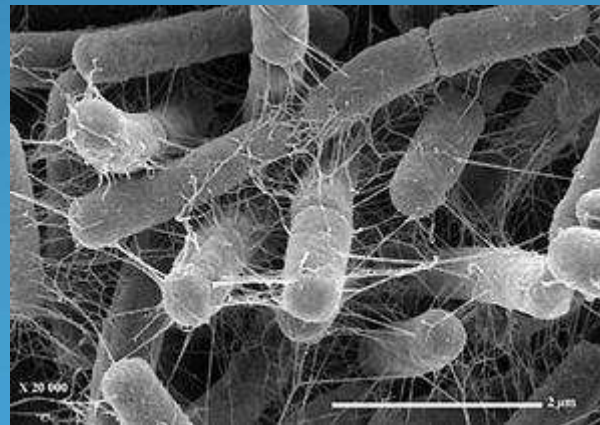


Physiopathologie du biofilm sur matériel



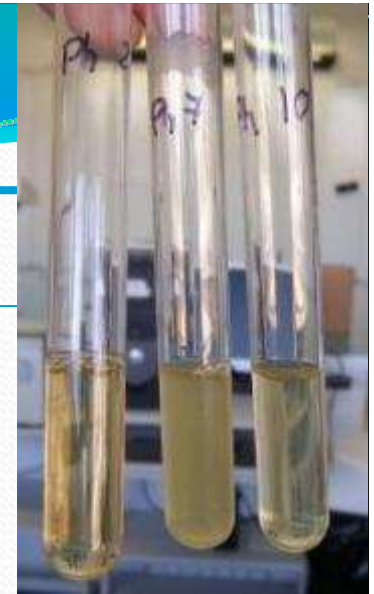
Sommaire

- 1- Historique, définition et implication du biofilm**
- 2- Cycle du biofilm : 5 étapes**
- 3- Pathogénèse du biofilm sur matériel**
- 4- Biofilm sur matériel : un ménage à trois**
- 5- Implication du biofilm : diagnostique et thérapeutique**

Etats physiologiques des bactéries

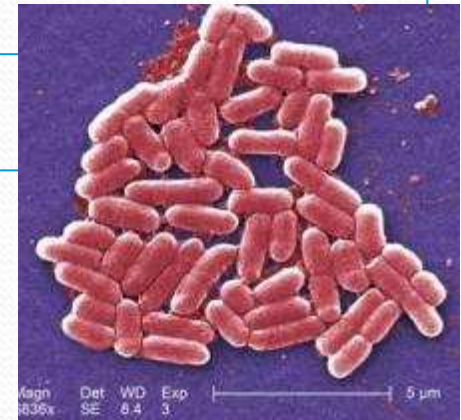
Bactéries planctoniques :

- Libres, mobiles, en amas mais en suspension dans le μ environnement
 - Sensibles aux antibiotiques et Ac
 - Sensibles à la phagocytose et au complément
- ☒ **Forme végétative présente au laboratoire**



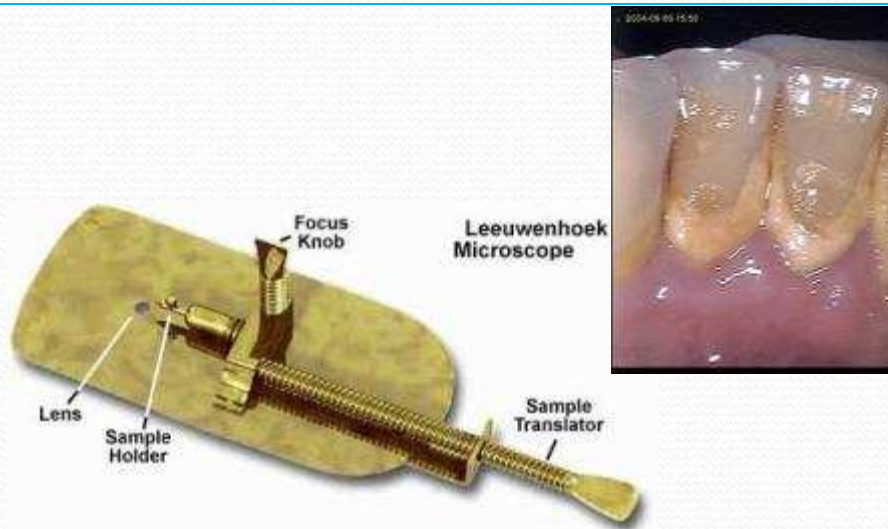
Bactéries sessiles :

- Adhérentes aux surfaces ou cellules du μ environnement
 - Régulation de certains groupes de gènes participant à la formation du biofilm
 - Protection des agressions chimiques, physiques et cellulaires (système immunitaire)
- ☒ **Forme végétative présente dans la nature, le plus fréquent**



Histoire et découverte du biofilm

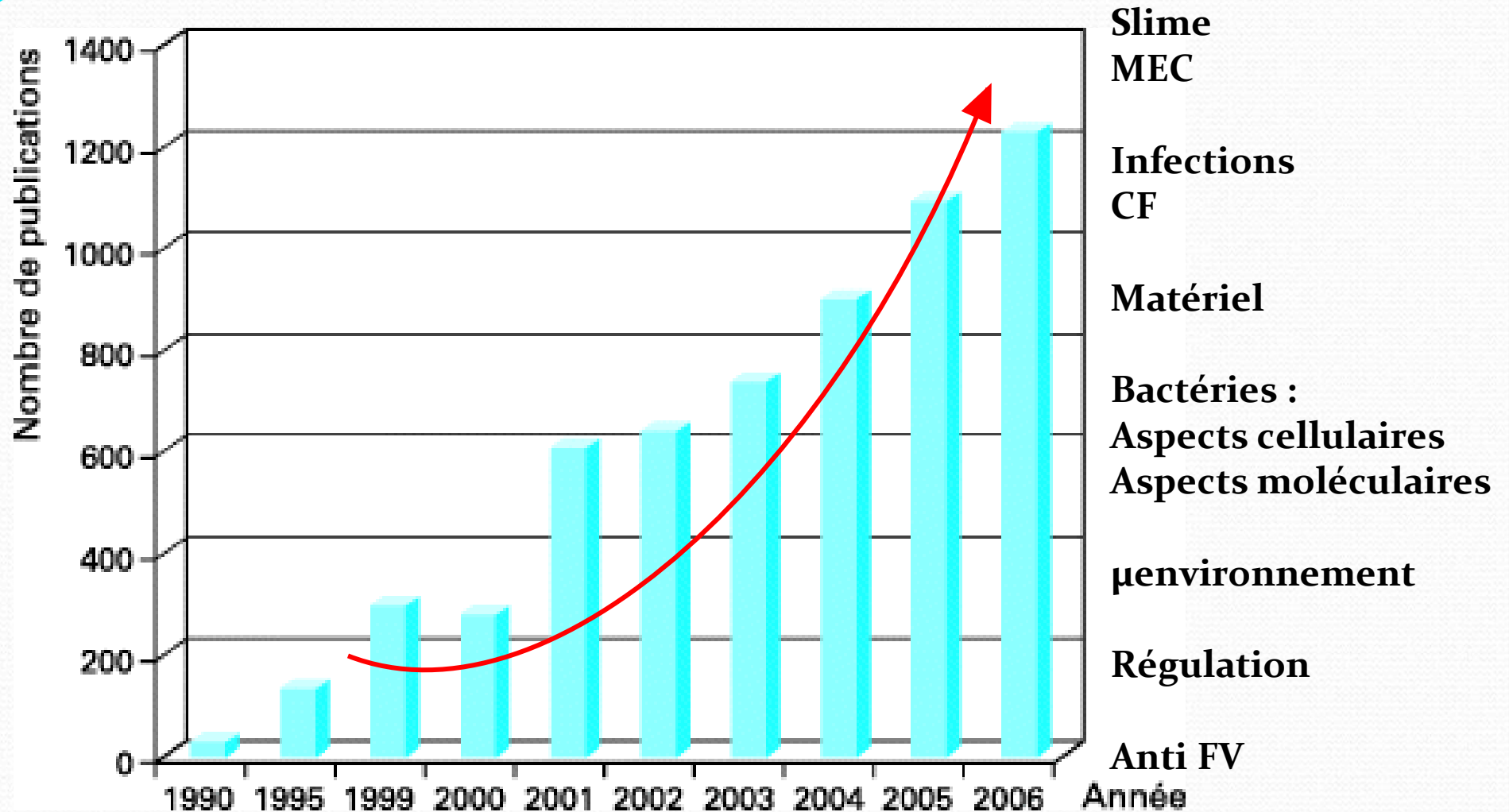
Animalcules Van Leeuwenhoek – observation plaques dentaires 1676
« Bactéries planctoniques libérées du biofilm »



Eontophysalis, genre de cyanobactéries (3,8 milliards d'années)
Stromatolithes du littoral Ouest Australien parc national de Yalgorup
roches calcaires récifales biogéniques, tapis biominéral

Formation du biofilm inévitable : surface/bactéries, eau et nutriments :
Mode d'adaptation très ancien des bactéries !

Qui s'intéresse au biofilm ?



Biofilm et le monde médical

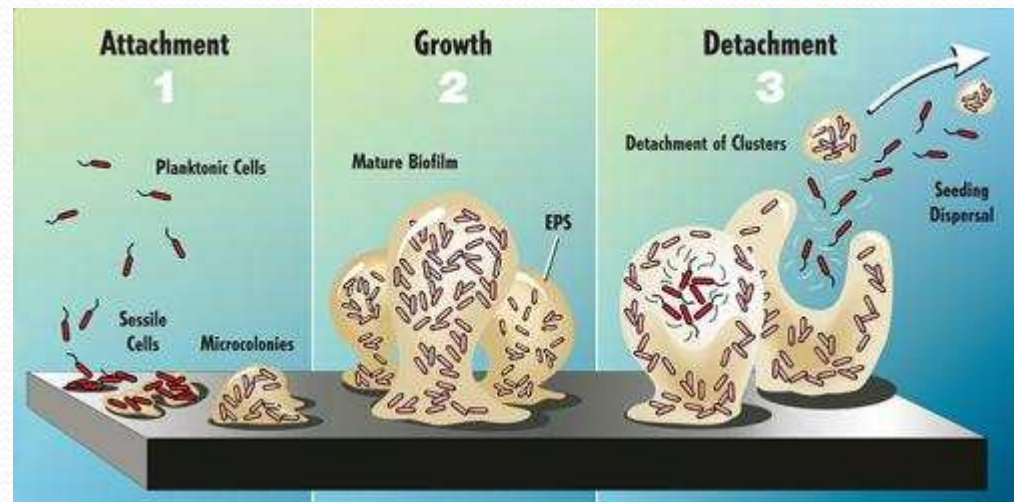
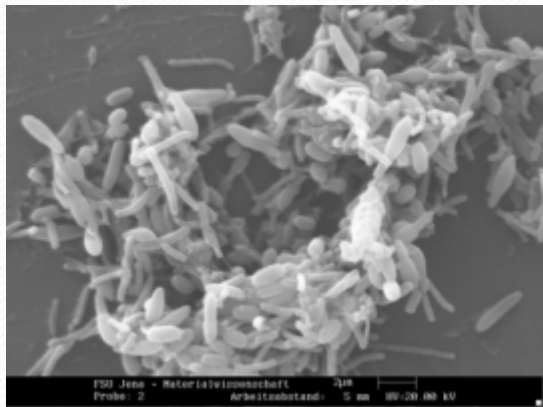
Infections associées aux soins et nosocomiales = 60-80 % biofilm
Si biofilm = apparition retardée des symptômes, chronicité et récurrence
Difficultés diagnostiques et thérapeutiques



Définition du biofilm

Assemblage de bactéries irréversiblement associées à une surface inerte (non décrochable par un rinçage doux), incluses dans une gangue ou matrice extracellulaire essentiellement polysaccharidique

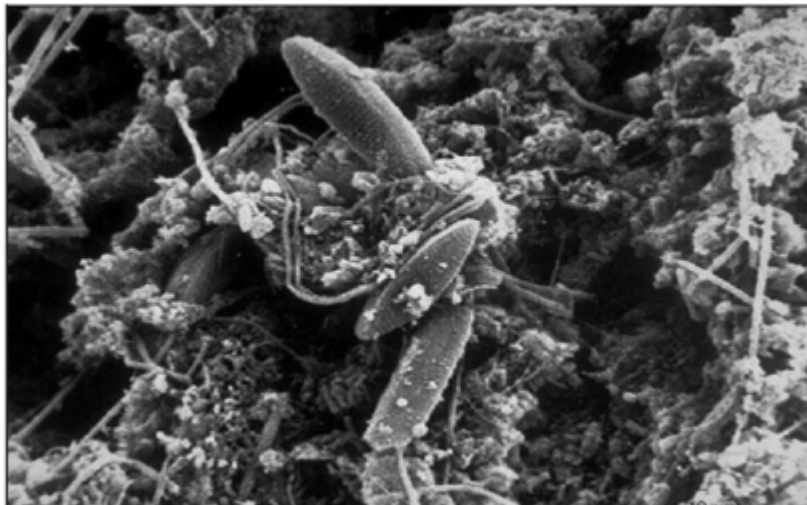
- **Communautés mono ou plurimicrobiennes** : hétérogène et dynamique, en constant changement
- **15% de cellules et 85 % matériel de matrice**
- **Partage de compétence et d'aptitude individuelles pour la survie du groupe, échanges génétiques**
- **Nombreux avantages en termes de protection (micro-embols septiques)**



Existence de différents types de biofilm

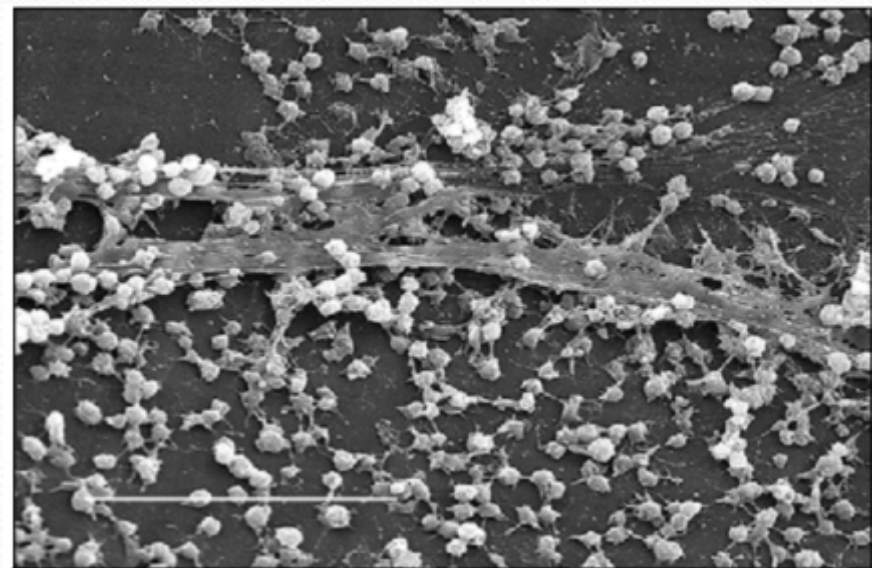
Biofilm environnementaux :
exemple système de distribution industrielle ou collective de l'eau

Très complexes
Généralement plurimicrobien
Composition variable : bactéries
champignons, algues, déchets,
produits de corrosion
Echanges intenses



Biofilm des dispositifs médicaux: prothèse articulaire, valve mécanique, KT, sondes

Plus simple
Généralement monomicrobien
Cocci ++ mais aussi BGN
Conséquences diagnostiques et thérapeutiques



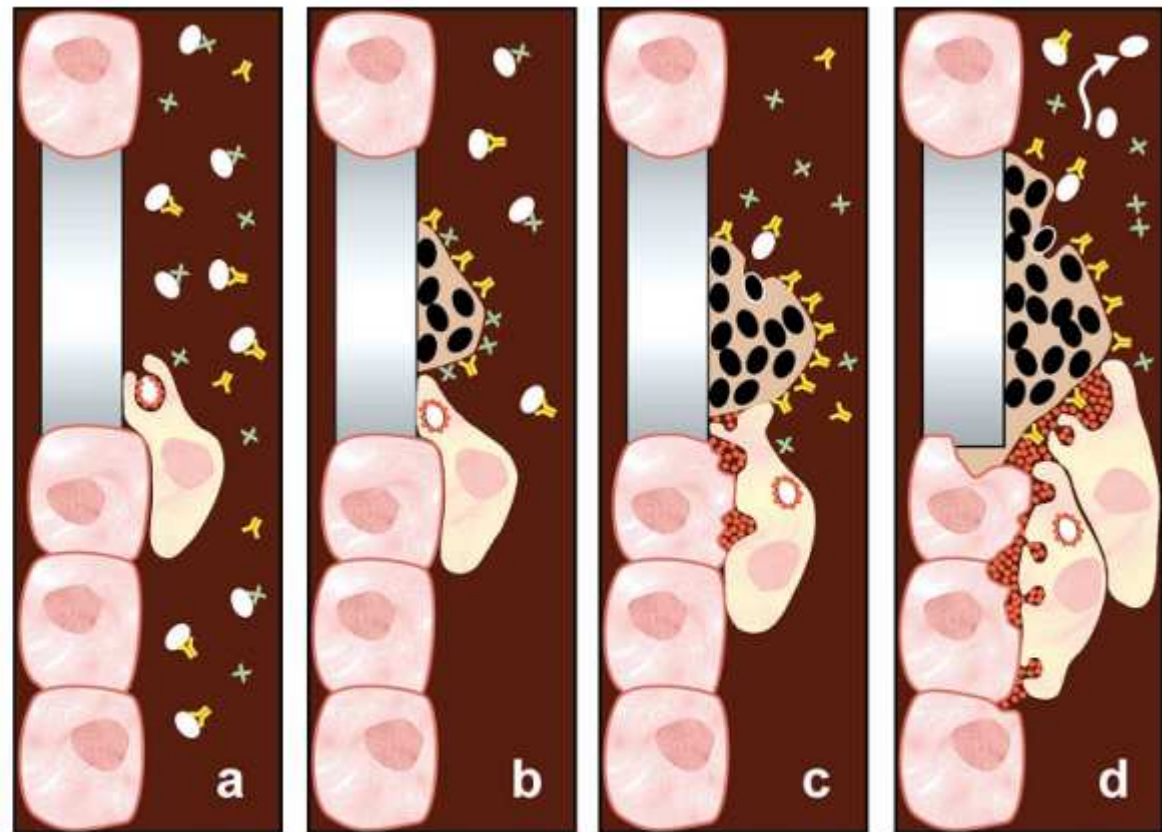
Le père du biofilm

REVIEW

Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections

J. W. Costerton,¹ Philip S. Stewart,¹ E. P. Greenberg^{2*}

Fig. 1. Diagram of a medical biofilm. (A) Planktonic bacteria can be cleared by antibodies and phagocytes, and are susceptible to antibiotics. (B) Adherent bacterial cells form biofilms preferentially on inert surfaces, and these sessile communities are resistant to antibodies, phagocytes, and antibiotics. (C) Phagocytes are attracted to the biofilms. Phagocytosis is frustrated but phagocytic enzymes are released. (D) Phagocytic enzymes damage tissue around the biofilm, and planktonic bacteria are released from the biofilm. Release may cause dissemination and acute infection in neighboring tissue.



x Antibiotic y Antibody Planktonic cell Biofilm cell Phagocyte enzymes

1934-2012



Costerton 1999 Science

Médecine et biofilm ?

Table 1. Indwelling medical devices on which biofilms may develop.

Central venous catheters
 Central venous catheter needleless connectors
 Contact lenses
 Endotracheal tubes
 Intrauterine devices
 Mechanical heart valves
 Pacemakers
 Peritoneal dialysis catheters
 Prosthetic joints
 Tympanostomy tubes
 Urinary catheters
 Voice prostheses

Table 2. Biofilm-associated microorganisms commonly isolated from selected indwelling medical devices.

Indwelling medical device	Organisms
Central venous catheter	Coagulase-negative staphylococci, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>
Prosthetic heart valve	Viridans <i>Streptococcus</i> , coagulase-negative staphylococci, enterococci, <i>Staphylococcus aureus</i>
Urinary catheter	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
Artificial hip prosthesis	Coagulase-negative staphylococci, β -hemolytic streptococci, enterococci, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Bacterioides</i> species, <i>Staphylococcus aureus</i> , viridans <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Artificial voice prosthesis	<i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Stomatococcus mucilaginous</i>
Intrauterine device	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> species, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus</i> species, <i>Lactobacillus plantarum</i> , group B streptococci, <i>Enterococcus</i> species, <i>Candida albicans</i>

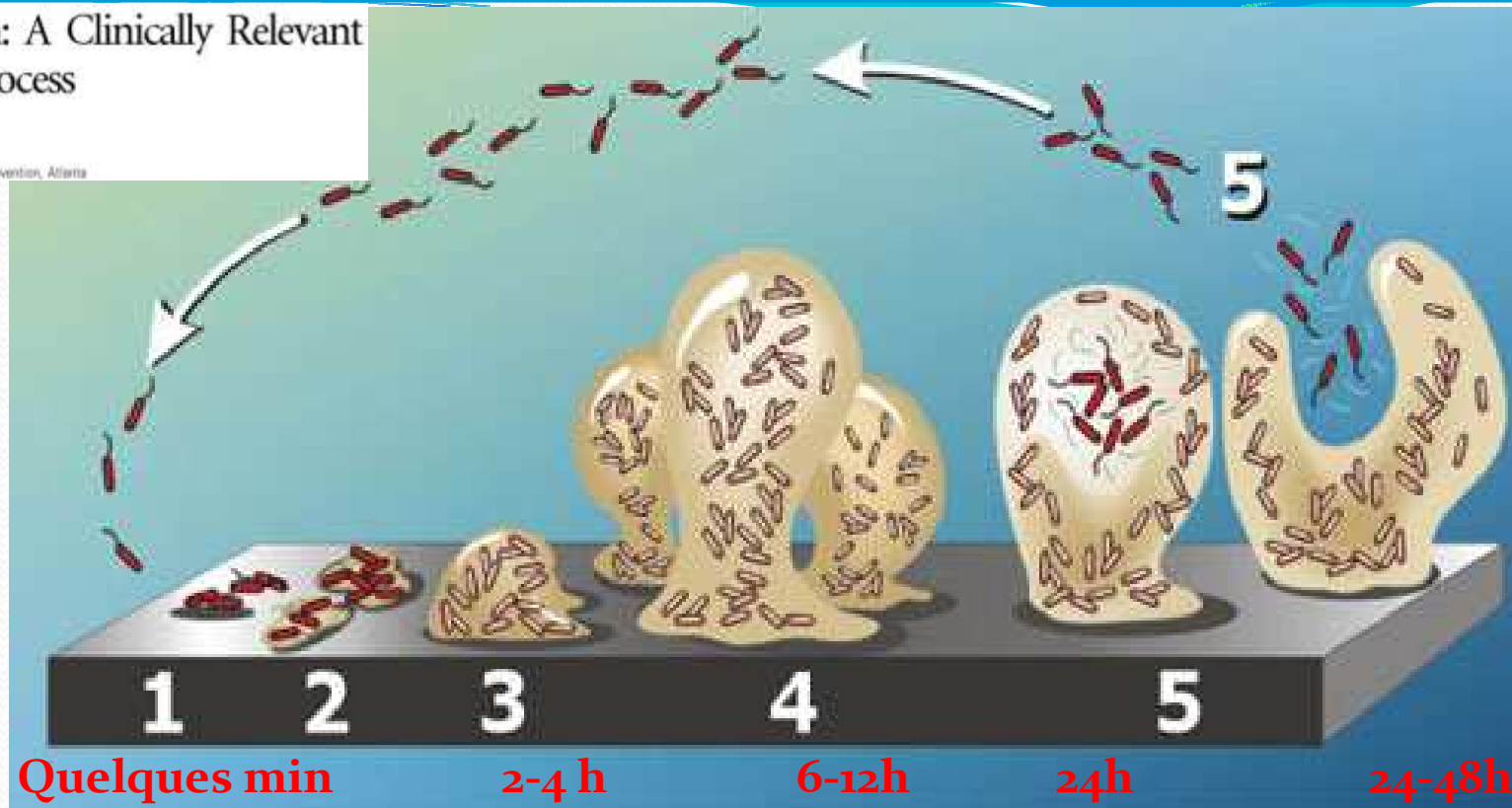
Cycle du biofilm

Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process

Rodney M. Donlan

Biofilm Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta

Dolan, CID 2001



1 Quelques min

2 2-4 h

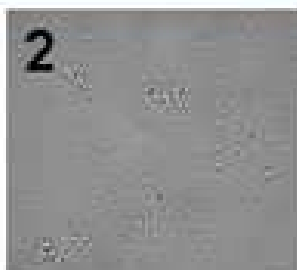
3 6-12h

4 24h

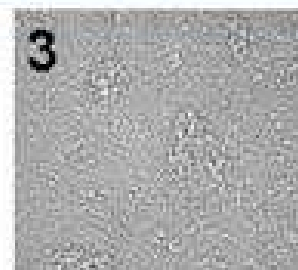
5 24-48h



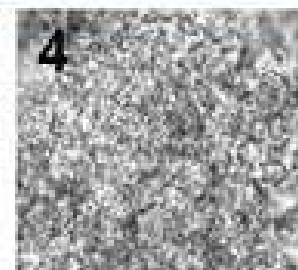
1
Adhérence réversible



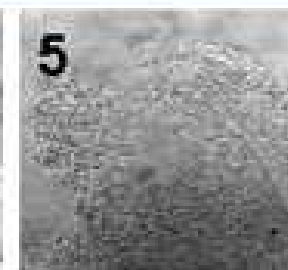
2
Adhérence Irréversible



3
Multiplication
Formation
Micro-colonies



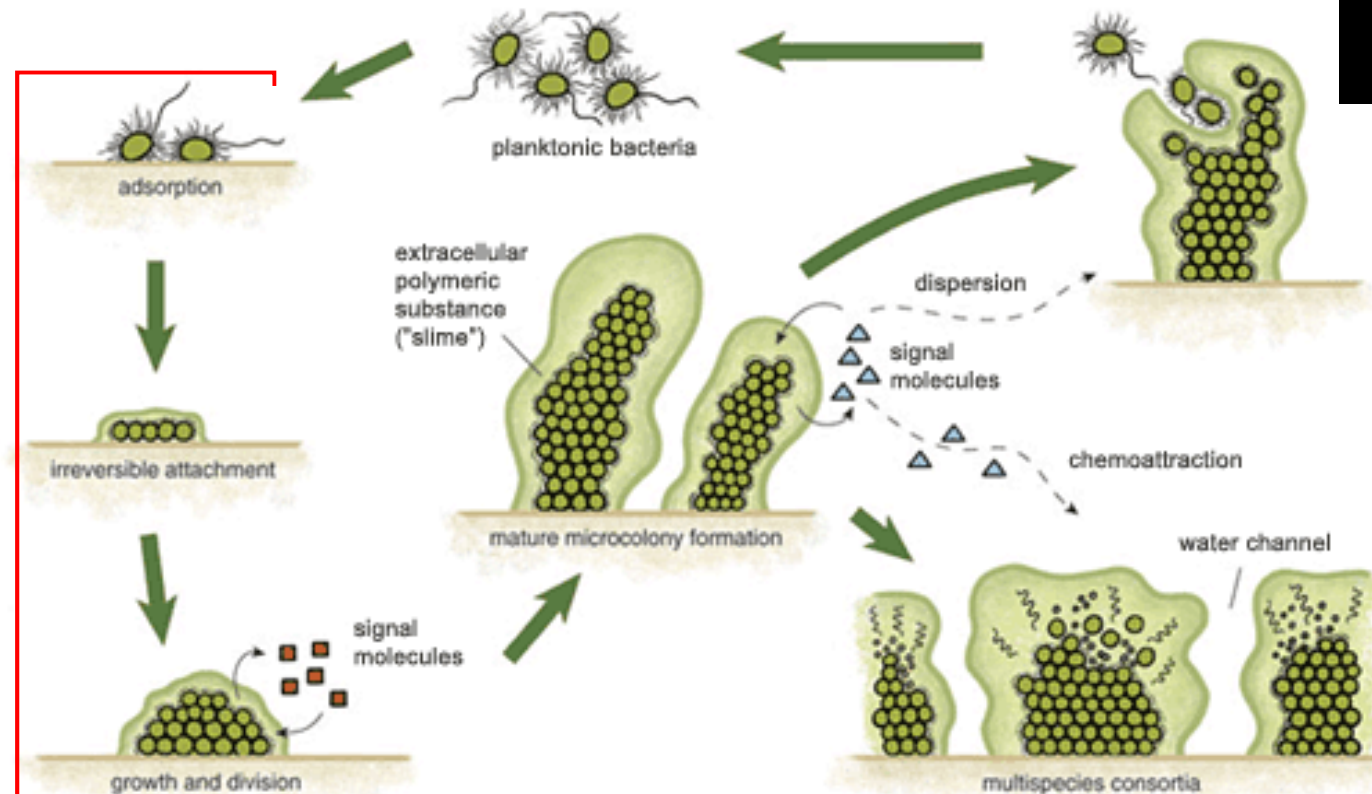
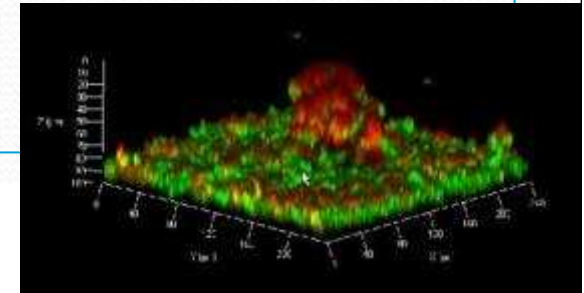
4
Production
Matrice EPS
Biofilm précoce/
mature



5
Libération
cellules
planctoniques

Cycle du biofilm

Caractéristiques cellulaires et moléculaires :
Taille variable : $10^7/cm^2$ – 200/500 μm
Phénotype biofilm « small colonie variant »



Nécessité d'un film de conditionnement+++

Etapes de formation du biofilm (1)



How Do Bacteria Know They Are on a Surface and Regulate Their Response to an Adhering State?

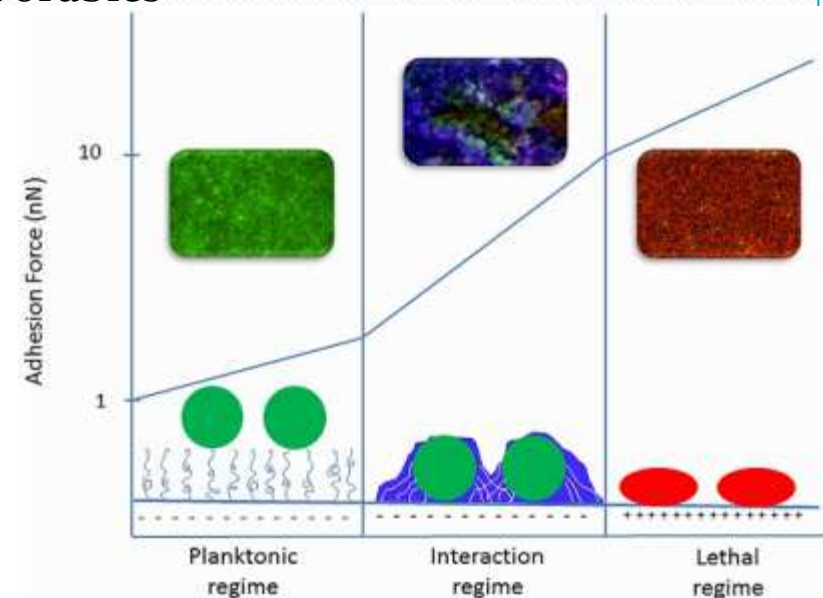
Henk J. Busscher, Henny C. van der Mei*

PLoS PATHOGENS

Adhérence réversible :

Rencontre accidentelle μenvironnement, surface inerte conditionnée (rôle des molécules du sérum) et bactérie planctonique

- Nécessité d'une proximité et de conditions favorables (pH, T°, osmolarité, oxygénation, etc...)
- Forces d'interactions complémentaires entre les 2 acteurs :
 - **Interactions électrostatiques**
fonction charges des parois bactériennes (\neq Gram +/-), surfaces biomatériaux chargées neg
 - **Force de Van der Waals** attractives



Etapes de formation du biofilm (1)



How Do Bacteria Know They Are on a Surface and Regulate Their Response to an Adhering State?

Henk J. Busscher, Henny C. van der Mei*

PLoS PATHOGENS

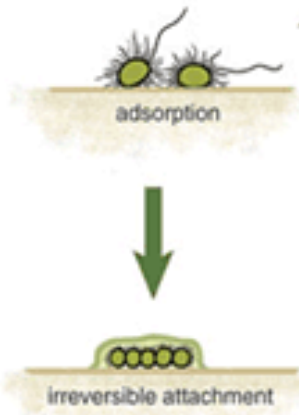
Adhérence réversible :

- **Hydrophobicité** des biomatériaux : adhérence accrue si surfaces hydrophobes Téflon, Dacron, métal, polymères
- **Hydrophobicité** des bactéries : *S. aureus* (A téichoïques) > *E. coli* (LPS)

Forces hydrodynamiques :

- KT, sonde, shunts
Equilibre entre vitesse (turbulence entraînant l'adhérence par projection sur les parois et forces de cisaillement entraînant un détachement)

Etapes de formation du biofilm (2)



Adhérence irréversible :

- **Synthèse d'une gangue d'exopolysaccharide :**

Attachement fort entre support et bactéries, protéines de l'hôte et structures pariétales (pili, adhésines, ...)

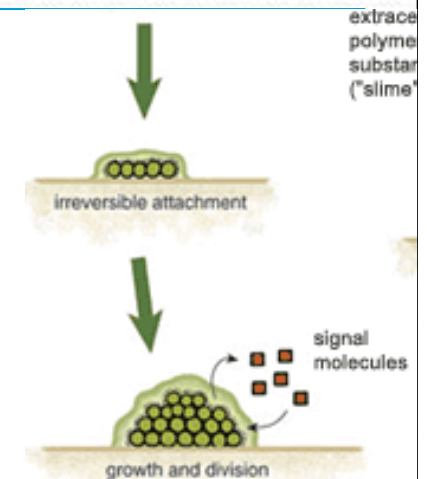
- **Surface et anfractuosités des implants :**

Si KT et sonde = plaquettes, fibrine, vitronectine, laminine

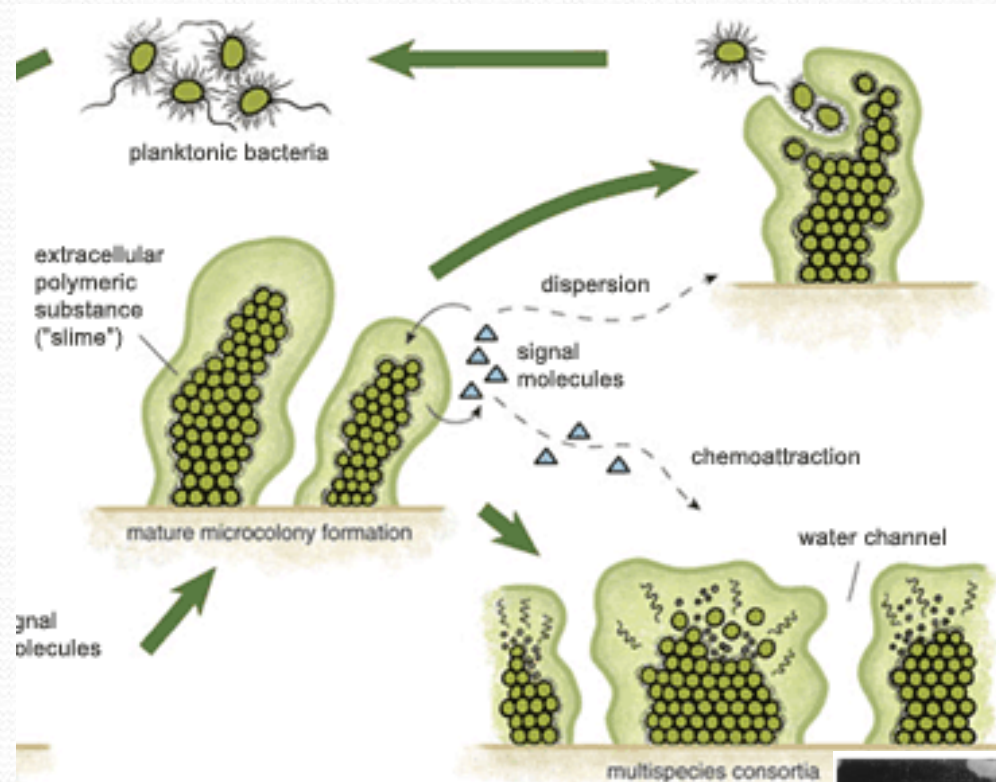
Si KT = risque thrombogène,

Multiplication : biofilm précoce → biofilm mature

- Formation de micro-colonies
- Protection par gangue d'exopolysaccharide (autoinduction)
- Médiateurs bactériens
- Ralentissement du métabolisme
- Coopération cellulaires : mutualisation des moyens, partage d'informations

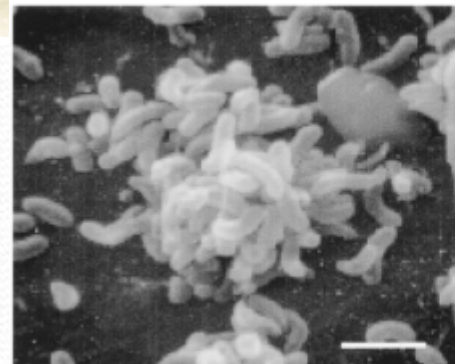


Etapes de formation du biofilm (3)



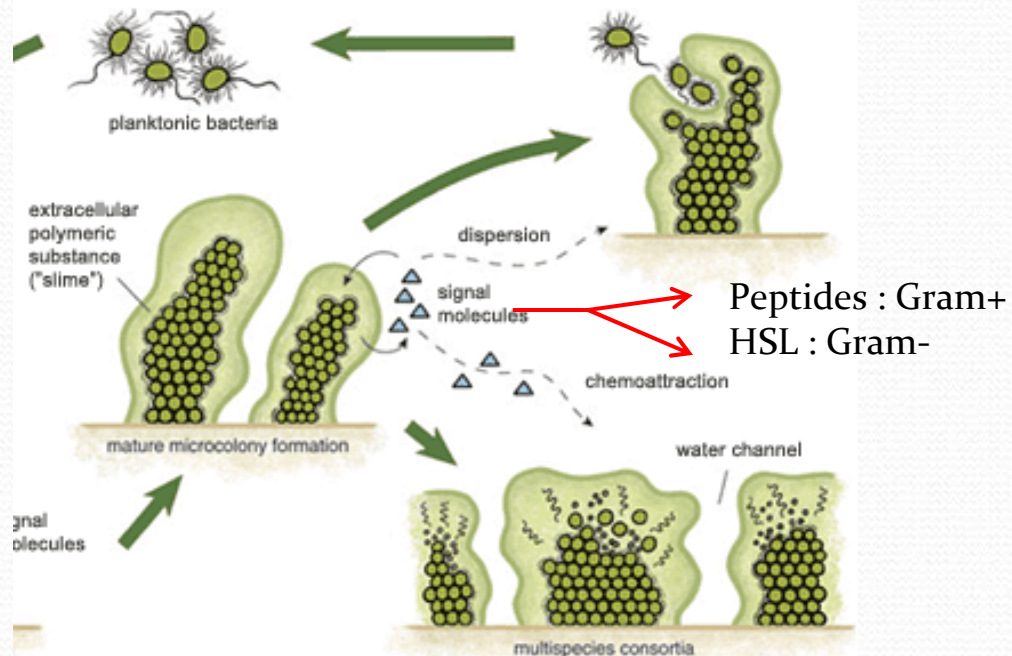
Multiplication : biofilm précoce → biofilm mature

- Modification du transcriptome $\approx 40\%$, *E. coli*
- \searrow synthèse adhésines et flagelles, \nearrow EPS
- *P. aeruginosa* : alginate+++



Microcolony

Etapes de formation du biofilm (3)



Biofilm mature

- Structure chimique et physique variable
- Piège les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne (ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , lipides, protéines, ADN) mais aussi accumulation de toxiques

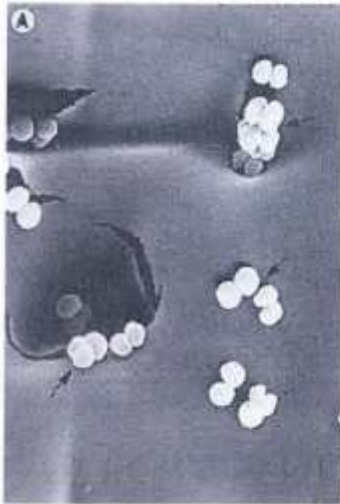
Rôle de la matrice

- Piège l'eau, biofilm = 90% d'eau, empêche la dessiccation – canaux aqueux
- **Etablissement de la communauté** : différents étages, métabolisme différent fonction pH, O_2 , nutriments, osmolarité, toxiques
- Communication inter-cellulaires et régulation : **quorum sensing** : coordination cellulaire fonction μ environnement et densité bactérienne
- **Transfert de gènes**, conjugaison et ADNe

Au total , le cycle du biofilm sur implant

Biofilm = Structure dynamique en évolution constante :

- Fonction de l'espèce et des conditions du μ environnement int et ext.
- Biofilm : communauté microbienne, forme de survie la plus répandue, fonctionnelle, organisée et coopérative
- Protection de l'extérieur : nombreux agresseurs, libération de planctoniques



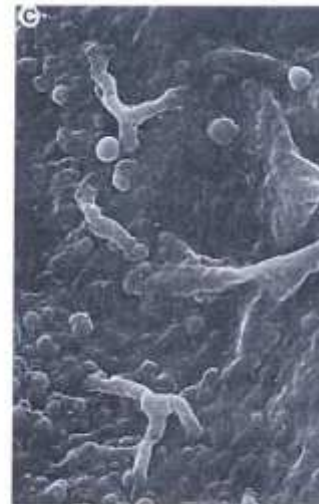
2 h

Fixation des *S. aureus*
sur des irrégularités à
la surface du matériel



4 h

Début de fabrication
du "slime "



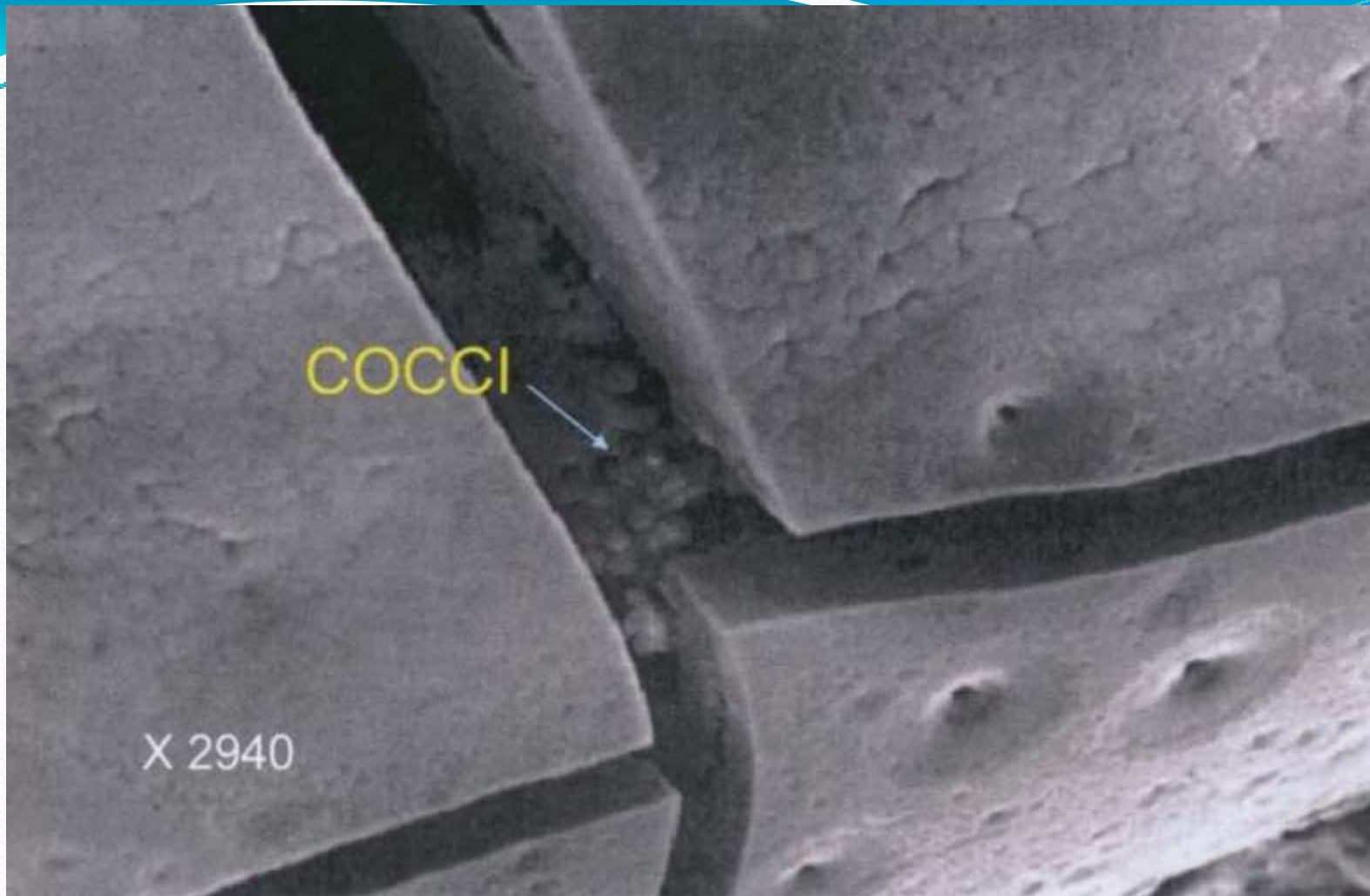
8 h

La surface du matériel
est recouverte par
une couche épaisse
de "slime"



24 h

Des bactéries
émergent du biofilm,
libres et prêtes à se
fixer ailleurs



Cocci au fond d'une cassure d'une couche épaisse de biofilm d'un séquestre

Evans et al., Clin Orthop. 1998, 243-249



Conséquences sur prise en charge

Pathogénèse du biofilm sur matériel

Hétérogénéité du biofilm :

- Structurelle, hauteur des tours et nombre de canaux
- **Composition** : MEC et espèces
- **Génotype** selon besoin et situation
- Comportement bactérien :
 - niches fonctionnelles/localisation
 - conditions physico-chimiques
 - **gradient** d'activité métabolique et de croissance

BIOFILM = ville hébergeant des communautés différentes qui vivent et interagissent

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2000, p. 2675-2679
1072-5128/00/50-2675-05
Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

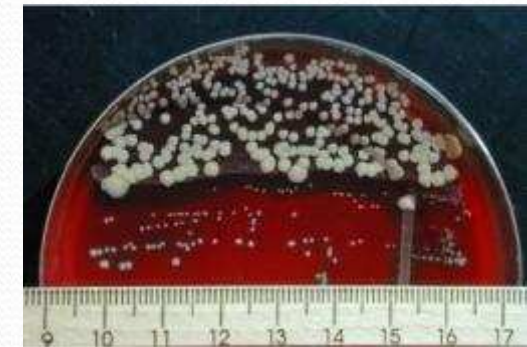
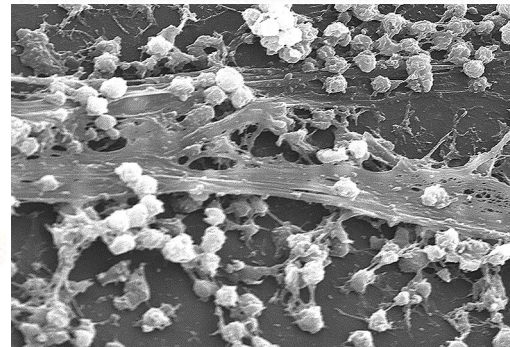
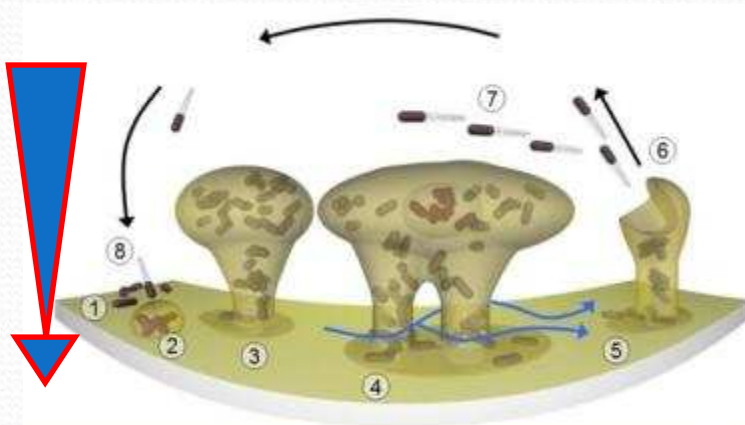
Vol. 182, No. 10

MINIREVIEW

Biofilm, City of Microbes

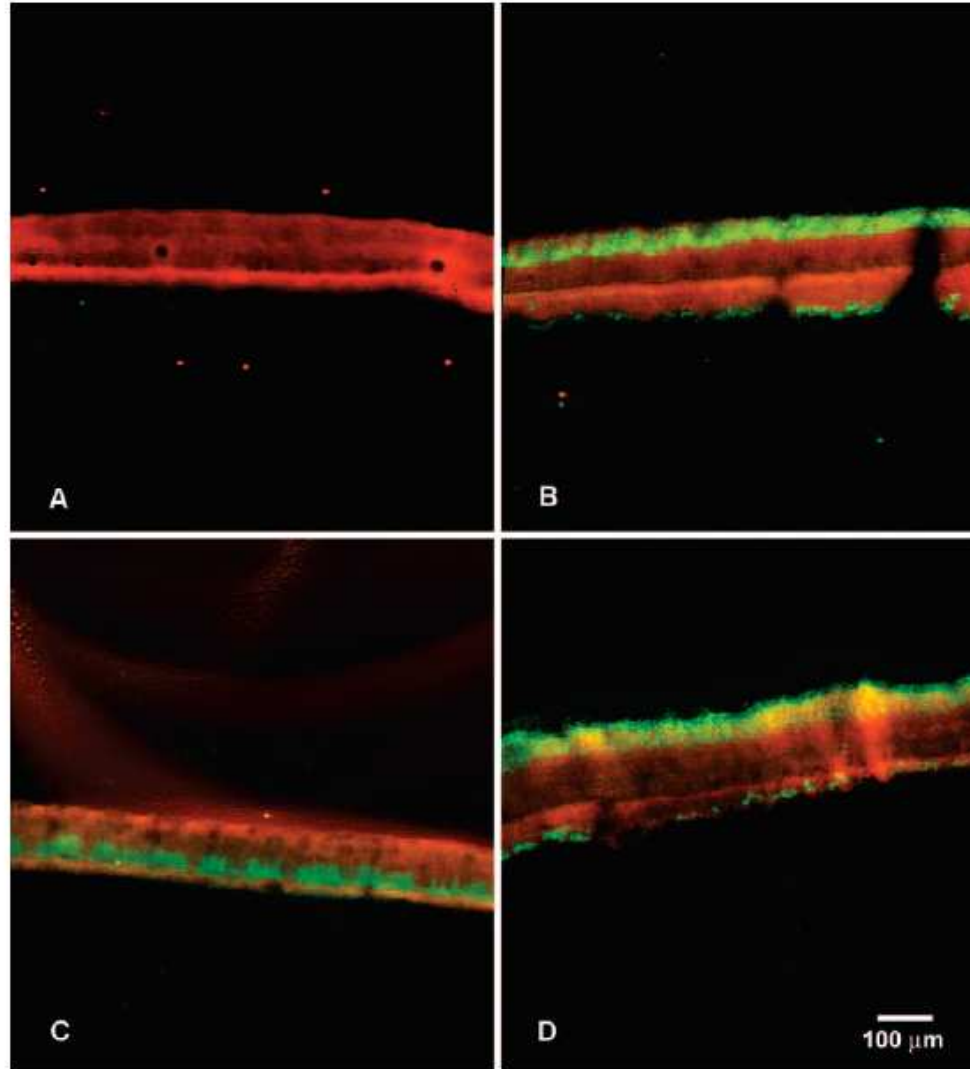
PAULA WATNICK¹ AND ROBERTO KOLTER^{2*}

¹Infectious Disease Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114, and ²Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115*



Pathogénèse du biofilm sur matériel

Rhodamine
biomasse



Conditions
aérobie

Conditions
anaérobie

Conditions
O₂ pur

FIG. 1. Patterns of DNA synthesis in *S. epidermidis* colony biofilms. Panel A shows an unlabeled (no BrdU) colony biofilm probed with antibody. Panel B shows a colony biofilm labeled with BrdU under aerobic conditions. Panel C shows a colony biofilm labeled with BrdU under anaerobic conditions. Panel D shows a colony biofilm labeled with BrdU in an environment of pure oxygen. Green areas are due to BrdU incorporation into DNA and indicate active replication. Red areas are due to rhodamine B counterstaining that reveals the extent of the biomass independent of its activity. In each image, the membrane interface of the colony is on the bottom and the air interface is on the top.

Pathogénèse du biofilm sur matériel

Hétérogénéité du biofilm :

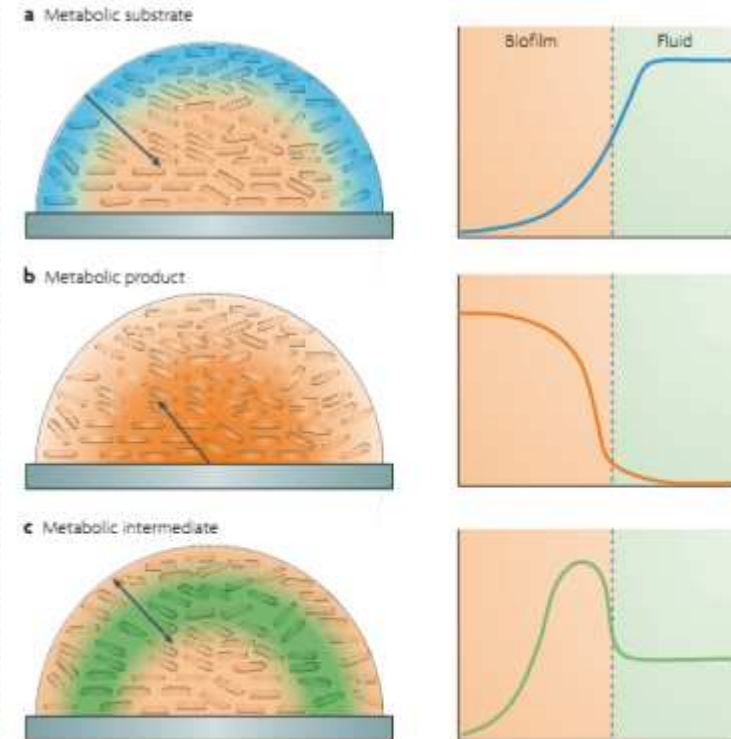
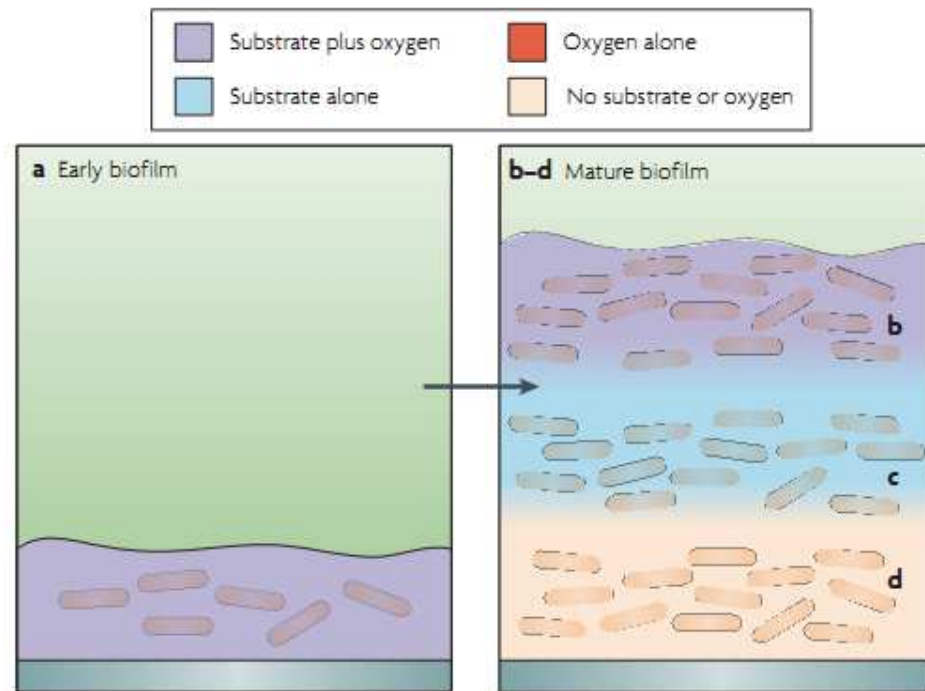
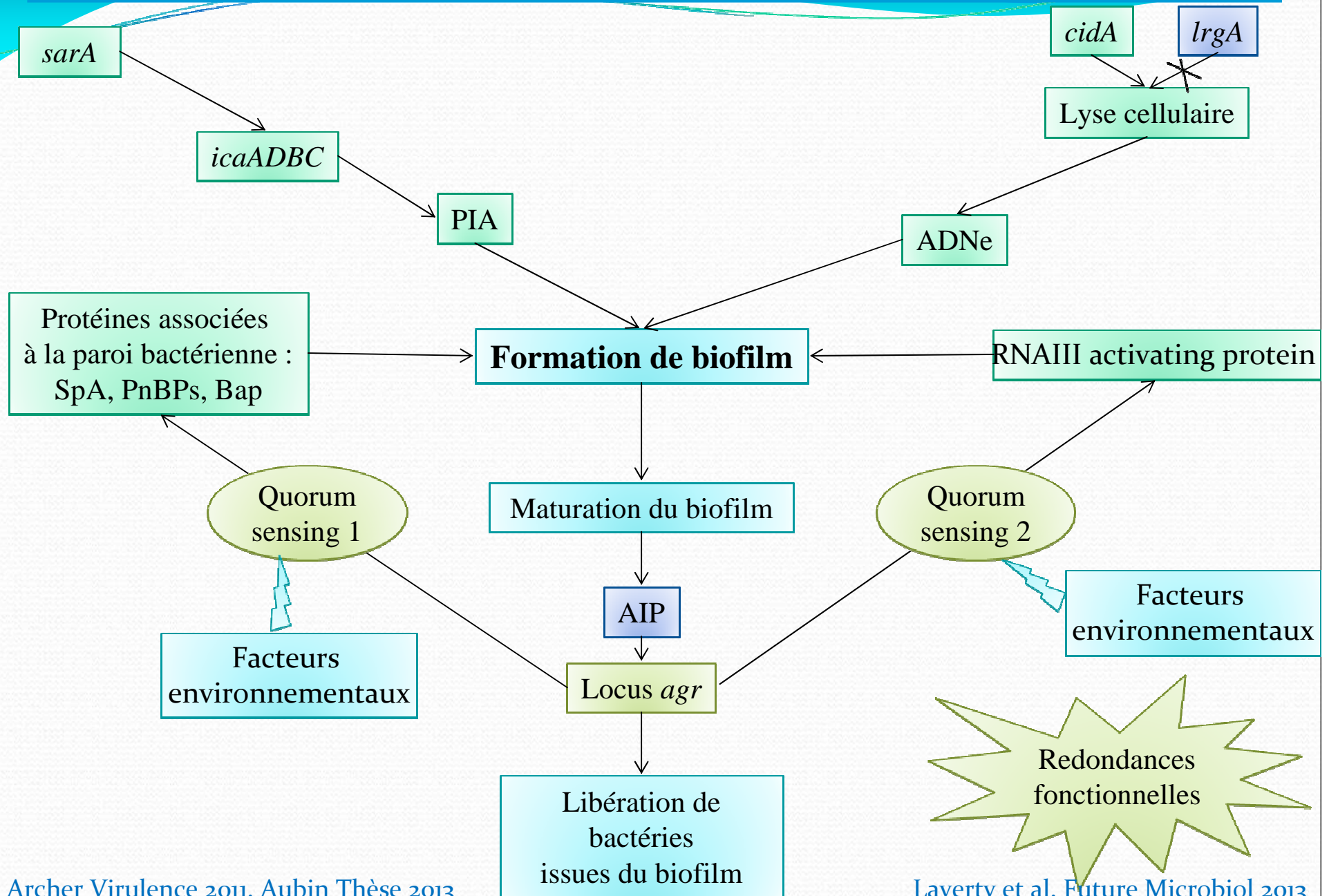


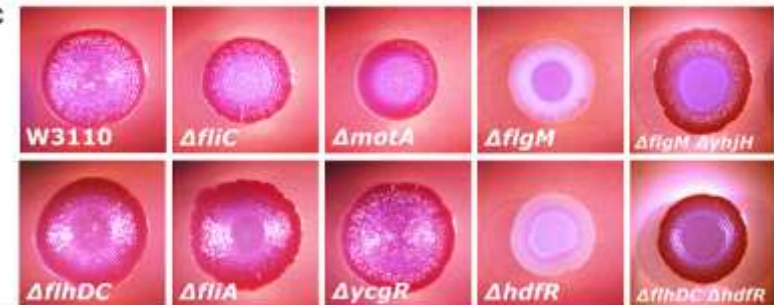
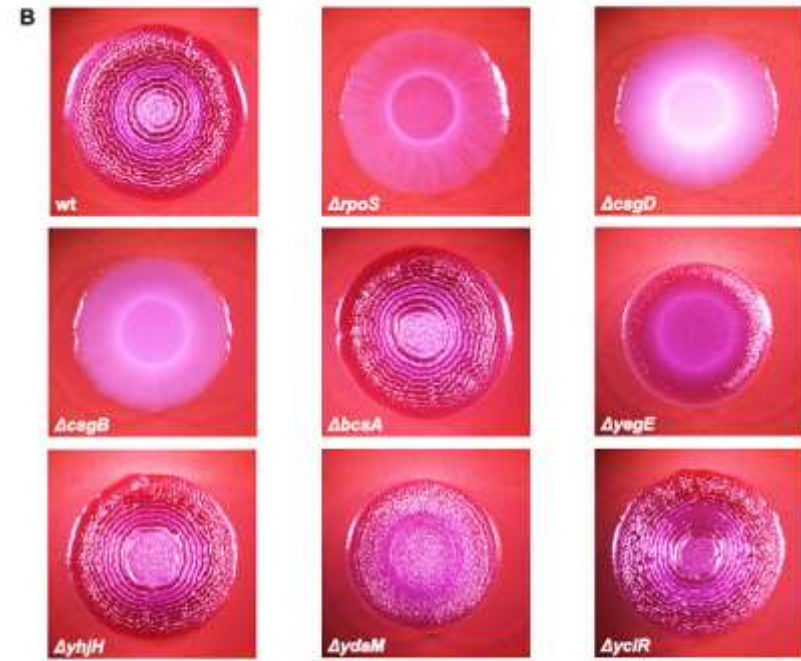
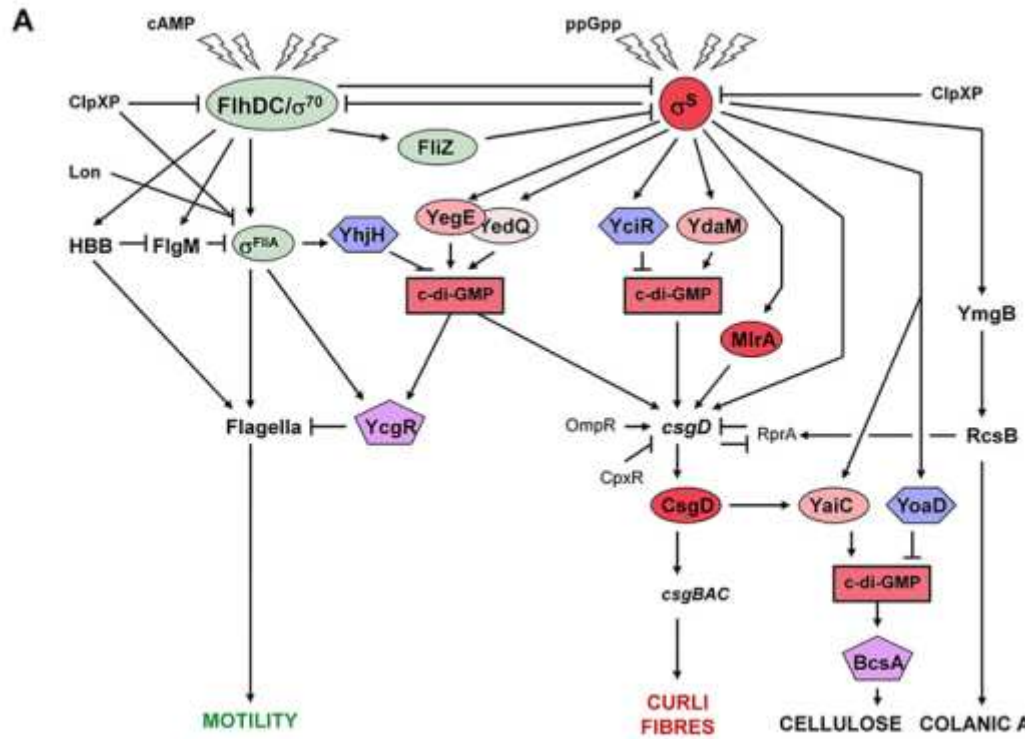
Figure 2 | **Chemical heterogeneity in biofilms.** Three qualitatively distinct patterns of chemical heterogeneity arise in biofilms owing to reaction–diffusion interactions for a metabolic substrate (blue; a), a metabolic product (orange; b) and a metabolic intermediate (green; c). The concentration of a substrate that is consumed in the biofilm decreases with depth into the biofilm and distance away from the source (a). Conversely, a metabolic product is more concentrated inside the biofilm (b). A metabolic intermediate that is both consumed and produced within the biofilm can exhibit concentration profiles that have local maxima (c).

Variations génétiques et adaptation au cours de la vie du biofilm et du stress :
inflammation, antibiotiques, etc...

Pathogénèse du biofilm : *S. aureus*

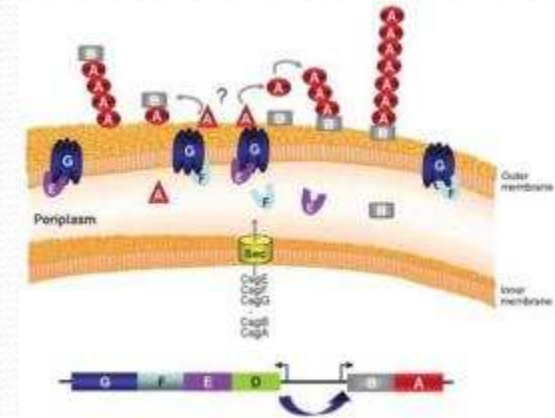
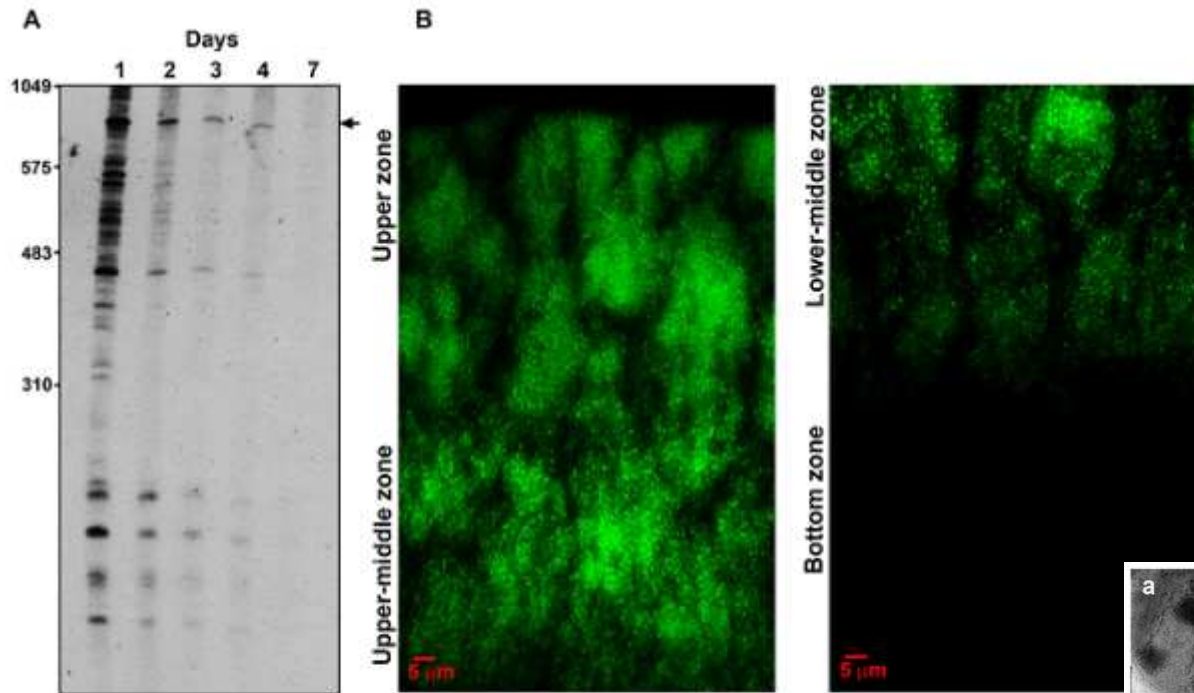


Pathogénèse du biofilm : *E. coli*



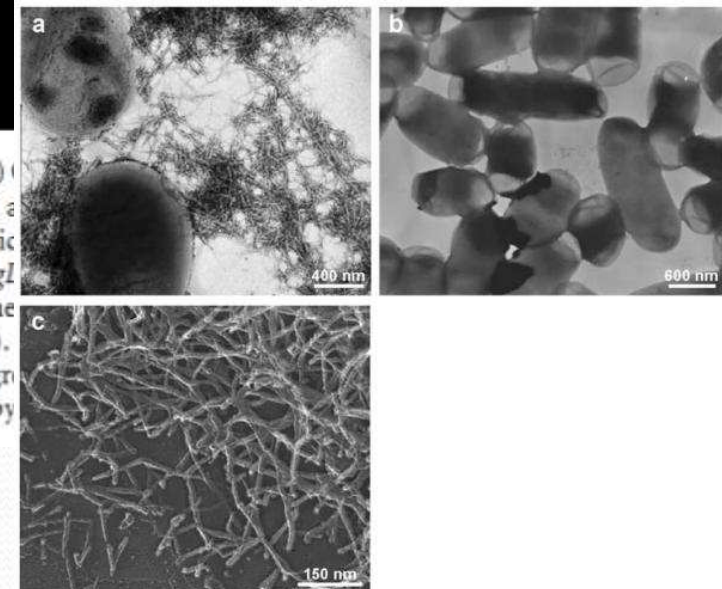
Flagelle
 Fimbriae type 1 (*fimH*) et P
 Curli (opéron *csg*)
 Autotransporteur type V, Ag43
 PGA, cellulose, A colanique, LPS

Pathogénèse du biofilm : *E. coli*



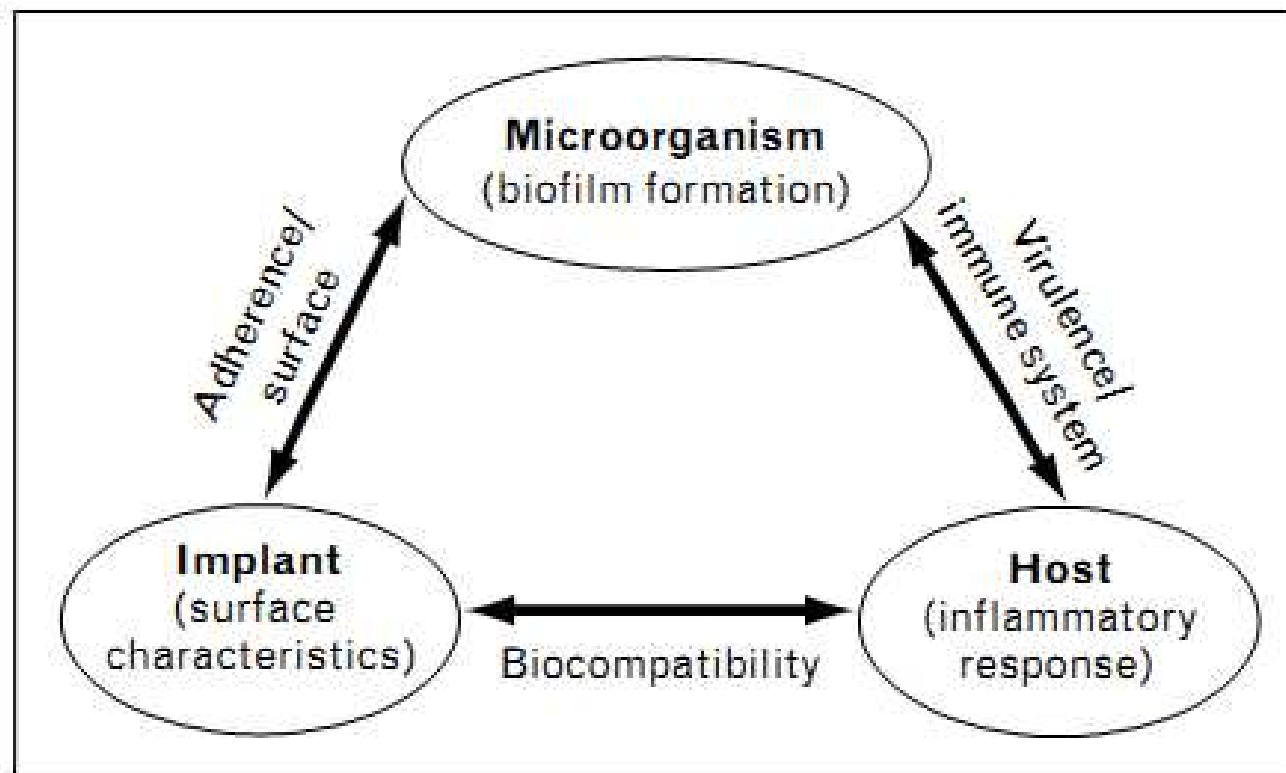
Etude des transcrits Fusion GFP reporter

FIG 6 Expression of the key biofilm regulator CsgD in a developing macrocolony biofilm. (A) Levels of *csgD* mRNA in developing W3110 macrocolonies determined by Northern blot analysis. Macrocolonies were harvested after growth for 1, 2, 3, 4, and 7 days as indicated. The arrow indicates *csgD* mRNA, which is the main product of the *csgDEFG* operon. (B) Expression pattern of *csgD* in different zones of a representative cross section of a 2-day-old WT macrocolony. Combined images visualize the whole vertical section of the macrocolony at the central region (zone III). Colonies of the W3110 derivative harboring a single-copy *csgD::gfp* reporter fusion were grown on salt-free LB plates, cryoembedded, cross-sectioned, and visualized by fluorescence microscopy.



Biofilm sur matériel : un ménage à trois !

Figure 1 Interaction between the microorganism, the implant and the host in the pathogenesis of implant-associated infections



Biofilm sur matériel : la bactérie

Liaison au substratum

Biofilm avec communication inter-cellulaires

Rôle de médiateurs, petites molécules inductrices → peptides ou homosérine lactones et synchronisation de la transcription ou de la répression de certains gènes

Implication sur des sites privilégiés :

- **Paroi bactérienne** : morphotypes différents, récurrence, surinfection ?
- **Métabolisme** : morphotype et phénotype de résistance différents
- Bactéries **quiescentes**, ralenties profondément enfouies dans la structure protectrice
- **Structures** pili/flagelles pour les premières phases puis adhésines puis enzymes et toxines (cf. régulation *S. aureus* par syst Agr)

Implication clinique

Biofilm sur matériel : la bactérie

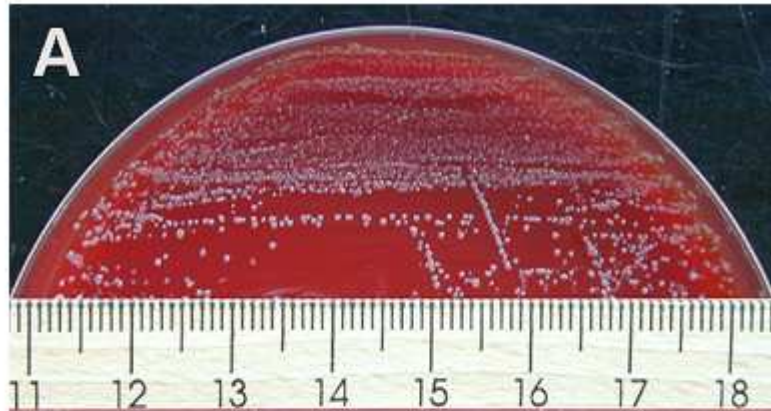


FIG. 1. (A) Growth of small colonies of *E. coli* on a Columbia sheep blood agar plate after 96 h of incubation. (B) *E. coli* colonies grow toward an antimicrobial disk containing gentamicin (GM10).

Biofilm sur matériel : la bactérie

TABLE 1. Biochemical reactions used to identify *E. coli* species before and after passaging on culture media^a

Assay	Reaction of isolate before/after passage on culture medium								
	ATCC 25922	SF	PPT 1	PPT 2	SON 1	SON 2	SON 3	SON 4	SON 5
Motility	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+
Beta-galactosidase	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+
Lysine decarboxylase	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
Indole	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+
Fermentation of sorbitol	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+
Tyrosine arylamidase	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+
Alkalinization									
Lactate	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+
Succinate	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-
Alkaline phosphatase	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+
Ellman's esterase assay	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+

^a SF, synovial fluid; PPT, periprosthetic tissue; SON, sonication.

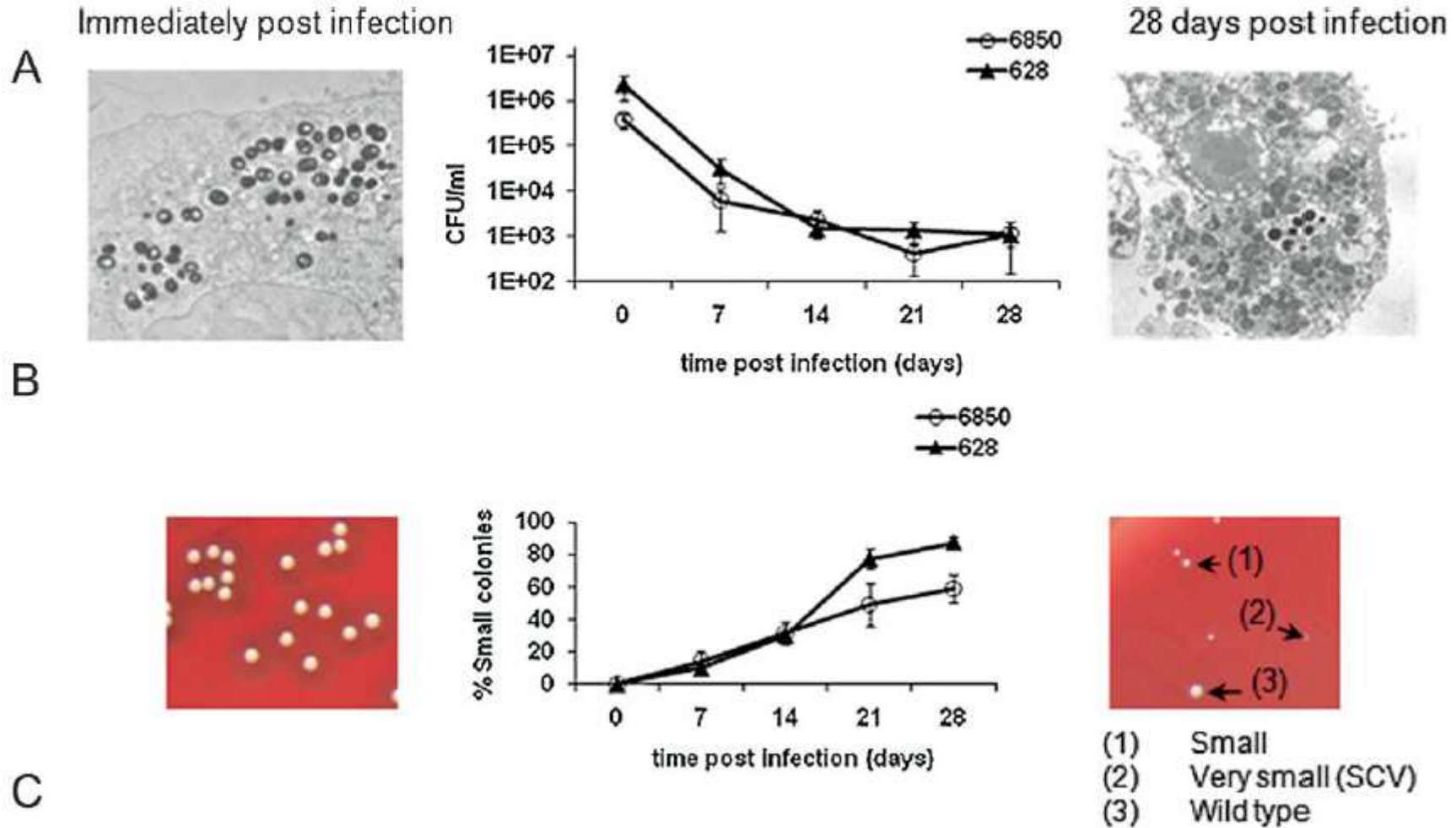
TABLE 2. Aminoglycoside susceptibility testing by Etest before and after passaging on culture media^a

Isolate	Gentamicin				Amikacin			
	Before passage		After passage		Before passage		After passage	
	MIC (µg/ml)	Category	MIC (µg/ml)	Category	MIC (µg/ml)	Category	MIC (µg/ml)	Category
ATCC 25922	1	S	1	S	4	S	4	S
SF	2	S	2	S	8	S	8	S
PPT 1	64	R	16	R	256	R	64	R
PPT 2	32	R	16	R	256	R	64	R
SON 1	16	R	16	R	256	R	64	R
SON 2 ^b	16	R	2	S	256	R	8	S
SON 3 ^b	16	R	4	S	256	R	16	S
SON 4	16	R	16	R	256	R	128	R
SON 5 ^b	8	I	4	S	128	R	16	S

^a S, susceptible; I, intermediate; R, resistant. Values of Etest were rounded up to the next highest 2-fold dilution of microdilution assays and interpreted according to CLSI guidelines.

^b Only isolates SON 2, 3, and 5 completely reverted after passage on culture media.

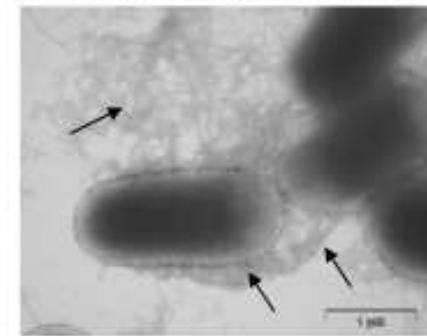
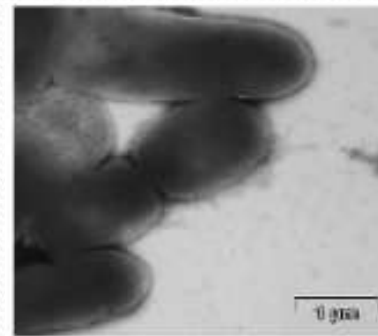
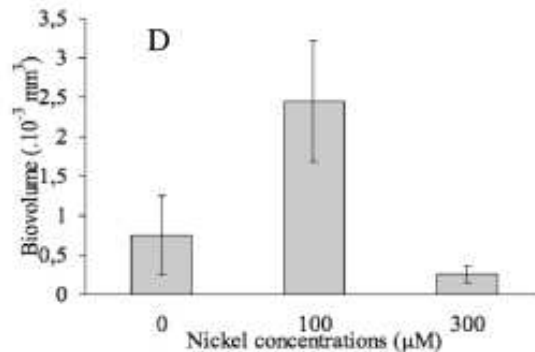
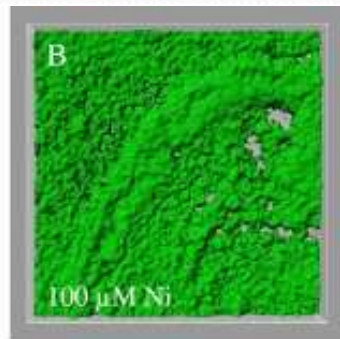
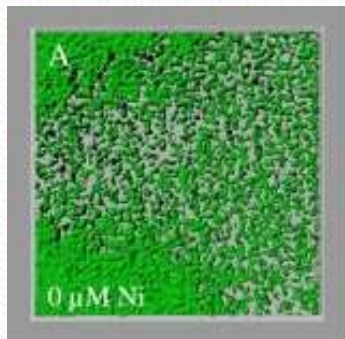
Biofilm sur matériel : la bactérie



Biofilm sur matériel : le matériel

Liaison au substratum

Impact des ions métalliques ou des polymères



- **Ni** : toxique croissance bactérienne si $> 300 \mu\text{M}$
- Impact présence de $100 \mu\text{M}$ de Ni :
 - ↗ biomasse biofilm
 - ↘ bactéries libres
- Régulation transcriptionnelle : opéron CsgAB

Rôle des autres métaux : Cu, Co, Ti, Cr, Ti et Va

Conséquences / conditions du micro-E

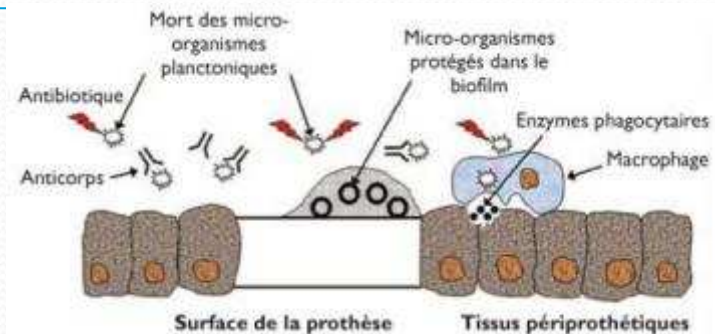
Biofilm et hôte / système immunitaire

Interaction active entre bactéries en biofilm et SI :
maintien d'un système pro-Inflammatoire persistant
accumulation de PNn, cytokines pro-inflammatoires, ↗ enzymes protéases
et élastases

Stratégie parasite : état qui permet d'augmenter l'apport en nutriment tout
en maintenant le SI inefficace pour éradiquer le biofilm

Infection chronique et persistante sans guérison : SI, atbs et
antiseptiques incapables d'éradiquer le biofilm
Source de réinfection : libération potentielle de cellules planctoniques

Impact des réponses immunes :
Th₂/Treg, rôle protecteur infection sur
implant chronique à *S. aureus*
Th₁/Th₁₇, rôle dans le développement



Biofilm et antibiotiques

Echec de l'éradication lié à un mode de vie spécifique : BIOFILM

- **Difficulté de pénétration** des antibiotiques, antiseptiques et phagocytes spécialisés dans la matrice du biofilm
- Effet barrière, épaisseur et profondeur du biofilm
- **Diminution du métabolisme / anaérobiose** : moindre efficacité des antibiotiques par moindre sensibilité de bactéries
- **Modifications du phénotype** :
 - Augmentation transfert des plasmides
 - Augmentation fréquence de mutation

Stratification des bactéries, plus ou moins dormantes
Conditions +ou- hostiles : effet barrière, séquestration physique, stress, osmolarité (porines), métabolisme anaérobie,
Conséquence : croissance + ralentie / *substratum*, *inoculum*

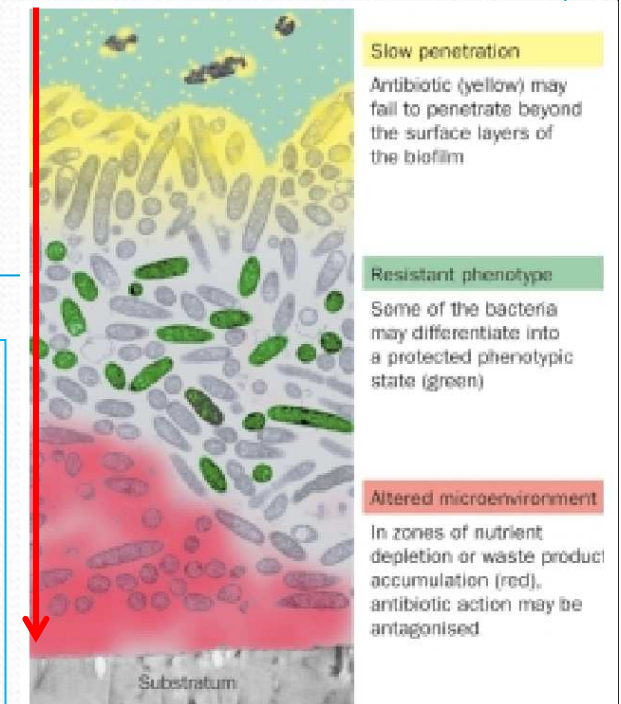


Figure 2: **Three hypotheses for mechanisms of antibiotic resistance in biofilms**

The attachment surface is shown at the bottom and the aqueous phase containing the antibiotic at the top.

Biofilm et antibiotiques

Détermination de la sensibilité : comment !!

CMI ou CMEC ? Utile ou futile ? Réaliste ou utopique ?

Infections sur implant : quels antibiotiques ?

β -lactamines, amoxicilline et *P. acnes*

Clindamycine

Tetracycline

Rifampicine : staphylocoques

Daptomycine, linezolide, vancomycine ?

Fluoroquinolones : BGN

Cotrimoxazole

Fosfomycine : BGN et Staphylocoques

Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

Diagnostic d'une infection à biofilm : quel outils pour quels résultats ?

Rôle actuel : limité à l'isolement, identification et sensibilité mais bactéries planctoniques

Rôle futur : biofilm

Sensibilité *in vitro* de biofilm : réaliste ?

CMI = bactéries planctoniques

CMEB = bactéries en biofilm, mais attention nombreux systèmes non standardisés...

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

Reference	Organism	Antibiotic	MIC or MBC of planktonic phenotype (µg/ml)	Concn effective against biofilm phenotype (µg/ml)	
215	<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4	Vancomycin	2 (MBC)	20 ^a	×10
26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Imipenem	1 (MIC)	>1,024 ^b	×1000
26	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ampicillin	2 (MIC)	512 ^b	×256
208	<i>P. pseudomallei</i>	Ceftazidime	8 (MBC)	800 ^c	×100
114	<i>Streptococcus sanguis</i> 804	Doxycycline	0.063 (MIC)	3.15 ^d	×50

^a Concentration required for 99% reduction.

^b Minimal biofilm eradication concentration.

^c Concentration required for ~99% reduction.

^d Concentration required for >99.9% reduction.

Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

TABLE 2. Antimicrobial susceptibilities of staphylococcal species isolated from orthopedic implants

Isolate (no. of strains tested)	Test agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%	Range	50%	90%
<i>S. epidermidis</i> (17)	Gentamicin	<0.5–512	16	256	1–>1,024	128	>1,024
	Cefamandole	<0.5–64	4	32	1–512	16	64
	Cefotaxime	<0.5–32	4	16	4–>1,024	128	512
	Erythromycin	<0.5–>1,024	>1,024	>1,024	2–>1,024	>1,024	>1,024
	Vancomycin	1–2	2	2	8–64	16	64
	Ciprofloxacin	0.25–1	0.5	1	0.5–64	16	32
	Fusidic acid	<0.125–16	0.5	16	1–>256	>256	>256
<i>S. aureus</i> (4)	Gentamicin	16–32			16–32		
	Cefamandole	32			64–512		
	Cefotaxime	2–4			256–>1,024		
	Erythromycin	2–16			2–>1,024		
	Vancomycin	0.5–1			16–32		
	Ciprofloxacin	0.5–1			1–32		
	Fusidic acid	<0.125–0.25			16–128		



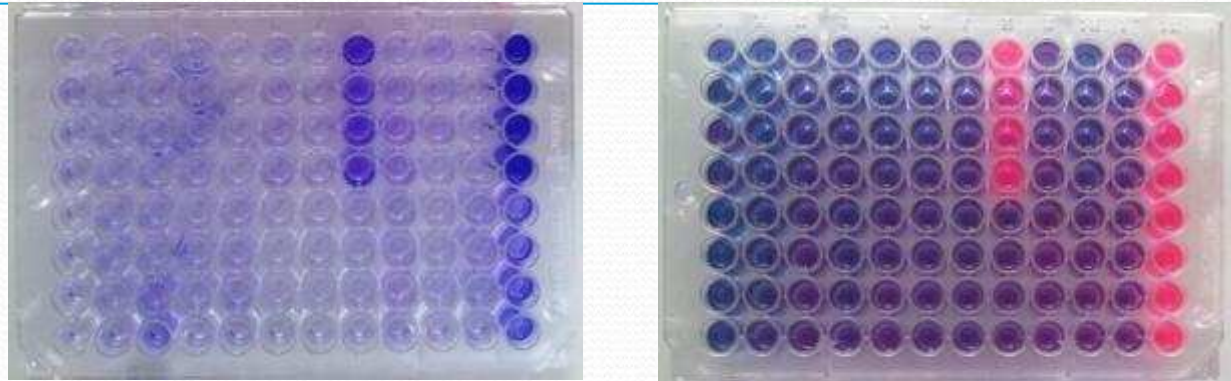
Table 2
Minimum bactericidal concentrations of prosthetic hip isolates grown on polymethylmethacrylate

Strain	Gentamicin		Cefamandole		Vancomycin		Ciprofloxacin	
	PMBC ^a ($\mu\text{g/ml}$)	SMBC ^b ($\mu\text{g/ml}$)	PMBC ($\mu\text{g/ml}$)	SMBC ($\mu\text{g/ml}$)	PMBC ($\mu\text{g/ml}$)	SMBC ($\mu\text{g/ml}$)	PMBC ($\mu\text{g/ml}$)	SMBC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>P. acnes</i> strains								
HJ 1	32	32	1	> 1024	32	> 1024	8	512
HJ 2	32	32	<0.5	512	8	512	16	512
HJ 3	32	32	<0.5	> 1024	16	> 1024	16	256
HJ 4	16	32	<0.5	> 1024	32	> 1024	16	512
L671	32	128	4	> 1024	8	> 1024	16	512
L149	16	64	2	> 1024	8	> 1024	4	1024
L1958	32	64	1	256	1	> 1024	8	512
CK77	32	32	1	> 1024	32	> 1024	4	512

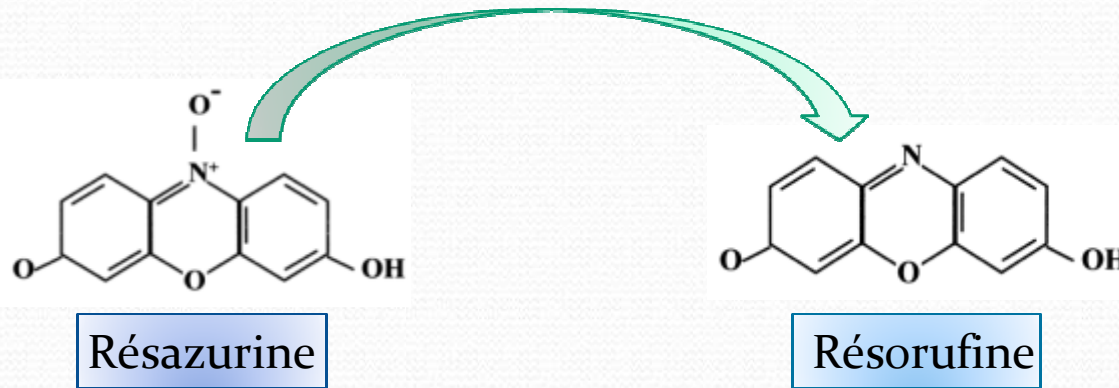
Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

Méthodes d'évaluation du biofilm

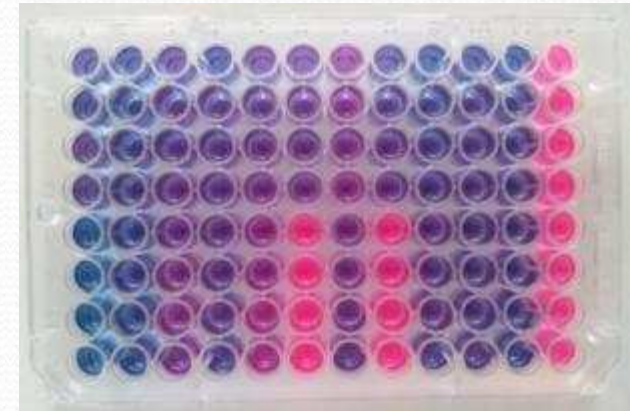
1- Méthode de référence Cristal violet



2- Méthode à la résazurine



Aucune standardisation



Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

3- Biofilm ring test



Principe du Biofilm Ringtest® :

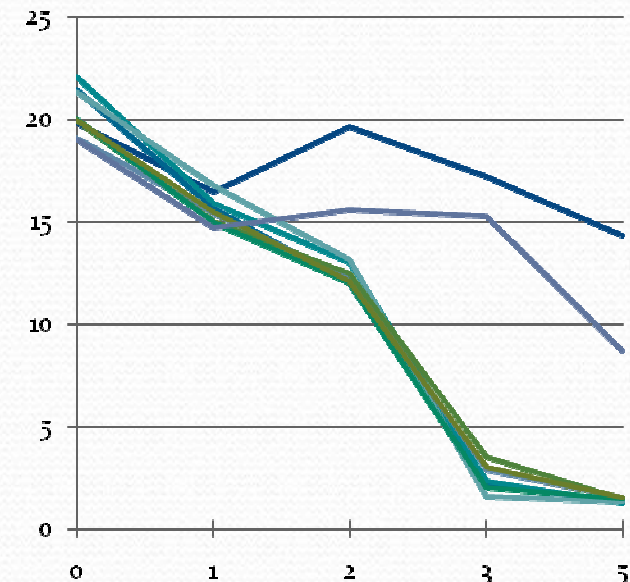
Une solution bactérienne (SBI) est déposée dans un puits associée à une suspension de particules magnétisables. En l'absence de biofilm, si un aimant est présenté sous le fond du puits, toutes les particules sont attirées et forment un spot central. Au fur et à mesure de la formation du biofilm les particules sont immobilisées et le spot disparaît. L'analyse des Images t_0 et t_1 par le logiciel BFC Elements® donne un indice de formation de biofilm (BFI).

**Straightforward
data interpretation**

Absence
of Biofilm
NO

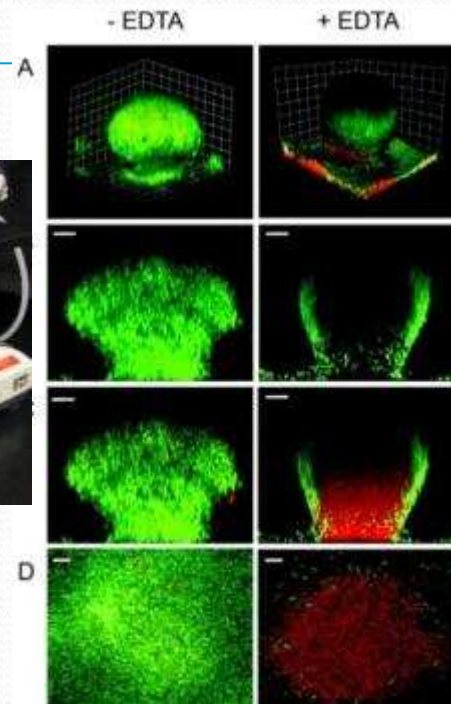
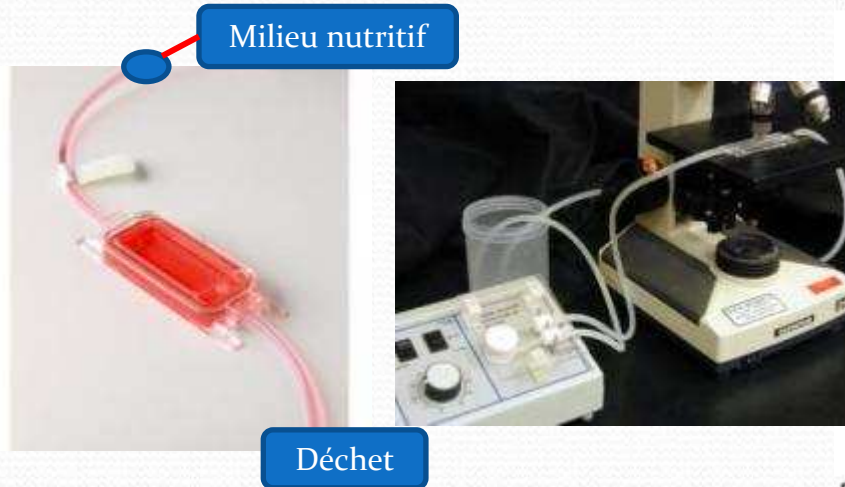


Presence
of Biofilm
YES

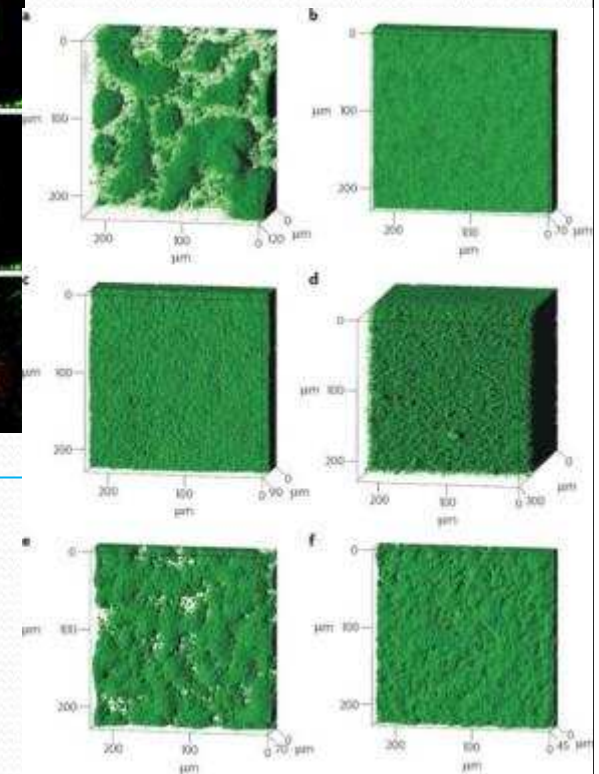


Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

4- Méthode dynamique en flux



Biofilm matrix :
dynamics of *P. aeruginosa*
biofilm architecture



Reconstitution image 3D par μ confocale
Non adaptée à la pratique quotidienne

- Activité des antibiotiques
- Tester \neq mutants inactivés
- Variations conditions environnementales

Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

3- Sonication - Microscopie

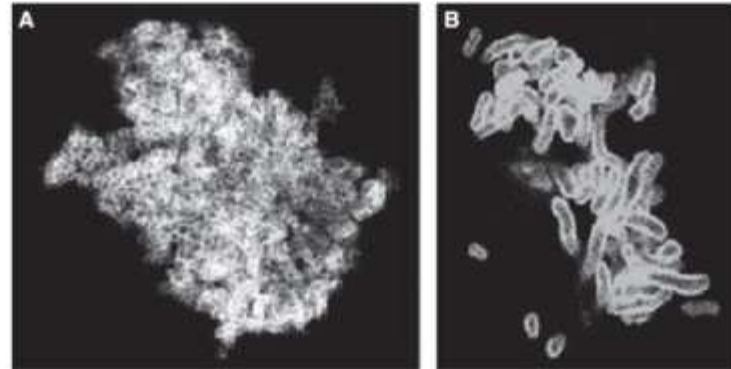


Fig. 1. Confocal laser scanning micrograph of bacterial biofilms removed from retrieved prostheses using ultrasonication. Biofilms were labeled with either (A) anti-*Staphylococcus* spp. antiserum (1/400) or (B) undiluted anti-*Propionibacterium acnes* monoclonal antibody hybridoma culture supernatant (QUBPa3) prior to incubation with the secondary antibody conjugated to a fluorescent dye fluorescein isothiocyanate (FITC). Reprinted with permission from (7).

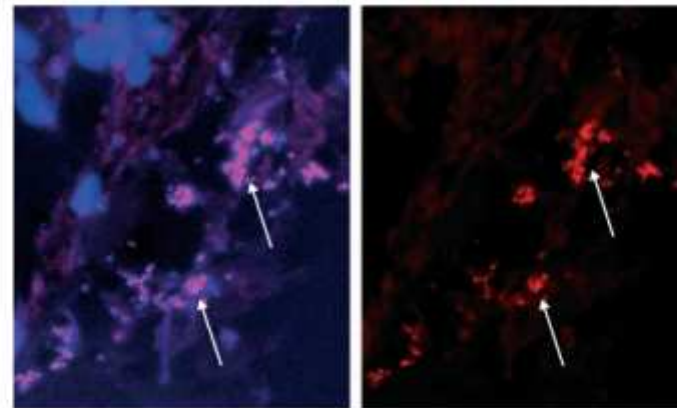


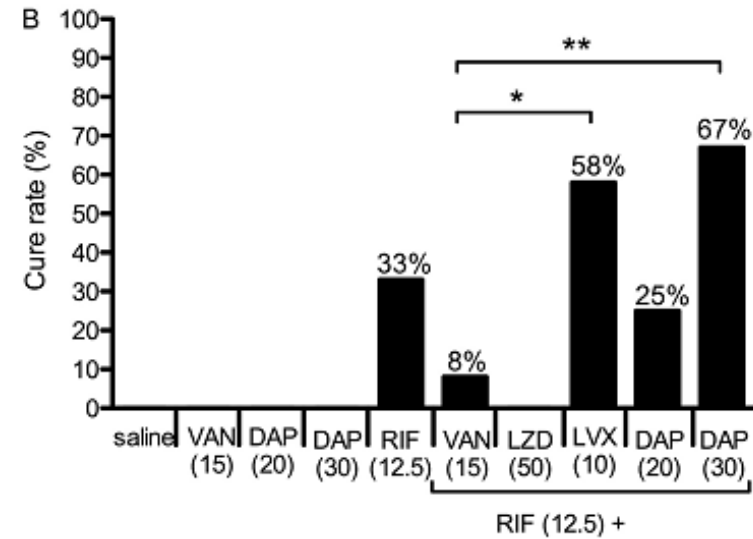
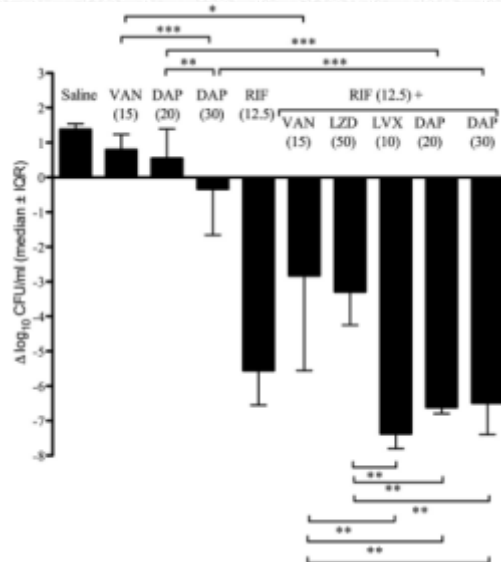
Fig. 3. Fluorescence *in situ* hybridization using fluorescein-labeled peptide nucleic acid probes targeting bacterial 16S rRNA (PNA FISH) in combination with diamidino phenylindoline (DAPI) stain for DNA (left) and PNA FISH visualization of bacteria alone (right). The arrows point to aggregates of bacteria lying in a biofilm-like pattern. Epi-fluorescence microscopy, $\times 90$. Reprinted with permission from (37).

Implication du biofilm : thérapeutique

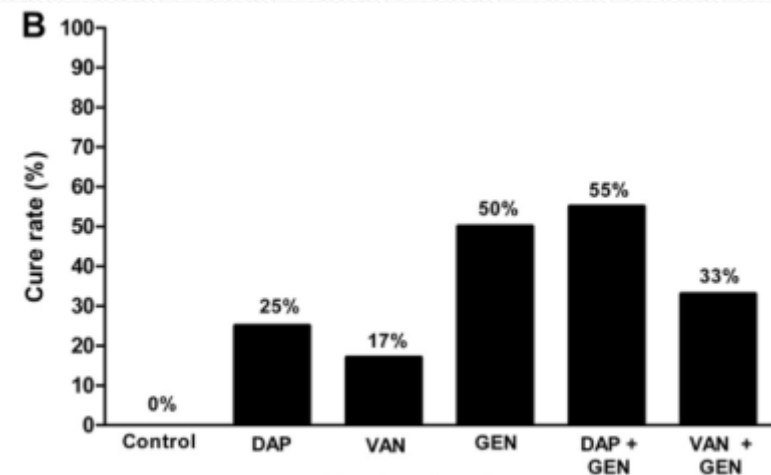
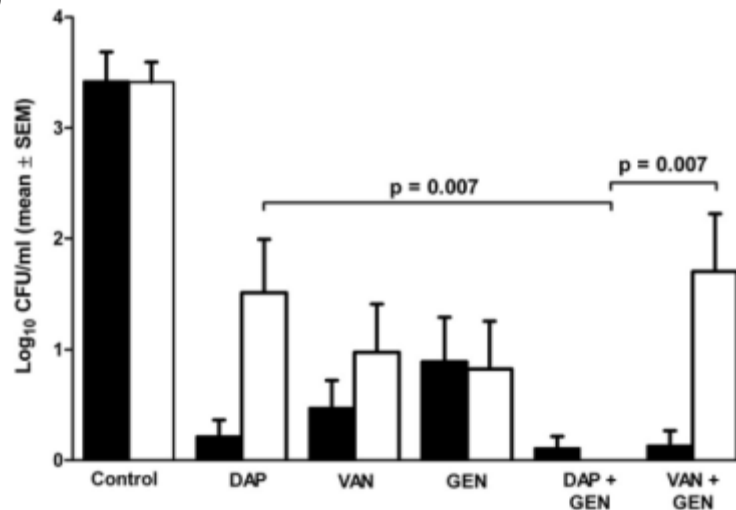


4- Modèles animaux

SARM
et Dapto



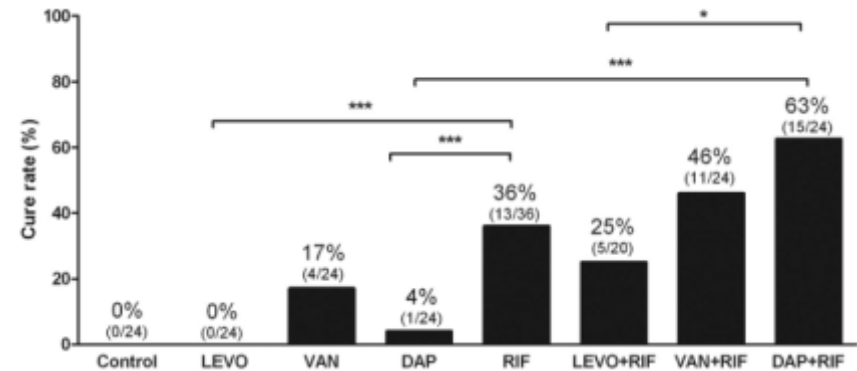
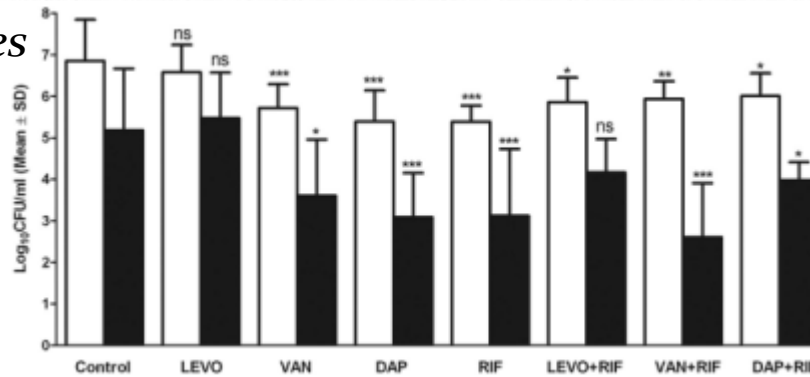
E. faecalis
Genta/dapto



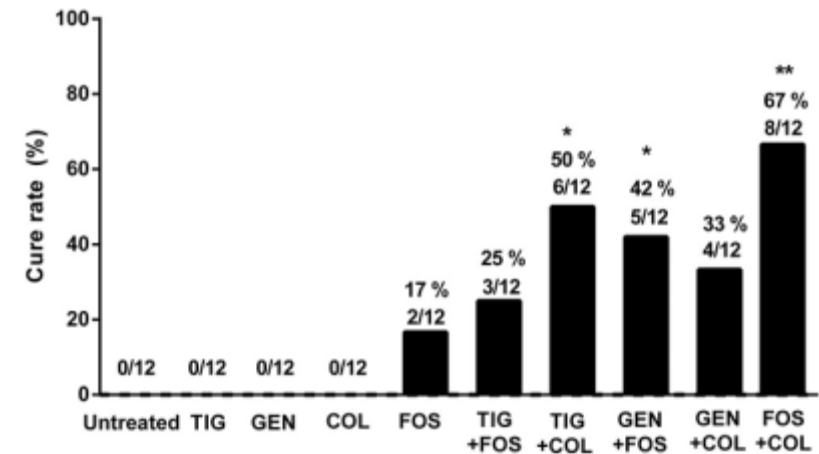
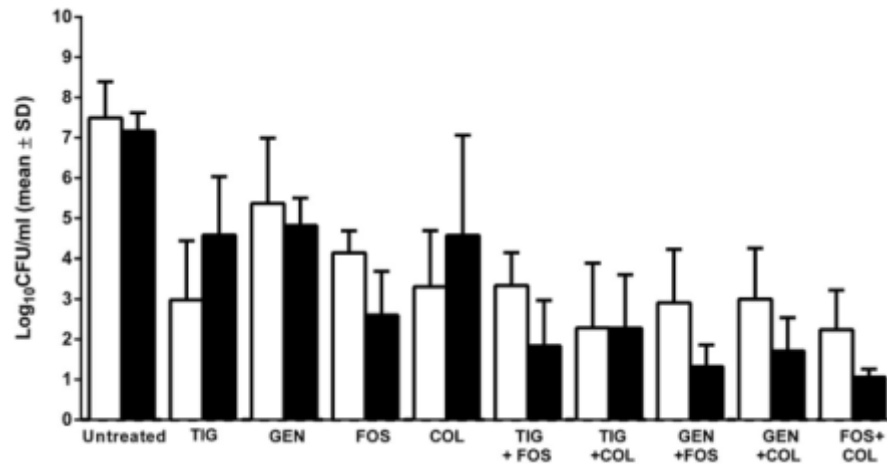
Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

4- Modèles animaux

P. acnes
et Rif

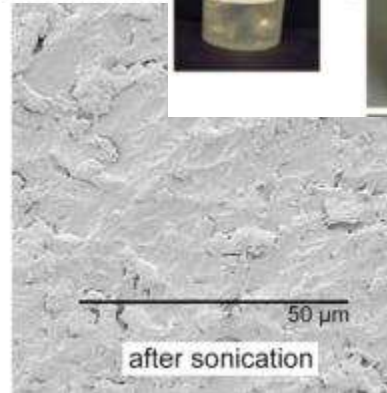
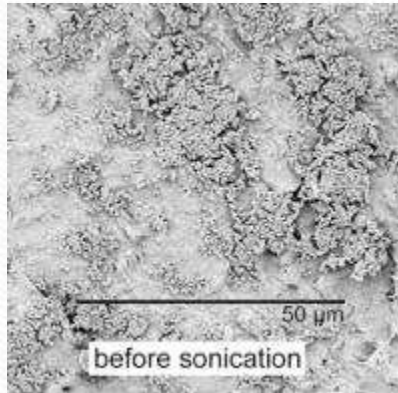


E. coli
Fos+coli



Implication du biofilm : diagnostic et thérapeutique

Combattre le biofilm



Biofilm Elimination on Intravascular Catheters: Important Considerations for the Infectious Disease Practitioner

Rodney M. Donlan

Division of Healthcare Quality Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

Implication du biofilm : thérapeutique

Combattre le biofilm :

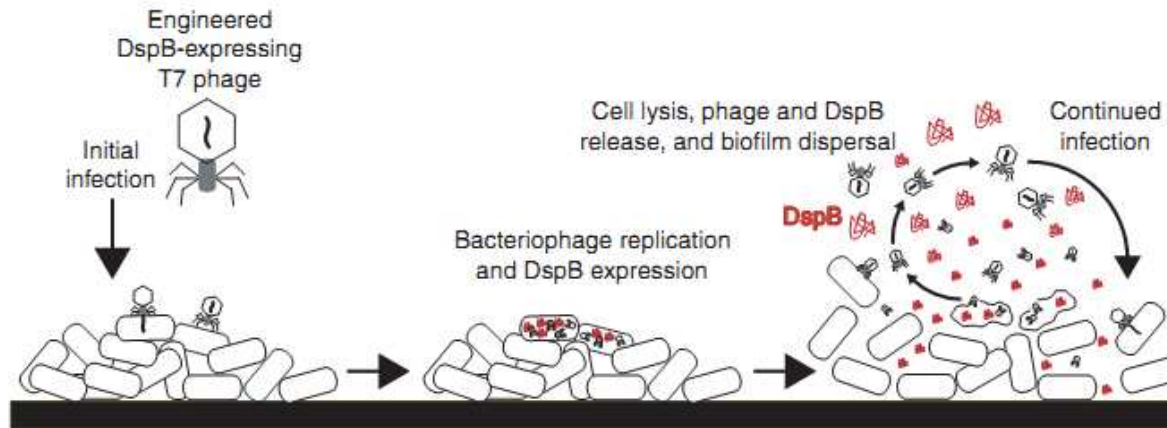
1- Empêcher l'établissement

2- **Stratégies physiques** : sonication, water-Pik élimine 99,9 % du biofilm de la plaque dentaire en 3 secondes, quid matériel ?

3- **Stratégies chimiques** :

- Inhiber ou limiter l'adhérence : anti facteurs de virulence ?
- Empêcher la métamorphose du phénotype planctonique à sessile
- Anti communications « quorum-sensing » : cf. *P. aeruginosa*
- Inhiber la synthèse de la MEC, antibiotiques ?
- Inhiber la structuration complexe du biofilm
- Augmenter les concentrations d'antibiotiques + combinaison
- Désorganisation du biofilm surfactant, bactériophage, enzymes

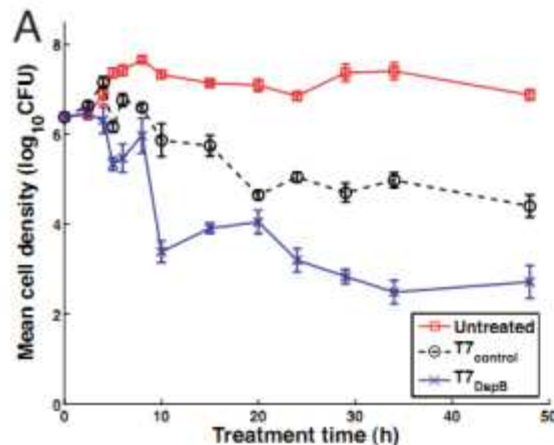
Implication du biofilm : thérapeutique



Double action

- Phage T7
- Dispersin B

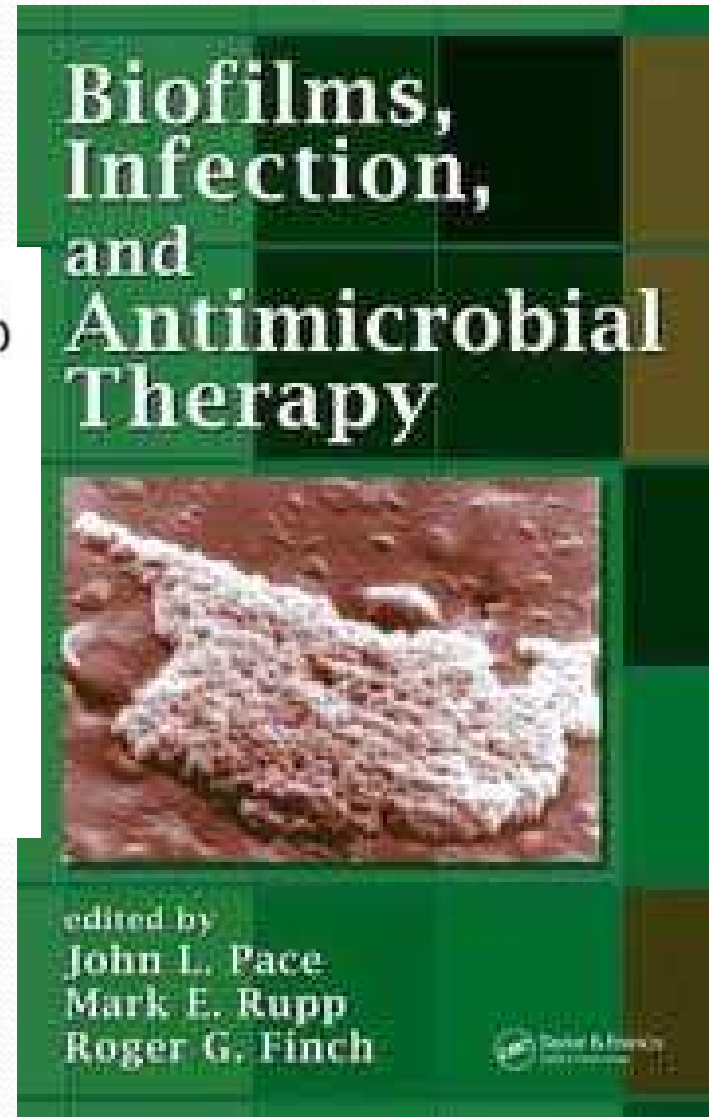
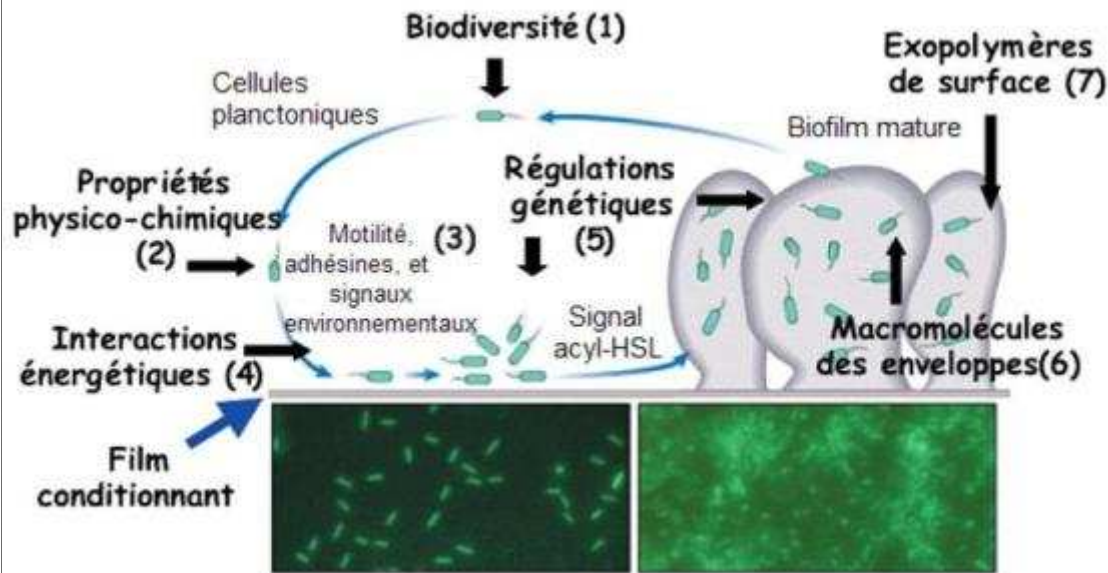
Fig. 1. Two-pronged attack strategy for biofilm removal with enzymatically active DspB-expressing T7_{DspB} phage. Initial infection of *E. coli* biofilm results in rapid multiplication of phage and expression of DspB. Both phage and DspB are released upon lysis, leading to subsequent infection as well as degradation of the crucial biofilm EPS component, β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine (22).



Conclusions

- **Biofilm structure complexe dynamique** : cellulaire, moléculaire, chimique, physique et microbiologique
- **Nombreuses étapes et variables donc nombreux paramètres parfois redondants (régulation+++)**
- ⊗ **Impact sur diffusion, efficacité des antibiotiques**
- **Fonction circonstances sondes, KT, matériel : meilleur traitement, Enlever le dispositif implantable**
 - SAD aisé
 - KTC facile mais pas toujours possible
 - Endoprothèse vasculaire compliqué malgré taux infection
 - PTH/PTG : nouveaux concepts
- **Prise en charge pluridisciplinaire cf. IOAC**
- **Nouveaux outils pour étudier efficacité des antibiotiques**
- **Nouvelles approches : phages, antiQS, biomatériaux, vaccins anti MEC**

Tout ce que vous voulez savoir sur le BIOFILM sans jamais osez le demande



stephane.corvec@chu-nantes.fr