



HAL
open science

Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa*: place de l'Antibiofilmogramme®

Elodie Olivares

► To cite this version:

Elodie Olivares. Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa*: place de l'Antibiofilmogramme®. Bactériologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT: 2017STRAJ074 . tel-01762512

HAL Id: tel-01762512

<https://theses.hal.science/tel-01762512>

Submitted on 10 Apr 2018

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.

THÈSE présentée par :

Élodie OLIVARES

Soutenue le : **28 septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Vie et Santé / Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa* : place de l'Antibiofilmogramme®

THÈSE dirigée par :

Dr. JEHL François

MCU-PH, HDR, Université de Strasbourg

Dr. BERNARDI Thierry

PharmD, Biofilm Control, Saint-Beauzire

RAPPORTEURS :

Dr. JEANNOT Katy

MCU-PH, HDR, Université de Besançon

Pr. SENNEVILLE Éric

PU-PH, Université de Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. SCHALK Isabelle

Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg

Pr. HANSMANN Yves

PU-PH, Université de Strasbourg

THÈSE présentée par :

Élodie OLIVARES

Soutenue le : **28 septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Vie et Santé / Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa* : place de l'Antibiofilmogramme®

THÈSE dirigée par :

Dr. JEHL François

MCU-PH, HDR, Université de Strasbourg

Dr. BERNARDI Thierry

PharmD, Biofilm Control, Saint-Beauzire

RAPPORTEURS :

Dr. JEANNOT Katy

MCU-PH, HDR, Université de Besançon

Pr. SENNEVILLE Éric

PU-PH, Université de Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. SCHALK Isabelle

Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg

Pr. HANSMANN Yves

PU-PH, Université de Strasbourg

OLIVARES Élodie

olivares.elodie@gmail.com

Université de Strasbourg – EA 7290 Virulence bactérienne précoce

Institut de Bactériologie – 3 rue Koeberlé 67000 Strasbourg, France

« Étudie, non pour savoir plus, mais pour savoir mieux »

Sénèque

« Dans la vie rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

À mes parents,

Remerciements

Cette thèse a fait l'objet d'une convention CIFRE entre la société Biofilm Control et l'EA7290 Virulence Bactérienne Précoce de l'Université de Strasbourg.

Le doctorat est souvent décrit comme une expérience exclusive, nécessitant de mettre sa vie entre parenthèses pour « quelques » années, tant l'implication personnelle est grande. S'engager dans cette voie implique peut-être une certaine forme d'égoïsme, d'envie de solitude (mais de passion aussi !), puisque l'on accepte de se consacrer exclusivement à son projet de recherche pendant de longs mois. Pourtant, tout ce travail n'aurait été possible, sans le soutien de nombreuses personnes, collègues et amis. Je souhaiterais donc consacrer quelques lignes de mon manuscrit à exprimer ma plus profonde gratitude à tous ceux, qui de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation et/ou son aboutissement.

Tout d'abord, je tiens à remercier Madame Katy Jeannot et Monsieur Éric Senneville d'avoir accepté de juger et d'enrichir ce travail en tant que rapporteurs. Merci également à Madame Schalk Isabelle et Monsieur Yves Hansmann qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à Thierry Bernardi pour la confiance qu'il m'a témoignée pour mener à bien ce projet de recherche ainsi que pour le soutien financier de Biofilm Control, sans lequel ces travaux n'auraient pu voir le jour. Je remercie également Stéphanie Badel-Berchoux, Christian Provot et les membres de Biofilm Control que j'ai pu côtoyer au cours de ces dernières années et qui ont su me conseiller sur des points techniques lorsque j'en ai eu besoin.

Mes plus sincères remerciements vont ensuite à François Jehl, mon directeur de thèse. Tout ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans votre aide. Merci de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même. J'espère avoir été à la hauteur. Plus qu'un simple directeur thèse, vous avez été un réel pilier pour moi, qui débarquait pour la première fois, un peu perdue, à Strasbourg. J'ai tellement appris à vos côtés. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté d'un point de vue professionnel et scientifique, mais aussi humainement. Vous avez toujours eu pour moi des paroles bienveillantes et avez toujours veillé à ce que tout ce passe au mieux pour moi durant ces 4 années. Pour tout cela, encore une fois, je vous remercie.

Un immense merci également à Gilles Prévost, directeur de l'EA7290. Même si je n'étais pas rattachée officiellement à la thématique de recherche de l'institut, vous m'avez accueillie dans vos locaux et m'avez permis d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions. Vous m'avez toujours considérée comme une de vos propres étudiantes et avez suivi l'avancée de mes travaux avec intérêt. J'ai toujours pu trouver, auprès de vous, une oreille attentive et vous avez toujours été, pour moi, de très bons conseils. Je vous remercie également d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que membre invité.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l'institut de Bactériologie, que j'ai pu fréquenter tout au long de ces années. Plus particulièrement, merci à Daniel Keller, véritable homme à tout faire du labo sans qui, nous étudiants, serions complètement perdus. Merci à vous d'avoir toujours eu une réponse à mes questions, pour tous vos conseils techniques, votre disponibilité, pour avoir géré pour moi mes comptes Connectus et Hôpital, pour votre culture générale et toutes vos anecdotes et histoires qui m'ont fait me coucher « moins bête ».

Une pensée pour mes compagnons de thèse, qui m'ont précédée et que je m'apprête enfin à rejoindre dans la cour des « grands ». Mira, pour sa gentillesse et les pauses détente partagées. Xavier, pour son éternelle bonne humeur et qui reste un véritable exemple de travail et de réussite. Et finalement Gaëlle, ma collègue de bureau, avec qui j'aurais partagé cette aventure dans sa presque totalité ; merci pour ces moments de rigolades, ces pauses déjeuner/thé à se raconter nos vies et ces sorties nocturnes qui nous ont permis de décompresser quand on en avait besoin.

Enfin, je remercie tous mes stagiaires, qui ont pu partager avec moi, pendant plusieurs semaines ou mois, mes travaux de recherche et que j'ai pris plaisir à former.

Finalement, mes remerciements les plus sincères vont à mes proches, qui m'ont toujours soutenue et qui ont dû (souvent) me supporter au cours de ces dernières années.

À Sophie et Laura, mes amies de fac, qui sont devenues tellement plus depuis. Vous étiez convaincues depuis le départ que je vous suivrais dans la voie du doctorat, alors que je passais mon temps à dire que « je ne ferais jamais de thèse !! ». Et voilà où j'en suis aujourd'hui. Finalement vous me connaissez sûrement mieux que moi. Merci pour tous ces moments passés ensemble et surtout pour votre amitié sans faille, qui perdure malgré les années et les kilomètres qui nous ont éloignés (seulement physiquement). Notre trio, si cher à mes yeux, est inséparable.

Je remercie également ma famille, et plus particulièrement mes grands-parents, qui ont toujours été d'un soutien indéfectible et qui m'ont bien souvent aidée à relativiser.

Je ne pourrais ensuite jamais assez remercier mes parents... Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours soutenue dans mes choix. Merci de m'avoir permis de mener ces « longues » études comme je le voulais. Merci d'avoir toujours été là pour moi quand j'en avais besoin. Vous êtes tout simplement exceptionnels. Ma réussite d'aujourd'hui, je vous la dois. J'espère que vous êtes fiers de moi...

Et, peut-être le meilleur pour la fin, je voudrais te dire merci à toi, David. Mon binôme, ma moitié... Tu as partagé cette thèse à mes côtés depuis le départ et comme tu le dis si bien « cette thèse c'est un peu la tienne aussi ». Merci pour toute la confiance que tu m'accordes, tu me répètes si souvent que tu crois en moi. Merci d'avoir été là dans tous ces moments à partager mes réussites, mais (et surtout) de m'avoir aidée à traverser les moments un peu plus difficiles... Je ne sais pas si j'aurai réussi à faire tout ça sans toi. Finalement, merci pour tout l'amour que tu m'apportes chaque jour et pour la place si importante que tu occupes désormais dans ma vie.

SOMMAIRE

Chapitre 1 • Introduction.....	1
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	2
1.1 Un peu d'histoire.....	2
1.2. Fiche d'identité du bacille pyocyanique.....	2
1.3. Facteurs de virulence.....	3
1.3.1. <i>Facteurs de virulence impliqués dans l'infection aiguë</i>	3
1.3.2. <i>Facteurs de virulence impliqués dans l'infection chronique</i>	6
1.4. Régulation de l'expression des facteurs de virulence.....	8
1.4.1. <i>Systèmes à deux composants</i>	8
1.4.2. <i>Quorum Sensing</i>	8
1.5. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	10
1.5.1. <i>Inactivation enzymatique de l'antibiotique</i>	10
1.5.2. <i>Diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne</i>	11
1.5.3. <i>Mise en place de mécanismes actifs d'efflux</i>	11
2. Le biofilm bactérien.....	12
2.1. Description d'un mode de vie communautaire.....	12
2.2. Développement d'un environnement hétérogène.....	14
2.3. Des bactéries sous abri.....	18
2.3.1. <i>Inefficacité du système immunitaire</i>	18
2.3.2. <i>Tolérance générale aux antimicrobiens</i>	19
2.3.3. <i>L'énigme des « persister cells »</i>	21
2.4. Épidémiologie et aspects cliniques des infections sur biofilms.....	22
2.4.1. <i>Conséquences médicales</i>	22
2.4.2. <i>Biofilms de P. aeruginosa dans les infections pulmonaires de mucoviscidose</i>	23
3. Prise en charge des infections associées aux biofilms.....	26
3.1. Approches actuelles pour le traitement des biofilms.....	26
3.1.1. <i>Mesures préventives</i>	27
3.1.2. <i>Mesures curatives</i>	28
3.1.3. <i>Nouvelles approches anti-biofilm</i>	28
3.2. Limites de l'antibiogramme classique dans les infections liées aux biofilms.....	29
3.3. Modèles de laboratoire pour l'étude des biofilms bactériens.....	31
4. La mucoviscidose.....	34
4.1. Description historique: de la fibrose kystique du pancréas à la mucoviscidose.....	34
4.2. Epidémiologie de la maladie.....	34
4.3. Physiopathologie et génétique de la mucoviscidose.....	35
4.3.1. <i>Du gène à la protéine CFTR</i>	35
4.3.2. <i>Pathologie moléculaire</i>	37
4.4. Diagnostic et dépistage.....	37
4.4.1. <i>Test de la sueur</i>	37
4.4.2. <i>Dépistage néonatal</i>	37
4.4.3. <i>Génétique</i>	38
4.4.4. <i>Dépistage prénatal</i>	38
4.5. Manifestations cliniques.....	38

4.5.1.	<i>Manifestations respiratoires.....</i>	38
4.5.2.	<i>Manifestations digestives.....</i>	40
4.5.3.	<i>Diabète mucoviscidosisique.....</i>	40
4.6.	Prise en charge des patients et traitements.....	40
4.6.1.	<i>Prise en charge des patients.....</i>	40
4.6.2.	<i>Diagnostic de l'infection bronchopulmonaire.....</i>	41
4.6.3.	<i>Traitement de l'atteinte respiratoire.....</i>	41
4.6.4.	<i>Autres stratégies thérapeutiques.....</i>	43
4.6.5.	<i>Transplantation pulmonaire.....</i>	44
5.	Objectifs de la thèse.....	44
Chapitre 2 • Matériels & méthodes.....		46
1.	Matériels.....	47
1.1.	Milieux et réactifs.....	47
1.2.	Détermination de la CMI des antibiotiques par bandelettes à gradient de concentrations.....	47
1.3.	Souches bactériennes.....	49
1.4.	Lignée cellulaire.....	49
1.4.1.	<i>Entretien hebdomadaire des cellules.....</i>	50
1.4.2.	<i>Congélation des cellules.....</i>	50
2.	Détermination des cinétiques d'adhésion bactériennes par le Biofilm Ring Test®.....	50
2.1.	Principe.....	50
2.2.	Protocole.....	51
2.2.1.	<i>Préparation de la suspension bactérienne initiale (SBI).....</i>	51
2.2.2.	<i>Evaluation de la cinétique d'adhésion par le BRT.....</i>	51
3.	L'Antibiofilmogramme® ou l'évaluation de l'effet des antibiotiques sur la formation du biofilm bactérien.....	53
3.1.	Principe.....	53
3.2.	Protocole.....	53
3.2.1.	<i>Préparation préalable des différentes concentrations d'antibiotiques.....</i>	53
3.2.2.	<i>Préparation de la suspension bactérienne initiale (SBI).....</i>	53
3.2.3.	<i>Mise en œuvre d'un Antibiofilmogramme®.....</i>	53
4.	Détection de la formation de biofilm par marquage au Cristal Violet.....	54
4.1.	Principe.....	54
4.2.	Protocole.....	54
4.3.	Classification de l'adhérence bactérienne.....	55
5.	Co-culture statique bactéries/cellules.....	55
5.1.	Principe.....	55
5.2.	Protocole.....	56
5.2.1.	<i>Préparation des cellules.....</i>	56
5.2.2.	<i>Inoculation des cultures cellulaires par la suspension bactérienne.....</i>	56
5.2.3.	<i>Quantification de la biomasse bactérienne constitutive du biofilm.....</i>	56
5.2.4.	<i>Marquage et observation microscopique des co-cultures statiques.....</i>	57
6.	Imagerie cellulaire.....	57
6.1.	Microscope à épifluorescence.....	57
6.2.	Traitement des images.....	57
7.	Statistiques.....	57

<i>Résultats</i>	59
Chapitre 3 • Analyse standardisée de la cinétique de formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	60
Article 1 ~ The BioFilm Ring Test : a rapid method for routine analysis of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation kinetics.....	61
Chapitre 4 • Inhibition de la formation de biofilm par les aminosides	68
Article 2 ~ Tobramycin and amikacin delay adhesion and microcolony formation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cystic fibrosis isolates.....	69
Chapitre 5 • Induction de la formation de biofilm par les β-lactamines	80
Article 3 ~ <i>P. aeruginosa</i> Antibiofilmogram® reveals the role of β -lactam antibiotics in the induction of a reversible biofilm.....	81
Chapitre 6 • Discussion générale	105
1. Utilisation potentielle du BRT comme test de routine.....	106
2. Identification des effets préventifs et indésirables des antibiotiques sur la formation de biofilms grâce à l'Antibiofilmogramme®.....	107
Chapitre 7 • Articles et communications liés à la thèse	112
Liste des communications	113
Publications.....	113
Communications orales.....	113
Posters.....	114
Prix et récompenses.....	114
Article ~ Kinetics of biofilm formation by <i>Staphylococcus lugdunensis</i> strains in bone and joint infections.....	115
Chapitre 8 • Bibliographie	123
Chapitre 9 • Annexes	137
Milieux & réactifs	138
Géloses nutritives.....	138
Milieux de culture microbiologiques.....	138
Solutions.....	138
Culture cellulaire.....	139
Pack BIOFILM (BioFilm Control SAS, France).....	139
Réactifs.....	139
Bandelettes à gradient de concentration.....	139
Recueil de Données Cliniques	140

Index des figures

Figure 1. Observation de <i>P. aeruginosa</i> au microscope électronique.....	2
Figure 2. Résistance naturelle de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	10
Figure 3. Rôles de l'ADNe dans la formation et la défense du biofilm.....	14
Figure 4. Représentation schématique des différentes étapes de développement d'un biofilm microbien..	15
Figure 5. Rôle du flagelle et du pilus de type IV dans l'établissement du biofilm.....	16
Figure 6. Reconstitution 3D de la structure d'un biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	17
Figure 7. Caractéristiques cliniques d'une infection sur biofilm.....	19
Figure 8. Cinétique de la mort biphasique d'une communauté bactérienne soumis à un traitement antibiotique bactéricide.....	21
Figure 9. Principales infections liées aux biofilms bactériens.....	23
Figure 10. Pathogènes cliniquement importants dans l'évolution de la mucoviscidose (par classes d'âge).	24
Figure 11. Prévalence de la mucoviscidose par département français.....	35
Figure 12. Structure du canal CFTR.....	36
Figure 13. Technologie du Biofilm Ring Test®.....	51

Index des tables

Tableau 1. Modèles pour la culture de biofilms bactériens.....	31
Tableau 2. Panel d'antibiotiques utilisés.....	47
Tableau 3. Listing des différentes concentrations d'antibiotiques testées sur les isolats cliniques de <i>P. aeruginosa</i>	48

Abréviations

AAC : aminoside acétyltransférase

ABC: ATP binding cassette

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNe : ADN extracellulaire

ADP : adénosine diphosphate

AHL : acyl-homosérine lactone

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ANT : aminoside nucléotidyltransférase

APH : aminoside phosphotransférase

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine triphosphate

BFI : indice biofilm

BHI : brain heart infusion

BLSE : β -lactamase à spectre étendu

BRT : Biofilm Ring Test®

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CFU : colony forming unit

CLSM : confocal laser scanning microscope

CMEb : concentration minimale d'éradication du biofilm

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMib : concentration minimale inhibitrice du biofilm

CRCM : centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose

Cup : chaperone usher pathway

CV: cristal violet

DMSO : diméthyl-sulfoxyde

DNase I : désoxyribonucléase I

DO : densité optique

DO_c : DO cut-off

DO_s : DO spécifique

ECBC : examen cytobactériologique des crachats

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EnaC: epithelial sodium channel
EPS : exopolysaccharide
ET : écart-type
FISH : fluorescence in situ hybridization
GFP : green fluorescent protein
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
HAS : Haute Autorité de Santé
HBSS: hanks' balanced salt solution
HSL : homosérine lactone
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
InVS : Institut de Veille Sanitaire
ITU : infection du tractus urinaire
LPS : lipopolysaccharide
MBEC : minimal biofilm eradication concentration
MH : müeller-hinton
NBF: nucleotide binding fold
O/N : overnight
PAI 1/2 : *Pseudomonas* autoinducer 1/2
PAP : pancreatitis-associated protein
PBS: phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PK/PD : pharmacocinétique/pharmacodynamique
PLC : phospholipase C
PNAG : polyglucosamine
QS : quorum sensing
rh-DNase : désoxyribonucléase de type I recombinante humaine
RPMI : roswell park memorial institute
SBI : suspension bactérienne initiale
SCV : small-colony variant
SDS : dodécylsulfate de sodium
SEM : standard error of the mean
SSTT : système de sécrétion de type III
SVF : sérum de vœu fœtal

TA : (module) toxine/antitoxine

TIR: trypsine immunoréactive

TR : toll-like receptor

UV : ultraviolet

XDR : extremely drug resistant

Chapitre 1

Introduction

1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

1.1 Un peu d'histoire...

En 1850, Sédillot, un chirurgien militaire français observa la présence récurrente de “pus bleu” sur les bandages de plaies des soldats (Villavicencio, 1998). Le pigment responsable de cette coloration fut extrait de pansements souillés en 1860 par Fordos, mais ce ne fut qu'en 1882 que Carle Gessard, pharmacien lui aussi militaire, isola pour la première fois le micro-organisme associé à cette pigmentation (Gessard, 1984). Il le nomma *Bacillus pyocyaneus* du grec “puon” (pus) et “kianos” (bleu foncé). Le terme générique *Pseudomonas* fut attribué à l'espèce bactérienne vers les années 1900, par le botaniste Migula (Palleroni, 2010). Et finalement, Freeman proposa une description plus détaillée du processus d'infection de *P. aeruginosa* en 1916 (Freeman, 1916).

1.2. Fiche d'identité du bacille pyocyanique

Pseudomonas aeruginosa, communément appelé “bacille pyocyanique”, est une bactérie Gram-négative. Elle appartient à la classe des *Gammaproteobacteria* et à la sous-famille bactérienne des *Pseudomonadaceae*. Son génome, publié en 2000, est un des plus grands génomes bactériens jamais séquencés (6,3 Mpb), expliquant ainsi sa grande versatilité métabolique et son adaptabilité exceptionnelle (Stover et al., 2000). Les bactéries se présentent sous la forme de bacilles droits, fins et très mobiles de par la présence d'un flagelle polaire (ciliature monotriche) (Figure 1). Ils se caractérisent par la production d'un certain nombre de pigments, dont la pyocyanine (bleu-vert), la pyoverdine (jaune-vert) et la pyorubine (brun-rouge).



Figure 1. Observation de *P. aeruginosa* au microscope électronique

Source <http://www.gettyimages.fr/detail/photo/pseudomonas-aeruginosa-photo/128546923>

P. aeruginosa vit principalement dans les sols et milieux humides. Son portage, rare chez des sujets sains,

est devenu fréquent chez les malades hospitalisés notamment en réanimation (Bertrand et al., 2011). L'InVS a recensé en 2014, par le réseau de surveillance nationale REA-Raisin, 14,8% de patients adultes colonisés par *P. aeruginosa* parmi les 10,7% admis en service de réanimation et présentant une infection associée à un dispositif invasif (Institut de veille sanitaire, 2016). Bien que peu agressif pour le sujet en bonne santé, *P. aeruginosa* est donc fréquemment impliqué dans les infections associées aux soins, principalement chez les patients immunodéprimés bénéficiant de dispositifs implantables. La bactérie s'est ainsi imposée au cours des dernières décennies comme le pathogène-type des infections hospitalières et nosocomiales. Elle se rencontre également en ambulatoire chez les patients atteints de mucoviscidose, chez qui elle apparaît en moyenne vers l'âge de 8 à 10 ans. Son apparition dans l'expectoration pulmonaire marque généralement une aggravation dans l'évolution de la maladie ("Antibiotiques," 2014). *P. aeruginosa* est également responsable d'infections urinaires, pulmonaires, oculaires (kératite ou endophtalmie) ou ostéo-articulaires. Elle peut également surinfecter des lésions cutanées (brûlures), des plaies traumatiques ou postopératoires, provoquer des otites externes (pouvant évoluer de manière invasive chez les sujets âgés et diabétiques), des septicémies (chez les neutropéniques) et des endocardites.

1.3. Facteurs de virulence

P. aeruginosa est un micro-organisme opportuniste dont la pathogénicité est multifactorielle. Elle est notamment attribuée à la production de facteurs de virulence membranaires et extracellulaires, agissant à différents niveaux au cours de l'infection. Ces derniers jouent un rôle dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus (Khalifa et al., 2011).

1.3.1. Facteurs de virulence impliqués dans l'infection aiguë

Dans le cas d'une infection aiguë, l'invasion, la dissémination de la bactérie et les lésions tissulaires prédominent. Les facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* favorisent alors l'invasion tissulaire et la cytotoxicité.

1.3.1.1. Motilité et adhérence bactérienne (facteurs de virulence de surface)

L'adhésion des bactéries à la cellule hôte est généralement la première étape du processus infectieux. C'est un phénomène spécifique qui implique deux facteurs : un récepteur eucaryote et une adhésine bactérienne. Les récepteurs sont généralement des glucides ou des résidus peptidiques spécifiques de la cellule. Les adhésines, quant à elles, sont considérées comme des facteurs de virulence puisqu'elles sont capables d'interférer avec le système immunitaire, de participer à l'introduction de molécules toxiques dans la cellule hôte et de favoriser l'invasion bactérienne.

FLAGELLE : Le flagelle bactérien est une structure rotative actionnée par un moteur situé à la base, qui

entraîne un filament agissant comme une hélice (Osterman et al., 2015). Cet appendice, essentiel à la mobilité de *P. aeruginosa* (de type “swimming” et “swarming”), facilite également l’acquisition de nutriments et joue un rôle indirect dans l’adhésion cellulaire et la virulence bactérienne (Josenhans & Suerbaum, 2002). Le flagelle est un organe très immunogène, surtout au cours des infections chroniques comme dans la mucoviscidose. *P. aeruginosa* s’adapte alors en sélectionnant des mutants dépourvus de flagelles, ou en inactivant son propre flagelle, pour contourner la réponse de défense de l’hôte (Jyot et al., 2007; Wolfgang et al., 2004).

PILI DE TYPE IV : Le pilus de type IV, constitué essentiellement de monomères de piline (PilA), est la principale adhésine de *P. aeruginosa*. Il est responsable de l’adhésion aux cellules épithéliales, l’évènement initial assurant l’infection bactérienne. Ces organites rétractables ont été parmi les premiers facteurs identifiés, au cours de criblages génétiques recherchant les traits nécessaires au développement d’un biofilm par *P. aeruginosa*. Ils participent activement à l’adhésion de la bactérie à la surface et à la formation de microcolonies (O’Toole & Kolter, 1998). Les pili de type IV sont également impliqués dans un mécanisme de déplacement particulier, indépendant du flagelle, appelé “twitching motility” qui prédomine dans les mouvements bactériens à l’interface de surfaces solides (Burrows, 2012).

FIMBRIAE : Un nouveau facteur d’attachement, le pili de type fimbriae, a été mis en évidence chez *P. aeruginosa*. De manière générale, il est essentiel à l’adhérence des bactéries aux surfaces abiotiques, comme le verre et le plastique, mais également dans la formation du biofilm (Ruer et al., 2007).

LPS : La molécule de lipopolysaccharide (LPS), constituant lipidique majeur de la membrane externe des bactéries, est constituée de trois parties : le lipide A, le cœur oligosaccharidique et l’antigène O. Le lipide A, aussi appelé endotoxine, est une partie hydrophobe insérée dans la bicouche phospholipidique membranaire. Il est responsable d’une stimulation excessive du système immunitaire pouvant aller jusqu’au choc septique. L’antigène O, quant à lui, est une région polysaccharique variable, caractéristique de la bactérie, qui la protège de la phagocytose. Il est présent sur toute la surface de la bactérie et en contact direct avec les tissus de l’hôte, jouant ainsi un rôle clé dans la réponse inflammatoire. De manière générale, le LPS protège les bactéries de la lyse provoquée par le sérum et possède une activité endotoxique par stimulation de la production de cytokines (King et al., 2009). *P. aeruginosa* est capable de produire deux formes de LPS, le LPS A et le LPS B. Ils déterminent alors le phénotype des colonies bactériennes. Selon que l’antigène O est présent ou non sur le cœur oligosaccharidique, on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux. Le variant de phénotype lisse est décrit comme étant plus virulent qu’un mutant au phénotype rugueux.

1.3.1.2. Colonisation de l’hôte (facteurs de virulence sécrétés)

Ils interviennent dans la dissémination de la bactérie au niveau des tissus et dans l’atténuation des

défenses de l'hôte (Veesenmeyer et al., 2009).

EXOTOXINES : L'ExoA est le composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa*. Son mode d'action est identique à celui de la toxine diphtérique, elle engendre une inflammation sévère et une nécrose tissulaire. L'ExoS est la toxine la mieux caractérisée de *P. aeruginosa*. Elle est retrouvée chez 70 à 80% des isolats cliniques. Elle n'est pas nécessaire à l'initiation de l'infection, mais participe à la destruction des tissus au site d'inflammation et à la dissémination bactérienne. L'ExoT présente 76% d'homologie de séquence avec ExoS. Responsable de réarrangements du cytosquelette, elle empêche également la phagocytose et peut être impliquée dans l'infection pulmonaire en interférant avec les filaments d'actine. L'ExoU est la plus grande des quatre cytotoxines sécrétées par *P. aeruginosa*. C'est une toxine nécrotique possédant une activité phospholipase. Elle est donc capable de détruire les membranes cellulaires, induisant la perméabilité des cellules épithéliales, des macrophages et des fibroblastes. Sa cytotoxicité est 100 fois supérieure à celle d'ExoS. Finalement, l'ExoY est une adénylate cyclase dont la translocation dans les cellules eucaryotes cibles conduit à une augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc. Elle conduit alors à la formation de pores membranaires et à la détérioration des cellules endothéliales pulmonaires.

De par sa structure, le système de sécrétion de type III (SSTT) permet à la bactérie d'injecter directement ses toxines à l'intérieur de la cellule. Le passage de ces dernières depuis la bactérie se fait à l'aide d'un appendice similaire à une aiguille, qui est capable de percer la membrane de la cellule eucaryote.

ÉLASTASE : L'activité élastase de *P. aeruginosa* est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB (Galloway, 1991). LasB une métalloprotéase à zinc, à activité protéolytique très importante. L'élastase LasA est une protéase à sérine qui agit en synergie avec LasB. Elle rend l'élastine, composant majeur de l'épithélium respiratoire, plus accessible à l'action d'autres enzymes de dégradation comme LasB. Ceci conduit donc à une perméabilisation de l'épithélium pulmonaire qui devient sensible à l'action des autres facteurs de virulence de la bactérie. LasB est également capable d'inactiver de nombreux acteurs du système immunitaire de l'hôte comme les IgA et IgG ou les composants du complément.

PHOSPHOLIPASES C : Trois phospholipases C (PLC), de spécificité de substrats différente, ont été identifiées chez *P. aeruginosa* (Stonehouse et al., 2002). Ce sont des hémolysines thermolabiles extracellulaires d'environ 80 kDa contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique. Elles sont synthétisées dans des conditions de carence en phosphate et ciblent particulièrement la partie lipidique de la membrane des cellules eucaryotes. De manière générale, elles participent à l'inflammation, à la mobilité de type "twitching", sont capables de supprimer la réponse oxydative des neutrophiles et présentent, parfois, une activité hémolytique. Leur action est facilitée par les rhamnolipides bactériens.

RHAMNOLIPIDES : Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles impliqués

dans la mobilité de type “swarming” et la formation de communautés microbiennes (Soberón-Chávez et al., 2005). Ils interviennent à différentes étapes du développement du biofilm bactérien et jouent un rôle particulier dans la sauvegarde de sa structure tridimensionnelle (maintien des canaux assurant le transport d’eau et d’oxygène au sein même du biofilm) (Davey et al., 2003). Initialement impliqués dans la mise en place de l’infection aiguë par *P. aeruginosa*, ces surfactants peuvent indirectement être impliqués dans l’installation d’une infection chronique. Ils agissent également sur les phospholipides des membranes eucaryotes et en facilitent l’accès aux phospholipases. Ils participent à l’invasion du tissu pulmonaire humain par *P. aeruginosa* en perturbant le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l’épithélium respiratoire et en étant capables d’inhiber la phagocytose. Les rhamnolipides contribuent donc à l’invasion du tissu pulmonaire par les bactéries et sont retrouvés à haute concentration dans les crachats des patients mucoviscidiques infectés. Ils conduisent souvent à une exacerbation des symptômes.

PYOCYANINE : La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie et impliqué dans de nombreux mécanismes pathogènes. Elle est toxique pour les cellules eucaryotes et procaryotes. Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte et joue un rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa* en participant au stress oxydatif et à la nécrose du tissu respiratoire (Hall et al., 2016).

LECTINES SOLUBLES : Parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie, deux lectines solubles cytotoxiques ont été identifiées chez *P. aeruginosa* (Grishin et al., 2015). La lectine PA-IL (LecA) favorise la formation d’agrégats bactériens, protégeant les micro-organismes du système immunitaire de l’hôte. Elle joue un rôle dans l’adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales et dans la mise en place et la stabilisation du biofilm bactérien. Une souche dont le gène codant pour LecA est délété, conduit à la formation d’un biofilm plus fragile et moins épais que la souche sauvage (Diggle et al., 2006). PA-III (LecB) présente une forte affinité pour le L-fucose et est capable d’inhiber le battement ciliaire des cellules pulmonaires. Elle joue aussi un rôle dans la formation du biofilm, en se fixant aux glycoconjugués localisés à la surface des bactéries. Une souche déficiente en LecB n’est pas capable de croître sous forme sessile contrairement à une souche sauvage (Tielker et al., 2005). Comme pour les rhamnolipides, ces facteurs de virulence initialement exprimés au cours de l’infection aiguë peuvent conduire à l’établissement d’une infection chronique par *P. aeruginosa*.

1.3.2. Facteurs de virulence impliqués dans l’infection chronique

Dès que la bactérie a réussi à s’implanter, elle doit s’adapter à son nouvel environnement et ce malgré la présence des défenses immunitaires de l’hôte et d’évènements extérieurs tels que des antibiothérapies répétées. Pour réussir ceci, *P. aeruginosa* va devoir développer une importante gamme de stratégies comme la perte de ses composants les plus immunogènes (fimbriae ou flagelle), mais également la

formation d'un biofilm par optimisation de son adhésion et modification de sa mucosité. Les facteurs de virulence extracellulaires sécrétés et l'expression d'un phénotype sessile tolérant aux antibiotiques favorisent alors une inflammation persistante.

SIDÉROPHORES : Le fer étant un élément essentiel à la croissance de tous les organismes vivants, les bactéries ont dû développer plusieurs stratégies en vue d'acquérir, transporter et rendre le fer soluble. La méthode la plus répandue est la production de composés chélatant le fer : les sidérophores (Cornelis & Dingemans, 2013). Après sécrétion, le sidérophore chélate le fer dans l'environnement extracellulaire. Il est obtenu des transferrines, des ferritines, de l'hémoglobine et de toutes protéines de l'hôte contenant du fer. Le complexe moléculaire résultant, le ferri-sidérophore est ensuite transporté à l'intérieur du cytoplasme via des récepteurs membranaires spécifiques (FpvA) (Cézard et al., 2015). *P. aeruginosa* synthétise deux types de sidérophores : la pyoverdine et la pyocheline. Cette dernière peut provoquer des effets pathogènes secondaires dont la production de radicaux hydroxyles cytotoxiques. Elle participe donc indirectement à la destruction des cellules épithéliales pulmonaires.

ALGINATE : Les bactéries pathogènes peuvent être responsables d'infections chroniques lorsqu'elles se développent au sein d'un biofilm. Cette structure bactérienne est composée de microcolonies enchâssées dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS). En gênant la diffusion des antibiotiques et en permettant une résistance à la phagocytose et aux anticorps, la formation d'un biofilm par les micro-organismes leur assure une installation durable. Historiquement, l'alginate a été considéré comme l'exopolysaccharide majeur du biofilm de *P. aeruginosa* (Remminghorst & Rehm, 2006). C'est un polysaccharide chargé négativement qui se compose d'acides L-gulonique (G) et D-mannuronique (M) liés entre eux par des liaisons β -1,4. Chez *P. aeruginosa*, la synthèse de l'alginate répond à certains facteurs environnementaux rencontrés notamment chez les patients atteints de mucoviscidose (déshydratation, hyperosmolarité ou carences en nutriments des sécrétions pulmonaires). Une surproduction d'alginate est observée chez les bactéries infectant ces malades, certainement en raison des conditions inflammatoires caractéristiques retrouvées dans leurs poumons. De façon générale, douze gènes principaux sont impliqués dans la biosynthèse de l'EPS. Ils sont regroupés en un opéron dont la transcription est contrôlée par un système de régulation à deux composants (protéine "sensor" AlgQ et protéine régulatrice AlgR). Cependant, des études chimiques et génétiques ont montré que l'alginate n'est pas impliqué dans l'initiation de la formation du biofilm par les souches pyocyaniques PAO1 et PA14 (Wozniak et al., 2003). Les systèmes Pel et Psl ont été décrits plus récemment (Jackson et al., 2004; Vasseur et al., 2007). Ce sont des systèmes de synthèse et d'exportation de matrices exopolysaccharidiques participant à la structuration du biofilm. L'implication de ces composants dans la structure du biofilm sera détaillée plus précisément dans le chapitre suivant.

1.4. Régulation de l'expression des facteurs de virulence

La majorité des facteurs de virulence sont sous la dépendance de deux systèmes de régulation : le système à deux composants et le Quorum Sensing. Ils permettent l'adaptation de la synthèse protéique bactérienne à l'environnement, assurant ainsi la survie et la multiplication de la bactérie.

1.4.1. Systèmes à deux composants

Ils permettent, grâce à la détection et à la transduction de signaux extérieurs, une réponse rapide de la bactérie face à des modifications de l'environnement. Ces systèmes se composent d'une protéine kinase (senseur), généralement située à la membrane, et d'un régulateur de réponse (Stock et al., 2000). La protéine senseur est constituée d'un module "détecteur" dans sa région N-terminale. La longueur du domaine associé et sa séquence varient d'une protéine à l'autre, conférant alors une spécificité de réponse à différents stimuli. Suite à la détection d'un signal extérieur, la protéine s'autophosphoryle sur un résidu histidine conservé du domaine transmetteur. Le groupement phosphate est ensuite transféré au régulateur. Ce dernier, qui possède un domaine de fixation à l'ADN, est alors capable de réguler la transcription de gènes cibles (Gooderham & Hancock, 2009). Chez *P. aeruginosa*, il a été identifié un nombre très élevé de protéines impliquées dans des systèmes de régulation à deux composants dont au moins 63 protéines senseurs et 64 régulateurs de réponse (Rodrigue et al., 2000). L'importance de ces systèmes de régulation pourrait expliquer la forte adaptabilité du pathogène à l'environnement et donc expliquer le fait qu'il soit si répandu dans la nature. Dans le cas particulier de la mucoviscidose, les systèmes à deux composants seraient également impliqués dans l'établissement et le maintien des infections chroniques, en assurant l'adaptation des micro-organismes à l'environnement pulmonaire.

1.4.2. Quorum Sensing

1.4.2.1. Principe général

Le Quorum Sensing (QS) permet une adaptation particulière des micro-organismes à une modification de l'environnement, par régulation coordonnée de l'expression de gènes et de facteurs de virulence. L'expression des phénotypes contrôlés par le QS est très coûteuse en énergie pour les cellules bactériennes et n'apporte un avantage que si elle a lieu quand la densité bactérienne est importante (Bricha et al., 2009). Ce système de régulation est basé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles par la production de phéromones diffusibles. Elles diffèrent d'une bactérie à l'autre et donnent, aux micro-organismes, une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Ces derniers peuvent alors coordonner leur comportement et ainsi fonctionner comme un individu multicellulaire. Quand la concentration en molécules de signalisation atteint un seuil critique, elles se lient à un régulateur transcriptionnel. En absence du signal approprié, la plupart de ces récepteurs sont dégradés. À l'inverse, quand une molécule s'y lie, le récepteur devient stable, se dimérise et se fixe à l'ADN. Le complexe ainsi formé, associé à de

courtes séquences d'ADN, va activer la transcription en aval, de gènes cibles de virulence, mais également du gène inducteur initial, on parle alors de molécules auto-inductrices. Cette boucle d'auto-induction conduit à l'activation du système chez les bactéries voisines, expliquant la notion de réponse coordonnée de l'ensemble de la population. Ce système a un impact très large puisque les molécules impliquées sont capables de moduler l'expression des gènes chez les bactéries de la même espèce, mais aussi chez des bactéries d'espèces différentes voire même chez des organismes eucaryotes (Rumbaugh et al., 2000). Identifié chez les espèces bactériennes à Gram - et à Gram +, le QS permet une adaptation physiologique et métabolique des bactéries ainsi que l'expression de facteurs de virulence et la formation de biofilms (Papenfort & Bassler, 2016).

1.4.2.2. QS chez *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, le QS est considéré comme le principal mécanisme de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation écologique. Six à 10% des gènes de *P. aeruginosa*, impliqués dans le métabolisme cellulaire ou la virulence bactérienne, sont ainsi régulés par le QS. Trois systèmes principaux de QS ont déjà été caractérisés chez le bacille pyocyanique. Deux d'entre eux sont médiés par des N-acyl homosérine lactones (LasI/LasR et RhlI/RhlR) et le troisième est régi par des quinolones (PQS). Ils sont tous connectés au sein d'une même cascade et sont impliqués dans l'expression de la quasi-totalité des gènes de virulence.

Les systèmes régulés par les AHL ont été les premiers décrits et ont été nommés à partir des facteurs de virulence identifiés sous leur contrôle (Castillo-Juárez et al., 2015). La synthase LasI synthétise une 3-oxo-C₁₂-homosérine lactone (3O-C₁₂-HSL), également nommée PAI1 pour *Pseudomonas* AutoInducer 1. Cette dernière diffuse librement à travers la structure pariétale de la bactérie. Lorsque la concentration en PAI1 atteint un seuil critique, témoin d'une concentration bactérienne élevée, les molécules se fixent à deux protéines LasR pour constituer un complexe activateur de la transcription de gènes. Le couple LasR/PAI1 ainsi formé est capable de réguler l'expression de facteurs de virulence comme LasA, LasB et ExoA. Il est important de noter que cette activation se déclenche de manière synchrone dans toute la population bactérienne à la jonction entre la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire.

Le second système de régulation a été nommé Rhl puisqu'il contrôle, entre autres, la biosynthèse des rhamnolipides. La synthèse du PAI2, une C₄-homosérine lactone (C₄-HSL), se fait donc par RhlI. La molécule auto-inductrice rejoint alors RhlR en faisant intervenir un transport actif par pompe à efflux. L'activation de ce dernier permet la régulation de gènes impliqués dans la synthèse des rhamnolipides et la production de métabolites secondaires, comme la pyocyanine.

Le dernier système PQS, bien que sous la dépendance des systèmes LasI/R (effet positif) et RhlI/R (effet

négatif), est chimiquement unique. La molécule auto-inductrice est une 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone; c'est le premier exemple de composé antibactérien ayant un rôle de molécule signal. Le récepteur régulateur PqsR (également connu sous le nom de MvfR), une fois activé, contrôle lui aussi l'expression de facteurs de virulence chez la bactérie dont l'élastase LasB et également la pyocyanine. L'importance du système PQS semble conséquente pour la bactérie puisqu'aucune mutation de gènes le régulant ne conduit à une diminution de la production des facteurs de virulence.

Récemment, un quatrième système de communication intercellulaire a été mis en évidence (Lee & Zhang, 2015). Nommé IQS, la structure de sa molécule signal a été identifiée comme étant un 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldéhyde. Une mutation des gènes impliqués dans sa synthèse conduit à une diminution de la production de pyocyanine, de rhamnolipides et d'élastase.

1.5. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa présente la particularité d'être multirésistant aux antimicrobiens, ce qui induit de sérieux problèmes thérapeutiques et favorise sa dissémination en milieu hospitalier (Lister et al., 2009). La résistance naturelle du pathogène aux biocides, appelée aussi résistance intrinsèque, relève en général d'une mauvaise perméabilité de la membrane externe, de la production constante d'enzymes inactivant les antibiotiques et de la mise en place de systèmes de pompes à efflux actifs (Cag et al., 2016; Cattoir, 2004; Jehl et al., 2012; Mérens et al., 2011). Portée par les chromosomes, elle est stable et détermine le phénotype "sauvage" des bactéries. Chez *P. aeruginosa*, il n'est pas exceptionnel d'isoler des souches cliniques dites «XDR» (pour «eXtremely Drug-Resistant»), qui se définissent par la résistance à tous les antibiotiques sauf un ou deux, voire des souches résistantes «à tout» (Figure 2).

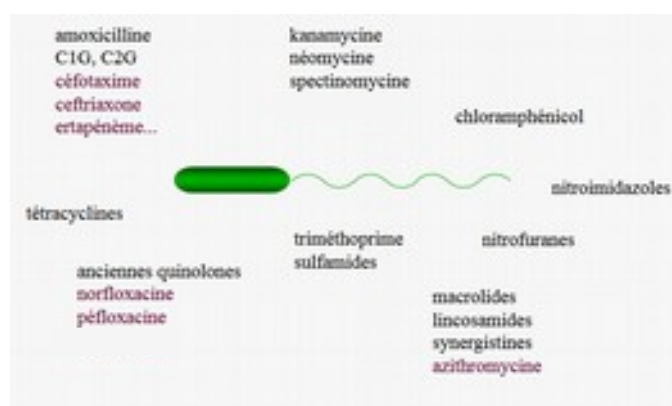


Figure 2. Résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux antibiotiques

Source http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/conf_posters/PPlesiat_Bordeaux2008.pdf

1.5.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Les cellules bactériennes vont synthétiser des enzymes capables d'interagir avec l'antibiotique, conduisant à son inactivité. C'est le mécanisme le plus fréquent en pathologie infectieuse. Il peut s'agir d'une

destruction de l'antibiotique, telle l'hydrolyse des β -lactamines par les β -lactamases (pénicillinases, céphalosporinases, BLSE, carbapénèmases etc.), ou d'une modification de la molécule par l'ajout de radicaux telles les estérifications des aminosides par les aminosides-phosphotransférases (APH), -nucléotidyltransférases (ANT) et -acétyltransférases (AAC).

1.5.2. Diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne

Chez *P. aeruginosa*, c'est le mécanisme le plus fréquent de résistance à l'imipénème. Le défaut d'expression de la porine D2, consécutif à une mutation, entraîne une résistance sélective aux carbapénèmes. La prévalence de cette résistance est élevée. Une production d'exopolysaccharide ou une modification du LPS est parfois également à l'origine d'une résistance à bas niveau aux aminosides. Finalement, la résistance à la famille des fluoroquinolones, par imperméabilité, peut être liée, chez *P. aeruginosa*, à un déficit de l'expression des porines qui représentent la principale voie de passage de ces molécules à travers la membrane externe.

1.5.3. Mise en place de mécanismes actifs d'efflux

Une dizaine de systèmes d'efflux ont été mis à jour chez *P. aeruginosa*. Parmi eux, quatre ont été décrits comme participant à la résistance acquise du pathogène: MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN. Ces mécanismes sont tous constitués de trois composants: une protéine de liaison entre les membranes externes et cytoplasmiques, une pompe d'efflux localisée au niveau de la membrane cytoplasmique et une protéine de membrane externe (canal d'efflux). Initialement, seul MexAB-OprM s'exprime de manière constitutive chez la bactérie, l'expression des autres pompes est régie par des régulateurs génétiques. Bien que les niveaux de résistance conférés par ces systèmes d'efflux soient bas, ils s'additionnent généralement à d'autres mécanismes. Ces pompes donnent alors lieu à différents phénotypes et confèrent une résistance à la plupart des antimicrobiens.

Outre un arsenal conséquent de facteurs de virulence, le bacille pyocyanique est donc capable d'utiliser tout un ensemble de dispositifs intrinsèques ou acquis pour échapper à l'action des antimicrobiens, auxquels il est habituellement sensible. Cependant, l'expression de ces mécanismes peut s'intégrer dans un contexte adaptatif, plus complexe et transitoire, conditionné par une pression environnementale. Cette résistance induite par le milieu est la plupart du temps conditionnée par la formation de communautés bactériennes denses, communément appelées biofilms. L'appartenance des micro-organismes à de telles structures modifie le comportement individuel de chaque cellule, les rendant souvent beaucoup plus résistantes aux antibiotiques qu'elles ne le sont à l'état isolé. Les mécanismes de résistance impliqués sont alors propres au mode de vie du biofilm bactérien (cf. paragraphe **2.3. Des bactéries sousabri**).

2. LE BIOFILM BACTÉRIEN

2.1. Description d'un mode de vie communautaire

Le terme de biofilm bactérien a été pour la première fois défini en 1978 comme une communauté structurée de micro-organismes adhérant à un support et se caractérisant par la production d'une matrice polysaccharidique extracellulaire (Costerton et al., 1978). Il représente un processus de développement particulier chez les bactéries, initialement déclenché par la proximité d'une surface biotique (muqueuse) ou abiotique (roche, canalisation...) et impliquant des phénomènes de communication tels que le QS.

Sa découverte est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, qui observa en 1684, une accumulation de micro-organismes au niveau de la plaque dentaire. Il écrivit dans un compte rendu pour la Royal Society of London: "The number of these animalcules in the scurf of a man's teeth are so many that I believe they exceed the number of men in a kingdom." ("Biofilms: The Hypertextbook," 2011).

La croissance des bactéries sous forme de biofilms est un processus extrêmement fréquent dans la nature. Il est même estimé que 80% de la biomasse microbienne existante réside au sein de telles communautés bactériennes. À l'échelle de la planète, les biofilms jouent un rôle écologique majeur et ont également un impact non négligeable en médecine humaine en contribuant au développement d'infections liées aux soins (Lebeaux & Ghigo, 2012).

Ce mode communautaire, autrement appelé "sessile", s'oppose au mode de vie planctonique, où les bactéries sont isolées, en flottaison libre dans l'environnement. Les microbes sessiles diffèrent de leur forme planctonique par leur morphologie, leur physiologie et leur expression génique. La forme planctonique peut finalement se réduire au passage des bactéries d'une surface à l'autre. L'attachement et la croissance sous forme de biofilm représentent une stratégie de survie qui permet aux micro-organismes de s'installer et de coloniser un environnement. Ensuite, le biofilm sera amené à libérer à son tour des éléments isolés. Les bactéries passent donc continuellement du mode sessile à planctonique. Cette variation de phases est stratégique pour la bactérie puisqu'elle lui assure une adaptation rapide à des variations de conditions environnementales. Par une réorganisation génique qui "allume" ou "éteint" l'expression de certains gènes en fonction des conditions extérieures, différents traits phénotypiques associés peuvent être exprimés.

L'utilisation du microscope a également permis de mettre en évidence la structure tridimensionnelle, dite "en champignon", des biofilms bactériens. Ces derniers sont en fait composés d'agrégats de micro-organismes, séparés par des espaces "vierges" de cellules formant des courants aqueux (Lawrence et al.,

1991). Ces véritables canaux, à l'intérieur même de l'organisation bactérienne, séparent les microcolonies et permettent une circulation de l'oxygène et des nutriments dans les régions enfouies du biofilm ainsi que l'élimination des produits de dégradation. Ainsi, le biofilm reflète un environnement structuré, d'une architecture complexe et spécifique aux conditions environnementales et aux organismes qui le composent.

L'étape clé du développement du biofilm est sans nul doute la synthèse de la matrice extracellulaire, résultant du métabolisme intrinsèque des bactéries. De manière générale, elle inclut tous les éléments du biofilm autre que les bactéries. En constituant 50 à 90% de sa matière organique totale, la matrice est le composant structural majeur du biofilm bactérien.

Hautement hydratée (jusqu'à 97% d'eau), elle se compose majoritairement d'exopolysaccharides (EPS), de protéines, d'acides nucléiques et de sels (Limoli et al., 2015). En fait, sa composition va dépendre de l'espèce bactérienne productrice et des conditions de croissance.

Lors de la maturation du biofilm, des quantités significatives de polymères extracellulaires sont produites afin d'assurer une liaison entre les cellules bactériennes. Cette matrice renforce ainsi la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. Son rôle, bien qu'avant tout structural, est également protecteur puisqu'elle augmente directement la tolérance des bactéries aux agents antimicrobiens et aux facteurs environnementaux néfastes (UV, variation de pH, choc osmotique, dessiccation...). De plus, les EPS participent à "l'absorption" des minéraux, la dissolution des composés organiques et la concentration des nutriments, des enzymes et des facteurs de croissance mis à disposition des micro-organismes au sein du biofilm (Smirnova et al., 2010).

Les polysaccharides les plus souvent retrouvés dans la matrice extracellulaire sont le poly-N-acétylglucosamine (PNAG), le polymère de glucose, le glucane et surtout l'alginate chez *P. aeruginosa* (Garrett et al., 1999).

Au cours des étapes de développement précoce de la structure bactérienne, il a également été démontré que l'ADN extracellulaire figurait comme un composant essentiel de l'adhésion des organismes à la surface et participait également à la cohésion intercellulaire (Figure 3) (Whitchurch et al., 2002). En effet, d'un point de vue quantitatif, dans la matrice d'un biofilm de *P. aeruginosa*, l'ADNe est six fois plus abondant que les protéines et dix-huit fois plus présent que les composés organiques. L'origine de cet ADNe a été confirmée comme étant génomique. Les acides nucléiques peuvent alors provenir soit de la lyse d'une fraction de la population bactérienne sessile, contrôlée par QS, ou soit d'une excrétion volontaire par des cellules vivantes via des vésicules de transport membranaires (Okshevsky & Meyer, 2015).

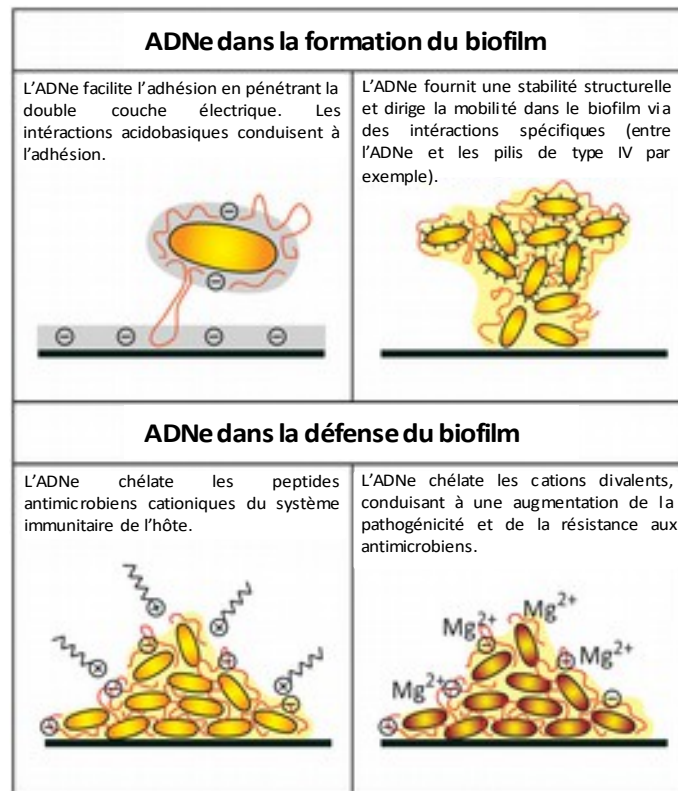


Figure 3. Rôles de l'ADNe dans la formation et la défense du biofilm.

Traduit et d'après (Okshevsky & Meyer, 2015)

Des études utilisant la microscopie électronique en transmission ont également montré, par analyse de coupes ultrafines de biofilms de *P. aeruginosa*, que les cellules bactériennes sessiles présentaient des vésicules membranaires inhabituelles. Ces dernières semblent alors agir en tant que facteurs de virulence, en contenant des enzymes telles que la phosphatase alcaline ou encore la phospholipase C. Il a alors été suggéré que ces enzymes hydrolytiques étaient transportées à la surface des cellules, par l'intermédiaire des vésicules, afin d'être déversées dans la matrice extracellulaire du biofilm et plus généralement dans l'environnement externe (Schooling & Beveridge, 2006). Une des conséquences directes de la formation de ces vésicules membranaires peut être la lyse des bactéries environnantes, qui servent alors de source d'énergie aux cellules avoisinantes. La survie d'une organisation multicellulaire au sein d'une niche écologique semble impliquer un comportement altruiste de la part des micro-organismes la composant. L'expression génique différentielle des membres d'un biofilm indique que chaque individu endosse une fonction propre, favorisant la survie de la communauté bactérienne dans son ensemble (Kreft, 2004).

2.2. Développement d'un environnement hétérogène

Le biofilm bactérien peut se former très rapidement, en quelques heures seulement. Son développement dynamique comporte 5 étapes principales (Figure 4) (Dufour et al., 2010; Lebeaux & Ghigo, 2012).

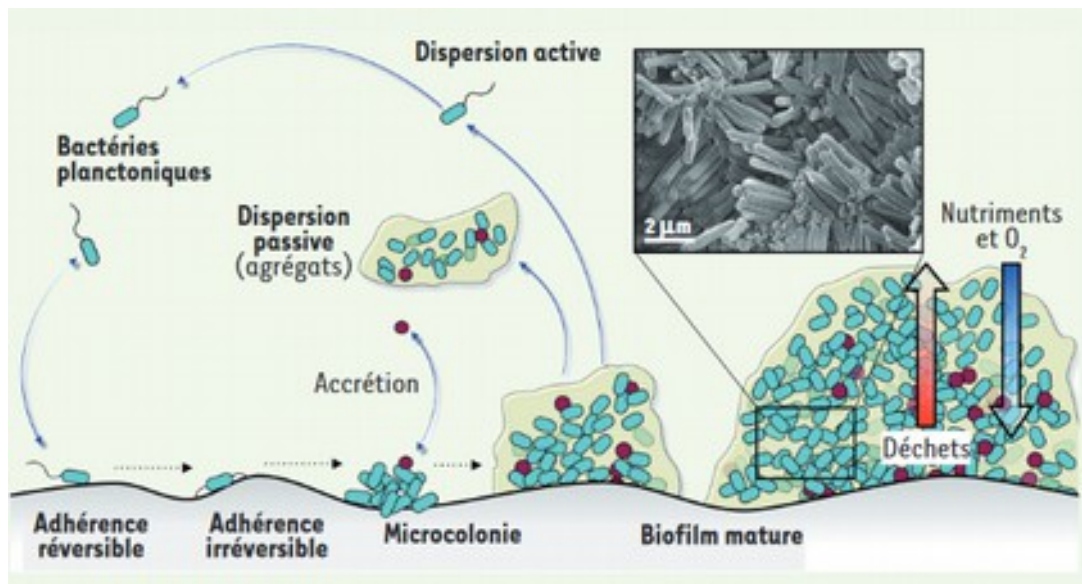


Figure 4. Représentation schématique des différentes étapes de développement d'un biofilm microbien.

Les étapes distinctes de la formation d'un biofilm impliquent l'adhésion initiale des micro-organismes à une surface, la formation d'une monocouche avec formation de microcolonies, la maturation du biofilm associée à une structure tridimensionnelle et la dispersion cellulaire. Issue de (Lebeaux & Ghigo, 2012).

Dans un premier temps, les bactéries isolées doivent se déplacer et détecter une surface à coloniser. Pour cela, elles font intervenir des appendices générateurs de mouvement comme les flagelles. Une fois à proximité d'un support, le déclenchement de signaux environnementaux va informer les bactéries de la possibilité d'adhésion (variation du pH, concentrations en oxygène et en nutriments, température, osmolarité...). La mobilité bactérienne est alors réduite et l'adhésion à la surface va pouvoir se faire par l'intermédiaire d'organites comme les pilis ou plus généralement d'adhésines. Ces dernières favorisent l'attachement et empêchent l'élimination précoce des micro-organismes. À ce stade, l'adhésion est réversible.

L'implication du flagelle est aussi importante dans l'approche du support que dans l'initiation de la formation du biofilm puisque des mutants défectueux dans sa synthèse ne sont pas capables d'adhérer à une surface (O'Toole & Kolter, 1998). De la même manière, un flagelle assemblé, mais inactif empêchera l'établissement du biofilm (Vallet et al., 2001).

Les surfaces colonisables par un biofilm microbien peuvent tout aussi bien être de type minéral, végétal, animal que totalement synthétique. Il peut s'agir de surfaces hydrophiles ou hydrophobes, lisses ou rugueuses. Ces caractéristiques détermineront cependant la facilité et la solidité de l'adhésion bactérienne. Après cette première adhésion au support, qui peut survenir dans les secondes qui suivent le contact initial, une deuxième phase d'attachement permet aux bactéries adhérentes de se multiplier et, par l'intermédiaire de pili de type IV, de s'agglutiner en formant des microcolonies. La fixation devient cette fois irréversible. Les appendices de type pili sont initialement impliqués dans une mobilité particulière,

dépendante de la présence d'un support, appelée "twitching". Ces mouvements d'élongation/rétraction permettent, dans un contexte sessile, une agrégation des cellules bactériennes en microcolonies (Figure 5).



Figure 5. Rôle du flagelle et du pilus de type IV dans l'établissement du biofilm.

La mobilité médiée par le flagelle est nécessaire à la formation d'une monocouche bactérienne au niveau d'une surface abiotique. Les pili de type IV jouent un rôle dans les événements sous-jacents comme la formation de microcolonies. D'après (O'Toole & Kolter, 1998).

Comme pour le flagelle, la formation de biofilm peut être affectée en cas d'organites extracellulaires déficients. Des mutants défectueux dans la production de pili de type IV adhèrent à une surface par formation d'une monocouche de cellules, mais ne sont pas capables de s'agglomérer en microcolonies. Ceci confirme que la formation de microcolonies est un mécanisme d'agrégation cellulaire nécessitant la mobilité des bactéries et non pas seulement une croissance clonale à partir d'une cellule bactérienne donnée (O'Toole & Kolter, 1998). De manière générale, les appendices bactériens, impliqués dans la mobilité des micro-organismes, sont essentiels à la phase initiale de la formation du biofilm. Ils assurent l'approche et la colonisation du support. Des études portant sur l'expression génique de bactéries sessiles, via l'utilisation de puces à ADN, ont montré que l'expression des gènes codant pour les appendices de surface était réprimée une fois que la formation d'un biofilm était initiée (Whiteley et al., 2001). Ces structures ne sont plus nécessaires au maintien du biofilm et laissent place à des déterminants permettant sa structuration et sa différenciation. Dans ce sens, il a été démontré que le QS était directement impliqué dans l'étape de structuration du biofilm. L'étude d'une souche sauvage *P. aeruginosa* et d'un mutant *lasI*, bien que montrant des capacités à adhérer et à proliférer sur une surface en verre, a mis en évidence une différence d'architecture entre le biofilm formé par la souche sauvage et celui du "mutant" (plus uniforme et plus mince) (Davies et al., 1998).

S'ensuit alors une première étape de maturation qui se caractérise par la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire. Cette dernière assure alors une cohésion mécanique entre les cellules bactériennes et favorise le passage de la "vie libre" à la "vie statique". Sa composition varie dans le temps et l'espace et détermine la configuration spatiale du biofilm.

Comme pour l'inactivation des gènes codant pour les appendices extracellulaires, des études ont démontré que les bactéries sessiles possédaient un "sens du toucher", soit la capacité de détecter la présence d'une surface et d'y associer l'expression de gènes spécifiques. En effet, pendant les premières phases d'adhésion, la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de l'alginate est activée programmant

ainsi la synthèse de la matrice après la formation des microcolonies (Davies & Geesey, 1995). De récents travaux ont montré que l'ensemble de ces informations était finalement intégré directement dans le cytoplasme des bactéries via un messager secondaire chimique, le di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc). Cette molécule, dont la concentration intracellulaire est influencée par des stimuli environnementaux, va jouer un vrai rôle d'interrupteur entre une vie nomade planctonique et une vie sédentaire sessile (McDougald et al., 2011).

Si les conditions de croissance le permettent, le biofilm connaît alors une deuxième phase de maturation, se définissant par une croissance en épaisseur (de 10µm à 100µm, puis supérieure à 100µm). Le biofilm mature présente alors généralement une structure complexe en 3 dimensions. Il peut acquérir une forme caractéristique en “champignon” constituée par des colonnes de bactéries reposant sur un socle de cellules et dans lesquelles circulent des bactéries mobiles, le tout englobé dans la matrice extracellulaire (Figure 6). Au travers de cette structure persistent des canaux assurant le transfert d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des bactéries sessiles. Des gradients d'oxygène, mais également de pH se mettent en place du sommet à la base du biofilm. Ces variations de concentrations au sein même du biofilm conduisent à des différences d'activité métabolique et de croissance des bactéries, leur activité étant élevée à la surface et réduite en son centre. Cette hétérogénéité physicochimique, propre à la structure biofilm, conduit à une hétérogénéité physiologique des micro-organismes en son sein et génère la formation de microniches environnementales, conduisant à l'émergence de sous populations bactériennes, génétiquement semblables, mais physiologiquement distinctes (différence de tolérance vis-à-vis des antibiotiques par exemple).

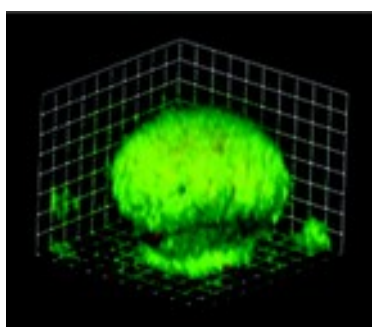


Figure 6. Reconstitution 3D de la structure d'un biofilm à *P. aeruginosa*.

Formation d'un biofilm à *P. aeruginosa*-GFP en chambre en flux (flow cell) pendant 6 jours. Les cellules mortes sont marquées à l'Iodure de Propidium et les cellules vivantes au SYTO9. Les images sont initialement acquises par microscopie confocale (CLSM). Issue de (Banin et al., 2006).

L'étape finale du cycle de formation d'un biofilm est sa déstructuration. La dispersion d'un biofilm peut être initiée par plusieurs facteurs comme des perturbations mécaniques (abrasion), des dégradations enzymatiques (sécrétions d'enzymes régies par le QS) ou encore une pénurie en nutriments ou une

surpopulation. Des portions de bactéries se détachent alors de la communauté et se dispersent dans l'environnement. Ces cellules individuelles, ayant retrouvé leur mobilité et leur capacité d'adhésion, vont pouvoir explorer et coloniser de nouvelles surfaces par la mise en place d'un nouveau biofilm. Un nouveau cycle d'adhésion/maturation peut alors reprendre.

Le biofilm doit être considéré comme une organisation très élaborée, vivante et dynamique, qui évolue constamment pour s'adapter à son milieu. Les signaux environnementaux, comme la concentration en éléments nutritifs, ainsi que la densité de cellules bactériennes (QS) ont une influence directe sur les différentes étapes de formation du biofilm. De manière générale, la formation d'un biofilm est régie par un réseau complexe de régulations multifactorielles. Le passage cyclique du mode sessile à planctonique joue un rôle considérable dans la transmission des bactéries de réservoirs environnementaux à un hôte, mais aussi dans la transmission entre hôtes et dans la propagation de l'infection chez un individu (métastases de biofilm).

2.3. Des bactéries sous abri

L'avantage principal du mode de vie sessile est la modification de la sensibilité des bactéries adhérentes vis-à-vis des mécanismes de défense immunitaire et des antimicrobiens. En effet, un microbe planctonique, individuel et isolé, est vulnérable à l'action des anticorps ou phagocytes. Il sera également plus ou moins sensible aux antibiotiques. À l'inverse, des bactéries incluses dans une structure biofilm, de par l'ensemble de ses caractéristiques, vont être résistantes au système immunitaire de l'hôte, aux antibiothérapies et autres molécules biocides. Cependant, ces traits de résistance spécifiques à la vie bactérienne sessile se révèlent être réversibles, phénotypiques et non hérités. En effet, une bactérie issue d'un biofilm, remise en suspension de manière isolée en milieu liquide, retrouvera une sensibilité *in vitro* "normale" aux différents antimicrobiens. On parle alors plus de tolérance du biofilm aux antibiotiques que de résistance.

2.3.1. Inefficacité du système immunitaire

La taille d'un biofilm bactérien est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose. Même chez des individus immunocompétents, les composants du système immunitaire sont rarement efficaces contre une infection sur biofilm. Au cours de la réponse immunitaire innée, les macrophages et surtout les neutrophiles s'activent rapidement suite à un contact direct avec les bactéries, avec le lipopolysaccharide bactérien ou avec l'alginate. La réponse immunitaire immédiate déclenche alors une accumulation importante de neutrophiles aux alentours de la structure du biofilm, associée à un épuisement accéléré d'oxygène dû à une stimulation active du métabolisme oxydatif où l'oxygène moléculaire est réduit en superoxyde. Les cellules phagocytaires pénètrent difficilement la matrice extracellulaire. Ralenties, elles

deviennent alors plus vulnérables à l'action inactivatrice d'enzymes bactériennes. Certains pathogènes comme *P. aeruginosa* vont également synthétiser des rhamnolipides, en réponse à l'attaque immunitaire. Ces puissants détergents, en causant une nécrose cellulaire et l'élimination concomitante des neutrophiles, agissent comme un réel bouclier face aux cellules de défense de l'hôte. De plus, la lyse prolongée des neutrophiles conduit au déversement de composés nocifs dans le milieu, responsables de lésions tissulaires consécutives. En effet, la réponse immunitaire de l'hôte est elle-même la cause principale de la dégradation des tissus sains, environnants de l'infection bactérienne (Figure 7).

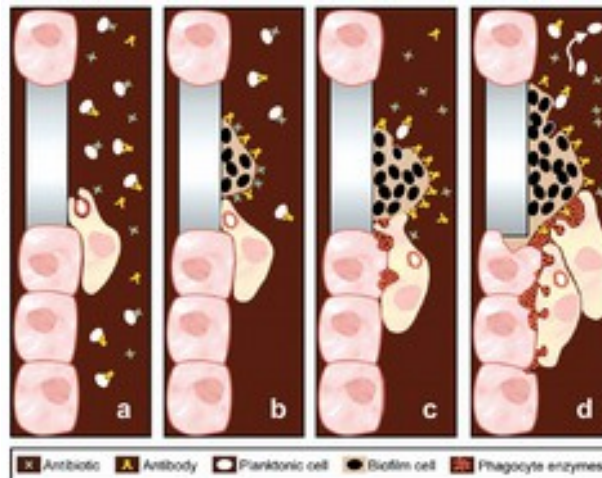


Figure 7. Caractéristiques cliniques d'une infection sur biofilm.

(A) Les bactéries planctoniques peuvent être éliminées par les anticorps et les phagocytes et sont sensibles aux antibiotiques. (B) Les cellules bactériennes adhérentes forment un biofilm préférentiellement sur une surface inerte. Cette communauté sessile est alors résistante aux anticorps, phagocytes et antibiotiques. (C) Les phagocytes sont attirés par le biofilm. La phagocytose est déjouée, mais les enzymes phagocytaires sont tout de même relâchées. (D) Les enzymes phagocytaires entraînent des dommages tissulaires autour du biofilm. Des bactéries planctoniques sont relarguées de ce dernier. Cette libération de cellules isolées peut entraîner la dissémination d'une infection aiguë aux tissus environnants. D'après (Costerton et al., 1999).

Concernant la réponse mémoire du système immunitaire, il a été reporté, chez des patients atteints de mucoviscidose, la sécrétion d'anticorps spécifiques contre les composants bactériens tels que l'élastase, le LPS ou encore le flagelle. Ces données indiquent donc que ces déterminants antigéniques ont vraisemblablement été neutralisés au cours de l'infection pulmonaire chronique. Malheureusement, il a été démontré là encore que ces anticorps qui participent à la formation de complexes immuns se précipitant dans le parenchyme conduisent à l'activation du complément et à l'opsonisation des neutrophiles, soit de manière indirecte, à la dégradation des tissus environnants (Jensen et al., 2010).

2.3.2. Tolérance générale aux antimicrobiens

La tolérance du biofilm aux agressions extérieures que peuvent constituer les antibiothérapies est une de ses particularités les plus remarquables. En effet, il est désormais largement reconnu que les

Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) d'antibiotiques, efficaces sur des bactéries sessiles, sont 10 à 1000 fois plus concentrées que celles qui le seraient sur leur version planctonique (Moskowitz et al., 2004). Cette tolérance engendre facilement un questionnement concernant le recours aux antibiotiques pour le traitement d'une infection sur biofilm. Cette diminution de la sensibilité aux antimicrobiens peut avoir plusieurs causes. Elle peut déjà être inhérente à l'organisation même du biofilm (structure, fonctionnement), mais également acquise par la transmission de facteurs de résistance (Davies, 2003). Comme pour les cellules du système immunitaire de l'hôte, la matrice extracellulaire formerait une barrière mécanique empêchant la diffusion des antibiotiques à l'intérieur du biofilm et donc leur accès aux micro-organismes. Les charges électrostatiques ou certains composants de la matrice peuvent également se lier à certains antimicrobiens et les y piéger. Ce retard de pénétration serait alors suffisant pour permettre une adaptation physiologique progressive des bactéries exposées aux antibiotiques (expression de gènes de résistance, sécrétion d'enzymes inactivatrices...). Il a par exemple été démontré que l'alginate et l'ADNe constituant la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* pouvaient se lier aux aminosides et ainsi jouer un rôle dans la tolérance des bactéries sessiles à la tobramycine (Hentzer et al., 2001).

De par l'organisation même du biofilm, le métabolisme des bactéries joue un rôle très important dans la résistance aux antibiotiques. En effet, les gradients d'oxygène et de nutriments présents au sein même du biofilm rendent certaines niches bactériennes peu actives métaboliquement, certaines d'entre elles se retrouvant même en phase stationnaire de croissance. Or, le mode d'action de la plupart des antibiotiques cible des processus métaboliques retrouvés chez des bactéries croissantes, comme la réplication, la transcription, la traduction ou la synthèse de la paroi cellulaire. Le métabolisme ralenti de certaines cellules sessiles et les conditions d'anaérobiose rendent alors les antimicrobiens moins actifs et sont probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée au biofilm. De nombreux travaux ont validé l'efficacité préférentielle des antibiotiques sur les bactéries métaboliquement actives, localisées dans les zones externes du biofilm. Pourtant, des études parallèles ont également montré que d'autres types de molécules comme le SDS, l'EDTA ou la chlorehexidine pouvaient, à l'inverse, agir sur les cellules en phase stationnaire de croissance, situées dans les niches internes (Ciofu et al., 2015).

L'activation de pompes à efflux, par les bactéries enchâssées dans la matrice extracellulaire, peut également contribuer à l'inefficacité des antibiotiques en les expulsant activement en dehors de la structure biofilm, avant qu'ils ne puissent atteindre leur cible. L'expression de certaines d'entre elles a même été démontrée comme pouvant être spécifique au mode de vie biofilm (Zhang & Mah, 2008).

La densité bactérienne et la proximité spatiale des microbes au sein d'un biofilm mature favorisent certainement les phénomènes de conjugaison et la transmission de plasmides de résistance. Le transfert horizontal de gènes pourrait être 1000 fois plus important au sein d'une communauté bactérienne qu'entre individus planctoniques. Finalement, l'augmentation du taux de mutations constatée au sein d'un biofilm

conduit également à une résistance chromosomique. La fréquence des mutations au sein de la population bactérienne sessile peut être directement stimulée par des facteurs environnementaux, comme la présence de dérivés réactifs de l’oxygène issus de la réponse inflammatoire pulmonaire. Ces réactifs, en endommageant l’ADN, provoquent des mutations chez les bactéries et conduisent ainsi à la génération de variants phénotypiques (Rodríguez-Rojas et al., 2012). Les concentrations subinhibitrices d’antibiotiques ont aussi démontré la capacité à induire l’émergence de mutants (Kohanski et al., 2010).

Par association de plusieurs de ces mécanismes, les bactéries au sein d’un biofilm peuvent rapidement devenir multirésistantes. De plus, il a également été démontré l’existence d’une population bactérienne dite “persistante” qui constituerait une réserve assurant la relance de l’infection après élimination des cellules planctoniques et sessiles périphériques.

2.3.3. L’énigme des « persister cells »

L’existence des “bacterial persisters” a été décrite pour la première fois dans les années 1940 (Bigger, 1944). Leur présence peut facilement être mise en évidence à partir de cultures bactériennes sessiles ou planctoniques (Klayman et al., 2008; Lewis, 2007). Ces cellules persistantes sont des variants phénotypiques issus d’une population bactérienne en croissance, capables de survivre à des doses létales d’antibiotiques et se maintenant dans un état de dormance (multiplication cellulaire stoppée). Peu nombreuses, elles représentent toujours moins de 1% des micro-organismes d’une communauté microbienne.

La présence des persisters peut être facilement détectée via un phénomène de mort biphasique chez une culture bactérienne exposée à des concentrations bactéricides d’antibiotiques. De manière caractéristique, une dose létale d’antibiotique est capable d’éradiquer rapidement le foyer sensible de la population microbienne. S’ensuit alors une seconde phase de cinétique de bactéricidie, beaucoup plus lente et reflétant la faible mort des cellules persistantes (Figure 8). Finalement, l’arrêt de l’antibiothérapie va permettre la régénérescence de la communauté bactérienne par réanimation des persisters survivants.

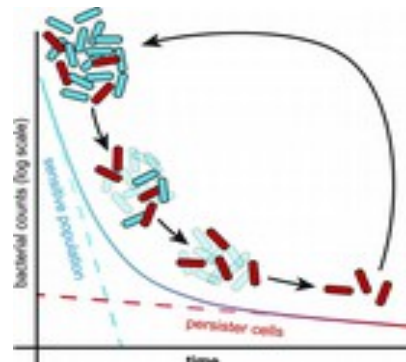


Figure 8. Cinétique de la mort biphasique d’une communauté bactérienne soumise à un traitement antibiotique bactéricide.

Issue de (Harms et al., 2016)

Initialement, chaque bactérie présente la capacité de se différencier en une cellule persistante, mais cette conversion phénotypique peut également être induite par des stimuli environnementaux, prédictifs de menaces immédiates pour la population bactérienne (Harms et al., 2016).

2.4. Épidémiologie et aspects cliniques des infections sur biofilms

2.4.1. Conséquences médicales

À l'heure actuelle, les infections associées à la présence de biofilms concernent la majorité des situations pathologiques affectant l'homme. Impliqués dans plus de 65% des infections bactériennes, les micro-organismes sessiles sont également les premiers responsables d'infections nosocomiales (Filloux & Vallet, 2003; Nathwani et al., 2014). Aux États-Unis, le National Institutes of Health estime même que 80% des infections microbiennes sont caractérisées par la présence de biofilms bactériens (Ammons, 2010). L'importance des infections biofilms dans le domaine médical est donc devenue capitale.

Les infections liées au biofilm sont généralement causées par des bactéries pathogènes ou opportunistes, le plus souvent dans un contexte de chronicité. En effet, même si les antibiothérapies administrées permettent la disparition transitoire des symptômes, en éradiquant les cellules planctoniques libérées en continu de la structure du biofilm, ce dernier persistera et constitue donc un réservoir bactérien à l'origine d'infections récidivantes.

Les infections sur biofilms partagent toutes les mêmes caractéristiques et plusieurs critères ont été proposés afin de les définir (Parsek & Singh, 2003). Dans un premier temps, les bactéries pathogènes doivent s'associer à une surface inerte (tissus morts ou vivants, instruments médicaux) et s'organiser en agrégats cellulaires enchâssés dans une matrice polysaccharidique. Leur croissance lente conduit au développement tardif de symptômes cliniques. L'infection initiale est ainsi confinée à un site précis et est résistante aux traitements antibiotiques, bien que les organismes planctoniques y soient sensibles. C'est pour cette raison que les biofilms induisent des symptômes récurrents, malgré des cycles d'antibiothérapies, et cela jusqu'à ce que la population sessile soit retirée chirurgicalement de l'organisme (Costerton et al., 1999).

Parmi les complications médicales liées au développement de biofilms bactériens, deux types d'infections peuvent être distinguées : les infections sur matériel implanté (prothèse, cathéter...) et les infections tissulaires chroniques (endocardites, infections urinaires, ORL, pulmonaires, plaies chroniques...) (Figure 9). (Høiby et al., 2015; Lebeaux & Ghigo, 2012).

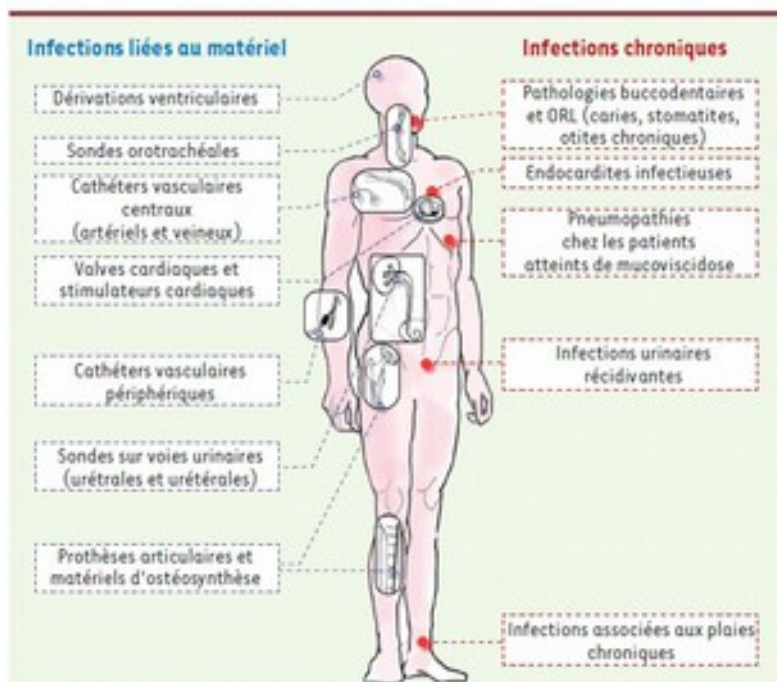


Figure 9. Principales infections liées aux biofilms bactériens.
D'après (Lebeaux & Ghigo, 2012)

2.4.2. Biofilms de *P. aeruginosa* dans les infections pulmonaires de mucoviscidose

En France, 2 millions de personnes sont porteuses saines du gène de la mucoviscidose et tous les 3 jours, un enfant naît atteint de la maladie ("Maladie génétique rare," 2014). Bien que multifactorielles, les atteintes de la maladie sont principalement respiratoires et digestives (Girodon-Boulandet & Costa, 2005). L'infection broncho-pulmonaire conditionne même le pronostic vital des patients. En effet, l'obstruction bronchique et les lésions pulmonaires associées à une infection bactérienne et à une inflammation représentent la cause majeure de mortalité (Boucher, 2004).

2.4.2.1. Épidémiologie

L'atteinte pulmonaire, qui se développe rapidement après la naissance, est liée à la production d'un mucus épais et abondant dans les voies respiratoires. Ce dernier, riche en nutriments et ralentissant la clairance mucociliaire, devient un environnement propice à la colonisation microbienne.

Les principaux pathogènes impliqués dans les infections pulmonaires mucoviscidosiques sont généralement *S. aureus* et *H. influenzae* dans la petite enfance. La primo-colonisation à *P. aeruginosa* intervient en moyenne entre 8 et 10 ans et perdurera jusqu'à la fin de vie des malades (Figure 10).

En effet, une fois présent dans les voies aériennes, le bacille pyocyanique est pratiquement impossible à éradiquer en raison de sa remarquable plasticité génomique, qui lui permet de s'adapter constamment à

l'environnement pulmonaire particulier lié à la mucoviscidose. Après une première colonisation par le pathogène, les patients seront sujets à des épisodes successifs de recolonisation jusqu'à l'établissement d'une infection chronique et persistante.

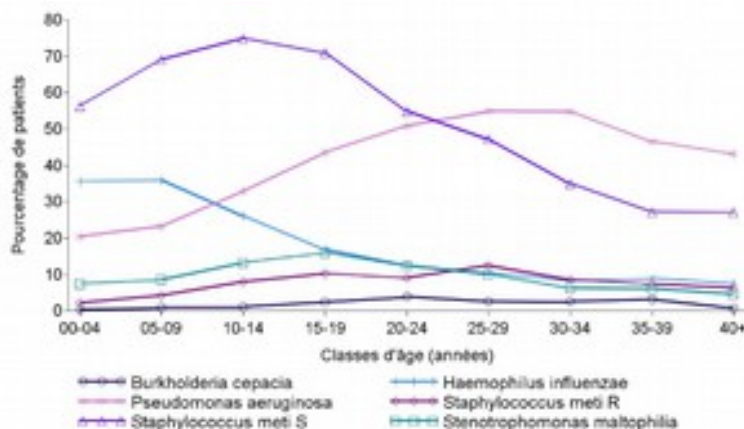


Figure 10. Pathogènes cliniquement importants dans l'évolution de la mucoviscidose (par classes d'âge).
Source *Registre français de la mucoviscidose 2014*.

Les infections respiratoires, se développant chez les patients mucoviscidosiques, peuvent en effet être classées en deux catégories cliniques distinctes (Parsek & Singh, 2003). Dans le premier type d'infections, les patients développent des infections respiratoires intermittentes, similaires à des bronchites, impliquant de nombreuses espèces bactériennes. Entre ces épisodes infectieux, les voies aériennes sont "stériles" et le patient ne présente généralement pas de symptôme respiratoire. La deuxième catégorie d'infections représente une colonisation pulmonaire permanente par *P. aeruginosa*. À son commencement, cette infection est similaire aux précédents épisodes infectieux. Elle persistera cependant tout le long de la vie du patient. Des études génétiques ont même montré que dans ce cas, une même souche pyocyanique pouvait persister dans les voies respiratoires du patient pendant des années voire des décennies. Le commencement d'une infection chronique est significatif d'un point de vue clinique. Elle coïncide avec le déclin de la fonction pulmonaire et l'augmentation des symptômes respiratoires. L'infection pulmonaire chronique par *P. aeruginosa* est la cause majeure de mortalité/morbidité chez les malades. Cette colonisation est presque inéluctable au cours de l'évolution de la pathologie puisque 95% des patients en insuffisance respiratoire terminale sont contaminés par le bacille pyocyanique. Parmi eux, 50% succomberont dans les 5 ans suivant le commencement de l'infection bactérienne chronique (Ciofu et al., 2015).

2.4.2.2. De la primo-colonisation à l'infection chronique

L'incidence de la colonisation chronique par *P. aeruginosa*, sur le pronostic vital des patients, conduit à la recherche trimestrielle systématique de la primo-colonisation par la bactérie, dans la population

mucoviscidose. L'objectif premier est alors de dépister le plus précocement possible la primo-infection afin de recourir à des traitements antibiotiques efficaces auxquels la bactérie est encore sensible.

En effet, un des facteurs principaux marquant la transition de la primo-colonisation à une infection permanente est probablement l'émergence du phénotype mucoïde de *P. aeruginosa*. La formation d'agrégats cellulaires, par les pathogènes, enchâssés dans une matrice extracellulaire dense et associée à une résistance accrue à l'encontre des traitements thérapeutiques conforte également l'idée d'un développement bactérien de type biofilm dans les voies aériennes supérieures. La faible proportion d'isolats mucoïdes retrouvés dans l'environnement et dans les autres pathologies suggèrent même que le contexte pulmonaire, propre à la mucoviscidose, sélectionne lui-même cette adaptation bactérienne (Parsek & Singh, 2003). De ce fait, le passage de *P. aeruginosa* d'un phénotype non mucoïde à une forme mucoïde est devenu la caractéristique principale de l'infection pulmonaire spécifique aux patients mucoviscidosiques.

Le switch des cellules bactériennes du phénotype planctonique à sessile s'accompagne d'un nombre de différenciations physiologiques et métaboliques complexes. L'analyse de l'expression génique globale des biofilms matures de *P. aeruginosa* a révélé que seulement 1% des gènes exprimés différaient entre la forme bactérienne isolée et sessile. Plus précisément, 0,5% des gènes étaient activés et 0,5% étaient réprimés (Southey-Pillig et al., 2005). La plupart du temps, les gènes codant pour la formation du flagelle ou des pilis bactériens sont réprimés et à l'inverse, les gènes régulateurs de réponses au stress sont hyperexprimés. De manière générale, l'expression génique peut varier au cours du développement du biofilm. Ceci semble indiquer qu'il existe un "modèle" d'expression des gènes, temporel, spatial et spécifique au phénotype des bactéries.

2.4.2.3. Impact sur la situation respiratoire

Worlitzsch *et al.* ont démontré que chez les sujets atteints de mucoviscidose, la région allant de la trachée aux bronchioles était recouverte de biofilms à *P. aeruginosa*. À l'inverse, peu de bactéries ont été retrouvées à la surface épithéliale des bronches. Plus précisément, ils ont suggéré que les bactéries, dans l'environnement pulmonaire, formaient des agrégats cellulaires directement dans le mucus, plutôt qu'à la surface de l'épithélium cellulaire (Worlitzsch et al., 2002). Cette théorie a cependant, depuis, été contestée (Moreau-Marquis et al., 2008).

Les bactéries sessiles, protégées de l'action des antibiotiques par la formation de microcolonies, vont également libérer des antigènes. Ces derniers réagissent avec des anticorps, présents en nombre dans le sang et les poumons, au niveau des couches supérieures de la matrice extracellulaire. Malheureusement, les complexes formés ne présentent ni d'effet bactéricide ni de capacité d'opsonisation. Au contraire, chez un patient mucoviscidosique, une concentration élevée en anticorps circulants conduit à des dommages

tissulaires par inflammation et est donc synonyme d'une détérioration de l'état clinique du malade.

Finalement, en raison d'altérations de l'environnement bronchique (variation du pH, disponibilité en oxygène et nutriments), des métastases bactériennes peuvent être relarguées du biofilm. Cette dissémination de cellules planctoniques apporte à *P. aeruginosa* une opportunité de nouvelles niches pulmonaires et donc, de perpétuer l'infection. Ces événements de dispersion sont généralement responsables des épisodes d'exacerbations pouvant avoir lieu au cours d'une infection chronique. Les antibiothérapies "classiques", actives sur ces bactéries temporairement isolées, peuvent permettre un soulagement des symptômes cliniques causés par l'infection aiguë, mais restent inefficaces sur les communautés bactériennes sessiles initiales.

2.4.2.4. Small-colony variants (SCV) et biofilms

La pression de sélection conditionnée par l'environnement pulmonaire spécifique à la mucoviscidose assure donc l'émergence de variants phénotypiques divers, avec une prédominance du morphotype mucoïde. Bien que ce dernier soit caractéristique des infections pulmonaires chroniques, rencontrées au cours de la mucoviscidose, il semble pouvoir coexister avec des phénotypes non mucoïdes (Bjarnsholt et al., 2009). Les phénotypes mucoïdes peuvent se reconvertir en une forme non mucoïde en absence de pression de sélection ou via des mutations secondaires. Cela suggère donc indirectement que la production d'alginate est coûteuse en énergie pour la bactérie et est une caractéristique instable. En ce sens, il a pu être observé, parmi des isolats de *P. aeruginosa* issus d'infections chroniques au cours de la mucoviscidose, une possible conversion des colonies bactériennes en SCV. La désignation de ce phénotype de "small-colony variants" provient de la petite taille des colonies, typiquement inférieure à 3mm, après 24-48h de croissance sur gélose nutritive. Les SCV sont généralement hyper-piliés, hyper-adhérents soit d'excellents producteurs de biofilms et expriment la capacité de s'autoagréger. De plus, les SCV présentent une résistance accrue aux antibiotiques, notamment aux aminosides. Ils sont couramment sélectionnés après des traitements antibiotiques prolongés. Ce phénotype caractéristique peut survenir après l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les polysaccharides *pel* et *psl* mais également suite à un taux élevé de di-GMPc intracellulaire, qui favorise alors la formation de biofilms (Sousa & Pereira, 2014).

3. PRISE EN CHARGE DES INFECTIONS ASSOCIÉES AUX BIOFILMS

3.1. Approches actuelles pour le traitement des biofilms

Le développement de nouvelles stratégies pour combattre les infections liées aux biofilms, devenu

essentiel, se révèle être, à l'heure d'aujourd'hui, un véritable défi pour les scientifiques et les cliniciens. Actuellement, les outils de diagnostic et les traitements disponibles ont pour l'essentiel, été développés pour leur efficacité sur des bactéries en phase planctonique de croissance. Ils se déclinent généralement en mesures préventives et curatives et s'appuient, pour la plupart, sur l'utilisation d'antibiotiques.

3.1.1. Mesures préventives

3.1.1.1. Hygiène

L'application de mesures d'hygiène drastiques n'est bien sûr pas spécifiquement une mesure anti-biofilm. En contexte chirurgical, elles contribuent cependant à limiter les risques de contamination du site opératoire et, par exemple, de la manipulation de dispositifs implantables (O'Grady et al., 2011). Des procédures d'isolement et d'hygiène permettent également, chez les patients mucoviscidiques, de prévenir l'établissement d'infections pulmonaires persistantes à *P. aeruginosa* en évitant les infections croisées avec des malades déjà infectés chroniquement (Reychler et al., 2006).

3.1.1.2. Thérapies anti-infectieuses agressives et précoces

L'intérêt d'avoir recours à une antibiothérapie agressive et précoce est de pouvoir cibler directement les cellules bactériennes planctoniques, encore sensibles aux antimicrobiens, avant l'initiation de leur changement phénotypique (passage en mode sessile). Utiliser des dispositifs médicaux constitués de polymères hydrophiles ou imprégnés d'antibactériens, qui assurent alors une libération locale au niveau du site à risque de colonisation, d'une concentration élevée d'agents antimicrobiens, permet de prévenir l'adhésion des micro-organismes (Francolini & Donelli, 2010).

Pour les porteurs de cathéters de longue durée ayant présenté de multiples complications infectieuses, il est préconisé l'utilisation de verrous préventifs afin de limiter l'adhérence bactérienne. L'utilisation de verrous d'antibiotiques ou d'éthanol repose alors sur l'injection et le maintien d'un volume restreint d'antibiotiques concentrés (ou d'éthanol), entre 12 et 24h, dans la lumière d'un cathéter (O'Grady et al., 2011).

Finalement, les cations métalliques comme le magnésium, le calcium ou le fer, qui sont des éléments essentiels à la croissance des bactéries et au maintien de la stabilité de la matrice extracellulaire du biofilm, se révèlent être des cibles potentielles pour la mise en place de traitements préventifs contre les biofilms. Il a en effet été proposé dans ce sens d'avoir recours à des verrous composés de chélateurs de ces métaux (EDTA, citrate, lactoferrine) afin d'inhiber la croissance des bactéries, prévenir leur adhésion voire même participer à la destruction d'un biofilm mature, si le chélateur est combiné à une molécule antimicrobienne (Banin et al., 2006).

3.1.2. Mesures curatives

3.1.2.1. Destruction mécanique

La destruction mécanique du biofilm reste encore l'un des moyens les plus efficaces pour s'en débarrasser. Grâce à la création de forces de cisaillement, les bactéries se détachent de leur support et sont éliminées. Le nettoyage doit toujours être combiné à l'utilisation d'antibiotiques afin de détruire les potentielles cellules adhérentes restantes. Le traitement des infections liées à des dispositifs médicaux implantés reste cependant difficile et nécessite la plupart du temps de retirer entièrement le matériel afin de réduire le risque de récurrence infectieuse (Zimmerli & Moser, 2012).

3.1.2.2. Verrous curatifs

Basé sur le même principe que le verrou préventif, le verrou curatif repose sur un contact prolongé de l'antibiotique concentré, dans la lumière du cathéter, afin d'essayer d'éradiquer l'origine de l'infection. L'objectif premier est alors d'éviter de retirer le dispositif implantable. Son utilisation est restreinte aux infections sur cathéters longue durée impliquant des pathogènes comme le staphylocoque à coagulase négative et en l'absence de complications. En respectant ces critères, il permet alors un succès thérapeutique, avec conservation du cathéter en place, de l'ordre de 80% (Mermel et al., 2009).

3.1.3. Nouvelles approches anti-biofilm

La recherche croissante de la compréhension des mécanismes de fonctionnement du biofilm bactérien a permis de dégager plusieurs axes exploitables pour la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une des premières approches envisagées est la dispersion des bactéries adhérentes dans le but de restaurer leur sensibilité à l'action des antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte. Pour cela, il peut être envisagé d'empêcher la formation du biofilm en inhibant l'adhésion précoce des micro-organismes ou d'interférer avec les signaux du QS émis par les bactéries afin de leur donner un faux signal de dispersion. Ces stratégies doivent alors être associées à une antibiothérapie efficace afin d'éviter l'effet délétère de la libération de cellules planctoniques dans l'organisme.

3.1.3.1. Inhibition de l'adhésion initiale des bactéries

L'objectif de cette approche est d'inhiber l'adhérence initiale des bactéries en les maintenant dans un état isolé et sensible aux antimicrobiens. Des enzymes comme la DNase I ou l'alginate lyase, capables de dissocier les polymères composant la matrice extracellulaire du biofilm, révèlent ainsi une forte activité anti-biofilm (Alkawash et al., 2006; Eckhart et al., 2007). La thérapie phagique, impliquant l'utilisation de bactériophages recombinés, semble également être une stratégie prometteuse pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*. En participant à la dégradation des exopolysaccharides bactériens via la synthèse d'enzymes de dégradation ciblant la matrice extracellulaire, les bactériophages, combinés à des

antibiotiques, assureraient la progression des molécules antimicrobiennes vers l'intérieur du biofilm (Sharma et al., 2014).

3.1.3.2. Inhibition du QS

L'utilisation de molécules interférant avec le mécanisme de QS est une stratégie thérapeutique encourageante pour contrer l'adaptation microbienne dans l'organisme et le développement sous-jacent d'épisodes infectieux (Bjarnsholt & Givskov, 2008). Dans cette approche, il s'agit d'interférer dans la communication inter-bactérienne afin d'empêcher la mise en place et la maturation du biofilm. Il a déjà été démontré que l'utilisation d'analogues structuraux des homosérines lactones, dont les furanones, brouillait les communications régies par le QS et réduisait la formation de biofilm par *P. aeruginosa* (Morten Hentzer & Givskov, 2003). Certains antibiotiques, comme l'azithromycine, semblent également capables d'altérer les signaux de communication de la bactérie, bien qu'il n'a initialement qu'une faible activité bactéricide contre le bacille pyocyanique. La conséquence directe de cette perturbation de mécanisme de QS par l'antibiotique est une amélioration du tableau clinique chez les patients mucoviscidosiques (Hoffmann et al., 2007; Saiman et al., 2003).

3.2. Limites de l'antibiogramme classique dans les infections liées aux biofilms

Actuellement, les thérapies anti-infectieuses et les outils de diagnostic ont, pour l'essentiel, été développés pour leur efficacité sur des micro-organismes en phase planctonique de croissance.

Pour réaliser un antibiogramme en routine, le laboratoire de bactériologie dispose d'une variété de méthodes (diffusion en gélose, microdilution, bandelettes à gradient de concentrations). Le choix entre les techniques manuelles et les méthodes dites automatisées se fait en fonction de critères comme le nombre d'antibiogrammes à réaliser, l'espèce à étudier, le délai de réponse attendu ou le coût d'investissement.

DIFFUSION EN MILIEU GÉLOSÉ : Une pastille de papier buvard contenant l'antibiotique est déposée à la surface d'une gélose après l'ensemencement en nappe de la souche bactérienne à tester. En quelques secondes, l'antibiotique va diffuser vers le fond de la gélose, mais également de façon uniforme autour du disque. Cette double diffusion crée ainsi un gradient de concentration homogène décroissant du bord de la pastille aux extrémités de la gélose. Les bactéries vont croître autour du disque en formant un halo d'inhibition de la croissance à l'endroit où la concentration du gradient dans la gélose correspond à la CMI de l'antibiotique (Jehl & Twizeyimana, 2015). Le paramètre mesurable de la technique par diffusion est donc le diamètre du halo d'inhibition. Il sera alors comparé aux diamètres critiques estimés de l'antibiotique afin d'obtenir la catégorisation clinique de la souche bactérienne.

MÉTHODE DE DILUTION : Les méthodes de dilution peuvent se réaliser en milieu liquide ou en milieu solide. Le principe sera alors le même et consistera à mettre l'inoculum bactérien standardisé au

contact de concentrations d'antibiotiques en série de raison 2. En milieu liquide, la préparation bactérienne est distribuée soit dans une série de tubes (macrodilution) soit dans les puits d'une microplaque (microdilution) contenant l'antibiotique. Après croissance des micro-organismes, la CMI peut être estimée par observation du "trouble" des cultures bactériennes : le tube ou la cupule ne présentant aucune croissance bactérienne visible correspond à la CMI de l'antibiotique. En milieu solide, l'antibiotique est cette fois incorporé directement dans les géloses, à différentes concentrations (coulées manuellement en boîtes de Pétri). L'inoculum bactérien est ensuiteensemencé à la surface des géloses. La CMI de l'antibiotique sera déterminée par l'inhibition de la croissance bactérienne sur la gélose contenant la plus faible concentration de la molécule.

BANDELETTES A GRADIENT DE CONCENTRATIONS : Introduite dans les années 1990, la bandelette à gradient de concentrations est une procédure de diffusion en milieu gélosé permettant la lecture directe de la CMI d'un antibiotique. Techniquement, le principe du test est identique à celui de la méthode par diffusion utilisant des disques, sauf que l'antibiotique est, cette fois-ci, contenu dans une bandelette. Après ensemencement en nappe de la souche bactérienne sur une gélose, la bandelette y est déposée à la surface et l'antibiotique va alors se répartir selon un gradient exponentiel de concentrations. Après la croissance des micro-organismes, une ellipse d'inhibition de culture se dessine autour de la bandelette et la valeur de la CMI de l'antibiotique peut être directement lue à l'intersection de la culture bactérienne et de la bandelette (Jolyguillou, 2006).

ANTIBIOGRAMME AUTOMATISÉ : L'avantage des systèmes automatisés est l'association de l'instrument à une base de données experte (Quentin-Noury, 2016). Le principe d'interprétation des résultats par le système peut différer en fonction de la génération de l'appareil. Les "anciens" systèmes fonctionnent sur le principe que l'acquisition d'un mécanisme de résistance se traduit par un phénotype bactérien particulier. Ceux de dernière génération incluent dans leur base de données la distribution des CMI des antibiotiques selon les mécanismes de résistance rencontrés, pour chaque espèce bactérienne. Les CMI mesurées ou extrapolées pour l'échantillon analysé sont alors comparées à ceux de la base de données. Si le profil de la souche bactérienne est superposable à l'un des profils en mémoire, le résultat est validé biologiquement et le mécanisme de résistance peut être identifié. Sinon, les résultats sont donnés en catégorisation clinique.

L'ensemble de ces méthodologies évaluant l'efficacité des antibiotiques *in vitro* sur des organismes planctoniques ne permettent pas de prédire le succès d'une antibiothérapie en cas d'infection associée au biofilm. Le développement de nouveaux outils et de nouvelles approches pour la prévention, le traitement et le diagnostic des bactéries pathogènes sessiles est donc devenu urgent pour la prise en charge des infections sur biofilms, toujours plus nombreuses (Macià et al., 2014). L'objectif étant que l'efficacité des

biocides soit évaluée contre des bactéries adhérentes et non plus uniquement contre des cellules planctoniques, afin de mieux orienter le choix des antibiothérapies et donc, d'améliorer les résultats cliniques dans le traitement des infections sur biofilms

3.3. Modèles de laboratoire pour l'étude des biofilms bactériens

L'incidence clinique significative des biofilms bactériens en pathologie humaine a nécessairement conduit au développement de nouvelles méthodologies, permettant leur analyse en laboratoire de recherche. À l'heure actuelle, de nombreux systèmes sont disponibles (Tableau 1).

Tableau 1. Modèles pour la culture de biofilms bactériens

Tableau traduit et reproduit d'après (Azeredo et al., 2016)

Outil/Méthode	Application	Avantages	Inconvénients
Marquage en microplaque(s)	Évaluation de la capacité des bactéries à former un biofilm Test de composés anti-biofilm	Méthode « haut-débit » Peu coûteuse Nécessite uniquement un lecteur de plaques Imagerie non-invasive si utilisation de microplaques spécifiques	Étapes de lavages répétées (perte potentielle d'une portion du biofilm faiblement adhérent = mesure incorrecte) Sensible à la sédimentation Mesure en point final Inspection directe difficile Applicable uniquement pour des tests de courtes durées Possible interférence avec la pellicule air-liquide Faible reproductibilité Résultats opérateur- et laboratoire-dépendants Évaluation possible seulement à partir d'une biomasse bactérienne suffisante Non-applicable pour l'investigation des étapes précoces de la formation de biofilm
« Calgary device »	Évaluation de la capacité des bactéries à former un biofilm Test des Concentrations Minimales d'Inhibition du biofilm (antibiotiques)	Méthode « haut-débit » Possibilité de faire varier les conditions de culture Moins sensible à la sédimentation Nécessite uniquement un lecteur de plaques	Chaque changement de milieu nécessite que les « picots » du couvercle traversent l'interface air-liquide Étapes de lavages (perte potentielle d'une portion du biofilm faiblement adhérent = mesure incorrecte) Inspection directe difficile Mesure en point final Collecte individuelle difficile des « picots » pour les numérations Sonication peut ne pas détacher toutes les cellules Applicable uniquement pour des tests de courtes durées Non-applicable pour l'investigation des étapes précoces de la formation de biofilm Relativement coûteux
Biofilm Ring Test®	Évaluation de la capacité des bactéries à former un biofilm Test de molécules anti-biofilm Antibiofilmogramme®	Méthode « haut-débit » rapide Prise en main facile (pas de lavage ni d'étapes de fixation ou de marquage) Développé pour l'étude des étapes précoces de la formation de biofilm Reproductibilité élevée	Nécessite un support aimanté et un scanner spécifiques Non prévu pour l'étude des étapes tardives de la formation de biofilm Non adapté aux biofilms développés à l'interface air-liquide Possible restriction due au milieu de croissance (certains milieux peuvent spontanément bloquer la migration des microbilles)
« Robbins Device »	Étude des surfaces de développement du biofilm Convient à des tests « de flux en ligne »	Peut fonctionner durant de longues périodes sans intervention Extraction ou échange des coupons de substrats possible pendant le test	Méthode « faible débit » Coûteux Nécessite des pompes et des systèmes en flux Ne permet pas d'inspection <i>in situ</i> des biofilms Connaissances des flux dynamiques nécessaires pour la prise en main de la méthode

« Drip Flow Biofilm Reactor »	Visualisation et quantification de la formation de biofilm sur des coupons à de faibles forces de cisaillement	Compatible avec des coupons de géométrie variable	Développement hétérogène du biofilm sur les coupons
« Rotary Biofilm Devices »	Évaluation de l'effet du matériel et des forces de cisaillement sur le développement du biofilm	Comparaison d'une variété de matériaux dans des conditions hydrodynamiques et de nutrition similaires Forces de cisaillement constantes Définition indépendante des forces de cisaillement et débit du flux d'alimentation Application possible de forces de cisaillement élevées	Analyse d'un faible nombre de souches bactériennes Géométrie du coupon fixe (déterminée par le design du réacteur) Coûteux
Chambre(s) en flux	Convient au développement du biofilm avec un apport continu de milieu de culture « frais » Peut être utilisée pour l'étude de la croissance et de la réponse au stress du biofilm bactérien en condition de flux continu Application peut refléter des conditions en flux naturelles (organisme, environnement)	Permet une observation directe et non-invasive du biofilm Optimisée pour de la microscopie en ligne <i>in situ</i> Peut être conçue avec du verre ou d'autres substrats	Méthode « faible débit » Ne permet pas un accès direct aux cellules sessiles Nécessite des pompes péristaltiques et un équipement spécifique
« Microfluidics »	Objectifs fins spéciaux et spécifiques (reflet de l'interface air-liquide, apport de mélange <i>in situ</i> de réactifs, utilisation d'appareils de mesures customisés...)	Versatile Compatible avec l'analyse de cellules individuelles	Nécessite un équipement particulier pour l'application du système Peut être coûteux Protocole pouvant être fastidieux à appliquer Encrassement possible du système en raison de sa petite dimension

Les méthodes en flux continu (Flow Cell, Drip Flow Reactor, Microfluidics...) sont de petites chambres dans lesquelles des bactéries sessiles peuvent croître sous forme de biofilm à l'interface solide-liquide, en présence d'une force de cisaillement et d'un apport continu en éléments nutritifs. Elles sont couramment utilisées en laboratoire de recherche pour l'étude de la croissance des biofilms bactériens. Présentant de nombreux avantages (croissance bactérienne à forte densité, production de biomasse significative, conditions de culture continues...), de tels systèmes ne permettent cependant pas l'étude simultanée de plusieurs échantillons bactériens et impliquent l'utilisation de volumes importants de milieux de culture (risque de contaminations ou de fuites).

L'étude des biofilms, en système statique utilisant un support standard comme la microplaque 96 puits, peut dans certains cas être préférable à ces méthodes en flux continu. Développés initialement pour l'étude de l'adhésion bactérienne, les systèmes de culture statique peuvent, de manière plus approfondie, être appliqués à l'analyse du développement de micro-organismes sessiles (Merritt et al., 2011). Cependant, la plupart de ces méthodologies sont restreintes à un usage en recherche fondamentale et ne peuvent être

adaptées à une utilisation de diagnostic en routine hospitalière. En effet, l'évaluation de l'efficacité de molécules anti-biofilm nécessite une procédure standardisée, peu coûteuse et reproductible. Deux technologies, récemment industrialisées, semblent pouvoir répondre à ces différents critères :

CALGARY DEVICE : À l'origine décrite par Ceri *et al.*, cette technologie est la première à avoir été standardisée pour une évaluation rapide et reproductible de la sensibilité des bactéries sessiles aux antibiotiques (Ceri *et al.*, 1999). Elle a, depuis, été commercialisée par Innovotech sous le nom de « MBEC assay » (MBEC pour Minimal Biofilm Eradication Concentration). Cette méthode de culture statique permet la formation de biofilms matures sur les « picots » d'un couvercle de plaque 96 puits. Ce dernier est ensuite placé sur ladite microplaque contenant différentes concentrations d'antimicrobiens. Après un temps de contact suffisant, les cellules adhérentes sont récupérées par sonication. Les concentrations d'éradication du biofilm peuvent alors être déterminées qualitativement par la mesure de la densité optique des puits, ou quantitativement par la réalisation de numérations bactériennes (Harrison *et al.*, 2010). Malgré son développement récent, certaines limites concernant son application ont déjà pu être mises en évidence. L'inconvénient majeur concerne la sonication appliquée pour le détachement de la communauté sessile. Plusieurs études ont démontré que seule une portion de la population adhérente était récupérée au cours de cette étape (Edmonds *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2011). De la même façon, les propriétés physiologiques des cellules bactériennes détachées peuvent ne pas refléter le comportement de la population sessile globale (Grand *et al.*, 2011). Finalement, Yau *et al.* ont comparé l'incidence de l'antibiothérapie sélectionnée sur la base du « MBEC assay » et de la technique standard de microdilution en milieu liquide, sur la réponse microbiologique et clinique de patients mucoviscidosiques présentant une exacerbation pulmonaire (Yau *et al.*, 2015). Les résultats obtenus démontrent alors que la technologie d'Innovotech ne permet pas la sélection de molécules plus efficaces sur l'issue clinique, que celle apportée par l'antibiogramme classique.

BIOFILM RING TEST® (BRT) : Cet outil est destiné spécifiquement à l'investigation des étapes précoces de développement du biofilm. Basée sur la capacité des micro-organismes à immobiliser des microbilles paramagnétiques lors de la mise en place d'un biofilm, cette technique permet d'évaluer l'aptitude des cellules bactériennes à initier la formation d'un biofilm. Comme pour le Calgary device, le BRT a été, à l'origine, développé pour le test rapide de la sensibilité d'isolats cliniques sessiles aux antibiotiques, grâce au criblage en haut débit de molécules anti-biofilm. Ces tests, qualifiés d'Antibiofilmogrammes®, fournissent alors des données complémentaires et bien souvent plus pertinentes d'un point de vue clinique, qu'un antibiogramme standard.

L'application d'Antibiofilmogrammes® constituant la base du projet de recherche développé au cours de

cette thèse, cette technologie sera présentée plus en détail dans les prochains chapitres du manuscrit.

4. LA MUCOVISCIDOSE

4.1. Description historique: de la fibrose kystique du pancréas à la mucoviscidose

Dès le Moyen Âge, un dicton populaire proclamait qu'un enfant, dont le goût du baiser sur le front était salé, était ensorcelé et mourrait avant la fin de l'année. Cette prédiction, fatalement vraie, diagnostiquait sans le savoir la mucoviscidose. Ce ne fut qu'en 1936 que la première description rigoureuse de la maladie fut publiée par le pédiatre suisse Fanconi sous le nom de "Zystische Pankreasfibromatose mit Bronchiektasien". Deux ans plus tard, la pédiatre américaine Andersen proposa le terme de "Cystic Fibrosis of the pancreas". En effet, les premières observations cliniques des malades montraient une fibrose caractéristique du pancréas ("Histoire: de fibrose kystique du pancréas à mucoviscidose" 2010).

Le terme de *mucoviscidosis*, voulant littéralement dire "mucus visqueux", fut utilisé pour la première fois en 1943 par le docteur Farber suite à la découverte d'anomalies respiratoires et d'une diffusion généralisée de mucus visqueux chez les patients (Farber, 1943). Le terme de mucoviscidose reste de nos jours très employé dans le monde, particulièrement en France; les Anglo-saxons ayant conservé le nom de cystic fibrosis. La mesure d'une concentration anormale en chlore dans la sueur de bébés mucoviscidosiques hospitalisés suite à une vague de chaleur en 1948 permit la mise au point des tests de la sueur, outils de diagnostic toujours utilisés à l'heure actuelle (Kessler & Andersen, 1951). Finalement, l'anomalie génétique associée à la maladie fut identifiée en 1989 comme une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989). Ce n'est qu'un peu plus tard que la protéine associée fut caractérisée comme un canal chlore.

4.2. Épidémiologie de la maladie

La mucoviscidose est la maladie génétique héréditaire grave la plus fréquente de la population caucasienne. Après avoir longtemps été évaluée à 1 cas pour 2 500 naissances en Europe et en Amérique du Nord, la mise en place du dépistage néonatal systématique de la maladie a permis la réévaluation de son incidence, enregistrée désormais à environ un enfant sur 3 500.

La mucoviscidose est présente dans toutes les populations du globe, mais à des prévalences variables. Sur le territoire français, il existe des variations de fréquence à la naissance inter-régionales allant de 1 nouveau-né sur 2 500 dans le nord-ouest à 1/10 000 dans le sud-est (Figure 11).

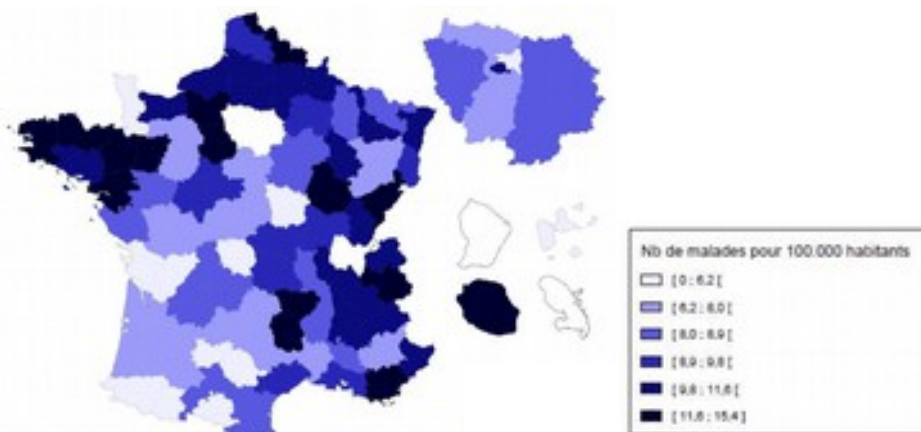


Figure 11. Prévalence de la mucoviscidose par département français.

Nombre de patients pour 100 000 habitants. Source *Registre français de la mucoviscidose 2014*.

La mucoviscidose étant une pathologie génétique à mode de transmission autosomique récessif, seuls les individus homozygotes pour la mutation CFTR ou hétérozygotes composites (porteur de deux mutations différentes du gène CFTR) déclarent la maladie. La fréquence des porteurs sains d'une mutation CFTR est d'environ 1/25 soit 4% de la population occidentale globale. En France, il est estimé que 2 millions de personnes sont porteurs hétérozygotes d'une mutation affectant le gène CFTR. Le sexe ratio est proche de 1, ce qui signifie que les hommes et les femmes sont atteints à la même fréquence par la maladie. Cependant, l'implication des hormones féminines conduirait à une atteinte plus sévère chez les femmes (Harness-Brumley et al., 2014; Saint-Criq & Harvey, 2014).

Les données collectées en 2014 par le Registre français de la Mucoviscidose ont montré que cette année là, pour la deuxième fois consécutive, le nombre de patients adultes dépassait le nombre d'enfants malades. Ces éléments présument d'un tournant important dans l'évolution de la pathologie avec la stabilisation de l'effectif pédiatrique et, à l'inverse, un accroissement de la population adulte. Les progrès de la prise en charge des patients ainsi que les avancées thérapeutiques ont permis une progression continue de l'espérance de vie à la naissance, qui dépasse aujourd'hui 50 ans (Bellis et al., 2016).

4.3. Physiopathologie et génétique de la mucoviscidose

4.3.1. Du gène à la protéine CFTR

Le gène responsable de la mucoviscidose est constitué d'environ 250 000 paires de bases réparties en 27 exons et codant un ARNm de 6,5 kb. Il code pour la synthèse d'une protéine de 1 480 acides aminés, dénommée CFTR, dont la fonction de canal ionique est essentielle à l'organisme.

La protéine CFTR est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des transporteurs ABC (pour ATP Binding Cassette). La fonction première de ce type de molécule est le transport d'une variété

considérable de substrats. Initialement, elle s'exprime, à un taux basal, au pôle apical de très nombreuses cellules épithéliales de l'organisme (canaux pancréatiques, biliaires, de l'arbre trachéobronchique, des tubules rénaux, de l'appareil génital, des glandes sudoripares...) (Girodon-Boulandet & Costa, 2005).

D'un point de vue structural, elle se compose de deux parties symétriques, composées de six domaines transmembranaires hydrophobes et de deux domaines transcellulaires hydrophiles de liaison à l'adénosine tri-phosphate (ATP), appelés Nucleotide Binding Fold (NBF). Un domaine intracellulaire régulateur riche en sites de phosphorylation, appelé domaine R, assure la liaison entre ces différentes structures (Figure 12). L'ensemble de ces domaines protéiques s'assemble alors pour former un canal ionique transmembranaire ATP-dépendant.

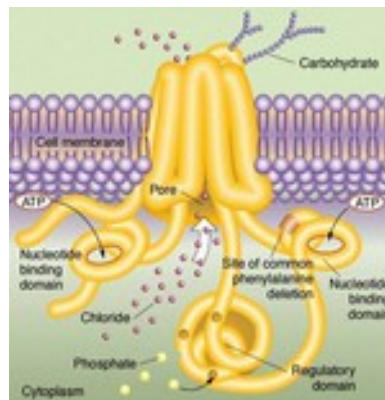


Figure 12. Structure du canal CFTR.

Source <http://massgenomics.org/2011/02/a-promising-new-drug-for-cystic-fibrosis.html>

Les fonctions de la protéine CFTR sont multiples. À l'origine, elle assure la régulation des flux hydro-ioniques transmembranaires. Sa structure de canal chlorure conduit à une sortie équilibrée d'ions Cl^- hors de la cellule épithéliale, selon un gradient électrochimique. Elle est également capable d'interagir avec d'autres canaux ioniques, notamment les canaux sodiques EnaC (Epithelial sodium Channel). Les flux ioniques de chlore cellulaire, régulés par l'intermédiaire de ces différents canaux, vont moduler par osmose le transfert d'eau entre les cellules et le milieu extracellulaire. Cette distribution contrôlée et équilibrée d'eau contribue essentiellement à la régulation de l'hydratation du liquide de surface, qui recouvre et protège les épithéliums respiratoires et digestifs.

La lumière des voies aériennes est en effet tapissée de fluide de surface bronchique. Ce film protecteur se compose d'une couche hydrique (liquide de surface), au contact direct des cellules épithéliales, et d'une couche muqueuse plus épaisse. Le liquide de surface participe activement à la clairance mucociliaire car, en permettant le battement des cils des cellules épithéliales, il contribue à la remontée du mucus, ayant piégé des poussières inhalées, le long des voies aériennes. Ces particules peuvent ensuite être expectorées ou dégluties lors de leur arrivée dans l'oropharynx. L'homéostasie hydrique de ce film de surface

bronchique dépend de la qualité de la sécrétion hydro-électrolytique des cellules épithéliales, régie essentiellement par le transfert des ions chlorures (Sermet-Gaudelus et al., 2002). Chez un patient mucoviscidosique, chez qui le canal CFTR est défectueux, la rétention intracellulaire des ions, empêchant la sortie passive d'eau, entraîne alors la réduction du liquide de surface bronchique qui augmente la viscosité des sécrétions. Ce phénomène diminue la clairance mucociliaire et donc la stase du mucus pulmonaire, créant ainsi un environnement favorable au développement d'agents infectieux.

Au niveau des glandes sudoripares, la sécrétion des ions se fait en sens inverse, soit de la lumière vers la cellule. Un défaut des protéines CFTR se traduit donc par le maintien d'une sécrétion sudorale riche en chlorure de sodium et en eau, d'où la sueur "salée" des malades.

4.3.2. Pathologie moléculaire

Aujourd'hui, plus de 2 000 mutations et polymorphismes du gène CFTR ont été répertoriés au sein de la "Cystic Fibrosis Mutation Database" (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). Ce consortium international de généticiens a été créé dès la découverte du gène CFTR, en 1989, afin d'améliorer et faciliter la communication entre les chercheurs dans le domaine de la mucoviscidose.

Tous les types de mutations existantes ont pu être retrouvés dans le cadre de l'expression de la maladie : mutations non-sens, altérant l'épissage, micro-insertions et micro-délétions décalant le cadre de lecture, faux-sens ou remaniements de grande taille (délétions, insertions, duplication). La mutation $\Delta F508$, qui se traduit par la perte d'un résidu phénylalanine en position 508 de la protéine, est la mutation la plus fréquente, particulièrement au sein de la population française. Globalement, elle se retrouve chez 67% des patients mucoviscidosiques.

4.4. Diagnostic et dépistage

4.4.1. Test de la sueur

Le test de la sueur fut, jusqu'à la découverte du gène CFTR, l'examen clé pour le diagnostic de la mucoviscidose. Son principe consiste à mesurer les concentrations en ions chlore et sodium dans la sueur du patient. Il se décompose alors toujours en trois étapes : la stimulation de la sudation par ionophorèse, son recueil et le dosage des électrolytes (Farrell et al., 2017).

4.4.2. Dépistage néonatal

En France, le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose est instauré depuis 2002. Il repose sur la mesure de la trypsine immunoréactive (TIR) dans le sang du nourrisson, prélevé au troisième jour de vie (Haute Autorité de Santé, 2009). La TIR est une enzyme pancréatique impliquée dans la digestion des protéines, initialement acheminée du pancréas à l'intestin grêle. Or, chez un patient mucoviscidosique, l'obstruction des canaux pancréatiques par des bouchons muqueux, empêche la proenzyme d'atteindre

l'intestin. Elle est alors relarguée dans le sang, expliquant ainsi l'augmentation de sa concentration sérique.

En 2009, la Haute Autorité de Santé (HAS) a suggéré d'associer au dosage de la TIR, le dosage de la Pancreatitis-Associated Protein (PAP). En effet, la PAP est une enzyme normalement absente du suc pancréatique et dont la sécrétion devient majoritaire en cas d'atteinte du pancréas. Sa concentration sérique est donc spontanément élevée, dès la naissance, chez les jeunes patients mucoviscidosiques. Le couplage du dosage TIR/PAP représente alors une alternative de dépistage intéressante, car il éviterait les inconvénients multiples des analyses en biologie moléculaire pour un moindre coût et une plus grande facilité de mise en pratique (Haute Autorité de Santé, 2015).

4.4.3. Génétique

Le diagnostic génétique de la mucoviscidose assure la détermination du génotype du patient par recherche des mutations les plus fréquentes du gène *cftr*.

4.4.4. Dépistage prénatal

Le diagnostic prénatal s'adresse aux couples "à risque", soit des futurs parents étant apparentés proches avec un individu déjà atteint de la maladie. Un des tests proposés consiste en une biopsie, effectuée pendant la grossesse, permettant l'établissement du caryotype du fœtus, à l'aide des marqueurs ADN du gène *cftr* muté, pouvant être porté par les parents. Un dosage des enzymes digestives dans le liquide amniotique, prélevé par amniocentèse à la 18^{ème} semaine d'aménorrhée, peut également être conseillé (taux anormalement bas en cas de mucoviscidose révélée).

4.5. Manifestations cliniques

Dans sa forme typique, la mucoviscidose associe des atteintes respiratoires, quasi constantes et précoces, une insuffisance pancréatique externe et un retard de croissance. L'infertilité masculine, par l'absence de canaux déférents, est systématique. Chez les femmes, il existe également une hypofertilité en raison d'un épaissement de la glaire cervicale. L'âge d'apparition des premiers troubles est variable, mais 80% des symptômes se manifestent avant 6 mois. Les premiers signes sont généralement digestifs et/ou pancréatiques chez le nourrisson, puis les atteintes respiratoires évolueront au cours de l'enfance et conditionneront le pronostic.

4.5.1. Manifestations respiratoires

L'atteinte respiratoire conditionne systématiquement le pronostic de la maladie, puisqu'elle est responsable de 90% des décès chez les patients mucoviscidosiques (Hubert, 2005). L'altération des canaux ioniques CFTR, au niveau de l'arbre bronchique, génère plus ou moins directement une

modification de la composition des sécrétions pulmonaires, associée à une inflammation bronchique précoce. La bronchopathie chronique obstructive résultante conduit alors au développement d'une insuffisance respiratoire mortelle.

4.5.1.1. Physiopathologie respiratoire

Dans un poumon sain, les particules inhalées, microbiennes ou autres, se déposent et restent piégées dans la couche muqueuse du fluide de surface bronchique. Grâce au mouvement des cils des cellules épithéliales sous-jacentes, rendu possible par la phase hydrique du liquide de surface, le mucus remonte le long des voies aériennes et est ensuite expectoré ou dégluti lors de son arrivée dans l'oropharynx (épuration mucociliaire des particules étrangères). Chez les patients mucoviscidosiques, le dysfonctionnement des canaux CFTR conduit, au niveau cellulaire, à des troubles hydro-électrolytiques. Concrètement, le liquide de surface des voies aériennes est déshydraté et le volume de la couche hydrique diminue. Elle devient alors visqueuse, perd en élasticité et les cils cellulaires s'affaissent. La clairance mucociliaire est diminuée, entraînant une adhérence et une stase du mucus au niveau des cellules épithéliales (Haq et al., 2016). De plus, en dépit de cette accumulation, les cellules caliciformes et les cellules des glandes submucosales continuent à sécréter du mucus, qui vient s'ajouter au mucus déjà stagnant à la surface cellulaire. Des plaques et des bouchons muqueux se forment ainsi dans les voies aériennes, conduisant à une déplétion en dioxygène du milieu. Cet environnement se révèle alors favorable à la croissance de certaines bactéries qui ne sont pas éliminées par l'appareil mucociliaire dysfonctionnel et qui échappent ainsi plus facilement aux mécanismes de défenses antibactériennes. En outre, les bactéries mobiles peuvent se loger dans les plaques muqueuses et être protégées de l'action des neutrophiles et des macrophages. Les bactéries s'adaptent au milieu environnant, deviennent moins accessibles aux antibiotiques et développent des résistances, dont la formation de biofilms. L'infection chronique commence à s'installer.

4.5.1.2. Rôle de l'inflammation

L'inflammation des tissus pulmonaires semble être le phénomène initial constitutif à la maladie. Elle semble même précéder l'infection. La réalisation de lavages broncho-alvéolaires chez des nourrissons mucoviscidosiques, en dehors de tout épisode infectieux, a mis en évidence un taux de polynucléaires neutrophiles jusqu'à 100 fois supérieur à celui de témoins non malades. Cette suractivation de cellules immunitaires, s'accompagnant d'une surproduction d'élastase leucocytaire, va conduire à une augmentation de la production de mucus visqueux, associée à une inflammation chronique de la muqueuse pouvant aller jusqu'à la destruction du parenchyme. Ces données soulignent une initiation du processus inflammatoire, intrinsèque à l'expression de protéines CFTR mutantes et indépendante d'un stimulus infectieux extérieur (Puchelle, 2002).

4.5.2. Manifestations digestives

L'insuffisance pancréatique externe est liée à l'accumulation de cellules éosinophiles et à la formation de bouchons muqueux obstructifs dans la lumière des canaux du pancréas. Ces manifestations classiques de la mucoviscidose aboutissent à de nombreuses atteintes pancréatiques, allant de la formation de kystes avec dilatation à la fibrose du parenchyme (Dray et al., 2005). De façon générale, les sécrétions pancréatiques, chez les malades, sont déshydratées, épaisses et pauvres en enzymes. Les manifestations cliniques de l'insuffisance pancréatique sont classiquement une diarrhée nauséabonde et grasseuse, des douleurs abdominales et une perte de poids malgré un appétit conservé. Sa conséquence première est la malabsorption des graisses, associée à une carence en vitamines et acides gras essentiels. Les déficits nutritionnels, observés chez les patients atteints de mucoviscidose, résultent d'une combinaison de pertes énergétiques excessives et d'apports complémentaires insuffisants. Bien que ces pertes énergétiques soient multifactorielles, elles sont avant tout dues aux atteintes digestives qui ne permettent pas une absorption efficace des graisses, des vitamines et des nutriments.

4.5.3. Diabète mucoviscidosique

Compte tenu de l'allongement de la durée de vie des patients, la prévalence du diabète chez ces individus est en augmentation. Il est peu retrouvé chez de jeunes patients, mais est développé par 50% des malades à 30 ans (Vantuyghem et al., 2005). Les îlots de Langerhans sont épargnés beaucoup plus longtemps dans le développement de la maladie, par rapport au pancréas, ce qui explique l'apparition plus tardive du diabète. Leur nombre est cependant diminué et la fibrose pancréatique aboutit à leur désorganisation structurelle. Le déclenchement du diabète est généralement associé à une dégradation de la pathologie dans les 2 à 4 ans qui précèdent son diagnostic. Il est donc désormais préconisé de rechercher les marqueurs d'une intolérance au glucose avant l'apparition de signes cliniques chez le patient (O'Shea & O'Connell, 2014).

4.6. Prise en charge des patients et traitements

4.6.1. Prise en charge des patients

La prise en charge des patients mucoviscidosiques relève de centres hospitaliers particuliers appelés CRCM pour Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose. Ces structures assurent la mise en contact et la collaboration de cliniciens spécialistes (pneumologues, gastroentérologues, microbiologistes, diététiciens, psychologues...). Cependant, afin de limiter les risques de contracter une infection microbienne nosocomiale, il est préconisé d'organiser au maximum les soins à domicile.

De façon générale, le suivi ambulatoire des patients est mensuel chez les tout-petits, puis devient trimestriel avec l'âge. À chaque consultation, il est pratiqué un examen cytobactériologique des crachats, une spirométrie et une évaluation nutritionnelle. Une évaluation pluridisciplinaire plus complète est

réalisée annuellement (Haute Autorité de Santé, 2010).

4.6.2. Diagnostic de l'infection bronchopulmonaire

L'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) permet la détection et la surveillance de l'évolution de l'infection pulmonaire. Initialement, l'ECBC se réalise suite au recueil d'une expectoration profonde. Cette dernière est alorsensemencée sur un milieu sélectif afin d'évaluer qualitativement et quantitativement les micro-organismes colonisateurs (Burns & Rolain, 2014). Globalement, l'infection bactérienne de l'arbre bronchique est validée par la présence de plus de 10^6 bactéries/mL.

L'ECBC doit être réalisé en routine tous les trois mois, y compris chez les patients asymptomatiques, ainsi qu'à chaque exacerbation aiguë afin de mettre en place une antibiothérapie efficace. Le choix de la thérapeutique adaptée reposera sur la détermination des phénotypes de résistance des organismes pathogènes retrouvés, par réalisation d'antibiogrammes.

4.6.3. Traitement de l'atteinte respiratoire

4.6.3.1. Traitement anti-infectieux

Plusieurs modalités d'administration des antibiotiques sont possibles: voie orale, injection intraveineuse, nébulisations. Le choix de la molécule et de la voie d'administration la plus appropriée découle de la souche bactérienne isolée des expectorations et de sa sensibilité aux thérapeutiques disponibles.

Pour *H. influenzae* et *S. aureus*, premiers colonisateurs de l'arbre bronchique chez les jeunes enfants, l'utilisation de mono- ou bithérapies est relativement efficace pour contrer les épisodes infectieux pulmonaires ponctuels (Sardet, 2003). Le recours aux antibiothérapies pour le traitement de l'infection persistante à *P. aeruginosa* est, à l'inverse, beaucoup plus limité. De nombreux obstacles s'opposent à l'action des antibiotiques (viscosité des sécrétions bronchiques, biofilm protecteur, forte charge bactérienne...). La plupart des recommandations internationales insistent alors sur l'importance du traitement antibiotique précoce et agressif de la primocolonisation à *P. aeruginosa*, afin d'éradiquer les bactéries et ainsi retarder le passage à l'infection chronique.

La faible pénétration des β -lactamines dans les muco sités pulmonaires et leur activité temps-dépendante suggèrent leur utilisation à des doses élevées. Le choix de la molécule est alors guidé par l'antibiogramme. Les aminosides, quant à eux, sont des antibiotiques concentration-dépendants. Leur administration en dose unique journalière paraît plus adaptée à leur pharmacodynamique. Les molécules les plus couramment proposées sont l'amikacine et la tobramycine (Bassinnet, 2003). Globalement, la bithérapie associant une β -lactamine (ceftazidime) et un aminoside (tobramycine) reste le traitement de référence pour une surinfection bronchique au bacille pyocyanique (Langan et al., 2015). Cette stratégie thérapeutique de première intention est généralement prolongée jusqu'à négativation de l'ECBC, soit en pratique en 2 à 3 semaines. Un traitement complémentaire par inhalation est souvent associé à la cure initiale puis

poursuivie pendant plusieurs mois. La ciprofloxacine (par voie orale) peut être associée à l'antibiothérapie en cas de pathogène multirésistant ou en alternative à une contre-indication aux aminosides (Sermet-Gaudelus et al., 2014).

En cas d'infection pulmonaire chronique, la stratégie thérapeutique est toute différente. Le caractère chronique doit, dans un premier temps, être confirmé. Finalement, les antibiotiques administrés, qui ne pourront permettre l'éradication des micro-organismes, auront pour objectif principal de ralentir la destruction de l'environnement pulmonaire et de potentiellement réduire l'inoculum bactérien (nébulisations de tobramycine, d'aztréonam ou de colistine) (Hubert, 2009). Des cures d'azithromycine, en traitement au long cours, semblent également avoir un effet bénéfique sur l'atteinte pulmonaire, en diminuant l'expression de certains facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (Lutz et al., 2012; Wagner et al., 2005). Cependant, l'amélioration symptomatologique apportée par les cures d'antibiotiques diminue au fur et à mesure de la progression de la maladie, jusqu'à conduire au développement de résistances bactériennes.

4.6.3.2. Optimisation de l'antibiothérapie

La caractéristique principale du biofilm bactérien est sans nul doute son antibiorésistance élevée. Cette généralité induit donc indirectement le besoin d'utiliser des doses plus fortes d'antibiotiques, que celles initialement évaluées sur des micro-organismes planctoniques.

La réalisation d'études *in vitro*, *in vivo* et cliniques ont également tenté d'identifier des associations d'antibiotiques pouvant être plus efficaces contre les biofilms, que l'administration individuelle de molécules. Chez *P. aeruginosa*, l'utilisation de bithérapies, couplant deux antibiotiques à action différentielle, permet de cibler des bactéries dans des états métaboliques différents et donc d'optimiser l'efficacité thérapeutique du traitement, tout en évitant l'apparition de résistance (Pamp et al., 2008). En effet, il a pu être démontré que l'administration de monothérapies, sur des périodes de temps prolongées, conduisait au développement plus ou moins rapide de souches multirésistantes (Döring et al., 2000). L'émergence de souches pyocyaniques, résistantes à la ceftazidime, a par exemple été constatée chez une petite population de patients mucoviscidosiques ayant reçu cet antibiotique en monothérapie pendant plus de 5 ans (Cheng et al., 1996; Watkins et al., 1988). De la même manière, Smith *et al.* ont notifié une augmentation du pourcentage de patients atteints de mucoviscidose, porteurs de souches *P. aeruginosa* résistantes à la tobramycine, suite à une administration de 600mg d'antibiotique nébulisé, trois fois par jour, en continu pendant 3 mois (Smith et al., 1989).

Finalement, l'impact clinique et économique des infections liées aux biofilms a conduit à l'utilisation de nouvelles molécules antimicrobiennes (linézolide, ceftobiprole), ainsi qu'au recyclage d'anciens antibiotiques (colistine) (Abbanat et al., 2014; Curcio, 2014; Sierra et al., 2017).

Dans le cadre d'une optimisation de l'antibiothérapie dirigée contre les biofilms microbiens, la nécessité de développer de nouveaux outils de diagnostic, prenant en compte le caractère sessile des bactéries, semble néanmoins nécessaire.

4.6.3.3. Kinésithérapie respiratoire

La kinésithérapie respiratoire fait partie intégrante du traitement de la mucoviscidose. Son objectif est de compenser le déficit ciliaire des patients en réalisant un drainage bronchique et de soulager ainsi l'encombrement des voies aériennes. Elle doit être mise en place même lorsque les malades présentent peu de symptômes respiratoires. En effet, des séances régulières évitent la stase et l'accumulation des sécrétions muqueuses dans l'arbre bronchique.

4.6.4. Autres stratégies thérapeutiques

4.6.4.1. Thérapie génique

La mucoviscidose étant une maladie monogénique, des essais de thérapie génique ont rapidement été mis au point dans le but de corriger le gène CFTR anormal. L'objectif est alors d'introduire une copie du gène *cftr* non muté, dans les cellules épithéliales cibles, afin de les transformer en cellules phénotypiquement normales. Le gène *cftr* "normal" est incorporé dans le génome d'un vecteur viral recombinant, modifié par délétion des séquences nécessaires à la réplication. Il pourra ainsi infecter les cellules pulmonaires cibles sans s'y répliquer et éviter ainsi sa dissémination dans l'ensemble de l'organisme. Généralement, les adénovirus sont les vecteurs les plus utilisés, car ils sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ce qui est le cas de l'épithélium respiratoire (Villate-Beitia et al., 2017; Welsh, 1999).

4.6.4.2. Thérapie protéique

Certaines molécules peuvent agir au niveau de la régulation post-transcriptionnelle de *cftr* et permettent ainsi de contrer l'effet délétère de certaines mutations du gène. Il a été démontré que des antibiotiques pouvaient court-circuiter l'effet de certaines mutations et conduire à la synthèse de protéines CFTR fonctionnelles (Sermet-Gaudelus et al., 2007). Des réactifs comme le glycérol ou le sodium-butyrate sont aussi capables d'intervenir sur la synthèse et la stabilisation des canaux ioniques (Cheng et al., 1995).

4.6.4.3. Traitements symptomatiques

Certaines stratégies thérapeutiques ont une visée plus symptomatique et s'attaquent aux troubles rhéologiques du mucus ou à la composante inflammatoire associée à la pathologie. Des molécules ou enzymes comme la N-acétylcystéine ou la désoxyribonucléase de type I recombinante humaine (rh-DNase) sont décrites comme étant capables de réduire la viscosité des sécrétions bronchiques (Diot et al., 2003). Finalement, le processus d'inflammation des voies aériennes, constitutif à la mucoviscidose, permet d'envisager l'utilisation de traitements anti-inflammatoires comme l'ibuprofène ou les corticoïdes.

4.6.5. Transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire est actuellement l'option thérapeutique terminale chez les patients au stade avancé de la maladie. Le déséquilibre entre la quantité de greffons disponibles et le nombre toujours croissant de patients en attente de greffe a conduit au développement de greffes lobaires ou de transplantation à partir de donneurs vivants.

5. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Ces dernières années, de nombreux travaux ont abordé le fait que les bactéries ont la capacité de se développer et de s'organiser selon différents phénotypes : le mode planctonique où elles coexistent en suspension libre dans un environnement liquide, et le mode biofilm, où les bactéries adhèrent à un support solide et sécrètent de nombreux polymères extracellulaires. Ces bactéries sessiles sont particulièrement plus résistantes aux antibiotiques que leur version planctonique. Cette résistance multifactorielle est considérable et la survie d'un biofilm bactérien s'observe à des concentrations d'antibiotiques allant jusqu'à 1000 fois la concentration minimale inhibitrice mesurée sur les bactéries planctoniques.

Le dilemme scientifique induit par la mucoviscidose est que les antibiotiques actuellement disponibles sur le marché pharmaceutique sont sélectionnés et administrés suite à la réalisation d'un antibiogramme explorant l'effet bactériostatique des molécules sur des cellules non-adhérentes. En routine, cet outil oriente directement le traitement pour le clinicien.

L'antibiothérapie est donc administrée sur la base de son efficacité contre la forme planctonique de *P. aeruginosa* alors qu'il est désormais bien établi qu'au cours de l'infection chronique pulmonaire mucoviscidosique, les bactéries expriment un phénotype sessile. Sans surprise, l'antibiogramme traditionnel ne peut donc pas être prédictif de l'efficacité ou non des traitements utilisés dans le contexte respiratoire. Finalement, seules les bactéries planctoniques relâchées du biofilm pulmonaire seront tuées. Les symptômes cliniques pourront être réduits temporairement, mais le réservoir de micro-organismes sessile demeurera intact et persistera. À l'heure actuelle, les conditions de l'antibiogramme standard *in vitro* ne peuvent refléter qu'imparfaitement les conditions réelles *in vivo*. Cela peut se traduire, chez le malade, par une absence d'effet de l'antibiotique malgré une sensibilité mesurée *in vitro*.

Le nombre limité d'études explorant le versant biofilm du comportement bactérien et sa sensibilité aux antimicrobiens est principalement lié au fait que le praticien est limité par les possibilités techniques disponibles. À l'heure actuelle, ces méthodologies disponibles sont difficilement compatibles avec les pratiques d'un laboratoire hospitalier, avec en général de lourdes contraintes techniques et manuelles. Il est donc conceptuellement extrêmement intéressant et novateur de pouvoir disposer d'une technologie conviviale, automatisable, et d'un modèle *in vitro* à même de tester l'efficacité des antibiotiques à la fois

sur des bactéries planctoniques et aussi de mesurer leur capacité à prévenir la formation de biofilm. Une telle possibilité représenterait une avancée considérable dans l'optimisation des traitements des infections pulmonaires à *P. aeruginosa*, chez les patients mucoviscidosiques.

La société BioFilm Control a développé un nouveau système, le Biofilm Ring Test® (BRT), permettant l'étude de la cinétique de formation de biofilm par un échantillon bactérien. Son principe de fonctionnement est de visualiser le déplacement macroscopique de microbilles magnétisables le long d'une surface sous l'action d'un aimant. Ce déplacement est modulé par la présence d'obstacles microscopiques (les bactéries), par la viscosité à proximité de la surface (induite par les macromolécules incluses dans le biofilm), par des interactions moléculaires et par la viscoélasticité de la surface (adsorption des macromolécules secrétées par les bactéries). Par l'intermédiaire de cet outil, un test innovant de sensibilité aux antimicrobiens, appelé Antibiofilmogramme®, a également pu être mis en point dans le but d'évaluer la capacité des antibiotiques à prévenir l'installation des bactéries en configuration de biofilm, sur un support inerte.

Les études effectuées dans le cadre de cette thèse de doctorat ont consisté en l'évaluation de la capacité de souches *P. aeruginosa* à croître sous la forme d'un biofilm et en la détermination de l'impact de différents antibiotiques sur cette formation. Nos recherches ont ainsi porté sur une collection de vingt-cinq souches cliniques, collectées à partir de prélèvements d'expectorations de patients mucoviscidosiques.

Les travaux réalisés s'articulent alors en trois parties:

- (1). Classification, à l'aide du Biofilm Ring Test® (BRT), des souches *P. aeruginosa* de notre collection en fonction de leur capacité à former ou non un biofilm.
- (2). Mise en évidence d'un processus de prévention de l'adhésion bactérienne par les aminosides, en Antibiofilmogrammes® mais également par la méthode standard de marquage au Cristal Violet et par un modèle cellulaire permettant l'adhésion de bactéries sessiles à un tapis de cellules épithéliales bronchiques.
- (3). Mise en évidence d'un processus d'induction des étapes précoces de formation du biofilm par les β -lactamines, en Antibiofilmogrammes®, associée à la confirmation de la détection de l'adhésion des bactéries par un traitement enzymatique à la DNase I.

Étude de la réversibilité de ce phénomène d'induction de l'adhésion bactérienne par les antibiotiques.

Chapitre 2

Matériels & Méthodes

1. MATÉRIELS

1.1. Milieux et réactifs

La liste complète des réactifs et milieux utilisés durant cette thèse figure en **Annexe (Chapitre 9)**.

1.2. Détermination de la CMI des antibiotiques par bandelettes à gradient de concentrations

Tableau 2. Panel d'antibiotiques utilisés

**d'après les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (Table 6A. Solvents and diluents for preparation of stock solutions of antimicrobial agents)*

Antibiotique	Concentration stock (µg/mL)	Diluant*
Amikacine	25 000	H ₂ O
Céfépime	40 000	PBS 0,1M
Ceftazidime	40 000	H ₂ O
Ciprofloxacine	2 000	H ₂ O
Imipénème	100 000	PBS 0,01M
Méropénème	40 000	H ₂ O
Ticarilline/Acide clavulanique	120 000	PBS 0,1M
Tobramycine	9 800	H ₂ O

La souche analysée est ensemencée la veille du test sur une gélose nutritive non sélective (gélose au sang par exemple). Quelques colonies sont ensuite remises en suspension en eau physiologique stérile et la concentration bactérienne est ajustée à une concentration standard comprise entre 0,55 et 0,62 McFarland. Pour l'étude d'une souche *P. aeruginosa*, il est préconisé de diluer ensuite la suspension microbienne au 1/1000 pour l'ensemencement par inondation de géloses MH. Finalement, les bandelettes d'antibiotiques y sont déposées à la surface, tête-bêche, à raison de deux par gélose.

Après une incubation de 18-24h à 37°C, les CMI des différents antibiotiques testés peuvent être lues directement sur les géloses, à l'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette.

Pour la validation des concentrations, deux E-tests ont, au minimum, été réalisés pour chacune des souches bactériennes testées. Dans le cas où, pour un antibiotique donné, les deux CMI lues différaient de moins d'un facteur 2, la plus haute concentration était validée comme étant sa CMI efficace sur les bactéries. Si, au contraire, les deux valeurs étaient différentes de plus d'un facteur 2, un troisième E-test était réalisé.

Concentrations d'antibiotiques testées et appliquées lors des différents tests évaluant l'effet des antibiotiques sur l'initiation de la formation d'un biofilm par les bactéries (Tableau 3) :

- **CMI = détermination directe par bandelettes à gradient de concentrations**

Les CMI des 8 antibiotiques listés ci-dessus (Tableau 2) ont été déterminées par bandelettes à gradient de concentrations sur 14 souches *P. aeruginosa* de notre collection clinique (+ 2 souches de référence ATCC et PAO1).

- **SubCMI = 0,5 x CMI**

- **PK/PD = activité bactéricide optimale de l'antibiotique *in vivo***

Pour les β -lactamines, la concentration importante dans l'évaluation de l'efficacité des antibiotiques est la concentration résiduelle qui doit atteindre une valeur de 8 x CMI. Pour les fluoroquinolones, c'est l'aire sous la courbe qui est optimisée par une valeur de l'ordre de 3 x CMI. Finalement, l'activité des aminosides est maximisée au pic sérique, soit à une concentration équivalente à 10 x CMI.

Tableau 3. Listing des différentes concentrations d'antibiotiques testées sur les isolats cliniques de *P. aeruginosa* (seules les concentrations pour les souches analysées dans la partie Résultats sont présentées ici).

	($\mu\text{g/mL}$)	Souche #1	Souche #6	Souche #12	Souche #24
Amikacine	CMI	6	96	32	12
	SubCMI	3	48	16	6
	PK/PD	60	-	320	120
Céfépime	CMI	4	24	24	2
	SubCMI	2	12	12	1
	PK/PD	32	192	192	16
Ceftazidime	CMI	4	16	1,5	3
	SubCMI	2	8	0,75	1,5
	PK/PD	32	128	12	24
Ciprofloxacine	CMI	0,19	8	0,75	0,19
	SubCMI	0,095	4	0,375	0,095
	PK/PD	0,57	24	2,25	0,57
Imipénème	CMI	0,5	3	4	1,5
	SubCMI	0,25	1,5	2	0,75
	PK/PD	4	24	32	12
Méropénème	CMI	0,38	0,75	0,19	0,064
	SubCMI	0,19	0,375	0,095	0,032
	PK/PD	3,04	6	1,52	0,512
Ticarcilline/Acide clavulanique	CMI	64	48	1,5	R
	SubCMI	32	24	0,75	R
	PK/PD	512	-	12	R

	CMI	0,75	4	4	0,5
Tobramycine	SubCMI	0,375	2	2	0,25
	PK/PD	7,5	40	40	5

(« - » = concentration non testée, car non relevante d'un point de vue clinique)

1.3. Souches bactériennes

Un panel de souches cliniques a pu être collecté à partir de prélèvements d'expectorations de patients mucoviscidosiques. Dans un premier temps, ces dernières ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de confirmer leur appartenance à l'espèce *P. aeruginosa*. Finalement, une collection de vingt-cinq souches a pu être validée pour la réalisation de nos travaux de recherche (Recueil de Données Cliniques des souches disponible en **Annexe Chapitre 9**).

Pour conservation, les souches ont toutes été congelées à -80°C. Pour chacune d'entre elles, des suspensions en bouillon Brain Heart Infusion (BHI), complété de 10% de glycérol, ont été préparées et déposées en cryotubes de congélation.

Pour la réalisation des expérimentations, les souches à analyser sont décongelées etensemencées sur géloses Drigalski. Après incubation à 37°C pendant 24h, ces cultures intermédiaires sont conservées à +4°C et repiquées hebdomadairement, par la technique classique d'isolement, sur le même type de géloses.

1.4. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire CFBE410⁺, utilisée pour le modèle de co-culture statique bactéries/cellules, nous a été généreusement offerte par le Dr Frédéric BECQ de l'équipe « Transports Ioniques et Mucoviscidose » de l'Université de Poitiers.

Cette lignée continue a initialement été générée par la transformation (plasmide viral SV40) de cellules épithéliales bronchiques, isolées chez un patient mucoviscidosique, homozygote pour la mutation $\Delta F508$ du gène CFTR (Ehrhardt et al., 2006). Ces cellules immortalisées maintiennent leur habilité à former des monocouches confluentes, aux contacts intercellulaires fonctionnels, lorsqu'elles sont en condition de culture immergée. Elles convertissent également la mutation du gène CFTR au fil de leurs passages et expriment des protéines de transport pulmonaires. Leur utilisation est donc appropriée pour l'étude de traitements alternatifs de la mucoviscidose.

1.4.1. Entretien hebdomadaire des cellules

Les cellules CFBE410⁺ sont remises en suspension dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et d'un mélange de L-Glutamine et d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Elles sont cultivées dans des flasques ventilées pour culture cellulaire et incubées à 37°C dans une étuve

saturée en humidité (95%) et équilibrée en CO₂ (5%). À leur arrivée à confluence, les cellules sont décollées par de la trypsine-EDTA, centrifugées à 500g pendant 5 min, puis réensemencées en flasques.

1.4.2. Congélation des cellules

Pour une longue conservation, les cellules CFBE410⁺ peuvent être congelées dans de l'azote liquide. Elles sont alors remises en suspension dans du milieu de congélation constitué de 30% de SVF, 60% de RPMI-1640 et 10% de diméthyl-sulfoxyde (DMSO). Des aliquotes de 1,5 mL sont réparties en cryotubes et congelées pendant 24h à -80°C dans un bain d'isopropanol. Les tubes sont ensuite conservés dans une bonbonne d'azote liquide.

Pour la décongélation, les cryotubes sont réchauffés 2 min à 37°C et les cellules sont récupérées pour un nouveau cycle d'ensemencements.

2. DÉTERMINATION DES CINÉTIQUES D'ADHÉSION BACTÉRIENNES PAR LE BIOFILM RING TEST®

2.1. Principe

Le système du Biofilm Ring Test® permet d'étudier les étapes précoces de développement d'un biofilm bactérien (Chavant et al., 2007). Son principe de fonctionnement consiste à visualiser le déplacement macroscopique de microbilles magnétisables le long d'une surface, sous l'action d'un aimant (Figure 13). Concrètement, une solution bactérienne est mélangée à une suspension de particules magnétiques avant d'être déposée dans les puits d'une microplaque standard de laboratoire. Cette dernière est alors incubée et des mesures directes de cinétique d'adhésion sont effectuées, sans aucune étape de lavage ni de marquage. En effet, l'application d'un support aimanté sous la microplaque va engendrer un champ magnétique agglomérant les billes en un spot visible au fond des puits. Le test consiste ainsi à suivre l'immobilisation de ces particules au fur et à mesure de la formation d'un biofilm. En effet, lors de l'adhésion des bactéries au support, les billes magnétiques vont être piégées par le tapis bactérien et ne pourront plus se déplacer sous l'attraction de l'aimant (absence de spot). La lecture du fond des puits de la microplaque se fait à l'aide d'un lecteur spécifique conçu par BioFilm Control: le Biofilm reader. Une analyse d'images à l'aide du logiciel BFC Elements génère un score d'agrégation des billes, l'Indice BioFilm (BFI), pour chacun des puits analysés. Grâce au suivi de l'indice BFI, il est alors possible d'identifier en moins de 24h les souches bactériennes capables d'adhérer et de former un biofilm au fond des puits de la microplaque.

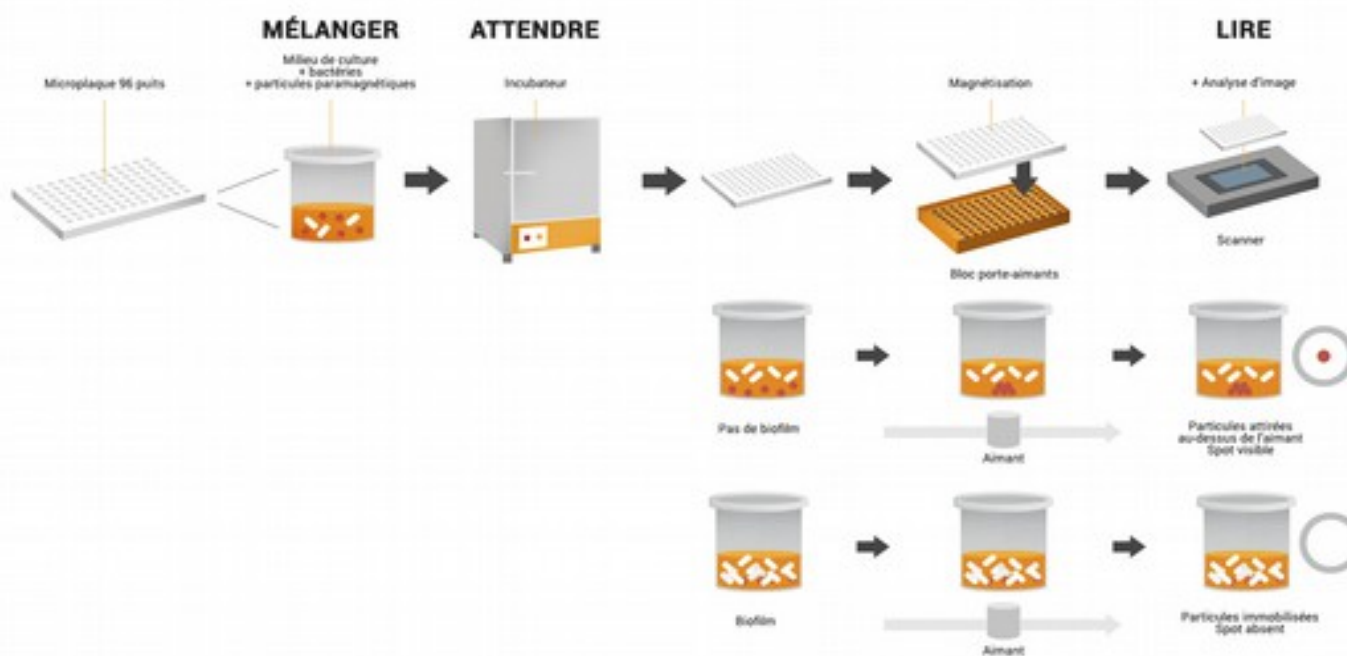


Figure 13. Technologie du Biofilm Ring Test®

Source <http://www.biofilmcontrol.com/fr/la-technique/>

La technologie du BRT ne nécessite aucune manipulation de la culture bactérienne initiale, comme des procédures de fixation ou de marquage, évitant ainsi toutes les étapes qui génèrent typiquement des variations de résultats inter-opérateurs et inter-laboratoires.

2.2. Protocole

2.2.1. Préparation de la suspension bactérienne initiale (SBI)

La veille du lancement du test de cinétique d'adhésion, la souche bactérienne à analyser est repiquée sur une gélose BHI, à partir de sa culture d'entretien (incubation O/N à 37°C). Quelques colonies sont alors resuspendues dans 2 mL de milieu BHI et la Densité Optique (DO) de la solution est mesurée à 600nm. La Suspension Bactérienne Initiale est ensuite préparée en milieu BHI à une DO ajustée à environ 1/250 (soit environ 10^6 CFU/mL).

2.2.2. Évaluation de la cinétique d'adhésion par le BRT

La solution de microbilles magnétique, appelée Toner, est mélangée et ajoutée à la SBI à une concentration finale de 10 μ L/mL. Le test utilise ensuite un support standard de laboratoire: la plaque 96 puits. Une microplaque individuelle est utilisée pour chaque temps d'incubation inclus dans la cinétique d'adhésion. Pour l'analyse d'une souche *P. aeruginosa*, les mesures d'une cinétique se font toutes les 2h pendant 6 à 8h (une plaque à 24h peut cependant être évaluée).

Après homogénéisation, la SBI finale est donc déposée à 200 μL /puits dans les microplaques. Généralement, pour une souche, un réplicat technique de 4 à 8 puits est réalisé. Un contrôle de la libre migration des billes dans le milieu BHI doit également être préparé (BHI et Toner sans suspension bactérienne), afin de confirmer que le potentiel blocage des billes résulte uniquement de l'activité spécifique des micro-organismes en culture. Les microplaques du test sont alors toutes incubées à 37°C, sans agitation.

À la fin de son incubation, la microplaque est préparée pour son analyse par le système BRT. Dans un premier temps, les puits sont recouverts par 120 μL de liquide de contraste (huile inerte et opaque permettant la bonne lecture des puits lors du scan de la microplaque par le Biofilm reader). Deux générations d'appareils ont été utilisées au cours de nos travaux de recherche. Tous deux se composent d'un scanner et d'un support aimanté pour l'étape de magnétisation. La différence entre les systèmes réside principalement dans le logiciel d'exploitation des résultats. Pour une analyse de la microplaque via l'ancien BRT, un scan pré- (I_0) et post-magnétisation (I_1) doivent être réalisés. Pour le plus récent appareil, une acquisition post-magnétisation est suffisante.

La magnétisation de la microplaque se calibre sur une minute et se réalise par l'intermédiaire du Block test fourni dans le pack BIOFILM par BioFilm Control. Ce dernier n'est autre qu'un support contenant 96 mini-aimants, qui, une fois que la microplaque y est ajustée, vont se retrouver au centre des puits. Concrètement, au cours de l'étape de magnétisation, les billes vont spontanément être attirées au centre du fond des puits, où elles vont y former un spot dense et visible. Dans le cas où les cellules bactériennes ont eu la possibilité d'adhérer à la plaque et d'y entreprendre la formation de structures biofilm, la migration des microbilles va être perturbée et, au bout de la minute de magnétisation, aucun spot ne sera détecté.

Le scan de la microplaque par le lecteur dédié, permet d'obtenir une photo précise de chacun des puits et d'y associer une valeur de BFI (Indice BioFilm), représentative du potentiel blocage des billes, soit de la capacité d'adhésion de la souche bactérienne analysée. Les valeurs de BFI, déduites de l'image post-magnétisation par le logiciel d'analyse exploitant un algorithme mathématique, sont inversement proportionnelles au nombre de bactéries adhérees. Une haute valeur de BFI (~ 20) indique une mobilité spontanée des microbilles sous l'action de l'aimant, soit une absence de formation de biofilm, alors qu'une faible BFI ($=0$) représente une immobilisation complète des billes par des bactéries en phase d'adhésion. L'analyse des différentes microplaques, lues à des intervalles de 2h, permet alors l'établissement d'une courbe de cinétique d'adhésion en fonction du temps d'incubation.

3. L'ANTIBIOFILMOGRAMME® ou l'évaluation de l'effet des antibiotiques sur la formation du biofilm bactérien

3.1. Principe

Une application supplémentaire du système BRT consiste en la caractérisation de la cinétique d'adhésion d'une souche bactérienne, en présence de différentes concentrations d'antibiotiques (Antibiofilmogramme®). En permettant de passer au crible les molécules ayant un effet potentiel sur la formation du biofilm, il aide à la détermination de la Concentration Minimale d'Inhibition du Biofilm (CMib) des antimicrobiens.

Toutes les étapes du protocole de l'Antibiofilmogramme® sont identiques à celles de l'évaluation de la cinétique d'adhésion d'une souche bactérienne. Seul l'ajout d'antibiotiques, lors de la préparation des microplaques, diffère. Toujours à l'aide du suivi de l'indice BFI, il sera possible d'identifier en moins de 24h, les molécules d'antibiotiques susceptibles de retarder voire d'inhiber complètement la formation d'un biofilm, en comparaison de l'adhésion spontanée de la souche analysée. Les points techniques de la réalisation d'un Antibiofilmogramme® seront énoncés brièvement, compte tenu de leur similarité à ceux détaillés précédemment pour la détermination d'une cinétique d'adhésion simple.

3.2. Protocole

3.2.1. Préparation préalable des différentes concentrations d'antibiotiques

L'objectif d'un Antibiofilmogramme® est la détermination de l'adhésion d'une souche bactérienne, en contact direct avec divers antibiotiques. 20 µL de chacune des concentrations d'antibiotiques à tester sont donc déposées en duplicat de puits dans les différentes microplaques. L'Antibiofilmogramme® a été mis en oeuvre à 0, 2, 4, 6/8h et/ou 24h. Après préparation, les différentes plaques sont conservées à -20°C jusqu'au jour du lancement du test (congélation conseillée de quelques jours seulement).

3.2.2. Préparation de la suspension bactérienne initiale (SBI)

Quelques colonies de la culture bactérienne,ensemencée la veille sur une gélose BHI, sont remises en suspension dans 2 mL de bouillon BHI. Après détermination de sa DO_{600nm} , la solution bactérienne est utilisée pour préparer la SBI, contenant une concentration finale en Toner de 10 µL/mL, à une DO ajustée à 1/250 (pour atteindre environ 10^6 CFU/mL).

3.2.3. Mise en oeuvre d'un Antibiofilmogramme®

Après décongélation, les microplaques du test sont inoculées avec 200 µL de SBI. Les contrôles de l'adhésion spontanée des bactéries (sans antibiotique) et de la migration des billes magnétiques (condition sans la souche bactérienne) doivent également être évalués à chaque temps d'incubation. Suite à une incubation statique à 37°C, 120 µL de liquide de contraste sont ajoutés aux différents puits de la

microplaque analysée pour sa mesure par le système BRT. Elle est alors magnétisée une minute par l'intermédiaire du Block test et scannée à l'aide du Biofilm reader. Comme pour une cinétique d'adhésion simple, la force d'adhésion des micro-organismes en contact des antibiotiques est exprimée en BFI, indice représentant l'agrégation des microparticules magnétisables. L'exploitation des résultats sous forme de cinétique d'adhésion en fonction du temps d'incubation permet d'évaluer l'effet des antibiotiques, sur l'adhérence des bactéries, en comparaison de leur comportement spontané (souche contrôle sans antibiotique).

4. DÉTECTION DE LA FORMATION DE BIOFILM PAR MARQUAGE AU CRISTAL VIOLET

4.1. Principe

Avoir recours au marquage au Cristal Violet pour la quantification du biofilm bactérien reste, à l'heure d'aujourd'hui, la technique la plus fréquemment utilisée au laboratoire en microplaques 96-puits. Basé sur la spectrophotométrie, le principe de cette méthode, qui quantifie la biomasse totale du biofilm, repose sur le marquage des cellules adhérentes par le CV (O'Toole, 2011; Stepanović et al., 2000). La mesure de l'absorbance de la culture bactérienne analysée reflète ainsi sa capacité à adhérer et donc à former un biofilm au fond des puits de la microplaque. Tout comme pour les expérimentations menées avec le BRT, l'effet des antibiotiques sur la prévention de l'adhésion bactérienne peut être évalué par la technique du CV, en les ajoutant à la suspension bactérienne initiale à différentes concentrations. Les nombreux inconvénients relatifs à cette méthodologie (longue incubation des microplaques, faible reproductibilité des résultats, étapes de lavages contraignantes...) empêchent cependant sa standardisation pour une utilisation en routine hospitalière.

4.2. Protocole

Une gélose BHI estensemencée la veille du test avec la souche bactérienne à analyser et est incubée O/N à 37°C. De la même manière que pour la préparation de la SBI d'un Antibiofilmogramme®, une plaque 96 puits, contenant 20 µL des différentes concentrations d'antibiotiques à tester, est inoculée avec la suspension bactérienne ajustée à une concentration d'environ 10⁶ CFU/mL. Un répliquat technique de 6 à 8 puits peut ainsi être déposé pour chacune des conditions testées. La microplaque est ensuite incubée 6h à 37°C, puis le milieu contenant les cellules planctoniques est éliminé. Pour cela, la plaque est secouée vigoureusement au-dessus d'une poubelle contenant de la poudre neutralisante et est lavée à deux reprises avec 250 µL/puits d'eau stérile. Les cellules ayant adhéré aux parois et au fond des puits sont marquées par 250 µL de solution de Cristal Violet à <1% pendant 15 min à température ambiante. Le CV est alors retiré et les puits sont à nouveau lavés avec 250 µL d'eau stérile, à trois reprises. Finalement, le CV

associé aux bactéries sessiles est dissous par 250 μL d'acide acétique 30% et l'absorbance des puits est mesurée à 540nm par le lecteur de plaques Micronaut Skan (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Allemagne).

4.3. Classification de l'adhérence bactérienne

Dans le cadre de nos expérimentations appliquant la technique de marquage au CV, le temps d'analyse optimal a été arrêté à 6h d'incubation (comparaison la plus efficace entre les techniques *in vitro* sur surface abiotique et la co-culture cellulaire). La classification des souches bactériennes selon leur capacité d'adhésion, initialement standardisée par Stepanovic *et al.*, a été adaptée à notre étude (Stepanović et al., 2007). En effet, pour des souches bactériennes dont l'adhésion est progressive au cours de la durée d'incubation, cette catégorisation fondamentale sous-évalue le potentiel des bactéries à initier la formation d'un biofilm. Pour contrer cette limite d'interprétation des résultats, nous avons donc également introduit notre propre classification des cultures bactériennes testées, sur la base de nos mesures expérimentales. Finalement, nous proposons de comparer directement la DO moyenne de chaque condition à la plus haute DO du contrôle négatif ($\text{DO}_{\text{moyenne}} + \text{ET}$). La classification des souches bactériennes se répartie alors en deux catégories: $\text{DO} \leq \text{DO}_{\text{contrôle négatif}} + \text{ET} = \text{cellules non-adhérentes}$ et $\text{DO} > \text{DO}_{\text{contrôle négatif}} + \text{ET} = \text{production d'un biofilm}$.

5. CO-CULTURE STATIQUE BACTÉRIES/CELLULES

5.1. Principe

Afin de se rapprocher au mieux de la réalité pathologique de la mucoviscidose, un modèle de co-culture sur cellules eucaryotes a été appliqué pour vérifier la capacité d'adhésion de nos isolats cliniques à un tapis cellulaire (Moreau-Marquis et al., 2010). L'utilisation d'un épithélium pulmonaire comme support pour la croissance bactérienne apparaît plus pertinente pour faire le lien avec de futurs résultats *in vivo*, que l'usage de microplaques en plastique. Au cours de la mucoviscidose, durant l'étape précoce de colonisation des voies aériennes par *P. aeruginosa*, il a en effet été démontré que les bactéries pouvaient interagir directement avec les cellules épithéliales (Anderson et al., 2008).

L'intérêt de la co-culture statique est donc de permettre l'adhésion des bactéries directement aux cellules pour ensuite quantifier, par la réalisation d'un dénombrement microbiologique, la biomasse bactérienne constituant le biofilm formé. La mise au point d'un protocole de marquage du biofilm, permettant son observation au microscope à épifluorescence, a également permis de visualiser la formation des microcolonies au niveau du tapis cellulaire. Finalement, comme pour les expérimentations menées avec le BRT ou la technique de CV, l'effet des antibiotiques sur la formation du biofilm pyocyanique a été étudié par ajout des différentes concentrations à tester aux suspensions bactériennes, avant l'inoculation des

cellules.

5.2. Protocole

5.2.1. Préparation des cellules

À partir de leur passage d'entretien hebdomadaire, les cellules sontensemencées dans des plaques de culture 6 et 24 puits à une concentration de $7,5 \cdot 10^5$ cellules/puits ou $4,5 \cdot 10^5$ cellules/puits respectivement. Dans le cadre de nos travaux, les plaques 6 puits ont été utilisées pour le marquage fluorescent des biofilms, soit une analyse des cultures au microscope et les plaques 24 puits pour le dénombrement des colonies bactériennes sessiles. Il a également été convenu que chaque condition analysée en co-culture (souche bactérienne seule ou additionnée d'une concentration d'antibiotique) devait être testée sur au moins un duplicat de puits.

De façon générale, les cultures cellulaires sont entretenues en milieu RPMI-1640 complété par 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-Glutamine, 10 U/mL de pénicilline et 10 μ g/mL de streptomycine. Elles sont ensuite incubées à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'à la formation de tapis cellulaires confluent (en 48h pour une plaque 24 puits, jusqu'à 3 à 4 jours pour une plaque 6 puits).

5.2.2. Inoculation des cultures cellulaires par la suspension bactérienne

Le milieu de culture est retiré des plaques et les cellules sont lavées trois fois avec du milieu RPMI simple ou du PBS. À partir des puits dédiés, un comptage est réalisé afin d'estimer la concentration cellulaire des plaques. Une suspension bactérienne, en bouillon BHI, a été préparée la veille du lancement de la co-culture et incubée sur la nuit à 37°C, sous agitation. Après détermination de sa DO à 600nm, elle est utilisée pour inoculer les cultures cellulaires à une MOI de 30:1, soit 30 bactéries pour une cellule infectée. À cette étape, une co-culture peut être complétée d'une concentration d'antibiotique afin d'évaluer son impact sur l'initiation de l'adhésion bactérienne, en comparaison de la culture contrôle (comportement spontané des bactéries en contact des cellules). Le milieu de culture requis pour la réalisation des co-cultures statique est du RPMI-1640 complété par 2 mM de L-Glutamine. Les plaques de co-cultures sont incubées à 37°C et 5% de CO₂, sans agitation, pour une durée de 6h.

5.2.3. Quantification de la biomasse bactérienne constitutive du biofilm

Après les 6h d'incubation, le milieu de culture contenant les bactéries non-adhérentes est éliminé et les cellules sont lavées précautionneusement au PBS à deux reprises. De la trypsine-EDTA est ensuite ajoutée aux co-cultures à 1 mL/puits pour détacher l'ensemble des cellules et des bactéries sessiles associées. Les lysats récupérés sont alors dilués en séries de raison 10 pour la réalisation d'un dénombrement bactérien standard. Pour cela, chacune des dilutions est déposée à un volume de 100 μ L sur une gélose BHI et y estensemencée par étalement. L'ensemble des géloses est incubé à 37°C, sur la

nuit. Le lendemain, le nombre de colonies sur chacune des boites est apprécié et la concentration moyenne de cellules bactériennes adhérentes et cultivables peut être estimée en log CFU/mL.

5.2.4. Marquage et observation microscopique des co-cultures statiques

Alternativement au dénombrement microbiologique, la formation de microcolonies adhérant au tapis cellulaire peut être estimée par le marquage du biofilm au calcofluor. Ce marqueur fluorescent est capable de révéler les structures contenant de la cellulose et de la chitine, ou plus généralement constituées de polysaccharides présentant des liaisons β 1-4 ou 1-3. Dans l'étude des biofilms, son utilisation est donc appropriée pour la détection de la matrice extracellulaire.

Comme pour la quantification de la biomasse bactérienne, le milieu de culture est donc retiré des puits, après l'incubation des plaques, et les cellules sont lavées au PBS. Les co-cultures sont ensuite marquées au calcofluor 1% pendant 30 min, à température ambiante. Le marqueur est éliminé et les puits sont à nouveau lavés à deux reprises, au PBS, afin de limiter le bruit de fond du marquage. Finalement, 2 mL de HBSS sont ajoutés aux puits et les co-cultures sont examinées au microscope à épifluorescence.

6. IMAGERIE CELLULAIRE

6.1. Microscope à épifluorescence

Après marquage au calcofluor, les co-cultures statiques cellules/bactéries sont observées au microscope à épifluorescence. L'appareil utilisé est un Olympus BX60 avec, pour source lumineuse, une lampe HBO. L'objectif (Olympus) utilisé est le x40 à immersion. Le filtre UV est appliqué pour visualiser la fluorescence bleue du marqueur. Finalement, une caméra Orcaflash 4.0 (C11440, Hamamatsu, Massy, France) permet de capturer les images grâce au logiciel HC Image Live (Hamamatsu).

6.2. Traitement des images

Après acquisition, les images sont analysées grâce au logiciel libre ImageJ, afin de procéder à une localisation subcellulaire du calcofluor. Pour cela, il faut qu'initialement, deux photographies aient été prises sur le même champ microscopique à l'aide de deux jeux de filtres différents (phase de contraste et UV). Le logiciel de traitement d'images permet alors la fusion des deux clichés. Cette superposition reflète ainsi, en couleurs factices, la fluorescence bleue du calcofluor sur l'image initiale restituée en niveaux de gris.

7. STATISTIQUES

La représentation graphique de l'ensemble des résultats obtenus au cours de nos travaux a été générée par l'intermédiaire du logiciel Prism. Ce dernier permet également d'établir des statistiques détaillées en fonction du type d'expérimentation réalisée. De manière générale, les résultats sont moyennés et exprimés

avec l'erreur standard à la moyenne (SEM: Standard Error of the Mean). Pour l'analyse des cinétiques d'adhésion (avec ou sans antibiotique) menée avec le BRT, un test d'analyse de la variance ANOVA two-way a été appliqué. Concernant les résultats de quantification de la biomasse bactérienne adhérente par marquage au CV et dénombrement microbiologique, un test ANOVA one-way a été réalisé, suivi d'un test de Bonferroni, comparant les conditions avec antibiotiques au témoin de la souche bactérienne seule. Les résultats obtenus sont alors considérés comme étant statistiquement significatifs, sur la base de l'échelle suivante (avec **p** défini comme la probabilité d'obtenir au moins la même valeur du test si l'hypothèse nulle était vraie) :

Valeur de p	Symbole
p < 0,0001	****
0,0001 < p < 0,001	***
0,001 < p < 0,01	**
0,01 < p < 0,05	*
p > 0,05	<i>ns</i>

RÉSULTATS

Chapitre 3

Analyse standardisée de la cinétique de formation de biofilm par *P. aeruginosa*

ARTICLE 1

The BioFilm Ring Test : a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics

Auteurs : Olivares Elodie, Badel-Berchoux Stéphanie, Provot Christian, Jaulhac Benoît, Prévost Gilles, Bernardi Thierry, Jehl François.

Statut de l'article : Publié

Revue : Journal of Clinical Microbiology

Objectifs de l'étude : Malgré l'amélioration des services de santé et l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre toujours croissant d'infections liées aux biofilms bactériens demeure un défi de santé publique de premier ordre. En effet, la recrudescence des infections sur biofilms signifie l'analyse, en laboratoire hospitalier, de nombreux échantillons cliniques composés, initialement, de micro-organismes pathogènes adhérents. Or, encore à l'heure actuelle, les techniques de mesure de sensibilité des bactéries aux antibiotiques se font sur des cellules planctoniques, remises en suspension dans un milieu liquide. Nous sommes alors bien loin du comportement sessile spontané, exprimé *in vivo* par les bactéries au site d'infection. Les techniques adaptées à l'analyse de la formation et du développement d'un biofilm bactérien ne sont, en plus, toujours pas standardisées. Dans le contexte infectieux de la mucoviscidose, nous avons donc proposé de caractériser à l'aide du BRT, la capacité de notre collection de souches *P. aeruginosa* à initier la formation d'un biofilm, sur un support plastique, pendant 24h d'incubation. La robustesse de ce test a également été vérifiée par la variation de certaines conditions de culture comme le milieu ou le jeu de billes paramagnétiques utilisé.

Résultats : L'ensemble de notre collection clinique de souches *P. aeruginosa* a été analysé, pour sa capacité propre à former un biofilm, par l'intermédiaire du BRT. Les différentes cinétiques d'adhésion récoltées ont alors permis la définition et le classement des souches en trois groupes majeurs, dépendant de la vitesse de l'initiation de la formation d'un biofilm par les bactéries. Concrètement, sur les vingt-cinq souches analysées, sept d'entre elles ont été placées dans le profil d'adhésion 1, défini par une adhésion forte et rapide des cellules bactériennes (blocage des billes magnétiques, soit formation d'un biofilm, en moins de 2h d'incubation). La majorité des souches ont, quant à elles, été catégorisées comme formant un biofilm de manière progressive sur 24h (profil d'adhésion 2). Finalement, seulement quatre souches de la collection ont semblé conserver un phénotype planctonique au cours des expériences menées et ont donc été classées dans un troisième profil d'adhésion (libre mouvement des billes jusqu'à 24h d'incubation).

Cette catégorisation de souches cliniques, en fonction de leur capacité à initier la mise en place d'un biofilm, a également été confirmée, pour chaque temps de cinétique mesuré, par la méthode plus conventionnelle du marquage des bactéries adhérentes au CV. De plus, l'utilisation de différents jeux de billes (variation du diamètre) et milieux de culture (utilisation du milieu MH recommandé pour la réalisation d'antibiogrammes standards), par rapport au protocole initial, a conduit à l'obtention d'une classification similaire des souches bactériennes, renforçant ainsi la prédictibilité du BRT.

Conclusion : De façon globale, ces premiers résultats, obtenus sur des souches pyocyaniques issues d'expectorations de patients mucoviscidosiques, confirment l'importance du biofilm bactérien dans les atteintes pulmonaires développées au cours de la maladie. La reproductibilité significative des données récoltées, le gain de temps et le peu de manipulations nécessaires, comparés aux méthodologies standards, se révèlent être des arguments clés pour la certification du BRT en laboratoire de diagnostic. En effet, en plus de permettre la caractérisation sessile ou planctonique d'un prélèvement bactérien, la perspective directe du BRT est le criblage rapide de molécules antibiotiques efficaces contre l'adhésion bactérienne. En ayant préalablement déterminé la cinétique d'adhésion d'une souche donnée, l'ajout d'antibiotiques à la suspension bactérienne, au début du test, permet d'estimer la capacité des molécules à retarder, voire inhiber l'initiation de la formation d'un biofilm par les micro-organismes. Cette nouvelle procédure, appelée Antibiofilmogramme®, semble alors capable de fournir des informations complémentaires et probablement plus pertinentes d'un point de vue clinique que celles obtenues par un antibiogramme classique.



The BioFilm Ring Test: a Rapid Method for Routine Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation Kinetics

Elodie Olivares,^{a,b} Stéphanie Badel-Berchoux,^b Christian Provot,^b Benoît Jaulhac,^a Gilles Prévost,^a Thierry Bernardi,^b François Jehl^a

Fédération de médecine translationnelle, EA7290 Virulence bactérienne précoce, Institut de Bactériologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France^a; BioFilm Control SAS, Saint-Beauzire, France^b

Currently, few techniques are available for the evaluation of bacterial biofilm adhesion. These detection tools generally require time for culture and/or arduous handling steps. In this work, the BioFilm Ring Test (BRT), a new technology, was used to estimate the biofilm formation kinetics of 25 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from the sputum of cystic fibrosis (CF) patients. The principle of the new assay is based on the mobility measurement of magnetic microbeads mixed with a bacterial suspension in a polystyrene microplate. If free to move under the magnetic action, particles gather to a visible central spot in the well bottom. Therefore, the absence of spot formation in the plate reflects the bead immobilization by a biofilm in formation. The BRT device allowed us to classify the bacterial strains into three general adhesion profiles. Group 1 consists of bacteria, which are able to form a solid biofilm in <2 h. Group 2 comprises the strains that progressively set up a biofilm during 24 h. Lastly, group 3 includes the strains that stay in a planktonic form. The grouping of our strains did not differ according to culture conditions, i.e., the use of different sets of beads or culture media. The BRT is shown to be an informative tool for the characterization of biofilm-forming bacteria. Various application perspectives may be investigated for this device, such as the addition of antibiotics to the bacterial suspension to select which would have the ability to inhibit the biofilm formation.

Pseudomonas aeruginosa, a Gram-negative rod-shaped bacterium, is an ubiquitous microorganism widespread in different environments, such as soil, water, plants, animals, and humans. This opportunistic pathogen often colonizes immunocompromised patients. It is largely involved in hospital-acquired infections, including pneumonia, burn, wound, urinary tract and gastrointestinal infections, otitis media, and keratitis (1). *P. aeruginosa* infections occur frequently in cystic fibrosis (CF) patients, and the presence of bacteria in airways is highly associated with poor lung function, morbidity, and mortality (2, 3). Once in CF lungs, *P. aeruginosa* is virtually impossible to eradicate, and despite the inflammatory response and intensive antibiotic treatments, infections caused by this pathogen persist. In fact, bacteria are able to survive in stressful environments by switching to the biofilm mode of growth (4).

Biofilms are structured communities of bacteria embedded in a self-produced matrix composed of exopolysaccharides, proteins, and extracellular DNA. Bacterial biofilms are notoriously known for their high resistance to antibiotics, disinfectant chemicals, and components of the innate and adaptive inflammatory defense system of the body (5).

Antibiotic tolerance in biofilms is 10- to 1,000-fold higher than in corresponding planktonic bacteria (6). Biofilm-reduced susceptibility to antibiotics arises from the combination of several mechanisms, including slow antibiotic penetration in the biofilm matrix, slow bacterial growth in an altered microenvironment (nutrient gradients and oxygen restriction), resort of quorum-sensing mechanisms by bacteria, and existence of a population of persister microorganisms (7, 8).

Several methods are available to measure bacterial biofilm adherence and to test biofilm susceptibility to antimicrobial agents (9). For the numeration of sessile bacteria after their surface detachment, culture (colony formation) and staining methods can be used, in addition to quantitative PCR (qPCR) and various microscopy techniques, such as epifluorescence and laser-scanning

confocal, transmission electron, and scanning electron microscopy (10–16).

A new technology called the BioFilm Ring Test (BRT) (BioFilm Control, Saint-Beauzire, France) was developed. The assay does not require any washing or staining steps, it is easy to handle, and above all, results can be obtained in a few hours. Briefly, a bacterial suspension is mixed with superparamagnetic microbeads. If a biofilm is forming, microparticles are embedded in the matrix and, after magnetization, are no longer detectable. Based on the measurement of this superparamagnetic microbead immobilization by adherent cells, the BRT can be used to assess the kinetics of biofilm formation and the ability of antibiotics to prevent it (17, 18).

Here, we used the device for the evaluation of bacterial biofilm formation by a collection of *P. aeruginosa* strains isolated from sputum samples of CF patients.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Twenty-five strains of *P. aeruginosa* isolated from the sputum of a cohort of CF patients were analyzed in this study. All strains were collected from patients of the CF Foundation

Received 5 November 2015. Returned for modification 7 December 2015.

Accepted 23 December 2015.

Accepted manuscript posted online 30 December 2015.

Citation: Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Jaulhac B, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. 2016. The BioFilm ring test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *J Clin Microbiol* 54:657–661. doi:10.1128/JCM.02938-15.

Editor: R. Patel

Address correspondence to François Jehl, jehl@unistra.fr.

Copyright © 2016 Olivares et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

(Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose) of the University Hospital of Strasbourg (France).

They were identified by mass spectrometry by using the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) Biotyper. Frozen cultures were then prepared in brain heart infusion (BHI) broth, supplemented by 10% (vol/vol) of glycerol, and stored at -80°C for further use. When experiments were planned, loopfuls of these frozen cultures were defrosted, spread on Drigalski agar plates, and incubated at 37°C for 24 h. From these subcultures, strains were maintained weekly on Drigalski agar plates, from one colony of the previous culture.

When an adhesion kinetic test was scheduled, strains were precultured the day before the experiment on a BHI or Mueller-Hinton (MH) agar plate.

Preparation of initial bacterial suspension. For each of the 25 bacterial strains included in the study, adhesion kinetic experiments were carried out with two culture media. The BHI medium is recommended by the manufacturer for BRT use, but the MH medium was also tested as it is officially recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for antimicrobial susceptibility testing on bacteria (19). Thus, some colonies from agar cultures were cautiously resuspended in 2 ml of sterile liquid medium. These solutions were employed to bring initial bacterial suspension (IBS) cultures to a final optical density adjusted to $1/250$ (4×10^6 CFU/ml) at 600 nm (OD_{600}). IBS was then used for kinetic tests carried out on the BRT device.

Bacterial adhesion assessment using BRT. Each of the 25 *P. aeruginosa* strains was tested to evaluate its adhesion capacity to polystyrene 96-well microplates using the BRT. To carry out these tests, microplates (12 columns of 8 wells), toner solution (containing magnetic microbeads), contrast liquid (an inert opaque oil used for the reading step), a block test (the magnet support), and the dedicated scan plate reader (a commercial Epson scanner modified for microplate reading) were used.

The toner solution was mixed for homogenization and added to each IBS to get a final concentration of $10 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$. Two sets of beads (toner 4 and toner 6) are available to test their impact on the biofilm formation ability of strains. They mainly differ in diameter, resulting in a variation in their sedimentation speed; therefore, this mixture was homogenized by vortexing, and 200 μl were loaded per well. One column was used for each *P. aeruginosa* strain tested (11 strains can be tested on a plate), and the last one was used as a control for bead migration (culture broth and toner solution without bacteria). Five plates were prepared for each incubation time tested (0, 2, 4, 6, and 24 h). The cultures were incubated at 37°C .

After incubation, wells were covered with $\sim 120 \mu\text{l}$ of contrast liquid. Plates were read before (I_0 image getting) and after (I_1 image getting) 1 min of magnetization using the block test and the scanner. The block test is made up of 96 minimagets, which are centered under the bottom of each well. After magnet contact, free beads are attracted toward the center of the wells, forming a brown spot, while beads embedded in a biofilm are blocked and remain undetectable. The adhesion ability of each strain was expressed as the biofilm index (BFI) according to dedicated software, the BioFilm Control Elements. The software compares the I_0 and I_1 images of each well and, through a mathematical algorithm, calculates a corresponding BFI value ranging from 0 to 30. Deduced BFIs are inversely proportional to the attached cell number. A high BFI value indicates high bead mobility under magnetic action that corresponds to the absence of biofilm formation (i.e., control wells), while a low value (~ 2) shows a complete immobilization of beads due to the sessile cells (no difference between well images I_0 and I_1).

Three independent experiments, with at least four replicates (four wells) by experiment for each strain and condition tested (toner sets and culture media), were carried out. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed on the resulting BFI data.

RESULTS

Tests of adhesion kinetics. For each test, adherence was measured at 0, 2, 4, 6, and 24 h. Three groups of strains emerged. The first

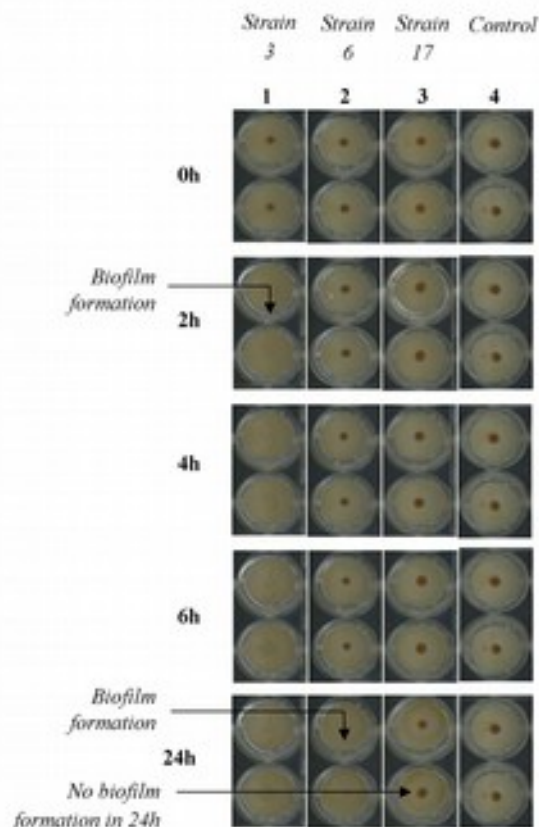


FIG 1 Kinetics of biofilm formation by three selected *P. aeruginosa* strains with the BioFilm Ring Test at different incubation times. Strip 4, controls with BHI medium and toner alone. Well images were obtained by scan of microplates with the plate reader after magnetization by the block test.

group included the strains that rapidly form a biofilm (in < 2 h). The second group included strains that form a biofilm slowly and progressively. The third group comprised strains that were not able to form a biofilm.

The kinetic profiles for three strains representative of these three groups (*P. aeruginosa* 3, 6, and 17, respectively) are presented in Fig. 1. Testing of controls consisting of sterile BHI medium with toner was performed to show that beads were freely mobile in the absence of sessile cells. All control wells, at any incubation times, were characterized by a centered brown spot after plate magnetization (Fig. 1, strip 4). This corresponds to the attraction and concentration of beads under magnetic action. Thus, shape or intensity variations of the spots in wells containing bacteria may be attributed only to the presence of microorganisms. For strain 3, spots visualized in the initial plate (0 h) had completely disappeared after 2 h incubation (Fig. 1, strip 1). For strain 6, brown spots were observed only at the beginning of the experiment (Fig. 1, strip 2). Due to the progressive adhesion of bacterial cells, the magnetic forces were not strong enough to attract beads at the well bottom or to overcome their trapping during biofilm formation. Thus, the spot intensity was reduced during the time experiment until its disappearance. Finally, the biofilm-negative strain 17 displayed brown spots throughout the kinetic analysis, showing that beads were always mobile under magnetic action and were not retained by potential sessile cells (Fig. 1, strip 3).

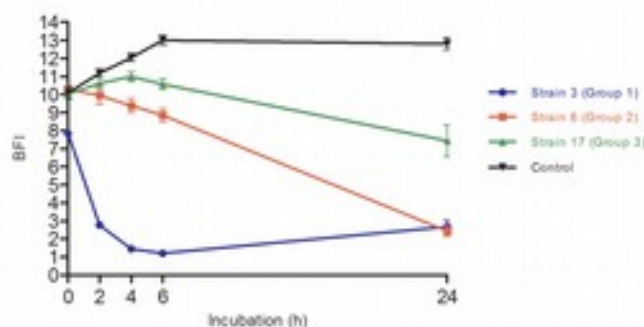


FIG 2 Biofilm formation by *P. aeruginosa* strains 3, 6, and 17 obtained after analysis of microplate images by the BioFilm Control Elements software. Control curve represents the BHI medium with toner condition. Results are expressed as BFI (biofilm index) as a function of incubation time. Analyses of results obtained by two-way ANOVA validated a significant difference between each point of the different strain curves. Bars, standard deviation obtained from 12 measurements obtained for each strain (3 independent experiments performed in quadruplicate).

The raw data interpretation of biofilm formation kinetics is shown in Fig. 2. As previously described, the plate images analyzed by the software gives a BFI value for each strain at each incubation point. When displayed as a function of time, this index gives a kinetic profile in concordance with the bead attraction during the magnetization step, reflecting the biofilm formation. Thus, a high BFI value (>8) reflects complete bead mobility corresponding to the absence of a biofilm, whereas a low value (≤ 2) reflects the complete immobilization of beads (embedded in the formed biofilm). The biofilm formation kinetics of the depicted strains differentiated three adhesion behaviors. Strain 3 formed a strong biofilm in <2 h incubation (BFI <3 at 2 h), and this biofilm persisted until the end of the kinetic measurement. Strain 6 displayed a progressive decrease in BFI values, reflecting slower but constant biofilm formation. Finally, for strain 17, BFI values remained at >8 throughout the experiment, showing that this strain was not able to adhere to the microplates. Bacteria grew in suspension in the medium in a planktonic state.

All of the *P. aeruginosa* strains of the collection, originating from CF patients, were classified in one of these three adhesion profiles. Among the 25 strains tested, 7 formed a strong biofilm in <2 h (adhesion profile 1), only 4 strains of the collection did not form a biofilm after 24 h incubation (adhesion profile 3), and more than half (14) of the collection strains formed a biofilm in a progressive manner during 24 h (adhesion profile 2) (data not shown).

Moreover, the good reproducibility of three independent experiments showed that these adhesion profiles were a conserved feature by each strain. Standard deviations on graphs were representative, for each analysis point, of 12 BFI measurements (four replicates by test).

Effects of the toner solution on biofilm formation. Another set of microbeads (toner 6) was tested in regard to the adhesion kinetics of the 25 *P. aeruginosa* strains. This toner solution differed in bead diameter from the one used initially (toner 4). Results for strains 4, 9, and 12, belonging to adhesion profiles 1, 2, and 3, respectively, are shown in Fig. 3.

Mostly, the size of beads did not interfere in the adherence ability of bacteria. No significant differences were revealed be-

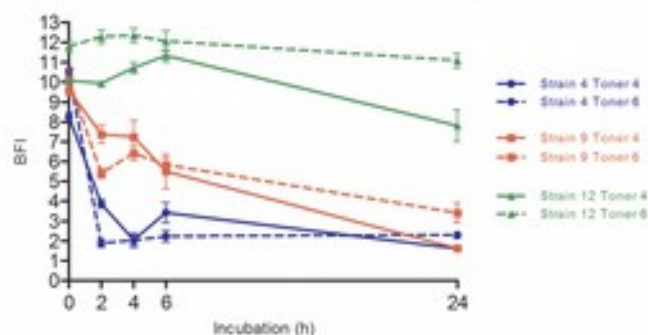


FIG 3 Adhesion kinetics of *P. aeruginosa* strains 4, 9, and 12 with two sets of paramagnetic microbeads (toner 4 and toner 6). Results were obtained after analysis of microplate images by the BioFilm Control Elements software and are expressed as BFI (biofilm index) as a function of incubation time. Analyses of results obtained by two-way ANOVA validated a statistically significant difference between each point of the different strain curves. Conversely, changing microbead sets did not implicate such significant differences between toner curves for the same strain. Bars, standard deviation obtained from 12 measurements obtained for each strain (3 independent experiments performed in quadruplicate).

tween experiments carried out with the two toner solutions. Indeed, for a given strain, the two adhesion curves were nearly superimposed (Fig. 3). This concordance between the two toner solutions was observed for all 25 *P. aeruginosa* strains (data not shown).

Effects of the culture medium on biofilm formation. The BHI medium is theoretically recommended by the manufacturer for experiments carried out with the BRT device. The MH medium, which is officially recommended by EUCAST for the realization of antimicrobial susceptibility testing on bacteria, was used for comparison (19). An example of results obtained with strains 11, 14, and 17 (belonging to adhesion profiles 1, 2, and 3, respectively) is shown in Fig. 4. These culture media did not influence the bacteria adhesion capacity. These concordant behaviors between the media were found for the whole *P. aeruginosa* collection (data not

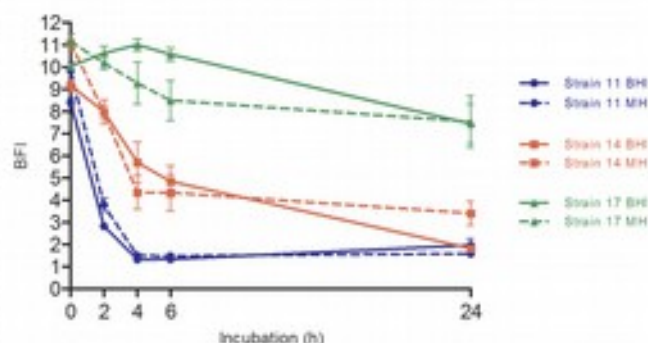


FIG 4 Biofilm formation kinetics of *P. aeruginosa* strains 11, 14, and 17 in two culture media (BHI and MH). Results were obtained after analysis of microplate images by the Biofilm Control Elements software and are expressed as BFI (biofilm index) as a function of incubation time. Analyses of results obtained by two-way ANOVA validated a statistically significant difference between each point of the different strain curves. Conversely, changing media did not implicate such significant differences between the two different curves for the same strain. Bars, standard deviation obtained from 12 measurements obtained for each strain (3 independent experiments performed in quadruplicate).

shown). Therefore, results obtained using BHI medium can be correlated with those obtained using MH.

DISCUSSION

Currently, a limited number of methods are available to detect biofilm formation by bacteria. The conventional methods are usually quantification by staining (e.g., crystal violet [CV] test) or observation by microscopy (9–14). However, staining is a tedious technique with washing steps that may lead to the detachment and loss of sessile bacteria. Similarly, the use of microscopy techniques is arduous because it requires delicate steps for sample preparation. This explains why these standard methods are not adapted for routine use.

In our hands, the BRT device allowed the classification of *P. aeruginosa* strains in three profiles according to their adhesion ability. Comparison with the CV assay was done with eight replicates for each strain at each sampling time. The adhesion profiles detected by the CV method were exactly the same as those detected by the BRT (data not shown).

Moreover, in order to assess the performance and reliability of the BRT, experiments of adhesion kinetics were performed three times for each strain with four replicates by test. Note that use of the BRT device requires very few manipulations aside from the initial bacterial suspension preparation. Therefore, the very low standard deviation obtained and the features, including less time required and less handling compared to the standard methods, are key arguments for device certification.

Finally, as mentioned by Chavant et al. (17), it is important to test various conditions to confirm the robustness of this new technology. Results obtained with another culture medium (MH) and another microbead set (toner 6) led to similar trends concerning the adhesion ability of the strains, strengthening the predictability of the BRT.

Many perspectives of utilization of this methodology are under investigation in our laboratory. The addition of various antibiotics to wells to perform an Antibiofilmogram test may enable detection of the ability of a given molecule to inhibit or delay biofilm formation. Indeed, Antibiofilmograms may soon be used for antimicrobial susceptibility testing in diagnostic laboratories to complete data obtained from conventional antibiograms (20). These experiments are under way. First trends confirm that it may be possible to find antibiotics that are inhibitors of biofilm formation in a strain-dependent manner.

Another potential use of the BRT is for detection of the inducer effects of some antibiotics on the setting up of biofilm by a strain that initially does not form one. The clinical impact of such results would be considerable if they enable discarding the use of inappropriate antibiotic treatments that would lead to biofilm formation in CF patients. Owing to the fact that *P. aeruginosa* in a sessile mode in lungs is responsible for the general deterioration of patients, it seems very important to confirm and study these observations in more detail.

Other experiments are planned to determine whether the acquisition of the biofilm formation phenotype by bacteria following antibiotic treatment is an irreversible phenomenon.

Macrolides are also known to reduce *P. aeruginosa* activity by acting on the quorum sensing or the bacterial motility (21, 22). It may be interesting to evaluate the impact of this class of antibiotics, when added to any other class of antimicrobials, on the setting up of biofilm in our strains.

Finally, the results obtained here are specific to *P. aeruginosa* isolated from CF patients and cannot be extrapolated to other species. The use of rich media for cell growth does not reflect the natural environment of bacteria. Nevertheless, they are unavoidable since the usual clinical microbiological *in vitro* tests (classic antibiograms) are performed with rich medium (MH, BHI).

In conclusion, the BRT appears to be a relevant method for determination of the ability of *P. aeruginosa* to initiate the formation of a biofilm. In the near future, after certification, the device may be used to estimate antibiotic susceptibilities on sessile bacteria by carrying out Antibiofilmogram tests.

ACKNOWLEDGMENTS

T.B., C.P., and S.B.-B. are members of BioFilm Control SAS, Saint-Beauzire, France.

A CIFRE fellowship from BioFilm Control for E.O. is gratefully acknowledged.

FUNDING INFORMATION

CIFRE fellowship provided funding to Elodie OLIVARES under grant number 2013/12042013. Fonds Unique Interministériel (FUI) provided funding to Thierry Bernardi.

This work was partly supported by a grant from the 15th Fonds Unique Interministériel (FUI) call for projects.

REFERENCES

- Sousa AM, Pereira MO. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs: a review. *Pathogens* 3:680–703. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens3030680>.
- Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. 2014. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* 3:32. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-2994-3-32>.
- Kerr KG, Snelling AM. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 73:338–344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15:194–222. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002>.
- Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PO, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 3:55. <http://dx.doi.org/10.4248/IJOS11026>.
- Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, MacLeod C, Aaron SD, Harbour C. 2005. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 43:5085–5090. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.10.5085-5090.2005>.
- Stewart PS. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292:107–113. <http://dx.doi.org/10.1078/1438-4221-00196>.
- Stewart PS, William Costerton J. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135–138. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).
- Pantanello F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig* 25:31–42. <http://dx.doi.org/10.7416/ai.2013.1904>.
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 15:305–311. [http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70197-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70197-0).
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Mi-*

- Microbiol Methods 72:157–165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>.
12. Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ. 2005. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods* 63:287–295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.014>.
 13. Thurnheer T, Gmür R, Guggenheim B. 2004. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J Microbiol Methods* 56:37–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.003>.
 14. Gula G, Waszczuk K, Olszak T, Majewska J, Sarowska J, Gotszalk T, Gutowicz J, Drulis-Kawa Z. 2012. Piezoelectric tuning fork based mass measurement method as a novel tool for determination of antibiotic activity on bacterial biofilm. *Sensors Actuators B Chem* 175:34–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.11.044>.
 15. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 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.
 16. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 37:318–326.
 17. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* 68:605–612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.010>.
 18. Sulaeman S, Le Bihan G, Rossero A, Federighi M, Dé E, Tresse O. 2010. Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test[®]. *J Appl Microbiol* 108:1303–1312. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04534.x>.
 19. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 20:O255–O266. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12373>.
 20. Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 49:1749–1755. <http://dx.doi.org/10.1086/647952>.
 21. Wozniak DJ, Keyser R. 2004. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 125:62S–69S. http://dx.doi.org/10.1378/chest.125.2_suppl.62S.
 22. Bala A, Kumar R, Harjai K. 2011. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. *J Med Microbiol* 60:300–306. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.025387-0>.

Chapitre 4

Inhibition de la formation de biofilm par les aminosides

ARTICLE 2

Tobramycin and amikacin delay adhesion and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates

Auteurs : Olivares Elodie, Badel-Berchoux Stéphanie, Provot Christian, Jaulhac Benoît, Prévost Gilles, Bernardi Thierry, Jehl François.

Statut de l'article : Publié

Revue : Frontiers in Microbiology

Objectifs de l'étude : Comme il a déjà pu être proposé à la suite de notre première étude, le BRT, en tant que nouvel outil de diagnostic, semble pouvoir s'incorporer facilement dans la routine d'un laboratoire hospitalier. La réalisation d'un Antibiofilmogramme®, appréciant la cinétique d'adhésion d'un prélèvement bactérien sessile en contact de diverses concentrations d'antibiotiques, fournirait des données complémentaires à l'antibiogramme standard, affinant ainsi la sélection thérapeutique.

Dans le cadre de nos recherches, nous avons donc procédé à la réalisation d'Antibiofilmogrammes® sur certaines de nos souches cliniques appartenant au profil d'adhésion 2, afin de tester l'impact, à diverses concentrations, de deux aminosides sur l'initiation précoce de l'adhésion bactérienne. En effet, l'amikacine et la tobramycine demeurent actuellement des molécules de premier choix pour le traitement des infections chroniques pulmonaires contractées au cours de la mucoviscidose. La méthodologie du BRT a également été comparée à la méthode plus conventionnelle de marquage du biofilm au CV. Finalement, il a aussi été proposé de tester l'effet des aminosides sur un biofilm développé par l'intermédiaire d'un modèle cellulaire clinique afin de vérifier que le comportement des bactéries aux antibiotiques n'était pas une réponse spécifique de l'adhésion microbienne à une surface abiotique.

Résultats : L'analyse de deux souches cliniques *P. aeruginosa*, spontanément productrices de biofilm sur 6h d'incubation, en Antibiofilmogrammes®, a révélé que l'amikacine et la tobramycine étaient capables de retarder l'adhésion bactérienne, à diverses concentrations.

Pour la proposition d'une comparaison inter-méthodes, la technique de marquage des cellules adhérentes au CV a été appliquée. Le même potentiel inhibiteur des aminosides sur la formation du biofilm, a été retrouvé lors de l'analyse de nos deux souches *P. aeruginosa*. Finalement, afin de se rapprocher au mieux de la réalité pathologique de la mucoviscidose, nous avons mis au point un système de co-culture tissulaire permettant à nos isolats cliniques de croître sous forme de biofilm, directement à la surface de cellules épithéliales pulmonaires mucoviscidosiques. Spontanément, nos souches cliniques ont été

capables d'adhérer au tapis cellulaire et d'y former des microcolonies à structure tridimensionnelle. L'application de ce modèle cellulaire de co-culture statique permet la quantification de la biomasse bactérienne adhérente, mais également le marquage et la visualisation microscopique par fluorescence du biofilm. Là encore, l'amikacine et la tobramycine ont montré un effet délétère sur la viabilité bactérienne et la formation d'une matrice extracellulaire protectrice.

Conclusion : La synthèse de l'ensemble des résultats récoltés par l'intermédiaire de ces trois tests *in vitro* fondamentalement différents confirme la capacité des aminosides à retarder la mise en place d'un biofilm par des isolats cliniques mucoviscidosiques de *P. aeruginosa*. En plus de confirmer l'impact bénéfique des aminosides sur l'initiation de l'adhésion bactérienne, cette étude conforte la relevance de l'Antibiofilmogramme® en diagnostic clinique et son utilité dans la détermination standardisée de la Concentration Minimale Inhibitrice du biofilm (CMIb).



Tobramycin and Amikacin Delay Adhesion and Microcolony Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates

Elodie Olivares^{1,2*}, Stéphanie Badel-Berchoux², Christian Provot², Benoît Jaulhac¹, Gilles Prévost¹, Thierry Bernardi² and François Jehl¹

¹ Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, CHRU Strasbourg, Institut de Bactériologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, ² BioFilm Control SAS, Saint-Beauzire, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Sara María Soto,
ISGlobal, Spain

Reviewed by:

Devendra Hiranjan Dusane,
The Ohio State University,
United States
Giovanni Di Bonaventura,
Università degli Studi "G. d'Annunzio"
Chieti - Pescara, Italy

*Correspondence:

Elodie Olivares
olivares.elodie@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 24 April 2017

Accepted: 27 June 2017

Published: 11 July 2017

Citation:

Olivares E, Badel-Berchoux S,
Provot C, Jaulhac B, Prévost G,
Bernardi T and Jehl F (2017)
Tobramycin and Amikacin Delay
Adhesion and Microcolony Formation
in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic
Fibrosis Isolates.
Front. Microbiol. 8:1289.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01289

Cystic fibrosis (CF) patients are predisposed to chronic colonization of the major airways by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Pulmonary infections, involving sessile bacteria, are the main cause of morbidity and mortality. As the eradication of antibiotic-resistant biofilms remains impossible, one key objective for the treatment of lung infections is to delay the switch of *P. aeruginosa* to a sessile phenotype. Few tools are currently available in hospital laboratories to evaluate the susceptibility of adherent microorganisms to antimicrobials. In this study, we used the Biofilm Ring Test[®], for the achievement of Antibiofilmograms[®] on CF clinical isolates. In comparison to standard antibiograms, these procedures allow the investigation of antibiotic effects on the biofilm formation by bacteria. To confirm the inter-assay reproducibility, conventional Crystal Violet assays were performed. To mimic the pathologic reality of CF, we also used a model allowing the biofilm growth on CF-derived cells. Results obtained from these three different assays showed that amikacin and tobramycin, the two favored aminoglycosides in CF therapies, were able to prevent the early adhesion of *P. aeruginosa* isolates. This promising inhibitory effect of antimicrobials confirm that biofilm setting up is governed by adaptive responses and depends on environmental conditions, as opposite processes of biofilm induction by aminoglycosides were previously described in literature. Finally, Antibiofilmograms[®], whose given results are in concordance with other *in vitro* antibiotic susceptibility testing, appear to be useful for the optimisation of CF therapies by the selection of antimicrobials able to delay chronic infection establishment.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, biofilms, aminoglycosides, Biofilm Ring Test, Antibiofilmograms, Crystal Violet, cell culture

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most common inherited genetic disorder in Caucasian populations (Lyczak et al., 2002). The pathology is bought by mutations in the gene for CF Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) protein. Initially, CFTR is involved in production of sweat, digestive fluids and mucus. In the CF lungs, the chloride transport defect, caused by non-functional proteins, results in altered airway physiology, impairment of mucociliary clearance and production

of thick mucus plugs. Consequently, CF individuals are predisposed to chronic pulmonary microbial infections, which lead to respiratory failure, the primary cause of patient death (Davies et al., 2007; Farrell et al., 2017).

Pseudomonas aeruginosa is the most frequent microorganism establishing chronic lung infections beyond infancy, in people with CF (Bhagirath et al., 2016). Indeed, this opportunistic pathogen possesses features that contribute to its adaptation and persistence in the CF lungs, despite the availability of aggressive use of antibiotics (Høiby et al., 2001). One of the main reasons explaining the resistance of *P. aeruginosa* in the lower tract of CF patients is its ability to grow as a biofilm (Moreau-Marquis et al., 2008b).

This bacterial gathering, associated to the production of a protective polysaccharide matrix, renders microbial cells intrinsically more resistant to environmental agents and antimicrobials. The general principle of biofilm formation is the result of global regulatory modifications within the bacterium. The specific environment found in CF lungs seems to act as a stress signal governing the transition between acute (bacterial planktonic state) and chronic infections (bacterial sessile state) (Ciofu et al., 2015).

The aminoglycosides are an important class of antibiotics used to treat chronic bacterial infections, in particular lung infections. Among them, the superior activity of tobramycin (TOB) against *P. aeruginosa* makes it the preferred aminoglycoside for treatment of lung infections in CF. TOB by inhalation is often considered in first line for the eradication of early *P. aeruginosa* infections and for chronic therapies (Elborn et al., 2009). Amikacin (AMK) is also a good candidate as strains that are resistant to multiple other aminoglycosides tend to be susceptible to it. Its antimicrobial activity spectrum is the broadest of the group (Ehsan and Clancy, 2015).

The treatment of biofilm-involving infections is often poorly effective. Antibiotic susceptibility testing is traditionally performed on growing planktonic cells. Thus, antimicrobial selection does not take into account the common sessile growth of bacteria and antibiotic therapies cannot be effective on *in vivo* microbial biofilms (Ciofu et al., 2015). The development of clinical assays, evaluating the susceptibility of sessile microorganisms to antimicrobials, becomes essential particularly for the treatment of biofilm-associated infections as in CF (Moskowitz et al., 2011; Hurley et al., 2012).

The aim of the study was to evaluate the effects of AMK and TOB on the initiation of the biofilm formation by *P. aeruginosa* CF isolates, with the Biofilm Ring Test® (BRT) system. This device allows the evaluation of the bacterial adhesion and the investigation of the antibiotic effect on the biofilm setting up (Antibiofilmogram®) (Olivares et al., 2016). Interestingly, prevention phenomena of bacterial adhesion were reported with various concentrations of AMK and TOB. Crystal Violet (CV) assay was also used as a comparison (Christensen et al., 1985; Stepanović et al., 2000). Finally, to attest that the delay of the biofilm formation initiation by the two aminoglycosides was not a specific response of the bacterial adhesion on abiotic surfaces, we also used a clinically more relevant cell model. The antibiotic effects were evaluated through a tissue culture-based

system allowing the biofilm formation on CF airway epithelium (Anderson et al., 2008; Moreau-Marquis et al., 2010).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

Initially, 25 strains of *P. aeruginosa* were isolated from sputum of CF anonymized patients. They were collected from the CF foundation (Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose) of the University Hospital of Strasbourg (France). A previous study allowed to classify them in three adhesion profiles according to their adherence ability and their speed of biofilm formation (Olivares et al., 2016). In this work, we focused on intermediate strains, namely the ones, which are able to progressively adhere within 6 h of incubation. In this way, two strains were selected for the following experiments: the strain #1 and the strain #24 of our clinical collection.

Antibiotic Panel Selection

Two aminoglycosides, amikacin (AMK) and tobramycin (TOB) were used. Their Minimal Inhibitory Concentration (MIC) were determined on strains #1 and #24 by gradient diffusion strips (Etests, Biomérieux, France), following supplier's indications (Marley et al., 1995).

Their effect on sessile cells was investigated at three concentrations: MIC, subMIC (half MIC) and a so-called "PK/PD" concentration (Jehl and Koebel, 2011). The latter is the concentration that allows the adequate PK/PD parameter relevant for aminoglycosides to reach their target. Indeed, the required concentration for optimal efficacy of aminoglycosides is 10 times the MIC. All the corresponding concentrations are summarized in the **Table 1**.

Antibiofilmograms®

Antibiofilmogram® consists in the characterisation of adhesion kinetics of bacteria in the presence of a given concentration of various antibiotics.

For BRT experiments, a fresh overnight culture of bacteria, grown on Brain Heart Infusion (BHI) agar plate, was used to inoculate 2 mL of sterile BHI medium. After determination of its OD_{600nm}, Initial Bacterial Suspension (IBS) was prepared to an optical density adjusted to 1/250 (to reach approximately 10⁶ CFU/mL) in BHI medium, containing a final concentration of 10 µL/mL of the magnetic beads suspension (Pack BIOFILM Ring Test, Biofilm Control, Saint-Beauzire, France). 96-well polystyrene plates were inoculated with 200 µL/well of IBS after being loaded with 20 µL of antibiotic concentrations (**Table 1**). The U-bottom sterile microplates were directly provided by Biofilm Control. They are specifically not treated, enabling an optimal adhesion of microorganisms. One plate was prepared for each read incubation time (adhesion kinetics with antimicrobials were analyzed at 0, 2, 4, and 6 h).

Controls of spontaneous adherence of bacteria (without antibiotics) and migration of beads (medium without bacterial strains) were also prepared in each plate. After static incubation at 37°C, few drops of contrast liquid (inert opaque oil) were

TABLE 1 | Aminoglycoside concentrations tested on *P. aeruginosa* strains in Antibiofilmograms®, crystal violet and cell culture assays.

	($\mu\text{g/mL}$)	Strain #1	Strain #24
AMK	MIC	6	12
	subMIC	3	6
	PK/PD	60	120
TOB	MIC	0.75	0.5
	subMIC	0.375	0.25
	PK/PD	7.5	5

Antibiotic MIC is initially determined by E-tests. The effect of two others concentrations, on the bacterial adhesion, was investigated. The subMIC one corresponds to half of MIC and the PK/PD one reflects 10 times the MIC (in vivo efficacy of peak serum concentration).

used to cover wells. Then, plates were magnetized 1 min with the block carrying 96 mini-magnets (Block test) and scanned with the BIOFILM Reader.

The adhesion strength of bacterial cultures with/without aminoglycosides was expressed as BioFilm Index (BFI), a score of beads aggregation. Briefly, a high BFI value signs bead mobility during magnetization step, namely no biofilm formation, while a low value shows a full bead immobilization due to the presence of sessile cells (Chavant et al., 2007).

Bacterial cultures supplemented with antibiotic concentrations were analyzed in six replicates to assess repeatability and precision of the Antibiofilmogram®. Two-way ANOVA analyses were applied to statistically compare resulting BFI data.

Biofilm Detection with Crystal Violet (CV) Assay

For CV assays, the IBS were prepared in similar way as for BRT protocol and the microplates used were the ones provided by Biofilm Control. Sterile 96-well polystyrene plate was inoculated with 200 μL of IBS (10^6 CFU/mL) in BHI medium and incubated for 6 h at 37°C. Twelve replicates for bacterial and antibiotic conditions were analyzed. After incubation, medium containing non-adherent cells was removed and wells were washed two times with 250 μL of sterile water. The plate was vigorously shaken during washing steps to remove all planktonic bacteria. The remaining adherent bacteria were stained with 250 μL of CV solution (0.1%) during 15 min. Then, the dye was removed and the wells washed three times with 250 μL of sterile water. From this step, adhesion of bacteria can be macroscopically visible in wells. Finally, the CV bound to the sessile cells was dissolved by 250 μL of acetic acid (30%) and the absorbance was measured at 540_{nm} by using the automated reader Micronaut Skan (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany). One-way ANOVA analyses were applied to statistically compare resulting OD values. We also defined a simple classification of our bacterial cultures according to their adherence ability, based on our experimental observations and measurements. First, the average OD values and standard deviations should be calculated for all tested conditions and negative controls. Second, the specific OD (OD_s) should be established for bacterial cultures. It was defined as the mean OD of the condition subtracted by the mean OD of

the negative control (BHI medium here). These final OD values were then compared to the mean OD of the negative control, as follows: $\text{OD}_s \leq \text{OD}_{\text{negative control}} + \text{SD}$ = non-adherent cells and $\text{OD}_s > \text{OD}_{\text{negative control}} + \text{SD}$ = biofilm producer.

Static Co-culture Biofilm Assay

To be closer to pathogenic reality of the CF, we adapted the tissue culture system of Anderson et al. (2008) to evaluate the adhesion of our clinical isolates on viable cells and the aminoglycoside effect on this biofilm formation (Moreau-Marquis et al., 2010). *P. aeruginosa* biofilms were grown on CF-derived human airway cells (CFBE41o⁻). This continuous cell line was generated by the transformation of bronchial epithelial cells collected in a CF patient, homozygous for the ΔF508 mutation of CFTR (Ehrhardt et al., 2006). Initially, epithelial cells were seeded at a concentration of 4.5×10^5 cells/well in 24-well tissue culture plates or 7.5×10^5 cells/well in 6-well tissue culture plates. They were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) – 1640 medium (Dutscher SAS, Brumath, France) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-Glutamine, 10 U/mL penicillin and 10 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin. The cells were grown at 37°C and 5% CO₂ until they form a confluent monolayer.

For bacterial inoculation, a fresh overnight BHI broth culture was prepared. The culture medium from CFBE41o⁻ cells was removed and they were washed three times with RPMI or phosphate-buffered saline (PBS). Afterward, they were inoculated with the bacterial suspension (+/- concentrations of aminoglycosides) in RPMI medium with L-Glutamine, at a Multiplicity Of Infection (MOI) of approximately 30:1, relative to the number of epithelial cells originally seeded. The co-cultures were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 6 h.

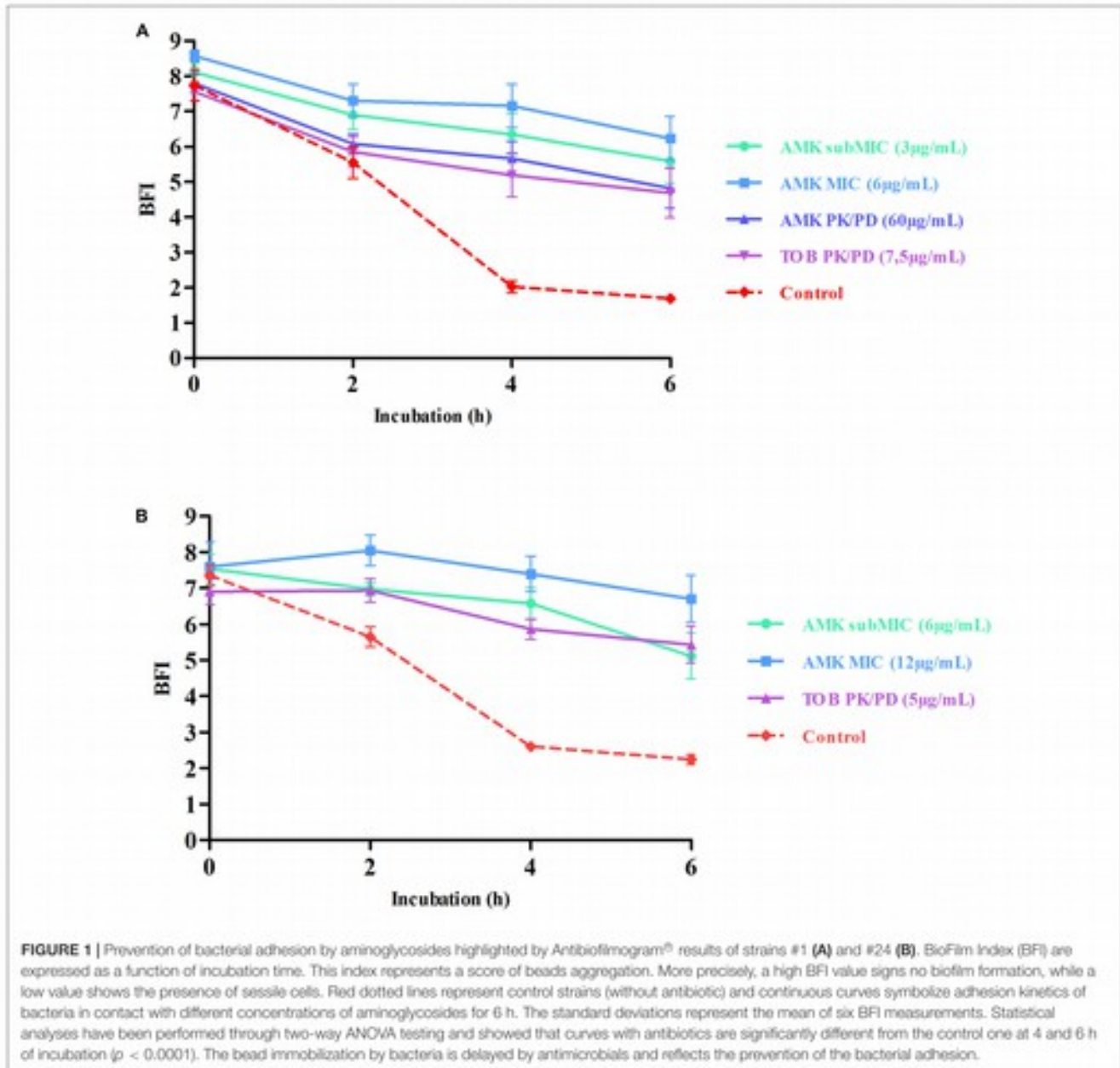
To determine the number of CFU in the biofilm, the medium containing planktonic bacteria was removed and cells were washed two times with PBS. Then, remaining co-cultures were treated with trypsin-EDTA to detach the cells and the associated adherent bacteria. The lysates were serially diluted and plated on BHI agar to perform a standard bacterial count. One-way ANOVA analyses were applied on resulting CFU/mL data for the statistical study of results.

Alternatively, calcofluor staining can also be achieved to observe biofilm structures developed on cell monolayer. Biofilm staining was assessed by fluorescence microscopic examination (Olympus System Microscope Model BX60 with immersion objective $\times 40$), after incubation of washed co-cultures with calcofluor 1% for 30 min.

RESULTS

Evaluation of Aminoglycoside Effect on Early Bacterial Adhesion by Antibiofilmograms®

The realization of Antibiofilmograms®, through the BRT device, allows the ability evaluation of antimicrobials to prevent the growth of bacteria in a sessile state, conducting to the formation



of a biofilm. Results of assays testing aminoglycoside effects on strains #1 and #24 are presented in **Figure 1**. The control curves confirmed the spontaneous progressive adhesion of bacteria. For the two strains, the gradual immobilization of magnetic beads by the biofilm formation initiation is reflected by the decrease of the BFI values during the time experiment (a BFI value near of 2 represents a complete sessile state). Conversely, the use of AMK and TOB at different concentrations slowed down the adhesion of bacteria, as shown by higher BFI values, starting from 4 to 6 h of incubation. Result analyses by two-way ANOVA testing validated a statistically significant difference between points of antibiotic curves and the control ones at 4 and 6 h of incubation ($p < 0.0001$).

Effects of antimicrobials belonging to antibiotic families of β -lactams and fluoroquinolones were also evaluated with the BRT device. Results showed that none of them prevented or reduced the progressive adherence of bacteria (data not shown). The only significant effects obtained with our two clinical strains were the inhibitory process of bacterial adhesion by aminoglycosides.

Categorical Concordance of Antibiofilmogram® Results with CV Staining

The spontaneous adhesion by clinical isolates and its prevention by aminoglycosides were further assessed by the CV assay. The

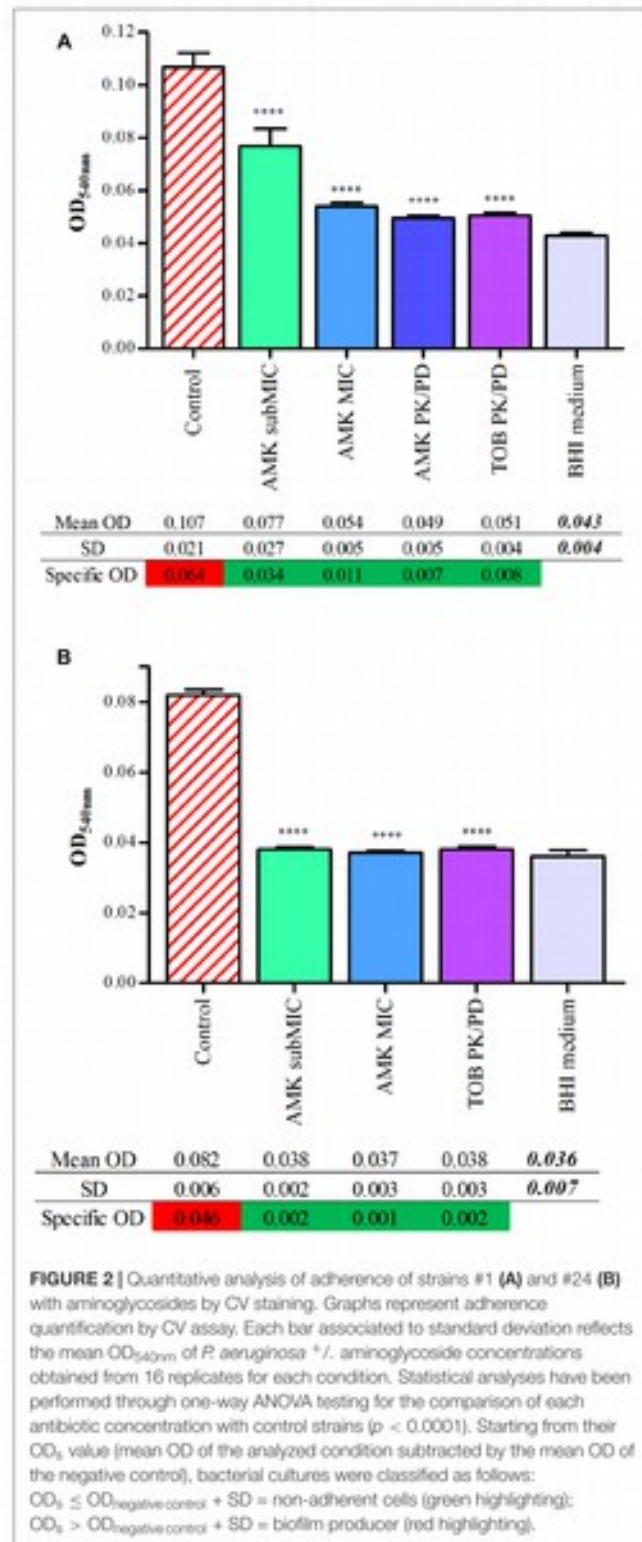
average light absorbance of biofilms formed by *P. aeruginosa* strains, associated with AMK and TOB, are represented in **Figure 2**. Raw data of OD_{540nm}, reflecting the CV bound by sessile cells, showed that strains #1 and #24 adhere spontaneously after 6 h of incubation, as for controls of Antibiofilmograms[®]. A drop of OD values, allowing their reclassification as non-adherent cells, was observed for cultures of bacteria with antibiotics. The statistical analysis of the OD_{540nm} means confirmed a significant difference of CV bound between control strains and cultures with AMK and TOB ($p < 0.0001$). These results attest that aminoglycosides, at the tested concentrations, limit the adhesion of bacteria.

A general agreement was recorded between CV and Antibiofilmogram[®] assays concerning the ability of aminoglycosides to delay the initiation of the biofilm formation by clinical *P. aeruginosa* strains.

Bacterial Adhesion Prevention and Biomass Reduction on CFBE41o⁻ Cells

The inhibitory effect of AMK and TOB on bacterial adhesion was investigated on CF-derived cells. The bacterial numerations, reflecting the number of adherent bacteria bound to the cell layer after 6 h of incubation, are expressed in **Figure 3**. Similar bacterial behaviors to those previously observed with BRT and CV assays were confirmed for strains #1 and #24. First, bacteria were spontaneously able to adhere to the cell monolayer. The initial inocula for the two control strains reflect more than 3×10^7 CFU/mL for strain #1 and 7.5×10^7 CFU/mL for strain #24. For bacterial cultures with antibiotics, a decrease of adherent biomasses was observed. The drop of bacterial counts can reach more than one log for the highest antibiotic concentrations. Compared with spontaneous adhesion of control strains, a statistically significant reduction of the biomass was observed with concentrations of aminoglycosides equal to MIC and PK/PD values. No effect of the subMIC concentration of AMK was observed on bacterial adherence with the strain #1.

The staining of cultures with calcofluor was simultaneously performed to verify that the decrease of bacterial adhesion observed with aminoglycosides is correlated to a reduction of microcolony establishment. Briefly, calcofluor is a fluorescent stain able to bind structures containing cellulose and chitin and more generally polysaccharides. In biofilm studies, its use is appropriate for the slime detection. Fluorescence microscopy revealed clusters of *P. aeruginosa* cells scattered across the epithelial cell monolayer for the control strains #1 and #24 (**Figures 4A,F**, respectively). These clusters appeared to be attached to the cells and exhibited a 3D-structure. Moreover, in comparison of the flat layer of epithelial cells, these bacterial clusters were strongly stained with calcofluor, suggesting the presence of a polysaccharide matrix. These morphological observations showed that the strains #1 and #24 were able to initiate a biofilm formation on the CFBE41o⁻ cells. These results confirmed once again the spontaneous sessile state of bacteria, observed with BRT, CV and bacterial enumeration experiments. As for CFU counts, a decrease of stained-biofilm structures was observed for cultures with antibiotics (**Figures 4B-E** for strain



#1, **Figures 4G-I** for strain #24). The average number and the size of observed clusters decreased significantly with the highest concentrations of AMK and TOB. For the PK/PD ones, the

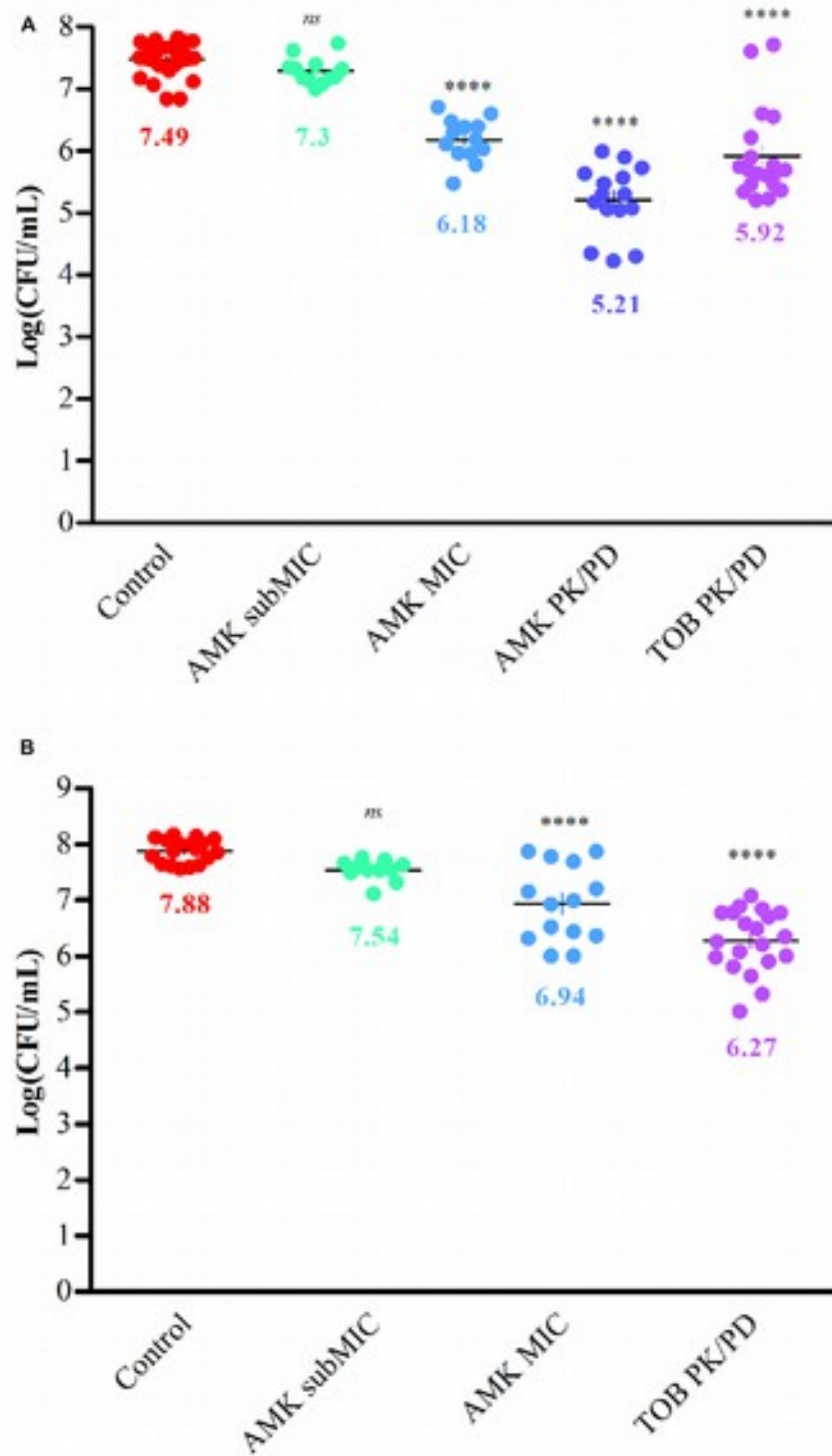


FIGURE 3 | Reduction of bacterial biomasses adhered to CFBE410⁺ cells by aminoglycosides for strains #1 **(A)** and #24 **(B)**. Scatter plots represent counts of *P. aeruginosa* colonies $\times 10^7$ various concentrations of aminoglycosides after a 6h-culture with CFBE410⁺ cells. Bacterial numerations are expressed as log CFU/mL. The spontaneous adhesion of control strains to the cell monolayer is confirmed (> 7log). A decrease of the adhered bacterial biomass was observed with aminoglycosides. Data reflect three independent co-culture experiments and statistical analyses have been performed through one-way ANOVA testing for the comparison of each antibiotic concentration with control strains ($p < 0.0001$).

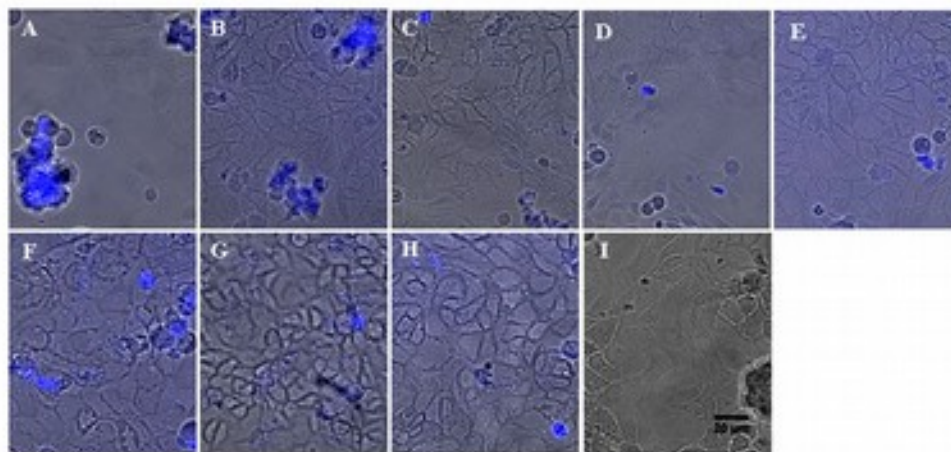


FIGURE 4 | Representative images of *P. aeruginosa* microcolonies grown on confluent human CF-derived cells after 6 h of incubation, in absence or presence of aminoglycosides. Spontaneous formation of microcolonies by strains #1 (A) and #24 (F) was assessed on CFBE410⁺ cells by epifluorescence microscopy. Blue fluorescence resulted from the staining of the bacterial polysaccharide matrix with calcofluor. Image is an overlay of the phase contrast channel and the fluorescence channel. The observation plane was focused on the cell monolayer, explaining why the bacterial 3D-structures located above appeared somewhat blurred. Addition of AMK at subMIC (B for strain #1 and G for #24), MIC (C for #1 and H for #24) and PK/PD concentrations (D for #1) prevented the formation of bacterial clusters. In the same way, the PK/PD concentration of TOB inhibited the bacterial adhesion on epithelial cells (E for #1 and I for #24). Scale bar, 20 μ m.

clusters were even flat and seemed to be an early gathering of bacteria (Figure 4E for strain #1, Figure 4I for strain #24). Fluorescence observations confirmed the prevention of the early bacterial adhesion by aminoglycosides and were an additional proof of agreement of previous results obtained with *in vitro* CV and Antibiofilmogram[®] assays.

DISCUSSION

Pulmonary infections are the main cause of morbidity and mortality in patients with CF. The lung colonization is essentially dominated by *P. aeruginosa*, which grows in a sessile state. This biofilm formation leads to a chronic inflammation in the airways and owing to its antimicrobial resistance, makes eradication of the infection impossible (Moreau-Marquis et al., 2008b; Bhagirath et al., 2016). As common antibiotic susceptibility testing do not indicate the tolerance of biofilm-growing bacteria, the development of laboratory assays, taking into account the *in vivo* sessile state of microorganisms is essential. This kind of diagnostic tools could be easily incorporated in routine clinical laboratory testing to provide complementary data for the antibiotic selection.

Antibiofilmograms[®] allowed the study of adhesion kinetics of sessile bacteria and the evaluation of their susceptibility to antimicrobials through the BRT device. In our study, realization of these assays showed that our *P. aeruginosa* clinical strains are susceptible to various concentrations of AMK and TOB, two molecules considered as antimicrobials of first choice for treatment of pulmonary infections in CF. Both aminoglycosides delayed the initiation of the biofilm formation by bacteria.

These results were confirmed by the conventional CV assay. Finally, the inhibitory effect of aminoglycosides was confirmed

with CF-derived cells. Only one discriminating result was noticed between the three applied methodologies: the inhibitory potential of the subMIC concentration of AMK on the bacterial adhesion prevention of the strain #1, when compared to the cell model which detects no antimicrobial effect. Effects of antimicrobials belonging to the families of β -lactams and fluoroquinolones were also tested with BRT, CV and cell co-culture assays. Clearly, these antibiotics did not disturb the spontaneous adhesion ability of bacteria (data not shown).

In opposition to our results, previous works have described the ability of subinhibitory concentrations of aminoglycosides, particularly tobramycin, to induce the biofilm formation in *P. aeruginosa* (Hoffman, 2005; Elliott et al., 2010). This deleterious effect of antimicrobials is explained as being an adaptive response of microorganisms to antibiotic exposure (Kaplan, 2011). Indeed, antimicrobials were presented as signal agents for the homeostasis regulation of microbial communities. As bacteria coevolute in the environment under constant weak concentrations of antibiotics, they have developed a protective response by the formation of resistant biofilms (Linares et al., 2006). In our study, the subMIC concentration of TOB did not show deleterious effect on the bacterial adhesion (data not shown). These opposite effects of antimicrobials on microbial adhesion could be explained by the mucoid phenotype of our bacterial isolates. We intentionally used mucoid strains for co-cultures to allow the staining and the observation in fluorescence of the biofilm matrix. Mucoid isolates have been described as able to maintain their antibiotic susceptibility in comparison of non-mucoid strains, which rapidly develop resistance by their hypermutability (Oliver et al., 2000; Ciofu et al., 2001). Kaplan (2011) also introduce the notion of hormetic responses by antimicrobials. In fact, the bacterial biofilm formation exhibits a biphasic response to antimicrobial

exposure. In this sense, antibiotics can act as antagonist or agonist according to the concentration tested (Kaplan, 2011). Finally, it seems established that the biofilm formation is mainly governed by adaptive responses. Indeed, transcriptomic analyses have failed to identify specific biofilm regulons suggesting that its formation is dependent on the environmental conditions (Whiteley et al., 2001; Ciofu et al., 2015).

Antibiofilmograms[®] revealed that AMK and TOB decrease the bacterial adhesion as paramagnetic beads stay free-moving for these conditions. This tool allows rapid screen of antibiotics and does not require fixation or staining procedures. Its use could be appropriate to precise CF treatments as it is specifically intended for analyze of the early stages of biofilm formation. The major limitation of the conventional CV microtiter plate assay is the bias of the bacterial sessile biomass estimation due to the repetitive washing steps. It is even advisable to add a fixation step with ethanol or heat, just before the dye staining step, to prevent the detachment of adhering microorganisms (Stepanović et al., 2007). Even without this binding step, which usually enhances reproducibility of the assay, we found reproducible results confirming the preventive effect of aminoglycosides. Besides, we introduced our own classification of bacterial cultures according to adhesion potential of microorganisms. Based on our experimental observations, we decided to directly compare the final mean OD value of conditions to the upper OD of the negative control (mean OD + SD). This methodology differs from the one originally described by Stepanović et al. (2007), which defined a cut off OD to compare to final OD of the tested conditions. In terms of experiments carried out on only few hours of incubation, as for our CV assays, this method of classification undervalues the potential of bacteria to adhere to a support. Finally, we adapted a static tissue co-culture system to allow the adhesion, of our clinical isolates, on human CF-derived airway cells. Our clinical strains were able to bind to the cell layer in forming microcolonies and more precisely, 3D-structures. The latter were characterized by the presence of polysaccharide matrix, revealed by a calcofluor staining. In this co-culture model, AMK and TOB showed the ability to decrease the bacterial viability and the formation of a protective matrix. Previous studies have also evaluated the potential toxicity of antimicrobials on the airway cells. No evidence of cytotoxicity was observed for tobramycin treatment of *P. aeruginosa* biofilms on CFBE cells (until 1000 mg/L) (Anderson et al., 2008; Moreau-Marquis et al., 2009; Yu et al., 2012). Although this kind of *in vitro* cell model cannot be standardized in diagnostic laboratories, it is closer to the *in vivo* pathologic reality than microtiter plate assays. Even studies have suggested that in CF airways, the biofilm formation by *P. aeruginosa* is initiated within the thick mucus, in the early stages of lung colonization, bacteria can directly interact with epithelial cells (Anderson et al., 2008). In that sense, the cell system allows the evaluation of biofilm formation on another support than polystyrene microplates and with a different culture medium. It is well conceivable that according to the adhesion surface, the ability of biofilm formation varies. With tissue culture systems, it has already been observed differences of bacterial responses to antimicrobials according to the epithelial cell lines and even according to the CFTR status of cells, in the case of

CF studies (Moreau-Marquis et al., 2008a). In the same manner, with *in vitro* assays, the medium composition may have a strong impact on the biofilm setting up ability of bacteria. To explore this issue, we have preliminary tested the adhesion ability of our strains, by microscopic observations, in BHI and RPMI + L-Glutamine media. We found a spontaneous adhesion of bacteria to microplates for the two culture media but in a much higher proportion for the RPMI one (data not shown). This medium seems to significantly stimulate the initial adherence of *P. aeruginosa*. This difference could be due to the poorer nutrients composition in RPMI than in BHI. The nutrient stress is a well-known parameter increasing the biofilm formation. Nevertheless, despite this adhesion stimulation, aminoglycosides could delay the bacterial adhesion in the co-culture experiments.

Taken together, results obtained by three inherently different assays confirm the ability of aminoglycosides to prevent the early adhesion of CF clinical *P. aeruginosa* strains. Currently, inhalations with TOB are predominantly favored for the maintenance therapy of chronically *P. aeruginosa* infected patients. Topical administration of antibiotics allows to reach high concentrations, in contrast with systemic treatments. In conclusion, the BRT device provides complementary information about antimicrobial effects on sessile bacterial cells. These data, being more relevant compared to a classical antibiogram, insist on its utility in routine hospital practice. Its robustness was confirmed by conventional and cell assays. Finally, we attested that aminoglycoside family, which is promptly administered to chronic infected CF patients, has a beneficial impact in delaying the initiation of the biofilm setting up by *P. aeruginosa* strains.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FJ and EO designed the study. EO performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) through a CIFRE fellowship to Elodie OLIVARES (grant number 2013/12042013) and by the 15th Fonds Unique Interministériel (FUI). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Frédéric BECQ of the Transports Ioniques et Mucoviscidose team of the University of Poitiers (France) for providing the CFBE410⁻ cell line. We also sincerely wish to thank Tom COENYE and Aurélie GRABBE of the Laboratory of Pharmaceutical Microbiology of the University of Ghent (Belgium) for their welcome and their support about the cell co-culture experiments.

REFERENCES

- Anderson, G. G., Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A., and O'Toole, G. A. (2008). *In vitro* analysis of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived airway epithelial cells. *Infect. Immun.* 76, 1423–1433. doi: 10.1128/IAI.01373-07
- Bhagirath, A. Y., Li, Y., Somayajula, D., Dadashi, M., Badr, S., and Duan, K. (2016). Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* 16:174. doi: 10.1186/s12890-016-0339-5
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., and Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* 68, 605–612. doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.010
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., et al. (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.
- Ciofu, O., Fussing, V., Bagge, N., Koch, C., and Hoiby, N. (2001). Characterization of paired mucoid/non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance, β -lactamase activity and RiboPrinting. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 391–396. doi: 10.1093/jac/48.3.391
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P. Ø., Wang, H., and Hoiby, N. (2015). Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 85, 7–23. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.017
- Davies, J. C., Alton, E. W., and Bush, A. (2007). Cystic fibrosis. *BMJ* 335, 1255–1259. doi: 10.1136/bmj.39391.713229.AD
- Ehrhardt, C., Collnot, E.-M., Baldes, C., Becker, U., Laue, M., Kim, K.-J., et al. (2006). Towards an *in vitro* model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o-. *Cell Tissue Res.* 323, 405–415. doi: 10.1007/s00441-005-0062-7
- Ehsan, Z., and Clancy, J. P. (2015). Management of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients using inhaled antibiotics with a focus on nebulized liposomal amikacin. *Future Microbiol.* 10, 1901–1912. doi: 10.2217/fmb.15.117
- Elborn, J. S., Hodson, M., and Bertram, C. (2009). Implementation of European standards of care for cystic fibrosis-control and treatment of infection. *J. Cyst. Fibros.* 8, 211–217. doi: 10.1016/j.jcf.2009.03.001
- Elliott, D., Burns, J. L., and Hoffman, L. R. (2010). Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3024–3026. doi: 10.1128/AAC.00102-10
- Farrell, P. M., White, T. B., Ren, C. L., Hempstead, S. E., Accurso, F., Derichs, N., et al. (2017). Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. *J. Pediatr.* 181S, S4.e1–S15.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064
- Hoffman, L. R. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171–1175. doi: 10.1038/nature03912
- Hoiby, N., Krogh Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., and Kharazmi, A. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* 3, 23–35. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01349-6
- Hurley, M. N., Amin Ariff, A. H., Bertenshaw, C., Bhatt, J., and Smyth, A. R. (2012). Results of antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 11, 288–292. doi: 10.1016/j.jcf.2012.02.006
- Jehl, F., and Koebel, C. (2011). Antibiotiques-bactéries: une relation (pharmaco) dynamique. *Rev. Francoph. Lab.* 2011, 45–56. doi: 10.1016/s1773-035x(11)71054-1
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 34, 737–751. doi: 10.5301/ijao.5000027
- Linares, J. F., Gustafsson, J., Baquero, F., and Martinez, J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19484–19489. doi: 10.1073/pnas.0608949103
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 194–222. doi: 10.1128/CMR.15.2.194-222.2002
- Marley, E. F., Mohla, C., and Campos, J. M. (1995). Evaluation of E-Test for determination of antimicrobial MICs for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3191–3193.
- Moreau-Marquis, S., Bomberger, J. M., Anderson, G. G., Swiatecka-Urban, A., Ye, S., O'Toole, G. A., et al. (2008a). The F508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L25–L37. doi: 10.1152/ajplung.00391.2007
- Moreau-Marquis, S., O'Toole, G. A., and Stanton, B. A. (2009). Tobramycin and FDA-approved iron chelators eliminate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 305–313. doi: 10.1165/rcmb.2008-0299OC
- Moreau-Marquis, S., Redelman, C. V., Stanton, B. A., and Anderson, G. G. (2010). Co-culture models of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on live human airway cells. *J. Vis. Exp.* 44:2186. doi: 10.3791/2186
- Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A., and O'Toole, G. A. (2008b). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21, 595–599. doi: 10.1016/j.pupt.2007.12.001
- Moskowitz, S. M., Emerson, J. C., McNamara, S., Shell, R. D., Orenstein, D. M., Rosenbluth, D., et al. (2011). Randomized trial of biofilm testing to select antibiotics for cystic fibrosis airway infection. *Pediatr. Pulmonol.* 46, 184–192. doi: 10.1002/ppul.21350
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulbac, B., Prévost, G., Bernardi, T., et al. (2016). The BioFilm Ring Test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *J. Clin. Microbiol.* 54, 657–661. doi: 10.1128/JCM.02938-15
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., and Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251–1253. doi: 10.1126/science.288.5469.1251
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., and Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6
- Stepanović, S., Vuković, D., Hala, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., et al. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115, 891–899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., et al. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860–864. doi: 10.1038/35101627
- Yu, Q., Griffin, E. F., Moreau-Marquis, S., Schwartzman, J. D., Stanton, B. A., and O'Toole, G. A. (2012). *In vitro* evaluation of tobramycin and aztreonam versus *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived human airway epithelial cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2673–2681. doi: 10.1093/jac/dks296

Conflict of Interest Statement: EO, SB-B, CP and TB declare a conflict of interest: SB-B, CP and TB are members of BioFilm Control SAS, Saint-Beauzire, France. A CIFRE fellowship (Ph.D. student) from BioFilm Control, for EO, is gratefully acknowledged.

The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Olivares, Badel-Berchoux, Provot, Jaulbac, Prévost, Bernardi and Jehl. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre 5

Induction de la formation de biofilm par les β -lactamines

ARTICLE 3

P. aeruginosa Antibiofilmogram® reveals the role of β -lactam antibiotics in the induction of a reversible biofilm

Auteurs : Olivares Elodie, Badel-Berchoux Stéphanie, Provot Christian, Jaulhac Benoît, Prévost Gilles, Bernardi Thierry, Jehl François.

Statut de l'article : Under review

Revue : Frontiers in Microbiology

Objectifs de l'étude : L'exposition des bactéries à des concentrations sublétales d'antibiotiques a déjà été décrite comme pouvant altérer leur métabolisme, voire même modifier leur comportement intrinsèque, en favorisant l'expression de certains déterminants de virulence. Dans le contexte de la mucoviscidose, la conséquence pour les patients, qui sont constamment sous des concentrations variables d'antibiotiques, est donc la sélection de souches pyocyaniques tolérantes aux antimicrobiens, par l'induction directe d'un biofilm résistant, et donc le passage à la chronicité de la maladie.

Toujours par l'intermédiaire de la technologie du BRT, nous avons investiguer l'effet des β -lactamines sur deux souches *P. aeruginosa* appartenant au profil d'adhésion 3 (maintien d'un état planctonique). Nous avons alors jugé pertinent de tester, en plus des concentrations subCMI, l'effet de concentrations standards telles que la CMI, mais aussi plus fortes, comme la PK/PD, afin d'évaluer la réponse dose-dépendante des cellules bactériennes aux antimicrobiens. La sensibilité aux antibiotiques de nos souches témoins cliniques a également été vérifiée par la technique de marquage conventionnelle au CV. Finalement, pour confirmer que les β -lactamines jouent un rôle sur l'initiation de la formation de biofilms par les bactéries, il a été proposé d'ajouter aux cultures bactériennes, additionnées d'antibiotiques, de la DNase I lors de la répétition de certains Antibiofilmogrammes®. L'activité de cette enzyme, capable de dégrader l'ADN extracellulaire qui n'est autre qu'un des composants majeurs de la matrice du biofilm bactérien, peut conduire à l'inhibition de l'adhésion précoce des cellules bactériennes.

Résultats : Les cinétiques d'adhésion de deux isolats cliniques planctoniques de *P. aeruginosa*, obtenues par Antibiofilmogrammes®, démontrent que l'adhésion des micro-organismes peut être stimulée par de nombreuses concentrations de β -lactamines. En comparaison des données préalablement décrites dans la littérature, nos résultats semblent indiquer que le potentiel inducteur des antibiotiques n'est pas exclusivement réservé aux doses inférieures aux CMI. L'acquisition d'un phénotype sessile par *P. aeruginosa*, suite à un contact avec des molécules antimicrobiennes, nous a également conduits à

documenter l'aspect réversible de l'induction. Toujours par l'intermédiaire de la méthodologie du BRT, nous avons donc récupéré les cultures bactériennes stimulées et avons déterminé leur nouvelle cinétique d'adhésion spécifique, sans la présence d'antibiotiques dans le milieu. Les résultats obtenus ont alors montré que les cellules bactériennes étaient capables de retrouver, très rapidement en absence d'antimicrobiens, leur comportement planctonique original.

L'effet des β -lactamines sur le comportement adhésif de nos souches a également été évalué par la méthode colorimétrique du CV. Dans cette étude (en comparaison de l'Article 2), aucune corrélation de résultats n'a pu être mise en évidence entre cette technique et celle du BRT. Le processus d'induction de la formation de biofilm par les antibiotiques n'a pas été détecté via la méthodologie du CV. Cette initiation de l'adhésion bactérienne reflétant probablement l'étape précoce de la formation du biofilm, il est probable que ce processus soit sous-évalué par la technique du CV, pour des souches faiblement adhérentes. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons donc réalisé de nouveaux Antibiofilmogrammes® en supplémentant les cultures bactériennes de DNase I, cette enzyme ayant déjà été décrite comme une molécule anti-biofilm. Par le clivage de l'ADNe constituant la matrice et les adhésines de surface cellulaires, son addition aux suspensions bactériennes a permis de mettre en évidence l'adhésion précoce des micro-organismes, initialement induite par la présence des différentes concentrations d'antibiotiques dans le milieu.

Conclusion : Ces résultats complémentaires renforcent ainsi la pertinence de l'Antibiofilmogramme® puisque ce dernier est capable, comparé aux méthodes conventionnelles d'étude du biofilm, de détecter l'initiation précoce de l'adhésion bactérienne par une souche clinique et d'ainsi écarter les molécules pouvant l'induire. La réponse spécifique du biofilm bactérien aux antibiotiques, dépendante des conditions environnementales, nécessite l'administration de posologies basées sur des méthodes de diagnostic prenant en compte la sensibilité des cellules aux antimicrobiens. L'Antibiofilmogramme® apparaît alors comme étant complémentaire des antibiogrammes réalisés en routine hospitalière, en précisant le risque "biofilm" associé aux thérapeutiques anti-infectieuses.

P. aeruginosa Antibiofilmogram® reveals the role of β -lactam antibiotics in the induction of a reversible biofilm.

Elodie Olivares^{1, 2*}, Stéphanie Badel-Berchoux¹, Christian Provot¹, Benoit Jaulhac², Gilles Prévost², Thierry Bernardi¹, François Jehl²

¹BioFilm Control, France, ²EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
310923

Received on:
13 Sep 2017

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

In review

Conflict of interest statement

The authors declare a potential conflict of interest and state it below

EO, SBB, CP and TB declare a competing interest: SBB, CP and TB are members of BioFilm Control SAS, Saint-Beauzire, France. A CIFRE fellowship (PHD student) from BioFilm Control, for EO, is gratefully acknowledged.

Author contribution statement

FJ and EO designed the study. EO performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Keywords

Biofilm, Cystic Fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, Antibiofilmograms®, Biofilm Ring Test®

Abstract

Word count: 251

Biofilms are characterized by a high tolerance to antimicrobials. However, conventional antibiograms are performed on planktonic microorganisms. According to the Biofilm Ring Test® (BRT) device, which allows the study of sessile bacteria susceptibility to antibiotics, effects of antimicrobials on biofilm formation by cystic fibrosis (CF) *P. aeruginosa* strains were evaluated. Various concentrations of β -lactam antibiotics (MIC, subMIC and the optimized PK/PD concentrations) were applied in Antibiofilmograms® to clinical *P. aeruginosa* strains. To validate the inter-assay reproducibility, conventional Crystal Violet (CV) assays were performed. Finally, to attest the establishment of biofilm, the bacterial adhesion inhibition was verified using deoxyribonuclease I (DNase I).

Results of Antibiofilmograms® showed a biofilm formation induction by antibiotics for non-adherent bacteria. Sub-inhibitory concentrations of antibiotics were already described as having an induction effect in biofilm abilities. In our study, these observations were made on remaining-planktonic strains and for higher concentrations. Adhesion kinetics tests performed without antibiotics, on newly-sessile bacteria, showed that they restored their spontaneous planktonic behaviour. Biofilm induction process by antimicrobials was not found in CV assays. We presumed that induction phenomenon reflects the early bacterial adhesion steps, which cannot be detected by CV method. The detachment of induced sessile colonies with DNase I confirmed that the BRT discerns the early adhesion induction of microorganisms by antibiotics.

Antibiofilmograms® appear useful for the selection of antimicrobials in CF, in avoiding the inducer molecules of biofilm formation. According to this technology, we showed that the induced biofilm setting up depends on the antibiotic contact and is a reversible process.

Funding statement

This work was supported by Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) through a CIFRE fellowship to Elodie OLIVARES (grant number 2013/12042013) and by the 15th Fonds Unique Interministériel (FUI). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: No

1 ***P. aeruginosa* Antibiofilmogram® reveals the role of β -lactam**
2 **antibiotics in the induction of a reversible biofilm**

3
4 Elodie Olivares^{1,2*}, Stéphanie Badel-Berchoux², Christian Provot², Benoît Jaulhac¹, Gilles
5 Prévost¹, Thierry Bernardi², François Jehl¹

6
7 ¹Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de
8 Strasbourg, EA7290 Virulence bactérienne précoce, Institut de Bactériologie, Strasbourg, France

9 ²BioFilm Control SAS, Saint Beuzire, France

10
11 Running Title: *P. aeruginosa* biofilm induction by β -lactams

12
13 Correspondence

14 Elodie Olivares

15 olivares.elodie@gmail.com

16
17 Manuscript length: 4351 words

18 Number of figures: 4 figures and 1 table

In review

46 **Abstract**

47 Biofilms are characterized by a high tolerance to antimicrobials. However, conventional
48 antibiograms are performed on planktonic microorganisms. According to the Biofilm Ring Test®
49 (BRT) device, which allows the study of sessile bacteria susceptibility to antibiotics, effects of
50 antimicrobials on biofilm formation by cystic fibrosis (CF) *P. aeruginosa* strains were evaluated.
51 Various concentrations of β -lactam antibiotics (MIC, subMIC and the optimized PK/PD
52 concentrations) were applied in Antibiofilmograms® to clinical *P. aeruginosa* strains. To
53 validate the inter-assay reproducibility, conventional Crystal Violet (CV) assays were performed.
54 Finally, to attest the establishment of biofilm, the bacterial adhesion inhibition was verified using
55 deoxyribonuclease I (DNase I).

56 Results of Antibiofilmograms® showed a biofilm formation induction by antibiotics for non-
57 adherent bacteria. Sub-inhibitory concentrations of antibiotics were already described as having
58 an induction effect in biofilm abilities. In our study, these observations were made on remaining-
59 planktonic strains and for higher concentrations. Adhesion kinetics tests performed without
60 antibiotics, on newly-sessile bacteria, showed that they restored their spontaneous planktonic
61 behaviour. Biofilm induction process by antimicrobials was not found in CV assays. We
62 presumed that induction phenomenon reflects the early bacterial adhesion steps, which cannot be
63 detected by CV method. The detachment of induced sessile colonies with DNase I confirmed that
64 the BRT discerns the early adhesion induction of microorganisms by antibiotics.

65 Antibiofilmograms® appear useful for the selection of antimicrobials in CF, in avoiding the
66 inducer molecules of biofilm formation. According to this technology, we showed that the
67 induced biofilm setting up depends on the antibiotic contact and is a reversible process.
68

69 **Keywords**

70 Biofilm, Cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotics, Antibiofilmograms®, Biofilm
71 Ring Test®
72

73 **Introduction**

74 *Pseudomonas aeruginosa* is highly resistant to antimicrobials and plays a major role in
75 nosocomial infections leading to a high mortality rate (Morita, Tomida, and Kawamura 2014;
76 Nathwani et al. 2014). Its survival ability is very complex and includes multifactorial
77 mechanisms including the capacity to grow in biofilms (Poole 2011). These structural
78 organizations are defined as communities of microorganisms embedded in a self-produced matrix
79 and adhering to surfaces. Biofilm-growing *P. aeruginosa* are also mainly found in cystic fibrosis
80 (CF) patients where it causes severe lung infections (Lyczak, Cannon, and Pier 2002).

81 It is now well established that the Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) and the Minimal
82 Bactericidal Concentrations (MBCs) of antimicrobials against bacteria in biofilms are 10 to 1000-
83 fold higher than the ones of planktonic microorganisms (Schurek, Breidenstein, and Hancock
84 2012; Davies 2003). This tolerance can be explained, at least partly, by the slowed down
85 metabolism of sessile bacteria forming the biofilm, the hypoxic environment inside of these
86 structures and the presence of a persister subpopulation of microbes (Høiby et al. 2011).

87 Recent works have also shown that antimicrobials act as signal agents (Aminov 2013). In fact, at
88 low concentrations, antimicrobials can be beneficial to the bacterial survival in nature by
89 increasing the expression of virulence determinants. Then, they act as signal molecules for the
90 homeostasis regulation of microbial communities. In this way, many recent studies demonstrated
91 that, in clinics, antimicrobial sub-inhibitory concentrations trigger expression of factors

92 contributing to the biofilm formation by sessile bacteria (Linares et al. 2006). The consequence in
93 CF patients, as they are usually under variable concentrations of antimicrobials, is the selection of
94 multi-drug resistant *P. aeruginosa* strains through the induction of biofilm formation, and thus,
95 the move towards chronicity of the disease. This assessment means that the optimization of anti-
96 *Pseudomonas* chemotherapy is critical (Morita, Tomida, and Kawamura 2014).

97 In a previous study, we evaluated the biofilm formation ability of twenty-five strains of *P.*
98 *aeruginosa*, isolated from sputum of anonymised CF patients, by using a new technology, the
99 Biofilm Ring Test® (BRT) (BioFilm Control, Saint-Beauzire, France) (Olivares et al. 2016).

100 In the present work, we used this methodology to measure effects of antimicrobials on clinical *P.*
101 *aeruginosa* strains, by the achievement of Antibiofilmogram® tests. The procedure principle is to
102 add antibiotic at various concentrations to initial bacterial cultures, before the incubation, to
103 explore whether antimicrobials are able to prevent or induce the biofilm formation by bacteria.
104 The analysis of our *P. aeruginosa* strains highlighted a phenomenon of biofilm induction by β -
105 lactam antibiotics in non-adherent bacteria. The adhesion kinetic evaluation of these newly-
106 sessile strains, always with the BRT device, showed that they restored their spontaneous
107 planktonic phenotype when antimicrobials were no longer present in the culture medium. To
108 confirm that the bead immobilisation reflected an induction of biofilm setting up, we added
109 deoxyribonuclease I (DNase I) to initial bacterial preparations with antibiotics, in
110 Antibiofilmograms®. DNase I can degrade extracellular DNA (eDNA), which is one of the major
111 component from the biofilm matrix. Initially, it functions as an intercellular adhesin within the
112 sessile colonies but also as cell-surface-associated nucleic acids on the surface of bacteria, that
113 serve as surface adhesins (Whitchurch et al. 2002; Tetz, Artemenko, and Tetz 2009; Tetz and
114 Tetz 2010; Kaplan 2009). The DNase I activity, on these adhesion determinants, leads to an
115 inhibition of the early adhesion of microorganisms.

116 **Materials and methods**

117 **Bacterial strains**

118 We used our collection of twenty-five strains of *P. aeruginosa*, isolated from sputum of CF
119 anonymized patients. They were classified in three adhesion profiles according to their speed of
120 biofilm formation, as previously described (Olivares et al. 2016). Here, we focused on strains
121 staying in a non-adherent form during 6h of incubation. In this way, two strains were selected for
122 the realisation of Antibiofilmograms® and additional experiments of this study: the strain #6 and
123 the strain #12 of our clinical collection.

124 **Antibiotic selection and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination**

125 Among antimicrobials usually used for CF treatments, five β -lactams were selected: cefepim
126 (FEP), ceftazidime (CAZ), imipenem (IPM), meropenem (MEM) and ticarcillin/clavulanate
127 (TIM). Their MICs were determined on strains #6 and #12 by gradient diffusion strips (E-tests,
128 Biomérieux, France), following supplier's indications (Marley, Mohla, and Campos 1995). Their
129 effect on bacterial cells was investigated in Antibiofilmograms® at three concentrations: MIC,
130 subMIC (half MIC) and a so-called "PK/PD" concentration. The latter, a concentration approved
131 to give the optimised bactericidal activity at residual concentration *in vivo*, is equivalent to eight
132 times the MIC for the five β -lactams. All the corresponding concentrations are summarized in the
133 Table 1.

134 **Enzymes**

135 Bovine pancreatic deoxyribonuclease I (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), with a
136 specific activity of 6680 Kunitz units/mg was used.

138 **Antibiofilmograms®**

139 Antibiofilmogram® consists in the realisation of adhesion kinetics of bacteria in the presence of a
140 given concentration of antibiotic, by the BRT technology. The device functioning is based on the
141 moving measurement of magnetic microbeads in wells of a microplate, under magnetic field
142 generated by a magnet placed under the well bottom. The total or partial reduction of the bead
143 moving reflects the bacterial biofilm formation. The BRT device consists in 96-well microplates,
144 toner (suspension containing magnetic microbeads), contrast liquid (inert opaque oil used for
145 plate reading step) and a pack composed of a block test (magnet holder), a dedicated plate reader
146 and the Biofilm Control Elements® software to acquire and analyse images.

147 Strains analysed in Antibiofilmograms® were pre-cultured on Brain Heart Infusion (BHI) agar
148 plates, 24h before the tests. Some colonies were resuspended in sterile BHI medium and Initial
149 Bacterial Suspensions (IBS) were prepared to reach approximately a final concentration of 10^6
150 CFU/mL in BHI containing the toner suspension (final concentration of 10 μ L/mL). In parallel,
151 the different antibiotic concentrations were prepared (see Table 1). 20 μ L of each ones were
152 loaded in polystyrene microplates. One plate was prepared for each read incubation time (0, 2, 4
153 and 6h).

154 After homogenisation by vortexing, bacterial mixtures were loaded in wells containing
155 antimicrobials (200 μ L of IBS per well) and microplates were incubated at 37°C. Controls of
156 spontaneous adhesion kinetics of bacteria (without antibiotics) and beads migration (medium
157 without bacterial strains) were also prepared and analysed in each plate.

158 For the plate reading, 120 μ L of contrast liquid were used to cover the medium in the wells.
159 Then, plates were magnetized one minute with the block test and scanned with the plate reader.
160 The block test is made of 96 mini-magnets, which are centered under the bottom of each well.
161 During magnet contact, free beads are attracted towards the center of wells, forming a brown
162 spot, while beads embedded in a biofilm are blocked and remain non-detectable. The adhesion
163 ability of each strain was expressed as the BioFilm Index (BFI) calculated by the Biofilm Control
164 Elements® software. Deduced BFIs are inversely proportional to the number of attached bacteria.
165 A high BFI value (>8) signs a high bead mobility under magnet action that corresponds to the
166 absence of biofilm formation (*i.e.* control wells), while a low value (~2) shows a full
167 immobilization of beads due to the sessile cells (Chavant et al. 2007).

168 Each bacterial condition was analysed in six replicates to assess repeatability and precision of the
169 assay. Two-way ANOVA analyses were applied to statistically compare resulting BFI data.

170 **Control of the reversibility of the biofilm formation induction**

171 When an induction process of biofilm formation was observed with the antibiotic concentrations
172 tested in Antibiofilmograms®, procedures were repeated and stimulated bacteria were directly
173 used to investigate the reversibility phenomenon.

174 After contact with antimicrobials, bacteria were seeded on BHI agar plates and incubated during
175 at least 24h at 37°C. Adhesion kinetic tests, without antibiotics, were then performed with BRT
176 to verify the conservation or the reversibility of biofilm formation by microorganisms, in absence
177 of antibiotics.

178 **Evaluation of the biofilm formation with the Crystal Violet (CV) assay**

179 To verify if there is a categorical agreement between the Antibiofilmogram® procedure and the
180 CV method, bacterial suspensions were prepared in similar way as for BRT protocol.

181 Sterile 96-well polystyrene plate was inoculated with 200 μ L of suspensions containing cells (10^6
182 CFU/mL) and antimicrobial concentrations (Table 1) in BHI medium. Twelve replicates for
183 bacterial and antibiotic conditions were analysed. After 6h of incubation at 37°C, medium

184 containing non-adherent bacteria was removed and wells were washed two times with 250 μ L of
185 sterile water. The plate was vigorously shaken during washing steps to remove all planktonic
186 cells. The remaining adherent bacteria were stained with 250 μ L of CV solution (0,1%) during 15
187 min. Then, the dye was removed and the wells washed three times with 250 μ L of sterile water.
188 Finally, the CV bound to the sessile cells was dissolved by 250 μ L of acetic acid (30%) and the
189 absorbance of wells was measured at 540_{nm} by using the automated reader Micronaut Skan
190 (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany). One-way ANOVA analyses were applied to
191 statistically compare resulting OD values. As for the BRT device, allowing sorting of bacterial
192 strains in adhesion profiles, Stepanovic *et al.* introduced classification of bacteria adherence
193 abilities into four categories (Stepanović *et al.* 2007). Their definition depends on the cut-off OD
194 (OD_c), which is defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control
195 (BHI medium). For easier interpretation of results, average OD of a tested condition is compared
196 to the OD_c . Therefore, bacteria were classified as follows: $OD < OD_c$ = non-adherent cells; $OD_c <$
197 $OD \leq 2 \times OD_c$ = weak biofilm producer; $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ = moderate biofilm producer
198 and $4 \times OD_c < OD$ = strong adherence of cells.

199 **Effect of DNase I on the biofilm establishment**

200 To confirm that the bead blocking, observed in Antibiofilmograms®, reflects an induction of the
201 early bacterial adhesion by antimicrobials, we proposed to prevent this deleterious antibiotic
202 effect by using DNase I.

203 Biofilm formation was carried out in 96-well polystyrene plate as described for the
204 Antibiofilmogram® procedure. Bacterial suspensions containing magnetic microbeads and
205 potential inducer antibiotic concentrations of the biofilm formation were supplemented with
206 DNase I (55 μ g/mL). After 6h of incubation, 120 μ L of contrast liquid were used to cover the
207 medium in the wells for the plate reading. Then, after one minute of magnetization with the block
208 test, it was scanned with the plate reader. The inhibition of the early bacterial adhesion, initially
209 induced by antibiotic concentrations, could be evaluated by the direct detection of brown spots in
210 wells.

211

212 **Results**

213 **Induction of biofilm formation by β -lactams**

214 Results of Antibiofilmogram® assays with β -lactam concentrations having a significant effect on
215 *P. aeruginosa* strains #6 and #12 are represented in Figure 1.

216 An induction of biofilm formation by various concentrations of antimicrobials was revealed for
217 both strains. As shown by the curves of control bacteria, they do not spontaneously form a
218 biofilm. For both strains, the preservation of an isolated non-adherent form was reflected by the
219 stable mobility of magnetic beads during the time experiment (maintenance of BFI values around
220 10). Conversely, when microorganisms were in contact with low/high concentrations of FEP,
221 CAZ, TIM, IPM or MEM, a drop of BFI values was noticed, attesting a phenotypic switch of
222 planktonic bacteria to a sessile form (a BFI value near the value of 2 represents a complete sessile
223 state). Kinetic curves of the strain #12 are shown only for the higher concentrations of
224 antimicrobials but most of others concentrations of antibiotics, as the subMIC and MIC ones,
225 were also able to induce the adhesion of bacterial cells. Results analyses by two-way ANOVA
226 testing validated a statistically significant difference between the curves with antibiotics and the
227 control ones at 4h and 6h of incubation ($p < 0.0001$).

228 **Reversibility of the induction of the biofilm formation**

229 The newly-sessile-stimulated isolates of strains #6 and #12, obtained in Antibiofilmograms® at
230 6h of incubation; were recovered and used to test if in the absence of antibiotics, the new-sessile
231 phenotype was conserved or if the induction process of biofilm formation is a reversible process.
232 Sessile cultures of strains *P. aeruginosa* #6 and #12, for which the biofilm formation was
233 previously induced by β -lactams, were maintained 24h in absence of antibiotics and analysed
234 with the BRT device for determination of their adhesion kinetics. Examples of results obtained
235 for some representative concentrations tested on the two strains are presented in Figure 2. The
236 initial induction process, observed after a 6h-contact with various concentrations of FEP, TIM,
237 IPM and MEM was completely lost when antimicrobials were no longer present in cultures. The
238 analysis of initially stimulated bacteria after 24h free of antibiotics showed their spontaneous
239 behaviour, namely their maintenance in a planktonic state. The drop of BFI values from 4 to 6h,
240 previously noticed when antibiotics were present, were no longer observed. Conversely, adhesion
241 kinetic curves of stimulated bacteria tend to be superimposed to the control one. Statistical
242 analysis by two-way ANOVA testing showed that curves representing adhesion kinetics of
243 bacterial isolates previously stimulated by antibiotics were not significantly different from the
244 one of control strain ($p > 0.05$). Therefore, it appeared that the newly-acquired sessile phenotype
245 was no longer conserved in absence of antimicrobials in bacterial cultures and on the contrary,
246 was reversible.

247 **Categorical discordance of Antibiofilmogram® results with Crystal Violet staining**

248 The spontaneous planktonic phenotype of our clinical isolates and the biofilm formation
249 induction by β -lactams were further assessed by the CV assay. The average light absorbance of
250 bacterial cultures, supplemented or not with various concentrations of FEP, CAZ, TIM, IPM and
251 MEM, are represented in Figure 3. Raw data of OD_{540nm}, reflecting the CV bound by sessile cells,
252 showed that strains #6 and #12 did not adhere spontaneously to well sides, after 6h of incubation,
253 as values were in the same order of magnitude than the medium control one (mean OD of the
254 negative control was equivalent to 0.047 \pm 0.007 for strain #6 experiments and 0.045 \pm 0.005
255 for the ones of the strain #12). This spontaneous planktonic behaviour is similar to the one
256 observed for control strains in Antibiofilmograms®. Identical OD values were obtained for
257 cultures of bacteria with antibiotics. The statistical analysis of the OD_{540nm} means confirmed a
258 non-significant difference of CV bound between control strains and cultures with β -lactams ($p >$
259 0.05). The corresponding classification of all bacterial cultures supplemented or not with
260 antibiotics, defined the *P. aeruginosa* strains #6 and #12 as non-adherent. Finally, the induction
261 process recorded in Antibiofilmogram® assays was not evidenced when the same conditions
262 were analysed, at 6h of incubation, with CV method.

263 **Inhibition of biofilm formation induction by antimicrobials by use of DNase I**

264 As we hypothesized that the absence of results correlation between CV assays and BRT device
265 originates from a limit of the CV procedure to detect the early adhesion of bacterial cells, we used
266 DNase I to inhibit the induced adhesion of bacteria by antibiotics, noticed in
267 Antibiofilmograms®. Indeed the enzyme has already been described as an anti-biofilm agent.
268 Results of BRT assays testing β -lactam effects on *P. aeruginosa* strains #6 and #12, with and
269 without DNase concentrations, are represented in Figure 4. As initially stated by observation of
270 wells without enzyme, strains #6 and #12 did not spontaneously adhere to the microplate
271 (formation of spots in bottom wells), whereas the addition of antibiotic concentrations to bacterial
272 cultures induced their adhesion, as microbeads were no longer detectable. The preparation of
273 medium controls confirmed that the noticed immobilisation of beads was only due to the impact
274 of antimicrobials on the bacteria behaviour. Conversely, the addition of DNase I to cultures at the

275 time of inoculation showed that bacteria were no longer able to block the bead moving, as
276 confirmed by the presence of spots in wells (even for FEP PK/PD and TIM MIC conditions of the
277 strain #6, for which the presence of spots was less clear macroscopically). This suggests that
278 DNase I inhibited the early adhesion of bacterial cells, induced by antimicrobials, and therefore
279 confirmed the ability of these latter to stimulate the biofilm formation by spontaneous non-
280 adherent *P. aeruginosa* strains. In the same manner, the presence of spots in control wells with
281 DNase I proved that the release of beads, noted for antibiotic conditions with the enzyme, is due
282 to its direct action on bacterial cells.

283

284 **Discussion**

285 In hospital routine analysis, the antibiotic susceptibility testing of bacteria are related to
286 planktonic cells. They do not take into account the spontaneous growth of microorganisms in
287 biofilms. The tolerance to antibiotics of these specific microbial structures is much higher than
288 the one of planktonic cells. This partly explains the antibiotic treatment failure in infections with
289 biofilm formation. The development of technologies dedicated to the evaluation of antimicrobial
290 efficacy on adherent bacteria becomes crucial, especially for the optimization of anti-
291 *Pseudomonas* chemotherapies in CF (Macià, Rojo-Moliner, and Oliver 2014).

292 Following this objective, we used a new tool, the BRT, to perform Antibiofilmograms® on
293 clinical *P. aeruginosa* strains isolated from CF patients. In comparison of standard antibiotic
294 susceptibility testing, this procedure allows the investigation of antibiotic effects on sessile
295 bacteria. In a previous study, the spontaneous adhesion kinetics of our clinical strains was
296 determined with the BRT without use of antimicrobials (Olivares et al. 2016). This work allowed
297 us to classify our collection of strains into three adhesion profiles according to the speed and their
298 ability to form a biofilm in microwells. We therefore performed Antibiofilmograms® on
299 representative strains, belonging to these three groups, to evaluate antibiotic impacts on their
300 sessile behaviour. In this study, we especially focused on remaining non-adherent strains as
301 induction phenomenon of biofilm formation by antimicrobials was highlighted.

302 In comparison of their spontaneous behaviour, the kinetic curves of bacteria in contact with
303 antibiotics and the consecutive drop of BFI values before 6h of incubation demonstrated that
304 adhesion of microorganisms was stimulated by antimicrobials. These data suggest that when
305 antibiotics are in contact with bacteria, they caused a sufficient stress that forced them to switch
306 their planktonic phenotype towards a new sessile one. Even if the biofilm formation induction by
307 antimicrobials was noticed on most clinical planktonic strains of *P. aeruginosa*, this remains a
308 strain- and antibiotic-dependent process. Nevertheless, we have to be mindful that induction
309 phenomena can occur when *P. aeruginosa* infections are treated with antibiotics. The resort to
310 Antibiofilmogram® tests may be efficient to avoid the use of these inducer antimicrobials.

311 Always according to the BRT device, the identification of induction processes led us to verify
312 whether the acquired sessile phenotype was conserved by bacteria or not, when antimicrobials
313 were no longer present in cultures. Analyses of adhesion kinetics of stimulated bacteria showed
314 that in the few hours following the initial contact with antibiotics, bacteria restored their original
315 adhesion behaviour. The reversibility of the biofilm formation induction means that this event
316 does not originate from a gene mutation as for genetic variations causing resistance acquisition by
317 bacteria (Sousa and Pereira 2014; Oliver et al. 2000). It is likely a transient induction of gene
318 expression, even if an epigenetic mechanism cannot be ruled out.

319 Then, the antibiotic susceptibilities of our clinical strains were further assessed with the Crystal
320 Violet assay, which is still the most widely used method for *in vitro* biofilm quantification

321 (Christensen et al. 1985; Stepanović et al. 2000). No categorical agreement was obtained for the
322 results of the two techniques. The induction process of bacterial adhesion by antibiotics was not
323 detected with CV test, while inhibition phenomenon of biofilm formation by strongly adherent
324 strains could be found with Antibiofilmograms® and also with staining assay (Olivares et al.
325 2017).

326 Even if CV procedure is rather simple and sensitive, it presents lots of important limitations. The
327 main drawback of the staining method is probably the need to resort to several washing steps to
328 remove the unattached cells and the unbound dye. Rationally, these stages can result in
329 detachment and removal of some bacterial sessile cells. In the review of Azeredo *et al.*, the first
330 described limitation of the technique is a bias in the estimation of adhesion ability of bacteria
331 forming loose or weak biofilms, due to the washing steps (Azeredo et al. 2016). Based on this
332 idea, we suggested that the absence of correlation between our results obtained from CV and
333 BRT methods is due to a detection limit of the staining assay. The bacterial adhesion induction
334 caused by antibiotics probably reflects the early steps of bacterial biofilm formation, when cells
335 lose their moving ability and begin to express early adhesion factors to adhere to the support.
336 Thus, this process cannot be observed with CV assay, either because washing steps remove the
337 first adherent bacteria, or because they are not yet enough to be stained by CV.

338 To confirm this hypothesis, we proposed to repeat Antibiofilmograms® in supplementing
339 bacterial preparations with DNase I, as the enzyme has already been described as an anti-biofilm
340 molecule. Indeed, DNase I prevent the biofilm setting up when it is added to the culture medium
341 at the time of inoculation (Kaplan 2009). In cleaving eDNA of the biofilm matrix and, above all,
342 nucleic acids acting as surface adhesins in bacteria, it could highlight the early adhesion of cells,
343 initially induced by antimicrobials. Moreover, this enzyme with molecular weight of 33 kDa is
344 known to not penetrate bacteria and then, to only cleave eDNA when added to bacterial
345 suspensions (Salnikow et al. 1973). In our study, the observation of spots of microbead in wells
346 containing bacteria, antibiotic concentrations and DNase I confirmed that antimicrobials can
347 induce the first step of biofilm formation in spontaneous planktonic strains and that the BRT
348 device is able to detect this early adhesion in comparison of others conventional colorimetric
349 assays, which cannot.

350 Finally, biofilm formation induction processes are known and largely documented in literature
351 (Kaplan 2011). Numerous studies demonstrated that antibiotics, at subMIC concentrations, can
352 significantly induce the *in vitro* biofilm setting up by bacterial strains (Morita, Tomida, and
353 Kawamura 2014; Kaplan 2011; Hoffman 2005). In fact, microorganisms, detecting a low
354 antibiotic dose, could interpret it as a signal anticipating a future exposure to a higher
355 concentration (Ratcliff and Denison 2011; Cornforth and Foster 2013). Indeed, a simple contact
356 with antimicrobials can modify the physico-chemical characteristics and the surface architecture
357 of bacteria (Fonseca 2004). Several mechanisms have already been studied to explain the
358 behaviour difference of bacteria with antibiotics. Generally, antimicrobials are described as
359 having a direct influence on genes involved in chronic colonization, antibiotic resistance, stress
360 response and biofilm formation in microorganisms (Linares et al. 2006). Antimicrobials seem to
361 act particularly on the intracellular c-di-GMP levels and expression of genes involved in alginate
362 metabolism, which can alter the biofilm formation ability of bacteria (Hoffman 2005; Bagge
363 2004). In the case of CF, Elliott *et al.* have also shown that approximately half of *P. aeruginosa*
364 strains isolated from patients exhibited biofilm induction phenomena (Elliott, Burns, and
365 Hoffman 2010). *In vivo*, these effects are common. Bacterial strains are exposed to low

366 antibiotics concentrations at the very beginning and end of a standard treatment, between doses,
367 or continuously during low-dose therapy (Odenholt 2001).

368 In the present work, where we tested different concentrations for commonly-used antibiotics, we
369 found similar inducer effects for subMIC concentrations but also for higher concentrations (MIC
370 and PK/PD concentrations). We had also observed dose-response effects. Although some studies
371 introduce the notion of bi-phasic relationships (low-dose stimulation of biofilm formation and
372 high-dose inhibition), we found, for instance, that CAZ subMIC and MIC concentrations, for
373 another strain of our collection (strain #20), were inhibitor of the bacterial adherence (during a
374 24h-experiment) and that the PK/PD one was accelerator (data not shown). In the same way,
375 Hoffman *et al.* showed that sub-inhibitory concentrations of aminoglycosides induce biofilm
376 formation in *P. aeruginosa* and *E. coli*, whereas for our collection of strains, various
377 concentrations of amikacin and tobramycin prevent the biofilm setting up by bacteria (Hoffman
378 2005; Olivares *et al.* 2017). In fact, it must be taken into account that our analysed strains are
379 clinical isolates with a specific behaviour, as the ability to stay in a planktonic form, compared to
380 the control ones (PAOI or ATCC 27853 strains), which are well-documented for their
381 spontaneous sessile phenotype. In any case, a dose-response relationship can be highlighted
382 concerning the antibiotics effects on general biofilm formation.

383 Finally, it can be pointed out that the achievement of Antibiofilmograms® and the evaluation of
384 antibiotic effects do not fully mimic the natural behaviour of sessile bacteria, even if such *in vitro*
385 assays are essential for the study of biofilm formation and the selection of antibiotherapies
386 (Vandecandelaere, Acker, and Coenye 2016). In order to be closer to the pathogenic reality of the
387 CF, the next steps of our investigations will include the study of biofilm formation on viable
388 cells. By the achievement of static co-cultures, the effects of antibiotics on bacteria adhering to a
389 cell layer could be evaluated (Moreau-Marquis *et al.* 2010; Anderson *et al.* 2008). Moreau-
390 Marquis *et al.* showed that the MBC of TOB was to 8 µg/mL for planktonic *P. aeruginosa*, 400
391 µg/mL for biofilm developed on abiotic surface and more than 10,000 µg/mL for biofilm form on
392 a cell layer (Moreau-Marquis *et al.* 2008). The resort to this cell methodology will allow us to
393 further document the impact of antimicrobials on the bacterial biofilm formation, with a more
394 relevant clinical model.

395 To conclude, in order to closely reflect the spontaneous biofilm mode of *P. aeruginosa* within the
396 CF lung, antibiotic regimens based on the susceptibility of sessile cells must be considered.
397 Indeed, selection of antibiotic treatments must be different according to the susceptibility testing
398 used. Simulated regimens based on biofilm or conventional planktonic methods can yield to
399 contradictory prescriptions (Hurley *et al.* 2012). In this sense, Antibiofilmograms® appear to be
400 complementary of antibiograms performed in routine hospital practice by adding a biofilm risk
401 assessment associated to antibiotics. They may be useful for the choice of antibiotics in CF, in
402 avoiding inducer molecules of biofilm formation and above all, in detecting the early adhesion of
403 microorganisms. Moreover, according to the BRT, we showed that the induced biofilm formation
404 is dependent on the contact of antibiotics with bacterial cells and is a reversible process for β-
405 lactams. The clinical significance of all these results remains to be precised. Additional studies on
406 antibiotic-induced biofilm formation might elucidate involved mechanisms and dose-dependent
407 behaviours.

408

409 **Conflicts of interest**

410 EO, SBB, CP and TB declare a competing interest: SBB, CP and TB are members of BioFilm
411 Control SAS, Saint-Beauzire, France. A CIFRE fellowship (PhD student) from BioFilm Control,
412 for EO, is gratefully acknowledged.

413

414 **Funding sources**

415 This work was supported by Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT)
416 through a CIFRE fellowship to Elodie OLIVARES (grant number 2013/12042013) and by the
417 15th Fonds Unique Interministériel (FUI). The funders had no role in study design, data collection
418 and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

419

420 **Author contributions**

421 FJ and EO designed the study. EO performed the experiments, analysed the data and wrote the
422 manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

423

424 **References**

- 425 Aminov, Rustam I. 2013. "Biotic acts of antibiotics." *Frontiers in Microbiology* 4: 241.
426 doi:10.3389/fmicb.2013.00241.
- 427 Anderson, G. G., S. Moreau-Marquis, B. A. Stanton, and G. A. O'Toole. 2008. "In vitro analysis
428 of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived
429 airway epithelial cells." *Infection and Immunity* 76 (4): 1423–33. doi:10.1128/IAI.01373-
430 07.
- 431 Azeredo, Joana, Nuno F. Azevedo, Romain Briandet, Nuno Cerca, Tom Coenye, Ana Rita Costa,
432 Mickaël Desvaux, et al. 2016. "Critical review on biofilm methods." *Critical Reviews in*
433 *Microbiology*, November, 1–39. doi:10.1080/1040841X.2016.1208146.
- 434 Bagge, N. 2004. "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in
435 global gene expression and β -lactamase and alginate production." *Antimicrob. Agents*
436 *Chemother.* 48: 1175–87. doi:10.1128/AAC.48.4.1175-1187.2004.
- 437 Chavant, Patrick, Brigitte Gaillard-Martinie, Régine Talon, Michel Hébraud, and Thierry
438 Bernardi. 2007. "A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by
439 bacteria." *Journal of Microbiological Methods* 68 (3): 605–12.
440 doi:10.1016/j.mimet.2006.11.010.
- 441 Christensen, Gordon D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M.
442 Melton, and E. H. Beachey. 1985. "Adherence of coagulase-negative staphylococci to
443 plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to
444 medical devices." *Journal of Clinical Microbiology* 22 (6): 996–1006.
- 445 Cornforth, Daniel M., and Kevin R. Foster. 2013. "Competition sensing: the social side of
446 bacterial stress responses." *Nat Rev Micro* 11 (4): 285–93. doi:10.1038/nrmicro2977.
- 447 Davies, David. 2003. "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." *Nat Rev Drug*
448 *Discov* 2 (2): 114–22. doi:10.1038/nrd1008.
- 449 Elliott, D., J. L. Burns, and L. R. Hoffman. 2010. "Exploratory study of the prevalence and
450 clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas*
451 *aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients." *Antimicrobial Agents and*
452 *Chemotherapy* 54 (7): 3024–26. doi:10.1128/AAC.00102-10.
- 453 Fonseca, A. P. 2004. "Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on
454 *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Medical Microbiology* 53 (9): 903–10.
455 doi:10.1099/jmm.0.45637-0.

- 456 Hoffman, L. R. 2005. "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." *Nature*
457 436: 1171–75. doi:10.1038/nature03912.
- 458 Høiby, Niels, Oana Ciofu, Helle Krogh Johansen, Zhi-jun Song, Claus Moser, Peter Østrup
459 Jensen, Søren Molin, Michael Givskov, Tim Tolker-Nielsen, and Thomas Bjarnsholt.
460 2011. "The clinical impact of bacterial biofilms." *International Journal of Oral Science* 3
461 (2): 55.
- 462 Hurley, M. N., A. H. Amin Ariff, C. Bertenshaw, J. Bhatt, and A. R. Smyth. 2012. "Results of
463 antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic
464 fibrosis." *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis*
465 *Society* 11 (4): 288–92. doi:10.1016/j.jcf.2012.02.006.
- 466 Kaplan, Jeffrey B. 2009. "Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes." *The*
467 *International Journal of Artificial Organs* 32 (9): 545–54.
- 468 Kaplan, Jeffrey B. 2011. "Antibiotic-induced biofilm formation." *The International Journal of*
469 *Artificial Organs* 34 (9): 737–51. doi:10.5301/ijao.5000027.
- 470 Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero, and J. L. Martinez. 2006. "Antibiotics as intermicrobial
471 signaling agents instead of weapons." *Proceedings of the National Academy of Sciences*
472 103 (51): 19484–89. doi:10.1073/pnas.0608949103.
- 473 Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2002. "Lung infections associated with cystic
474 fibrosis." *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 194–222. doi:10.1128/CMR.15.2.194-
475 222.2002.
- 476 Macià, María D., Estrella Rojo-Molinero, and Antonio Oliver. 2014. "Antimicrobial
477 susceptibility testing in biofilm growing bacteria." *Clinical Microbiology and Infection*,
478 April, n/a-n/a. doi:10.1111/1469-0691.12651.
- 479 Marley, Edith F., Chitra Mohla, and Joseph M. Campos. 1995. "Evaluation of E-Test for
480 determination of antimicrobial MICs for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic
481 fibrosis patients." *Journal of Clinical Microbiology* 33 (12): 3191–3193.
- 482 Moreau-Marquis, S., J. M. Bomberger, G. G. Anderson, A. Swiatecka-Urban, S. Ye, G. A.
483 O'Toole, and B. A. Stanton. 2008. "The F508-CFTR mutation results in increased biofilm
484 formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability." *AJP: Lung*
485 *Cellular and Molecular Physiology* 295 (1): L25–37. doi:10.1152/ajplung.00391.2007.
- 486 Moreau-Marquis, Sophie, Carly V. Redelman, Bruce A. Stanton, and Gregory G. Anderson.
487 2010. "Co-culture models of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on live human
488 airway cells." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 44 (October).
489 doi:10.3791/2186.
- 490 Morita, Yuji, Junko Tomida, and Yoshiaki Kawamura. 2014. "Responses of *Pseudomonas*
491 *aeruginosa* to antimicrobials." *Frontiers in Microbiology* 4,
492 doi:10.3389/fmicb.2013.00422.
- 493 Nathwani, Dilip, Gowri Raman, Katherine Sulham, Meghan Gavaghan, and Vandana Menon.
494 2014. "Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-
495 resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis."
496 *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 3 (1): 32.
- 497 Odenholt, Inga. 2001. "Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations."
498 *International Journal of Antimicrobial Agents* 17 (1): 1–8. doi:10.1016/S0924-
499 8579(00)00243-0.
- 500 Olivares, Elodie, Stéphanie Badel-Berchoux, Christian Provot, Benoît Jaulhac, Gilles Prévost,
501 Thierry Bernardi, and François Jehl. 2016. "The BioFilm Ring Test: a rapid method for

502 routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics." Edited by R.
503 Patel. *Journal of Clinical Microbiology* 54 (3): 657–61. doi:10.1128/JCM.02938-15.

504 Olivares, Elodie, Stéphanie Badel-Berchoux, Christian Provot, Benoit Jaulhac, Gilles Prévost,
505 Thierry Bernardi, and François Jehl. 2017. "Tobramycin and amikacin delay adhesion and
506 microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates." *Frontiers in*
507 *Microbiology* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01289.

508 Oliver, Antonio, Rafael Cantón, Pilar Campo, Fernando Baquero, and Jesús Blázquez. 2000.
509 "High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung
510 infection." *Science* 288 (5469): 1251–53. doi:10.1126/science.288.5469.1251.

511 Poole, Keith. 2011. "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max." *Frontiers in Microbiology*
512 2 (April). doi:10.3389/fmicb.2011.00065.

513 Ratcliff, William Croft, and Robert Ford Denison. 2011. "Alternative actions for antibiotics."
514 *Science* 332 (6029): 547–48. doi:10.1126/science.1205970.

515 Salnikow, J., T. H. Liao, S. Moore, and W. H. Stein. 1973. "Bovine pancreatic deoxyribonuclease
516 A. Isolation, composition, and amino acid sequences of the tryptic and chymotryptic
517 peptides." *The Journal of Biological Chemistry* 248 (4): 1480–88.

518 Schurek, Kristen N., Elena B. M. Breidenstein, and Robert E. W. Hancock. 2012. "*Pseudomonas*
519 *aeruginosa*: a persistent pathogen in cystic fibrosis and hospital-associated infections." In
520 *Antibiotic Discovery and Development*, edited by Thomas J. Dougherty and Michael J.
521 Pucci, 679–715. Springer US. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-1400-](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-1400-1_21)
522 [1_21](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-1400-1_21).

523 Sousa, Ana Margarida, and Maria Olívia Pereira. 2014. "*Pseudomonas aeruginosa* diversification
524 during infection development in cystic fibrosis lungs—A Review." *Pathogens* 3 (3): 680–
525 703.

526 Stepanović, Srdjan, Dragana Vuković, Ivana Dakić, Branislava Savić, and Milena Švabić-
527 Vlahović. 2000. "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal
528 biofilm formation." *Journal of Microbiological Methods* 40 (2): 175–79.
529 doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

530 Stepanović, Srdjan, Dragana Vuković, Veronika Hola, Giovanni Di Bonaventura, Slobodanka
531 Djukić, Ivana Cirković, and Filip Ruzicka. 2007. "Quantification of biofilm in microtiter
532 plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of
533 biofilm production by staphylococci." *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et*
534 *Immunologica Scandinavica* 115 (8): 891–99. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.

535 Tetz, George V., Natalia K. Artemenko, and Victor V. Tetz. 2009. "Effect of DNase and
536 antibiotics on biofilm characteristics." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (3):
537 1204–9. doi:10.1128/AAC.00471-08.

538 Tetz, Victor V., and George V. Tetz. 2010. "Effect of extracellular DNA destruction by DNase I
539 on characteristics of forming biofilms." *DNA and Cell Biology* 29 (8): 399–405.
540 doi:10.1089/dna.2009.1011.

541 Vandecandelaere, Ilse, Heleen Acker, and Tom Coenye. 2016. "A microplate-based system as *in*
542 *vitro* model of biofilm growth and quantification." In *Bacterial Persistence: Methods and*
543 *Protocols*, edited by Jan Michiels and Maarten Fauvart, 53–66. New York, NY: Springer
544 New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_5.

545 Whitchurch, Cynthia B., Tim Tolker-Nielsen, Paula C. Ragas, and John S. Mattick. 2002.
546 "Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation." *Science (New York, N.Y.)*
547 295 (5559): 1487. doi:10.1126/science.295.5559.1487.

	($\mu\text{g/mL}$)	Strain #6	Strain #12
FEP	MIC	24	24
	subMIC	12	12
	PK/PD	192	192
CAZ	MIC	16	1.5
	subMIC	8	0.75
	PK/PD	128	12
IPM	MIC	3	4
	subMIC	1.5	2
	PK/PD	24	32
MEM	MIC	0.75	0.19
	subMIC	0.375	0.095
	PK/PD	6	1.52
TIM	MIC	48	1.5
	subMIC	24	0.75
	PK/PD	-	12

549 **Table 1: β -lactam concentrations tested on *P. aeruginosa* strains in Antibiofilmograms®,**
550 **crystal violet and DNase I assays.** Antibiotic MIC was determined by E-tests. The effect of two
551 others concentrations was investigated on the bacterial adhesion. The subMIC one corresponded
552 to half of MIC and the PK/PD one reflected eight times the MIC (*in vivo* efficacy of residual
553 concentration). When the measured concentration was too high to be clinically relevant, it was
554 not tested in Antibiofilmograms® (sign “-”).

555

556 **Figure legends**

557 **Fig 1: Induction of biofilm formation by β -lactam antibiotics highlighted by**
558 **Antibiofilmogram® results of strains #6 (A) and #12 (B)**

559 BioFilm Index (BFI) are expressed as a function of incubation time. Red dotted lines represent
560 control strains (without antibiotic) and continuous curves symbolise adhesion kinetics of bacteria
561 in contact with different concentrations of β -lactams for 6h. The standard deviations represent the
562 mean of six independent experiments. Statistical analyses have been performed through two-way
563 ANOVA testing and showed that curves with antibiotics are significantly different from the
564 control one at 4h and 6h of incubation ($p < 0.0001$). The bead immobilisation by bacteria is
565 induced by antimicrobials and reflects an induction of the biofilm formation.

566 **Fig 2: Adhesion kinetics of originally stimulated bacterial isolates #6 and #12, 24h after last**
567 **contact with antibiotics**

568 Results are expressed as BFI (BioFilm Index) as a function of incubation time. Color curves
569 represent adhesion kinetics of bacteria, initially stimulated for adhesion by MIC or PK/PD
570 concentrations of FEP, TIM, IPM and MEM. Red dotted line represents the control *i.e.* the
571 original untreated strain. Standard deviations are significant for at least four well replicates for
572 each measurement. Statistic analyses have been performed through two-way ANOVA testing and
573 showed that curves with antibiotics are generally not significantly different from the control one
574 ($p > 0.05$).

575 **Fig 3: Quantitative analysis of biofilm formation by strains #6 (A) and #12 (B) with β -**
576 **lactams by CV staining**

577 Graphs represent biofilm quantification by CV assay. Each bar associated to standard deviation
578 reflects the mean OD_{540nm} of *P. aeruginosa* with or without β -lactam concentrations obtained
579 from twelve replicates for each condition. Statistical analyses have been performed through one-
580 way ANOVA testing for the comparison of each antibiotic concentration with control strain ($p >$
581 0.05). Starting from their average OD value, bacterial cultures were classified following
582 Stepanovic's indications : $OD < OD_c =$ non-adherent cells (0); $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c =$ weak
583 biofilm producer (+); $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c =$ moderate biofilm producer (++) and $4 \times OD_c <$
584 $OD =$ strong adherence of cells (+++) (with OD_c defined as three standard deviations above the
585 mean OD of the negative control).

586 **Fig 4: Inhibition by DNase I of the bacterial adhesion of strains #6 (A) and #12 (B) induced**
587 **by β -lactam concentrations**

588 DNase I effect on bacterial cultures, supplemented or not with different antibiotic concentrations,
589 was investigated by the Antibiofilmogram® procedure as the initial induction process of biofilm
590 formation was highlighted by the BRT device. Images were obtained after magnetization of
591 microplates on the block test and scanning with the dedicated scanner. Firstly bacterial
592 suspensions were analysed without enzyme and with all the appropriate controls to record the
593 process of biofilm formation induction, generated by antimicrobials. The addition of DNase I to
594 cultures, at the time of inoculation, allowed the prevention of this induced early adhesion of
595 bacteria, which initially obstructed the beads migration. Medium controls were also performed
596 with DNase I conditions to check that the enzyme had no effect on spontaneous behaviour of
597 beads. Each bacterial condition was deposited at least in four well replicates.

Figure 1.TIF

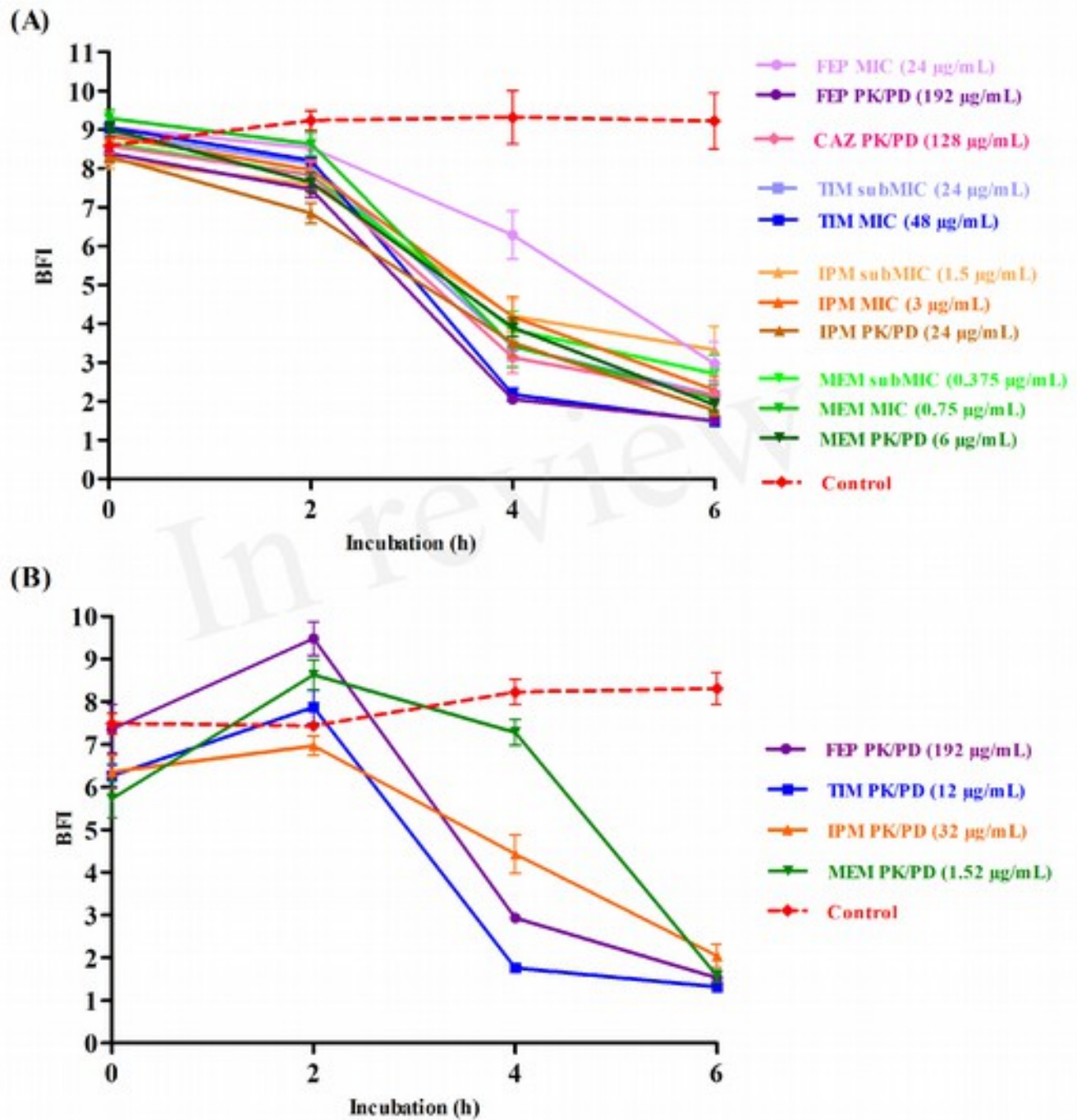


Figure 2.TIF

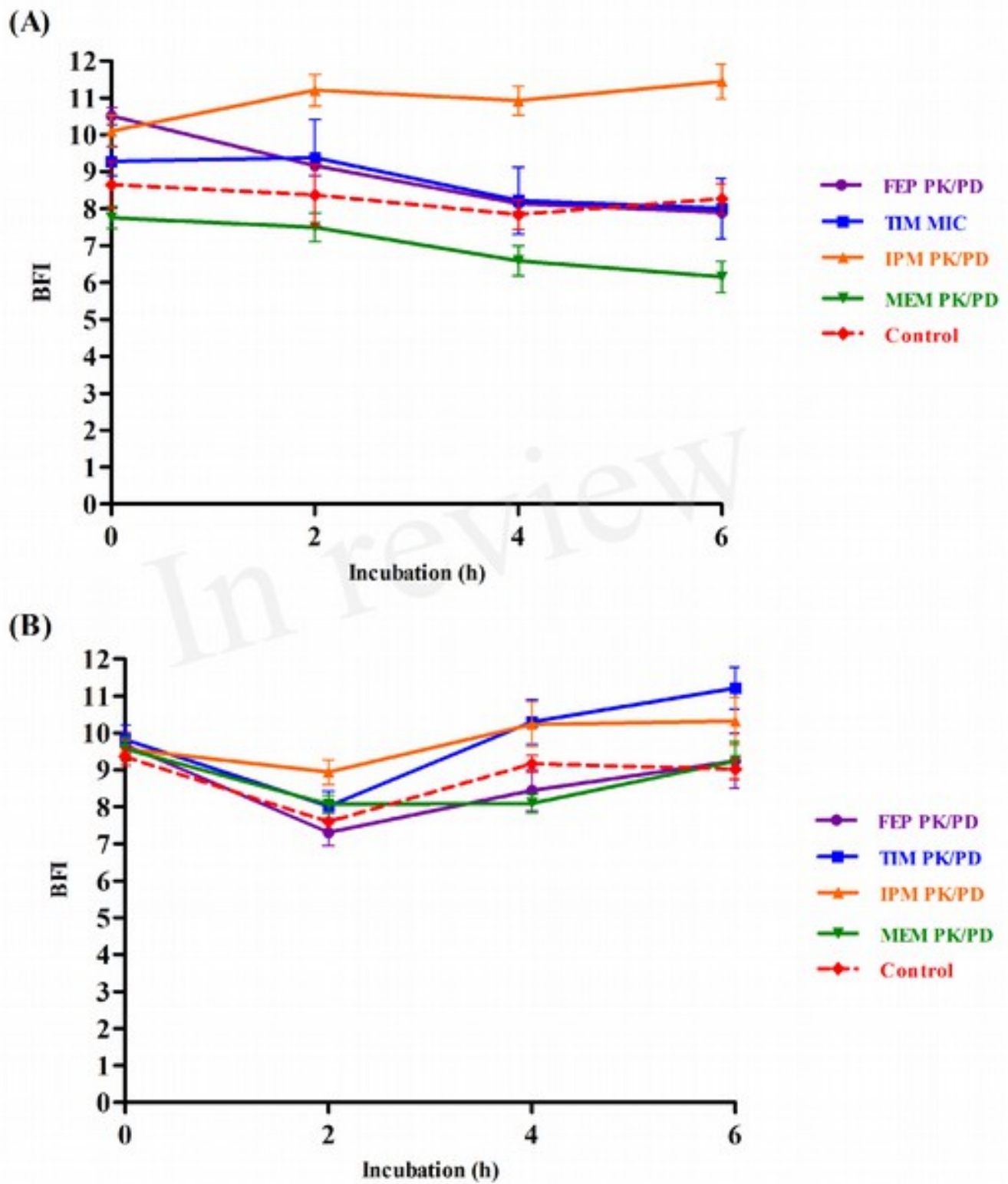
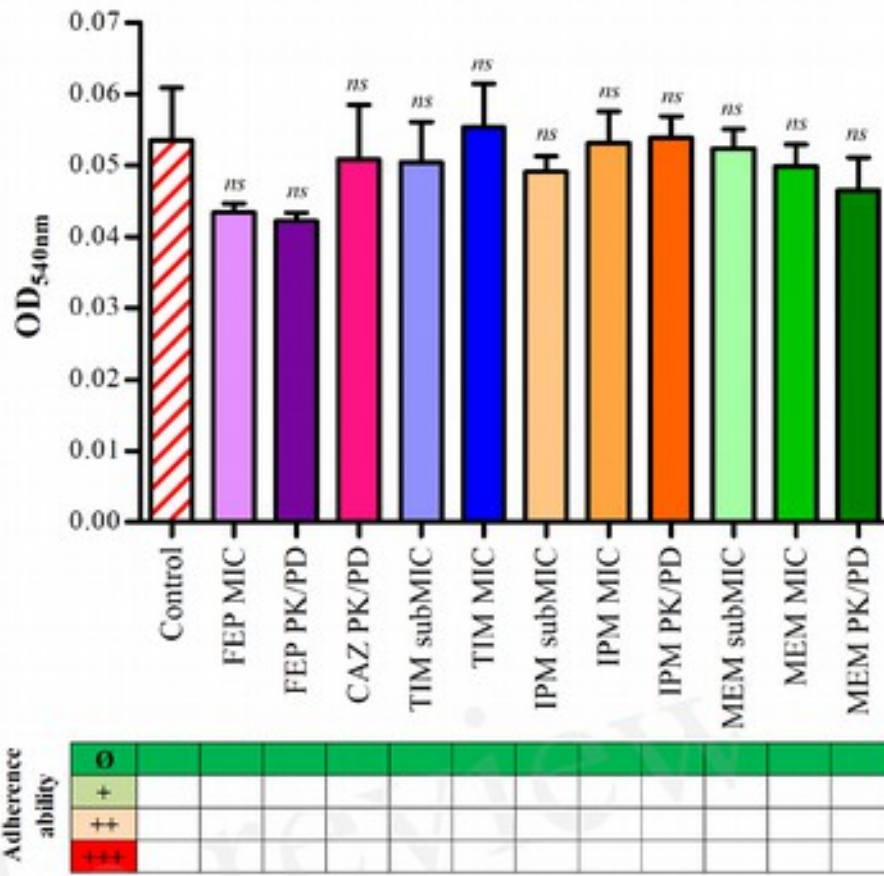


Figure 3.TIF

(A)



(B)

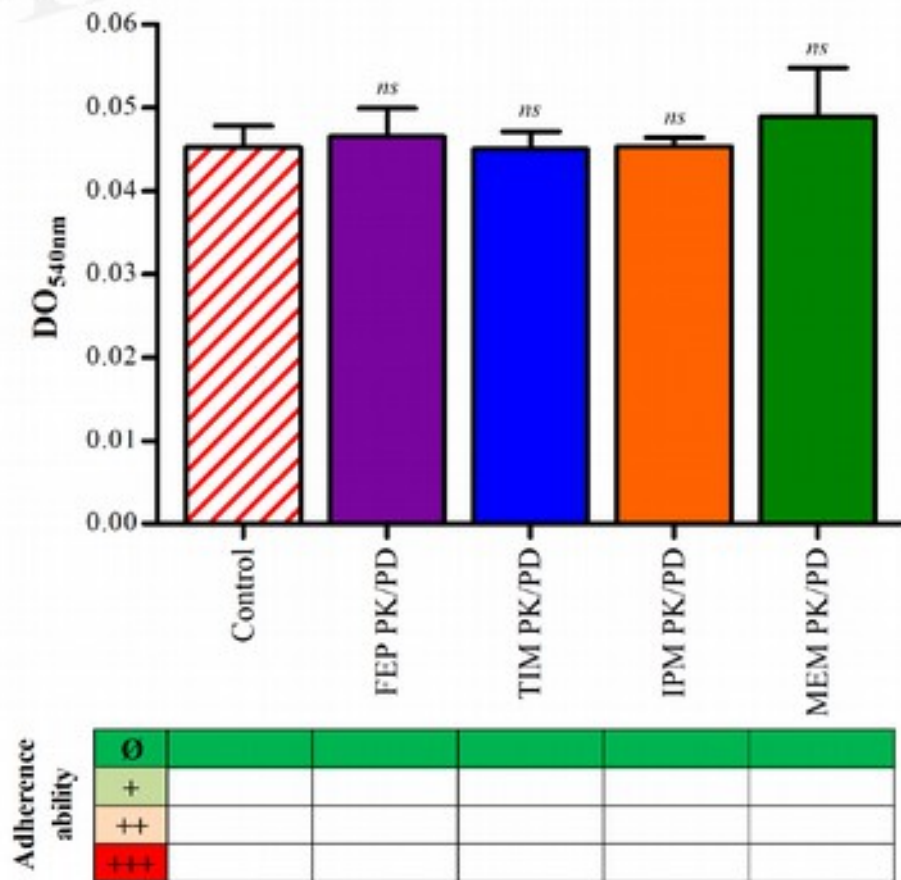
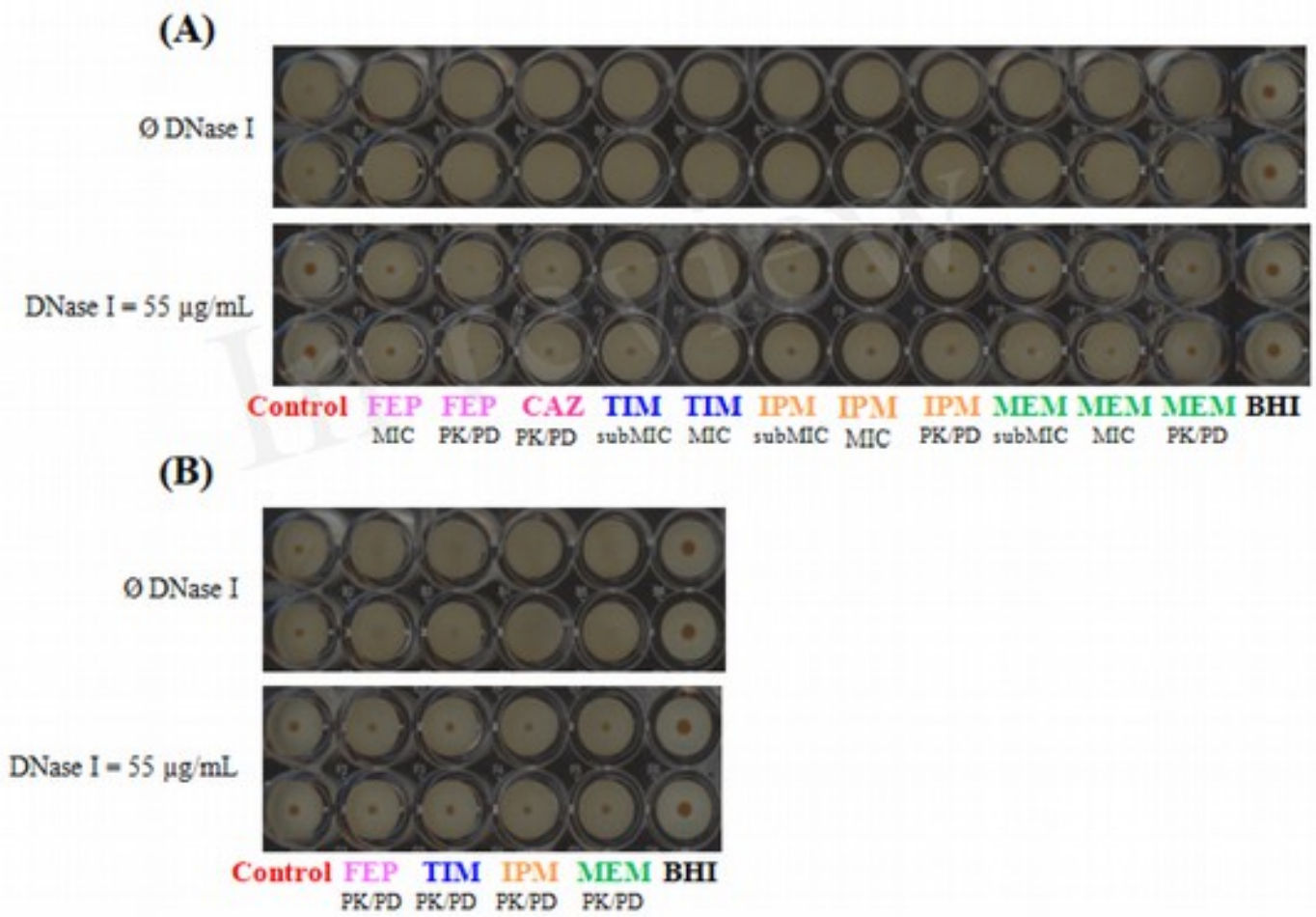


Figure 4.TIF



Chapitre 6

Discussion générale

1. UTILISATION POTENTIELLE DU BRT COMME TEST DE ROUTINE

Apports de la thèse et discussion

Dans le contexte particulier de la mucoviscidose, la colonisation des voies aériennes supérieures par la forme sessile du bacille pyocyanique est directement responsable de la détérioration générale des patients. L'éradication des biofilms bactériens pose un problème sur le plan médical. Bien que les traitements antibiotiques classiques soient actifs sur des cellules planctoniques, il s'avère que leur efficacité est bien moins probante pour l'éradication d'un biofilm.

Un nombre limité de méthodes conventionnelles est disponible pour détecter rapidement la capacité d'une souche bactérienne à former un biofilm. Ces techniques reposent soit sur une quantification de la biomasse microbienne par marquage des cellules adhérentes, soit par l'observation microscopique directe de l'échantillon bactérien. Globalement, le recours au marquage des bactéries est fastidieux de par les nombreuses étapes de lavages pouvant conduire au détachement et à la perte du biofilm. De façon similaire, les techniques de microscopie sont laborieuses à mettre en place en raison de la préparation délicate de l'échantillon. Ainsi, ces méthodologies standards ne peuvent être adaptées à une utilisation en routine.

Le Biofilm Ring Test® a démontré sa capacité à évaluer rapidement les cinétiques d'adhésion spécifiques de souches *P. aeruginosa* cliniques et a ainsi permis de mettre en évidence différents comportements bactériens concernant la formation de biofilms. Cette notion de profils d'adhésion, en fonction du temps d'incubation final appliqué, suggère que la cinétique de formation d'un biofilm peut varier d'une espèce bactérienne à l'autre, mais également d'une souche à l'autre au sein de la même espèce.

Sur le plan technique, le BRT est très praticable. La robustesse de ce nouvel outil s'est également confirmée par une très bonne reproductibilité et l'obtention de résultats en quelques heures seulement. Ces qualités sont indispensables à une technologie dont on peut envisager le passage en routine à court terme.

De par son principe de fonctionnement (mesure du blocage des microbilles paramagnétiques au cours de l'étape précoce de formation du biofilm), le BRT ne permet pas l'obtention d'informations concernant la structure ou l'épaisseur d'un biofilm mature. Dans ce sens, son application est surtout utile à la mise en évidence de l'adhésion bactérienne et de sa cinétique, plutôt qu'à la caractérisation des étapes tardives de formation et de maturation du biofilm bactérien.

De façon générale, il faut garder à l'esprit qu'avoir recours à une méthode d'analyse *in vitro*, utilisant un milieu de culture riche et un support abiotique, bien qu'essentiel dans une démarche de recherche scientifique, ne peut refléter l'environnement naturel et donc le comportement spontané des micro-

organismes. En effet, de récentes analyses transcriptomiques ont établi l'absence de régulons de gènes spécifiques à la croissance biofilm, suggérant que sa formation est majoritairement gouvernée par des réponses adaptatives et par les conditions environnementales (Ciofu et al., 2015; Whiteley et al., 2001).

La méthodologie du BRT a été initialement développée pour le criblage rapide de molécules biocides contre des micro-organismes sessiles. Après l'appréciation de leur cinétique d'adhésion spontanée, l'extension du champ d'application du BRT permet d'évaluer l'effet des antimicrobiens sur le comportement adhérent des isolats bactériens cliniques analysés. L'objectif est alors, en comparaison des CMI standards obtenues au bout de 24h minimum, de déterminer en quelques heures les concentrations de prévention de formation du biofilm des antibiotiques. Les Antibiofilmogrammes®, complémentaires et bien souvent plus pertinents d'un point de vue clinique, devraient pouvoir s'incorporer facilement en routine de diagnostic, aux côtés des antibiogrammes traditionnels.

2. IDENTIFICATION DES EFFETS PRÉVENTIFS ET INDÉSIRABLES DES ANTIBIOTIQUES SUR LA FORMATION DE BIOFILMS GRÂCE À L'ANTIBIOFILMOGRAMME®

Apports de la thèse et discussion

Réduire le délai de rendu des résultats et fournir aux cliniciens l'information dont ils ont besoin pour optimiser le traitement des patients est une priorité essentielle des laboratoires hospitaliers de microbiologie. La résistance aux antibiotiques et surtout l'implication des biofilms bactériens dans la majorité des situations infectieuses rendent les décisions thérapeutiques aléatoires. De nouvelles technologies faciles d'application, rapides et automatisables doivent voir le jour. Idéalement, les qualités requises pour un nouveau test de sensibilité de bactéries sessiles aux antibiotiques sont d'être reproductible, facile d'utilisation, applicable à de nombreux micro-organismes, prédictif de l'issue clinique, peu coûteux, de couvrir une gamme étendue de concentrations en antimicrobiens, d'éviter les contaminations et de permettre l'obtention rapide des premiers résultats.

L'Antibiofilmogramme®, protocole adapté du BRT permettant la détermination de la cinétique d'adhésion d'une culture bactérienne supplémentée de diverses concentrations d'antibiotiques, paraît pouvoir répondre en de nombreux points à ces prérequis. Comme déjà justifié précédemment, le BRT semble se positionner idéalement comme le nouvel outil de test de la sensibilité des micro-organismes sessiles aux antibiotiques. Entre nos mains, il a permis, par la réalisation de tests Antibiofilmogrammes® sur des isolats cliniques de *P. aeruginosa*, l'identification directe des effets bénéfiques et délétères des antibiotiques pouvant être préconisés dans le traitement des atteintes pulmonaires des patients

mucoviscidosiques. Dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence l'impact préventif des aminosides sur la formation de biofilms par des cellules sessiles. L'addition de concentrations d'antibiotiques, jugées comme pertinentes pour leur efficacité *in vivo*, à des cultures de *P. aeruginosa*, a conduit à un retardement de l'adhésion spontanée des cellules. Ces résultats confirment donc l'intérêt potentiel d'utiliser, comme molécules de premier choix, cette classe d'antimicrobiens pour l'éradication des infections précoces aux bacilles pyocyaniques. Bien entendu, cet effet bénéfique des aminosides ne peut être extrapolé à l'ensemble des souches bactériennes. Il s'oppose même partiellement à certains travaux de la littérature décrivant ces antibiotiques comme n'ayant aucun impact sur l'adhésion précoce des bactéries voire même comme pouvant l'induire à de faibles concentrations (Hoffman, 2005). Elliott *et al.* ont également noté cette capacité des concentrations subinhibitrices de tobramycine à déclencher l'initiation de la formation de biofilm par 81 isolats cliniques de *P. aeruginosa*, prélevés chez des patients mucoviscidosiques de moins de 15 ans (Elliott *et al.*, 2010). L'âge des patients, chez qui les souches sont isolées, pourrait être un paramètre influençant la réponse des bactéries aux aminosides. En effet, les souches colonisant des pré-adolescents reflètent encore probablement la primo-colonisation des voies aériennes. Elles expriment donc un phénotype planctonique, permettant ainsi l'induction du mode de vie sessile. À l'inverse, les souches cliniques de notre collection, chez qui l'inhibition de l'adhésion par les aminosides a pu être mise en évidence, ont toutes été isolées chez des patients mucoviscidosiques de plus de 25 ans (données ne figurant pas dans le RDC). Leur prélèvement a donc été réalisé dans un contexte d'infection chronique, impliquant un taux basal élevé de formation de biofilm. Un potentiel effet inducteur des antibiotiques sera donc difficilement visible, contrairement à un processus de prévention de l'adhésion bactérienne.

Finalement, ce phénomène d'induction est justifié comme une réponse adaptative des micro-organismes à une exposition d'antibiotiques. En effet, la tobramycine est une molécule initialement synthétisée par la bactérie *Streptomyces tenebrarius*, qui cohabite dans le sol avec *P. aeruginosa*. Il est donc probable que le bacille pyocyanique ait développé une capacité d'adaptation à la tobramycine par la formation d'un biofilm résistant, avant l'utilisation même de la molécule en clinique. Le caractère sessile de *P. aeruginosa* répondant de manière biphasique à l'action des antimicrobiens, ces derniers peuvent alors avoir une action agoniste ou antagoniste sur la capacité des bactéries à former un biofilm, en fonction de leurs concentrations (Kaplan, 2011). Ce constat souligne alors l'importance de mener des investigations à des concentrations variées d'antibiotiques.

La mise en place d'Antibiofilmogrammes® précis et complets semble ainsi conforter le choix d'une proposition thérapeutique efficace pour certains prélèvements cliniques. D'autant plus que cet effet inhibiteur potentiel des antibiotiques sur la formation du biofilm bactérien a pu être confirmé par différentes méthodologies, dont la technique conventionnelle *in vitro* de marquage des cellules adhérentes

au Cristal Violet et un modèle plus complexe de co-culture cellulaire, renforçant ainsi la véracité de son existence.

En parallèle, la réalisation d'Antibiofilmogrammes® a révélé la capacité des β -lactamines à induire, ou tout du moins accélérer, l'adhésion précoce de souches cliniques non adhérentes (conservation spontanée du phénotype planctonique sur au moins 6h d'incubation). Selon leurs concentrations, ces antibiotiques peuvent conduire à la stimulation négative des micro-organismes, conduisant à l'initiation de la formation d'un biofilm bactérien. Bien que souche-dépendant, cet effet indésirable de l'antibiothérapie générale peut se produire lors du traitement d'infections pulmonaires par *P. aeruginosa*. Comme pour la validation du phénomène d'inhibition par les aminosides, nous avons souhaité confirmer le processus d'induction par une méthodologie *in vitro* comparative. Nous avons donc eu recours encore une fois à la technique de détection du biofilm par CV. Étrangement, pour cet effet spécifique et délétère des β -lactamines, aucune concordance de résultats n'a pu être retrouvée, alors que l'impact préventif des aminosides avait pu être démontré par les deux méthodes. Cette absence de corrélation entre le BRT et le CV dans le cas présent nous a amenés à nous interroger sur la limite de détection de la technique de marquage. En effet, un des désavantages bien connus de cette méthode est l'estimation de l'adhésion bactérienne pouvant être biaisée en cas de faible production de biofilms. Sachant que le BRT permet précisément de mettre en évidence l'adhésion précoce des micro-organismes, nous avons donc supposé que le phénomène d'induction de la formation précoce de biofilm par les antibiotiques pouvait être détecté en Antibiofilmogrammes® et non pas par la méthodologie du CV (temps d'incubation trop court pour permettre un marquage efficace des cellules adhérentes). Pour vérifier cela, nous avons donc eu recours à un traitement enzymatique préalable de nos cultures microbiennes additionnées de différentes concentrations d'antibiotiques. L'ajout de DNase I aux préparations bactériennes a permis de confirmer l'inhibition de l'adhésion précoce des bactéries initialement induite par les antibiotiques. Ces données complémentaires, indétectables par les techniques d'étude standards actuelles, précisent un peu plus l'efficacité du BRT et de l'Antibiofilmogramme® quant à leur capacité à mettre en avant des comportements bactériens précoces et l'effet consécutif des antimicrobiens sur les micro-organismes.

De plus, l'évaluation des cinétiques d'adhésion des isolats bactériens, ayant acquis un phénotype sessile suite à leur contact avec des concentrations inductrices d'antibiotiques, a révélé le caractère réversible du processus. Concrètement, les β -lactamines sont capables, de par leur simple présence dans le milieu, d'induire l'expression transitoire de gènes spécifiques à l'adoption du phénotype sessile par les bactéries (Kaplan et al., 2012). Une fois que les antibiotiques sont retirés du milieu, les micro-organismes, pour qui l'établissement d'un biofilm protecteur engendre une dépense énergétique conséquente, ré-adoptent rapidement leur phénotype planctonique spontané. Ce comportement d'anticipation des bactéries à une future exposition à un traitement antibiotique est courant *in vivo*. Cependant, pour les patients

mucoviscidosiques, pour qui les antibiothérapies sont la plupart du temps administrées en continu, il est peu probable que la réversibilité de l'adhésion précoce bactérienne induite puisse avoir lieu. La conséquence directe de thérapeutiques inappropriées semble alors l'induction prématurée de la chronicité des atteintes pulmonaires. Cet effet indésirable des antibiotiques sur la mise en place d'un biofilm bactérien ne doit donc pas être pris à la légère et semble alors pertinent à évaluer en routine au même titre que le potentiel inhibiteur d'autres molécules. Dans les deux cas, l'Antibiofilmogramme® apparaît comme le test le plus adéquat dans l'objectif d'affiner les prescriptions thérapeutiques pour la mucoviscidose.

Perspectives

La perspective finale du projet Antibiofilmogramme® serait l'application du test en association des antibiogrammes standards, en routine et pour certaines situations cliniques. En effet, il serait conceptuellement intéressant de réaliser, à l'arrivée d'un nouvel échantillon microbien au laboratoire, un antibiogramme conventionnel, et en même temps de préciser l'effet des molécules antibiotiques sélectionnées sur l'adhésion bactérienne par la méthodologie du BRT. Concrètement, l'antibiogramme classique permettrait une première sélection de molécules antibiotiques auxquelles les bactéries en phase planctonique de croissance sont sensibles. Ces antibiotiques pourront alors être testés à diverses concentrations en Antibiofilmogrammes® afin d'estimer la CMI biofilm, à mettre en corrélation avec la CMI initiale déterminée par antibiogramme, et de mettre en évidence le potentiel effet inhibiteur ou inducteur de ces mêmes concentrations d'antibiotiques, sur la formation de biofilm. Une molécule à une concentration donnée à laquelle la souche analysée est sensible en antibiogramme, mais qui présente la capacité d'induire l'adhésion des bactéries devra être écartée des posologies à prescrire. À l'inverse, un antibiotique considéré comme efficace en antibiogramme et capable d'inhiber l'adhésion précoce et donc l'initiation de la formation d'un biofilm par *P. aeruginosa*, en Antibiofilmogrammes®, devra être envisagé comme une molécule de premier choix à utiliser pour le traitement des exacerbations pulmonaires.

Cette stratégie combinée antibiogramme/antibiofilmogramme permettrait, en un minimum de temps, de déterminer, quels sont les antibiotiques susceptibles d'être à la fois actifs sur *P. aeruginosa* (activité bactéricide), capables de prévenir l'établissement du biofilm et donc retarder la colonisation pulmonaire chronique des patients mucoviscidosiques et aptes à contrecarrer la production de facteurs d'adhésion. Globalement, cela permettrait d'affiner les thérapeutiques anti-infectieuses en associant à chaque antibiotique un effet préventif ou au contraire un risque inducteur de l'adhésion précoce des micro-organismes.

Avant d'arriver à un tel objectif idéal, de nombreuses étapes de validation du procédé doivent encore être atteintes. Des protocoles cliniques visant à établir la prédictivité du test Antibiofilmogramme® dans le cas d'infections ostéo-articulaires et d'infections de plaies sont déjà en cours.

Dans le cas plus spécifique de nos travaux menés sur des souches mucoviscidiques, l'efficacité clinique de prescriptions sélectionnées sur la base des résultats obtenus par Antibiofilmogrammes® pourra être confirmée sur des modèles animaux maîtrisés de pneumopathie (lapin, souris). Cet axe du projet de recherche devrait permettre de consolider les résultats obtenus *in vitro* par des données expérimentales *in vivo*.

Chapitre 7

Articles et communications liés à la thèse

LISTE DES COMMUNICATIONS

Publications

- 1) **Olivares, E.**, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2016). The BioFilm Ring Test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 657–661. <https://doi.org/10.1128/JCM.02938-15>
- 2) Argemi, X., Prévost, G., Riegel, P., Provot, C., Badel-Berchoux, S., Jehl, F., **Olivares, E.**, Hansmann, Y. (2017). Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.002>
- 3) **Olivares, E.**, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2017). Tobramycin and amikacin delay adhesion and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8:1289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01289>

Communications orales

- 1) 12^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Paris – France, 22-23 Mars 2016 : **Olivares, E.***, Clerigué-Louzado, J., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *L'induction de la formation du biofilm par les antibiotiques chez P. aeruginosa est réversible.*
- 2) 35^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris – France, 14-15 Décembre 2015 : **Olivares, E.***, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Antibiofilmogramme : l'induction de la formation de biofilms par les antibiotiques chez P. aeruginosa est un phénomène réversible.*
- 3) 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen – Danemark, 25-28 Avril 2015 : **Olivares, E.***, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Antibiofilmogram, a potential tool to optimize antibiotic choice against biofilm formation in cystic fibrosis patients (présentation orale d'un ePoster).*
- 4) Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, Strasbourg – France, 09 Avril 2015 : **Olivares, E.***, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Antibiofilmogram, a potential tool to optimize antibiotic therapy against bacterial biofilms in cystic fibrosis patients.*
- 5) Journées de l'École Doctorale, Illkirch – France, 26-27 Février 2015 : **Olivares, E.***, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Antibiofilmogram, a potential tool to optimize antibiotic therapy against bacterial biofilms in cystic fibrosis patients.*

Posters

- 1) 36^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris – France, 12-13 Décembre 2016 : **Olivares, E.**, Crabbé, A., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Effets des antibiotiques sur le biofilm de P. aeruginosa en co-culture cellulaire*.
- 2) 17^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), Lille – France, 07-09 Juin 2016 : **Olivares, E.**, Clerigué-Louzado, J., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *La formation de biofilm par P. aeruginosa est inductible par les antibiotiques et réversible*.
- 3) 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam – Pays-Bas, 09-12 Avril 2016 : **Olivares, E.**, Clerigué-Louzado, J., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Induction of biofilm formation by antibiotics in Pseudomonas aeruginosa is a reversible process (ePoster viewing)*.
- 4) 7th ASM Conference on Biofilms (American Society of Microbiology), Chicago – Etats-Unis, 24-29 Octobre 2015 : **Olivares, E.***, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Antibiofilmogram, a potential tool to optimize antibiotic choice against biofilm formation in cystic fibrosis patients*.
- 5) Meeting of ESCMID Study Group for Biofilms (Biofilm – based healthcare – associated infections : from microbiology to clinics), Rome – Italie, 09-10 Octobre 2014 : **Olivares, E.***, Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F., *Antibiofilmogram, a potential tool to optimize antibiotic choice against biofilm formation in cystic fibrosis patients*.

Prix et récompenses

- ✓ **Prix de la meilleure communication**, Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, Strasbourg – France, 09 Avril 2015.
- ✓ **ESGB Poster Award**, Meeting of ESCMID Study Group for Biofilms (Biofilm – based healthcare – associated infections : from microbiology to clinics), Rome – Italie, 09-10 Octobre 2014.

ARTICLE

Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections



Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections

Xavier Argemi^{a,b,*}, Gilles Prévost^b, Philippe Riegel^b, Christian Provot^c, Stéphanie Badel-Berchoux^c, François Jehl^b, Elodie Olivares^{b,c}, Yves Hansmann^{a,b}

^a Hôpitaux Universitaires, Maladies Infectieuses et Tropicales, Strasbourg, France

^b Université de Strasbourg, CHRU de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), VBP EA7290, Institut de Bactériologie, 3 Rue Koeberlé, Strasbourg, France

^c BioFilm Control SAS, Saint-Beauzire, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2017

Received in revised form 5 May 2017

Accepted 6 May 2017

Available online 12 May 2017

Keywords:

Staphylococcus lugdunensis

Biofilm

Prosthetic joint infections

Diabetes

ABSTRACT

Objective: To describe the clinical presentation and 1-year follow-up of patients with bone and joint infections (BJIs) caused by *Staphylococcus lugdunensis* and evaluate its biofilm-forming capacities.

Patients and methods: Overall, 28 patients with BJIs from VISLISI clinical trials were included. We evaluated 1-year clinical follow-up and analyzed biofilm production kinetics of the 28 strains using the BioFilm Ring Test®.

Results: Of all patients, 12 had osteoarticular infections without material and 16 had prosthetic joint infections, of which 9 underwent a 1-stage revision procedure. At the 1-year follow-up, all patients were cured but needed a surgical intervention. Diabetes affected 46.4% of all patients. Of all, 20 strains (71.4%) started biofilm formation within 2 h, but all strains started the formation after 4 h experiment, and 25 strains (89.3%) reached a maximum after 6 h.

Conclusions: This study describes the clinical and surgical management of BJIs caused by *S. lugdunensis* and shows that 1-stage prosthesis exchange procedures may be efficient. Further, it shows that biofilm production by this strain was not marginal and directly impacted clinical and surgical management.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus lugdunensis is a coagulase negative staphylococcus species (CNS) that may cause various infections with unusual severity (Babu and Oropello, 2011). This commensal skin bacteria was originally described mainly in the skin and soft tissue infections, but recent retrospective studies have emphasized its role in bone and joint infections (BJIs), particularly prosthetic and joint infections (PJIs) (Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016; Seng et al., 2017; Shah et al., 2010). These clinical observations are supported by some microbiological properties of this atypical CNS. Indeed, it produces a bound coagulase via a clumping factor, but this is only one of multiple adhesion factors described in this species. It exhibits a high binding percentage to purified collagen I and IV and immunoglobulin G, but it also binds fibrinogen, laminin, fibronectin, and plasminogen (Paulsson et al., 1993). Two adhesins, the fibrinogen binding protein (locus *Fbl*) and the von Willebrand factor binding protein (locus *vwbl*), have been reported (Mitchell, 2004; Nilsson et al., 2004). But additional surface components that recognize adhesive matrix molecules may exist, as suggested by genome sequence analysis of *S. lugdunensis* strains, N920143 and HKU09-01, which indicates several putative proteins covalently

anchored to the cell wall surface (Heilbronner et al., 2011). Besides its ability to bind extracellular matrix components, *S. lugdunensis* produces a biofilm that is mainly proteinaceous and contains iron-regulated surface determinants (Hussain et al., 2015; Zapotoczna et al., 2012). We recently conducted a prospective clinical trial that confirmed the pathogenicity of *S. lugdunensis* and facilitated the identification of a novel metalloprotease named lugdulysin, which is statistically linked to deep BJIs (Argemi et al., 2016). It represented approximately 35% of all infections, and this rate was in accordance with a previous published study (Douiri et al., 2016). In this secondary analysis of VISLISI clinical trial, we focused on the clinical characteristics, treatment, and evaluated the outcome at the 1-year follow-up of all patients who presented with BJIs. We performed a biofilm production analysis at the microbiological level using a recently available technology called the BioFilm Ring Test® (BRT; BioFilm Control, Saint-Beauzire, France), based on superparamagnetic bead mobility in bacterial suspensions (Chavant et al., 2007; Olivares et al., 2016). This device was used previously to evaluate biofilm production by *Staphylococcus aureus* and other CNS, and some *S. aureus* strains were shown to produce biofilm within 4–5 h, a result of high importance from a clinical perspective as biofilm-associated infection has emerged as a therapeutic challenge (Chavant et al., 2007; Di Domenico et al., 2016; Tasse et al., 2016). Biofilm-embedded bacteria represent a physical and biochemical barrier to antibiotic diffusion, and mechanical debridement of material-

* Corresponding author. Tel.: +33-368550545.

E-mail address: xavier.argemi@chru-strasbourg.fr (X. Argemi).

associated infections sometimes remains as the univocal solution to eliminate bacteria and biofilm (Flemming et al., 2016; Lebeaux et al., 2014).

2. Methods

2.1. Study population

VISLISI clinical trial was previously reported (NCT: 02026895) (Argemi et al., 2016). Overall, 81 patients with *S. lugdunensis* infection in the Strasbourg University Hospital from November 2013 to March 2016 were included in the study. All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the National Research Committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. The study was approved by the French Ethical Committee under registration number IDCRB-2013-A01057-38 and promoted by the University Hospital of Strasbourg (PRI 2013–HUS No. 5616). Informed and signed consent was obtained from all individual participants included in the study. Of the 81 patients, 28 presenting with BJIs were selected for subsequent analyses. BJIs and PJIs were defined as having 2 or more positive intra-operative cultures or a combination of positive preoperative aspiration and intra-operative cultures according to PJI guidelines of the Infectious Diseases Society of America (IDSA) (Osmon et al., 2013). For patients with only 1 bone sample positive for *S. lugdunensis*, infection was confirmed by 3 additional criteria: clinical signs of infection, a positive pure culture, and samples that did not come from a known niche (groin area, lower extremities, or axillae) (Bieber and Kahlmeter, 2010; Ho et al., 2015; van der Mee-Marquet et al., 2003). Postoperative infections occurring within 3 months after prosthesis implantation were classified as “early,” whereas those occurring within 3 months to 1 year after implantation were classified as “delayed,” according to IDSA classification (Osmon et al., 2013).

2.2. Data collection and follow-up

All clinical and paraclinical parameters were recorded at admission and after 1 month follow-up. The final outcome was evaluated 1 year after admission. The immunological status of the patient was evaluated 1 month after admission, including the white blood cell count, gammaglobulin dosage, phenotyping of lymphocytes, and complement components dosage.

2.3. Bacterial identification and antibiotics susceptibility testing

All strains were identified using MALDI-TOF MS, as previously described (Argemi et al., 2015). Regarding bone, joints, and material samples, bacteriologists systematically inoculated pediatric blood culture bottles (BACTEC PED PLUS, BD Diagnostics, France) for the analysis of joint fluid, tissue, and sonicated prosthetic materials prior to culture media inoculation. Antimicrobial susceptibility testing was performed using the VITEK 2 microbial identification system (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) or agar diffusion tests according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for the 2013–2016 study period (the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2014). All strains were named after their identification number in the VISLISI clinical trial that included 81 patients. Therefore, strains were numbered according to the patient inclusion number in the trial. For example, strain 2 referred to the second patient included in the VISLISI trial. Lugdulysin production and slide coagulation tests were described previously (Argemi et al., 2016).

2.4. BioFilm Ring Test (BRT)

The BRT kit consisted of 96-well microplates, toner (solution containing magnetic microbeads), contrast liquid (inert opaque oil used for plate reading step), and a pack including a block test (magnets

holder), a dedicated plate reader, and BFC Elements® software (v 3.0) to acquire and analyze images. All strains analyzed were pre-cultured for 24 h on brain heart infusion (BHI) agar plates. Selected colonies were suspended in sterile BHI medium, and the initial bacterial suspension (IBS) was prepared to a final concentration of 4.10^6 CFU/mL in BHI containing the toner suspension (10 µL/mL). After homogenization by vortexing, bacterial mixtures were loaded with 200 µL of IBS per well. One plate was prepared for each incubation time tested (0, 2, 4, and 6 h). Microplates were incubated at 37 °C. Controls of spontaneous adhesion kinetics of bacteria and bead migration (medium without bacterial strains) were also prepared in each plate and analyzed. For plate reading, 120 µL of contrast liquid was used to cover the medium in the wells that were scanned with the plate reader after 1 min magnetization with the block test. The block test was made of 96 mini magnets that were centered under the bottom of each well. During magnet contact, free beads were attracted toward the center of wells to form a brown spot, whereas the beads embedded in biofilm were blocked and remained non-detectable. The adhesion ability of each strain was expressed as BioFilm Index (BFI) and calculated by BFC Elements® software (v 3.0), as previously described (Olivares et al., 2016). A high BFI value (BFI > 17) signified a high bead mobility under magnet action that corresponded to the absence of biofilm formation (similar to the control wells), whereas a zero value (BFI = 0) shows full bead immobilization because of the sessile cells. Results were displayed at each time point as the results of 4 measurements, corresponding to 4 different wells (quadruplicates), with standard deviation.

2.5. Statistical analyses of groups repartition

Patient characteristics at admission and during follow-up were compared using the Fisher exact test for qualitative data and the Wilcoxon rank-sum tests for quantitative data. *P* values were 2-sided and *P* < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using STATA software, version 11.0 (Stata Corp., College Station, TX).

3. Results

3.1. Study population

Of the 28 patients included in the analysis, 12 had material-free infections and 16 had PJIs. Age, sex, background, and infection characteristics are reported in Tables 1 and 2. Regarding material-free infections, metatarsophalangeal localizations were the most frequent (*n* = 7, 58.3%) followed by concomitant diabetes (*n* = 8, 66.7%). Only 1 patient (8.3%) had fever but 3 (25%) had sepsis. Two (16.6%) had postoperative infections, both of which occurred after a sternotomy caused by cardiac surgery after 1 and 4 weeks, respectively. Regarding PJIs, most patients had total knee arthroplasty infections (*n* = 9, 56.3%) and 5 (31.3%) had concomitant diabetes. Only 2 patients (12.5%) presented with fever, but 5 (31.3%) fulfilled the sepsis criteria. Eight (50%) infections occurred within 1 year after surgery, but only 2 (12.5%) were diagnosed between 3 months and 1 year after prosthesis implantation and were considered delayed. All other postoperative infections (*n* = 6, 37.5%) were classified as early. Four patients (25%) had prosthesis infections within 1 month after implantation.

3.2. Patient treatment and outcome

Nearly all patients required surgical intervention and antibiotics treatments (*n* = 27, 96.4%, Table 2). Regarding material-free infections, transmetatarsal amputation was the most frequent intervention performed (*n* = 4, 33.3%) and fluoroquinolones and amoxicillin/clavulanate were the frequently prescribed medications (*n* = 5, 41% and *n* = 4, 33.3%, respectively) for a short term (≤2 weeks in 6 patients, 50%). Of the 12 patients, 11 (91.7%) were cured and the remaining patient underwent a

Table 1
Clinical and biological characteristics of patients with osteoarticular and prosthetic joints infections caused by *S. lugdunensis*.

	Osteoarticular infection n = 12	Prosthetic joint infections n = 16	P value
Clinical characteristics at admission			
Age, year, mean ± SD ¹	59.9 ± 11.3	66.9 ± 13.3	0.05
Male	6 (50%)	6 (37.5%)	0.70
Female	6 (50%)	10 (62.5%)	-
Charlson, mean ± SD	3.7 ± 2.4	3.6 ± 1.8	-
Cancer	1 (8.3%)	4 (25%)	0.35
Diabetes	8 (66.7%)	5 (31.3%)	0.12
Hypertension	6 (50%)	13 (81.3%)	0.11
Dyslipidemia	4 (33.3%)	7 (43.8%)	0.70
BMI, mean ± SD	27.5 ± 6.4	33.6 ± 6.3	0.04
T°C, mean ± SD	37.1 ± 0.2	37.4 ± 0.6	0.49
T°C ≥38 °C at admission	1 (8.3%)	2 (12.5%)	1.00
Sepsis	3 (25%)	5 (31.3%)	1.00
Abscess	3 (25%)	2 (12.5%)	0.62
Infection localisation			
Metatarsophalangeal	7 (58.3%)	3 (18.8%)	0.05
Metacarpophalangeal	2 (16.7%)	0	0.17
Rachis	1 (8.3%)	3 (18.8%)	0.61
Sternum	2 (16.7%)	0	0.17
Knee	0	9 (56.3%)	0.00
Hip	0	1 (6.3%)	1.00
Biological parameters at admission			
Hemoglobin, g/dL, mean (SD)	12.1 (1.6)	11.4 (2)	0.20
Platelets, 10 ⁹ /L, mean (SD)	298 (120)	341 (102)	0.30
Leukocytes, 10 ⁹ /L, mean (SD)	7.8 (3.4)	7.2 (1.7)	0.69
Neutrophils, 10 ⁹ /L, mean (SD)	4.5 (2)	4.5 (1.4)	0.89
Lymphocytes, 10 ⁹ /L, mean (SD)	1.7 (0.7)	1.7 (0.4)	0.91
Creatinine clearance, mL/min, mean (SD)	82 (16)	84 (13)	0.70
CRP ² , mg/L, mean (SD)	43 (80)	63 (54)	0.07
Lugdulysin positive	11 (91.7%)	9 (56.3%)	0.00
Clumping factor positive	5 (41.7%)	2 (12.5%)	0.10
One-month follow-up			
Length hospital stay, d, mean (SD)	15 (12)	18 (14)	0.53
Leukocytes, 10 ⁹ /L, mean (SD)	7.8 (1.8)	6 (1.3)	0.01
Neutrophils, 10 ⁹ /L, mean (SD)	4.7 (1.6)	3.5 (1.1)	0.08
Lymphocytes, 10 ⁹ /L, mean (SD)	1.8 (0.7)	1.5 (0.5)	0.21
Gammaglobulines, g/L, mean (SD)	9.8 (1.7)	10.9 (4)	0.53
IGG ³ , g/L, mean (SD)	10.3 (1.7)	12.2 (3.4)	0.18
LT ⁴ CD4 ⁺ , c/mm ³ , mean (SD)	888 (257)	814 (442)	0.23
LT CD8 ⁺ , c/mm ³ , mean (SD)	489 (204)	354 (250)	0.11
LT CD20 ⁺ , c/mm ³ , mean (SD)	267 (137)	170 (124)	0.08
LT CD56 ⁺ , c/mm ³ , mean (SD)	195 (125)	145 (107)	0.35
C3, g/L, mean (SD)	1.2 (0.2)	1.4 (0.4)	0.24
C4, g/L, mean (SD)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.18
Total complement, U/mL, mean (SD)	71 (7)	71 (11.5)	0.61

¹ SD = Standard deviation.

² T°C = Temperature.

³ CRP = C-reactive protein.

⁴ IGG = Immunoglobulin G.

⁵ LT = T Lymphocyte.

total transmetatarsal amputation after metatarsophalangeal resection arthroplasty. Regarding PjIs, particularly those patients with a total knee arthroplasty infection, 7 of the 9 patients underwent a 1-stage revision, 1 patient with an early postoperative infection underwent an irrigation debridement intervention with material retention, and 1 patient underwent only irrigation debridement followed by suppressive therapy because of his general condition. Half of the patients (n = 8, 50%) underwent 6 weeks of antibiotic therapy following surgery, and 15 of 16 patients (93.8%) underwent less than 3 months antibiotics therapy. All patients were cured at the 1-year follow-up except for the 1 patient who underwent suppressive therapy.

3.3. Microbiological results

All strains were identified using MALDI-TOF MS. Of the 28 strains, 3 were small colony variants (SCVs) and needed 48–72 h at 37 °C to grow (strains 2, 19, and 40). All strains remained susceptible to methicillin,

fluoroquinolones, aminoglycosides, clindamycin, and rifampicin. Slide agglutination tests yielded positive results in 7 of the 28 (25%) strains, and proteolytic activity because of lugdulysin was identified in 16 of the 28 strains (57.1%).

3.4. Comparison with previously published studies

Four studies from 2010 to 2017 focused on BJIs caused by *S. lugdunensis*; we did not include case reports in this comparison (Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016; Seng et al., 2017; Shah et al., 2010). The results are displayed in Table 3. All 4 were retrospective studies that included 28–39 patients with a similar mean age and sex ratio. Prosthetic knee infections were most often reported except Seng et al., who focused on osteomyelitis and thus mainly reported diabetic foot infections. A 2-stage revision and irrigation debridement were the most frequent therapeutic approaches for prosthetic infections and a medical treatment alone for diabetic foot infections. After various follow-up lengths that ranged from 1 to 2 years, treatment failure was observed in 8%–22% cases.

3.5. Biofilm production

Test adherence was positive for all strains i.e., all strains produced biofilm (Fig. 1). Of all, 20 strains (71.4%) started biofilm formation within 2 h (BFI <17), but all strains had started after 4 h experiment, and after 6 h, 25 strains (89.3%) had fully immobilized the microbeads. Strains 2, 13, and 40 reached a BFI <8 at 6 h but they were unable to completely block the beads at this time, showing a slow attachment kinetics.

3.6. Comparison between PjIs and material-free infections

Statistical analyses are reported in Table 1. The clinical characteristics of patients with and without prosthetic infections were not significantly different, except for body mass index that was significantly higher in patients with PjIs (P = 0.048). Regarding infection localization, knee infections occurred more often in patients with PjIs (P = 0.003), and no significant differences in other infection localizations were detected. Biological parameters at admission and at the 1-month follow-up were not significantly different between the 2 groups, except for the leukocyte count that was significantly higher in patients without PjIs (P = 0.016). The lugdulysin production frequency was significantly higher in patients with material-free infections (P = 0.000), and the presence of a clumping factor did not differ significantly between the 2 groups.

4. Discussion

We described the first prospective study regarding BJIs caused by *S. lugdunensis* as a secondary analysis of the VISLISI clinical trial (Argemi et al., 2016). The high rate of osteoarticular infections, particularly total knee arthroplasty infections, was previously reported in 2 retrospective cohorts (Lourtet-Hascoët et al., 2016; Shah et al., 2010) and our data strengthened these observations. Our study did not identify a high proportion of urogenital abnormalities in patient backgrounds as previously reported, but a high incidence of diabetes was identified, indeed it affected 44% of the patients. The role of diabetes in material-free infections was quite obvious as 7 of 12 patients presented with a diabetic foot infection classified according to IDSA guidelines as PEDIS Grade 3; as recommended, patients underwent radical surgical resections of the infected tissues leading to a shorter antibiotic therapy (Lipsky et al., 2012). The role of diabetes, particularly hyperglycemia, has been reported for staphylococci bone infections, and in vitro biofilm production was enhanced for various staphylococci, including *S. lugdunensis* (Frank and Patel, 2007). Regarding PjIs, diabetes frequency was lower and most patients with a total knee arthroplasty infection did not

Table 2
Patients with *S. lugdunensis* osteoarticular and prosthetic joint infections, treatments and outcomes.

	ID ¹	Infection localisation	Postoperative infection (Yes/No)	Delay from surgery to infection (weeks)	Positive/total sample	Surgical treatment	Antibiotics	Duration (weeks)	Outcome	2nd treatment	
Osteoarticular infections (no material)	17	1st MTP ²	N	-	1/1	TMA ³	Fluoroquinolone Clindamycin	1.5	Cured	-	
	36	1st MTP	N	-	1/1	MTP resection arthroplasty	Fluoroquinolone		Failed	TMA	
	43	3 rd MCP ⁴	N	-	2/2	Irrigation debridement	Unknown	-	Cured		
	44	1st MTP	N	-	2/3	TMA	Fluoroquinolone Linezolid	2	Cured		
	45	Sternal	Y	4	1/2	Irrigation debridement	Fluoroquinolone Rifampicin	6			
	47	Sternal	Y	1	1/2	Irrigation debridement	Piperacillin Vancomycin	1	Death (unrelated to the infection)		
	49	3d MTP	N	-	1/1	3d TMA	Clindamycin	2	Cured		
	51	2d foot ITP ⁵	N	-	1/2	Toe amputation	Amox/clav ⁶	1.5	Cured		
	53	2d hand ITP	N	-	1/1	Irrigation debridement	Amox/clav	1.5	Cured		
	54	5th MTP	N	-	1/1	5th TMA	Amox/clav	1.5	Cured		
	55	L5-S1	N	-	2/2	-	Fluoroquinolone Clindamycin	6	Cured		
	Prosthetic and joint infections	65	1st foot ITP	N	-	3/3	Toe amputation	Amox/clav	6	Cured	
		2	Knee	Y	40	3/4	One-stage revision	Fusidic acid Rifampicin	8	Cured	
		13	Knee	N	-	7/7	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	12	Cured	
15		L1-L3	Y	8	5/5	Material removal Irrigation debridement	Fluoroquinolone Clindamycin	6	Cured		
19		L2-S1	Y	3	1/4	Material retention Irrigation debridement	Fluoroquinolone Rifampicin	6	Cured		
23		L3-L4	N	-	2/5	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	6	Cured		
24		1st MTP	Y	4	1/1	Material removal Irrigation debridement	Fluoroquinolone Rifampicin	7	Cured		
25		Knee	N	-	5/5	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	6	Cured		
27		Knee	N	-	5/5	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	12	Cured		
38		Hip	Y	16	2/5	Material retention Irrigation debridement	Fluoroquinolone Rifampicin	8	Cured		
40		Knee	N	-	12/12	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	12	Cured		
50		1st foot ITP	N	-	2/2	Material removal Toe amputation	Fluoroquinolone Clindamycin	6	Cured		
52		1st MTP	Y	1	3/3	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	6	Cured		
59		Knee	Y	2	2/2	Material retention Irrigation debridement	Fluoroquinolone Rifampicin	6	Cured		
61		Knee	N	-	5/5	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	6	Cured		
66		Knee	N	-	4/4	Irrigation debridement	Fluoroquinolone Rifampicin	Sup. ⁷ Therapy	-		
80	Knee	Y	12	4/4	One-stage revision	Fluoroquinolone Rifampicin	8	Cured			

¹ ID = patients identification number from VISUSI clinical trial.

² MTP = metatarsophalangeal.

³ TMA = transmetatarsal amputation.

⁴ MCP = metacarpophalangeal.

⁵ ITP = interphalangeal.

⁶ Amox/clav = amoxicillin associated with clavulanate.

⁷ Sup = suppressive.

Table 3
Reported studies of *Staphylococcus lugdunensis* bone and joint infections.

	Shah et al., 2010	Douiri et al., 2016	Lourtet-Hascot et al., 2016	Seng et al., 2017	Present study
Inclusion duration	1998–2007	2010–2014	2000–2014	2002–2013	2013–2016
Study design	Retrospective	Retrospective	Retrospective	Retrospective	Prospective
n ^a	28	39	28	21	28
Clinical characteristics at admission					
Age, year, mean \pm SD ¹	73.5 (35–88)	63 (47–79)	67.5 (44–75)	64 (35–82)	65 (53–77)
Male	14 (50%)	21 (53.8%)	20 (66.7%)	14 (67%)	12 (42.8%)
Cancer	0	3 (7.7%)	2 (7%)	1 (5%)	5 (17.8%)
Diabetes	3 (11%)	11 (28.2%)	1 (4%)	13 (62%)	13 (46.4%)
Cardiovascular disease	- ¹	6 (15.4%)	4 (14%)	-	-
Chronic steroid therapy	5 (18%)	-	-	-	-
Urogenital abnormality	9 (32%)	-	-	-	-
Infection localisation					
Rachis	0	3 (7.7%)	0	0	4 (14.3%)
Prosthetic knee	25 (89%)	12 (30.8%)	16 (57%)	0	9 (32.1%)
Prosthetic hip	3 (11%)	2 (5.1%)	10 (36%)	0	1 (3.6%)
Diabetic foot	0	6 (15.4%)	0	12 (57%)	7 (25%)
osteomyelitis					
Osteosynthesis	0	6 (15.4%)	0	0	0
Other	0	10 (25.6%)	2 (7%)	9 (43%)	7 (25%)
Antibiotics susceptibility					
Oxacillin susceptible	24 (86%)	39 (100%)	28 (100%)	19 (90.5%)	28 (100%)
Therapy					
Two-stage revision	14 (50%)	0	11 (39.3%)	0	0
Irrigation debridement	10 (35.7%)	14 (35.9%)	11 (39.3%)	4 (19%)	7 (25%)
Medical treatment alone	2 (7.1%)	3 (7.7%)	0	10 (47.6%)	1 (3.6%)
One-stage revision	1 (3.6%)	6 (15.3%)	6 (21.4%)	0	9 (32.1%)
Material removal	1 (3.6%)	9 (23.1%)	0	0	4 (14.3%)
Amputation	0	4 (10.3%)	0	6 (28.6%)	4 (14.3%)
Other	0	3 (7.7%)	0	1 (4.8%)	3 (10.7%)
Prognosis					
Treatment failure	2 to 6 (8–22%) (2 years follow-up)	-	3 (10.7%) (at least 1-year follow-up)	5 (26%) (1-year follow-up)	2 (7.1%) (1-year follow-up)

¹ SD = Standard deviation.

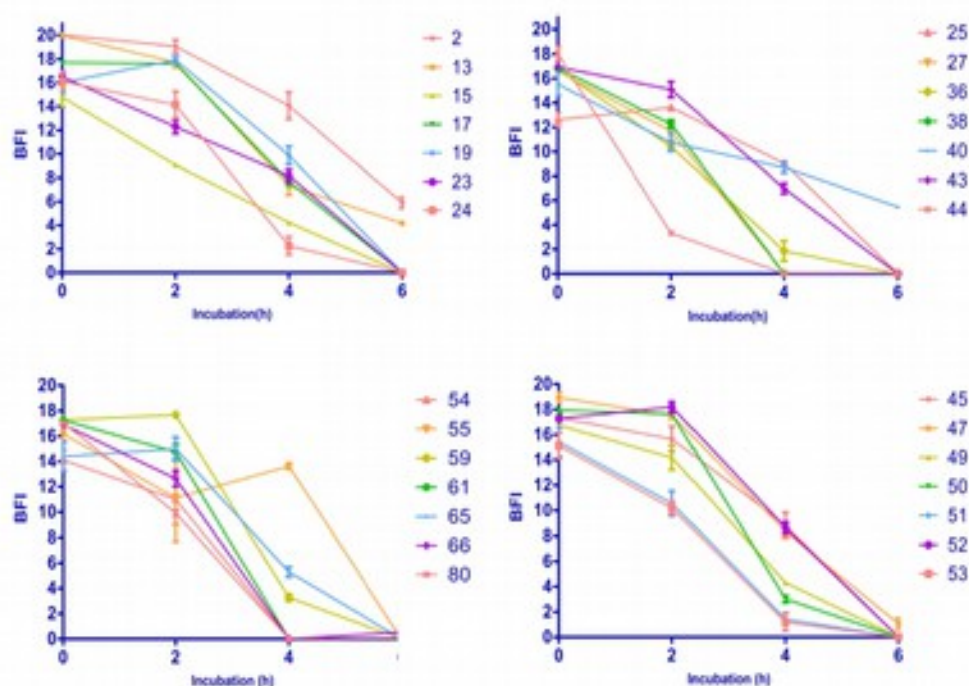


Fig. 1. Biofilm formation by 28 strains of *S. lugdunensis* issued from osteoarticular infection. Biofilm formation kinetics are displayed as BFI (Biofilm index) variations after 2, 4 and 6 hours of incubation time. Standard deviation at each time point are the results of quadruplicates. A high BFI value (>17 BFI) signs a high bead mobility under magnet action that corresponds to the absence of biofilm formation (i.e. control wells), while a low value (<2 BFI) shows a full immobilization of beads due to the sessile cells. Results were displayed at each time point with standard deviation as the results of 4 measurements corresponding to 4 different wells (quadruplicates).

have very early postoperative infections (before 1 month after prosthesis implantation). A 1-stage prosthesis exchange was performed in most patients, as recommended by French guidelines, but a staged exchange is most often used in the USA, a procedure that was favored in previously reported cohorts (Lourtet-Hascoët et al., 2016; Osmon et al., 2012; Shah et al., 2010). Nevertheless, here, we report a 100% cure rate in the 7 patients concerned; 1 patient was excluded because prosthesis retention and suppressive therapy were decided because of medical contraindications for prosthesis revision. Regarding medical therapy, most patients had a prolonged treatment with fluoroquinolone plus rifampicin for approximately 6 weeks. The use of rifampicin is supported by growing *in vitro* evidence showing its ability to accumulate in bone and prevent biofilm formation (Tasse et al., 2016). Although there is no definitive evidence, similar to comparative clinical trials, several studies have emphasized the safety of this procedure for a total knee or hip replacement to favor single-stage revision (Jenny et al., 2013, 2014; Zahar et al., 2016). It provides a direct functional benefit for patients and French guidelines favor this strategy (Haute Autorité de Santé, 2014); our data also support it.

Regarding biofilm production, we observed that all strains tested were fast biofilm producers because biofilm production was detectable 4 h after incubation, and magnetic beads were fully immobilized within 6 h for 89.3% of the strains. These data confirmed that *S. lugdunensis* is a biofilm-producing species, but we showed that this phenotype was not marginal (Frank and Patel, 2007; Frank et al., 2007). It could also explain why this species has been described lately in a wide range of prosthetic joint and bone infections in which biofilm production plays a crucial role (Argemi et al., 2016; Douiri et al., 2016; Lourtet-Hascoët et al., 2016). These results also directly impact PJI management, because biofilm is produced within hours after bacterial growth initiation and it justifies the immediate use of antibiotics during a 1-stage prosthesis exchange that comprises the mechanical debridement of infected tissues. Waiting for more than 6 h may be too late to perform bacterial eradication with antibiotics because the biofilm-embedded bacteria display a dramatic increase in minimum inhibitory concentrations (Frank et al., 2007; Jacqueline and Caillon, 2014; Macià et al., 2014). In our assay, 3 strains produced biofilm slower than others and they did not fully immobilize the magnetic beads. Two of those strains were SCVs. The role of SCVs in PJIs and osteoarticular infections in general has been reviewed extensively, and these metabolic staphylococci variants that usually display an increased biofilm production capacity may not be related to its rapidity (Mirani et al., 2015; Proctor et al., 2014; Singh et al., 2009).

We did not find any immune defects in patients regarding white cell counts and complement and gammaglobulin levels. Nevertheless, we observed, in this cohort, a high cancer frequency (affecting 17.9% of all patients) and the role of diabetes also seemed crucial. Therefore, we considered the population to be immunocompromised, and if *S. lugdunensis* has several virulence properties, it also probably constituted an opportunistic pathogen in a frail population.

Regarding other types of *S. lugdunensis* infections, large retrospective studies have described this pathogen in skin and soft tissue infections, although results are also sometimes difficult to interpret because of numerous biases and the absence of criteria to determine the significance of *S. lugdunensis* in clinical samples. Nevertheless, it appears that abscess formation is particularly frequent, and some authors described necrotizing infections that clearly distinguish *S. lugdunensis* from other CNS. Endocarditis and bacteremia are the second most frequently described clinical manifestations of this pathogen. Endocarditis occurred in 25%–50% of bacteremia cases, surgery was required in 40%–69% of cases with a mortality rate of up to 39%. These results also need careful interpretation because they are from retrospective reports with possible selective reporting. Nevertheless, *S. lugdunensis* seemed to behave as a particularly virulent staphylococci closer to *S. aureus* than other CNS.

This prospective cohort study also has several limitations. First, it could not give a definitive answer regarding the surgical management

of PJIs and comparative clinical trials are needed. Second, biofilm production was evaluated here *in vitro* but *in vivo* studies are necessary for antibiotic susceptibility testing under such conditions.

5. Conclusion

This study confirmed that *S. lugdunensis* samples and infections should be managed similarly to *S. aureus* ones. IDSA guidelines for the management of vertebral osteomyelitis in adults recommend that clinicians should consider this pathogen as a virulent pathogen, as they do for *S. aureus*, and not perform an image-guided aspiration biopsy in case of positive blood cultures.

Conflict of interests

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Funding

VISLISI clinical trial was funded by a grant from the Collège des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales and by public funding from EA7290 Virulence Bactérienne Précoce, Faculté de Médecine, Strasbourg and supported by the University Hospital of Strasbourg.

Acknowledgments

We thank all the patients who participated in the study as well as doctors and nurses from Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. We gratefully thank BioFilm Control for providing all necessary materials to perform the biofilm experiments. The authors would like to thank Enago (www.enago.com) for the English language review, Nicolas Lefebvre and Cécile Ronde-Oustau for their precious help during manuscript revision.

References

- Argemi X, Prévoist G, Riegel P, Keller D, Meyer N, Baldeyrou M, et al. VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from staphylococcus lugdunensis. *Clin Microbiol Infect* 2016;23:334.e1–8.
- Argemi X, Riegel P, Lavigne T, Lefebvre N, Grandpré N, Hansmann Y, et al. Implementation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol* 2015;53(7):2030–6.
- Babu E, Oropello J. *Staphylococcus lugdunensis*: the coagulase-negative staphylococcus you don't want to ignore. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9(10):901–7.
- Bieber L, Kahlmeter G. *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(4):385–8.
- Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* 2007; 68(3):605–12.
- Di Domenico EG, Toma I, Provot C, Ascenzi F, Sperduti I, et al. Development of an *in vitro* assay, based on the BioFilm Ring test®, for rapid profiling of biofilm-growing bacteria. *Front Microbiol* 2016;7. [Internet, cited 2017 Feb 8]. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01429/abstract>.
- Douiri N, Lefebvre N, Riegel P, Baldeyrou M, Prévoist G, Argemi X. *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(8):747–8.
- Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(9):563–75.
- Frank KL, Patel R. Poly-N-Acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun* 2007;75(10):4728–42.
- Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(3):888–95.
- Haute Autorité de Santé. Prothèse de hanche ou de genou: diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation [Internet]. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1228574/fr/prothese-de-hanche-ou-de-genou-diagnostic-et-prise-en-charge-de-l-infection-dans-le-mois-suivant-implantation, 2014.
- Heilbronner S, Holden MTG, van Tonder A, Geoghegan JA, Foster TJ, Parkhill J, et al. Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of

- putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence. *FEMS Microbiol Lett* 2011;322(1):60–7.
- Ho P-L, Leung SM-H, Chow K-H, Tse CW-S, Cheng VC-C, Tse H, et al. Carriage niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;81(2):141–4.
- Hussain M, Steinbacher T, Peters G, Heilmann C, Becker K. The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtlL and its role in biofilm formation and internalization. *Int J Med Microbiol* 2015;305(1):129–39.
- Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(Suppl. 1):i37–40.
- Jenny J-Y, Barbe B, Gaudias J, Boeri C, Argenson J-N. High infection control rate and function after routine one-stage exchange for chronically infected TKA. *Clin Orthop* 2013;471(1):238–43.
- Jenny J-Y, Lengert R, Diesinger Y, Gaudias J, Boeri C, Kempf J-F. Routine one-stage exchange for chronic infection after total hip replacement. *Int Orthop* 2014;38(12):2477–81.
- Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78(3):510–43.
- Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 2012;54(12):e132–73.
- Lourdet-Hascoët J, Bicart-See A, Félicé MP, Giordano G, Bonnet E. *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Infect Dis* 2016;51:56–61.
- Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(10):981–90.
- Mirani ZA, Aziz M, Khan SI. Small colony variants have a major role in stability and persistence of *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Antibiot (Tokyo)* 2015;68(2):98–105.
- Mitchell J. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology* 2004;150(11):3831–41.
- Nilsson M, Bjerketorp J, Wiebenjö A, Ljungh A, Frykberg L, Guss B, A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2004;234(1):155–61.
- Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Jaulhae B, Prévost G, Bernardi T, et al. The Biofilm Ring test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *J Clin Microbiol* 2016;54(3):657–61.
- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2012;cis803.
- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Executive summary: diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56(1):1–10.
- Paulsson M, Petersson A-C, Ljungh AAsa. Serum and tissue protein binding and cell surface properties of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Med Microbiol* 1993;38(2):96–102.
- Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small colony variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4. [Internet, cited 2017 Feb 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112797/>.
- Seng P, Traore M, Lagier J-C, Lavigne J-P, Sotto A, Drancourt M, et al. *Staphylococcus lugdunensis*: an underreported pathogen in osteomyelitis. *J Foot Ankle Surg* 2017;56(2):412–3.
- Shah NB, Osmon DR, Fadel H, Patel R, Kohner PC, Steckelberg JM, et al. Laboratory and clinical characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* prosthetic joint infections. *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1600–3.
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 8):1067–73.
- Tasse J, Croisier D, Badel-Berchoux S, Chavanet P, Bernardi T, Provot C, et al. Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®. *Pathog Dis* 2016;74(6). ffw057.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The European Committee on antimicrobial susceptibility testing recommendations [Internet]. Available from: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_0_2014.pdf, 2014.
- van der Mee-Marquet N, Achard A, Mereghetti L, Danton A, Minier M, Quentin R. *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1404–9.
- Zahar A, Kendoff DO, Klatté TD, Gehrke TA. Can good infection control be obtained in one-stage exchange of the infected TKA to a rotating hinge design? 10-year results. *Clin Orthop* 2016;474(1):81–7.
- Zapotoczna M, Heilbronner S, Speziale P, Foster TJ. Iron-regulated surface determinant (Isd) proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Bacteriol* 2012;194(23):6453–67.

Chapitre 8

Bibliographie

- Abbanat, D., Shang, W., Amsler, K., Santoro, C., Baum, E., Crespo-Carbone, S., & Lynch, A. S. (2014). Evaluation of the *in vitro* activities of ceftobiprole and comparators in staphylococcal colony or microtitre plate biofilm assays. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.013>
- Alkawash, M. A., Soothill, J. S., & Schiller, N. L. (2006). Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 114(2), 131–138. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_356.x
- Ammons, M. C. B. (2010). Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 5(1), 10–17.
- Anderson, G. G., Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A., & O’Toole, G. A. (2008). *In vitro* analysis of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, 76(4), 1423–1433. <https://doi.org/10.1128/IAI.01373-07>
- Antibiotiques. (2014, December 3). Retrieved August 2, 2017, from <http://www.vaincrelamuco.org/face-la-mucoviscidose/les-soins/traitements-et-hygiene/antibiotiques>
- Banin, E., Brady, K. M., & Greenberg, E. P. (2006). Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2064–2069. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2064-2069.2006>
- Bassinat, L. (2003). Stratégie de l’antibiothérapie au cours de l’infection chronique par *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 20(2-C2), 118–128. <https://doi.org/RMR-04-2003-20-2-C2-0761-8425-101019-ART15>
- Bellis, G., Dehillotte, C., & Lemonnier, L. (2016). *Registre français de la mucoviscidose*. Paris: Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d’études démographiques (Ined).
- Bertrand, X., Slekovec, C., Cholley, P., & Talon, D. (2011). Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2011(435), 35–40.
- Bigger, J. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*, 244(6320), 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Biofilms: The Hypertextbook. (2011, April). Retrieved December 15, 2016, from <http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v004/r003Test/index.html>
- Bjarnsholt, T., & Givskov, M. (2008). Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: worth the effort? *Current Infectious Disease Reports*, 10(1), 22–28.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Fiandaca, M. J., Pedersen, J., Hansen, C. R., Andersen, C. B., ... Høiby, N. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonology*, 44(6), 547–558. <https://doi.org/10.1002/ppul.21011>
- Boucher, R. C. (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal*, 23(1), 146–158. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00057003>

- Bricha, S., Ounine, K., Oulkheir, S., Haloui, N., & Attarassi, B. (2009). Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Tunisienne d'Infectiologie-Oct*, 2, 7–14.
- Burns, J. L., & Rolain, J.-M. (2014). Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? *Journal of Cystic Fibrosis*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.09.004>
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 493–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
- Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B., & Vahaboglu, H. (2016). Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine*, 4(17). <https://doi.org/10.21037/atm.2016.09.14>
- Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E. A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S. J., ... García-Contreras, R. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 3(7), 575–598. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.575>
- Cattoir, V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*, 52(10), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.09.001>
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771–1776.
- Cézard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 165–186.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., & Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 605–612. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.010>
- Cheng, K., Smyth, R. L., Govan, J. R., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., ... Hart, C. A. (1996). Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet (London, England)*, 348(9028), 639–642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)05169-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)05169-0)
- Cheng, S. H., Fang, S. L., Zabner, J., Marshall, J., Piraino, S., Schiavi, S. C., ... Smith, A. E. (1995). Functional activation of the cystic fibrosis trafficking mutant delta F508-CFTR by overexpression. *The American Journal of Physiology*, 268(4 Pt 1), L615-624.
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P. Ø., Wang, H., & Høiby, N. (2015). Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 85, 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.017>
- Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 75. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00075>
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86–95.

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Curcio, D. (2014). Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: are you ready for the challenge? *Current Clinical Pharmacology*, 9(1), 27–38.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., & O’Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1027–1036.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Davies, D. G., & Geesey, G. G. (1995). Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 860–867.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5361), 295–298.
- Diggle, S. P., Stacey, R. E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P., & Winzer, K. (2006). The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 8(6), 1095–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.001001.x>
- Diot, P., Vecellio-None, L., Varaigne, F., Marchand, S., & Lemarié, E. (2003). Place de la rhdNase dans la mucoviscidose. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 20(2-C2), 171–175. <https://doi.org/RMR-04-2003-20-2-C2-0761-8425-101019-ART22>
- Döring, G., Conway, S. P., Heijerman, H. G., Hodson, M. E., Høiby, N., Smyth, A., & Touw, D. J. (2000). Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *The European Respiratory Journal*, 16(4), 749–767.
- Dray, X., Hubert, D., Munck, A., Moreau, J., & Marteau, P. (2005). Digestive complications in adults with cystic fibrosis. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, 29(12), 1279–1285.
- Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- Eckhart, L., Fischer, H., Barken, K. B., Tolker-Nielsen, T., & Tschachler, E. (2007). DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *The British Journal of Dermatology*, 156(6), 1342–1345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07886.x>
- Edmonds, J. M., Collett, P. J., Valdes, E. R., Skowronski, E. W., Pellar, G. J., & Emanuel, P. A. (2009). Surface sampling of spores in dry-deposition aerosols. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 39–44. <https://doi.org/10.1128/AEM.01563-08>

- Ehrhardt, C., Collnot, E.-M., Baldes, C., Becker, U., Laue, M., Kim, K.-J., & Lehr, C.-M. (2006). Towards an *in vitro* model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o^c. *Cell and Tissue Research*, 323(3), 405–415. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0062-7>
- Elliott, D., Burns, J. L., & Hoffman, L. R. (2010). Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 3024–3026. <https://doi.org/10.1128/AAC.00102-10>
- Farber, S. (1943). Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. *New England Journal of Medicine*, 229(18), 682–687. <https://doi.org/10.1056/NEJM194310282291804>
- Farrell, P. M., White, T. B., Ren, C. L., Hempstead, S. E., Accurso, F., Derichs, N., ... Sosnay, P. R. (2017). Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. *The Journal of Pediatrics*, 181S, S4–S15.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.09.064>
- Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences*, 19(1), 77–83.
- Francolini, I., & Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 227–238. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x>
- Freeman, L. (1916). Chronic genral infection with the *Bacillus pyocyaneus*. *Annals of Surgery*, 64(2), 195–202.
- Galloway, D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Molecular Microbiology*, 5(10), 2315–2321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02076.x>
- Garrett, E. S., Perlegas, D., & Wozniak, D. J. (1999). Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7401–7404.
- Gessard, C. (1984). On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925). *Reviews of Infectious Diseases*, 6 Suppl 3, S775-776.
- Girodon-Boulandet, E., & Costa, C. (2005). Génétique de la mucoviscidose. *Médecine Thérapeutique/Pédiatrie*, 8(3), 126–134.
- Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. W. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 279–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x>
- Grand, I., Bellon-Fontaine, M.-N., Herry, J.-M., Hilaire, D., Moriconi, F.-X., & Naïtali, M. (2011). Possible overestimation of surface disinfection efficiency by assessment methods based on liquid sampling procedures as demonstrated by *in situ* quantification of spore viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6208–6214. <https://doi.org/10.1128/AEM.00649-11>
- Grishin, A. V., Krivozubov, M. S., Karyagina, A. S., & Gintsburg, A. L. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. *Acta Naturae*, 7(2), 29–41.

- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., ... Grant, G. D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
- Haq, I. J., Gray, M. A., Garnett, J. P., Ward, C., & Brodlie, M. (2016). Airway surface liquid homeostasis in cystic fibrosis: pathophysiology and therapeutic targets. *Thorax*, 71(3), 284–287. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207588>
- Harms, A., Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6318). <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>
- Harness-Brumley, C. L., Elliott, A. C., Rosenbluth, D. B., Raghavan, D., & Jain, R. (2014). Gender differences in outcomes of patients with cystic fibrosis. *Journal of Women's Health (2002)*, 23(12), 1012–1020. <https://doi.org/10.1089/jwh.2014.4985>
- Harrison, J. J., Stremick, C. A., Turner, R. J., Allan, N. D., Olson, M. E., & Ceri, H. (2010). Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature Protocols*, 5(7), 1236–1254. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.71>
- Haute Autorité de Santé. (2009). *Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : état des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement* (Etat des lieux en santé publique). Retrieved from http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-04/rapport_depistage_neonatal_systematique_de_la_mucoviscidose_en_france.pdf
- Haute Autorité de Santé. (2010). *Mucoviscidose : Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare* (Liste des actes et prestations Affection de longue durée).
- Haute Autorité de Santé. (2015). *Place de la stratégie couplant les dosages de la TIR et de la PAP dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France* (Evaluation en santé publique). Retrieved from http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2015-06/place_de_la_strategie_couplant_les_dosages_de_la_tir_et_de_la_pap_dans_le_depistage_systematique_de_la_mucoviscidose_en_france.pdf
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., & Parsek, M. R. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5395–5401. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001>
- Hentzer, Morten, & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1300–1307. <https://doi.org/10.1172/JCI20074>
- Histoire: de fibrose kystique du pancréas à mucoviscidose. (2010, September 26). Retrieved April 3, 2017, from <http://www.mucoviscidose-cftr.com/2010/09/26/histoire-de-fibrose-kystique-du-pancreas-a-mucoviscidose/>
- Hoffman, L. R. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436, 1171–1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>
- Hoffmann, N., Lee, B., Hentzer, M., Rasmussen, T. B., Song, Z., Johansen, H. K., ... Høiby, N. (2007). Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the

- sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr(-/-) mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3677–3687. <https://doi.org/10.1128/AAC.01011-06>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., ... Zimmerli, W. (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 Suppl 1, S1-25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
- Hubert, D. (2005). Mucoviscidose. *EMC - Medecine*, 1(2), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.emcmed.2004.09.004>
- Hubert, D. (2009). Mucoviscidose de l'adulte: particularités de l'antibiothérapie et de la prophylaxie anti-infectieuse. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 26(4), 461–462.
- Institut de veille sanitaire. (2016). *Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. Réseau REA-Raisin, France – Résultats 2014*. (p. 48 p).
- Jackson, K. D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2004). Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4466–4475. <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4466-4475.2004>
- Jehl, F., Chomar, M., Tankovic, J., Gérard, A., Schrenzel, J., Gutmann, L., & Stahl, J.-P. (2012). *De l'antibiogramme à la prescription* (3ème édition). Marcy-l'Étoile, France: BioMérieux.
- Jehl, F., & Twizeyimana, E. (2015). Sensibilité des bactéries aux antibiotiques: les CMI sont complémentaires de l'antibiogramme. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2015(476), 47–61. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(15\)30292-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(15)30292-6)
- Jensen, P. Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T., & Moser, C. (2010). The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 292–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00706.x>
- Jolyguillou, M. (2006). Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation*, 15(3), 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.02.003>
- Josenshans, C., & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>
- Jyot, J., Sonawane, A., Wu, W., & Ramphal, R. (2007). Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Molecular Microbiology*, 63(4), 1026–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05573.x>
- Kaplan, J. B., Izano, E. A., Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L., ... Horswill, A. R. (2012). Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 3(4), e00198-12-e00198-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00198-12>

- Kaplan, Jeffrey B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *The International Journal of Artificial Organs*, 34(9), 737–751. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000027>
- Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., ... Tsui, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1073–1080.
- Kessler, W. R., & Andersen, D. H. (1951). Heat prostration in fibrocystic disease of the pancreas and other conditions. *Pediatrics*, 8(5), 648–656.
- Khalifa, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V., & Khedher, M. (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique*, 69(4), 393–403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>
- King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5), 261–312. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>
- Klayman, B. J., Klapper, I., Stewart, P. S., & Camper, A. K. (2008). Measurements of accumulation and displacement at the single cell cluster level in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2344–2354. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01660.x>
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A., & Collins, J. J. (2010). Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell*, 37(3), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>
- Kreft, J.-U. (2004). Biofilms promote altruism. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 8), 2751–2760. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26829-0>
- Langan, K. M., Kotsimbos, T., & Peleg, A. Y. (2015). Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(6), 547–556. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000217>
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., & Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 173(20), 6558–6567.
- Lebeaux, D., & Ghigo, J.-M. (2012). Infections associées aux biofilms - Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *médecine/sciences*, 28(8–9), 727–739. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015>
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(1), 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>

- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Lutz, L., Pereira, D. C., Paiva, R. M., Zavascki, A. P., & Barth, A. L. (2012). Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients in biofilm. *BMC Microbiology*, 12, 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-196>
- Macià, M. D., Rojo-Molinero, E., & Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
- Maladie génétique rare. (2014, November 26). Retrieved February 20, 2017, from <http://www.vaincrelamuco.org/face-la-mucoviscidose/maladie-genetique-rare>
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(1), 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- Mérens, A., Delacour, H., Plésiat, P., Cavallo, J.-D., & Jeannot, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2011(435), 49–62. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71102-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71102-9)
- Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O’Grady, N. P., ... Warren, D. K. (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(1), 1–45. <https://doi.org/10.1086/599376>
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O’Toole, G. A. (2011). Growing and analyzing static biofilms. In R. Coico, T. Kowalik, J. Quarles, B. Stevenson, & R. Taylor (Eds.), *Current Protocols in Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1002/9780471729259.mc01b01s22>
- Moreau-Marquis, S., Bomberger, J. M., Anderson, G. G., Swiatecka-Urban, A., Ye, S., O’Toole, G. A., & Stanton, B. A. (2008). The F508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(1), L25–L37. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00391.2007>
- Moreau-Marquis, Sophie, Redelman, C. V., Stanton, B. A., & Anderson, G. G. (2010). Co-culture models of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on live human airway cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (44). <https://doi.org/10.3791/2186>
- Moskowitz, S. M., Foster, J. M., Emerson, J., & Burns, J. L. (2004). Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 1915–1922. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1915-1922.2004>

- Müller, P., Guggenheim, B., Attin, T., Marlinghaus, E., & Schmidlin, P. R. (2011). Potential of shock waves to remove calculus and biofilm. *Clinical Oral Investigations*, 15(6), 959–965. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0462-2>
- Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M., & Menon, V. (2014). Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 3(1), 32.
- O’Grady, N. P., Alexander, M., Burns, L. A., Dellinger, E. P., Garland, J., Heard, S. O., ... Saint, S. (2011). Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *American Journal of Infection Control*, 39(4 Suppl 1), S1-34. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.01.003>
- Okshevsky, M., & Meyer, R. L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 341–352. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.841639>
- O’Shea, D., & O’Connell, J. (2014). Cystic fibrosis related diabetes. *Current Diabetes Reports*, 14(8), 511. <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0511-3>
- Osterman, I. A., Dikhtyar, Y. Y., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A., & Sergiev, P. V. (2015). Regulation of flagellar gene expression in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 80(11), 1447–1456. <https://doi.org/10.1134/S000629791511005X>
- O’Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295–304.
- O’Toole, George A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47). <https://doi.org/10.3791/2437>
- Palleroni, N. J. (2010). The *Pseudomonas* Story. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1377–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>
- Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K., & Tolker-Nielsen, T. (2008). Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Molecular Microbiology*, 68(1), 223–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x>
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Parsek, M. R., & Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57, 677–701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>
- Puchelle, E. (2002). Early bronchial inflammation in cystic fibrosis. *Journal De La Societe De Biologie*, 196(1), 29–35.
- Quentin-Noury, C. (2016). Automatisation de l’antibiogramme au laboratoire de bactériologie. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2016(482), 49–59. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(16\)30172-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(16)30172-1)

- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 28(21), 1701–1712. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9156-x>
- Reychler, G., Simon, A., & Lebecque, P. (2006). Mucoviscidose : le kinésithérapeute face au risque infectieux, 23(6), 599–606. <https://doi.org/RMR-12-2006-23-6-0761-8425-101019-20064146>
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., ... Chou, J. L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1066–1073.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., & Foglino, M. (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in Microbiology*, 8(11), 498–504.
- Rodríguez-Rojas, A., Oliver, A., & Blázquez, J. (2012). Intrinsic and environmental mutagenesis drive diversification and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(1), 121–127. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir690>
- Ruer, S., Stender, S., Filloux, A., & Bentzmann, S. (2007). Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa* : functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3547–3555. <https://doi.org/10.1128/JB.00093-07>
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2000). The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection*, 2(14), 1721–1731. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01327-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01327-7)
- Saiman, L., Marshall, B. C., Mayer-Hamblett, N., Burns, J. L., Quittner, A. L., Cibene, D. A., ... Campbell, P. W. (2003). Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa* : a randomized controlled trial. *JAMA*, 290(13), 1749–1756. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1749>
- Saint-Criq, V., & Harvey, B. J. (2014). Estrogen and the cystic fibrosis gender gap. *Steroids*, 81, 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.11.023>
- Sardet, A. (2003). Infections à *Staphylococcus aureus* : quand et comment traiter ? *Revue Des Maladies Respiratoires*, 20(2-C2), 100–104. <https://doi.org/RMR-04-2003-20-2-C2-0761-8425-101019-ART12>
- Schooling, S. R., & Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol*, 188(16), 5945–5957. <https://doi.org/10.1128/JB.00257-06>
- Sermet-Gaudelus, I., Couderc, L., Vrielynck, S., Brouard, J., Weiss, L., Wizla, N., ... others. (2014). Recommandations nationales pour la prise en charge du nourrisson dépisté atteint de mucoviscidose. Consensus de la federation des centres de ressources et de competences de la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 21(6), 654–662.
- Sermet-Gaudelus, Isabelle, Lenoir, G., Berche, P., Ricour, C., Lacaille, F., Bonnefont, J.-P., ... Edelman, A. (2002). Mucoviscidose : physiopathologie, génétique, aspects cliniques et thérapeutiques. *Pédiatrie - Maladies Infectieuses*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S024605130200072x>

- Sermet-Gaudelus, Isabelle, Renouil, M., Fajac, A., Bidou, L., Parbaille, B., Pierrot, S., ... Edelman, A. (2007). *In vitro* prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis : a pilot study. *BMC Medicine*, 5, 5. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-5-5>
- Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm : potential therapeutic targets. *Biologicals*, 42(1), 1–7.
- Sierra, J. M., Fusté, E., Rabanal, F., Vinuesa, T., & Viñas, M. (2017). An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opinion on Biological Therapy*. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>
- Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., & Romanova, Y. M. (2010). Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Microbiology*, 79(4), 413–423. <https://doi.org/10.1134/S0026261710040016>
- Smith, A. L., Ramsey, B. W., Hedges, D. L., Hack, B., Williams-Warren, J., Weber, A., ... Redding, G. J. (1989). Safety of aerosol tobramycin administration for 3 months to patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 7(4), 265–271.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>
- Sousa, A. M., & Pereira, M. O. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs—A review. *Pathogens*, 3(3), 680–703.
- Southey-Pillig, C. J., Davies, D. G., & Sauer, K. (2005). Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 8114–8126. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8114-8126.2005>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 115(8), 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K., Martin, W. E., Hankin, J. A., Murphy, R. C., ... Vasil, M. L. (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Molecular Microbiology*, 46(3), 661–676. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03194.x>
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>

- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., ... Jaeger, K.-E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 5), 1313–1323. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27701-0>
- Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa* : Identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6911–6916. <https://doi.org/10.1073/pnas.111551898>
- Vantuyghem, M. C., Moussaïd-Guennoun, R., Perimenis, P., Marcelli-Tourvieille, S., Perez, T., & Wallaert, B. (2005). Cystic fibrosis diabetes in adult. *Annales D'endocrinologie*, 66(4), 347–354.
- Vasseur, P., Soscia, C., Voulhoux, R., & Filloux, A. (2007). PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie*, 89(8), 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.002>
- Veesenmeyer, J. L., Hauser, A. R., Lisboa, T., & Rello, J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy : evolving translational strategies. *Critical Care Medicine*, 37(5), 1777–1786. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819ff137>
- Villate-Beitia, I., Zarate, J., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2017). Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1298122>
- Villavicencio, R. T. (1998). The history of blue pus. *Journal of the American College of Surgeons*, 187(2), 212–216.
- Wagner, T., Soong, G., Sokol, S., Saiman, L., & Prince, A. (2005). Effects of azithromycin on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *CHEST Journal*, 128(2), 912–919.
- Watkins, J., Francis, J., & Kuzemko, J. A. (1988). Does monotherapy of pulmonary infections in cystic fibrosis lead to early development of resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*? *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 143, 81–85.
- Welsh, M. J. (1999). Gene transfer for cystic fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(9), 1165–1166.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5559), 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., & Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860–864. <https://doi.org/10.1038/35101627>
- Wolfgang, M. C., Jyot, J., Goodman, A. L., Ramphal, R., & Lory, S. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6664–6668. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307553101>

- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., ... Döring, G. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(3), 317–325. <https://doi.org/10.1172/JCI13870>
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J. O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., & Parsek, M. R. (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7907–7912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1231792100>
- Yau, Y. C. W., Ratjen, F., Tullis, E., Wilcox, P., Freitag, A., Chilvers, M., ... Waters, V. (2015). Randomized controlled trial of biofilm antimicrobial susceptibility testing in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 14(2), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.09.013>
- Zhang, L., & Mah, T.-F. (2008). Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4447–4452. <https://doi.org/10.1128/JB.01655-07>
- Zimmerli, W., & Moser, C. (2012). Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 158–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00938.x>

Chapitre 9

Annexes

MILIEUX & RÉACTIFS

Géloses nutritives

Géloses Drigalski : réf 43341, bioMérieux SA, France

Géloses Columbia avec Sang de Mouton Plus : réf PB5039A, Oxoid SA (Thermo Scientific), France

Géloses Mueller-Hinton : réf 63824, Biorad SA, France

Préparation de géloses BHI à partir de :

Bouillon Infusion Cœur Cervele ISO 6888-1 : cat n° 1331-00, Conda SA, Espagne

Agar Bactériologique : cat n° 1800-00, Conda SA, Espagne

Le milieu est reconstitué par mélange du bouillon BHI (37 g/L) et de l'agar (15 g/L). Après autoclavage, il est coulé en boîtes de Pétri standards (90 mm de diamètre). Une fois solidifiées, les géloses sont conservées à +4°C.

Milieus de culture microbiologiques

Bouillon Infusion Cœur Cervele ISO 6888-1 : 37 g/L - cat n° 1331-00, Conda SA, Espagne

Mueller-Hinton : 23 g/L - réf 70192, Sigma Aldrich, France

Solutions

Préparation de tampon phosphate salin 1X à partir de :

PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X : cat n° 0016232301BS, Biosolve Chimie SARL, France

Préparation de tampon phosphate salin 0,1M (pH 6) et 0,01M (pH 7,2) à partir de :

Dihydrogénophosphate de Sodium (monosodique dihydraté) NaH_2PO_4 , H_2O

$M = 137,99 \text{ g/mol}$

Préparation d'acide acétique 30% à partir de :

$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$

$M = 60,05 \text{ g/mol}$

Préparation de chlorure de sodium 0,15M à partir de :

NaCl

$M = 58,44 \text{ g/mol}$

Culture cellulaire

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - 1640 : w/L-Glutamine, w/2.0 g/L NaHCO₃ - cat n° P04-16500, Pan Biotech GmbH, Allemagne

Sérum de Veau Fœtal : origine Amérique du sud - cat n° 3302-P102202, Pan Biotech GmbH, Allemagne

Pénicilline (10 000 U/mL)/Streptomycine (10 mg/mL) : cat n° P06-07100, Pan Biotech GmbH, Allemagne

Glutamine stable (200 mM) : L-alanyl-L-glutamine - cat n° P04-82100, Pan Biotech GmbH, Allemagne

Trypsine - EDTA : 0,25% Trypsine 2,21 mM EDTA, 1X [-] sodium bicarbonate - réf 25-053-Cl, Mediatech Inc., Corning, USA

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) : w/calcium, w/magnésium, w/bicarbonate de soude, w/o rouge de phénol - cat n° L0612-500, Dutscher SAS, France

Tampon Hepes 1M : cat n° L0180-100, Dutscher SAS, France

Pack BIOFILM (BioFilm Control SAS, France)

Toner 04 : lot 141104

Toner 06 : lots 120821 et 131202

Huile de contraste : lot 140604

Réactifs

Cristal Violet : réf SS-041C-EU, ELITech Group Inc., USA

Désoxyribonucléase I (DNase I) : réf D4263-1VL, Sigma Aldrich, France

Calcofluor White : réf 18909-100ML-F, Sigma Aldrich, France

Bandelettes à gradient de concentration

Amikacine 0,016 - 256 µg/mL : réf 412219, bioMérieux SA, France

Céfépime 0,016 - 256 µg/mL : réf 412273, bioMérieux SA, France

Ceftazidime 0,016 - 256 mg/L : réf 92138, Liofilchem s.r.l, Italie

Ciprofloxacine 0,002 - 32 mg/L : réf 92045, Liofilchem s.r.l, Italie

Imipénème 0,002 - 32 µg/mL : réf 412374, bioMérieux SA, France

Méropénème 0,002 - 32 mg/L : réf 92084, Liofilchem s.r.l, Italie

Ticarilline/Acide Clavulanique 0,016 - 256 µg/mL : réf 412473, bioMérieux SA, France

Tobramycine 0,064 - 1024 mg/L : réf 921200, Liofilchem s.r.l, Italie

JORGE CHAM © 2009



WWW.PHDCOMICS.COM

THE ORIGIN OF THE THESES

Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa* : place de l'Antibiofilmogramme®

Résumé

Les patients mucoviscidosiques sont prédisposés à une colonisation chronique de l'arbre bronchique par *P. aeruginosa*. Ce pathogène opportuniste se caractérise par sa capacité à adhérer à une surface et à y former un biofilm protecteur, hautement tolérant aux agents antimicrobiens. En routine, les antibiogrammes sont effectués sur des cultures bactériennes planctoniques. L'efficacité des antibiothérapies ainsi sélectionnées est donc peu probante pour l'éradication des biofilms bactériens. La réalisation d'Antibiofilmogrammes® sur des isolats cliniques mucoviscidosiques (nouvel outil évaluant la sensibilité des bactéries sessiles aux antibiotiques) a permis de mettre en évidence des phénomènes d'inhibition et d'induction de la formation du biofilm. Plus précisément, les aminosides sont capables de retarder l'adhérence bactérienne. À l'inverse, la famille des β -lactamines présente la capacité de stimuler l'adhésion précoce des micro-organismes. Ces différents effets de l'antibiothérapie générale sur le comportement microbien se vérifient par l'intermédiaire de techniques conventionnelles *in vitro* (Cristal Violet, traitement enzymatique à la DNase I) et cellulaires (modèle de co-culture statique cellules eucaryotes/bactéries). La pertinence clinique de l'Antibiofilmogramme® se confirme donc par sa capacité à détecter l'initiation précoce de l'adhésion bactérienne, à sélectionner les molécules l'inhibant et à écarter celles pouvant l'induire. Associée aux antibiogrammes traditionnels, son application peut permettre d'affiner les stratégies thérapeutiques pour le traitement des infections pulmonaires chroniques développées au cours de la mucoviscidose.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, mucoviscidose, biofilms, Biofilm Ring Test®, Antibiofilmogramme®, Cristal Violet, co-culture cellulaire, DNase I

Abstract

Cystic fibrosis (CF) patients are predisposed to chronic colonisation of the upper airways by *P. aeruginosa*. This opportunist pathogen is characterized by its ability to adhere to a surface and to form a protective biofilm, which is highly tolerant to antimicrobials. In routine, antibiograms are realised on planktonic bacterial cultures. The efficacy of the corresponding antibiotherapies appears low for the eradication of bacterial biofilms. The realisation of Antibiofilmograms® on CF clinical isolates (a new tool investigating the susceptibility of sessile bacteria to antibiotics) highlighted phenomena of biofilm formation inhibition and induction. More precisely, aminoglycosides are able to delay the bacterial adherence. Conversely, the β -lactam family shows the ability to stimulate the early adhesion of microorganisms. These different effects of antimicrobials on the bacterial behaviour are confirmed with more conventional *in vitro* methods (Crystal Violet, enzymatic treatment with DNase I) and a cell model (static co-culture of eukaryotic cells and bacteria). The clinical relevance of the Antibiofilmogram® is reinforced by its ability to detect the initiation of the early bacterial adhesion, to select inhibitor molecules and to avoid the inducer ones. Associated to traditional antibiograms, its application should be pertinent to optimise the CF therapies for the treatment of chronic lung infections.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, biofilms, Biofilm Ring Test®, Antibiofilmogram®, Crystal Violet, cell co-culture, DNase I

Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa* : place de l'Antibiofilmogramme®

Résumé

Les patients mucoviscidosiques sont prédisposés à une colonisation chronique de l'arbre bronchique par *P. aeruginosa*. Ce pathogène opportuniste se caractérise par sa capacité à adhérer à une surface et à y former un biofilm protecteur, hautement tolérant aux agents antimicrobiens. En routine, les antibiogrammes sont effectués sur des cultures bactériennes planctoniques. L'efficacité des antibiothérapies ainsi sélectionnées est donc peu probante pour l'éradication des biofilms bactériens. La réalisation d'Antibiofilmogrammes® sur des isolats cliniques mucoviscidosiques (nouvel outil évaluant la sensibilité des bactéries sessiles aux antibiotiques) a permis de mettre en évidence des phénomènes d'inhibition et d'induction de la formation du biofilm. Plus précisément, les aminosides sont capables de retarder l'adhérence bactérienne. À l'inverse, la famille des β -lactamines présente la capacité de stimuler l'adhésion précoce des micro-organismes. Ces différents effets de l'antibiothérapie générale sur le comportement microbien se vérifient par l'intermédiaire de techniques conventionnelles *in vitro* (Cristal Violet, traitement enzymatique à la DNase I) et cellulaires (modèle de co-culture statique cellules eucaryotes/bactéries). La pertinence clinique de l'Antibiofilmogramme® se confirme donc par sa capacité à détecter l'initiation précoce de l'adhésion bactérienne, à sélectionner les molécules l'inhibant et à écarter celles pouvant l'induire. Associée aux antibiogrammes traditionnels, son application peut permettre d'affiner les stratégies thérapeutiques pour le traitement des infections pulmonaires chroniques développées au cours de la mucoviscidose.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, mucoviscidose, biofilms, Biofilm Ring Test®, Antibiofilmogramme®, Cristal Violet, co-culture cellulaire, DNase I

Abstract

Cystic fibrosis (CF) patients are predisposed to chronic colonisation of the upper airways by *P. aeruginosa*. This opportunist pathogen is characterized by its ability to adhere to a surface and to form a protective biofilm, which is highly tolerant to antimicrobials. In routine, antibiograms are realised on planktonic bacterial cultures. The efficacy of the corresponding antimicrobial therapies appears low for the eradication of bacterial biofilms. The realisation of Antibiofilmograms® on CF clinical isolates (a new tool investigating the susceptibility of sessile bacteria to antibiotics) highlighted phenomena of biofilm formation inhibition and induction. More precisely, aminoglycosides are able to delay the bacterial adherence. Conversely, the β -lactam family shows the ability to stimulate the early adhesion of microorganisms. These different effects of antimicrobials on the bacterial behaviour are confirmed with more conventional *in vitro* methods (Crystal Violet, enzymatic treatment with DNase I) and a cell model (static co-culture of eukaryotic cells and bacteria). The clinical relevance of the Antibiofilmogram® is reinforced by its ability to detect the initiation of the early bacterial adhesion, to select inhibitor molecules and to avoid the inducer ones. Associated to traditional antibiograms, its application should be pertinent to optimise the CF therapies for the treatment of chronic lung infections.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, biofilms, Biofilm Ring Test®, Antibiofilmogram®, Crystal Violet, cell co-culture, DNase I