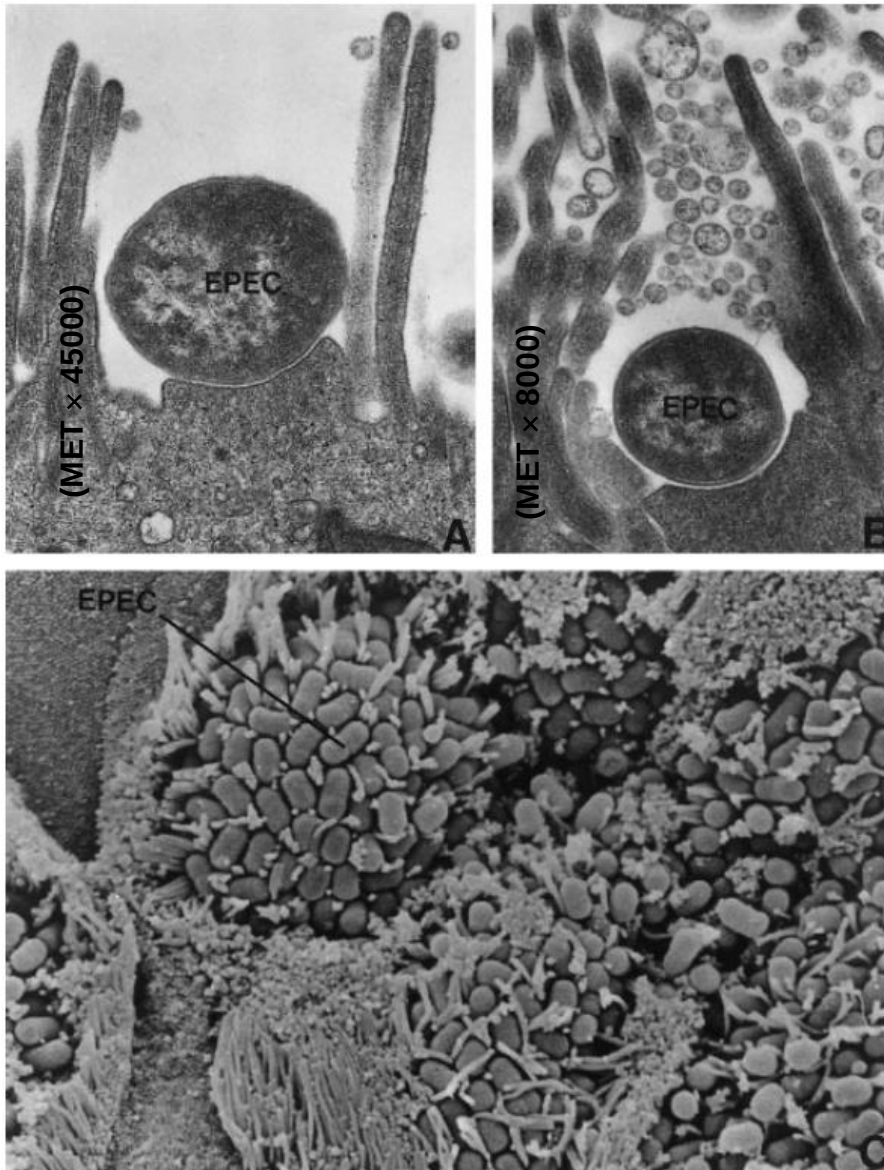


Piédestal

R4

(MET × 10000)

Lésions d'attachement et d'effacement

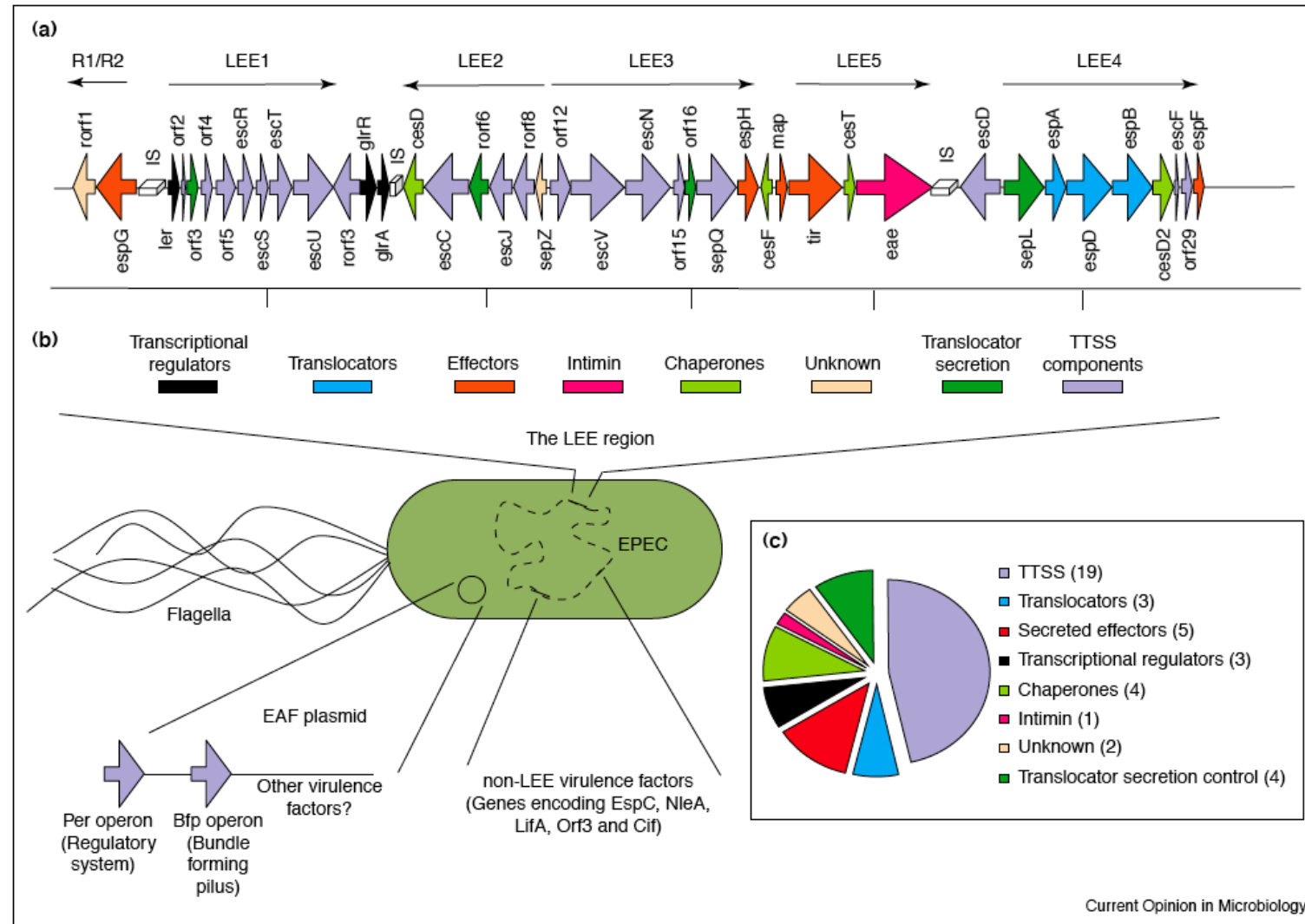


Altération de la muqueuse intestinale

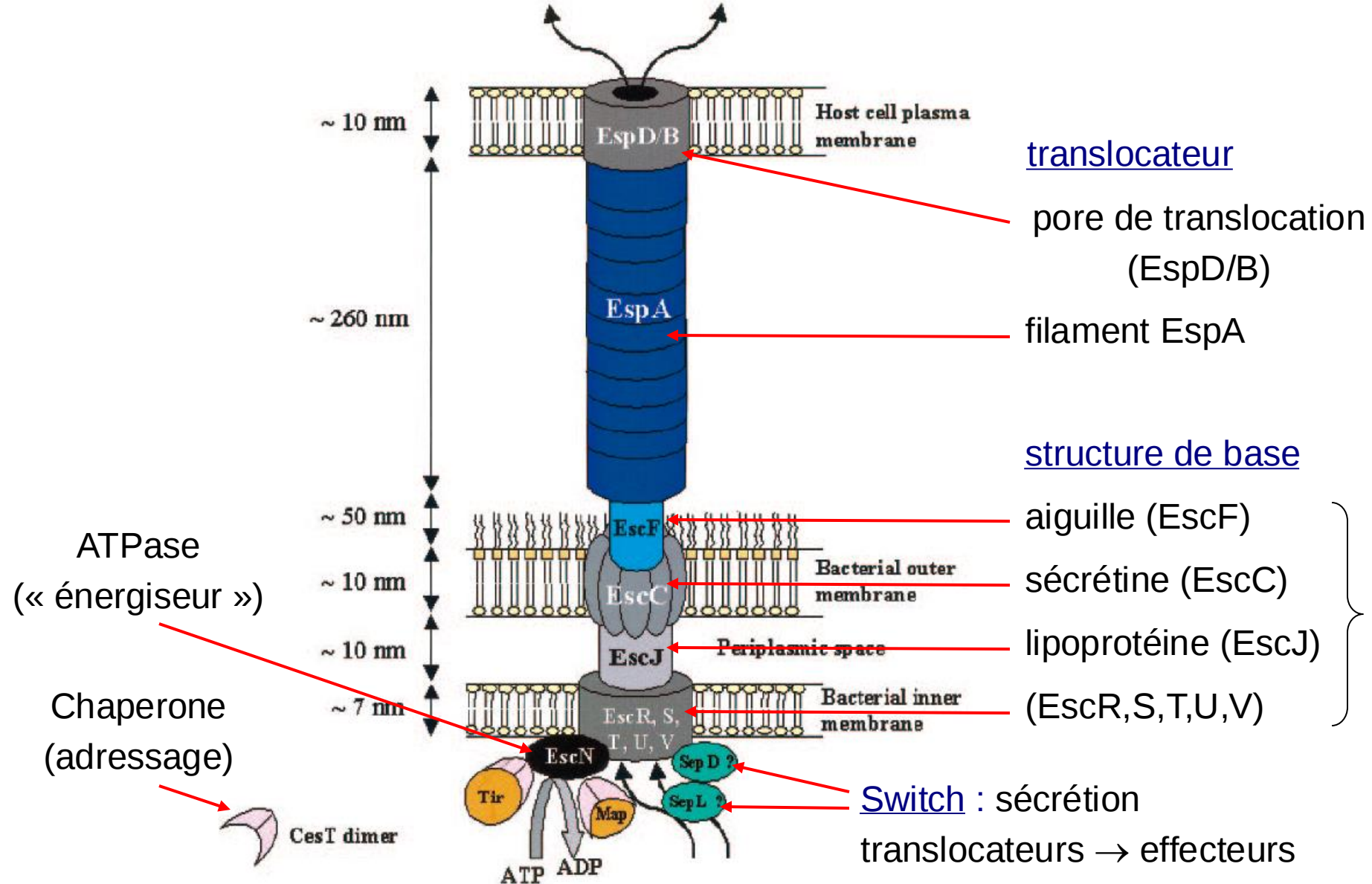
- (A) formation d'un piédestal.
- (B) destruction des microvillosités.
(altération du cytosquelette et vésiculation)
- (C) colonisation et perturbation
de la muqueuse.

«locus of enterocyte effacement »

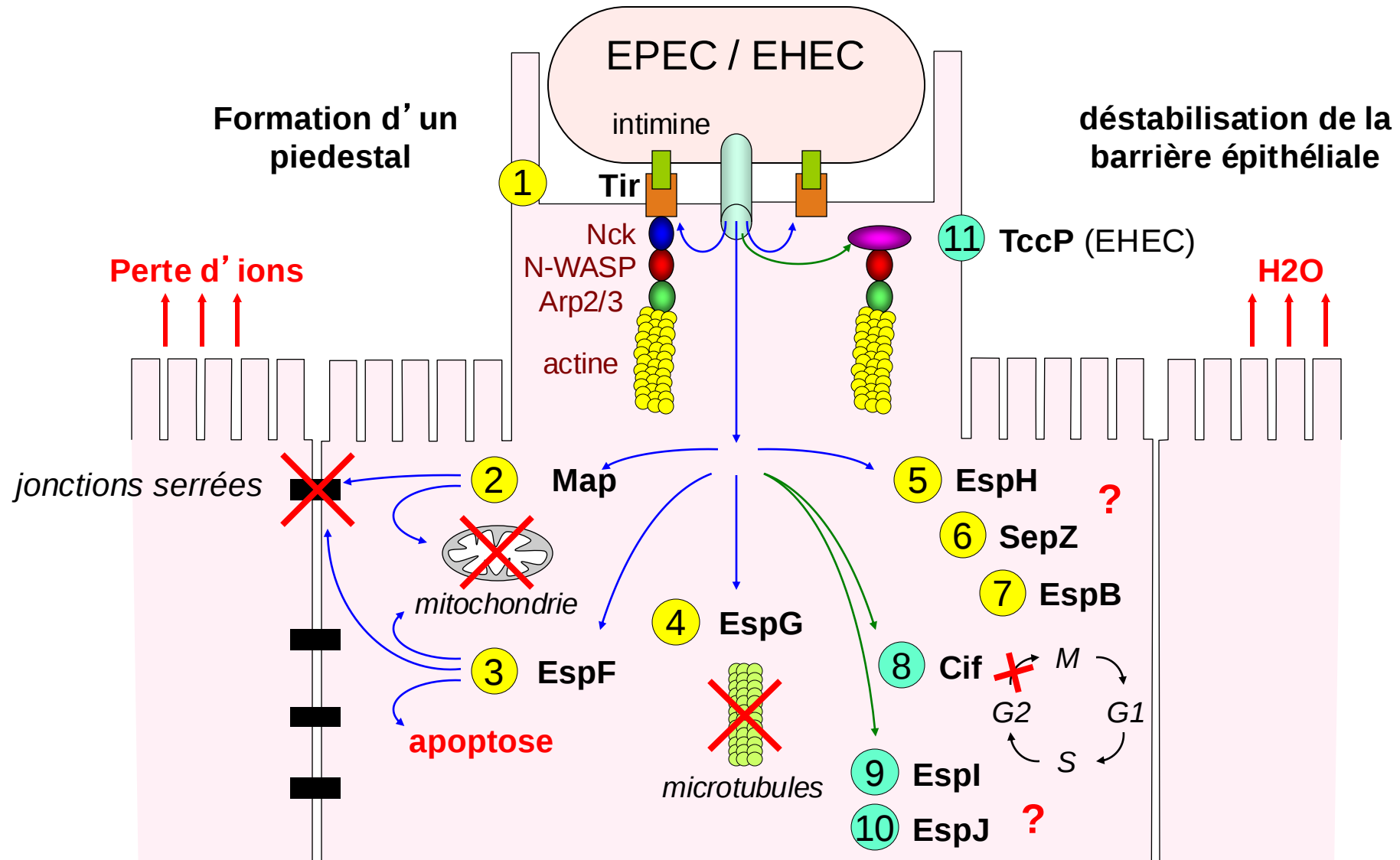
5 opérons principaux, 1 système de sécrétion, des effecteurs

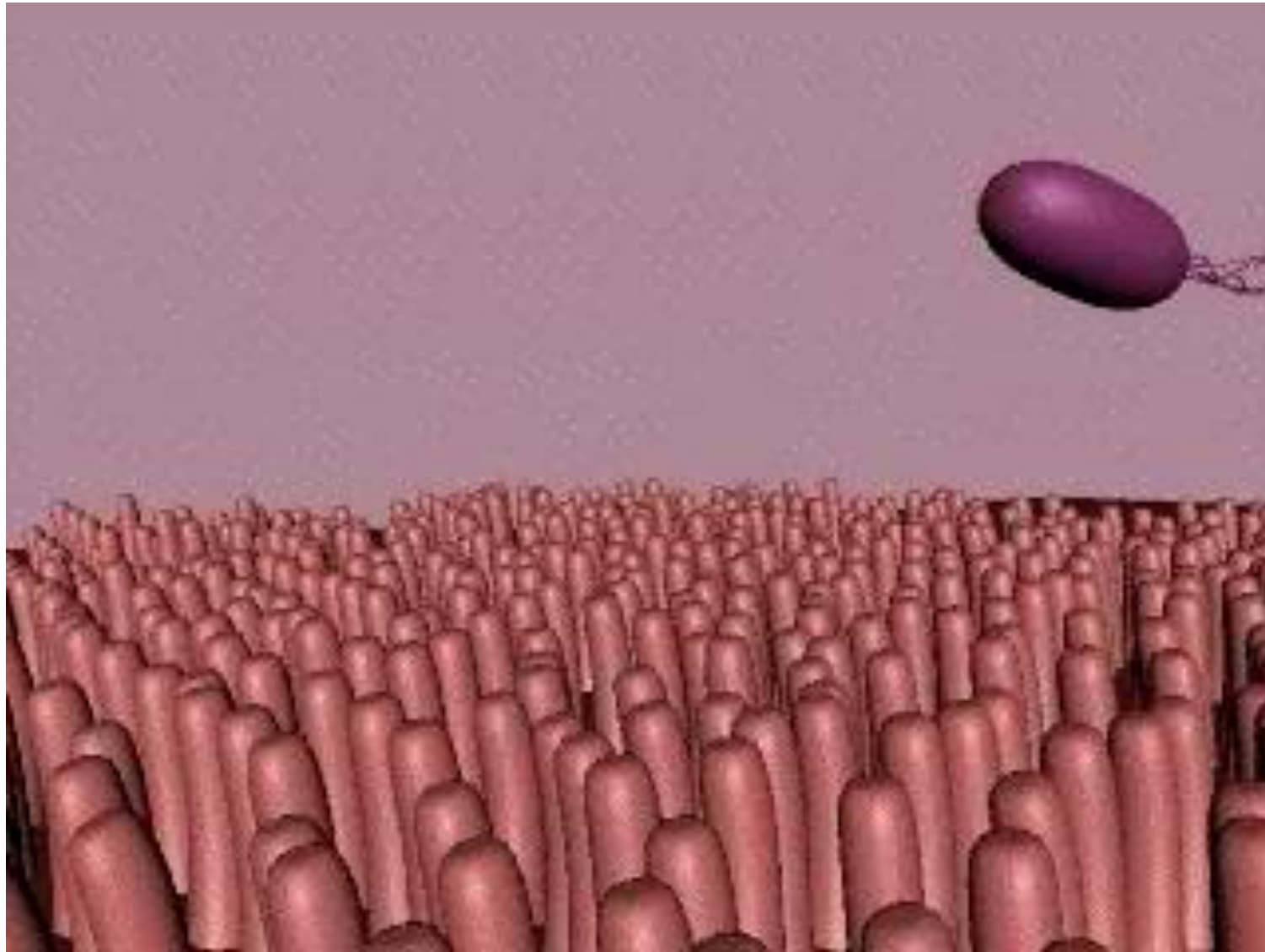


Système de sécrétion de type III (LEE)



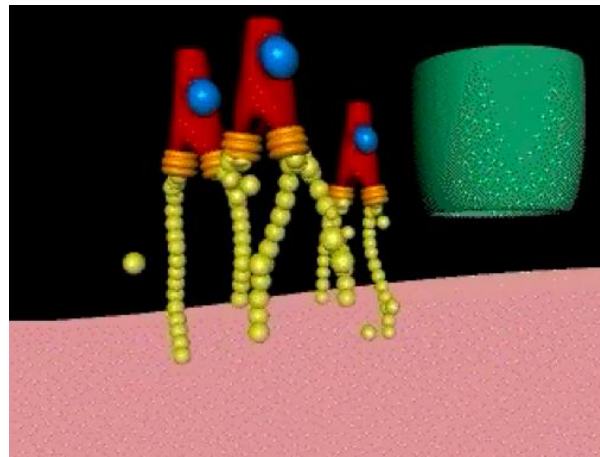
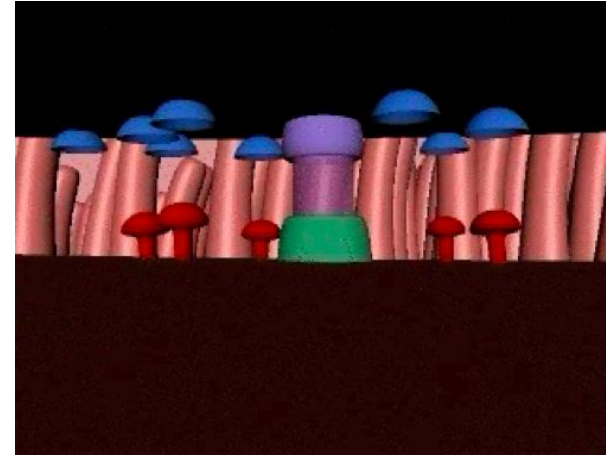
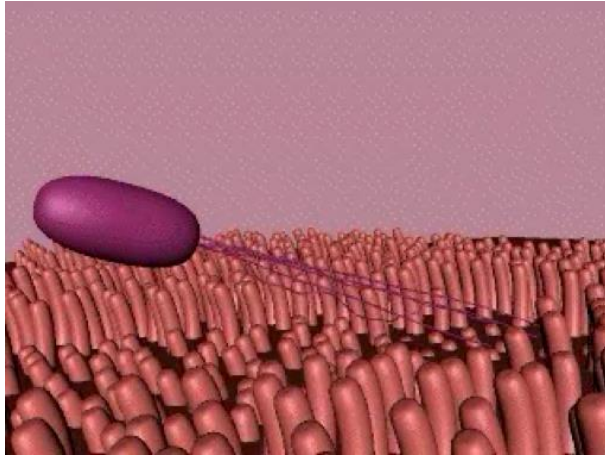
Les effecteurs sécrétés





Home page B. Finlay : <http://www.finlaylab.biotech.ubc.ca/index.html>

adhésion d'E. coli (EPEC & EHEC) aux cellules l'intestinales

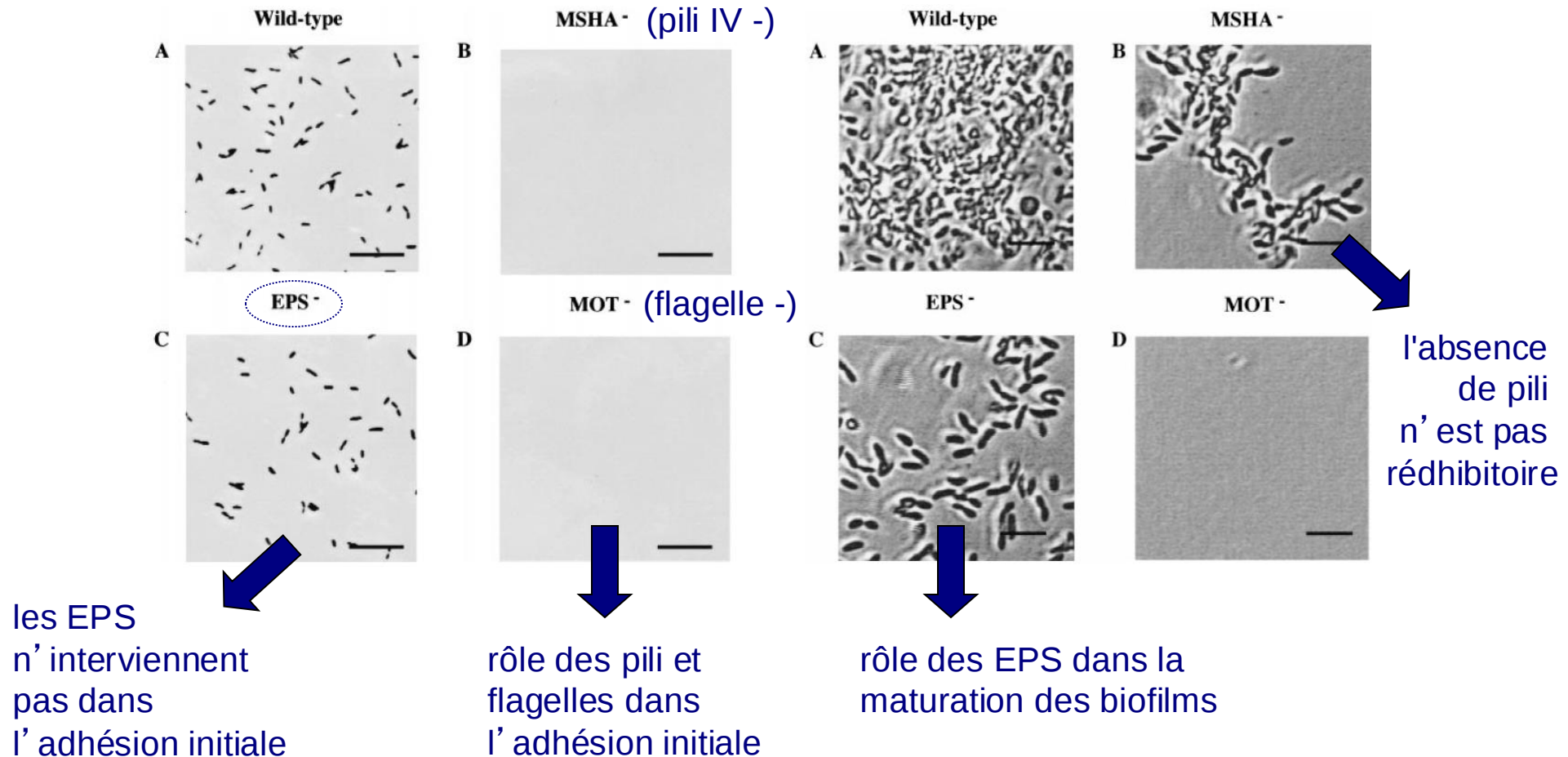


Rôle des EPS dans la formation de biofilms

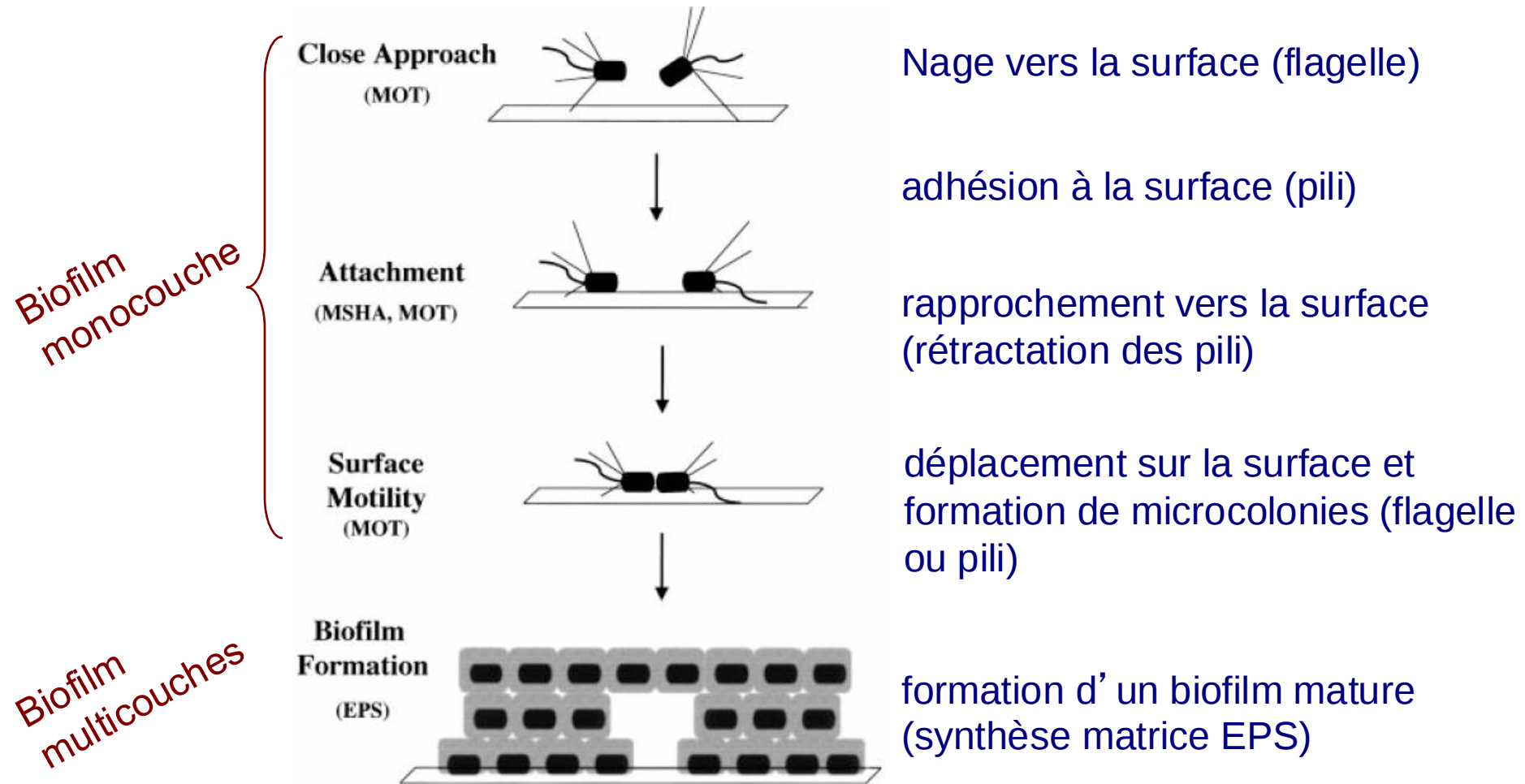
Mutagenèse *V. cholerae* → Biofilm- → Séquençage → morphologie biofilm

Biofilms de 15 min
= adhésion initiale

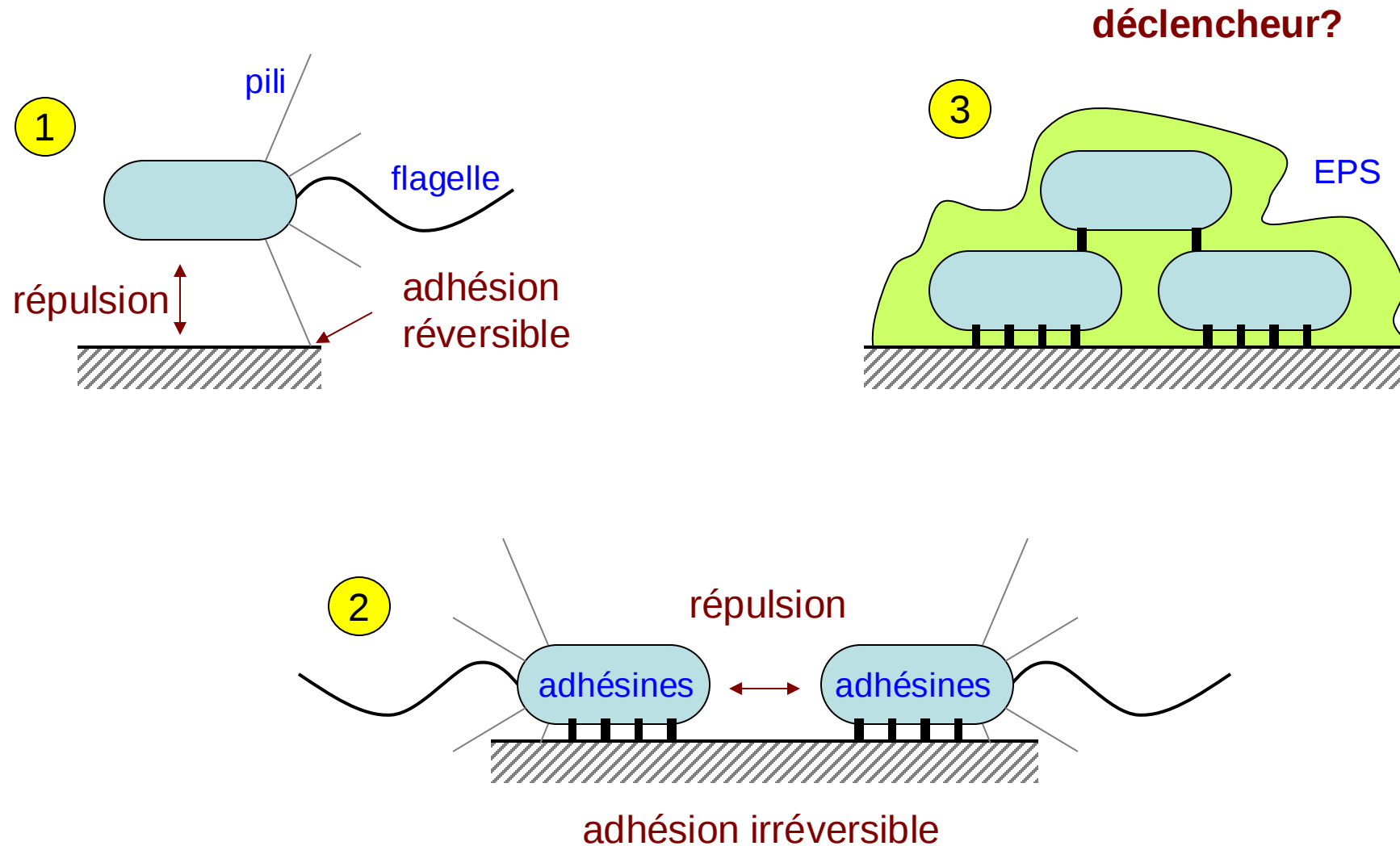
Biofilms de 24 heures
= biofilm mature



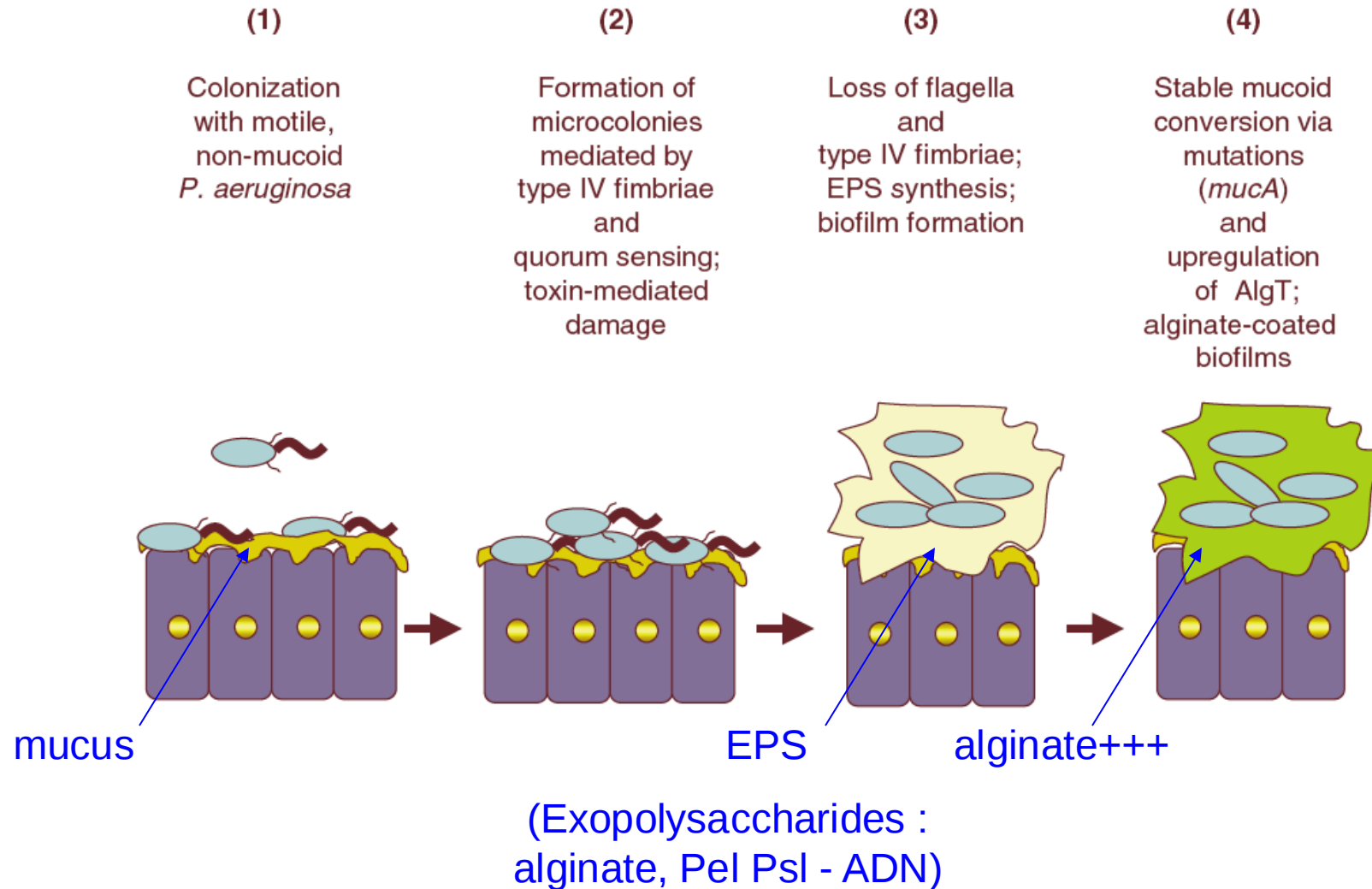
Modèle du développement de biofilms (1999)



Régulation de la transition vers un biofilm multicouches

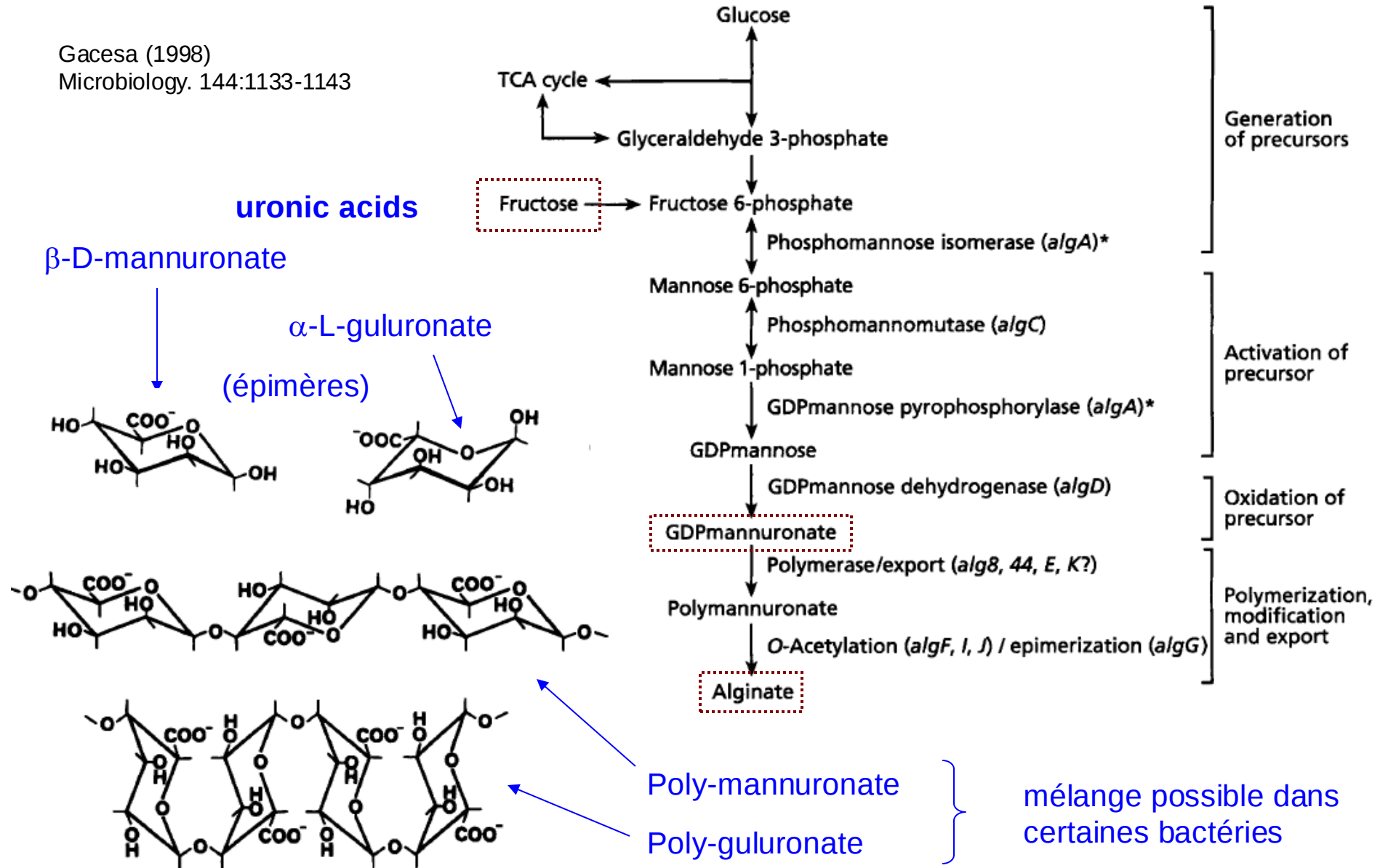


« Stratégie » de colonisation des poumons par *P. aeruginosa*



Biosynthèse d'alginate

Gacesa (1998)
Microbiology. 144:1133-1143

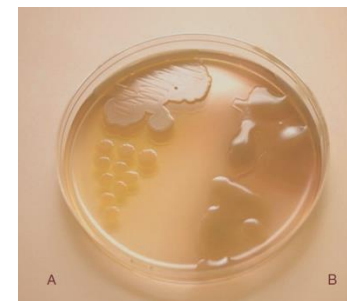
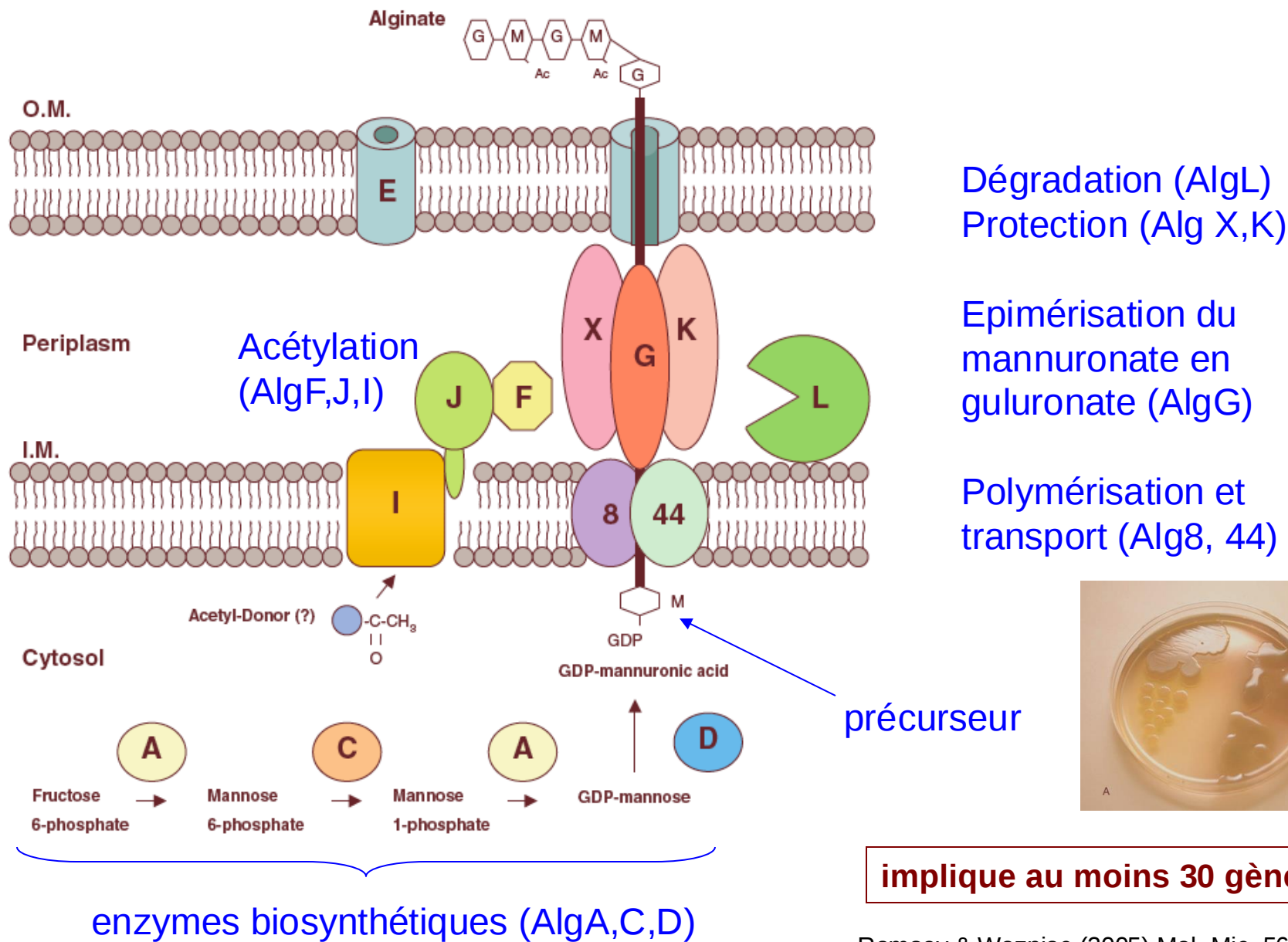


Poly-mannuronate

Poly-guluronate

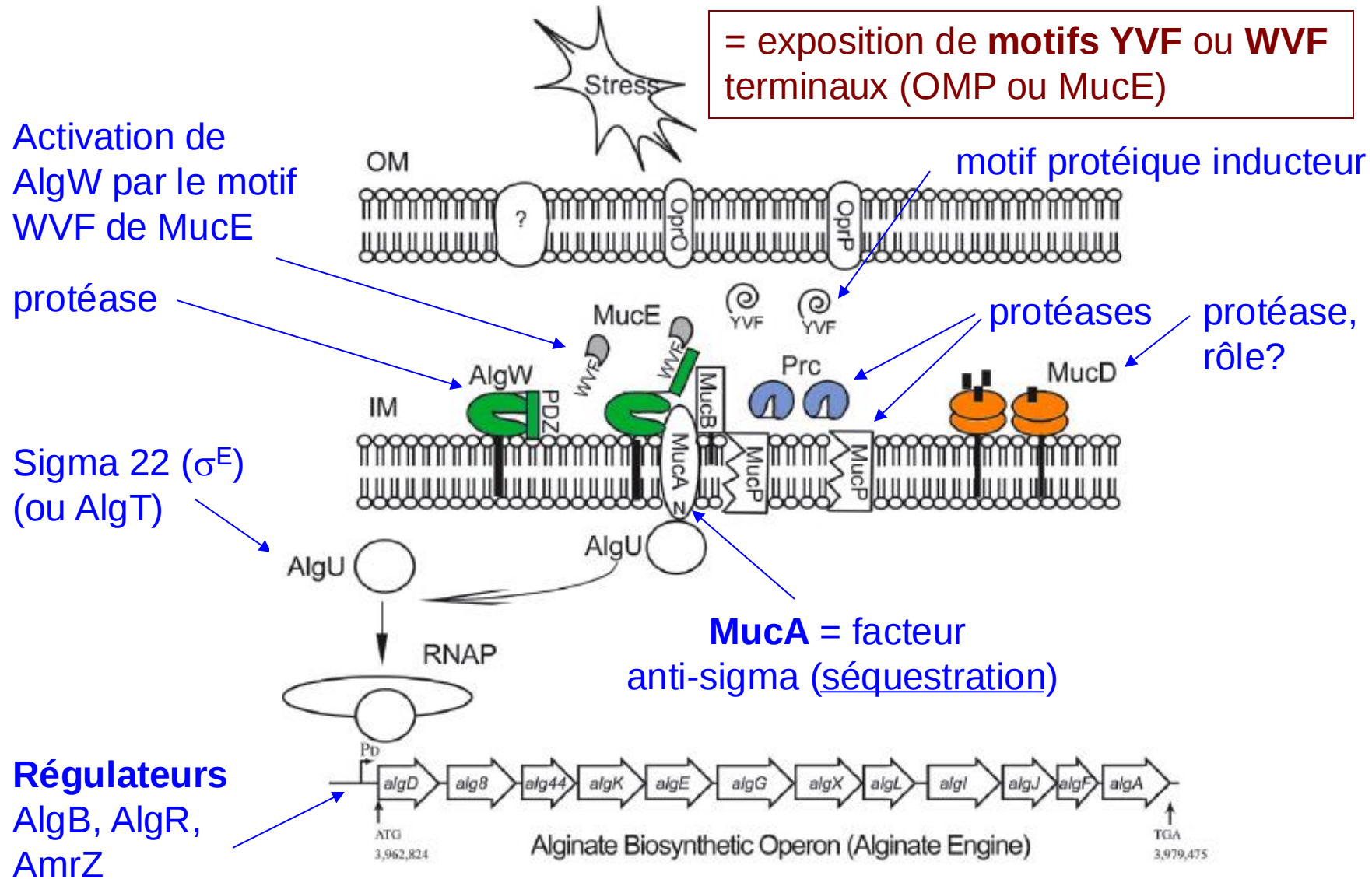
mélange possible dans
certaines bactéries

Biosynthèse d'alginate par *P. aeruginosa*



implique au moins 30 gènes!

Régulation de la synthèse d'alginate chez *P. aeruginosa*



Les signaux environnementaux qui régulent la formation de biofilms

Signaux mécaniques

- arrêt flagelle => +

Signaux métaboliques et nutritionnels

- Glucose et répression catabolique => + / -
- Indole (produit de dégradation du Trp) => +
- Polyamines (putrescines, spermidines, ...) => +

Molécules inorganiques

- Fer => +/-
- Phosphate => -

Osmolarité

- Osmolarité (ou force ionique) => +/-

Signaux de l'hôte

- Bile => + (chez *Vibrio cholerae*)
- H₂O₂ « oxidative burst » => (chez *Pseudomonas aeruginosa*)

Antimicrobiens

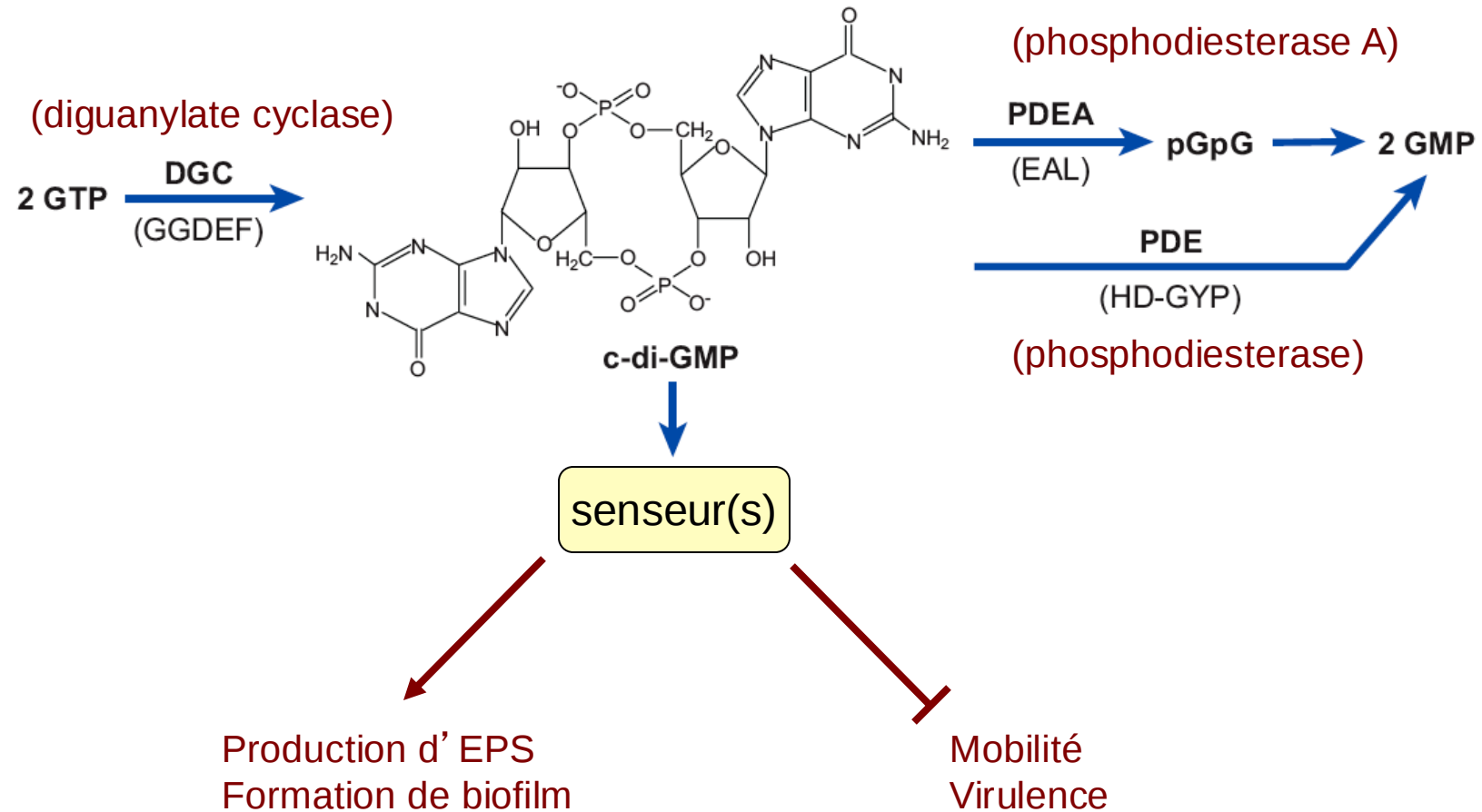
- Antimicrobiens en concentrations subinhibitrices => +/-

Quorum sensing

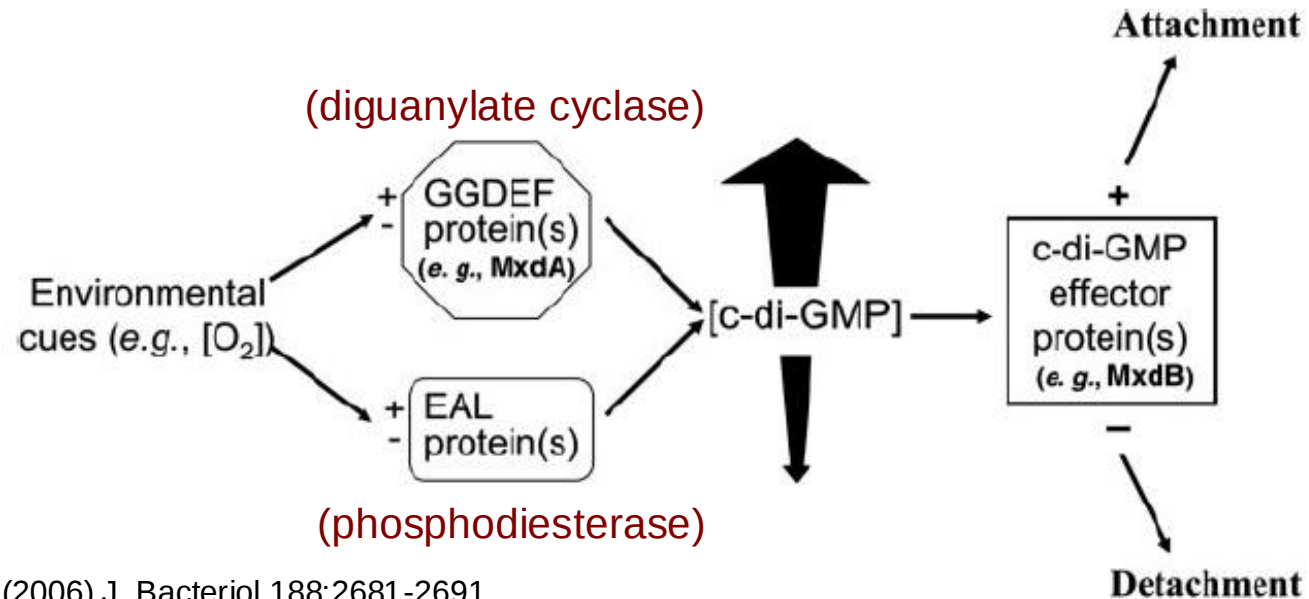
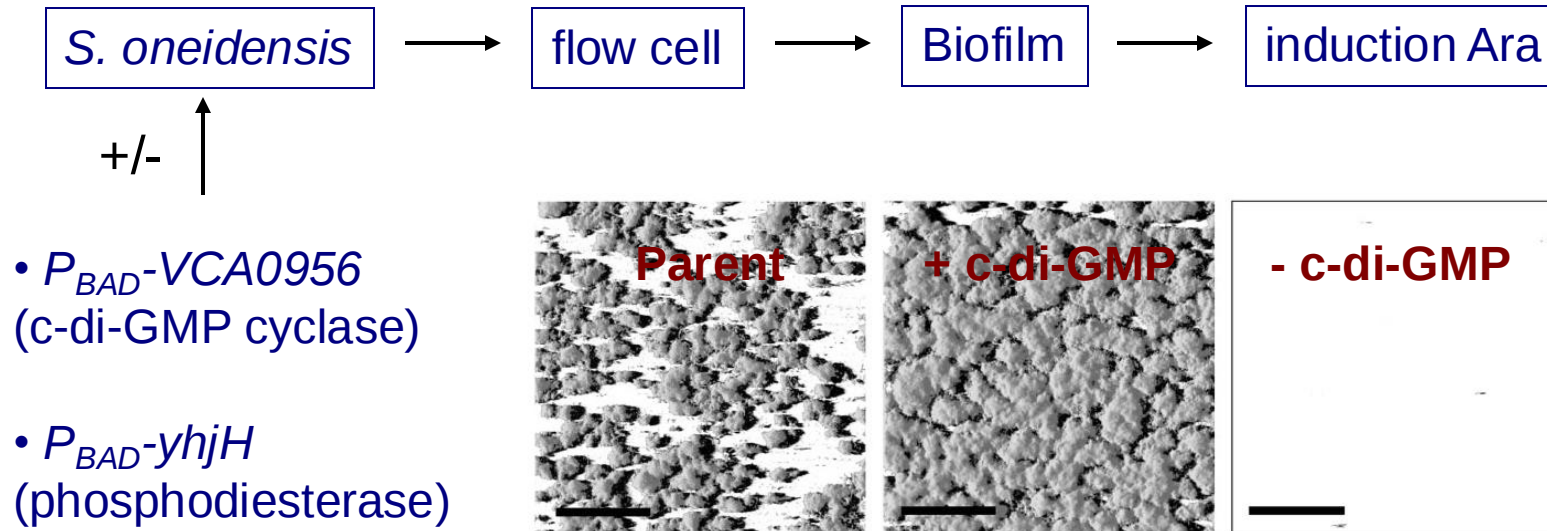
- Quorum sensing => +/-

Attention, la relation entre un signal et la formation de biofilms dépend du modèle étudié!

Le di-GMP cyclique



Dispersion de biofilms de *S. oneidensis*



Dispersion de biofilms

Signaux métaboliques et nutritionnels

- carence nutriments => + dispersion
- augmentation nutriments => + dispersion
- déplétion O₂ => + dispersion

**Attention, dépend du
modèle étudié!**

Messagers chimiques

- Messenger secondaire c-di-GMP
- Quorum sensing => + dispersion biofilm *S. aureus*

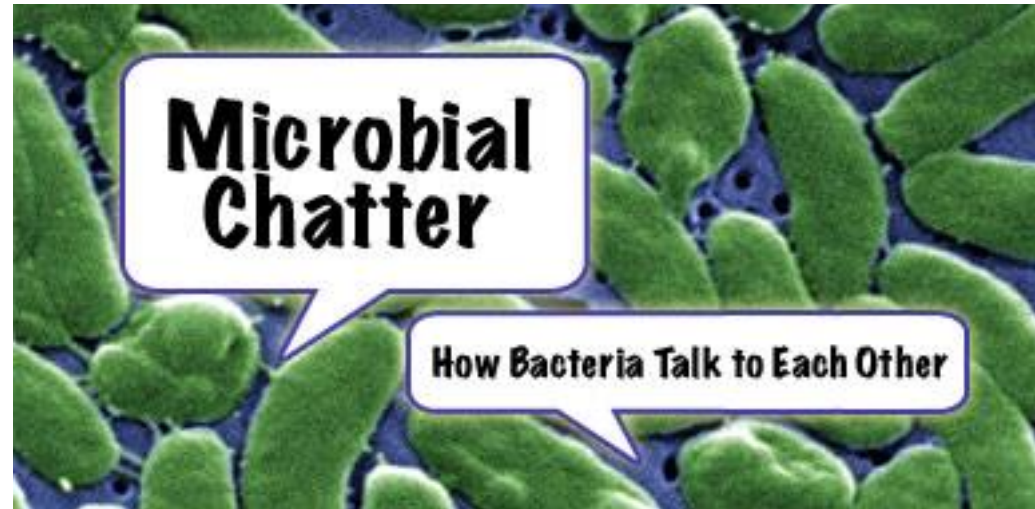
Mécanismes

- dégradation enzymatique de la matrice
- induction de mobilité (flagelle)
- production de surfactants
- mort et lyse d'une sous-population cellulaire

Partie III

du « quorum sensing » à la
« *socio-bactériologie* »

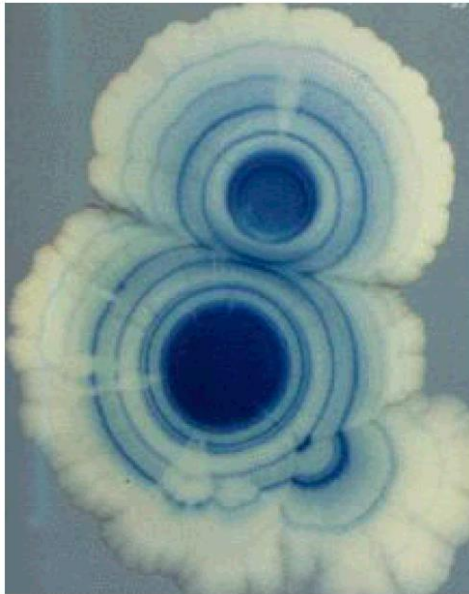
Communication cellules-cellules chez les bactéries



« Quorum sensing »
et
« Discussions microbiennes »

Bacteria are small but not stupid: Cognition, natural genetic engineering, and sociobacteriology

James A. Shapiro
Department of Biochemistry and Molecular Biology
University of Chicago
929 E. 57th Street
Chicago, IL 60637



Escherichia coli

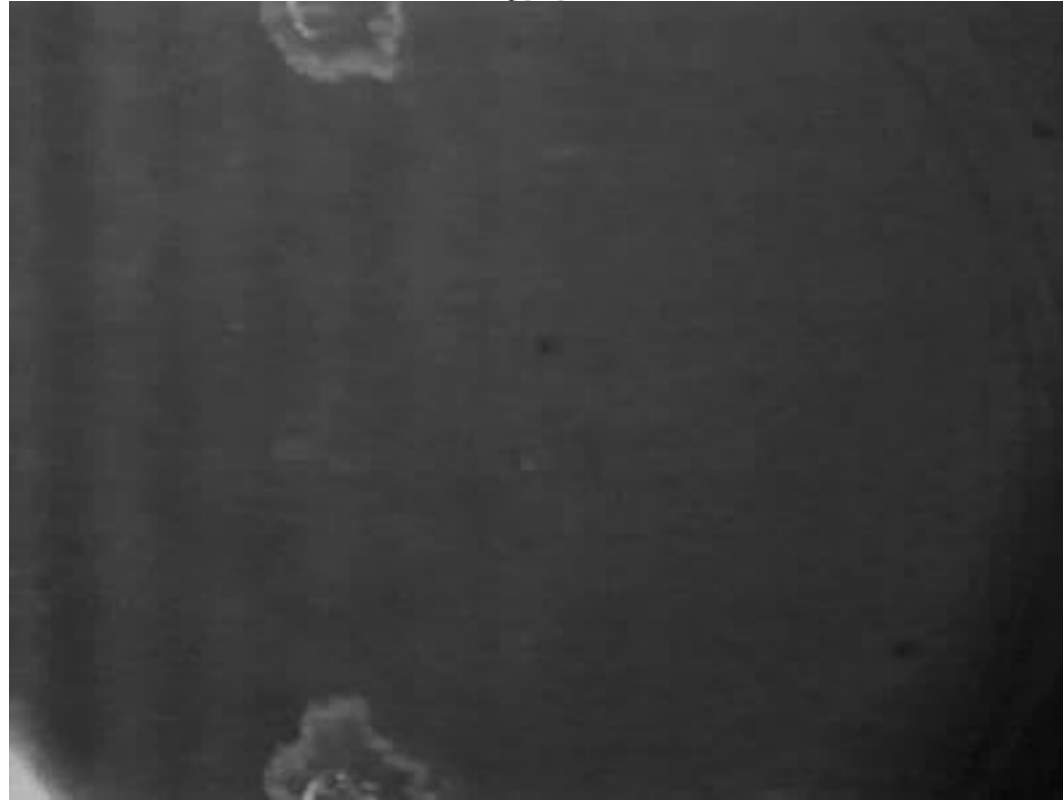
« ... In other words, seeing pattern and organization in bacterial colonies tells us that bacteria engage in regulated, coordinated behaviors, even when the biological utility of group activity may be something quite different from colony morphogenesis... »



Proteus mirabilis



James A. Shapiro
Department of Biochemistry and Molecular Biology
University of Chicago
929 E. 57th Street
Chicago, IL 60637

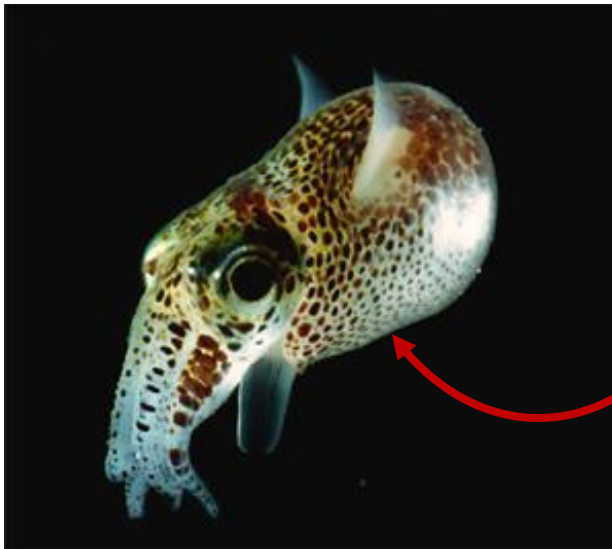


formation de « motifs » au cours de la morphogénèse de colonies Proteus mirabilis



Quorum sensing - historique

- **Luminescence chez le calmar *Euprymna scolopes*** : un système de défense reposant sur une symbiose avec la bactérie *Vibrio fischeri*.

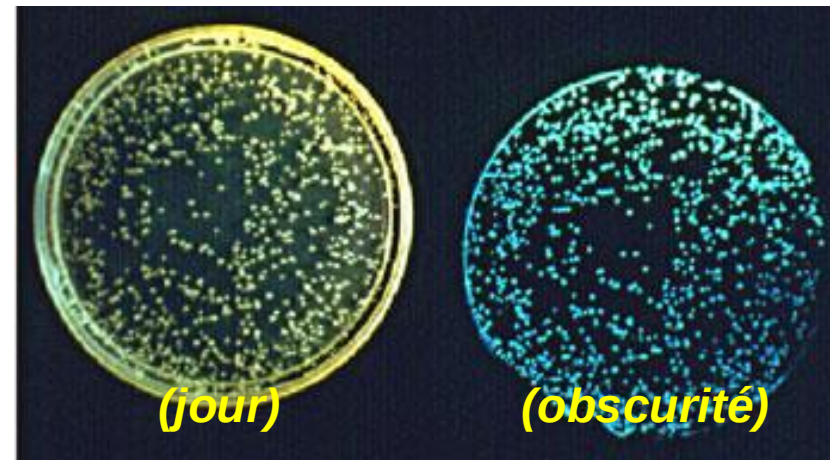


Euprymna scolopes

Organe luminescent :

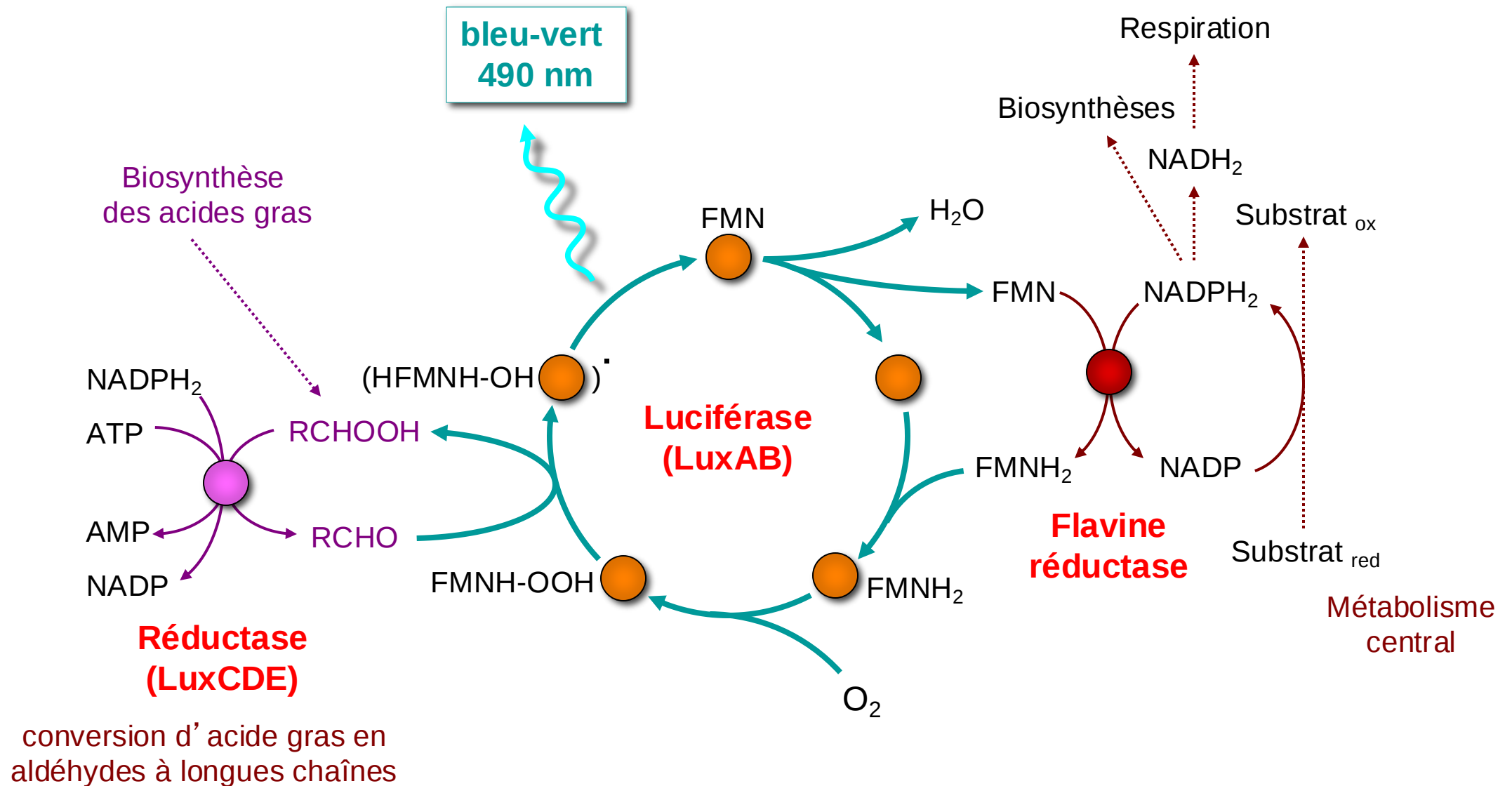
- Illumination du fond sablonneux pour masquer son ombre
- Simulation d'une émission lumineuse de couleur et d'intensité identique à celle de la surface pour ne pas être aperçu de dessous.

Vibrio fischeri



Bioluminescence et luciférase

(gènes *luxCDABE*)



Bioluminescence et densité cellulaire

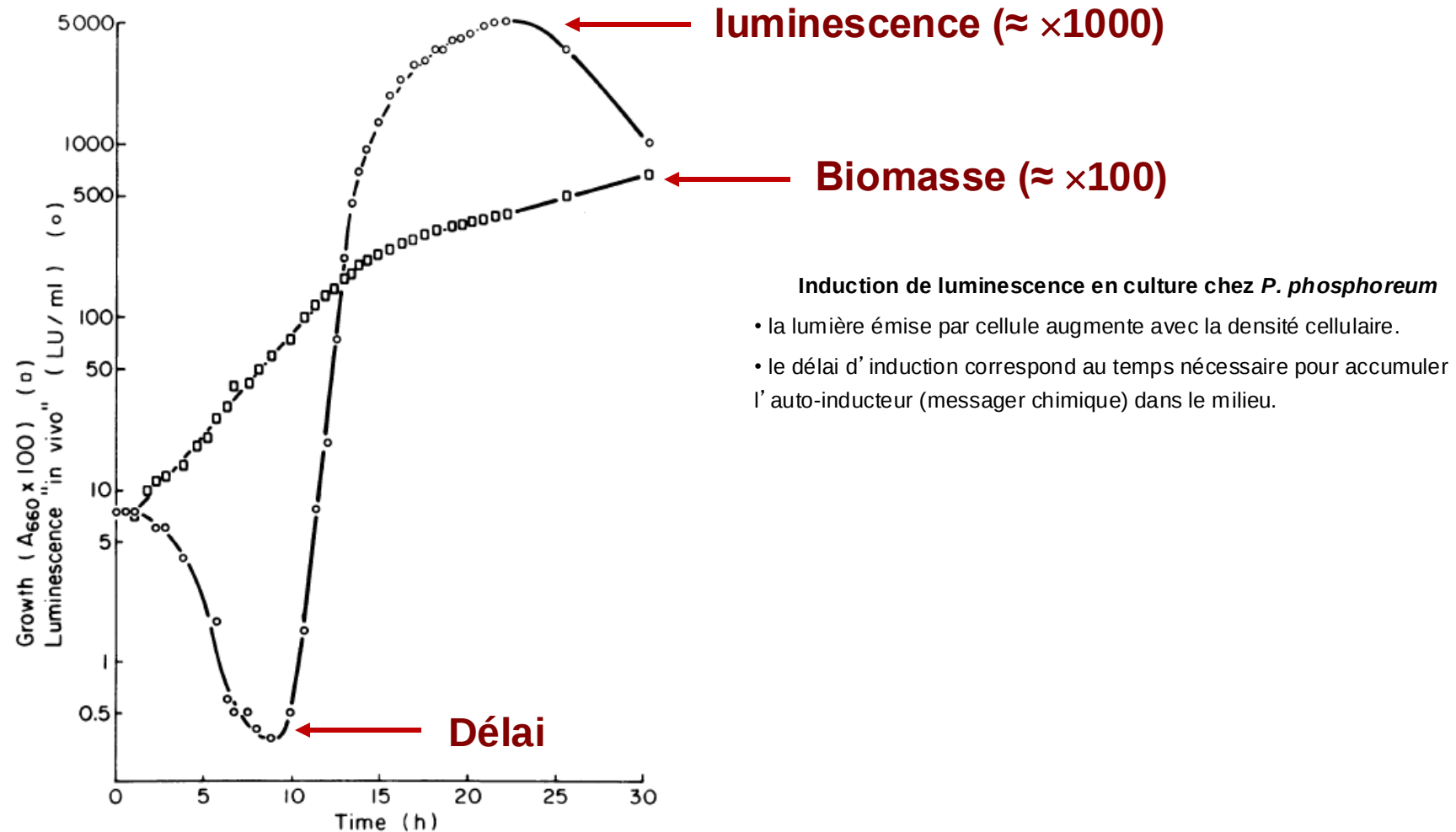
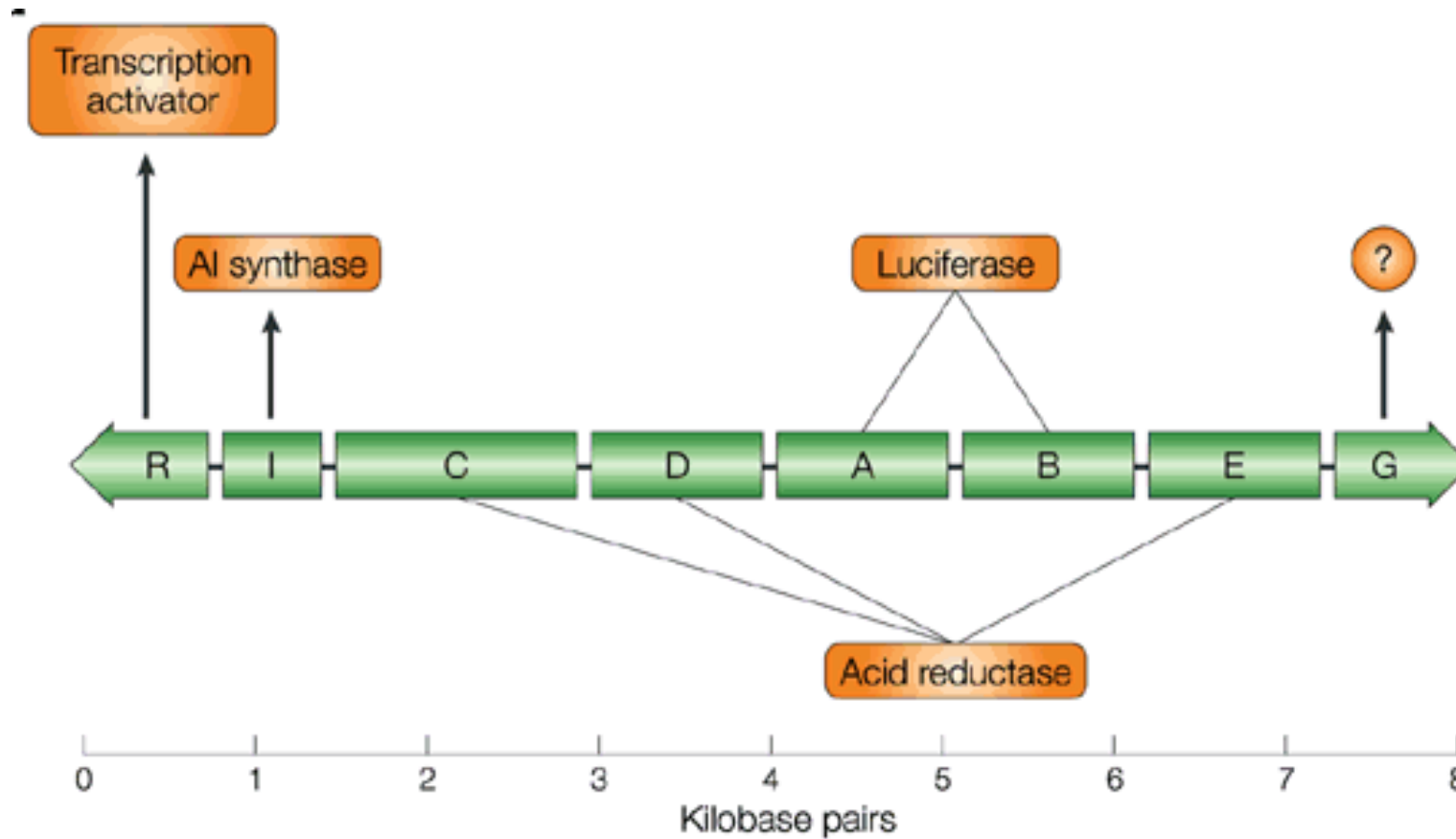
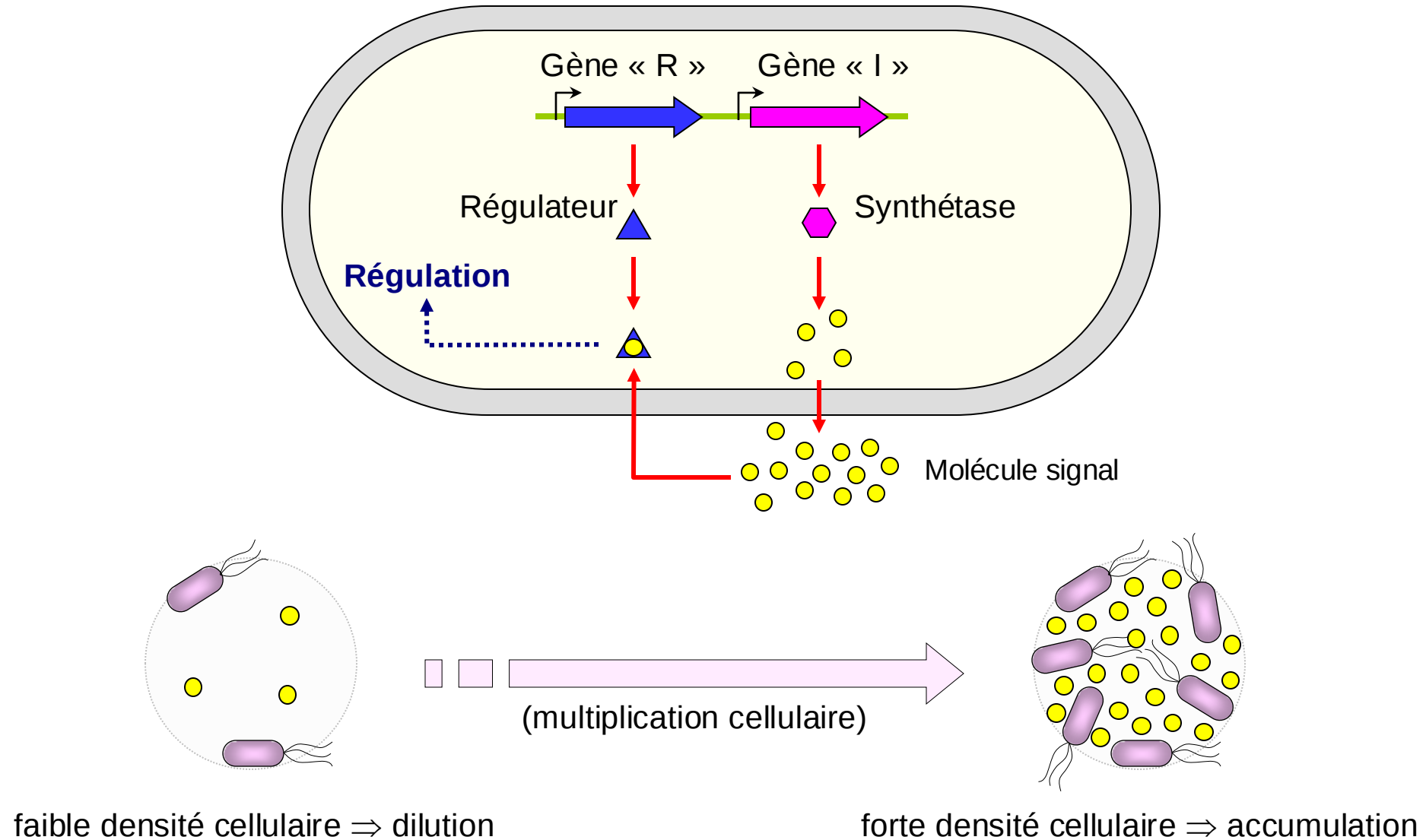


FIG. 4. Dependence of luminescence and cellular growth on time for *P. phosphoreum*. The light intensity is given in light units (LU), where 1 LU = 5×10^9 quanta per s, and growth is given by the optical density of the culture at 660 nm (A_{660}). Courtesy of L. Wall.

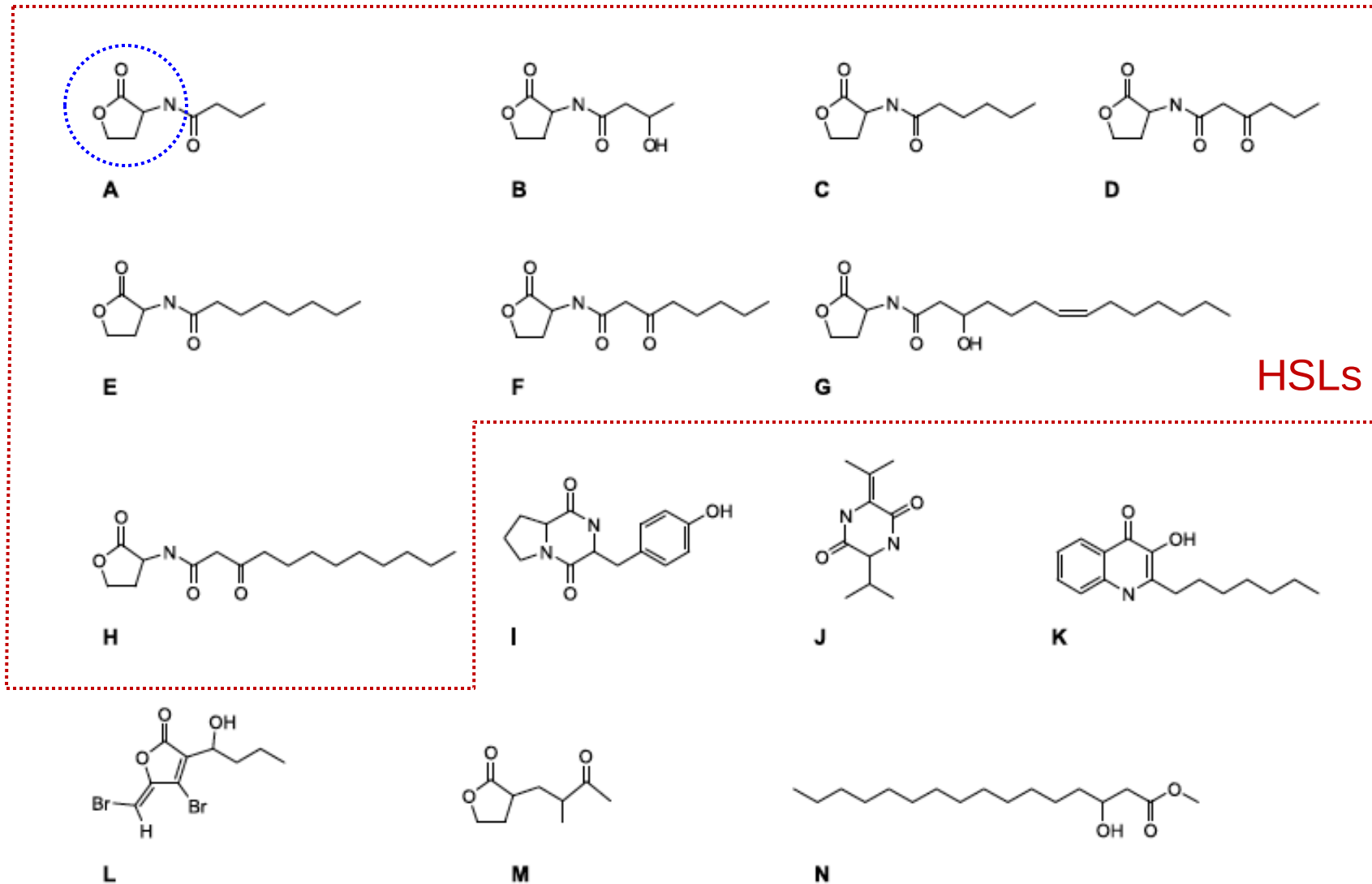
gènes *lux* impliqués dans la bioluminescence de *Vibrio fischeri*



Principe du quorum sensing



Les molécules signal du quorum sensing



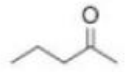
(HSLs: acyl-HomoSerine Lactones)

Structures et diversité des molécules signal

(a) *N*-Acylhomoserine lactones (*N*-AHLs)



R groups:



V. fischeri (LuxI)



V. harveyi (LuxM)

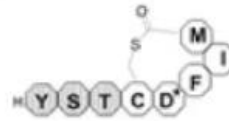


P. aeruginosa (RhII)



P. aeruginosa (LasI)

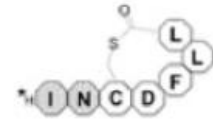
(b) Autoinducer oligopeptides (AIP)



AIP-I (*S. aureus*)



AIP-II (*S. aureus*)



AIP-III (*S. aureus*)

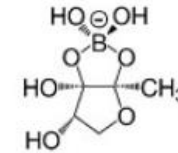


AIP-IV (*S. aureus*)

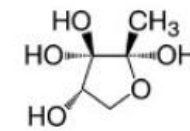
ADITRQWGD
ERGMT
EMRLSKFFRDFILQRKK

ComX (*B. subtilis*)
CSF (*B. subtilis*)
CSP (*S. pneumoniae*)

(c) AI-2 family

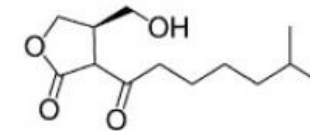


V. harveyi



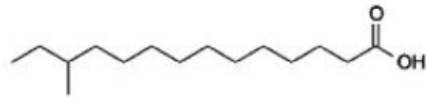
S. typhimurium

(d) *Streptomyces* butyrolactones

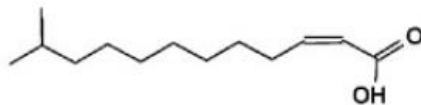


A-factor (*S. griseus*)

(e) Diffusible signal factor (DSF) family



Xf DSF (*X. fastidiosa*)

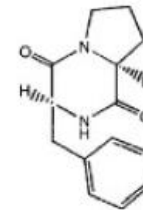


DSF (*X. campestris*)

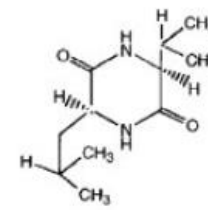


BDSF (*B. cenocepacia*)

(f) Diketopiperazines (DKPs)

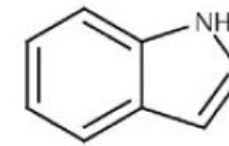


Cyclo(L-Phe-L-Pro)
(*P. putida*)



Cyclo(L-Leu-L-Val)
(*P. putida*)

(g) Indole

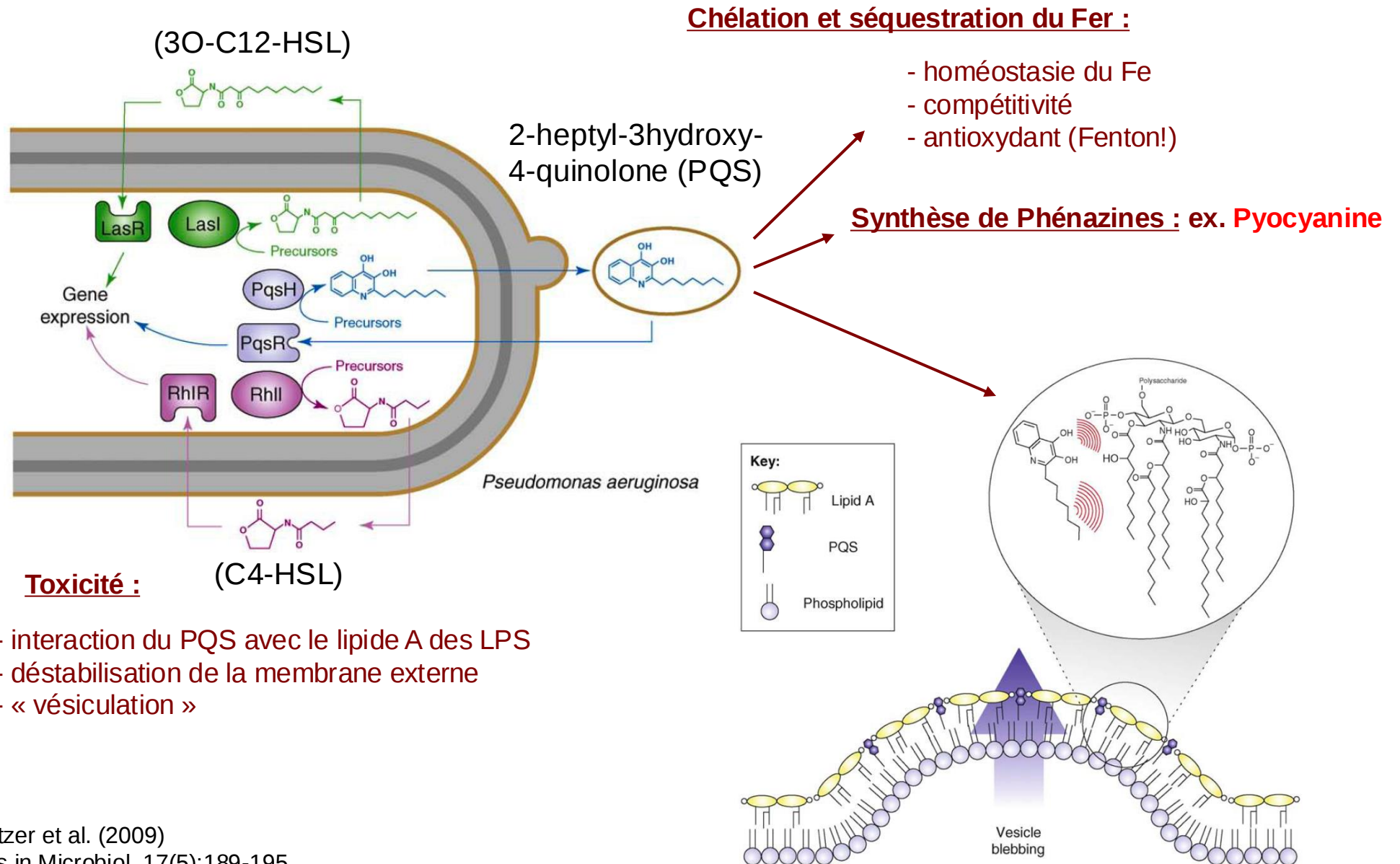


Indole

Quelques exemples de phénotypes contrôlés par le quorum sensing

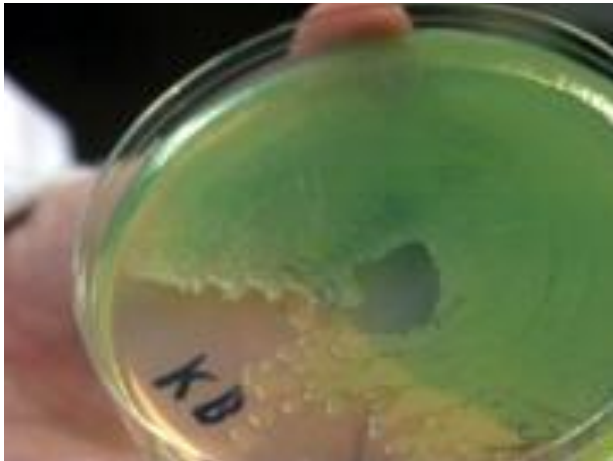
- Agrégation, **formation de biofilm**
- Induction de virulence
- Synthèse d' exoprotéases, sidérophores
- Conjugaison plasmidique, transposition, compétence
- Mobilité cellulaire (« swarming », « swimming », « gliding »)
- Synthèse d' exopolysaccharides
- Synthèse de métabolite secondaire, antibiotiques
- Colonisation racinaire, nodulation racinaire, symbiose
- Synthèse de pigment
- Bioluminescence
- *etc...*

Cas de *Pseudomonas aeruginosa*



Pyocyanine et infection respiratoire

- **Pyocyanine** : jusqu'à **27µg/mL** dans les expectorations de patients infectés par *P. aeruginosa*.
- Production d'espèces radicalaires **toxiques** pour d'autres microbes.
- **Avantage** sélectif pour la **colonisation** de niches écologiques naturelles.
- Apparemment essentiel pour le développement dans les poumons même en absence de compétiteurs....
autres rôles physiologiques bénéfiques pour l'infection.



Pyocyanine et respiration

Culture de *Pseudomonas aeruginosa*

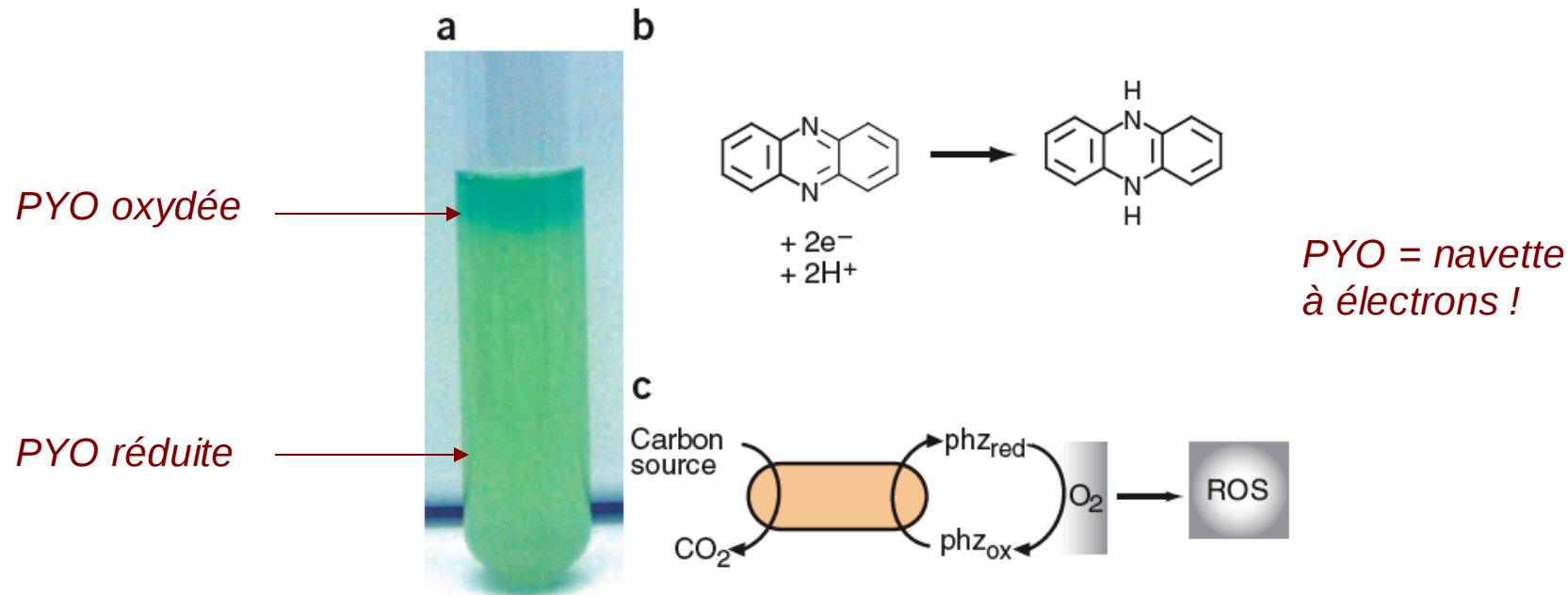
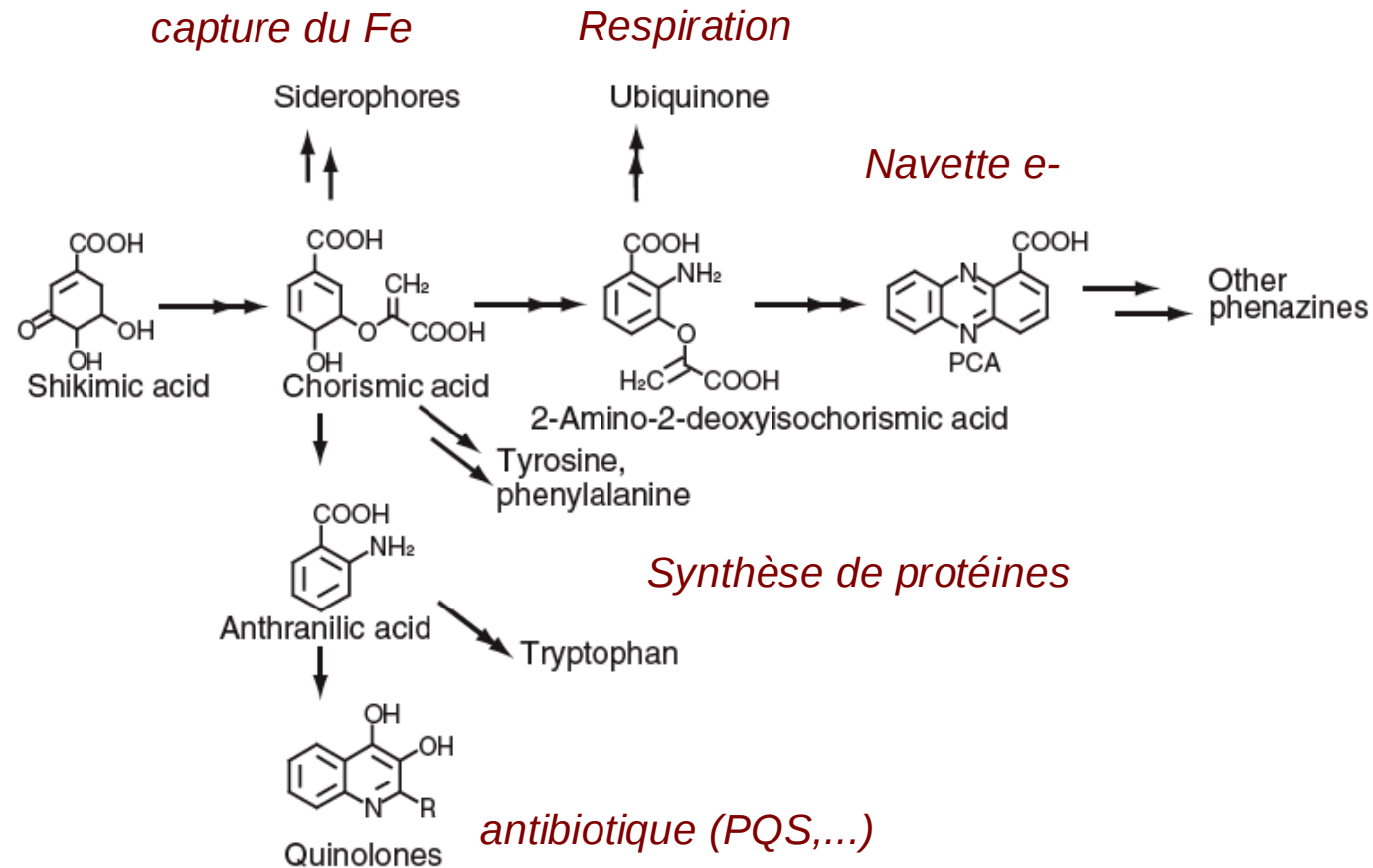


Figure 2 Pseudomonads stimulate phenazine reduction. (a) Characteristic gradient formed by standing cultures of *P. aeruginosa*. Bacterial respiration renders most of the culture anoxic. Phenazines (phz) are reduced and, in the case of PYO, become colorless. The darker blue at the top represents oxidized PYO. (b) Half-reaction representing generic two-electron phenazine reduction. (c) Schematic of phenazine reduction and auto-oxidation responsible for gradient formation in standing cultures. Reduced phenazines are oxidized abiotically by oxygen, generating reactive oxygen species (ROS).

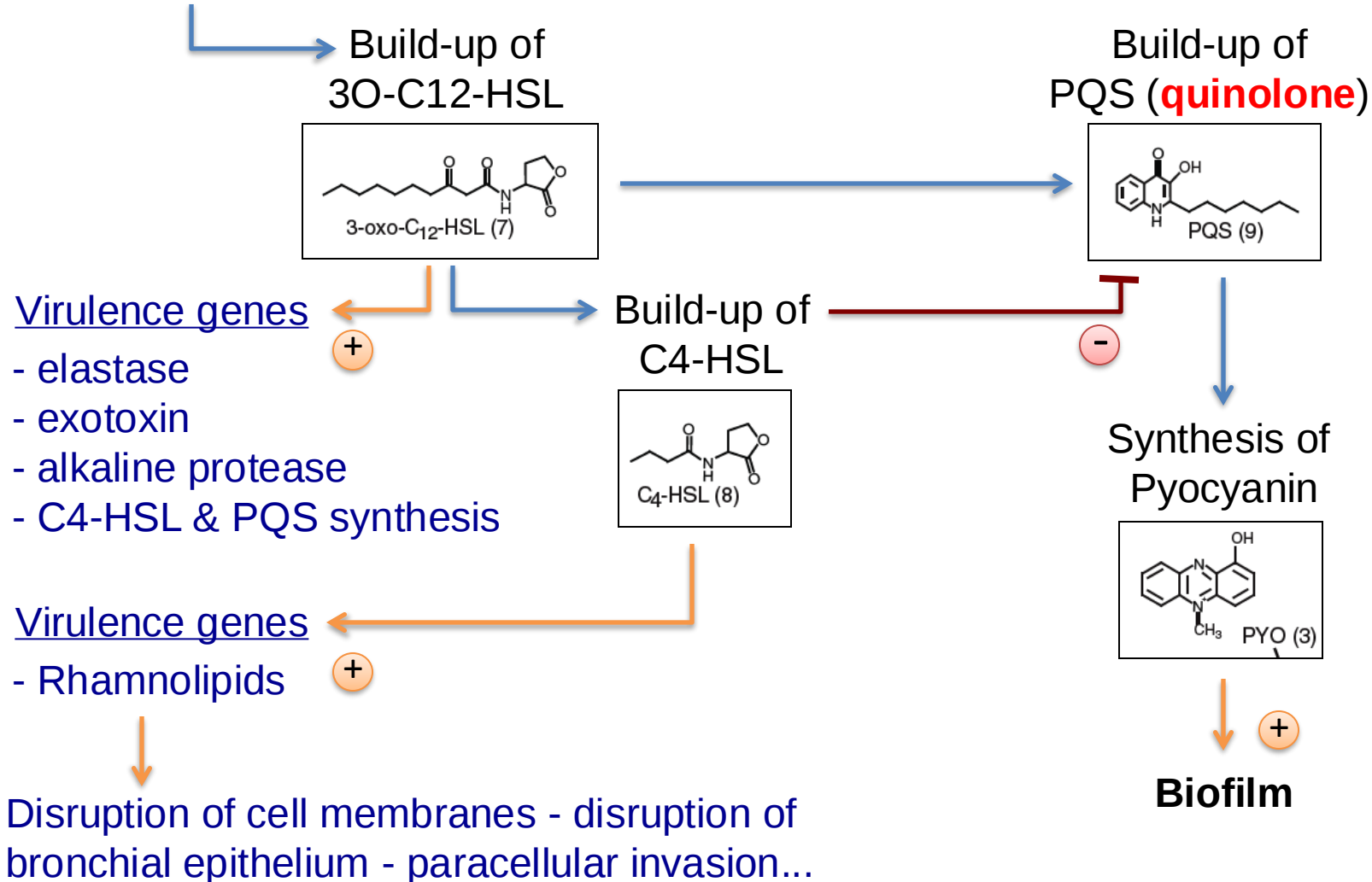
Biosynthèse des phénazines



Scheme 1 Phenazine biosynthesis and its relation to the shikimic acid pathway in pseudomonads^{24,45,46,93}.

Quorum sensing regulatory network in *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa growth



Effet des Phénazines sur le développement de biofilms chez *P. aeruginosa*

Biofilm de *P. aeruginosa* à 4 jours (en flow cells)

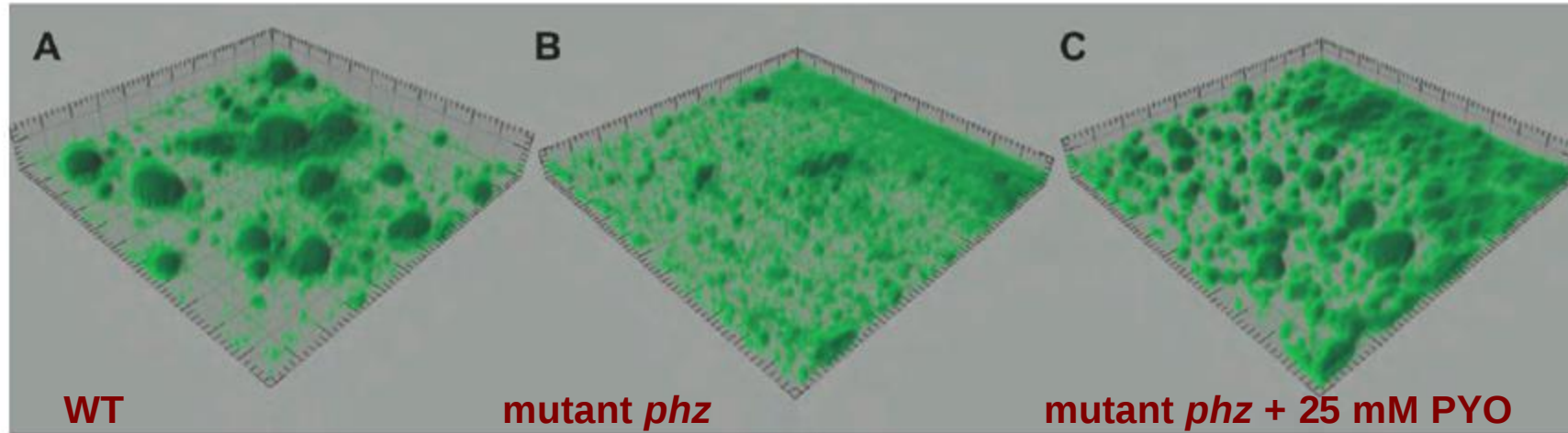


Fig. 2. Phenazines support development of structured biofilms in a continuous flow cell system. Representative images of 4-day-old biofilms of the wild-type (A) and *phz1/2* mutant without (B) and with addition of 25 μ M pyocyanin (C) to the nutrient flow. Images of similar positions in the flow cell were taken in triplicate. Three independent experiments were performed with similar results.

Rôle des phénazines dans le contrôle de la formation de biofilms.