



Etude du rôle des pili de *Lactococcus lactis* dans la structuration d'un biofilm : approche biophysique multi-échelle

Ibrahima Dramé

► To cite this version:

Ibrahima Dramé. Etude du rôle des pili de *Lactococcus lactis* dans la structuration d'un biofilm : approche biophysique multi-échelle. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2021. Français. NNT : 2021ISAT0002 . tel-03383712

HAL Id: tel-03383712

<https://theses.hal.science/tel-03383712>

Submitted on 18 Oct 2021

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

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse**

**Présentée et soutenue par
Ibrahima DRAME**

Le 25 mars 2021

**Etude du rôle des pili de *Lactococcus lactis* dans la structuration
d'un biofilm: approche biophysique multi-échelle**

Ecole doctorale : **MEGEP - Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés**

Spécialité : **Génie des Procédés et de l'Environnement**

Unité de recherche :

TBI - Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

Thèse dirigée par

Christine LAFFORGUE-BALDAS et Mickaël CASTELAIN

Jury

M. Raphaël DUVAL, Rapporteur

M. Frédéric PIGNON, Rapporteur

M. Etienne DAGUE, Examinateur

Mme Christine LAFFORGUE-BALDAS, Directrice de thèse

M. Mickaël CASTELAIN, Directeur de thèse

Mme Valérie GAGNAIRE, Présidente

Mme Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER, Membre invité

M. Jean-Christophe PIARD, Membre invité

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse**

Présentée et soutenue par

Ibrahima DRAME

Le 25 mars 2021

**Etude du rôle des pili de Lactococcus lactis dans la structuration
d'un biofilm : approche biophysique multi-échelle**

Ecole doctorale : **MEGEP - Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés**

Spécialité : **Génie des Procédés et de l'Environnement**

Unité de recherche :

TBI - Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

Thèse dirigée par

Christine LAFFORGUE-BALDAS et Mickaël CASTELAIN

Jury

Mme Valérie GAGNAIRE, Directrice de Recherche INRAE, Université de Rennes,.....**Présidente**

M. Raphaël DUVAL, Professeur, Université de Lorraine,.....**Rapporteur**

M. Frédéric PIGNON, Directeur de Recherches CNRS, Université Grenoble,.....**Rapporteur**

M. Etienne DAGUE, Chargé de Recherches CNRS, LAAS-CNRS Toulouse,.....**Examineur**

Mme Christine LAFFORGUE-BALDAS, Maître de Conférences INSA Toulouse,.....**Directrice de thèse**

M. Mickaël CASTELAIN, Chargé de Recherches INRAE Toulouse,.....**Directeur de thèse**

Mme Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER, Directrice de Recherche INRA Paris-Saclay,....**Membre invité**

M. Jean-Christophe PIARD, Ingénieur de Recherches, Paris-Saclay,.....**Membre invité**

Remerciements

Tout d'abord, mes remerciements s'adressent au ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (MESRI) et de l'Ecole Doctorale Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (ED-MEGeP), pour le financement de cette thèse, plus particulièrement à mes directeurs de thèse Mickael Castelain et Christine Lafforgue, pour leur confiance dans ce projet multidisciplinaire et pour sa réalisation. Durant ces années, ils ont, tous les deux, activement participé à mon encadrement. Christine et Mickael, au-delà, de leurs riches échanges et discussions, ont été d'une importance capitale durant ces 3 années de ma thèse ; vous avez été à mes côtés dans les bons et mauvais moments, j'avais même droit pendant cette période si difficile (Pandémie de covid-19) mes 2 masques par la poste, des appels, des conseils. Grâce à vous, j'ai pu montrer l'exemple au sein de ma famille, où il a fallu faire face à certains obstacles pour en arriver là. Merci à vous !

Ce projet ne serait réalisé sans la collaboration sans faille d'un de mes encadrants, Etienne Dague, PhD-HDR, PharmD LAAS-CNRS, avec qui nous avons travaillé sur toute la partie AFM et avec qui j'ai passé plus de la moitié de ma thèse. Etienne, franchement là je suis ému, je n'ai pas les mots, je te dis merci pour tout ! Je ne peux énumérer tout ce que tu as fait pour moi et pour la réalisation de ce projet qui nous a tous passionné. Je remercie également toute l'équipe ELIA (Ingénierie pour les sciences du vivant) pour leur accueil, les échanges, notamment le personnel technique qui m'a facilité la réalisation de mes expériences.

Je tiens également à remercier nos deux collaborateurs Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER et Jean-Christophe PIARD, respectivement Directrice de Recherche et Ingénieur de Recherche, à l'INRAE, Institut Micalis, Jouy-en-Josas, de nous avoir d'abord fourni les différentes souches utilisées dans ce travail et de participer activement dans la réalisation de nos deux publications. Leurs échanges nous ont été utiles et je les en remercie infiniment.

Cécile Formosa-Dague, chargée de recherche au CNRS, a été aussi en première ligne, dans mon encadrement, notamment à l'AFM. C'est avec elle que j'ai commencé à prendre une pince et à monter un microlevier, en ce mois de Novembre 2017. Durant ces premiers mois, grâce à elle, notamment ces conseils (dont le plus souvent, le mot clé a été la « patience ») et encouragements, j'ai pu avoir confiance. De l'analyse des résultats au traitement des données, tu as été disponible et réactive. Ces efforts ont payé puisque nous avons ensemble pu publier 2 articles durant ces années de ma thèse.

Mes remerciements vont également à l'encontre de tous les membres du jury, Frédéric PIGNON, Raphaël DUVAL et Valérie GAGNAIRE, d'avoir accepté et consacré leur temps pour juger ce travail.

Je souhaite remercier tout le personnel technique TIM, EAD7, plus particulièrement Christophe ELLERO, d'avoir pris un temps « fou » pour la mise en place du dispositif de la chambre à écoulement, Claude MARANGES qui a été très disponibles, m'a beaucoup aidé sur la partie numérique, ses blagues, sa bonne humeur, ses encouragements, ..., m'ont beaucoup marqué durant ces années passées au TBI.

Tiens, mes collègues de bureau, vous me manquez déjà, les goutés, le café, les fous de rire me manquent déjà. La liste est longue et je ne veux oublier personne, mais je tiens juste à vous remercier pour ces bons moments passés ensemble (les restos, les voyages avec certains d'entre vous, les sorties...) m'ont permis de découvrir de beaux endroits du sud de la France (Hautes Pyrénées, Lourdes, Nice, Monaco (j'ai failli quand même gagner au casino MONTE CARLO)) et tant d'autres événements passer ensemble. I'll never forget this, guys, thanks to all of you!

Je termine mes remerciements à l'encontre de ma famille. D'abord, mon père (paix à son âme) qui après son premier voyage, s'est battu pour que ses enfants aillent à l'école et me disait toujours je crois en toi, continues tes études, je veux que tu deviennes marin. Je ne vais sans doute l'hériter à ce niveau mais probablement, je m'intéresserai aux biofilms marins, un jour ! Merci à ma mère pour ces prières et conseils même si elle n'avait aucune idée de ce que je faisais. Mention spéciale à mon oncle paternel, Abou Bacry Touré, qui m'a fait venir en France par ces propres moyens et m'a permis de faire ma licence, master et jusque-là. Ce fut une personne capitale pour la réussite de mes études.

Je souhaite terminer mes remerciements à mes amis (es) plus particulièrement Abdramane Diarra, Mamadou Kanté pour toutes les démarches administratives entre Paris et Saint-Etienne, pour m'avoir trouvé une école, un logement et m'avoir aidé à affronter la neige de la Loire. Je n'oublie jamais mon deuxième Papa en France et mon homonyme, Ibrahima Doukara, de m'avoir accueilli, aidé et accompagné durant toutes ces années d'études ; mes sincères remerciements à tous !

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction générale	21
Chapitre 2 : Etat de l'art	29
2.1. Qu'est-ce qu'un biofilm bactérien.....	29
2.1.1. Constitution d'un biofilm bactérien et de sa matrice	29
2.1.2. Etapes de formation d'un biofilm bactérien	29
2.2. Influence de l'écoulement sur les caractéristiques des biofilms	31
2.2.1. Effets de contraintes mécaniques sur la morphologie d'un biofilm	32
2.2.2. Transfert de matière -Apport de nutriments	34
2.2.3. Effets des limitations nutritionnelles sur la croissance du biofilm	36
2.2.4. Couplage « conditions hydrodynamiques/activité cellulaire/EPS »	37
2.3. Les pili bactériens.....	38
2.3.1. Pili des bactéries à Gram-négatif	39
2.3.1.1. Différents types de pili et le mécanisme de leur assemblage	39
2.3.1.2. Rôle des pili dans la pathogénicité.....	42
2.3.2. Pili des bactéries à Gram-positif	43
2.3.2.1. Spécificité des pili des bactéries pathogènes.....	44
2.3.2.2. Spécificité des pili des bactéries non-pathogènes.....	46
2.4. Découverte des pili chez <i>L. lactis</i>	50
2.4.1. <i>L. lactis subsp lactis</i> , modèle d'étude des bactéries lactiques	50
2.4.2. Biogénèse des pili chez <i>L. lactis subsp. lactis</i> IL1403.....	51
2.4.3. Organisation fonctionnelle des pili de <i>L. lactis subsp lactis</i> IL1403	52
2.4.4. Biogénèse des pili chez <i>L. lactis subsp. lactis</i> TIL448	55
2.5. Rôle des pili de <i>L. lactis</i> et de ses sous-unités	58
2.5.1. Caractéristiques nanomécaniques d'un pilus analysé par pince optique.....	58
2.5.2. Propriétés adhésives des pili à l'échelle de la cellule.....	59
2.5.2.1. Etude de l'adhésion bactérienne en Chambre à écoulement	59

2.5.2.2.	Etude des mécanismes d'adhésion par microscopie à force atomique	63
2.5.3.	Etude du rôle des pili à l'échelle du biofilm	64
2.6.	Les techniques d'observation et d'analyse des biofilms	67
2.6.1.	Microscopie à fluorescence	68
2.6.2.	Microscopie confocale à balayage laser	68
2.6.2.1.	Définition et historique	68
2.6.2.2.	Dispositif	69
2.6.2.3.	Application	69
2.6.3.	Investigations des biofilms par AFM.....	70
2.6.3.1.	Historique et principes de fonctionnement	70
2.6.3.2.	Application de l'imagerie AFM à l'échelle de la cellule	73
2.6.3.3.	Imagerie des biofilms bactériens par AFM	76
2.6.3.4.	Mesures de force à l'échelle du biofilm par l'AFM.....	76
2.7.	Conclusion de la synthèse bibliographique et objectifs du projet de thèse	78
Chapitre 3 : Matériels et méthodes		83
3.1.	Microorganismes et conditions de croissance.....	83
3.1.1.	Souches bactériennes.....	83
3.1.2.	Conditions de croissance des souches de <i>L. lactis</i>	83
3.1.3.	Préparation des précultures	83
3.2.	Préparation d'échantillons bactériens pour les mesures d'interactions cellulaires par l'AFM.....	85
3.3.	Expériences de spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique	85
3.4.	Expériences d'observation des pili à la surface de <i>L. lactis</i>	87
3.4.1.	Imagerie des cellules et de leurs pili par l'AFM en mode contact.....	87
3.4.2.	Analyse de l'ultrastructure des pili de <i>L. lactis</i> par microscopie électronique à transmission	88
3.5.	Culture des biofilms des souches de <i>L. lactis</i> en condition statique	88
3.5.1.	Observation des biofilms par la microscopie confocale à balayage laser	88

3.5.2.	Imagerie des biofilms par AFM	89
3.6.	Mesures des propriétés nanomécaniques et des forces d'adhésion homotypiques du biofilm de <i>L. lactis</i> par l'AFM.....	89
3.6.1.	Etude des propriétés nanomécanique	89
3.6.2.	Mesure des forces d'interaction homotypique	90
3.7.	Etude des biofilms sous contrainte de cisaillement.....	91
3.7.1.	Dispositif expérimental	91
3.7.1.1.	Désinfection et mise en place du dispositif	92
3.7.1.2.	Configuration et géométrie de la chambre d'écoulement	93
3.7.2.	Etude de l'influence des conditions hydrodynamiques sur la croissance et la structure du biofilm	94
3.7.2.1.	Effets sur la structure du biofilm	94
3.7.2.2.	Validation du choix de l'éosine en tant que marqueur du biofilm	95
3.7.2.3.	Vérification de la disponibilité des substrats en sortie de la chambre d'écoulement	95
3.7.2.4.	Effets de variations des conditions d'écoulement sur la persistance du biofilm	96
Chapitre 4 :	Résultats et discussion	99
4.1.	Rôle médiateur des pili de <i>Lactococcus lactis</i> dans les interactions cellule-cellule par la spectroscopie de force	100
4.1.1.	Contexte et objectifs.....	100
4.1.2.	Principaux résultats et conclusions	101
4.1.3.	Article 1 : Analysis of homotypic interactions of <i>Lactococcus lactis</i> pili using single-cell force spectroscopy	103
4.2.	Relations entre structure et propriétés nanomécaniques du biofilm de <i>L. lactis</i> : influence de la production des pili et d'autres protéines de surfaces.....	116
4.2.1.	Contexte et objectifs.....	116
4.2.2.	Principaux résultats et conclusions	116
4.2.3.	Article 2 : Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of <i>Lactococcus lactis</i> biofilms	118

4.3. Influence des pili sur la structure et la cohésion d'un biofilm de <i>L. lactis</i> soumis à une contrainte de cisaillement	132
4.3.1. Contexte et objectifs.....	132
4.3.2. Résultats et discussion.....	133
4.3.2.1. Effets du débit sur les caractéristiques des biofilms de <i>L. lactis</i>	133
4.3.2.2. Découplage de l'apport en nutriments de la contrainte mécanique de cisaillement.....	138
4.3.2.3. L'influence des pili de <i>L. lactis</i> sur la persistance du biofilm.....	141
4.3.3. Conclusion	143
Chapitre 5 : Conclusion générale et perspectives.....	145
Annexes	153
Annexe 1 : Propriétés physico chimiques de surface des souches de <i>L. lactis</i>	155
Annexe 2 : Etude de la morphologie des cellules de <i>L. lactis</i>	158
Annexe 3 : Analyse topologique d'une cellule de <i>L. lactis</i> par l'imagerie AFM.....	159
Annexe 4 : Phénotype d'auto-agrégation des souches piliées.....	160
Annexe 5 : Tableau récapitulatif des résultats des travaux de l'article 1.....	161
Annexe 6 : Tableau récapitulatif des résultats des travaux de l'article 2.....	162
Annexe 7 : Effet de l'éosine sur la viabilité des cellules de <i>L. lactis</i>	163
Annexe 8 : Figures supplémentaires de l'article 1.....	164
Annexe 9 : Figures supplémentaires de l'article 2.....	178
Valorisation du travail de thèse	183
Références bibliographiques.....	187

Tables des illustrations

Figure 1 : Les étapes de formation d'un biofilm. Chaque numéro correspond à une étape dans le mécanisme de formation du biofilm. Cette figure tirée de (Magana et al. 2018), a été inspiré par Kostakioti et al. (2013).	30
Figure 2 : Représentation schématique pour les concepts de compression et de détachement simultanés sur un biofilm : les différents processus résultant de la contrainte de cisaillement (Paul et al. 2012,).	34
Figure 3 : Micrographie électronique de la souche W3110 d' <i>Escherichia coli</i> produisant des pili de type I.	39
Figure 4 : Les différents types de pili et leurs mécanismes d'assemblage chez les bactéries à Gram-négatif d'après Amano (2010) adapté avec permission par Oxaran (thèse Virginie Oxaran David, 2012).	42
Figure 5 : Modèle d'assemblage d'un pilus chez les bactéries à Gram-positif (modifié d'après Marraffini et al. 2006).....	44
Figure 6 : Exemple d'adhérence de streptocoques à la surface de cellules hôtes par l'intermédiaire des pili (Telford et al. 2006)	45
Figure 7 : Mécanisme moléculaire d'adhésion des pili médiateurs d'interactions entre bactéries-cellules hôtes et entre bactérie-bactérie (adhésion homophile) (Tripathi et al. 2013).	40
Figure 8 : Photo récapitulative des données sur les pili (thèse Manzano, adapté de Telford, 2006).	49
Figure 9 : Photographie des pili au microscope électronique à transmission d'un mutant de <i>L. lactis subsp. lactis</i> IL1403 (Castelain et al. 2016a).	52
Figure 10 : Représentation schématique de l'opéron pil et topologie d'un pilus de <i>L. lactis subsp lactis</i> (Castelain et al. 2016a).	53
Figure 11 : Représentation schématique de la topologie d'un pilus et des sous-unités dans les différentes souches de la collection de mutants décrits dans la Table 1 (Castelain et al. 2016a).	55
Figure 12 : Dispositif de la pince optique et configuration expérimentale pour l'étude des pili de <i>L. lactis</i> à l'échelle de la molécule unique (Castelain et al. 2016a).	59
Figure 13 : Dispositif expérimental de la CEC (Guillemot et al. 2006; Castelain et al. 2016b).	60

Figure 14 : Profil de détachement des différentes souches de <i>L. lactis</i> sous contrainte en chambre à écoulement cisailé (Castelain et al. 2016b) représentant le pourcentage de bactéries restant adhérentes au polystyrène en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée ($\tau_{p50\%}$ en Pa).....	62
Figure 15 : Structure tridimensionnelle des biofilms de 2 souches de <i>L. lactis</i> obtenues à partir d'images observées au microscope confocal à balayage laser (MCBL).....	60
Figure 16 : Principe de fonctionnement de l'AFM (à gauche). Exemple d'une courbe force-distance (à droite) d'après (Aguayo et Bozec 2016)	72
Figure 17 : Morphologie des bactéries observée par l'AFM dans l'air (mode contact), (Francius et al. 2011)	75
Figure 18 : Étude expérimentale des interactions cellule-cellule par spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique (SCFS).	87
Figure 19 : Dispositif expérimental permettant la mesure des propriétés nanomécaniques des biofilms (a) et des interactions homotypiques entre la sonde colloïdale cellulaire et l'interface du biofilm (b).	90
Figure 20 : Schéma du dispositif expérimental pour l'étude des biofilms de <i>L. lactis</i> en conditions d'écoulement.	92
Figure 21 : Vue générale (a) et éclatée de la chambre d'écoulement et de sa géométrie (b)...	93
Figure 22 : Schéma montrant la méthode d'étude de l'effet des différentes contraintes croissantes appliquées par paliers sur la persistance du biofilm.	96
Figure 23 : Images de microscopie à fluorescence montrant l'aspect des structures formées par les cellules après 24h de prolifération statique	133
Figure 24 : Images de microscopie à fluorescence montrant la structure des biofilms de <i>L. lactis</i> pour les différentes souches après 3 min (à droite) d'écoulement à un débit de 5 mL/min soit 1 Pa.....	135
Figure 25 : Images de microscopie à fluorescence montrant l'organisation des bactéries de <i>L. lactis</i> avant et après 24h d'écoulement à un débit de 0.1 mL/min (contrainte de 0,02 Pa)....	136
Figure 26 : Images de microscopie à fluorescence montrant la structure des biofilms des souches de <i>L. lactis</i> avant écoulement, et après 24h d'écoulement à 1, 2 et 5 mL/min correspondant à 0,2, 0,4 et 1 Pa.....	137
Figure 27 : Images en microscopie à fluorescence des biofilms obtenus après 24h d'écoulement pour les souches de <i>L. lactis</i> et leurs représentations schématiques.....	139
Figure 28 : Test de culture sur les milieux entrants et sortants de la chambre à un débit de 5 mL/min par mesure de la DO après 24 h de culture.....	140

Figure 29 : Images de microscopie à fluorescence montrant la persistance des biofilms des souches de *L. lactis* avant et après écoulement sous des débits de 5, 10 et 20 mL/min. Les biofilms (en jaune orangé) sont marqués par l'éosine à 2 %.143

Résumé

Les biofilms peuvent être considérés comme des communautés microbiennes plus ou moins complexes, très structurées, attachées à une surface. Chez les bactéries, les biofilms sont formés d'amas de cellules d'une ou de plusieurs espèces, produisant leur propre matrice exo-polymérique, protectrice et adhésive. Cette forme de vie en communauté permet aux bactéries de se protéger et de résister contre des phénomènes physiques, chimiques et biologiques. Cependant, chez les bactéries pathogènes et opportunistes, la formation de biofilm pose d'importants problèmes économiques et sanitaires. Chez les bactéries non-pathogènes, en particulier, les bactéries probiotiques ou les bactéries lactiques (BL), la formation de biofilm et son rôle dans le contrôle d'autres bactéries d'altération ou pathogènes sont de plus en plus étudiés. Dans cette optique, l'étape d'adhésion, les interactions intercellulaires et les mécanismes de formation de biofilm sont cruciales. Ces dernières années, si la plupart des travaux s'intéressent à la bactérie probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG, la BL modèle *Lactococcus lactis*, fait aussi l'objet de plusieurs études visant à comprendre sa capacité à adhérer sur des surfaces biotiques et abiotiques, les mécanismes d'interactions entre cellules et de formation de biofilms, tant en conditions statiques qu'en écoulement. Dans ces travaux de thèse, pour comprendre le rôle des pili de *L. lactis* dans l'organisation et la cohésion des cellules dans un biofilm, nous avons d'abord démontré, en utilisant la spectroscopie de force à l'échelle de la cellule (SCFS), l'implication des pili dans les interactions homotypiques et leur capacité à interagir avec d'autres protéines de surface comme les protéines à domaines Mub. Le rôle des pili dans les caractéristiques morphologiques du biofilm (hétérogène, aérien, rugueux), en lien avec la cohésion des cellules et ses propriétés nanomécaniques a été analysé. L'utilisation d'une banque de souches aux phénotypes différents a permis de montrer, que d'autres protéines de surface, comme les protéines à domaines Mub, participent à la structuration et aux caractéristiques du biofilm. En revanche, cette différence de structure entre les biofilms des souches piliées n'apparaît pas corrélée à leurs propriétés nanomécaniques. Toutes les souches produisant des pili ont des propriétés mécaniques similaires : les biofilms sont mille fois plus mous ou élastiques que ceux des souches contrôles dépourvues de pili. Enfin, en condition d'écoulement, différentes contraintes de cisaillement (de 0,02 à 4 Pa) ont été appliquées sur les biofilms afin de montrer leurs effets à la fois sur l'arrachement et la morphologie du biofilm ainsi que sur son développement au cours du temps (24 h). Ainsi, dans ces conditions d'écoulement, le rôle crucial des pili dans la structuration et la persistance des biofilms de *L. lactis* a été démontré.

Mots clés : *Lactococcus lactis*, pili, SCFS, AFM, biofilms, propriétés nanomécaniques, conditions hydrodynamiques.

Abstract

Biofilms can be considered as more or less complex, highly structured microbial communities attached to a surface. In bacteria, biofilms are formed from clusters of cells of one or more species, producing their own exopolymeric, protective and adhesive matrix. This form of community life allows bacteria to protect themselves and resist physical, chemical and biological phenomena. However, in pathogenic and opportunistic bacteria, the formation of biofilm poses significant economic and health problems. In non-pathogenic bacteria, particularly probiotic or lactic acid bacteria (LAB), biofilm formation and its role in controlling other spoilage or pathogenic bacteria is increasingly being studied. From this perspective, the adhesion stage, intercellular interactions and biofilm formation mechanisms are crucial. In recent years, while most work has focused on the probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* GG, the model LAB *Lactococcus lactis* is also the subject of several studies aimed at understanding its ability to adhere to biotic and abiotic surfaces, the mechanisms of cell-cell interactions and biofilm formation, both under static and flowing conditions. In these thesis works, in order to understand the role of *L. lactis* pili in the organization and cohesion of cells in a biofilm, we first demonstrated, using cell-scale force spectroscopy (SCFS), the involvement of pili in homotypic interactions and their ability to interact with other surface proteins such as Mub proteins. The role of pili in the morphological characteristics of the biofilm (heterogeneous, aerial, rough), related to cell cohesion and its nanomechanical properties was analyzed. The use of a library of strains with different phenotypes has shown that other surface proteins, such as Mub proteins, participate in the structuring and characteristics of the biofilm. On the other hand, this difference in structure between the biofilms of the piliated strains does not appear to be correlated with their nanomechanical properties. All piliated strains have similar mechanical properties: the biofilms are a thousand times softer or more elastic than those of control strains without pili. Finally, under flow conditions, different shear stresses (from 0.02 to 4 Pa) were applied to the biofilms in order to show their effects on both the detachment and the morphology of the biofilm as well as on its development during 24 h. Thus, under these flow conditions, the crucial role of pili in the structuring and persistence of *L. lactis* biofilms was demonstrated.

Key words: *Lactococcus lactis*, pili, SCFS, AFM, biofilms, nanomechanical properties, hydrodynamic conditions.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNe : ADN extracellulaire

AFM : Atomic Force Microscopy (Microscopie à force atomique)

BL : Bactérie Lactique

CLSM : Confocal laser scanning microscopy (Microscopie confocale à balayage laser)

DO : Densité Optique

EAD7 : Equipe d'Accueil 7

EPS : Extracellular Polymeric Substances (substances polymériques extracellulaires)

F : force (en N : Newton nN ou pN : nano ou pico-Newton)

FDA : Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaires et médicaments)

GRAS : Generally Recognized As Safe (Généralement reconnu comme sûr)

h : heure

H : hauteur (m)

J : joule

K : constant de raideur (N/m ou nN/ μ m)

KPa : KiloPascal

MEGeP : Mécanique, Energetique, Génie civil et Procédés

MESRI : Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation

min : minute (s)

MATS : Microbial Adhesion To Solvents (Adhésion microbienne aux solvants)

mL : milli-litre

Mub : mucus binding protéines (Protéines de liaison aux mucines)

NEP : nettoyage en place

nm ou μ m : nano ou micro-mètre

PBS : Phosphate Buffer Saline

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PEI : Polyéthylèneimine

PGM : Pig Gastric Mucin (Mucine gastrique de porc)

Pil : Piline

Q : débit (en mL/min)

s : seconde (s)

SCFS : Single-Cell Force Spectroscopy (Spectroscopie de force à l'échelle de la cellule)

Srt : Sortase

TBI : Toulouse Biotechnology Institute

TEM : Transmission Electronic Microscopy (Microscopie électronique à transmission)

TIM : Transfert Interface Mélange

ufc : unité formant colonie

WLC : Worm Like-Chain

Chapitre 1 :
Introduction générale

Chapitre 1 : Introduction générale

Les biofilms bactériens sont des amas structurés, hétérogènes, plus ou moins complexes associant des cellules ou des colonies d'une ou plusieurs espèces, enrobées par une matrice exo-polymérique adhésive et protectrice qui sont attachés à une surface biotique ou abiotique (Costerton et al. 1999; Stoodley et al. 2002; Tremblay et al. 2014). La matrice est constituée essentiellement d'eau et de substances polymériques extracellulaires (EPS, en anglais : extracellular polymeric substances) composées d'exo-polysaccharides, de protéines, de lipides, d'ADN extracellulaire, piégés du milieu environnant (Flemming et Wingender 2010; Mann et Wozniak 2012). Ces composants de la matrice sont essentiels car ils influent sur les conditions physico-chimiques et biologiques régnant au sein des biofilms et contribuent à leur stabilité mécanique (Wingender et al. 1999). A plus large échelle, les biofilms grâce à leur matrice d'EPS adhésive et protectrice participent à la préservation et la survie des bactéries sur la planète et dans la chaîne alimentaire.

Depuis les années 1970, le développement des biofilms a été largement étudié, principalement chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif pathogènes opportunistes, car leur présence peut avoir d'importantes conséquences économiques et sanitaires (Abee et al. 2011). Ces biofilms dits « négatifs » ont été décrits comme étant la source de différents de problèmes, aussi bien dans le secteur industriel qu'en milieu hospitalier. Dans l'industrie agroalimentaire, les biofilms sont responsables des contaminations de produits transformés impactant leur qualité et/ou leur sécurité (Abee et al. 2011) et conduisent à des pertes économiques considérables. Dans le milieu médical, ils sont par exemple impliqués dans 70% des infections bactériennes nosocomiales (Costerton et al. 1987; Berthelot et al. 2005) par contamination des matériels médicaux, et contribuent également à l'émergence de résistances aux antibiotiques (Mah et al. 2003). Ils sont également à l'origine de difficultés dans les opérations de nettoyage et de désinfection des surfaces, des instruments et des équipements car ils peuvent diminuer l'efficacité des procédures. Par conséquent, de nombreuses études se sont focalisées sur ces biofilms négatifs afin d'élucider leurs mécanismes de formation, leur structuration, leurs propriétés physico-chimiques pour comprendre l'origine de leur résistance et empêcher leur persistance.

Néanmoins, certains biofilms peuvent aussi être dits « positifs » lorsque par exemple ils jouent un rôle protecteur vis-à-vis de contaminants ou que leurs propriétés sont mises à profit

par la production ou l'élimination de molécules d'intérêt (biodégradation par exemple). C'est pour cela que de plus en plus d'études s'intéressent à ces biofilms positifs qui sont souvent constitués de bactéries dites probiotiques ou de bactéries alimentaires, en particulier certaines bactéries lactiques. Parmi les plus étudiées on peut citer *Lactobacillus rhamnosus* GG (Lebeer et al. 2012; Tripathi et al. 2013), *Lactococcus lactis* (Odamaki et al. 2011b) et des bifidobactéries commensales (Odamaki et al. 2011a; Turroni et al. 2014; Speranza et al. 2020). Ces bactéries sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire, en partie en raison de certaines propriétés antimicrobiennes (production de bactériocines comme la nisine, peroxyde d'hydrogène, diacyls etc...) qui contribuent à limiter la prolifération de bactéries d'altération et d'agents pathogènes susceptibles de contaminer la chaîne alimentaire (Alakomi et al. 2000; Vuyst et al. 2008). Par ailleurs, en raison de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe), c'est-à-dire ne présentant pas de risque pour la santé, leur utilisation dans la lutte contre des agents pathogènes humains apparaît prometteuse (Mokoena 2017).

Chez les bactéries lactiques (BL) comme *L. lactis*, bactérie modèle très répandue dans l'industrie laitière, les investigations se sont multipliées ces dernières années, notamment sur leurs capacités à adhérer, à former un biofilm ou à contrôler la prolifération d'espèces pathogènes (*Listeria monocytogenes*) (Harris et al. 1989; García-Almendárez et al. 2008; Scatassa et al. 2017) ou d'altération de produits fermentés (*Pseudomonas fluorescens*) (Smacchi et Gobetti 1998). *L. lactis* est présente dans diverses niches écologiques telles que les plantes et le lait. Son intérêt technologique (processus de fabrication de fromage et de produits laitiers fermentés), ajouté à d'éventuelles applications prometteuses dans la gestion de troubles gastro-intestinaux et d'infections urinaires a suscité un intérêt croissant. *L. lactis* à l'instar d'autres probiotiques tel que *L. rhamnosus* GG, est capable de produire des peptides antimicrobiens comme des bactériocines dont la plus connue est la nisine (Ruyter et al. 1996; Mierau et Kleerebezem 2005). Plusieurs études ont montré le rôle inhibiteur de la nisine sur la prolifération de pathogènes dans un biofilm mixte (Martinez et al. 2016; Gómez-Sala et al. 2019). L'utilisation de la nisine a été ainsi approuvée par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour être utilisée comme additif alimentaire (Dygico et al. 2019). De façon similaire, l'utilisation de *L. lactis* produisant des bactériocines pourrait également être pertinente (Piard and Briandet 2015) ce qui conduit d'une part à développer des recherches sur sa capacité à adhérer et à former des biofilms sur des surfaces biotiques (muqueuse intestinale) et abiotiques (polystyrène, acier inoxydable, ...) et d'autre part à étudier les interactions intercellulaires.

L'adhésion de *L. lactis* met en jeu aussi bien les propriétés de surface des cellules que celles des supports sur lesquels elles adhèrent. L'enveloppe bactérienne qui est le siège des interactions entre les cellules et entre les cellules et leur support (Bellon-Fontaine et al. 1996; Habimana et al. 2007) est caractérisée par des propriétés comme la charge de surface et l'hydrophobicité (Ly et al. 2008), qui sont déterminées par la composition moléculaire. La paroi d'une bactérie à Gram-positif comme *L. lactis*, est composée de peptidoglycane (Chapot-Chartier et Kulakauskas 2014), de protéines, d'acides téichoïques et lipotéichoïques, de lipides (Pelletier et al. 1997), d'une pellicule de polysaccharides (Ruas-Madiedo et al. 2002; Chapot-Chartier et al. 2010) et porte des pili (Telford et al. 2006; Oxaran et al. 2012; Meyrand et al. 2013; Castelain et al. 2016a). Chaque composant de l'enveloppe joue un rôle particulier pour la cellule.

Les pili font partie des protéines présentes à la surface des bactéries. De structure filamenteuse, ce sont des appendices qui occupent une place importante chez les bactéries et sont fortement impliqués dans l'adhésion initiale aux cellules hôtes ou aux supports durant la colonisation et la formation du biofilm (Tarazanova et al. 2018). Ces structures protéiques filamenteuses ont été observées pour la première fois chez des bactéries à Gram-négatif, au début des années 1950 (Houwink et van Iterson 1950; Brinton 1965; Ottow 1975). Elles ont été mises en évidence chez les bactéries à Gram-positif pathogènes, plus précisément chez *Corynebacterium renale*, dix ans plus tard (Yanagawa et Shinagawa 1968). Depuis lors, les pili, encore appelées fimbriae, ont fait l'objet d'études approfondies et leur présence à la surface des bactéries a été corrélée à leur pathogénicité (Telford et al. 2006). Au niveau cellulaire, ils jouent un rôle déterminant dans les interactions avec d'autres protéines de la matrice extracellulaire, influençant ainsi l'adhésion entre bactéries et entre bactéries et cellules hôtes (Murphy et al. 2014). Ce n'est que récemment que les pili ont été étudiés chez des bactéries à Gram-positif non-pathogènes comme *L. rhamnosus* GG (Lebeer et al. 2012; Tripathi et al. 2013), *L. lactis* (Meyrand et al. 2013; Castelain et al. 2016a) ou *Bifidobacterium bifidum* (Turroni et al. 2014).

Chez *L. lactis*, les pili sont décrits comme étant des macromolécules rigides et flexibles (Castelain et al. 2016a) capables d'adhérer fortement sur la muqueuse des cellules intestinales (Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013) mais aussi sur des surfaces inertes comme sur du polystyrène, même lorsqu'elles sont soumises à des contraintes dues à un écoulement (Castelain et al. 2016b). Ils peuvent également interagir avec des mucines et certaines protéines du lait (Guerin et al. 2016; Tarazanova et al. 2018; Guerin et al. 2018) et pourraient

être de ce fait des vecteurs efficaces pour délivrer des protéines thérapeutiques destinées à la protection de l'intestin (Wells 2011). A notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise à ce jour sur le rôle des pili de *L. lactis* dans les interactions intercellulaires. A l'échelle du biofilm, le rôle des pili notamment sur sa structuration, ses propriétés mécaniques et sa cohésion n'a pas été analysé. La seule étude rapportée dans la littérature conclue à leur probable implication dans l'architecture des biofilms (Oxaran et al. 2012). Ces travaux démontrent également que les pili sont à l'origine de phénotypes d'auto-agrégation des cellules en culture liquide (Oxaran et al. 2012). L'approche expérimentale menée dans cette étude, a été effectuée avec des mutants issus d'une souche de laboratoire IL1403 qui contient dans son chromosome un opéron *pil*, inactif dans les conditions de croissance standards, mais surexprimé dans des conditions de laboratoire qui conduit à une production des pili à la surface des cellules. L'opéron *pil* ainsi exprimé code une sortase putative de classe C (SrtC) ainsi que trois pilines (PilA, PilB et PilC) constitutives du pilus.

Les pili qui sont observables par microscopie électronique à transmission (MET) (Oxaran et al. 2012; Castelain et al. 2016a) le sont aussi par microscopie à force atomique (AFM) (Meyrand et al. 2013). Ces techniques permettent d'observer des structures longues et fines qui peuvent atteindre jusqu'à plus de 3 μm de longueur avec un diamètre d'environ 5 nm. A l'échelle de la cellule, le rôle clé des pili dans l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques a été démontré à la fois en AFM, par spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique (SCFS) et par expériences en chambre à écoulement cisailée (CEC). Ces deux techniques sont souvent combinées à l'échelle de la cellule et peuvent être utilisées à l'échelle du biofilm ainsi que la microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Ces techniques seront utilisées au cours de la thèse afin de mieux comprendre le rôle des pili de *L. lactis* dans les interactions intercellulaires et dans la structure et l'organisation du biofilm. Les corrélations entre les caractéristiques des pili et les propriétés nanomécaniques du biofilm seront étudiées. Dans le cas de biofilms soumis à des contraintes dynamiques en écoulement, les relations entre les propriétés des pili de *L. lactis* et la structure (topographie, morphologie), le développement, la cohésion du biofilm et ses propriétés nanomécaniques (élasticité ou viscoélasticité), seront également étudiées, tout en examinant plus particulièrement leur rôle dans la persistance du biofilm.

Ce manuscrit est organisé en 5 chapitres. Dans le chapitre 1, une introduction générale présente le contexte de la thèse.

L'état de l'art positionnant la problématique est présenté dans le chapitre 2. Il décrit différentes études relatives à la connaissance des biofilms aux échelles du biofilm, de la cellule et des pili et met l'accent sur l'apport de techniques d'investigations innovantes en particulier de l'AFM. Le rôle joué par les pili dans les caractéristiques morphologiques d'un biofilm chez différentes bactéries (Gram-négatif et Gram-positif) en condition de croissance statique ou en présence de contraintes liées à un écoulement sera brièvement décrits dans ce second chapitre.

Le chapitre 3 sera consacré à la présentation détaillée des protocoles et des dispositifs expérimentaux utilisés lors des différentes expériences réalisées au cours de ce travail.

Le chapitre 4 regroupe les résultats expérimentaux obtenus, relatifs respectivement à l'analyse du rôle des pili dans les interactions cellule-cellule, à la détermination des propriétés nanomécaniques des biofilms et dans une dernière partie aux caractéristiques de biofilms soumis à des cisaillements dans un écoulement. Les deux premiers points étudiés sont présentés sous forme d'articles scientifiques et sont précédés de résumés rappelant le contexte et les objectifs des expériences menées, les principaux résultats et conclusions. La troisième partie du chapitre qui concerne l'étude de biofilms de *L. lactis* en conditions d'écoulement s'attache à analyser le rôle des pili dans la structure, la cohésion et la persistance du biofilm.

Pour la mise en lumière des résultats clés, le chapitre 5 propose une conclusion générale et offre différentes perspectives à ces travaux de thèse.

Chapitre 2 :

Etat de l'art

Chapitre 2 : Etat de l'art

2.1. Qu'est-ce qu'un biofilm bactérien

2.1.1. Constitution d'un biofilm bactérien et de sa matrice

Il existe plusieurs descriptions de l'organisation d'un biofilm bactérien. Selon Costerton et al. (1999), un biofilm est une communauté complexe de bactéries adhérentes à une surface humide, encapsulée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS, en anglais : extracellular polymeric substances). Les biofilms peuvent être composés d'une ou de plusieurs espèces bactériennes d'où la notion de biofilm mono- ou multi-espèces. Dans tous les cas, les bactéries qui forment le biofilm produisent une matrice d'EPS, collante et d'aspect gélatineux, qui interagit avec la surface colonisée. Cette façon de s'organiser et de s'attacher permet aux bactéries de survivre et de se protéger contre des phénomènes de dessiccation ou de stress physiques, chimiques et biologiques (Tremblay et al. 2014). Les polymères qui composent la matrice correspondent à 50 - 90 % de la matière organique totale des biofilms (Evans 2013) et sont composés d'un assemblage de biopolymères constituées d'une grande quantité d'eau, d'exo-polysaccharides, de protéines, d'ADN extracellulaires (ADNe) et de lipides (Flemming et Wingender 2010). Ces macromolécules lient les cellules homologues ou hétérologues entre elles et les organisent en tissu. Leurs fonctions sont diverses et variées ; elles sont impliquées par exemple dans l'adhérence des bactéries, la stabilité mécanique du biofilm ou sa protection contre la dessiccation dans les milieux naturels. Ainsi, face à un stress environnemental, la production d'EPS protège les bactéries contre des éléments toxiques et contribue au maintien de la structure du biofilm. La production des EPS dépend des bactéries présentes mais aussi de l'environnement, de la composition du milieu de culture et de l'âge du biofilm (Leriche et al. 1999).

2.1.2. Etapes de formation d'un biofilm bactérien

L'obtention d'un biofilm mature résulte de différents processus. Le mécanisme de formation des biofilms peut être décrit en cinq étapes (**Fig. 1**) (Watnick et al. 2001; Stoodley et al. 2002; Kostakioti et al. 2013) et peut faire intervenir une ou plusieurs espèces bactériennes.

1. Les bactéries à l'état planctonique s'approchant de la surface d'un substrat biotique ou abiotique vont y adhérer sous l'effet d'interactions physico-chimiques et grâce à des appendices.

2. Les bactéries adhérentes sur la surface de façon irréversible voient leur comportement métabolique se modifier et produisent progressivement une matrice d'exopolymères qui les enrobe.
3. Une communauté multicellulaire se développe en formant des microcolonies dans lesquelles les bactéries se multiplient et évoluent.
4. L'activité microbienne entraîne le développement d'un biofilm mature dans lequel se font des échanges entre les cellules.
5. Le biofilm sert de réservoir et certaines bactéries peuvent être libérées dans le milieu environnant par sa dispersion et coloniser ensuite de nouvelles surfaces.

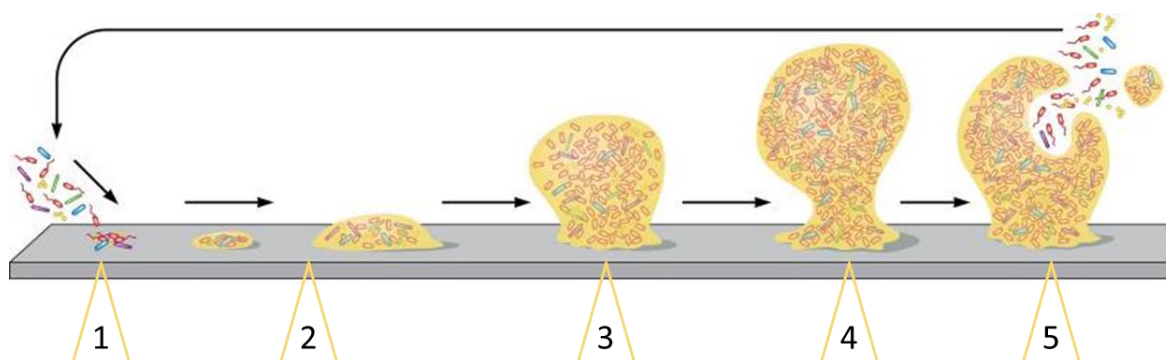


Figure 1 : Les étapes de formation d'un biofilm. Chaque numéro correspond à une étape dans le mécanisme de formation du biofilm. Cette figure tirée de (Magana et al. 2018), a été inspiré par Kostakioti et al. (2013).

Dans l'environnement naturel, la plupart des bactéries vivent sous forme de biofilms et subissent une reprogrammation métabolique et transcriptionnelle importante comparée aux bactéries planctoniques génétiquement identiques (Costerton et al. 1995). Cette reprogrammation au cours de la formation des biofilms fait intervenir l'expression d'un certain nombre de gènes impliquant des mécanismes moléculaires sous le terme de « quorum sensing (QS) » (Yarwood et al. 2004). Le QS est un mode de communication chez les bactéries et induit la production de composés qui, à un certain seuil, déclenche la formation du biofilm (Hammer et Bassler 2003). Ce mode de communication est largement étudié chez les bactéries pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* (Christensen et al. 2007; Kievit 2009), *Vibrio cholerae* (Hammer et Bassler 2003), *Staphylococcus aureus* (Yarwood et al. 2004). Récemment, le rôle du QS a été mis en évidence chez certaines bactéries alimentaires, comme *L. lactis* impliquées dans la production et la stabilité d'aliments fermentés (légumes, levain,

lait) (Johansen et Jespersen 2017). Chez ces bactéries alimentaires, les mécanismes de régulation du QS concernent non seulement la formation de biofilms, mais aussi la tolérance au stress acide, la production de bactériocines, la compétence, l'adhésion, les commutations morphologiques et la croissance orientée (Bai et Rai 2011; Johansen et Jespersen 2017).

Les biofilms se développent sur des interfaces liquides et solides variées. Par exemple ils colonisent le fond des rivières, les roches, les racines des plantes ou des endroits humides. Ils peuvent se développer également au sein d'organismes vivants, en particulier dans le tube digestif, sur les muqueuses, dans les cavités du corps (vagin, bouche, plaque dentaire...) (Costerton et al. 1987). Ces structures complexes ont été largement étudiées depuis les années 1970 avec les travaux de Listgarten et de ses collaborateurs qui ont mis en évidence par microscopie optique et électronique, l'architecture des biofilms de la plaque dentaire sur des prothèses ou des dents (Listgarten et al. 1975). Au cours des dernières décennies, les recherches se sont focalisées essentiellement sur les bactéries pathogènes. En effet, ces biofilms ont été suspectés d'être responsables de différents types de pathologies, notamment d'infections persistantes (Costerton et al. 1987). Ils peuvent également favoriser la résistance des bactéries aux antibiotiques (Mah et al. 2003) et sont à l'origine des problèmes de qualité/sécurité dans l'industrie alimentaire (Abee et al. 2011). Les recherches sur les biofilms formés de bactéries non-pathogènes sont récentes et rares et restent limitées à des probiotiques, comme par exemple *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Vuotto et al. 2014; Wasfi et al. 2018) et celles utilisées en agroalimentaires comme *L. lactis* (Leriche et al. 1999). Le rôle inhibiteur de ces bactéries dans le développement de pathogènes dans des biofilms mixtes a ainsi été mis en évidence (Tan et al. 2018), ce qui laisse entrevoir des perspectives prometteuses dans la lutte contre certaines infections intestinales ou dans la prévention contaminations à l'échelle industrielle.

2.2. Influence de l'écoulement sur les caractéristiques des biofilms

Du fait des difficultés à les éliminer sur des surfaces et de leur capacité accrue de résistance à de nombreux biocides (Stewart 2012), les biofilms formés par les bactéries pathogènes sont de loin les plus étudiés. La réduction de leur développement et de leur propagation est un défi dans de nombreux secteurs tels que le domaine médical, l'industrie agroalimentaire ou le traitement de l'eau (Costerton et al. 1999). L'une des stratégies consiste

à intensifier les conditions d'écoulement et les contraintes de cisaillement afin de limiter l'adhésion initiale et favoriser l'arrachement des biofilms installés. Ainsi de nombreux travaux se sont intéressés au comportement et aux caractéristiques des biofilms dans des conditions hydrodynamiques contrôlées.

Dans le cas des investigations menées en écoulement dans des conditions hydrodynamiques proches des conditions réelles, la morphologie, l'organisation et les fonctionnalités microbiennes des biofilms sont le plus souvent déterminées par l'étude du détachement. Ce processus de détachement du biofilm est généralement analysé en prenant en compte de nombreux paramètres tels que la production d'EPS, sa morphologie, ses propriétés mécaniques, notamment son comportement rhéologique et sa viscoélasticité (Boudarel et al. 2018; Rozenbaum et al. 2019), ainsi que les relations entre les conditions hydrodynamiques et sa croissance (Teodósio et al. 2011; Hancock et al. 2011; Paul et al. 2012). Les techniques d'investigation utilisées reposent sur des analyses physico-mécaniques statiques ou dynamiques (module d'élasticité, force de tension, module de cisaillement, compressibilité, porosité, densité...) et biologiques (concentration cellulaire, activité, cellules planctoniques...). Cependant, ces mesures ne sont pas applicables à tous les stades de développement d'un biofilm *in vivo* en conditions réelles. En outre, les interprétations sont généralement complexes car les phénomènes physiques, mécaniques et biologiques sont interdépendants. Afin de s'affranchir de certaines variables, les études sont parfois réalisées en mettant en œuvre des dispositifs expérimentaux modèles dans lesquels certains paramètres peuvent être stabilisés en découplant les aspects mécaniques des conditions d'alimentation en substrat. Par exemple dans l'étude de Mbaye (2011) la contrainte de cisaillement est modifiée en faisant varier la profondeur du canal d'écoulement, ce qui permet de travailler à débit d'apport de nutriment constant, et dans l'étude de Paul et al (2012) le biofilm se développe sur des coupons placés sur un dispositif mobile inséré dans un réacteur dans lequel les conditions nutritives et le cisaillement peuvent être indépendamment contrôlés.

2.2.1. Effets de contraintes mécaniques sur la morphologie d'un biofilm

Pour comprendre l'influence des conditions d'écoulement sur l'adhésion initiale des cellules, la structure et la morphologie des biofilms, Lecuyer et al. (2011) et Mbaye et al. (2013) ont réalisés des investigations chez *P. aeruginosa* et *P. putida*, respectivement. Une adhésion plus durable des cellules de *P. aeruginosa* sur du verre et du polydiméthylsiloxane (PDMS) a été observée lors que les contraintes de cisaillement augmentent (Lecuyer et al. 2011). La forte adhésion des cellules ou des amas de cellules a été attribuée à une réponse

dynamique aux variations des contraintes de cisaillement allant de 0,01 Pa à 10 Pa. Le comportement adhésif des bactéries serait ainsi modifié pour résister aux augmentations de cisaillement induites par la vitesse d'écoulement du fluide. Les résultats ont aussi montré que la persistance des cellules sur la surface augmente avec le cisaillement tant que la valeur de la contrainte est inférieure à environ 3 Pa. Au-delà de cette valeur, une augmentation brusque du détachement des cellules est observée entraînant une structure hétérogène du biofilm. L'existence d'un seuil a été également constatée dans les travaux de Mbaye et al. (2011) dans le cas du biofilm de *P. putida*. De façon similaire, dans d'autres études expérimentales, la concentration des cellules dans le biofilm (ufc/cm²) ne varie pas pour des contraintes allant de 0,07 à 0,17 Pa mais un détachement important est observé lorsque la contrainte augmente jusqu'à 0,29 Pa (Tsai 2005).

Paul et al. (2012), ont proposé un dispositif permettant d'analyser la réponse à des contraintes d'intensité croissante, le biofilm est ainsi formé sous faible contrainte de cisaillement (0,01 Pa) avant d'être exposé à contraintes allant de 0,1 à 13 Pa. Ils ont montré que l'augmentation de la contrainte de cisaillement s'accompagnait d'une diminution de l'épaisseur et de la masse du biofilm mais que sa densité évoluait inversement ; les biofilms les plus denses étant obtenus pour les contraintes les plus élevées. Si la couche de base du biofilm est toujours très résistante quelles que soient les conditions de culture, sa cohésion dépend des conditions hydrodynamiques dans lesquelles il a été formé (Paul et al. 2012). Ils concluent à une grande hétérogénéité du biofilm dans son épaisseur avec des couches superficielles plus sensibles à l'arrachement. Le détachement survient lorsque la contrainte de cisaillement contrebalance la force de cohésion interne de ces couches, alors que les couches plus profondes sont plus compactes et subissent une contrainte normale qui induit la compression du biofilm en réduisant sa porosité (Fig. 2).

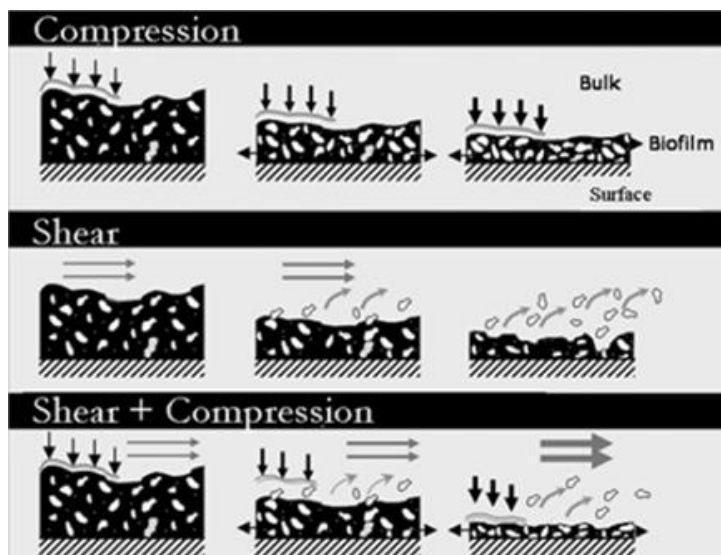


Figure 2 : Représentation schématique pour les concepts de compression et de détachement simultanés sur un biofilm : les différents processus résultant de la contrainte de cisaillement (Paul et al. 2012).

En résumé, les conditions d'écoulement peuvent induire d'une part un cisaillement important qui peut provoquer un détachement du biofilm (érosion superficielle du biofilm) sur différentes zones, conduisant à une répartition spatiale hétérogène des bactéries, d'autre part, une compression du biofilm se traduisant par une architecture compacte et cohésive. Il est à préciser aussi que des variations de morphologie du biofilm pourraient être liées à la géométrie du système d'écoulement (Rusconi et al. 2011) notamment consécutives à des variations locales des contraintes hydrodynamiques.

Toutefois, dans plusieurs travaux, le couplage des effets liés aux contraintes mécaniques à ceux liés aux conditions de croissance sur le détachement et le développement du biofilm, est souligné (Vieira et al. 1993; Stoodley et al. 1999; Liu et Tay 2002; Teodósio et al. 2011; Jones et Buie 2019).

2.2.2. Transfert de matière -Apport de nutriments

La croissance et le développement du biofilm dépendent de l'activité des microorganismes et donc de l'apport de nutriments aux bactéries présentes. Ce transfert de masse du fluide vers les microorganismes et l'accessibilité des substrats sont régis par différents phénomènes qui dépendent à la fois des conditions opératoires et des caractéristiques du biofilm. De façon générale, le transport par convection, dont va dépendre

la concentration en substrat à l'interface liquide/biofilm, est directement relié aux conditions d'écoulement (débit, vitesse, géométrie de la conduite, singularités...). En revanche le transfert de masse au sein du biofilm, qui s'opère principalement par diffusion, va dépendre des caractéristiques morphologiques du biofilm (densité, porosité, épaisseur...). De nombreux auteurs ont étudié l'impact de ces facteurs sur l'activité, la croissance et l'évolution de la structure du biofilm.

Les conditions hydrodynamiques imposées par le fluide circulant à la surface du biofilm influencent la diffusion interne dans le biofilm par le renouvellement du milieu (López et al. 2003). Lorsque cette diffusion est moindre, un changement de structure du biofilm est observé. Tsai et al. (2005) ont postulé que l'augmentation de la contrainte de cisaillement stimulait à la fois la diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le biofilm et favorisait ainsi sa prolifération (Tsai 2005; Jones et Buie 2019). Des coefficients de transfert de masse dans un biofilm formé par *P. aeruginosa* ont été mesurés sous différentes vitesses de fluide (Pinheiro et al. 1988). Les coefficients de diffusion d'un substrat au sein du biofilm obtenu sont variables ce qui suggère que le biofilm peut avoir différentes épaisseurs et structures en fonction de la vitesse d'écoulement du fluide. De nombreux auteurs ont en effet constaté que lorsque les contraintes de cisaillement augmentent, le biofilm est moins épais, mais présente une densité et une cohésion plus importantes, la diffusion interne étant alors plus faible (Vieira et al. 1993). Des conclusions similaires ont été faites par Pinheiro et al. (1988) dans le cas d'un biofilm de *P. fluorescens* et par Chang et ses collaborateurs (1991). Par ailleurs, une carence en nutriments au cœur du biofilm peut conduire à la lyse cellulaire et contribuer ainsi au détachement partiel d'une partie du biofilm (Hunt et al. 2004).

En résumé, l'augmentation du débit d'alimentation couplée à la vitesse d'écoulement, entraîne la diminution de l'épaisseur de la couche limite hydrodynamique et donc de la couche limite de concentration. Le transfert de matière convectif augmente ainsi que le flux de substrat vers le biofilm qui se développe alors plus vite de façon plus compacte et plus lisse. Mais la modulation de l'apport de nutriments par l'écoulement n'est pas le seul phénomène qui contribue à la modification de la morphologie du biofilm. En effet, l'augmentation des vitesses conduit à des contraintes pariétales plus élevées et à une intensification de l'érosion ce qui contribue également au lissage de la surface du biofilm et/ou à son amincissement. Cependant, certaines études sur les phénomènes de diffusion, ne prennent en compte que le régime de limitation des transferts de masse où le biofilm est très

irrégulier en surface (rugosité importante) et ne considèrent pas les effets dus au cisaillement (Piciooreanu et al. 2000).

2.2.3. Effets des limitations nutritionnelles sur la croissance du biofilm

Dans le processus de développement et de maturation des biofilms, le choix du milieu de culture et de son renouvellement constituent une étape cruciale. En effet, la croissance du biofilm est maintenue lorsque le milieu de culture est renouvelé régulièrement et en même temps que l'élimination des métabolites. Les limitations nutritionnelles induisent une diminution du taux de croissance et stimulent la production d'exo-polymères qui sont favorables à l'adhésion initiale et à la prolifération du biofilm (Kadam et al. 2013). Des études ont montré qu'en conditions statiques, la modification des conditions de cultures notamment l'appauvrissement du milieu nutritif favorise la croissance des bactéries sous forme adhérees par rapport aux bactéries planctoniques (Pécastaings et al. 2010). En milieu pauvre ou encore en milieu minimum, les bactéries subissent un stress nutritionnel qui conduit à la sélection des plus adhérentes (Khalilzadeh et al. 2010). Un milieu spécifiquement adapté à la croissance de biofilms mono-espèce de *Legionella pneumophila in vitro*, appelé « bouillon de biofilm modifié » (BBM), a été proposé par Pécastaings et al. (2010). Il ne permet pas la croissance planctonique mais conduit à la formation et au développement d'un biofilm atypique d'environ $5,36 \pm 0,40 \log_{10}$ (cfu/cm²) avec des macrocolonies allant jusqu'à 300 µm. Un tel milieu appauvri adapté à la croissance d'une bactérie particulière permet une grande reproductibilité et assure l'absence d'autres espèces microbiennes ce qui est particulièrement intéressant pour l'étude des gènes impliqués dans la formation de biofilms (Pécastaings et al. 2010). En conditions de culture statique, le renouvellement du milieu de culture constitue une étape cruciale. Il permet non seulement l'apport de nutriments pour la croissance du biofilm mais aussi d'éliminer et de quantifier les bactéries qui se sont détachées du biofilm et qui témoignent de l'activité constante du biofilm.

En conditions d'écoulement, de rares travaux ont étudié l'effet de la composition du milieu de culture sur la croissance du biofilm. Dans les expériences de Mbaye, (2011), il a été mis en évidence que certaines conditions de culture avaient une incidence sur la croissance des cellules initialement adhérees. Ainsi, dans les conditions non limitantes (milieu riche), le taux de croissance bactérienne apparaît inférieur à celui mesuré avec les cellules en suspension. Ce résultat a amené à sélectionner un milieu modifié plus pauvre afin de favoriser

la croissance des bactéries sous forme adhérees. Ce résultat corrobore les précédentes observations en conditions statiques faites par Khalilzadeh et al. (2010).

2.2.4. Couplage « conditions hydrodynamiques/activité cellulaire/EPS »

Comme décrit précédemment, la formation, la structure et le métabolisme des communautés bactériennes dans un biofilm sont très étroitement associés aux conditions hydrodynamiques (Liu et Tay 2002). Au cours du développement du biofilm, les bactéries sont capables de résister à différentes formes de stress grâce à la matrice d'EPS qui constitue un moyen de protection contre des facteurs externes physico-chimiques ou mécaniques comme le cisaillement et d'autres facteurs environnementaux (Lei et al. 2004; Ramasamy et Zhang 2005; Wang et al. 2014; Karimi et al. 2015). Un effet des conditions d'écoulement sur l'intensification de la production d'EPS, a été mis en évidence par Qi et al. (2008). Dans leur étude, ils ont rapporté que la sécrétion importante des exo-polymères était une réponse physiologique des bactéries consécutive à l'augmentation des contraintes de cisaillement. Des observations similaires ont été faites par Lei et al. (2004) qui ont montré un effet de l'augmentation des contraintes sur le développement des biofilms avec une production accrue de composés extracellulaires, dont essentiellement des polysaccharides, conduisant à un biofilm compact, dense et résistant. De la même façon, l'étude du biofilm formé par *Bacillus cereus* dans les conditions d'écoulement important, semble montrer une plus grande résistance aux forces mécaniques qui pourrait être liée à une production importante de matrice d'EPS (Lemos et al. 2015). Toutefois, la relation directe entre l'augmentation de la contrainte de cisaillement et la production d'EPS par *B. cereus* n'a pas été trouvée.

Cependant, d'autres études ont également mis en évidence un rôle crucial des protéines de surface dans les caractéristiques des biofilms soumis à des contraintes liées à l'écoulement. Par exemple le développement des biofilms constitués de bactéries déficientes en fimbria de type I, est défectueux et leur morphologie est altérée (Gibiansky et al. 2010; Wang et al. 2018). Cette dernière étude conclue que l'architecture du biofilm n'est pas seulement due aux conditions d'écoulement mais résulte également en l'absence des fimbria à la surface des cellules.

Si les protéines de surface paraissent importantes pour la structuration et la cohésion des biofilms, elles interviennent d'abord au cours de la première étape d'adhésion bactérienne qui est cruciale. En effet, cette étape d'initiation fait intervenir un certain nombre de facteurs qui permettent aux cellules d'adhérer fortement aux surfaces pour former un biofilm structuré et

cohésif. Parmi ces facteurs interviennent les propriétés physico-chimiques du support et de la paroi des bactéries ainsi que les protéines de surface qui sont présentes sur celle-ci, parmi lesquelles en particulier les pili (Pratt et Kolter 1998; Klausen et al. 2003).

Dans ce manuscrit, nous nous limiterons au rôle des protéines de surface que sont les pili, dans l'adhésion et la formation des biofilms.

2.3. Les pili bactériens

Des appendices non flagellaires ont été observés pour la première fois au début des années 1950 chez les bactéries à Gram-négatif au microscope électronique à transmission (Houwink et van Iterson 1950; Brinton 1965). Durant les années suivantes, ces protéines, de structure filamenteuse, ont été reconnues et caractérisées chez plusieurs espèces de bactéries à Gram-négatif par deux groupes de recherche : l'un dirigé par James Duguid, qui les a appelés des fimbria (structure fibreuse, fimbriae au singulier) (Duguid et al. 1955) et l'autre mené par Charles Brinton qui a préféré les nommer des pili (pilus au singulier) dérivé du mot latin pour poil ou cheveu (Brinton 1965) (**Fig. 3**). Aujourd'hui les deux termes, fimbria et pili sont utilisés indifféremment. Nous les nommerons pili ou pilus dans ce document. Les pili sont des hétéropolymères filamenteux, plus fins que les flagelles (quelques nanomètres d'épaisseur), constituée par l'assemblage de protéines pouvant être liées ou non par un système enzymatique particulier (Sauer et al. 2002; Proft et Baker 2008). Ils sont ancrés dans le peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif (Dieye et al. 2001; Scott et Zähler 2006; Marraffini et al. 2006; Oxaran et al. 2012) ou la membrane externe et la membrane cytoplasmique pour les bactéries à Gram-négatif (Soto et Hultgren 1999; Starks et al. 2006; Kline et al. 2009). Depuis plusieurs années, des études se sont largement intéressées aux pili des bactéries pathogènes à Gram-négatif et à Gram-positif qui sont aujourd'hui bien connues et mieux caractérisées. Plus récemment, les pili ont fait l'objet d'investigation chez les bactéries à Gram-positif non-pathogènes, notamment chez des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus rhamnosus* (Kankainen et al. 2009) et *Lactococcus lactis* (Oxaran et al. 2012; Castelain et al. 2016a).

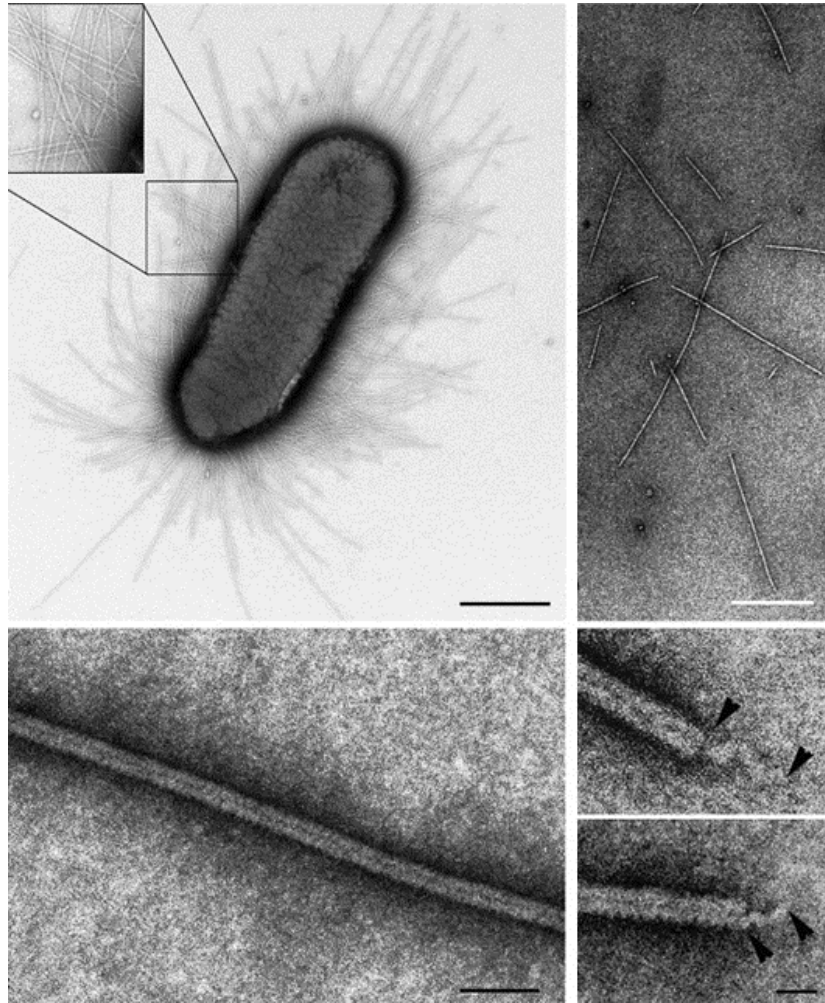


Figure 3 : Micrographie électronique de la souche W3110 d'*Escherichia coli* produisant des pili de type I. L'imagerie, réalisée par MET, montre des pili plutôt rigides et en forme de bâtonnet, clairement visibles grâce au marquage négatif au phosphotungstate de sodium (Hahn et al. 2002).

2.3.1. Pili des bactéries à Gram-négatif

2.3.1.1. Différents types de pili et le mécanisme de leur assemblage

Les pili des bactéries à Gram-négatif découverts par Houwink et van Iterson (1950) ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche largement portés sur leur détection, leurs mécanismes de formation, leur structure et leurs fonctions biologiques. Ils sont constitués de plusieurs sous-unités liées entre elles par des liaisons non-covalentes ne reposant pas sur une activité enzymatique. Différents types ont été identifiés, décrits et caractérisés selon leurs

mécanismes d'assemblage (Fronzes et al. 2008; Proft et Baker 2008; Amano 2010; Kline et al. 2010) (**Fig. 4**) :

- ✓ Les pili de type I sont des hétéro-polymères en forme de tige rigide avec des adhésines flexibles à leur extrémité. C'est le type le mieux caractérisé. Il est exprimé par *Salmonella* et certaines souches d'*Escherichia coli* entéro-pathogènes (Duguid et Campbell 1969; Martinez et Hultgren 2002). Il est synthétisé via le complexe chaperon-guide « Chaperone-Usher ». La formation des pili de type I résulte d'une organisation en opéron des gènes qui codent des sous-unités, les pilines. Les pilines sont sécrétées à travers la membrane interne dans l'espace périplasmique par la voie de sécrétion Sec. Elles sont ensuite prises en charge par une protéine chaperonne spécifique qui permet leur repliement et empêche l'assemblage prématuré des sous-unités entre elles. Arrivé à la membrane externe, le complexe « piline-Chaperone » est reconnu par le guide « Usher », une plateforme transmembranaire d'assemblage munie de deux pores. La protéine chaperonne se détache du complexe une fois que la liaison avec une autre piline est établie à travers la membrane externe. De là, débute la biosynthèse du pilus, la coiffe est la première pierre de l'édifice, puis suit une série d'un nombre déterminé de pilines principales constituant le squelette et enfin la piline d'ancrage. Les pili de ce type ont été largement étudiés chez *E.coli* et comprennent plusieurs sous-type (type I, S, P, F1C, CFA/I etc.), dont les propriétés nanomécaniques sont caractéristiques de leur environnement (intestinal, rénal, urétral et autres) (Bullitt et Makowski 1995; Fällman et al. 2004; Jass et al. 2004; Andersson et al. 2008).
- ✓ Les pili de type IV sont moins connus et sont généralement des homopolymères en forme de tige flexible, localisés aux pôles de la bactérie. Ce sont des protéines homologues à celles obtenues avec système de sécrétion de type II. L'assemblage se fait au niveau de la membrane interne où des pilines matures s'insèrent grâce à leur partie hydrophobe N-terminale. Ces types de pili, grâce à une « Rétraction ATPase », ont la particularité de se polymériser ou de se dépolymériser. Les pili de type IV sont exprimés par certaines souches de *E. coli* (Bieber et al. 1998) ainsi que chez *Pseudomonas aeruginosa* (Giltner et al. 2006) et chez *Neisseria* (Freitag et al. 1995; Imhaus et Duménil 2014).
- ✓ Les pili de type curli sont des filaments enroulés flexibles agrégés autour de la cellule et sont assemblés par la voie de nucléation-précipitation. L'assemblage commence par le transport de la piline majeure à travers la membrane interne. Dans le périplasme, deux

protéines se chargent de sa liaison avec une lipoprotéine localisée dans la membrane externe. La piline majeure s'associe ensuite avec une piline mineure qui agit comme facteur de nucléation et sert de base au pilus (Fronzes et al. 2008). Ce type de pili est produit par certaines souches d'*E. coli* (Kikuchi et al. 2005) et par plusieurs Entérobactéries et Salmonelles (Barnhart et Chapman 2006).

- ✓ Enfin, les pili formés par la voie « alternative Chaperone-Usher » sont similaires aux pili de type I mais ils ont la particularité d'avoir la capacité à se rétracter.

Il est à noter qu'il existe un autre type de pili qui sont formés par l'assemblage de sous-unités dépendantes d'un système de sécrétion de type flagellaire connu sous le nom de système de sécrétion de type III (T3SS) (Fronzes et al. 2008). Ce type de pilus est appelé « pilus Hrp » (Roine et al. 1997; Fronzes et al. 2008). Il a été observé pour la première fois chez *Salmonella typhimurium* et ressemble à des aiguilles responsables de l'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales (Fronzes et al. 2008). Il est également présent chez d'autres agents pathogènes d'animaux et de végétaux, notamment *Yersinia pestis* (He et al. 2004) et *Pseudomonas syringae* (Roine et al. 1997).

Les différents types de pili peuvent avoir des fonctions différentes. Les pili de type I et de type IV, par exemple, sont tous deux impliqués dans l'adhésion aux cellules hôtes et l'induction de la signalisation moléculaire dans ces cellules (Martinez et Hultgren 2002). Les pili de type IV permettent, quant à eux, le transfert de matériel génétique (Higashi et al. 2011) et aussi, par leur système de rétraction, ils jouent un rôle de motilité de la cellule (Mattick 2002; Chen et al. 2002). Une de leurs caractéristiques communes est leur rôle clé dans l'adhésion aux cellules hôtes et aux composants de la matrice extracellulaire (Amano 2003).

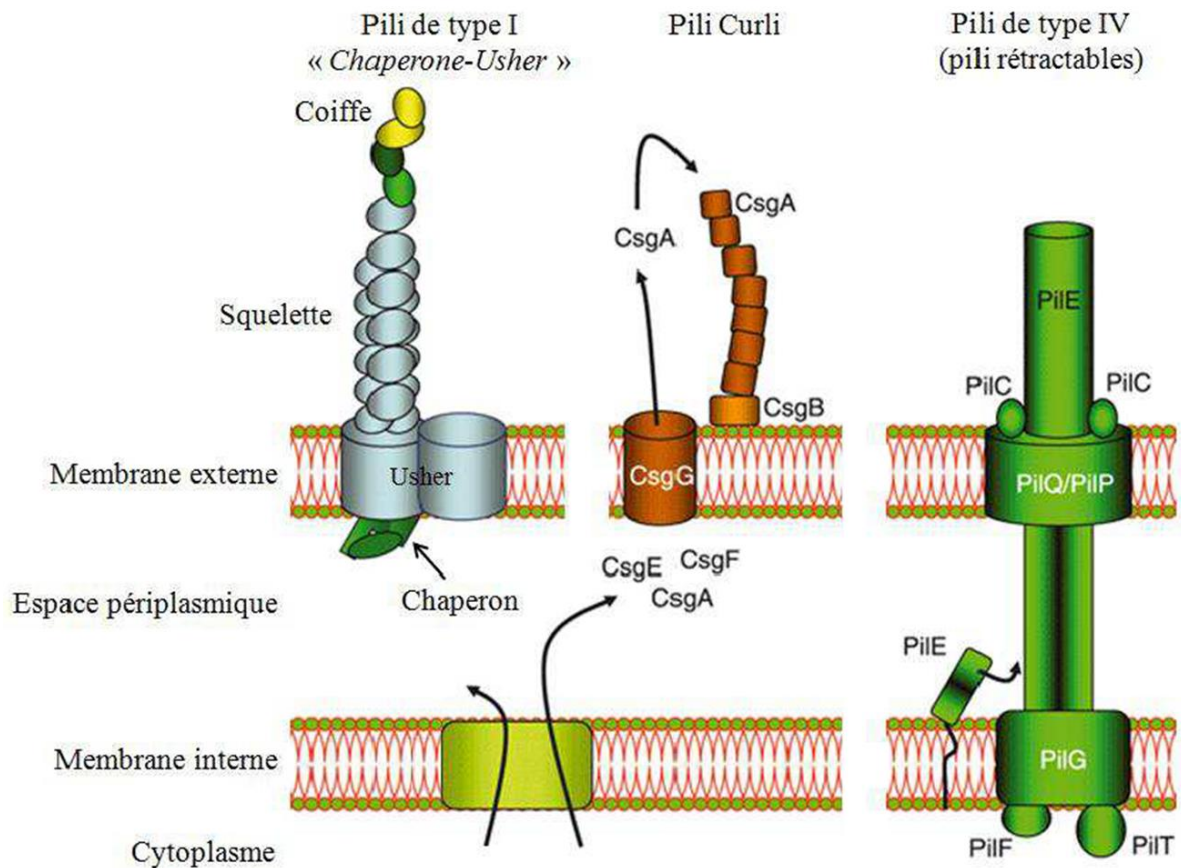


Figure 4 : Les différents types de pili et leurs mécanismes d'assemblage chez les bactéries à Gram-négatif d'après Amano (2010) adapté avec permission par Oxaran (Oxaran 2012). CsgA est la piline majeure des pili de type Curli, CsgB une sous-unité du pilus associée à la membrane externe, CsgC, CsgD, CsgE et CsgF sont des chaperonnes spécifiques localisées dans le périplasme, CsgG une lipoprotéine sur la membrane externe qui s'associe avec CsgE et CsgF pour la sécrétion de la CsgA. La PilE est la piline majeure des pili de type alternative Chaperone-Usher située dans la membrane interne. Les autres protéines notées PilX sont des sous-unités situées dans la membrane externe ou la membrane interne.

2.3.1.2. Rôle des pili dans la pathogénicité

La présence des pili à la surface des bactéries à Gram-négatif a été associée à leur pathogénicité (Schilling et al. 2001). Les pili sont en effet des facteurs de virulence importants pour plusieurs maladies, en particulier les infections des voies urinaires, gastro-intestinales et génitales (Proft et Baker 2008). Chez certaines bactéries comme *E. coli* entéro-pathogènes, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp*, les pili sont impliqués dans l'adhésion (Hahn et al. 2002) et l'agrégation de cellules (Wall et Kaiser 1999), la formation de biofilms (O'Toole et Kolter

1998). Ils sont également médiateurs d'interactions entre ces bactéries et les cellules hôtes (Martinez et al. 2000) sont impliqués dans la transduction de phage et l'absorption de l'ADN (Aas et al. 2002). Ils interviennent également dans la motilité des cellules bactériennes connue sous le terme de « twitching motility » (Chen et al. 2002) qui facilite la colonisation des cellules hôtes et établit la première étape de l'infection (Hospenthal et al. 2017). Ces différents rôles des pili contribuent donc à leur pouvoir pathogène mais participent également à la résistance aux antibiotiques par la formation du biofilm. Par conséquent, la résistance et la pathogénicité dues à la présence des pili à la surface des cellules rend difficile le contrôle et la maîtrise de ces bactéries en particulier dans le domaine médical (Proft et Baker 2008; Kline et al. 2010).

2.3.2. Pili des bactéries à Gram-positif

Les structures de type pilus à la surface d'une bactérie à Gram-positif, ont été découvertes par microscopie électronique à transmission dans les années 1960 chez *Corynebacterium renale*, bactérie pathogène causant les pyélonéphrites (Yanagawa et Shinagawa 1968). Cependant, elles n'ont été caractérisées qu'en 2003 au niveau moléculaire (Ton-That et Schneewind 2003). Ce sont des protéines constitutives contenant un peptide signal en N-terminal et un domaine d'ancrage C-terminal (**Fig. 5**). La partie C-terminale comporte un motif LPxTG avec un domaine hydrophobe suivi d'une queue chargée positivement (Yeung et al. 1998).

Dans le processus de biogénèse des pili des bactéries à Gram-positif se situe au niveau du mécanisme d'assemblage des sous-unités de pilines et d'ancrage au peptidoglycane. Ce mécanisme se fait de façon covalente et est catalysé par des transpeptidases membranaires appelées sortases (Navarre et Schneewind 1994; Ton-That et Schneewind 2003; Mandlik et al. 2008; Oxaran et al. 2012; Khare et Narayana 2017). Ces enzymes sont capables à la fois de reconnaître des protéines spécifiques et de catalyser leurs liaisons avec la paroi et avec d'autres protéines similaires. Elles ont été découvertes pour la première fois chez *Staphylococcus aureus* et sont principalement connues pour catalyser la polymérisation et l'ancrage covalent des protéines à motif LPxTG au peptidoglycane (Konto-Ghiorgi et al. 2009). La formation du pilus commence d'abord par une sous-unité de piline mineure qui constitue la coiffe ou l'extrémité du pilus. Ensuite, la (Pip) qui est la polymérase de piline liée à la sortase, également située dans la membrane, est une enzyme-acyl intermédiaire qui permet le clivage de la coiffe et son détachement de la membrane cellulaire. Après son transport à travers la membrane cellulaire (par le système de sécrétion Sec), la sous-unité

majeure (piline majeure) contenant le peptide signal en N-terminal libre dans le résidu leucine du motif LPxTG, s'associe par une liaison peptidique avec la sous-unité mineure de la coiffe grâce à la thréonine. La sous-unité majeure reste liée à la Pip. Lors de la polymérisation, les sous-unités majeures s'associent par le même type de réaction de clivage enzymatique pour former le squelette ou la tige du pilus. En cours de croissance, ce dernier est pris en charge par une autre enzyme, la sortase A (SrtA), codée par le gène de ménage *srtA*. La SrtA le fixe au précurseur de la paroi cellulaire par un lipide de type II qui se lie de façon covalente à la chaîne peptidoglycane (Marraffini et al. 2006).

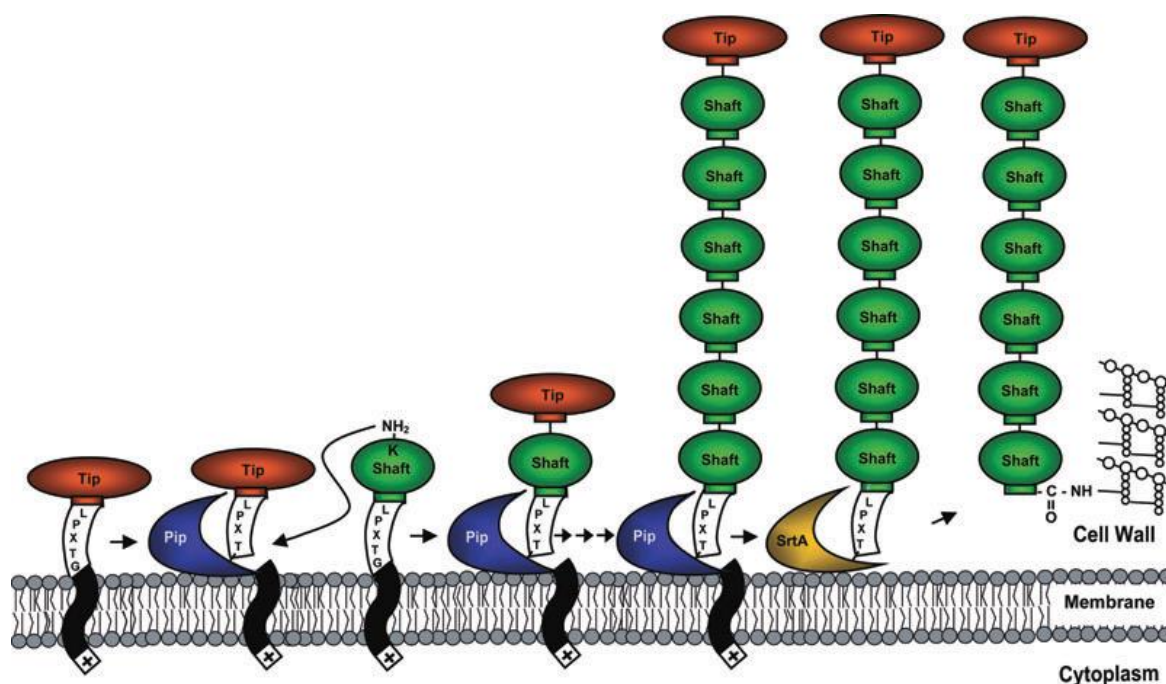


Figure 5 : Modèle d'assemblage d'un pilus chez les bactéries à Gram-positif (modifié d'après Marraffini et al. (2006). LPxTG = Leucine-Proline-x-Thréonine-Glycine avec x nombre indéfini d'acide aminés, Tip = extrémité ou coiffe du pilus, shaft = squelette du pilus, Pip = polymérase de piline liée à la sortase.

2.3.2.1. Spécificité des pili des bactéries pathogènes

Contrairement aux bactéries à Gram-négatif, les pili des bactéries à Gram-positif pathogènes sont peu étudiés. Les premiers types de pili qui ont été observés en microscopie électronique sont apparus plus courts et plus minces (70 à 500 nm de long et un diamètre de 1 à 2 nm) et le système d'assemblage ordonné des sous-unités n'était pas bien identifié au niveau moléculaire (O'Hanley et al. 1985). Ce n'est que vers les années 1990 que Yeung et

ses collaborateurs ont débuté leur caractérisation moléculaire chez *Actinomyces naeslundii* (Yeung et Cisar 1990; Yeung et al. 1998). Plus tard, le mécanisme d'assemblage des pili (décrit dans la section 2.2.2.) a été analysé par Ton-That et Schneewind (2003) chez *Corynebacterium diphtheriae*, puis chez d'autres agents pathogènes du genre *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* etc, bactéries opportunistes responsables de maladies invasives néonatales dont la méningite, la pneumonie et la septicémie (Cozzi et al. 2015). Il a été établi que chez toutes ces bactéries il existait au moins un locus sortase C impliquant la biogenèse des pili. Comme pour les bactéries à Gram-négatif, les pili des bactéries à Gram-positif pathogènes participent à la virulence. Par exemple chez les streptocoques, l'infection est initiée d'abord par l'attachement des pili à la surface des cellules hôtes (Fig. 6). Il s'en suit une étape de colonisation puis l'agrégation des cellules formant une communauté microbienne dans le tissu infecté. La colonisation qui résulte d'une grande variété de facteurs liés à l'hôte et aux agents pathogènes, ainsi que d'une densité bactérienne accrue dans la zone infectée, peut entraîner une augmentation de la réponse immunitaire innée et de l'inflammation.

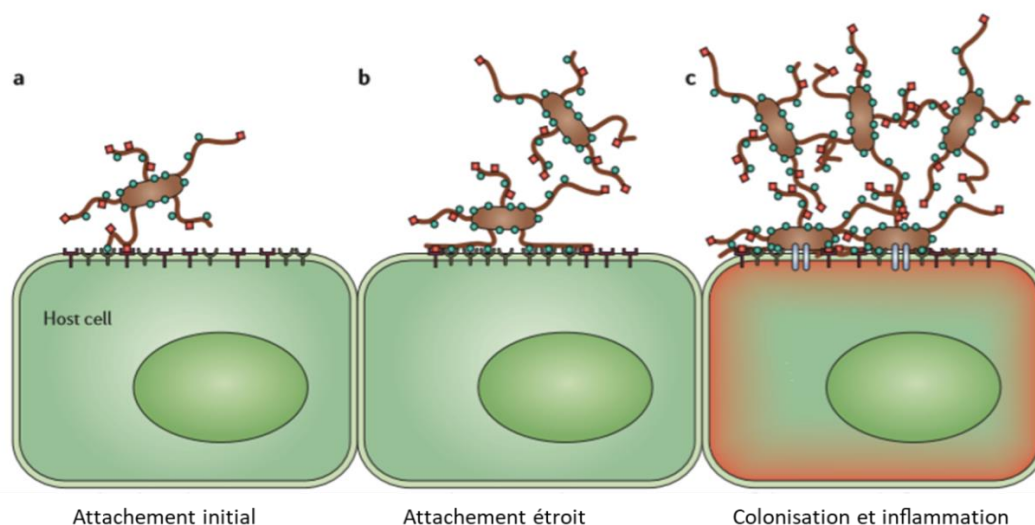


Figure 6 : Exemple d'adhérence de streptocoques à la surface de cellules hôtes par l'intermédiaire des pili (Telford et al. 2006). (a) Initiation à l'attachement de streptocoques aux cellules hôtes en étendant leurs pili à la surface apicale. (b) L'attachement progressif est un processus secondaire dans lequel les adhésines autour du pilus pourraient être impliquées dans l'adhésion des pili aux cellules hôtes. Cela diminue ainsi la distance entre la surface de la bactérie et celle de la cellule hôte. (c) L'attachement progressif conduit à la colonisation de la surface apicale de la cellule hôte, un processus qui est lié à l'expression d'adhésines de surface à haute affinité.

2.3.2.2. Spécificité des pili des bactéries non-pathogènes

Comme pour les bactéries à Gram-positif pathogènes, les pili n'ont été que récemment identifiés et caractérisés chez des bactéries à Gram-positif non-pathogènes. Les premières études ont été faites chez *Lactobacillus rhamnosus* (Kankainen et al. 2009), puis plus récemment chez *Bifidobacterium* (Turroni et al. 2014) et *L. lactis* (Oxaran et al. 2012). Toutefois les données disponibles sur le rôle des pili sont rares et les études portent essentiellement sur les bactéries du genre *Lactobacillus*, en particulier la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG notée LGG.

LGG est une bactérie à Gram-positif commensale du tractus gastro-intestinal. Elles jouent un rôle important dans la production et la conservation des aliments en agro-alimentaire (Kankainen et al. 2009). Ces bactéries sont également commercialisées en tant que probiotiques, en raison de leurs effets bénéfiques sur la Santé (Bernardeau et al. 2008). Une de leurs caractéristiques importantes est leur capacité d'adhérence aux tissus intestinaux humains, qui peut être favorisée par une variété d'interactions spécifiques entre les cellules et des protéines de surface qu'elles produisent (Lebeer et al. 2012). Par exemple, dans le génome de LGG, il a été identifié deux types de cluster de gènes qui conduisent à l'expression des pili à la surface des cellules (Kankainen et al. 2009; Ossowski et al. 2010). Les cellules de LGG présentent de nombreux pili à leur surface, environ 10 à 50 par bactéries. D'ultrastructure linéaire, le pilus de LGG a été identifié et observé par immuno-détection grâce à la microscopie électronique à transmission (MET) et peut atteindre plus de 1 µm de longueur et 1-10 nm de diamètre (Kankainen et al. 2009). C'est un hétérotrimère composé d'une piline majeure formant le corps du pilus, d'une piline mineure rattachées à l'épine dorsale du pilus, et d'une deuxième piline mineure aux propriétés adhésives située à la pointe, à l'extrémité et/ou autour du pilus (Mandlik et al. 2008; Reunanen et al. 2012). Les gènes codant les 3 sous-unités de pilines et la sortase spécifique aux pilines sont généralement localisés sur le même locus et sont fréquemment flanqués aux deux extrémités d'éléments transposables, ce qui suggère une origine par transfert horizontal de gènes. Le mécanisme d'assemblage des pilines qui forment le pilus est le même que celui décrit plus haut (**Fig. 5**). La piline mineure localisée au bout du pilus et aussi le long du squelette, permet aux cellules de LGG d'établir un contact à la fois à longue distance et courte distance avec les tissus de l'hôte (**Fig. 7**) (Tripathi et al. 2013). Elle se lie spécifiquement à la mucine et au collagène, deux composants

extracellulaires majeurs des couches épithéliales de l'hôte et contribue également à l'adhésion entre cellules bactériennes (interactions homotypiques). L'adhésion et la colonisation du tractus gastro-intestinal par les cellules de *Lactobacillus* entraînent le déclenchement de diverses réponses immunitaires contre les bactéries pathogènes et limite leur implantation (Saxelin et al. 2005). C'est une des raisons pour laquelle les bactéries probiotiques font de plus en plus l'objet d'études approfondies pour mieux comprendre leurs interactions avec la muqueuse intestinale.

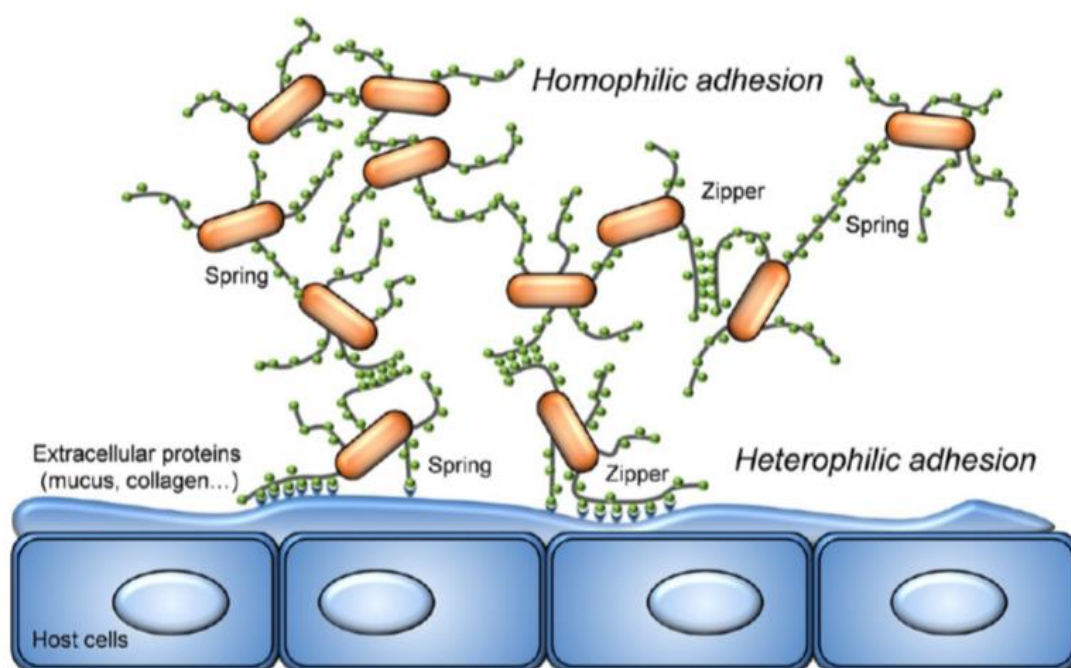


Figure 7 : Mécanisme moléculaire d'adhésion des pili médiateurs d'interactions entre bactéries-cellules hôtes et entre bactérie-bactérie (adhésion homophile) (Tripathi et al. 2013).

Des pili ont été également découverts chez d'autres bactéries probiotiques comme les bifidobactéries, bactéries commensales qui colonisent fréquemment l'intestin du nourrisson humain et ont des effets bénéfiques cliniques (Picard et al. 2005). Une analyse génétique et une identification morphologique de ces structures ont été réalisées chez diverses souches de bifidobactéries comme *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum subsp. longum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (Foroni et al. 2011). Dans les travaux de Turroni et al. (2013), une analyse du profil de transcription du génome entier a révélé un nombre important de protéines extracellulaires

couramment exprimées chez *B. bifidum* PRL2010, souche isolée des selles de nourrissons et considérée comme le modèle des bifidobactéries pour l'analyse des interactions entre les bactéries et la muqueuse intestinale. Cette souche exprime un certain nombre de gènes qui codent la sortase et les pilines constitutives du pilus. Dans la même étude, (Turroni et al. 2013) démontrent également que l'expression des séquences codant pour les appendices de *B. bifidum* PRL2010 dans une souche de *L. lactis* conduisent non-seulement à la production de pili qui adhèrent fortement aux entérocytes humains, mais également au déclenchement d'une activité immunomodulatrice (Turroni et al. 2013; Turroni et al. 2014).

D'autres chercheurs se sont focalisés sur d'autres bactéries bénéfiques à la santé humaine en particulier *Lactococcus lactis*. Les recherches s'intéressent aussi bien à leur capacité d'adhésion sur des surfaces biotiques et abiotiques mais aussi à la formation de biofilms.

	Bactéries à Gram-négatif		Pili curli <i>E.coli</i> (quelques souches)	Bactéries à Gram-positif	
	Pili de type I <i>E.coli</i> entérotoxigène	Pili de type IV <i>E.coli</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i>		Fibrille <i>S.salivarius</i>	Pili <i>S. pneumoniae</i> , <i>Corynebacterium</i>
Exemples d'espèces	<i>E.coli</i> entérotoxigène	<i>E.coli</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i>	<i>E.coli</i> (quelques souches)	<i>S.salivarius</i>	<i>S. pneumoniae</i> , <i>Corynebacterium</i>
Microscopie Électronique					
Morphologie	Tige rigide avec une adhésine flexible au sommet	Tige flexible	Filaments en coiled-coil	Courte, tige fine	Tige flexible
Longueur	1-2 µm	1-2 µm	1-2 µm	0,07-0,5 µm	0,3-03 µm
Diamètre	7 nm (Sommet : 2-3 nm)	5-6 nm	1-2 nm	1-2 nm	3-10 nm
Biogenèse du pilus	Voie Chaperonne/usher	Système de sécrétion du type II	Extracellulaire	ND	Activité de sortases
Récepteurs cellulaires des adhésines	Glycoprotéines, Glycolipides,	Glycolipides, CD46, C4BP	Fibronectine, laminine, plasminogène	Fibronectine	Collagène Fibronectine
Organisation génomique	Opéron	Ilôt de pathogénicité	Opéron	ND	Ilôt de pathogénicité
Immunogénicité	Protection engendrée par les protéines du pilus purifiées additionnées d'un adjuvant	Protection engendrée par les protéines du pilus purifiées	ND	ND	Protection engendrée par les protéines du pilus purifiées
Fonctions	Adhésion sur les tissus hôtes, co-aggrégation, immunomodulation, formation de biofilm	Adhésion sur les tissus hôtes, co-aggrégation, immunomodulation, motilité, transfert d'ADN	Adhésion sur les tissus hôtes, co-aggrégation, immunomodulation, formation de biofilm	Adhésion sur les tissus hôte, co-aggrégation,	Adhésion sur les tissus hôte, co-aggrégation, immunomodulation,

Figure 8 : Photo récapitulative des données sur les pili (thèse Manzano, adapté de Telford, 2006).

2.4. Découverte des pili chez *L. lactis*

2.4.1. *L. lactis subsp lactis*, modèle d'étude des bactéries lactiques

La bactérie du genre *Lactococcus* comprend sept espèces : *L. garvieae* (Collins et al. 1983), *L. lactis*, *L. piscium* (Williams et al. 1990), *L. plantarum* (Collins et al. 1983), *L. raffinolactis* (Gravie 1978), et plus récemment *L. chungangensis* (Cho et al. 2008) et *L. fujiensis* (Cai et al. 2011). En 2011, l'espèce *L. lactis* est divisée en quatre sous-espèces : *L. lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris*, *L. lactis subsp. hordniae* et *L. lactis subsp. tructae* (Pérez et al. 2011). La classification basée initialement sur des critères phénotypiques et biochimiques (Davidson et al. 1996) a été complétée par le séquençage des gènes codants les ARN ribosomiques 16s (Rodrigues et al. 1991). Dans notre étude, nous nous intéressons plus particulièrement à *L. lactis subsp. lactis*.

L. lactis est une bactérie non mobile, en forme de coques ovoïdes habituellement associées en paires ou chaînettes de longueurs variables. Elle est anaérobie aérotolérante avec un optimum de croissance à 30 °C. Présente dans des niches écologiques diverses et riches en nutriments (sol, plante, lait et produits fermentés), *L. lactis* est largement utilisée dans la filière laitière. Elle contribue à la flaveur, aux qualités organoleptiques et à la texturation au cours des processus de transformation des produits laitiers (fromages, yaourts...) (Giaouris et al. 2009; Cavanagh et al. 2015). Elle joue aussi un rôle dans la conservation en produisant des peptides antimicrobiens tels que les bactériocines et en acidifiant le milieu par son métabolisme homofermentaire. Bien qu'elle ne soit pas considérée comme une bactérie probiotique, *L. lactis* est reconnue pour être inoffensive pour l'homme par l'Agence Américaine du Médicament (Food and Drug Agency, FDA) en 2010 et possède le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Salminen et al. 1998). Elle survit transitoirement dans le tractus digestif (Drouault et al. 1999) comme LGG. Ces caractéristiques font de *L. lactis* un excellent candidat en tant que vecteur de protéines d'intérêt bio-thérapeutique, et comme productrice de composés protéiques particuliers (antigènes bactériens, interleukines ou vaccins) (Steidler et al. 2000; Wells et Mercenier 2008).

L'analyse génomique a permis de séquencer les génomes complets de cinq souches de *L. lactis* à ce jour : *L. lactis subsp. lactis* IL1403 (Bolotin et al. 2001), *L. lactis subsp. cremoris* MG1363 (Wegmann et al. 2007), *L. lactis subsp. cremoris* SK11 (Makarova et al. 2006), *L. lactis subsp. lactis* KF147 (Siezen et al. 2010) et *L. lactis subsp. lactis* CV56 (Gao et al. 2011). L'une des souches étudiées dans cette thèse est *L. lactis subsp. lactis* IL1403 qui

a été la première dont le génome a été intégralement séquencé (Bolotin et al. 2001). Curée de ses plasmides, elle possède le plus petit génome connu de *L. lactis* composé d'un chromosome circulaire de 2.36 Mb codant 2321 protéines. Grace aux outils génétiques tels que les méthodes de transformation, les vecteurs de clonage (Papagianni et al. 2007), les systèmes d'expression de gènes (Dieye et al. 2001) et les systèmes de mutagénèse (Maguin et al. 1996), *L. lactis* est très largement exploitée.

2.4.2. Biogénèse des pili chez *L. lactis subsp. lactis* IL1403

Dans l'optique de réaliser une caractérisation fonctionnelle des sortases, les travaux de Dieye et al. (2002) ont permis d'identifier deux types de sortases putatives de classe A et C dans le génome de *L. lactis subsp. lactis* IL1403. En complément de cette étude, la fonctionnalité de SrtA et de SrtC a été étudiée (Oxaran et al. 2012). La capacité de *L. lactis*, comme chez les bactéries à Gram-positif pathogènes, à ancrer des protéines hétérologues portant des signaux de reconnaissance par des sortases de classe A (SrtA) a été mise en évidence ainsi que l'existence de machineries « sortases » impliquées dans la production des pili. Ces auteurs ont également mis en évidence la présence d'un opéron *pil* sur le chromosome de *L. lactis subsp. lactis* IL1403, constitué de gènes qui codent pour la SrtC et pour trois sous-unités à motif LPxTG. Cependant, cet opéron n'est pas exprimé dans les conditions standards de culture (Oxaran et al. 2012). Sa surexpression, obtenue dans les conditions de culture spécifiques en laboratoire, conduit à la production de pili à la surface des mutants issus de *L. lactis subsp. lactis* IL1403 (Fig. 9).

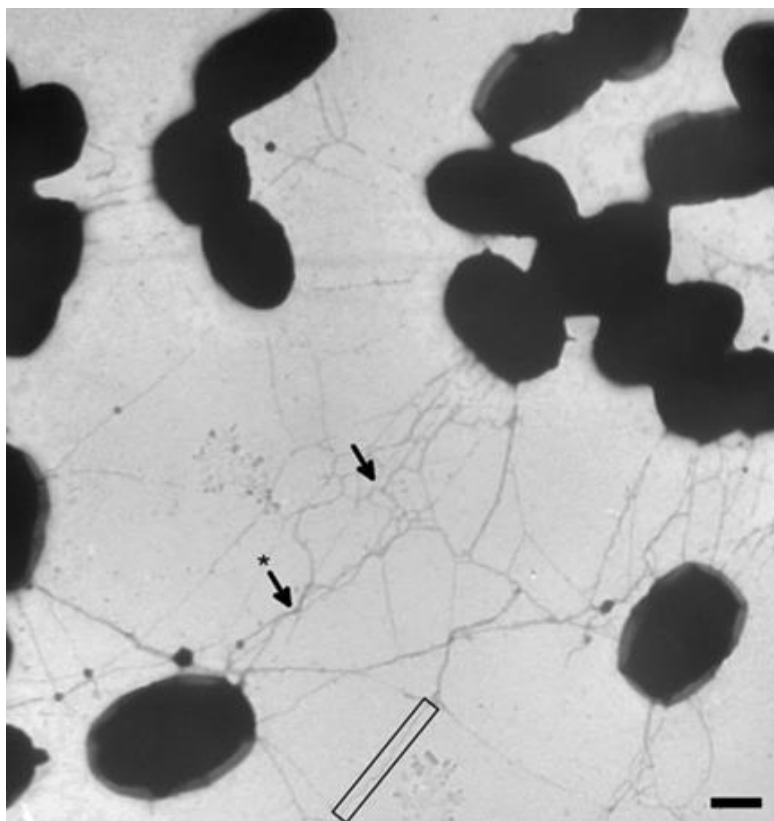


Figure 9 : Photographie des pili au microscope électronique à transmission d'un mutant de *L. lactis subsp. lactis* IL1403 (Castelain et al. 2016a). Les pili sont indiqués par les flèches noires (échelle = 500 nm).

2.4.3. Organisation fonctionnelle des pili de *L. lactis subsp lactis* IL1403

Le mécanisme de biogénèse des pili de *L. lactis* qui fait intervenir l'expression de l'opéron *pil* peut être résumé en deux étapes ; la polymérisation des sous-unités, les pilines et l'ancrage au peptidoglycane. Comme chez les autres bactéries à Gram-positif, la formation d'un pilus fait intervenir trois pilines à motif LPxTG assemblées de façon covalente par la SrtC et ancré au peptidoglycane par la SrtA.

L'analyse fonctionnelle du pilus montre que les sous-unités sont constituées de la piline A (PilA) nommée YhgD dans les travaux d'Oxaran et al. (2012), située à l'extrémité distale du pilus et appelée la coiffe, par où débute la biogénèse. La piline B (PilB ou YhgE) est la piline majeure qui constitue le squelette du pilus et la piline C (PilC ou YhgB) située à la partie basale, lie le pilus au peptidoglycane (Castelain et al. 2016a) (**Fig. 10 et Fig. 11**). Le mécanisme de reconnaissance et d'assemblage est le même que chez les bactéries à Gram-

positif, décrit plus haut (**Fig. 5**). L'oligomérisation, c'est-à-dire la conversion d'un ou d'un monomère ou d'un mélange de monomères en oligomères qui forment le squelette du pilus est catalysée par la SrtC qui, elle, reconnaît une large gamme de variantes du motif LPxTG. La SrtA appartient à une classe d'enzymes codées par les gènes de ménage qui sont des gènes essentiels à la survie de la bactérie. Elle permet au pilus de se fixer au peptidoglycane par liaison entre le motif LPxTG de la PilC et le lipide de type II de la paroi cellulaire.

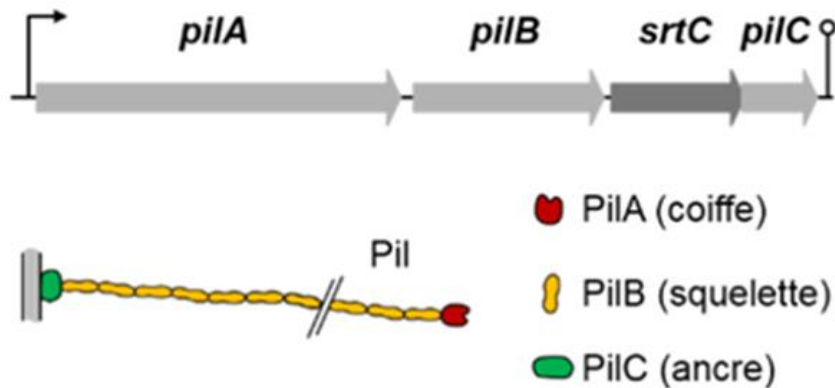


Figure 10 : Représentation schématique de l'opéron *pil* et topologie d'un pilus de *L. lactis subsp lactis* (Castelain et al. 2016a).

L'analyse génétique et la découverte de l'opéron *pil*, exprimé dans des conditions de culture en laboratoire chez *L. lactis subsp. lactis* IL1403, ont permis la construction d'une collection de mutants (**Table 1**) (Oxaran et al. 2012). Ces mutants ont été d'un grand intérêt pour étudier les propriétés nanomécaniques des pili et de leurs sous-unités (Castelain et al. 2016a) et pour démontrer leur rôle dans l'adhésion cellulaire (Castelain et al. 2016b) ainsi que dans la formation du biofilm (Oxaran et al. 2012). Les pili ont été également découverts chez d'autres souches de *L. lactis* d'origine végétale et ont fait l'objet de plusieurs études (Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013).

Table 1 : Données récapitulatives des caractéristiques des souches de *L. lactis subsp lactis* utilisées pour l'étude des pili (Castelain et al. 2016a ; Oxaran et al. 2012). La souche sauvage (WT) IL1403 et ses dérivés mutés sur différents gènes de l'opéron pil (3 gènes qui codent les pilines A, B et C, et le gène codant la SrtC) sont indiquées dans le tableau. SrtC* désigne la classe C dont le site actif a été inhibé.

Numéro et désignation des souches	Caractéristiques de chaque souche	Références
1. <i>L. lactis</i> VE17061, Pil ⁻ , control	Like wild-type (WT) strain IL1403	Oxaran et al. (2012)
2. <i>L. lactis</i> VE17173, Pil ⁺	WT, <i>pilA:pilB:srtC:pilC</i>	Oxaran et al. (2012)
3. <i>L. lactis</i> VE17148, Pil ^{ΔA}	WT, <i>pilB:srtC:pilC</i>	Oxaran et al. (2012)
4. <i>L. lactis</i> VE17183, Pil ^{ΔAΔC}	WT, <i>pilB:srtC</i>	Oxaran et al. (2012)
5. <i>L. lactis</i> VE17190, Pil ^{ΔB}	<i>ΔpilB, pilA:srtC:pilC</i>	Oxaran et al. (2012)
6. <i>L. lactis</i> VE17191, Pil ^{SrtC*}	<i>ΔsrtC, pilA:pilB:pilC</i>	Oxaran et al. (2012)
7. <i>L. lactis</i> VE17176, <i>ΔsrtA psrtA</i> , Pil ⁺⁺	<i>ΔsrtA psrtA pilA : pilB : srtC : pilC, psrtA</i> (pIL2608 : <i>srtA</i>)	Oxaran et al. (2012), Dieye et al. (2010)

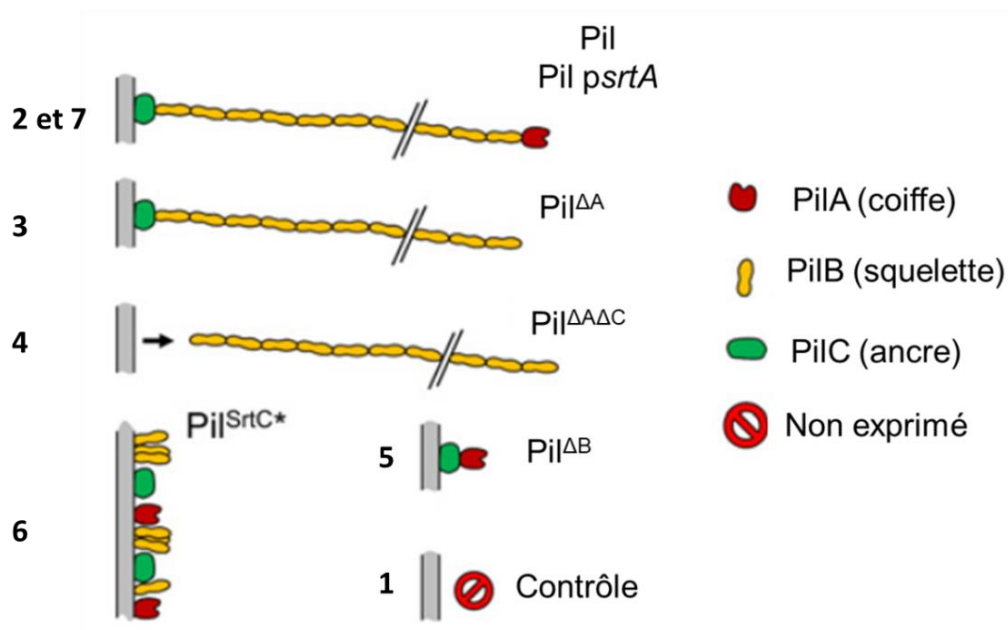


Figure 11 : Représentation schématique de la topologie d'un pilus et des sous-unités dans les différentes souches de la collection de mutants décrits dans la Table 1 (Castelain et al. 2016a). (2 et 7) souches produisant ou surproduisant des pili, (3) souches ayant des pili dépourvus de coiffe (sans piline A) ou sans leur ancre (4) ou leurs pilines majeurs (5). (6) et (1) sont respectivement les souches dont les gènes qui codent de la sortase C sont inhibés et l'opéron *pil* non exprimé.

2.4.4. Biogénèse des pili chez *L. lactis subsp. lactis* TIL448

L. lactis subsp. lactis TIL448 est un isolat naturel d'origine végétale reporté par Meyrand et al. (2013) qui exprime un phénotype de forte adhésion. Cette souche possède dans son génome un cluster de gènes plasmidiques. Ce cluster de gènes code quatre protéines putatives, dont une piline majeure (YhgE2), une sortase de classe C (SrtC) impliquée dans la polymérisation de la piline majeure, une piline mineure d'ancrage (YhgB2) et une piline située à la pointe du pilus (YhgD2). Par analyse et comparaison de séquences protéiques, une similarité de 28 % de la piline majeure YhgE2 avec son homologue PilB ou YhgE identifiées dans la séquence chromosomique de *L. lactis* IL1403 (Oxaran et al. 2012) a été observée. En revanche, la piline YhgD2 n'a pas d'homologue dans le chromosome de IL1403 ou dans d'autres séquences connues du génome de *L. lactis*. La séquence complète du génome de TIL448 n'est pas disponible dans les bases de données génomiques, mais l'identification des différents peptides a été faite par comparaison avec une base de données comprenant toutes les séquences déduites des séquences partielles d'ADN des plasmides de TIL448. Dans cette

approche protéomique, d'autres types de protéines à la surface de TIL448 ont été identifiées en plus des pili et sont aussi portées par des plasmides : ce sont des protéines à domaines Mub (Mub : mucus binding protéines) qui ont une forte affinité avec les protéines de la muqueuse intestinale (mucines) (Juge 2012; Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013). Ces protéines Mub sont des adhésines de surface qui possèdent dans leur chaîne peptidique un peptide signal typique LPxTG situé à la partie C-terminale. Elles contiennent de multiples domaines Mub (environ 200 résidus) et/ou des domaines MucBP (Pfam PF06458, d'environ 50 résidus) (Boekhorst et al. 2006; Kankainen et al. 2009; Juge 2012).

Les protéines à domaines Mub sont présentes principalement dans les bactéries lactiques et sont très abondantes dans les *Lactobacilles* du microbiote intestinal (Boekhorst et al. 2006). Chez *L. lactis*, les souches de laboratoire sans plasmide, telles que la IL1403 et la MG1363, présentent une seule protéine Mub avec quatre domaines mais sont dépourvues de séquence signal dans leur chromosome. Ces souches ne présentent pas de propriétés muco-adhésives (Radziwill-Bienkowska et al. 2017), suggérant que la protéine à domaines Mub n'est pas exprimée ou non fonctionnelle.

En résumé, chez la souche environnementale TIL448, les pili sont naturellement exprimés et présents à sa surface. D'autres protéines de surface sont exprimées, les protéines à domaines Mub, ce qui lui confère un phénotype d'adhésion important. Pour analyser le rôle de ces deux types de protéines dans l'adhésion cellulaire, deux études ont été récemment réalisées sur ses différents mutants (**Table 2**) (Juge 2012; Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013).

Table 2 : *L. lactis* TIL448 et ses dérivés

Désignation des souches	Caractéristiques	Références
TIL448	<i>L. lactis subsp. lactis</i> NCDO2110, isolé à partir du petit pois (végétal).	Collection INRA (Juge 2012; Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013)
TIL1230	Dérivé de TIL448 obtenu après délétion des plasmides.	(Juge 2012; Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013)
TIL1289	Ery ^R ; mutation de TIL448 par la délétion du gène <i>yhgE2</i> codant pour la piline principale.	(Juge 2012; Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013)
TIL1290	Ery ^R ; mutation de TIL448 par l'inhibition du gène <i>muc</i> codant la protéine Mub, avec l'utilisation du plasmide thermosensible pGhost 9.	(Juge 2012; Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013)
TIL1295	Ery ^R ; souche témoin TIL448 contenant le plasmide vide pGKV259.	(Juge 2012; Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013)

2.5. Rôle des pili de *L. lactis* et de ses sous-unités

La collection de mutants issus de la souche sauvage *L. lactis subsp. lactis* IL1403 a fait l'objet d'études au laboratoire de l'Institut Micalis de l'INRAE et dans l'équipe TIM, EAD7 de TBI. Les objectifs étaient variés : (i) caractériser les propriétés des pili produits par ces différentes souches et (ii) mettre en lumière leur rôle et ceux de leurs sous-unités dans les mécanismes d'adhésion à des supports ou entre cellules.

2.5.1. Caractéristiques nanomécaniques d'un pilus analysé par pince optique

Pour la première fois, le piégeage optique et la manipulation de virus et de bactéries comme *E. coli* par un rayonnement laser ont été démontrés par Ashkin et Dziedzic (1987). Cette technique expérimentale innovante appelée « pince optique » a révolutionné le domaine des sciences biophysiques. Elle est aujourd'hui largement utilisée pour étudier les propriétés nanomécaniques de la membrane des microorganismes ou des protéines à leur surface, en particulier les pili. Récemment, des travaux ont été menés pour étudier les caractéristiques du pilus de *L. lactis* et de ses sous unités (Castelain et al. 2016a). Expérimentalement, cela a consisté à utiliser deux microbilles de latex, l'une de 10 μm , immobile, sur laquelle est fixée une bactérie, et l'autre plus petite de 1 μm est piégée par le faisceau laser de la pince optique (Fig. 12). Les microbilles sont ensuite rapprochées puis écartées l'une de l'autre en déplaçant latéralement la platine du microscope où est déposée la bille de 10 μm portant la bactérie. Lorsque les deux billes s'éloignent, la force optique appliquée sur la bille de 1 μm peut atteindre 200 pN. Cette force traduit la résistance du ou des pili à l'étirement. Chaque cycle d'extension/rétraction permet d'observer le détachement d'un ou de plusieurs pili de la bille piégée. La flexibilité mécanique des pili peut être évaluée par leur longueur de persistance (L_p). C'est l'un des paramètres du modèle physique, Worm Like-Chain (WLC), couramment utilisé pour décrire la réponse de l'extension des polymères linéaires induite par une force mécanique (Bustamante et al. 1994). Ces expériences ont permis ainsi de déterminer la L_p du pilus de l'ordre de 2.7 nm. Cette valeur inférieure à la longueur de la PilB qui est environ 10 nm, traduit une flexibilité importante du pilus. Concernant ses sous-unités, les souches Pil^{ΔB} et Pil^{SrtC*} qui ne possèdent pas dans leur génome les gènes codant respectivement pour la PilB et la SrtC, s'avèrent incapables de produire des pili fonctionnels à leur surface. En effet, aucun processus d'élongation n'a été observé pour ces souches. Cela a confirmé le rôle clé de la SrtC et de la PilB dans la formation d'un pilus fonctionnel. Les mêmes résultats ont été obtenus chez la souche contrôle Pil⁻ et chez la souche Pil^{ΔΔC} qui produisent des pili mais qui ne sont pas ancrés dans la paroi cellulaire. En revanche l'absence de PilA (coiffe du pilus)

chez la souche Pil^{ΔA}, n'a pas affecté de manière substantielle les propriétés biomécaniques du pilus, indiquant que la coiffe PilA ne jouerait pas de rôle dans l'ultrastructure et la nonomécanique du pilus.

Ces résultats relatifs aux propriétés nanomécaniques des pili et de leurs sous-unités permettent de mieux analyser leur rôle dans l'adhésion de *L. lactis* sur différentes surfaces telles que la mucine (Meyrand et al. 2013) et le polystyrène (Castelain et al. 2016b).

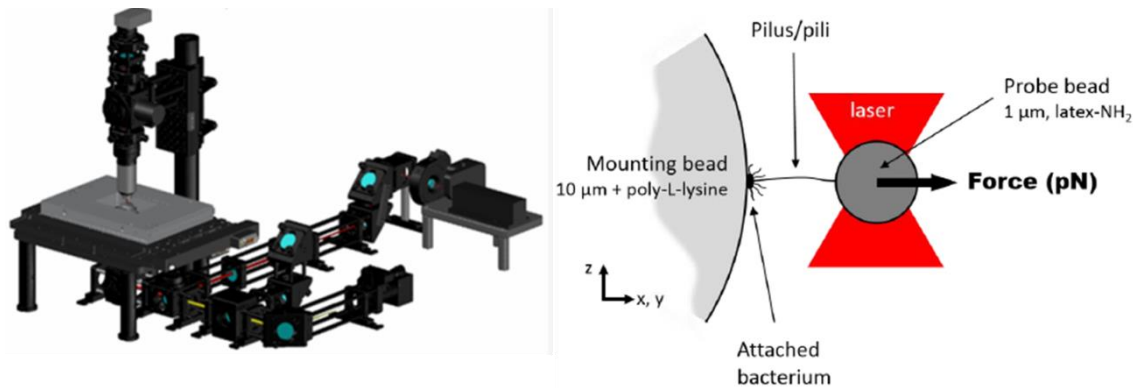


Figure 12 : Dispositif de la pince optique et configuration expérimentale pour l'étude des pili de *L. lactis* à l'échelle de la molécule unique (Castelain et al. 2016a).

2.5.2. Propriétés adhésives des pili à l'échelle de la cellule

Ces dernières années, les techniques les plus couramment utilisées pour étudier l'adhésion des cellules sur des surfaces biotiques ou abiotiques sont essentiellement la chambre à écoulement cisailé (CEC) et la microscopie à force atomique (AFM).

2.5.2.1. Etude de l'adhésion bactérienne en Chambre à écoulement

La CEC est un dispositif reposant sur la mise en œuvre d'un écoulement rampant et laminaire d'un fluide dans un canal rectangulaire de faible section. La contrainte de cisaillement à la paroi τ_p y est parfaitement contrôlée. Ce dispositif inspiré de l'étude d'Elzo et al. (1996) est composé de plusieurs éléments superposés, décrits dans la **Fig. 13** :

- ✓ Une plaque inférieure en acier, qui constitue le support du dispositif, est fixée à la platine du microscope.
- ✓ Une plaque en acier inoxydable, dans laquelle sont percés les orifices et les canaux horizontaux d'entrée et de sortie du fluide. Cette plaque comporte un canal

d'écoulement et un logement dans lequel est inséré le coupon de matériau support à étudier (polystyrène ou acier inoxydable ou en verre). Le canal d'écoulement a une largeur de 12.5 mm et une profondeur de 200 μm , il est recouvert d'une lame de verre.

- ✓ Un joint en silicone assure l'étanchéité de la chambre.
- ✓ Une plaque supérieure en acier inoxydable est percée d'une fenêtre d'observation.
- ✓ Un microscope optique muni d'une caméra permet d'observer l'échantillon biologique dans une zone fixe.

La géométrie de la chambre ainsi constituée permet d'obtenir une contrainte de cisaillement pariétale uniforme dans la zone d'observation. Elle est calculée par la relation suivante :

$$(1) \quad \tau_p = 3/4 \times (\mu Q / 4h^2l)$$

où : τ_p est la contrainte de cisaillement pariétale (Pa), Q , μ , h et l sont respectivement, le débit du fluide (m^3/s), la viscosité dynamique du fluide (Pa.s), la demi hauteur (m) et la demi largeur du canal (m).

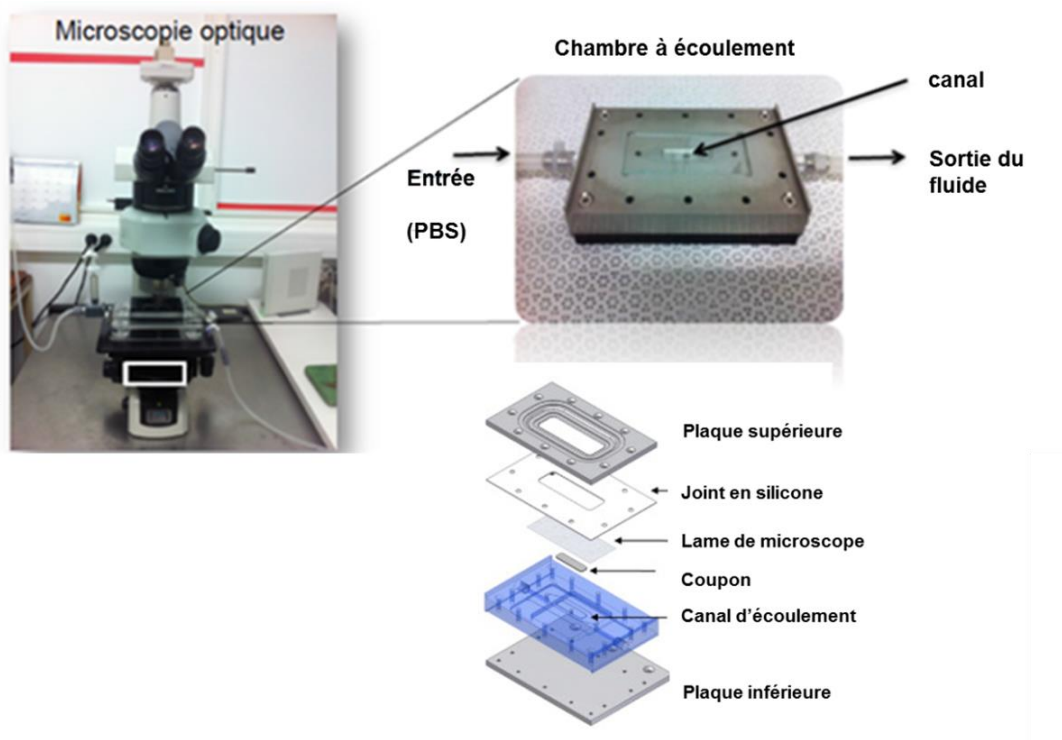


Figure 13 : Dispositif expérimental de la CEC (Guillemot et al. 2006; Castelain et al. 2016b).

Ce dispositif expérimental a permis d'analyser les interactions de particules de différentes natures avec diverses surfaces en conditions hydrodynamiques contrôlées (Lorthois et al. 2001). Plusieurs auteurs ont ainsi caractérisé les propriétés adhésives de la surface des microorganismes (bactéries, levures, cellules eucaryotes) sur des matériaux particuliers en suivant les profils de détachement induits par un cisaillement pariétal.

Ce dispositif expérimental a par exemple permis d'étudier l'influence relative des propriétés de surface des levures *Saccharomyces cerevisiae* adhérant à différents supports solides tels que le polystyrène, l'acier inoxydable ou le métal (Guillemot et al. 2006) ou caractériser les propriétés antiadhésives de l'argent sur *E. coli* (Mercier-Bonin et al. 2012). Dans ces études, l'adhésion est quantifiée par le paramètre $\tau_{p\ 50\%}$ défini comme étant la contrainte pariétale de cisaillement nécessaire pour détacher 50 % des cellules initialement adhérentes à la surface du support solide. Ce dispositif a permis également d'évaluer les propriétés d'adhésion de certaines bactéries probiotiques sur des supports divers en conditions hydrodynamiques contrôlées.

Dans le cas des lactobacillus, en particulier LGG, les propriétés adhésives des pili de *L. lactis subsp lactis* ont été évaluées sur des surfaces abiotiques et biotiques mais études restent peu nombreuses. Un des rares travaux publiés démontre l'implication à la fois des pili et de ses sous-unités dans l'adhésion de *L. lactis subsp lactis* IL1403 (Castelain et al. 2016b), indépendamment des caractéristiques de surface (surface hydrophobe/hydrophile, charge positive/négative, présence ou non de sites de liaison spécifiques). L'analyse des profils de détachement des souches de mutants décrites dans la **Table1** soumise à un écoulement (**Fig.14**) ont montré que seules les souches Pil^+ et $Pil^{\Delta A}$ résistent jusqu'à une contrainte pariétale supérieure à 80 Pa. Les souches $Pil^{\Delta B}$, Pil^{SrtC*} et $Pil^{\Delta A\Delta C}$ présentent le même profil de détachement que la souche contrôle Pil^- correspondant à une contrainte pariétale $\tau_{p\ 50\%}$ inférieure à 5 Pa. Ces résultats montrent que la sous-unité majeure, PilB, la protéine d'ancrage PilC et la SrtC sont indispensables à l'adhésion des bactéries et permettent son maintien à la surface du support en conditions d'écoulement. En revanche, la coiffe du pilus, PilA, ne semble pas être impliquée dans l'adhésion des cellules de *L. lactis* (Castelain et al. 2016b). Ce résultat diffère des observations réalisées pour les pili de LGG et de *Streptococcus* (mode d'action décrit dans la **Fig. 7**) où la piline mineure située à la pointe et autour du pilus, joue un rôle dans l'attachement ainsi que dans la colonisation des cellules hôtes (Tripathi et al. 2013).

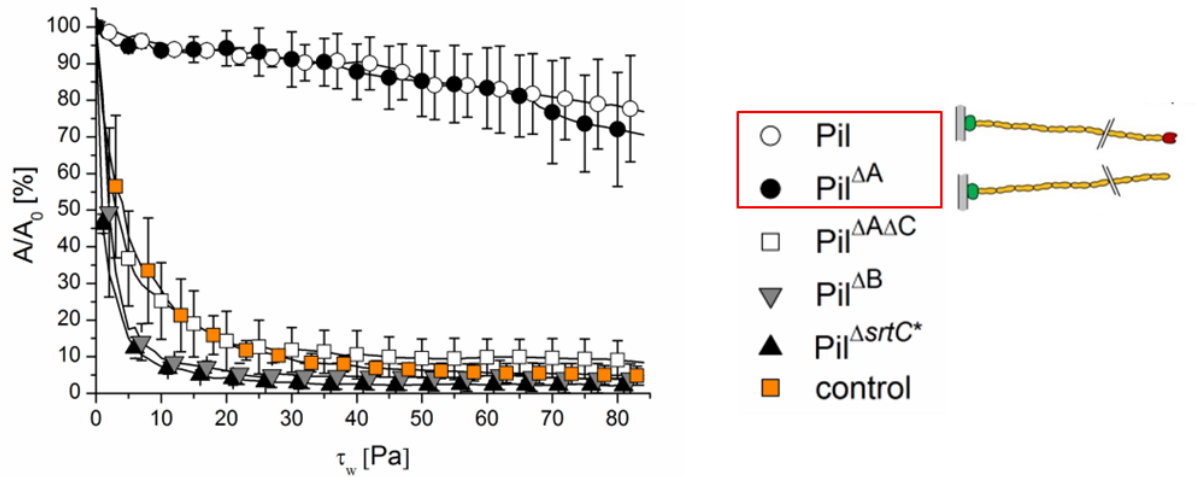


Figure 14 : Profil de détachement des différentes souches de *L. lactis* sous contrainte en chambre à écoulement cisailé (Castelain et al. 2016b) représentant le pourcentage de bactéries restant adhérentes au polystyrène en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée ($\tau_{p50\%}$ en Pa). La détermination de la contrainte repose sur la comparaison des ratios A/A_0 (avec A le nombre de bactéries adhérentes après application de la contrainte de cisaillement pariétale et A_0 le nombre de bactéries initialement adhérentes sur le polystyrène).

Par ailleurs, chez d'autres souches de *L. lactis* comme l'isolat TIL448 décrit plus haut, le rôle des protéines de surface, pili et protéines à domaines Mub dans l'adhésion à des surfaces biotiques a été récemment étudié *in vitro* en CEC (Lee et al. 2013). Dans ces travaux, des cellules initialement immobilisées sur une surface revêtue de mucines gastriques de porc, ont été soumises à différentes contraintes de cisaillement. Chez la souche sauvage TIL448, 80 % de bactéries initialement adhérentes, ont résisté fortement à des contraintes de cisaillement supérieures à 80 Pa. Le mutant défectueux uniquement du gène codant pour les pilines s'est peu détaché, alors que celui exprimant uniquement les pili, et non des protéines à domaines Mub, s'est fortement détaché. Cela indique que les protéines à domaines Mub adhèrent plus fortement sur les mucines que les pili. Ces deux protéines de surface, exprimées naturellement chez TIL448, présentent une affinité de liaison entre les motifs LPxTG et les sucres présents sur la muqueuse intestinale (Meyrand et al. 2013). Ces résultats sur le rôle des pili et des protéines à domaines Mub dans l'adhésion de *L. lactis* sur les surfaces biotiques et abiotiques ont été confirmés par AFM en spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique (SCFS, en anglais : Single-Cell Force Spectroscopy), technique souvent combinée à la CEC.

2.5.2.2. Etude des mécanismes d'adhésion par microscopie à force atomique

Dans cette partie, nous nous limiterons uniquement à l'application de l'AFM à l'échelle de la cellule. Une brève description de l'historique et du principe d'utilisation de l'AFM seront développés ci-après.

Depuis son invention dans les années 1981 par Christoph Gerber et Hans Peter Lang (Binnig et al. 1986), l'AFM a constitué une révolution considérable dans le domaine des nanosciences et des nanotechnologies. Cet outil de biophysique permet non-seulement d'étudier la morphologie et les propriétés mécaniques des surfaces inertes ou biologiques mais a aussi apporté une contribution notable à l'analyse des caractéristiques des enveloppes des micro-organismes vivants en conditions physiologiques (température, pH, composition chimique du milieu...) (Dorobantu et Gray 2010) en particulier leurs propriétés adhésives. Cependant, une des conditions préalables pour pouvoir réaliser des analyses en AFM est d'immobiliser des microorganismes. La fixation des cellules sur un substrat solide et/ou sur une pointe d'AFM, peut être faite chimiquement. Les produits qui sont souvent utilisés pour les bactéries sont la polydopamine (Beaussart et al. 2013) et la polyéthylénimine (PEI) (Dague et al. 2010).

La « single-cell force spectroscopy » (SCFS) a été mise à profit ces dernières années pour quantifier les forces d'adhésion entre une cellule bactérienne, préalablement accrochée sur un microlevier et des surfaces (Dague et al. 2010; Beaussart et al. 2013; Formosa-Dague et al. 2016). La capacité d'adhésion de bactéries pathogènes a ainsi pu être mesurée. Par exemple dans le cas de *Staphylococcus aureus* sur des cornéocytes humains une force d'interaction de l'ordre de 500 pN a été obtenue et a été attribuée à de multiples liaisons spécifiques entre des adhésines présentes à la surface de la cellule bactérienne et les ligands cibles à la surface des cornéocytes (Formosa-Dague et al. 2016). L'AFM a également permis d'analyser chez LGG le rôle des pili dans l'adhésion sur les mucines et le collagène mais aussi dans l'adhésion homophile (bactérie-bactérie) (Tripathi et al. 2013). Une stratégie originale basée sur l'immobilisation de lactocoques (*L. lactis*) sur une pointe AFM fonctionnalisée, a été proposée par Dague et al. (2010) pour quantifier des interactions entre des cellules de *L. lactis* et du polystyrène vierge ou recouvert de mucines gastriques de porc (PGM). Les forces d'adhésion de cette bactérie sur les surfaces qui ont été ainsi déterminées sont $0,74 \pm 0,10$ nN sur le polystyrène et $0,12 \pm 0,06$ nN sur le PGM, ont confirmé le

comportement adhésif des souches piliées sur une surface hydrophobe comme le polystyrène et ont mis en évidence l'existence d'interactions non spécifiques et spécifiques (liaison ligand/récepteur) des pili avec les surfaces.

Les caractéristiques des interactions, via les pili, entre *L. lactis* et les protéines de la muqueuse intestinale ont été analysées dans les travaux de Le et al. (2013). En combinant la CEC et l'AFM à l'échelle de la cellule, il a été montré que *L. lactis* subsp *lactis*, en particulier TIL448, adhère fortement aux mucines gastriques. En effet, les bactéries résistent à une contrainte de cisaillement de plus de 80 pN (action tangentielle à la surface) et les forces d'adhésion sont supérieures à 200 pN (action normale à la surface). Cette étude a permis d'attribuer un phénotype muco-adhésif à la souche TIL448, qui apparaît corrélé aux deux types de protéines de surfaces qu'elle exprime, les protéines à domaines Mub (reconnaissant les mucines) et les pili. Dans cette étude, les interactions mesurées entre les lactocoques et la surface PGM ont été plus fortes avec la souche exprimant les protéines à domaines Mub qu'avec la souche exprimant uniquement les pili. Ce résultat est cohérent avec les observations de Meyrand et al. (2013) qui montrent que *L. lactis* TIL448 est capable d'interagir fortement avec les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 (Meyrand et al. 2013).

A ce jour, les études au niveau moléculaire et cellulaire sont restées limitées au rôle des protéines de surface de *L. lactis* dans l'adhésion à des surfaces abiotiques (polystyrène) et biotiques/biologiques (mucines, cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2). En revanche les interactions homotypiques c'est-à-dire les interactions entre bactéries provenant de la même souche (pili à pili) chez *L. lactis* restent à étudier. La connaissance des mécanismes élémentaires impliqués dans l'adhésion initiale sur des surfaces puis l'auto-agrégation des cellules permettrait d'apporter une nouvelle brique dans la compréhension de la structuration et des caractéristiques d'un biofilm.

2.5.3. Etude du rôle des pili à l'échelle du biofilm

Le rôle des pili bactériens dans l'adhésion initiale et la formation des biofilms a été documenté chez plusieurs espèces pathogènes (Costerton et al. 1987; Watnick et Kolter 2000). La prolifération des bactéries sous forme de biofilms, facilite la colonisation de l'hôte, la communication entre les cellules (Maurice et al. 2018) et contribue par une expression différentielle de gènes à leur protection contre l'action des antibiotiques (Whiteley et al. 2001). Par conséquent, les pili qui sont impliqués dans le développement du biofilm, sont

aussi susceptibles de jouer un rôle important dans l'évolution d'une infection causée par les agents pathogènes. Par exemple, chez des souches d'*E. coli*, les pili de type I via l'adhésine FimH, influencent fortement la formation des biofilms *in vitro* sur des surfaces plastiques, que ce soit dans des conditions de culture statique ou en présence d'un écoulement (Pratt et Kolter 1998; Schembri et Klemm 2001). Il a été également démontré que des souches de *P. aeruginosa* dépourvues de pili de type IV perdaient leurs capacités de motilité et d'adhésion sur du polystyrène et réduisaient ainsi leur aptitude à former des couches de microcolonies qui pourraient donc s'apparenter à des biofilms (O'Toole et Kolter 1998). Des observations et conclusions similaires ont été faites chez *Vibrio cholerae* (Watnick et Kolter 2000).

En plus de leur rôle clé dans l'adhésion cellulaire, les pili interviennent également dans la structuration des biofilms. Par exemple, *P. aeruginosa* est capable de former des structures spatiales particulières grâce à la présence des pili de type IV à sa surface (O'Toole et Kolter 1998). Ces pili jouent un rôle dans l'agrégation cellulaire, la formation de microcolonies et la différenciation des biofilms. Dans d'autres travaux, il a été montré que les pili de type IV étaient également impliqués dans la formation de biofilms hétérogènes comportant des structures multicellulaires en forme de champignon (Klausen et al. 2003b; Barken et al. 2008).

Chez les bactéries à Gram-positif pathogènes, les pili jouent également un rôle majeur dans les interactions hôte-pathogène et dans la colonisation éventuelle des tissus (Goh et al. 2017). Ce rôle de médiateur a été démontré chez *Corynebacterium diphtheriae* dont les pili favorisent l'adhésion sur des cellules épithéliales du larynx et des poumons (Mandlik et al. 2008). Deux autres études ont souligné l'importance des pili dans la formation des biofilms et la persistance de l'infection chez d'autres pathogènes à Gram positif, *Enterococcus faecalis* (Nallapareddy et al. 2006), ou *Streptococcus pyogenes* (Manetti et al. 2007). Ces travaux ont mis en lumière le rôle essentiel de la piline majeure (principal constituant du corps du pilus) dans l'adhérence aux cellules hôtes et le développement du biofilm au cours de l'infection. Par exemple *Streptococcus pyogenes* forme des agrégats en culture liquide, adhère fortement aux cellules épithéliales humaines, constitue des microcolonies et donne lieu à un biofilm mature structuré (Manetti et al. 2007).

De rares études se sont intéressées au rôle des pili dans la formation de biofilms chez les bactéries à Gram positif non-pathogènes. Chez les bactéries lactiques en particulier *L. lactis*, le rôle des pili sur l'architecture du biofilm a été récemment démontré par Oxaran et al.

(2012) (**Fig. 15**). Des expériences ont été réalisées avec une collection de mutants issue de la souche de laboratoire IL1403 (**Table 1**). Pour la souche dépourvue de pili (Pil^-), le biofilm obtenu est compact et uniforme, par contre, lorsque que la souche exprime à sa surface, des pili (Pil^+), le biofilm apparait fortement réticulé, rugueux et comporte des agrégats de cellules qui se répartissent de façon hétérogène. Ce biofilm Pil^+ dont l'apparence est aérienne, est plus épais que celui de la souche contrôle Pil^- (85 μm contre 45 μm). Dans ces mêmes travaux, il a été démontré que la délétion des gènes qui codent pour la piline majeure YhgE (ou PilB) et la SrtC respectivement, conduit à la même structure que celle observée chez la souche contrôle Pil^- . Par contre, chez la souche dépourvue du gène qui code pour la piline YhgD (PilA), le biofilm garde la même architecture que dans le cas de la souche Pil^+ . Ces résultats montrent que la piline majeure PilB et la SrtC sont déterminantes pour l'architecture du biofilm. En revanche, la coiffe du pilus, PilA, ne semble jouer aucun rôle dans la morphologie du biofilm. Par ailleurs, en milieu liquide, des phénotypes d'auto-agrégation sont observés pour les cellules de *L. lactis* qui portent des pili à leur surface (Oxaran et al. 2012).

Ces conclusions majeures sur le rôle des pili de *L. lactis* dans l'architecture du biofilm (hétérogénéité, structure aérienne, rugosité, agrégation) méritent d'être approfondies et confirmées, en particulier en utilisant d'autres souches de *L. lactis* d'origines différentes.

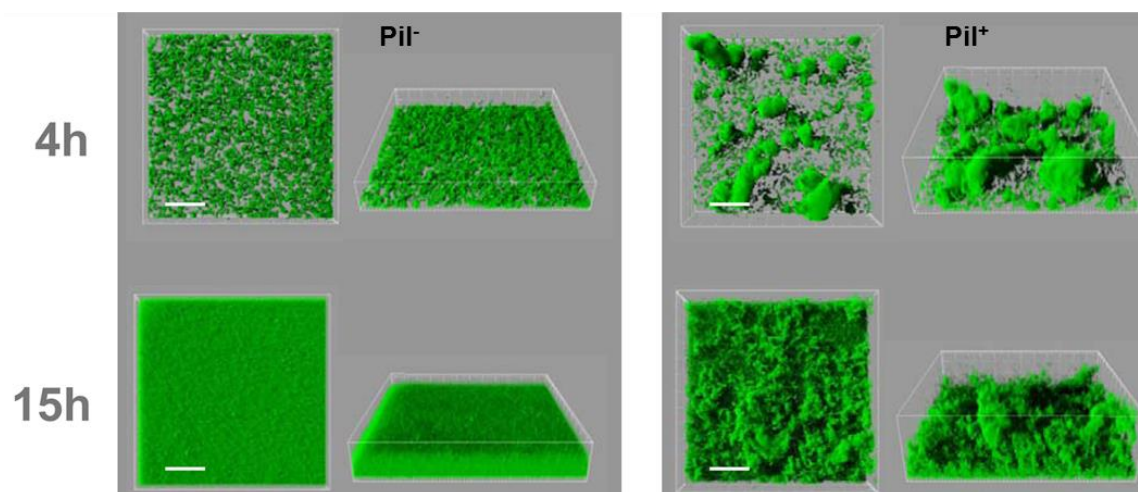


Figure 15 : Structure tridimensionnelle des biofilms de 2 souches de *L. lactis* obtenues à partir d'images observées au microscope confocal à balayage laser (MCBL). Les biofilms ont été obtenus après 4h et 15h de culture en microplaque à 30 °C en conditions statiques. La souche contrôle IL1403, dépourvue de pili, Pil⁻, et la souche mutante *L. lactis* produisant des pili, Pil⁺ ou ILpPil (Oxaran et al. 2012), échelle = 50 µm.

2.6. Les techniques d'observation et d'analyse des biofilms

Les biofilms sont des structures complexes pour lesquelles les mécanismes organisationnels ne sont que partiellement connus. L'essor des techniques d'observation et d'analyse a permis ces dernières années de mieux comprendre les processus de développement et l'organisation des biofilms. La microscopie électronique à transmission (MET) et la microscopie électronique à balayage (MEB) qui sont souvent utilisées, fournissent des images à haute résolution, mais présentent des limites liées à la pénétration dans l'échantillon. Elles nécessitent en outre des préparations spécifiques, en particulier la déshydratation de l'échantillon, qui peuvent altérer la structure du biofilm. De nouvelles méthodologies ont été récemment développées ou adaptées afin d'approfondir les connaissances sur l'organisation et la composition des biofilms, ainsi qu'étudier la viabilité et la physiologie des microorganismes qui les constituent. Parmi ces techniques, la microscopie à fluorescence, la microscopie confocale à balayage laser (MCBL ou CLSM en anglais : pour confocal laser scanning microscope) et l'AFM, technique innovante qui permet d'observer et d'analyser certaines caractéristiques morphologiques du biofilm mais aussi d'étudier ses propriétés mécaniques.

2.6.1. Microscopie à fluorescence

En microscopie optique traditionnelle, depuis le XVII^{ème} siècle, l'observation se faisait en utilisant la lumière blanche (Dunst et Tomancak 2019). L'ère de la microscopie optique à fluorescence a commencé en 1852 avec les travaux de Stokes (Stokes 1853; Ceredig 2020), qui montre que les substances organiques et inorganiques, telles que la chlorophylle et les vitamines, sont capables d'absorber la lumière et d'émettre des photons à une longueur d'onde plus élevée. Ce phénomène est appelé la "fluorescence". Les premiers microscopes à fluorescence furent construits par August Köhler (en 1904), Carl Reichert et Oskar Heimstädt (en 1911), et Carl Zeiss et Heinrich Lehmann (en 1913) (Dunst et Tomancak 2019). La microscopie à fluorescence a connu de nombreux développements et est utilisée aujourd'hui dans tous les domaines des Sciences de la Vie (Dunst et Tomancak 2019). Aux premiers temps de son invention, les chercheurs se limitaient aux échantillons auto-fluorescents. Dans les années 1930 Max Haitinger a introduit l'utilisation de colorants fluorescents pour marquer les tissus étendant aussi son champ d'application. Plus tard, la mise au point d'anticorps couplés à des marqueurs fluorescents a permis de détecter des antigènes spécifiques dans les tissus. La découverte de la protéine fluorescente verte GFP (en anglais : green fluorescent protein) chez la méduse *Aequorea victoria* par Osamu Shimomura en 1962 (Shimomura et al. 1988; Lukyanov et al. 2005) a permis, par l'introduction du gène correspondant dans de nombreux organismes modèles, de supprimer l'étape de marquage. Cependant, l'utilisation de tels organismes génétiquement modifiés (OGM) posant différentes contraintes expérimentales et réglementaires, le marquage par des fluorophores reste encore majoritairement utilisé. Ainsi, pour l'observation d'une population bactérienne, telle qu'un biofilm, de nombreux fluorophores sont disponibles. Parmi les plus utilisés le Syto-9 et l'iodure de propidium (LIVE/DEAD BacLight) permettent de caractériser la viabilité des cellules.

2.6.2. Microscopie confocale à balayage laser

2.6.2.1. Définition et historique

La microscopie confocale repose sur l'utilisation d'un microscope optique à fluorescence qui a la capacité de réaliser des images à haute résolution avec de très faible profondeur de champs (sections optiques). Le principe « confocal » proposé en 1957 par Marvin Minsky permet d'obtenir une coupe optique nette correspondant au plan focal en éliminant la fluorescence provenant de plans adjacents grâce à un « pinhole ». L'acquisition de plans focaux successifs peut être réalisée en déplaçant l'objet en z. Peu après, la microscopie confocale à balayage laser a été développée en 1967 par Egger et Petran qui ont

permis d'obtenir une image 3D d'un échantillon par section optique. Les microscopes confocaux commercialisés dès 1984 (modèle SOM-100 de Biorad) ont été régulièrement perfectionnés avec en particulier en 1986 un balayage par faisceau lumineux combiné à un microscope fluorescent (Zhang et Lunter 2018).

2.6.2.2. Dispositif

La MCBL est constituée d'une source lumineuse (un laser) et d'un détecteur qui sont focalisés simultanément en un même point de l'échantillon biologique par des diaphragmes afin d'éliminer la lumière provenant de coupes optiques supérieures et inférieures. Grâce à un mécanisme de balayage optique du faisceau laser, l'échantillon est éclairé, balayé et scruté point par point et de façon successive sur différents plans.

2.6.2.3. Application

Dans le but d'améliorer le pouvoir discriminatoire optique à travers l'épaisseur d'un échantillon transparent, la MCBL est devenue aujourd'hui une des techniques de microscopie les plus utilisées en biologie et en sciences des matériaux. En biologie, elle permet d'observer de façon non destructive des échantillons pour réaliser des études *in situ*, en particulier des flocs bactériens ou des biofilms. C'est une des méthodes de choix pour étudier les interfaces des biofilms et acquérir des données tridimensionnelles sur leur structure (reconstruction 3D) en fonction du temps (Mueller et al. 2006). Elle est souvent utilisée pour évaluer l'effet d'un traitement sur la viabilité de bactéries (marquées par un fluorochrome) ou sur l'élimination des biofilms. L'acquisition des images, le traitement et l'analyse de ces données (images des plans) donnent accès aux différents paramètres de l'échantillon (épaisseur, répartition spatiale...).

Cependant, si la MCBL fournit des informations sur la concentration et la distribution spatiale des composants des biofilms, elle montre des limitations dues au photo-dommage ou à une photo-atténuation qui peut avoir lieu dans l'épaisseur de l'échantillon (Azeredo et al. 2017).

D'autres techniques comme l'imagerie AFM ont été proposées de manière complémentaire à la MCBL afin d'étudier d'autres caractéristiques structurales de surface telles que la rugosité et la topographie du biofilm ainsi que des propriétés nanomécaniques.

2.6.3. Investigations des biofilms par AFM

2.6.3.1. Historique et principes de fonctionnement

L'invention du microscope à effet de tunnel (STM en anglais : scanning tunneling microscope) en mars 1981 par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer (prix Nobel de physique en 1986) a été suivie par l'arrivée de l'AFM cinq ans plus tard (Binnig et al. 1982; Marti et al. 1987; Gerber et Lang 2006). Le STM est un microscope optique en champ proche qui permet d'analyser des surfaces avec une résolution pouvant atteindre la taille des atomes mais qui n'est pas adapté à l'étude des matériaux non conducteurs (systèmes biologiques, polymères) ou amorphe. C'est à partir de ce constat que Christoph Gerber et Hans Peter Lang ont proposé la technique de l'AFM qui est une combinaison d'un STM et d'un profilomètre à pointe en incorporant une sonde. Cette avancée qui a été cruciale pour les nanosciences et les nanotechnologies, a eu ces dernières années un impact considérable dans de nombreux domaines de recherche, en particulier en biophysique.

L'AFM permet d'étudier la morphologie ou les propriétés nanomécaniques et adhésives de micro-organismes vivants dans des conditions physiologiques particulières (Dufrêne 2014; Goss et Volle 2020). Les cellules vivantes doivent être convenablement maintenues afin de résister aux forces latérales exercées par la pointe de balayage et de ne pas se déplacer, mais sans toutefois les endommager. La fixation des échantillons biologiques peut être réalisée de différentes façons, par exemple en utilisant des agents chimiques ou biologiques ; les plus communément utilisés étant la polyéthylèneimine (PEI), la polydopamine ou la concanavaline A. Cependant, certains peuvent générer une interface entre l'échantillon et le support de fixation ou polluer la pointe de l'AFM. D'autres stratégies comme la rétention dans les pores d'une membrane en polycarbonate est utilisée pour des bactéries et des levures (Kasas et Ikai 1995), mais nécessite un temps relativement long car la filtration doit être douce pour éviter d'exposer les cellules à des chocs mécaniques.

De façon générale, l'AFM utilisée en recherche couvre un grand nombre de techniques : l'imagerie en trois dimensions, la nanomécanique ou encore l'AFM à grande vitesse (HS-AFM, pour high-speed atomic force microscopy). Cette dernière permet de visualiser directement des structures et des processus dynamiques des molécules biologiques avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde (s) à moins 100 ms sans perturber leur fonction (Ando et al. 2013). Ainsi, l'AFM permet à la fois de réaliser de l'imagerie pour avoir accès aux dimensions des cellules et des éléments subcellulaires comme les protéines de surface et

d'étudier des propriétés nanomécaniques ainsi que leurs évolutions dynamiques ce qui lui confère un avantage important par rapport aux techniques de microscopie classiques telles que la microscopie électronique (Pillet et al. 2014; Aguayo et al. 2015; Aguayo et Bozec 2016).

Le principe de fonctionnement de base de l'AFM est assez simple (**Fig. 16**). Le dispositif est composé d'une pointe fixée à l'extrémité d'un microlevier flexible pouvant se déplacer dans différentes directions (appelé aussi cantilever). Un faisceau laser dirigé à l'extrémité du microlevier est réfléchi par un miroir. Lorsque le système est à l'équilibre (pas de force externe sur le microlevier), le laser est initialement centré au milieu d'une photodiode qui comporte quatre cadrans. Quand la pointe entre en contact avec l'échantillon, elle provoque la déviation du microlevier et donc du faisceau laser capté par la photodiode. La déviation est corrélée à la déflexion du microlevier. Au contact de la surface de l'échantillon, le microlevier peut s'incurver et déformer la surface de l'échantillon. Lorsque l'étude porte sur les propriétés mécaniques de la surface des échantillons ou la quantification des forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon, il en résulte une courbe de force représentant la relation entre la force et la distance (**Fig. 16**). Cette courbe de force comprend la courbe d'approche (courbe en bleu) qui consiste à un rapprochement lent de la pointe/microlevier vers la surface de l'échantillon jusqu'à ce qu'une force de compression sur la surface soit atteinte. Après un temps de contact déterminé, la sonde est retirée de la surface de l'échantillon et ramenée au point initial, c'est la courbe de retrait (Núñez et al. 2005; Aguayo et Bozec 2016; Aguayo et al. 2016). Les forces d'adhésion qui se produisent entre la pointe et la surface de l'échantillon donnent lieu généralement à des valeurs de forces négatives pendant la phase de rétraction. Cependant, dans le cas des microorganismes, les courbes de rétraction ont tendance à être plus complexes car elles présentent une série d'événements qui peuvent être analysés plus en détail pour caractériser les interactions correspondantes (Müller et al. 2009). En considérant le comportement du microlevier comme celui d'un ressort, la valeur de la force (F) peut être obtenue selon la loi de Hooke :

$$(2) \quad F = - k \times d,$$

où k est la constante de raideur (N/m) du microlevier et d la distance (m) correspondant à la déviation verticale du microlevier (Bolshakova et al. 2004). Les propriétés mécaniques de surface d'un échantillon qui en sont déduites sont décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

Le logiciel fourni avec le dispositif d'AFM convertit les valeurs de déflexion en une image ou en un jet de données qui renseigne les propriétés nanomécaniques, les forces d'adhésion de l'échantillon, etc... .

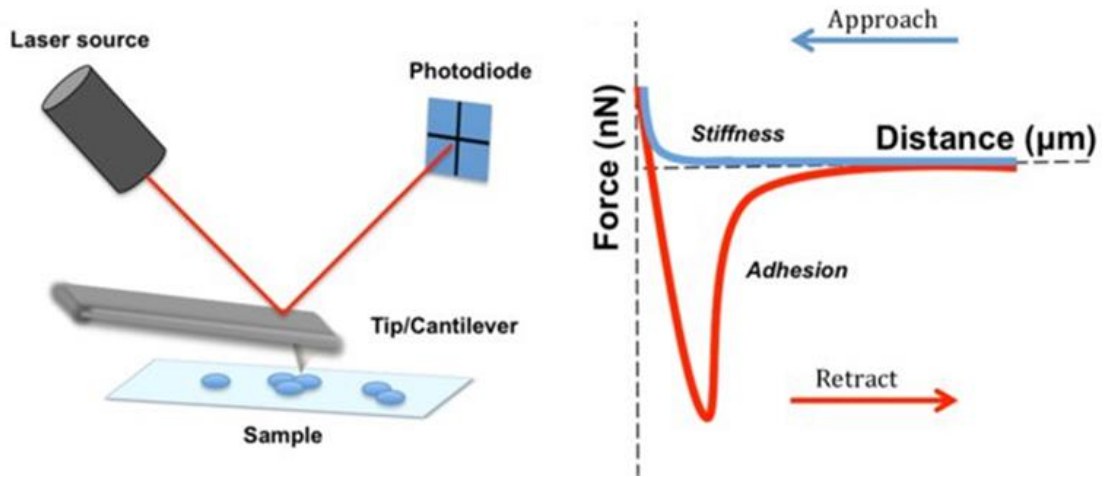


Figure 16 : Principe de fonctionnement de l'AFM (à gauche). Exemple d'une courbe force-distance (à droite) d'après (Aguayo et Bozec 2016). L'échantillon est placé sur un tube piézoélectrique en contact avec la pointe. La pointe est située à l'extrémité du levier. Les données sur la rigidité de l'échantillon sont obtenues à partir de la courbe d'approche (bleue), tandis que les interactions liées à l'adhésion sont indiquées par la courbe de retrait (rouge).

En fonction de la distance entre la pointe et la surface, deux modes de fonctionnement sont à ce jour les plus utilisés :

- ✓ Le mode contact : il est utilisé lorsqu'on impose une déflexion constante et le levier ne subit pas de force extérieure. C'est le mode que nous utiliserons au cours de la thèse.
- ✓ Le mode Tapping : la pointe vient toucher la surface par intermittence. Dans ce mode qui est utilisé pour étudier des polymères, la pointe est excitée par un signal électrique sinusoïdal de pulsation.

Il existe un autre mode rarement utilisé en biologie, appelé mode sans contact, où la pointe/microlevier vibre toujours à la surface de l'échantillon, mais n'est jamais en contact avec l'échantillon. Les forces à longue distance, telles que la force de van der Waals ou les forces électrostatiques, peuvent ainsi être détectées sans risque d'endommager l'échantillon (Deng et al. 2018).

2.6.3.2. Application de l'imagerie AFM à l'échelle de la cellule

L'AFM est notamment une technologie d'imagerie multiparamétrique, multifonctionnelle qui permet de visualiser à haute résolution et de manipuler des échantillons biologiques, des molécules simples aux cellules vivantes (Dufrêne et al. 2017). Elle peut donner une cartographie simultanée des propriétés mécaniques, cinétiques et thermodynamiques de ces échantillons. Ces dernières années, de nombreux protocoles d'imageries AFM (à l'air, en liquide, immobilisation dans des pores de filtre (Turner et al. 2010; Louise Meyer et al. 2010), dans des timbres en polydiméthylsiloxane (PDMS) microstructurés (Dague et al. 2011), sur des couches de polycations (Lvov et al. 1999) etc...) ont été développés et appliqués aux Sciences du Vivant. Ils ont permis d'acquérir des informations structurelles pouvant être quantifiées et cartographiées pour des systèmes biologiques complexes (cellules, macromolécules, ...). En microbiologie notamment, les capacités d'imagerie à haute résolution offertes par l'AFM ont permis d'accéder à la structure et l'ultrastructure de divers types de microorganismes (bactéries, levures...) (Schaer-Zammaretti et Ubbink 2003; Pillet et al. 2014; Dufrêne 2014; Formosa-Dague et al. 2016).

Les cellules vivantes présentent un niveau élevé de complexité structurelle et fonctionnelle. En particulier leurs surfaces, constituées de différentes macromolécules (protéines, lipides, phospholipides, ...), à la fois barrière et lieu d'échange avec le milieu environnant, sont très hétérogènes et dynamiques. En plus des bactéries, des protéines de structure filamenteuse observées à la surface de certaines bactéries, appelées « pili » sont aujourd'hui identifiables grâce à l'imagerie AFM en mode contact (**Fig. 17**) qui apparaît être un outil de choix pour étudier leurs caractéristiques. Les images de hauteur sont obtenues en travaillant à force constante et en ajustant la hauteur de la pointe à chaque instant. Les images de déflexion sont une représentation graphique de la dérivée de la hauteur. Elles sont représentatives des variations de hauteur. Les images de déflexion sont obtenues après une déviation du microlevier au contact de l'échantillon. Cette déviation ou déflexion est proportionnelle à l'intensité de la force d'interaction entre pointe/échantillon. Le faisceau laser est aligné sur le microlevier puis reflété par l'intermédiaire ou non, d'un miroir, sur la photodiode quatre quadrants, permet de mesurer cette déflexion. Les images de déflexion à la différence des images de hauteur ou images topographiques sont plus sensibles aux variations de relief de la surface ce qui permet de mettre en évidence, plus facilement, les caractéristiques morphologiques des bactéries et de leurs pili. Sur les images d'AFM

rapportées dans la **Fig. 17** de bactéries *E. coli* assimilées à des bâtonnets d'environ 3 μm de long et 0,8 μm de diamètre, l'enveloppe cellulaire, de 100 nm à 200 nm d'épaisseur, et les pili dont les longueurs vont de 0,2 à 10 μm pour un diamètre d'environ 10 nm (Francius et al. 2011) sont aussi observées. Dans d'autres études, l'imagerie AFM a permis d'observer des cellules individuelles de *L. lactis* présentant un pôle rugueux avec des striations concentrique séparées par 25 et 50 nm (Andre et al. 2010), ce qui suggèrent que ces structures en anneaux reflètent d'une couche épaisse de peptidoglycane de 25 nm de largeur. Ces structures sont similaires à celles de *Streptococcus agalactiae* (Saar Dover et al. 2015) dont l'épaisseur est d'environ 25 nm, avec une structure filiforme. Les pili ne sont cependant observables que dans l'air (en conditions sèches), du fait de leur mobilité dans un liquide, et sur des surfaces particulières, propres et planes (les pili étant très fines), comme le mica (description dans la section « Matériels et méthodes ») (Doktycz et al. 2003; Touhami et al. 2006). Une immobilisation spécifique des bactéries et des biomolécules, en particulier des pili, sur des surfaces adaptées comme les micas et des conditions environnementales particulières (air et/ou liquide pour les bactéries) sont essentielles pour réaliser leur observation et leur analyse topographique en AFM (**Fig. 17**). Cependant, le séchage des échantillons qui est nécessaire à l'observation des pili et permet d'avoir des images à haute résolution, peut induire un changement de morphologie ou de rugosité par rapport aux échantillons observés en milieu aqueux.

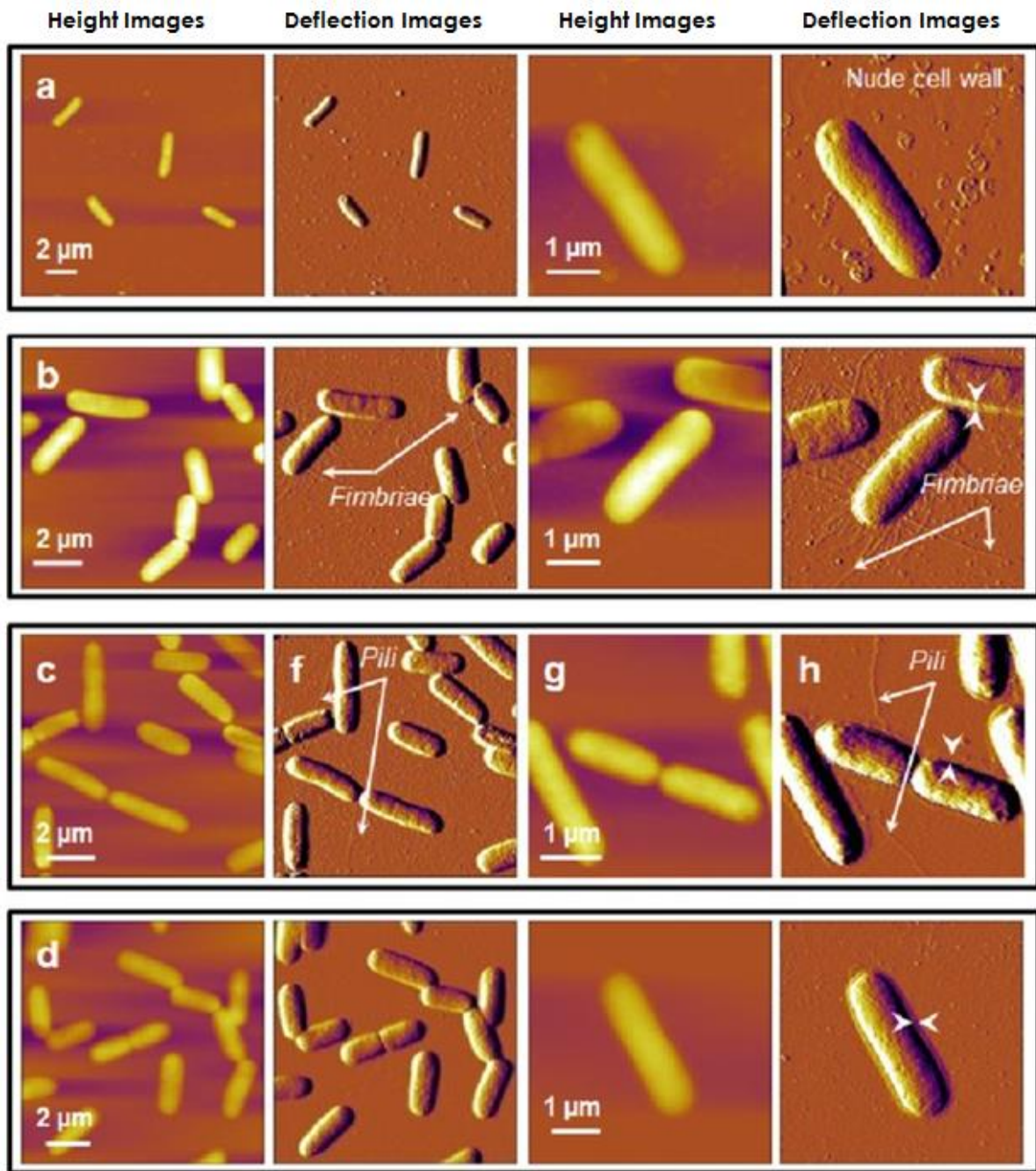


Figure 17 : Morphologie des bactéries observée par l'AFM dans l'air (mode contact), (Francius et al. 2011). Images de hauteur et de déflexion (échelle $z = 200$ nm) de cellules de *E. coli* produisant des pili ou des fimbria de type I et immobilisées sur une surface de verre revêtue de PEI. a) E2152, b) E2146, c) E2302 et d) E2498 sont les différentes souches analysées. Les flèches blanches longues montrent des pili à la surface des cellules et les flèches courtes correspondent à l'épaisseur de la paroi de la bactérie.

2.6.3.3. Imagerie des biofilms bactériens par AFM

L'AFM, selon le mode d'acquisition, permet d'accéder à des analyses physiques (informations topographiques et morphologiques) qui ne peuvent être fournies par d'autres approches d'imagerie à haute résolution telles que la microscopie électronique et la MCBL (Auerbach et al. 2000). Cependant, si au cours des dernières décennies, l'AFM a été largement utilisée pour étudier des cellules isolées, voire des biomolécules à la surface des bactéries, les études à l'échelle du biofilm sont rares et très peu s'intéressent à des biofilms hydratés. L'une des premières études d'imagerie AFM de biofilms hydratés a permis d'observer les structures formées par des bactéries d'eau douce sur des surfaces de cuivre lisses et rugueuses (Bremer et al. 1992). Ces biofilms étaient hétérogènes en profondeur, tant en porosité qu'en distribution cellulaire. D'autres études se sont focalisées sur le développement des biofilms bactériens sur des surfaces en acier (Percival et al. 1998; Beech et al. 2000). Les images à haute résolution ont permis d'accéder à des informations qualitatives et quantitatives sur la topographie de la surface des biofilms hydratés, notamment la répartition des cellules bactériennes recouvertes de leur matrice d'EPS et la formation de régions de corrosion sur le substrat. Ces études ont ouvert la voie à d'autres recherches sur la topographie des biofilms par imagerie AFM (Wright et al. 2010).

Le séchage des biofilms a permis à certains chercheurs d'obtenir des images nettes à haute résolution, mais avec des caractéristiques cependant très différentes de la réalité biologique d'un biofilm en milieu liquide (Méndez-Vilas et al. 2004a; Volle et al. 2008). Par exemple, il a été démontré que les biofilms de *P. putida* dans l'air (biofilm « séché ») changeaient de morphologie, de rugosité ou de force d'adhésion par rapport aux biofilms aqueux (Auerbach et al. 2000). En effet, lors des analyses des biofilms dans l'air l'humidité relative diminue à environ 75 %, niveau bien inférieur à leur humidité en milieu liquide qui est de 98 à 99 %. Ainsi, l'imagerie AFM en milieu aqueux apparaît particulièrement intéressante pour pouvoir apporter des informations pertinentes sur les réelles caractéristiques *in vivo* des biofilms.

2.6.3.4. Mesures de force à l'échelle du biofilm par l'AFM

Les mesures de forces par la spectroscopie à l'échelle de la molécule et de la cellule unique ont été largement développées ces dernières années (Kang et Elimelech 2009; Beaussart et al. 2013; Formosa-Dague et al. 2016; Ozkan et al. 2016). À l'échelle du biofilm, la spectroscopie de force permet de quantifier à l'échelle du nano-Newton (nN), les

interactions entre la pointe et la surface du biofilm (Volle et al. 2008; Oh et al. 2009; James et al. 2016) et d'accéder à ses propriétés nanomécaniques (Roa et al. 2011).

Oh et al. (2007) ont utilisé l'AFM pour étudier l'influence de la concentration en nutriments sur la formation de biofilm d'une souche d'*E.coli* O157:H7. Ces auteurs ont analysé la morphologie des biofilms formés et ont mesuré les forces d'adhésion de cellules bactériennes à la pointe AFM, à différents stades de développement du biofilm. Ils ont ainsi montré que plus le biofilm est mature plus les forces d'adhésion mesurées entre la pointe et la surface du biofilm augmentent. Cette augmentation des forces d'adhésion a été corrélée à la production progressive d'EPS qui s'accumulent à la surface des bactéries. Ces travaux ont ainsi permis de suggérer un rôle important de la production des EPS dans l'adhésion et cohésion des cellules au cours du développement du biofilm (Oh et al. 2007). Cette hypothèse a été confirmée par Papi et al. (2012) qui a démontré que la réduction des forces d'adhésion sur le biofilm d'*Aspergillus fumigatus* était liée à une diminution de la production d'EPS, résultat qui pourrait être utilisé comme un moyen d'améliorer les traitements pharmacologiques (Papi et al. 2012). Des mesures de force d'adhésion ont été également effectuées sur des microcolonies formées dans des stades précoces de développement de biofilms constitués par *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* (Volle et al. 2008). Il a été montré que l'adhérence des cellules à la pointe de l'AFM, déterminée à partir de séries de courbes de forces, diffère selon les propriétés de surface des cellules des souches testées.

Les mesures de force permettent également d'accéder à des propriétés nanomécaniques, en particulier l'élasticité des biofilms. Cette dernière est caractérisée par le module de Young (Körstgens et al. 2001). Des valeurs de module de Young de l'ordre du kilo-Pascal (kPa) ou de dizaines de kPa ont été rapportées. Dans le cas de biofilms d'*E. coli* produisant deux types de matrice d'EPS, ainsi que des cellules bactériennes, le module d'élasticité de l'ordre du mégaPascal (MPa) (Kreis et Sullan 2020). Les courbes d'indentation permettent d'accéder aux dépendent des propriétés élastiques. Pour ce faire, les courbes d'indentation sont ajustées à un modèle physique de type Hertzien pour déterminer le module de Young (E en Pa). Dans cette étude, l'obtention d'images à haute résolution montrant la topographie de la surface du biofilm et sa cartographie nanomécanique a permis aux auteurs de mettre en lumière l'hétérogénéité en termes d'élasticité de la matrice d'EPS du biofilm d'*E. coli*. Cela est lié à l'hétérogénéité de la structure du biofilm.

En complément, l'analyse de la pente des courbes d'approche permet d'accéder aux valeurs de la constante de raideur de la surface du biofilm et des cellules. Par exemple, les travaux de Volle (Volle et al. 2008), en mesurant des forces sur les biofilms d'*E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, *M. luteus*, ont permis de déterminer des constantes de raideur qui variaient entre $0,167 \pm 0,01$ et $0,417 \pm 0,01$ N/m.

En résumé, pour mieux comprendre la formation et de la structuration des biofilms, l'analyse de leur morphologie (imagerie AFM) et de leurs propriétés nanomécaniques (spectroscopie de force) est souvent associée (Kreis et Sullan 2020) pour mieux comprendre leur évolution dans leur milieu naturel. Il a été montré que les propriétés nanomécaniques des biofilms, notamment l'élasticité ou la viscoélasticité, jouaient un rôle crucial dans leur résistance aux forces de cisaillement externes (Stoodley et al. 1999; Körstgens et al. 2001; Tierra et al. 2015). Il a également été rapporté que sous contrainte hydrodynamique, l'augmentation de la résistance aux forces de cisaillement semblait corrélée à la production de macromolécules, de longueur allant de 50 à 500 nm et ressemblant à des pili (Abe et al. 2012). L'ensemble de ces travaux montrent que la compréhension des caractéristiques des biofilms et de leur résistance mécanique nécessite de prendre en compte à la fois les forces d'adhésion cellulaire, la structure (morphologie et topographie) et les propriétés nanomécaniques. Cela requiert de s'intéresser aux rôles des pili ou d'autres protéines de surface tels que les protéines à domaines Mub. La compréhension des mécanismes d'adaptation des biofilms, en particulier ceux de *L. lactis*, lorsqu'ils sont soumis à des contraintes hydrodynamiques est ainsi indissociable de l'étude des propriétés des pili bactériens considérés dans le contexte global d'un biofilm.

2.7. Conclusion de la synthèse bibliographique et objectifs du projet de thèse

Cette synthèse bibliographique souligne la complexité du système biologique qu'est un biofilm et montre la nécessité de prendre en considération différents paramètres pouvant influencer sa structuration comme les pili ou autres protéines de surface. Les nombreux travaux présentés dans ce premier chapitre, illustrent les avancées considérables réalisés ces dernières années sur l'étude des pili chez de nombreuses bactéries, leur structure, leurs propriétés mécaniques, leur rôle dans l'adhésion cellulaire et dans la formation d'un biofilm. Ces avancées ont pu être réalisées grâce à l'essor de techniques innovantes en particulier l'AFM et dans plusieurs investigations la nécessité et l'importance du couplage entre l'AFM

et d'autres techniques comme la MCBL et la MET, ont été soulignées. Les différents modes de fonctionnement de l'AFM, en particulier la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique (SMFS), de la cellule unique (SCFS) et plus rarement à l'échelle du biofilm permettent non seulement d'accéder à la topographie et à la morphologie des biomolécules présentes à la surface des bactéries, des cellules isolées, voire du biofilm, mais aussi de mesurer les forces d'adhésion et les propriétés nanomécaniques.

La SMFS par l'utilisation de la pince optique, a permis de démontrer selon le modèle de physique statistique WLC que le pilus de *L. lactis* était une macromolécule flexible mais non extensible (Castelain et al. 2016a). Par ailleurs, il a été observé que les pili tendent naturellement à s'auto-agréger ce qui peut contribuer à augmenter la résistance des structures cellulaires soumises à un écoulement.

La SCFS, combinée aux techniques hydrodynamiques, en particulier la CEC, a mis en lumière le rôle clé des pili et de certaines protéines de surface telles que les protéines à domaines Mub dans l'adhésion cellulaire sur des surfaces biotiques (surface recouverte de mucines) et abiotiques (polystyrène).

Le rôle essentiel des pili dans les interactions cellule-cellule a été démontré chez les bactéries à Gram-négatif produisant des pili de type I et chez certaines bactéries à Gram-positif (genre *Streptococcus*, *Lactobacillus*) dont les pili sont pourvus d'adhésines tout le long de leur structure filamenteuse.

Chez *L. lactis*, Castelain et al. (2016b) ont montré que les pili sont impliqués dans l'adhésion aux surfaces abiotiques, qu'ils ont une capacité à s'auto-agréger et qu'ils présentent des propriétés nanomécaniques favorisant cette auto-agrégation. Outre les phénomènes d'adhésion, les pili jouent également un rôle dans l'aspect et l'organisation des biofilms. Les travaux d'Oxaran et al. (2012) ont démontré que les biofilms de *L. lactis* présentent une structure réticulée, épaisse et aérienne lorsque la souche est piliée et sont fortement compacts lorsque la souche est dépourvue de pili.

Sur la base de ces travaux, l'hypothèse générale qui fait l'objet de ce travail de thèse est que les pili de *L. lactis* favorisent la formation de biofilms et contribuent à leur résistance à l'écoulement.

Les objectifs de ce projet sont donc de déterminer (i) la nature des interactions entre deux cellules, brique élémentaire de la structuration d'un biofilm, (ii) la cohésion du biofilm

lorsqu'il est soumis à des contraintes de cisaillement pariétales et (iii) la capacité au biofilm à résister aux contraintes hydrodynamiques et à se régénérer.

Chapitre 3 :

Matériels et méthodes

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

Afin de mieux comprendre les différentes expériences menées au cours des travaux de thèse, une présentation consacrée aux méthodes, protocoles et dispositifs expérimentaux, est détaillée dans ce chapitre 3.

3.1. Microorganismes et conditions de croissance

3.1.1. Souches bactériennes

Les souches de *L. lactis subsp. lactis* utilisées dans cette étude ont été gracieusement fournies par l'Institut Micalis, INRAE, AgroParisTech, (Jouy-en-Josas, France) et proviennent de deux origines :

- la souche de laboratoire IL1403 à partir de laquelle sont construits différents mutants (**Table 1**) mise à disposition par Jean Christophe Pillard et
- la souche TIL448 isolée d'un végétal et ses dérivés conçus par Marie-Pierre Chapot-Chartier (**Table 2 et 3**).

Les phénotypes des différentes bactéries sont décrits plus en détail dans la synthèse bibliographique.

3.1.2. Conditions de croissance des souches de *L. lactis*

Les souches de *L. lactis* sont cultivées dans du bouillon M17Glc constitué de milieu M17 (poudre prête à l'emploi à diluer 42,2 g/L dans de l'eau distillée, Oxoid) et contenant 0,5 % (p/v) de D-glucose. Le pH du milieu est ajusté à 7,1. Ce milieu M17Glc est stérilisé par autoclavage (121° C, 20 min). Pour la culture des mutants, les antibiotiques ont été ajoutés après refroidissement à une concentration finale de 5 µg/mL pour l'érythromycine (Ery) et la tétracycline (Tet). Les souches sont cultivées à 30°C dans un incubateur en conditions statiques.

3.1.3. Préparation des précultures

Les précultures (cultures sur une nuit) sont préparées à partir d'un cryotube contenant la souche bactérienne avec 20 % de glycérol conservé à -80° C (stock) et décongelé. Chaque souche estensemencée sur boîte de Pétri contenant le milieu gélosé (milieu M17Glc + agar (15 g/L, Biokar), avec ou sans antibiotique selon les souches. Cette étape permet de s'assurer de la pureté de la culture. Après l'incubation en boîte de Pétri à 30° C pendant 24h, 3 à 4

colonies sont suspendues dans 1 mL de milieu frais. 500 µL de cette suspension bactérienne sont introduits dans un tube à essai contenant 10 mL de milieu de culture. Le tube à essai est incubé à 30° C sans agitation, pendant une nuit (16h environ). Cette culture de nuit, ou préculture, est utilisée le lendemain pour réaliser les différentes expériences.

Table 3 : les différentes souches de *L. lactis subsp. lactis* utilisées au cours des travaux de thèse.

Souches	Génotype, phénotype	Références
VE17061	Pil ⁻ , contrôle (dépourvue de pili)	(Oxaran et al. 2012)
VE17173	Pil ⁺ , expression de l'opéron <i>pil</i>	(Oxaran et al. 2012)
VE17176	Pil ⁺⁺ , surexpression de l'opéron <i>pil</i> et du gène <i>srtA</i> .	(Oxaran et al. 2012)
TIL448	Pil ⁺ /Mub ⁺ , souche végétale, isolée du petit poids, exprime des pili et des protéines à domaines Mub, codés par des plasmides.	Collection INRAE (Meyrand et al. 2013)
TIL1230	Pil ⁻ /Mub ⁻ , TIL448 dépourvue de ses plasmides.	(Meyrand et al. 2013)
TIL1289	Pil ⁻ /Mub ⁺ , TIL448 avec délétion du gène <i>yghE2</i> qui code la piline majeure, Ery ^R	(Meyrand et al. 2013)
TIL1290	Pil ⁺ Mub ⁻ , TIL448 avec délétion du gène <i>mub</i> codant pour les protéines à domaines Mub, Ery ^R	(Meyrand et al. 2013)

3.2. Préparation d'échantillons bactériens pour les mesures d'interactions cellulaires par l'AFM

Les cultures sur une nuit sont récoltées par centrifugation (1000 g, 10 min, à température ambiante). Le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, 1X) à pH 7,4, puis dilué à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,02 afin d'obtenir des bactéries pouvant être isolées. Ces bactéries sont ensuite immobilisées sur des lames de verre préalablement imbibées d'une solution de chlorhydrate de dopamine ou polydopamine à 4 mg/mL (99 %, Sigma-Aldrich). Pour cela, les lames de verre, nettoyées pendant 5 minutes à l'aide d'un plasma d'oxygène, sont immergées pendant 24 h dans la solution de polydopamine. Elles sont ensuite rincées avec de l'eau Milli-Q et de l'éthanol, puis séchées sous azote. Une goutte de 50 μL de la suspension bactérienne diluée est ensuite déposée sur la lame. Elle est laissée au repos pendant 30 min à température ambiante de façon à laisser sédimenter et adhérer les bactéries sur la lame de verre. La lame est ensuite utilisée directement pour réaliser les mesures de spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique (SCFS).

3.3. Expériences de spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique

Les sondes cellulaires, constituées d'un microlevier ou « cantilever » sur lequel est fixée une microbille en silice portant elle-même une bactérie, sont préparées en utilisant le protocole légèrement modifié décrit par (Beaussart et al. 2013). Cette sonde colloïdale cellulaire (microlevier-microbille-bactérie) qui permet de mesurer les interactions cellule-cellule est obtenue en trois étapes (**Fig. 18**) :

1. Fixation de la sonde colloïdale sur le microlevier : des microbilles en silice (5 μm de diamètre, Bangs Laboratories) sont déposées de façon espacée sur une moitié de lame de verre propre et sèche. Sur la deuxième moitié de la lame, une goutte de colle liquide (NOA 63, Norland Edmund Optics) est étalée par stries à l'aide d'une spatule, de façon à obtenir de fines couches de colle. Un microlevier triangulaire sans pointe (NP-O10, Bruker, USA) est mis en contact avec une petite dose de colle puis avec une microbille isolée. L'ensemble microlevier et microbille est laissé en contact pendant 10 min sous une lampe UV afin que la microbille se fixe solidement au microlevier lors de la polymérisation de la colle.
2. Fixation d'une bactérie sur la sonde colloïdale : la polyéthylèneimine (PEI) 0,2 % est habituellement utilisée pour immobiliser des bactéries sur une pointe AFM sans les altérer

(Dague et al. 2010). La PEI crée des charges positives autour des cellules ce qui entraîne leur immobilisation par interaction électrostatique. Cette technique d'immobilisation devrait être adaptée pour des cellules de *L. lactis* qui sont chargées négativement. Cependant, probablement en raison de la faible charge négative de leur surface, la fixation des souches de *L. lactis* considérées dans cette étude (Annexe 1) s'est avérée difficile. Ce produit a été donc remplacé par la polydopamine, ou encore chlorhydrate de dopamine (99 %, Sigma-Aldrich), qui est une colle biologique de plus en plus utilisée pour fonctionnaliser des pointes AFM. Dissoute dans une solution de PBS à une concentration de 4 mg/mL, elle permet d'immobiliser des bactéries sans induire leur altération (Beaussart et al. 2013). Pour réaliser cette étape, la sonde microlevier-microbille est d'abord immergée pendant 1 h dans la solution de polydopamine (4 mg/mL). Après rinçage avec du PBS, la constante de raideur nominale de la sonde colloïdale est vérifiée par la méthode du bruit thermique (Hutter et Bechhoefer 1993) et doit être comprise entre 0,03 et 0,06 N/m. Elle peut ensuite être utilisée pour l'immobilisation d'une cellule en la mettant en contact avec une bactérie isolée pendant 3 min. La fixation de la cellule sur la sonde colloïdale est vérifiée par microscopie optique et par une courbe de force qui montre une indentation traduisant la présence de la cellule sur la bille.

3. Mesures de spectroscopie de force à l'échelle de la cellule (SCFS) : cette analyse est réalisée avec un appareil d'AFM Nanowizard III (Bruker USA). La sonde cellulaire déjà préparée, est utilisée pour mesurer les forces d'interaction entre paires de cellules, à température ambiante. Une force maximale de 1 nN est appliquée avec une vitesse d'approche/rétraction constante de 2,0 $\mu\text{m/s}$ et un temps de contact de 0,5 s. Les courbes de forces obtenues sont analysées à l'aide du logiciel de traitement de données de JPK Instruments (Bruker, USA). La force et le travail d'adhésion sont reportés sur histogrammes représentant les fréquences d'occurrence. Ils sont obtenus en calculant la force d'adhésion maximale et l'aire sous la courbe de rétraction, respectivement, pour chaque courbe de force obtenue. Sauf indication contraire, pour chaque condition, les expériences ont été répétées pour au moins trois paires de bactéries provenant de cultures indépendantes.

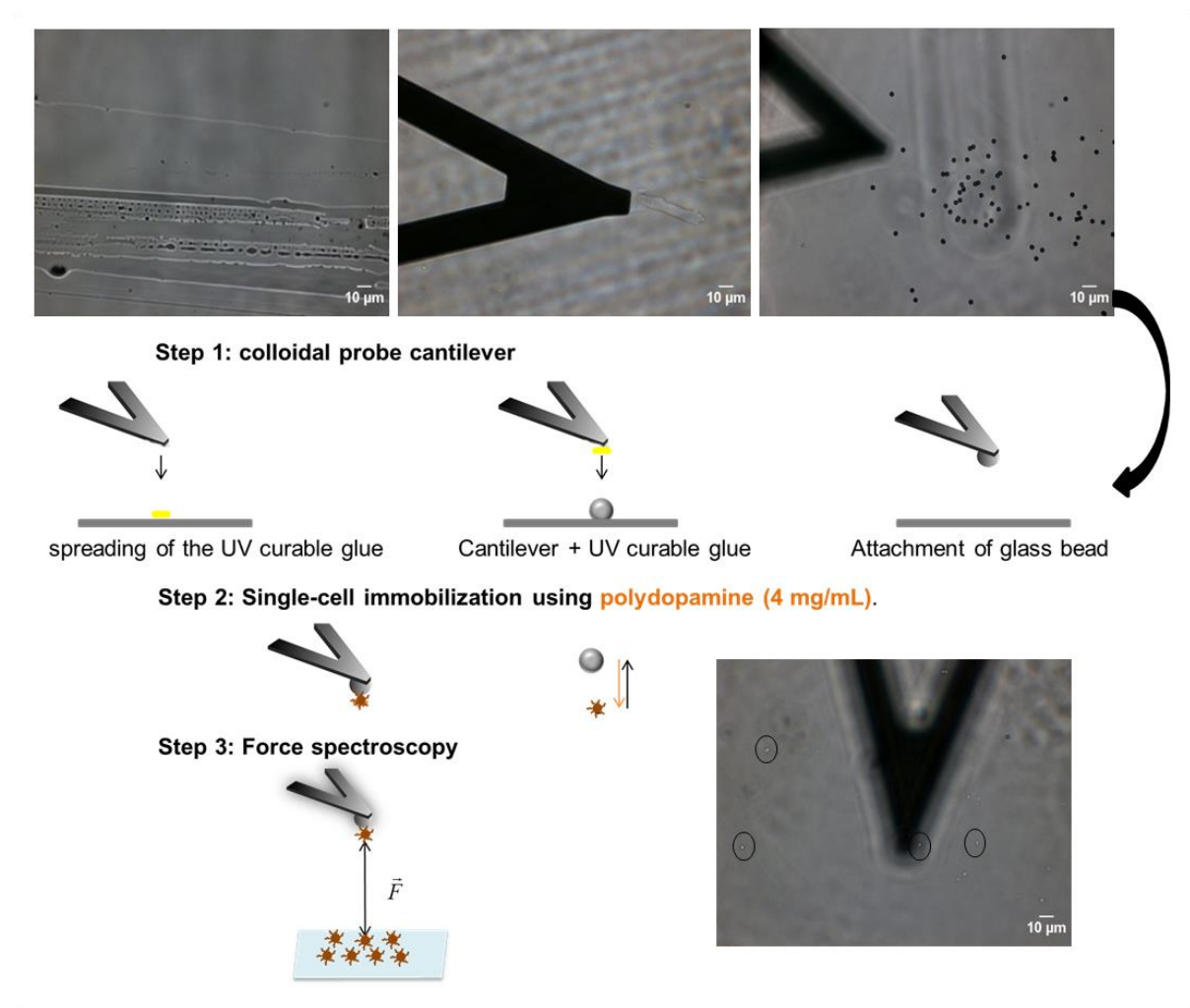


Figure 18 : Étude expérimentale des interactions cellule-cellule par spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique (SCFS).

3.4. Expériences d'observation des pili à la surface de *L. lactis*

3.4.1. Imagerie des cellules et de leurs pili par l'AFM en mode contact

50 μ L de la pré-culture sont introduits dans 5 mL de PBS, 1X, puis 50 μ L de cette suspension bactérienne diluée, sont déposés sur des surfaces de mica fraîchement clivées. L'observation d'une cellule en milieu liquide ne permet pas de mettre en évidence les pili.

Aussi, pour visualiser les pili étalés autour de la cellule, l'observation doit être faite dans l'air. Pour cela, la suspension bactérienne déposée sur le mica est incubée à 30 °C pendant 3 h afin d'évaporer le liquide. La surface du mica est ensuite rincée délicatement trois fois dans de l'eau Milli-Q puis séchée à 30 °C pendant 2 h. Les images de la topographie de

surface des bactéries, obtenues à l'aide de l'AFM en mode contact dans l'air à température ambiante en utilisant des microleviers MLCT (Bruker, USA, constante de raideur nominale de $\sim 0,01$ N/m) sont alors enregistrées (Hutter et Bechhoefer 1993). La vitesse de balayage est de 1 ligne/seconde (s) et la résolution de 512×512 lignes.

3.4.2. Analyse de l'ultrastructure des pili de *L. lactis* par microscopie électronique à transmission

La présence de pili à la surface des bactéries *L. lactis*, est contrôlée par microscopie électronique à transmission (MET) suivant une procédure de coloration négative. Pour cela, une préculture est centrifugée (1000 g, 10 min à température ambiante) et le culot est lavé dans du PBS 1X. Les bactéries sont ensuite fixées au paraformaldéhyde (PFA) 3 % pendant 30 minutes à température ambiante. Des grilles en cuivre recouvertes de carbone Formvar, sont mises en contact avec une goutte de bactéries fixées pendant 3 minutes pour que les cellules adhèrent au matériau. Les grilles sont rincées dans de l'eau Milli-Q et une coloration est effectuée à l'acétate d'uranyle 0,2 % pendant 20 secondes. Après séchage, elles sont observées avec un TEM H-600 (Hitachi, Japon), à une tension à 75 kV, équipé d'une caméra CCD orca au format 1024×1024 pixels. Les images résultantes sont traitées à l'aide du logiciel Image J pour mettre en évidence le contour des pili.

3.5. Culture des biofilms des souches de *L. lactis* en condition statique

3 mL de PBS, 1X contenant 4 mg/mL de chlorhydrate de dopamine (99 %, Sigma) sont introduits dans une petite boîte de Pétri (TPP, $\varnothing \times h = 40 \times 11$ mm) qui est incubée pendant 1 h dans des conditions stériles. La solution de chlorhydrate de dopamine est alors retirée de la boîte de Pétri et remplacée par 50 μ L de préculture et 3 mL de milieu de culture frais. Après 24 h d'incubation à 30 °C en conditions statiques, le milieu est délicatement retiré et remplacé par du PBS avant de réaliser les différentes expériences.

3.5.1. Observation des biofilms par la microscopie confocale à balayage laser

L'analyse de la structure et de l'épaisseur des biofilms obtenus en conditions statiques a été faite par marquage fluorescent en utilisant le Syto-9 du kit LIVE/DEAD *BacLight* (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le Syto-9 cible l'acide nucléique des cellules vivantes ou mortes du biofilm. Pour ce faire, 20 μ L de marqueur sont introduits dans le biofilm aqueux. Après 15 min d'incubation à l'obscurité, le biofilm est observé en MCBL (Confocal Visible Leica DMR TCS SP2, Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne) sous immersion. La

longueur d'onde d'excitation est 488 nm (laser bleu), l'émission est analysée en collectant toutes les longueurs d'ondes au-dessus de 500 nm. La structure 3D du biofilm est étudiée en enregistrant une série de sections horizontales (piles ou « stacks ») correspondant à des plans focaux successifs. Les images sont post-traitées à l'aide du logiciel Leica Confocal Software Lite.

3.5.2. Imagerie des biofilms par AFM

Pour analyser la topographie des biofilms statiques obtenus après 24h pour chaque souche de *L. lactis*, des images AFM (JPK Instruments, Bruker, USA) d'une surface de 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ sont enregistrées en mode contact et en milieu aqueux (PBS) à température ambiante. Des microleviers MLCT (Bruker, USA, avec une constante de raideur nominale de $\sim 0,01 \text{ N/m}$) sont utilisés. La fréquence de balayage est de 1 Hz et la résolution est de 128×128 pixels. Les images acquises sont analysées à l'aide du logiciel de traitement des données, JPK Instruments (Bruker, États-Unis).

3.6. Mesures des propriétés nanomécaniques et des forces d'adhésion homotypiques du biofilm de *L. lactis* par l'AFM

3.6.1. Etude des propriétés nanomécanique

Les propriétés nanomécaniques des biofilms pour les différentes souches de *L. lactis* sont mesurées par spectroscopie de force en enregistrant une cartographie d'élasticité de 16×16 courbes de force sur une surface de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ et en milieu aqueux (PBS). Les sondes colloïdales fonctionnalisées utilisées sont préparées selon le protocole décrit plus haut (**Fig. 18**). Lors des essais, la force maximale appliquée sur le biofilm par les sondes colloïdales est de 0,5 nN (**Fig. 19a**). La vitesse d'approche/retrait qui est constante, est de 12 à 30 $\mu\text{m/s}$ et la longueur z du piézo est ajustée à 15 μm , distance maximale du piézo. Les courbes de force obtenues sont ensuite converties en courbes d'indentation et sont ajustées au modèle de Hertz pour obtenir les valeurs du module de Young. Pour une indentation sphérique, ce modèle suit l'équation suivante :

$$(3) \quad F_{\text{cant}} = 4/3 (E^* R^{1/2} \delta^{3/2}),$$

où F est la force d'indentation du microlevier appliquée sur la surface du biofilm, E^* le module de Young réduit, δ la déformation de l'échantillon (du biofilm) en contact du microlevier, et R le rayon de courbure de la sonde colloïdale sphérique égale 2,51 μm .

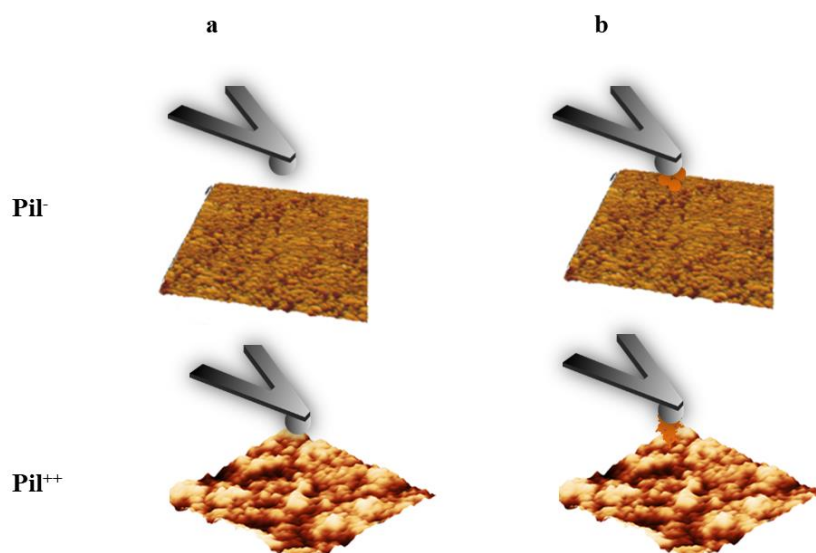


Figure 19 : Dispositif expérimental permettant la mesure des propriétés nanomécaniques des biofilms (a) et des interactions homotypiques entre la sonde colloïdale cellulaire et l'interface du biofilm (b).

3.6.2. Mesure des forces d'interaction homotypique

Les mesures des forces d'interaction homotypique entre des cellules fixées sur la sonde colloïdale fonctionnalisée (nombre de bactéries fixé non contrôlé) et l'interface du biofilm permettent de mettre en évidence le rôle des pili de *L. lactis* dans les mécanismes d'adhésion et dans la cohésion entre des cellules du biofilm (**Fig. 19b**). Pour cela, la sonde colloïdale est mise en contact avec une goutte de 50 μ L de suspension bactérienne diluée de façon à immobiliser des bactéries. La sonde colloïdale cellulaire ainsi préparée, est utilisée pour mesurer les forces d'interactions avec l'interface du biofilm. Les courbes de force obtenues sont analysées à l'aide du logiciel de traitement des données, JPK Instruments (Bruker, USA). Les histogrammes représentant la fréquence relative des forces d'adhésion sont obtenus en calculant la force d'adhésion maximale du dernier pic pour chaque courbe. Pour chaque souche, les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des cultures indépendantes.

3.7. Etude des biofilms sous contrainte de cisaillement

3.7.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental représenté **Fig. 20** est composé des principaux éléments suivants : une chambre d'écoulement, comportant une fenêtre optique, dans laquelle s'installe et se développe le biofilm, un microscope épi-fluorescent pour suivre et visualiser la formation et l'évolution du biofilm en temps réel, des réservoirs en amont de la chambre contenant le milieu nutritif pour l'alimentation du biofilm à un débit contrôlé par une pompe péristaltique. Le débit traversant la chambre varie selon les conditions opératoires dans une gamme de 0,1 à 20 mL/min ce qui correspond à des contraintes pariétales de 0,02 à 4 Pa (**Table 4**). Le tuyau d'alimentation traverse un bain marie ce qui permet de réguler la température dans le canal d'écoulement à $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. A l'aval de la chambre un réservoir permet la récupération des déchets biologiques.

En amont de la chambre se trouve un piège à bulles et à l'aval une vanne 3 voies dont l'une des voies est reliée à un septum à travers lequel se fait l'inoculation.

Table 4 : Conditions expérimentales : débits (Q) et contraintes pariétales de cisaillement correspondantes (τ_p).

Conditions hydrodynamiques	
Débit (Q en mL/min)	τ_p (en Pa)
0,1	0,02
1	0,2
2	0,4
5	1
10	2
20	4



Figure 20 : Schéma du dispositif expérimental pour l'étude des biofilms de *L. lactis* en conditions d'écoulement. (1) et (3) : réservoirs de stockage du milieu de culture avec leurs pompes respectives (2) et (4). (5) : bain-marie dans lequel baigne le tuyau d'alimentation. (6) : microscope à fluorescence avec caméra. (10) : chambre d'écoulement (7) : dispositif d'inoculation : piège à bulle, vanne et seringue d'injection. (8) : ordinateur connecté à la caméra. (9) : réservoir à déchets.

3.7.1.1. Désinfection et mise en place du dispositif

Avant le début de chaque expérience, les tuyaux, les connexions et les bidons contenant le milieu d'alimentation sont stérilisés par autoclave (121 °C, 20 min). La chambre d'écoulement désinfectée en y faisant circuler de l'éthanol 70 % pendant 1h à faible débit (1 mL/min), puis elle est rincée avec de l'eau distillée stérile (EDS) à 50 mL/min pendant 30 min. Le piège à bulles et la vanne 3 voies sont également désinfectés à l'éthanol puis rincés à l'eau stérile. Les connexions des différents éléments (tuyaux, réservoirs, chambre) sont liées les unes aux autres se font en conditions stériles, au voisinage d'une flamme.

3.7.1.2. Configuration et géométrie de la chambre d'écoulement

La chambre d'écoulement inspirée des travaux d'Elzo et al. (1996), est composée de différents éléments superposés :

- une partie supérieure en acier inoxydable dans laquelle est découpée la fenêtre d'observation,
- un joint en silicone également découpé,
- une lame de microscope,
- un support en acier inoxydable comportant un usinage de forme rectangulaire avec un convergent et un divergent à ses deux extrémités et en son milieu un logement dans lequel peut être inséré un coupon en polystyrène sur lequel le biofilm peut se développer (**Fig. 21**).

Cette organisation permet d'obtenir un canal d'écoulement dont la profondeur est égale à 0,2 mm et de garantir des conditions d'écoulement laminaire dans la zone d'observation du biofilm. La longueur (L) et la largeur (l) du canal sont de 25 mm et 12,5 mm respectivement. Les contraintes de cisaillement pariétales (τ_p) ainsi exercées sur le biofilm bactérien au cours des expériences en fonction du débit appliqué, sont données dans la **Table 4**.

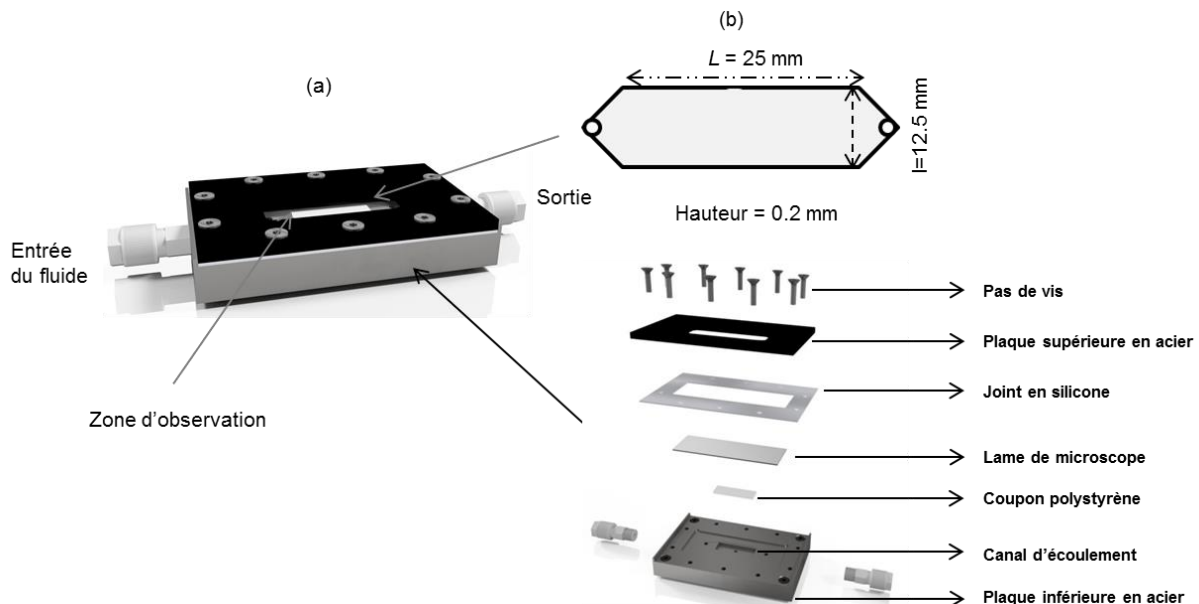


Figure 21 : Vue générale (a) et éclatée de la chambre d'écoulement et de sa géométrie (b).

3.7.2. Etude de l'influence des conditions hydrodynamiques sur la croissance et la structure du biofilm

3.7.2.1. Effets sur la structure du biofilm

Pour comprendre les phénomènes de détachement des biofilms ou analyser l'évolution de leur structuration spatiale induites par le cisaillement (modification/reconstruction/persistance de l'organisation), un biofilm est initialement installé pendant 24h en condition statique puis il est soumis à différentes contraintes de cisaillement.

Le protocole d'initiation du biofilm dans la chambre à écoulement, puis le suivi de son développement en condition d'écoulement, sont décrits ci-dessous :

- 1- Après les étapes de désinfection et de connexion des éléments du dispositif décrits dans la section 3.7.1.1., le débit d'alimentation est ajusté à la valeur choisie pour l'expérience en utilisant un réservoir d'eau distillée stérile qui est connecté à l'amont de la pompe d'alimentation (**Fig. 20**). Une fois le débit fixé, l'ensemble du système (tuyaux et chambre d'écoulement) est vidangé. Le réservoir d'eau stérile est remplacé par le bidon de milieu de culture connecté stérilement (M17Glc avec ou sans antibiotique). Les bulles d'air sont éliminées grâce au piège à bulles placé à l'amont du canal. Le débit du fluide est de nouveau vérifié à la sortie de la chambre avant l'inoculation.
- 2- L'inoculation de la chambre d'écoulement est effectuée avec 1 mL de la préculture (section 3.1.3.) à l'aide d'une seringue et au voisinage d'une flamme. Pour cela, la pompe d'alimentation est arrêtée, le piège à bulles est ouvert, la vanne 3 voies est positionnée de façon à connecter le septum avec la chambre, la sortie aval étant fermée. La préculture est alors injectée au travers du septum afin de remplir la chambre. Le système est alors laissé au repos (sans écoulement) pour permettre aux bactéries de sédimer sur le support d'adhésion (polystyrène), de s'y fixer et de se multiplier pour initier le biofilm.
- 3- Après 24h d'incubation, une observation au microscope épi-fluorescent permet de s'assurer de l'installation des bactéries sur toute la surface du coupon et visualiser la structure obtenue.
- 4- Le dispositif est alors alimenté pendant 24h à un débit constant, correspondant à la condition expérimentale souhaitée, établi grâce à la pompe-péristaltique.
- 5- Après 24h d'alimentation, le biofilm obtenu est marqué à l'éosine 2 % (Mercurochrome).

- 6- L'aspect global du biofilm est observé par microscopie de fluorescence et les images correspondantes sont enregistrées.

Les observations microscopiques en fluorescences sont réalisées avec un appareil OLYMPUS BX51, JAPAN équipé d'un objectif $\times 20$. Les images enregistrées sur une caméra Basler acA2040 – 90 uc, 2048×2048 pixels, reliée à un ordinateur sont ensuite traitées par le logiciel image J.

3.7.2.2. Validation du choix de l'éosine en tant que marqueur du biofilm

Pour les expériences en chambre à écoulement, le choix du marqueur fluorescent s'est porté sur l'éosine à la place du Syto-9 habituellement utilisé pour des raisons de sécurité (quantité requise, contamination potentielle de l'installation par un produit CMR intercalant de l'ADN). L'éosine employée est un colorant à usage médical aux propriétés asséchantes utilisée en application cutanée. En histologie, elle est souvent combinée avec l'hématoxyline pour marquer le cytoplasme et le nucléole des cellules eucaryotes, respectivement. Elle colore le cytoplasme en rouge/rose et, sous une longueur d'onde d'excitation de 500 nm, les cellules bactériennes apparaissent en jaune-orangé. Le mode d'action de l'éosine bien qu'imparfaitement connu chez les bactéries, permet tout de même un marquage satisfaisant du biofilm. Cependant, afin de s'assurer que ce composé n'altérerait pas l'intégrité des cellules et par conséquent du biofilm, son effet sur la survie des bactéries a été évalué aussi bien en culture liquide qu'en culture solide (milieu gélosé) (Annexe 7). Pour cela deux précultures d'une même souche sont réalisées, l'une est mise en contact avec l'éosine 2 % en solution aqueuse, homogénéisée, puis incubée à température ambiante pendant 1h (temps maximum entre le marquage et la fin des acquisitions d'images lors de l'expérimentation), l'autre reste sans ajout. Après centrifugation (1000 g, 10 min), les culots bactériens sont repris dans le milieu de culture et incubés à 30 °C pendant 24h puis la DO_{600nm} de chacune des cultures est mesurée et comparée. En milieu solide, après marquage à l'éosine dans les mêmes conditions qu'en milieu liquide, chaque préculture est étalée sur boîte de Pétri et incubée à 30 °C.

3.7.2.3. Vérification de la disponibilité des substrats en sortie de la chambre d'écoulement

La consommation des substrats par le biofilm lors de son passage dans la chambre. Pour ce faire, environ 10 mL de milieu de culture ont été prélevés dans un tube à essai stérile à la sortie de la chambre après 24h d'alimentation (juste avant l'arrêt de la pompe). En parallèle, un autre volume de 10 mL est recueilli dans un tube à essai stérile, à l'entrée de la chambre à

écoulement (milieu témoin). Ils sont immédiatement passés à la centrifugation (5000 g, 10 min) puis filtrés à l'aide d'un filtre seringue de 0,22 μm (en PVDF stérile, $\varnothing$ 33 mm) dans des conditions stériles. Dans chaque milieu de culture, 500 μL de préculture de la souche cultivée dans la chambre ont été introduits. Les deux tubes sont placés dans l'incubateur à 30 °C pendant 24h, sans agitation. Le lendemain, les $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ont été comparées pour mettre en évidence les différences de croissance dans les deux milieux de culture (milieu à l'entrée et milieu à la sortie de la chambre d'écoulement).

3.7.2.4. Effets de variations des conditions d'écoulement sur la persistance du biofilm

La persistance du biofilm lorsque les conditions d'écoulement varient est évaluée pour déterminer le rôle des pili de *L. lactis* dans les caractéristiques du biofilm. Pour cela, un biofilm est initié en condition statique pendant 24h comme décrit en section 3.7.2.1. Ce biofilm est ensuite soumis successivement à des débits croissants par paliers (Fig. 22). Le débit initial est fixé à 5 mL/min correspondant à une contrainte pariétale de 1 Pa et l'écoulement est maintenu pendant 3 min. Le biofilm est alors marqué à l'éosine 2 % et les images sont immédiatement enregistrées. Le débit est ensuite augmenté à 10 mL/min (2 Pa) pendant 3 min, une nouvelle observation est effectuée, puis à 20 mL/min (4 Pa) pendant 3 min également puis une observation est réalisée.

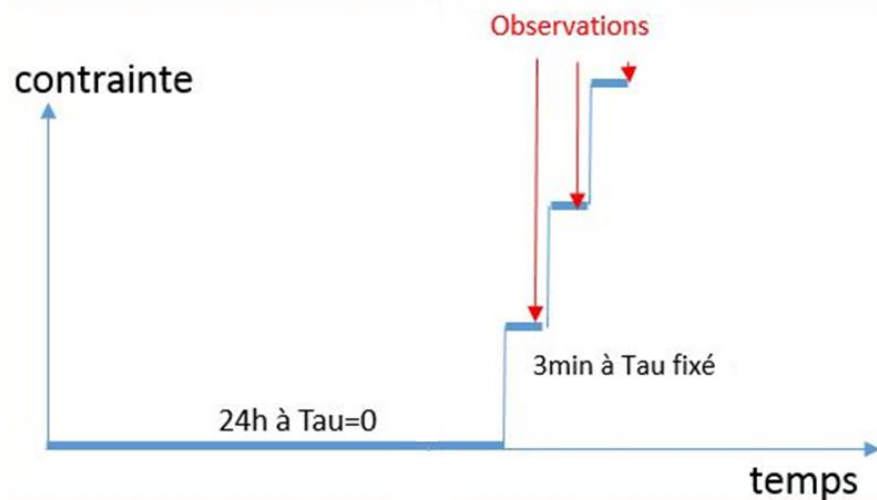


Figure 22 : Schéma montrant la méthode d'étude de l'effet des différentes contraintes croissantes appliquées par paliers sur la persistance du biofilm.

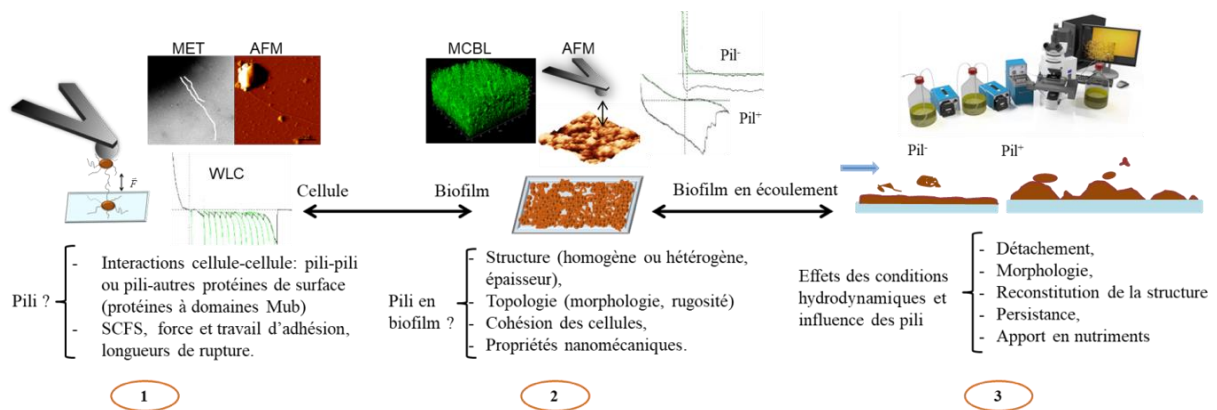
Chapitre 4 :

Résultats et discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre sont organisés sous la forme d'articles publiés dans des revues internationales, ou en phase de soumission. Un résumé étendu précède chaque partie :

1. Rôle médiateur des pili de *Lactococcus lactis* dans les interactions cellule-cellule par la spectroscopie de force.
2. Relations entre structure et propriétés nanomécaniques du biofilm de *L. lactis* : influence de la production des pili et d'autres protéines de surface.
3. Influence des pili sur la structure et la cohésion d'un biofilm de *L. lactis* soumis à une contrainte de cisaillement.



4.1. Rôle médiateur des pili de *Lactococcus lactis* dans les interactions cellule-cellule par la spectroscopie de force

4.1.1. Contexte et objectifs

Les pili sont des protéines de surface de structure filamenteuse, largement étudiés chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif pathogènes. Plusieurs rôles leur ont été attribués (détaillé dans la partie « Etat de l'art »), notamment leur influence dans les interactions entre les bactéries et les surfaces biotiques ou abiotiques où les microorganismes peuvent adhérer. En effet, les pili ont été décrits comme étant impliqués dans l'adhésion initiale des bactéries aux tissus de l'hôte, la médiation dans l'agrégation bactérienne, la colonisation et la virulence des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif pathogènes. Les études sur les pili des bactéries à Gram-positif non pathogènes sont récentes et concernent des bactéries probiotiques ou alimentaires comme *L. rhamnosus* GG, des bifidobactéries commensales et *L. lactis*. Chez cette dernière, les pili ont été décrits comme étant des macromolécules flexibles (Castelain et al. 2016a), nécessaires à l'adhésion cellulaire sur des surfaces inertes comme le polystyrène (Castelain et al. 2016b) ou recouvertes de mucines, protéines essentielles de la muqueuse intestinale (Le et al. 2013; Meyrand et al. 2013). Dans le processus de formation d'un biofilm, les interactions entre les cellules sont de première importance et plusieurs types de molécules, dont les pili, pourraient jouer un rôle médiateur entre les bactéries.

Pour étudier l'hypothèse d'un rôle majeur des pili à l'échelle de la cellule unique, l'objectif dans cette première partie des travaux de thèse a été d'analyser les interactions homotypiques entre paires de bactéries. L'imagerie AFM et la microscopie électronique à transmission (MET) ont été utilisées pour mettre en évidence les pili à la surface de différentes souches de bactéries sauvages ou modifiées au niveau des gènes codant pour la synthèse des pili et des protéines Mub. L'AFM a également permis de réaliser des mesures de spectroscopie de force à l'échelle de la cellule unique (SCFS) afin de quantifier les interactions cellule-cellule. A partir des courbes de forces obtenues, les fréquences relatives des forces et du travail d'adhésion et les distances de ruptures ont pu être évaluées. Les courbes de forces montrant des signatures multiples ont été traitées par un modèle physique, Worm Like-Chaine (WLC), ce qui a permis de caractériser les propriétés mécaniques des pili par des paramètres tels que les longueurs de persistance (L_p) et de contours (L_c).

4.1.2. Principaux résultats et conclusions

La SCFS a permis de quantifier le comportement d'adhésion entre paires de bactéries provenant de souches aux caractères phénotypiques différents. Les mutants issus de la souche de laboratoire IL1403 exprimant des pili, ont montré une force d'adhésion importante. La détermination du travail d'adhésion représentant l'énergie nécessaire pour séparer deux bactéries initialement en contact, a également montré des valeurs plus élevées pour les souches piliées. Les expériences menées avec des bactéries provenant de différentes cultures ont démontré que les interactions entre les paires de cellules médiées par les pili étaient homotypiques et spécifiques.

Ces expériences ont été reproduites et validées avec une souche environnementale TIL448 produisant naturellement des pili ainsi que des protéines à domaines Mub. En analysant les signatures des différentes courbes de force, nous avons montré que des profils en dents de scie sont obtenus lorsque les pili interagissent avec les protéines Mub et ne résultent pas de la présence d'adhésines le long des pili comme cela a pu être observé chez *L. rhamnosus* GG (Tripathi et al. 2013).

Afin de caractériser les propriétés nanomécaniques des pili, les courbes de forces ont été analysées par un modèle physique, Worm Like-Chain (WLC). Les valeurs des longueurs de persistance L_p et de contours L_c ainsi déterminées sont variables selon les bactéries mais restent faibles indiquant que les pili sont des macromolécules flexibles mais peu élastiques. Ce résultat corrobore les observations des pili de *L. lactis* faites à la fois par microscopie électronique à transmission et par l'AFM, qui montrent des structures filamenteuses et flexibles dont le nombre et la longueur moyenne varient selon la souche. Chez les souches de *L. lactis*, la capacité d'adhésion des cellules les unes aux autres est donc corrélée à la présence de pili à leurs surfaces. Cette capacité à interagir fortement entre elles par l'intermédiaire des pili est déterminante dans l'établissement de biofilms positifs. L'aptitude à générer ce type de biofilm pourrait être d'un grand intérêt en milieu industriel afin de contrôler des espèces indésirables prolifératives dans la flore laitière ainsi que dans des applications médicales (par exemple vecteurs de molécules spécifiques destinés aux muqueuses intestinales). Cependant, la mise en place de biofilms positifs, nécessitera d'approfondir la compréhension des mécanismes d'interactions pili-pili et pili-autres protéines (par exemple les protéines du lait)

et d'analyser leur rôle dans l'étape d'adhésion initiale des cellules et dans la formation, la structuration et la persistance d'un biofilm.

Les résultats de cette partie dont l'objectif était de mettre en évidence le rôle médiateur des pili dans les interactions cellule-cellule, a fait l'objet d'un article publié en Avril 2020 dans le journal « *ACS Applied Materials & Interfaces* ».

Si l'importance des pili dans l'adhésion cellulaire initiale et dans les interactions entre bactéries chez *L. lactis*, a été clairement démontrée, leur rôle dans la structuration, la cohésion et les propriétés nanomécaniques d'un biofilm doit être approfondi. Ainsi, les travaux qui seront décrits dans les paragraphes suivants s'attachent d'une part à caractériser les interactions à l'échelle moléculaire entre des bactéries et un biofilm et, d'autre part, analysent les possibles corrélations entre la présence de pili et de protéines de surface, le développement et la persistance du biofilm en conditions d'écoulement, représentatives de conditions réelles.

4.1.3. Article 1 : Analysis of homotypic interactions of *Lactococcus lactis* pili using single-cell force spectroscopy

ACS APPLIED MATERIALS
& INTERFACES

www.acsami.org

Research Article

Analysis of Homotypic Interactions of *Lactococcus lactis* Pili Using Single-Cell Force Spectroscopy

Ibrahima Dramé, Cécile Formosa-Dague, Christine Lafforgue, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Jean-Christophe Piard, Mickaël Castelain, and Etienne Dague*



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Cell surface proteins of Gram-positive bacteria play crucial roles in their adhesion to abiotic and biotic surfaces. Pili are long and flexible proteinaceous filaments known to enhance bacterial initial adhesion. They promote surface colonization and are thus considered as essential factors in biofilm cohesion. Our hypothesis is that pili mediate interactions between cells and may thereby directly affect biofilm formation. In this study, we use single-cell force spectroscopy (SCFS) to quantify the force of the homotypic pili interactions between individual bacterial cells, using different *Lactococcus lactis* strains producing pili or not as model bacteria. Moreover the force–distance curves were analyzed to determine the physical and nanomechanical properties of *L. lactis* pili. The results for pili-devoided strains showed a weak adhesion between cells (adhesion forces and work in the range of 100 pN and 7×10^{-18} J, respectively). On the contrary, the pilated strains showed high adhesion levels with adhesion forces and adhesion work over 200 pN and 50×10^{-18} J, respectively. The force–extension curves showed multiple adhesion events, typical of the unfolding of macromolecules. These unfolding force peaks were fitted using the physical worm-like chain model to get fundamental knowledge on the pili nanomechanical properties. In addition, SCFS applied to a *L. lactis* isolate expressing both pili and mucus-binding protein at its surface and two derivative mutants revealed the capacity of pili to interact with other surface proteins including mucus-binding proteins. This study demonstrates that pili are involved in *L. lactis* homotypic interactions and thus can influence biofilm structuring.

KEYWORDS: *L. lactis*, biofilm, pili, SCFS, adhesion force, rupture length, adhesion work

■ INTRODUCTION

Pili (Latin for hairs) or fimbriae (Latin for threads) are proteinaceous filaments found at the surface of Gram-negative and positive bacteria. Several roles have been assigned to these proteinaceous structures particularly in the interactions of bacteria with their biotic or abiotic environment. They have been described to be involved in initial bacterial attachment to host tissues to mediate bacterial aggregation and to facilitate colonization and virulence of Gram-negative^{1–3} and Gram-positive pathogenic bacteria.^{4–7}

Pili in Gram-positive pathogens were first observed in *Corynebacterium renale*, a pathogenic bacterium responsible of pyelonephritis, using electron microscopy in the 1960s.⁸ However, while their existence has been known for several decades, their structure and mode of assembly have been characterized at the molecular level more recently.⁹ In contrast to pili of Gram-negative bacteria that are made of non-covalently bound pilins, pili of Gram-positive bacteria are made of pilin subunits that are covalently assembled by a transpeptidase named sortase C and the resulting polymer is

ultimately anchored by sortase A to peptidoglycan in the cell wall.¹⁰ Similar to what has been observed in Gram-negative bacteria, the presence of pili on the surface of Gram-positive pathogens has been long known to play a key role in the interaction with other proteins in the extracellular matrix, thereby influencing bacterial adhesion and the biofilm structure on biotic surfaces.^{6,11} Pili in nonpathogenic bacteria were discovered more recently in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG,^{12–14} in commensal bifidobacteria,¹⁵ and also in the lactic acid bacterium (LAB) *Lactococcus lactis* present in various ecological niches such as plants and milk.¹⁶ In probiotic or commensal bacteria, pili could favor adhesion to the host intestinal mucosa and persistence in the gut. In regard

Received: February 17, 2020

Accepted: April 21, 2020

Published: April 21, 2020



ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

A

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

to *L. lactis*, in the plant niche, pili could play a role in tissue colonization, while in dairy environment, they could interact with milk components. Moreover, pilated recombinant *L. lactis* might also be more effective to deliver therapeutic proteins in the gut.^{17–19}

L. lactis strains contain a chromosome-borne *pil* operon that encodes a putative sortase C (SrtC) as well as three putative pilins (PilA, PilB, and PilC). Pili formation was not observed in the laboratory strain *L. lactis* IL1403 under standard growth conditions; however, overexpression of the *pil* operon resulted in the synthesis of detectable pili structures (up to 3 μ m in length with a diameter of 5 nm). PilB is the backbone of the pilus, covalently polymerized by the action of sortase C to form the filamentous structure of the pilus. PilA is the tip protein and PilC is the anchoring protein of the whole structure into the peptidoglycan layer. Mutants of the different proteins encoded by the *pil* operon from *L. lactis* IL1403 were then constructed to study the role of each pilus subunit in adhesion and biofilm formation. These investigations notably allowed to understand the role of pili in *L. lactis* adhesion to abiotic materials (polystyrene, stainless steel)²⁰ and in biofilm formation.¹⁶ The ability of pilated bacteria to stand on polystyrene under flow shear conditions was also studied, and the results showed that pili of *L. lactis*, and more particularly their backbones, were able to withstand a shear stress of more than 80 Pa, thereby showing their capacity to form strong adhesive bonds on abiotic surfaces.²⁰ In another study, optical tweezers were used to analyze the nanomechanical properties of single *L. lactis* pilus, which allowed to demonstrate that pili are highly flexible and inextensible structures.²¹ Finally, Oxaran et al.'s investigations¹⁶ demonstrated that pili of *L. lactis* are involved in the autoaggregation phenotype in liquid cultures and in the biofilm architecture, thus showing their crucial role in biofilm structuration and cell cohesion.

Pili were also characterized in a plant isolate of *L. lactis* (TIL448) with a backbone pilin (YhgE2) exhibiting 28% sequence similarity with PilB (YhgE) of *L. lactis* IL1403. In this strain, pili biosynthesis is encoded on a plasmid and assembly of pili was visualized without overexpression.²² These pili were shown to contribute to bacterial adhesion to epithelial cells and to mucins.^{22,23} During the 90s, AFM force spectroscopy has been developed to study, at the piconewton-scale, the interaction forces between individual molecules (ligand–receptor pairs, antibody–antigen, and complementary DNA strands).²⁴ More recently, single-cell force spectroscopy has been developed to measure intercellular and interbacterial interactions.²⁵ In example, the adhesion of *L. lactis* cells to pig gastric mucins has been investigated using this strategy and made it possible to decipher between the nonspecific and specific forces at play.²⁶ Regarding TIL448 and using AFM force spectroscopy, it was shown that both pili and a mucus-binding protein (Mub proteins) exposed at the bacterial surface contribute to adhesion of *L. lactis* TIL448 strains to mucins. Mub proteins are bacterial surface adhesins with typical signal peptide and C-terminal LPxTG, which contain multiple Mub domains (around 200 residues) and/or MucBP domains (around 50 residues).^{13,27,28} The comparative study of TIL448 and mutant derivatives expressing pili and Mub proteins or only pili or only Mub proteins enabled to elucidate the *L. lactis* muco-adhesive phenotype.²³ On AFM force–distance curves, showing the force recorded by the cantilever while it is approached and retraced from the surface, the authors observed rupture events both at short (100 to 200 nm)

and long distances (up to 600–800 nm) that they attributed, respectively, to Mub proteins and pili unfolding.²⁹ Moreover, the role of pili and Mub proteins in adhesion was investigated under shear stress conditions on the mucin layer.²³ The results of these experiments showed a more important contribution of the Mub protein compared to pili for the adhesion to the mucin layer.

In the process of biofilm formation, the interactions between cells are of first importance. In this intercellular adhesion, several kinds of molecules among which pili may play a crucial role³⁰ in the cohesion of cells in biofilm formation.

In the work presented here, the objective was to analyze homotypic interactions between pili at the single-molecule scale. To reach this goal we used an advanced AFM technique called single-cell force spectroscopy (SCFS) to probe the interactions between pili present on the surfaces of two individual bacteria, thereby allowing to characterize the nanomechanical properties of the pili–pili bond for *L. lactis* cells expressing more or less pili. The specificity of homotypic interactions was verified by monitoring the pili–pili interactions in the presence of anti-PilB antibodies. The rupture peaks observed on the obtained force curves were then described by the worm-like chain (WLC) model. The results unravelled the role of *L. lactis* pili in homotypic interactions of laboratory strain IL1403 mutants. Experiments conducted on the vegetal isolate TIL448 expressing both pili and Mub proteins further demonstrate the capacity of pili to interact with other surface proteins including Mub proteins. These findings are valuable to understand the influence of pili on adhesion, structuring, and cohesion of the cells during biofilm formation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions. Bacterial strains derived from *L. lactis* subsp. *lactis* used in this study are described in Table 1. Strains were grown in M17 broth (Oxoid) containing 0.5%

Table 1. *L. lactis* Strains Used in this Study

strains	genotype or phenotype	source/reference
VE17061	Pil [−] , control (pili minus)	16
VE17173	Pil ⁺ , over expression of the <i>pil</i> operon	16
VE17176	Pil ⁺⁺ , over expression of both the <i>pil</i> operon and the <i>srtA</i> gene	16
TIL448	Pil ⁺ /Mub ⁺ , vegetal strain isolated from peas	22
TIL1230	Pil [−] /Mub [−] , TIL448 derivative obtained by plasmid curing	22
TIL1289	Pil [−] /Mub ⁺ , TIL448 derivative obtained by disruption of the <i>yhgE2</i> gene encoding the backbone pilin, Ery ^R	22
TIL1290	Pil ⁺ Mub [−] , TIL448 derivative obtained by disruption of the <i>mub</i> gene encoding a mucus-binding protein, Ery ^R	22

(w/v) D-glucose (M17 Glc). When required, antibiotics were added to the medium to a final concentration of 5 μ g/mL for erythromycin (Ery) and tetracycline (Tet). The strains were incubated overnight at 30 °C under static conditions.

Bacterial Sample Preparation for AFM Measurements. Overnight cultures were obtained by inoculating 500 μ L of a cell suspension from frozen stock in 10 mL of medium. Cultures were harvested by centrifugation (1000 g, 10 min, at room temperature). The cell pellet was resuspended in phosphate-buffer saline (PBS 1X) solution at pH 7.4 and then diluted up to an optical density of 0.02 at 600 nm to obtain isolated cells. These cells were then immobilized on dopamine-coated glass coverslips. Briefly, glass coverslips were

B

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

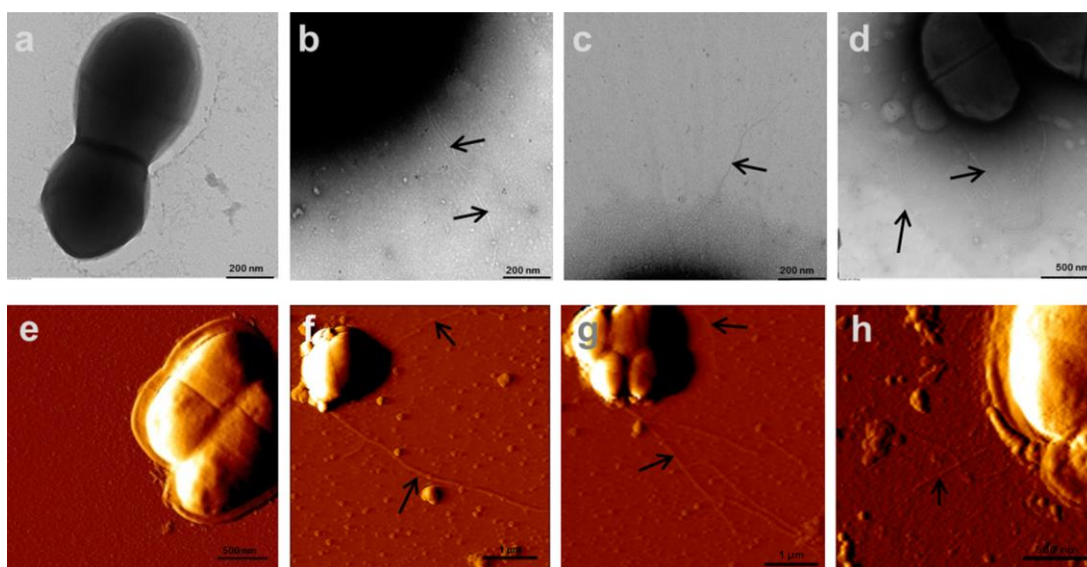


Figure 1. TEM and AFM images of *L. lactis* pili. TEM images obtained after negative staining of (a) control Pil[−] VE17061, (b) Pil⁺ VE17173, (c) Pil⁺⁺ VE17176, and (d) Pil⁺/Mub⁺ TIL448 strains. AFM contact imaging in air of (e) Pil[−] VE17061, (f) Pil⁺ VE17173, (g) Pil⁺⁺ VE17176, and (h) Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strains. The pili are indicated on the images by the black arrows.

cleaned for 5 min using oxygen plasma and immersed for 48 h in a PBS 1X solution containing 4 mg/mL of dopamine hydrochloride (99%, Sigma). They were then rinsed in Milli-Q-grade water and ethanol and dried under nitrogen. A total of 50 μ L of the diluted bacterial suspension was then applied to the dopamine-coated glass coverslip, allowed to stand for 30 min at room temperature, and directly used for AFM single-cell force spectroscopy (SCFS) experiments.

AFM Single-Cell Force Spectroscopy Experiments. Cell probes were prepared using the protocol described in Beaussart et al. Briefly, colloidal probes were obtained by attaching a single silica microsphere (5 μ m diameter, Bangs Laboratories) with a thin layer of UV-curable glue (NOA 63, Norland Edmund Optics) on triangular tipless cantilevers (NP-O10, Bruker, USA) and using a Nanowizard III AFM (Bruker USA). Cantilevers were then immersed for 1 h in PBS 1X containing 4 mg/mL of dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich), rinsed in PBS 1X, and used directly for cell probe preparation. The nominal spring constant of the colloidal probe cantilever was ranging from 0.03 to 0.06 N/m, as determined by the thermal noise method.³¹ The colloidal probe was then brought into contact with an isolated bacterium and retracted to attach the bacterial cell. Proper attachment of the cell on the colloidal probe was checked using optical microscopy. Cell probes were used to measure cell–cell interaction forces at room temperature, using a maximum applied force of 1 nN, a constant approach retraction speed of 2.0 μ m/s, and a contact time of 0.5 s. Data were analyzed using the Data Processing software from JPK Instruments (Bruker, USA). Adhesion force and work of adhesion histograms were obtained by calculating the maximum adhesion force and the area under the retract curve, respectively, for each force curve obtained. Unless stated otherwise, for each condition, experiments were repeated for three bacteria coming from independent cultures.

AFM Imaging of *L. lactis* Pili. Bacteria were grown overnight at 30 °C under static conditions. The following day, 50 μ L of the cell suspension was diluted in 5 mL of PBS 1X. A drop of 50 μ L of the diluted cell suspension was then immobilized on freshly cleaved mica surfaces and incubated at 30 °C for 3 h. The mica surfaces were then rinsed three times in Milli-Q water, and the samples were dried in an

incubator at 30 °C for 2 h. Surface topography images of dried bacteria were recorded using AFM in contact mode in air at room temperature, using MLCT cantilevers (Bruker, USA, nominal spring constant of $\sim$ 0.01 N/m, as determined using the thermal noise method) with a scanning rate of 1 line/s and a resolution of 512 $\times$ 512 lines.

Transmission Electron Microscopy of *L. lactis* Pili. To check for the presence of pili on the surface of *L. lactis* strains used in this study, transmission electron microscopy (TEM) and a negative staining procedure were used. Bacterial suspensions from overnight cultures were harvested by centrifugation (1000 g, 10 min at room temperature) and washed in PBS 1X. Bacterial cells were then fixed using paraformaldehyde (PFA) 3% during 30 min at room temperature. Formvar carbon-coated copper grids were rinsed in a drop of fixed bacteria and allowed to stand for 3 min for the bacterial cells to adsorb over the material. Staining was performed in uranyl acetate (0.2%) during 20 s after washing the grids in Milli-Q water. The grids were dried using a Whatman grad cellulose filter paper. Samples were observed at 75 kV with an H-600 TEM (Hitachi, Japan) equipped with a 1024 $\times$ 1024 pixel format orca CCD camera. Result images were treated using imageJ software.

RESULTS

Visualization of Pili in Different *L. lactis* Strains. As a first step, we checked for the absence/presence of pili at the surface of different *L. lactis* strains (Table 1) in our growth conditions, using both transmission electron microscopy (TEM) (representative images: Figure 1a–d) and AFM contact imaging in air (representative images: Figure 1e–h). As expected, both TEM micrographs and AFM images showed pili exhibiting filamentous structures at the surface of cells from strains VE17173 (Figure 1b,f), VE17176 (Figure 1c,g), and TIL448 (Figure 1d), referred to as Pil⁺, Pil⁺⁺, and Pil⁺ Mub⁺, respectively. As expected, no pili were observed at the surface of cells from the Pil[−] VE17061 control strain (Figure 1a,e). Higher numbers of pili were detected in the Pil⁺⁺ VE17176 strain than in the Pil⁺ VE17173 strain, consistent with previous

C

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

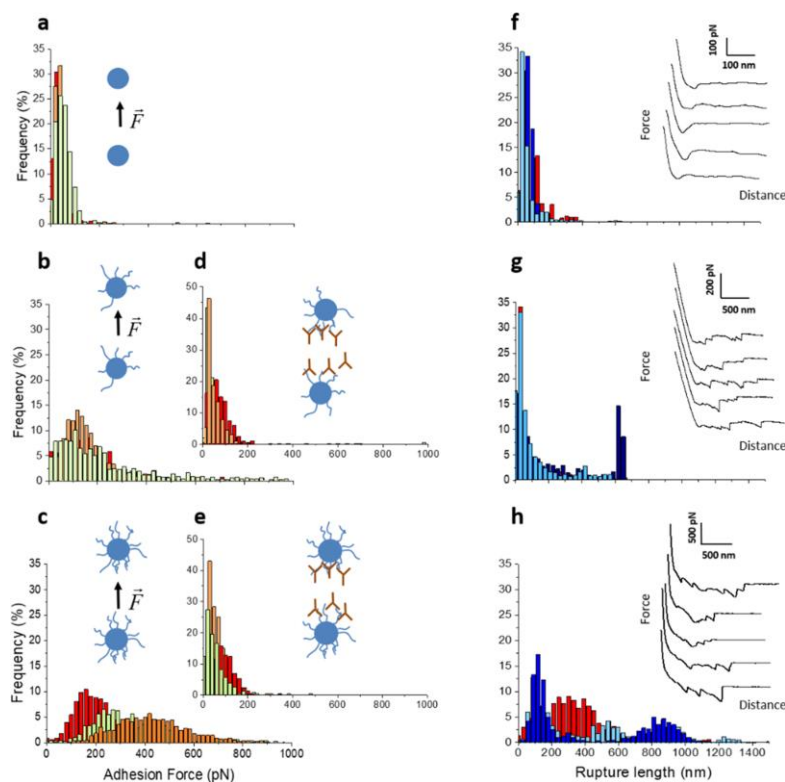


Figure 2. *L. lactis* pili mediate homotypic interactions between cells. Pili–pili interactions are measured between cell pairs of individual bacteria using single-cell force spectroscopy. Histograms representing the (a–e) adhesion force, (f–h) rupture lengths, and typical retraction force curves, obtained by recording force curves between cells of (a, f) the Pil[−] control VE17061, (b, g) the Pil⁺ VE17173, and (c, h) the Pil⁺ VE17176 strains were reported. For each strain, three independent experiments were conducted (one experiment means three pairs (corresponding to the three colors) of independent cells). The results presented here relate to one experiment and were representative of the three experiments (the two others are presented in Figure S3: homotypic interactions between the Pil[−] VE17061 cells, Figure S4: homotypic interactions between the Pil⁺ VE17173 cells, and Figure S5: homotypic interactions between the Pil⁺ VE17176 cells). The total number of analyzed force curves per strain was above 3000 and above 1000 for each histogram. Force measurements performed in the presence of anti-YhgE antibodies in (d) the Pil[−] VE17173 and (e) the Pil⁺ VE17176 strains were reported. $n > 1000$ for three pairs cells, representative of three experiments.

western blot analyses in which the former produced greater amounts of oligomerized pilins than the latter.¹⁶ In Figure 1, the pili are indicated by the black arrows. In the Pil⁺ VE17173 strain, the lengths measured were ranging from 200 to 4400 nm and in average 1178 ± 1074 nm. The Pil⁺ VE17176 and the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strains showed pili lengths between 250 to 4100 nm and 600 to 5500 nm, respectively. The average lengths were 1424 ± 1012 nm for the Pil⁺ VE17176 strain and 2930 ± 1884 nm for the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strain. As shown in Figure 1c,d,g, pili were tangled and extremely thin with width ranging from 5.22 to 9.32 nm and the average was 6.7 ± 1.3 nm.

Cell–Cell Interactions Are Dominantly Mediated by Pili. Then, in the second step, our goal was to characterize, at the molecular level, the homotypic interactions between pili from different *L. lactis* strains used in this study (Table 1). For this purpose, we used single-cell force spectroscopy

(SCFS),^{32,32,33} as described in the Materials and Methods section. The adhesion force measurements recorded between pairs of cells from each strain type are presented in Figure 2. It showed the result of typical force curve analyses obtained for three cells pairs (three different colors) coming from one culture (the results from two other cultures are presented in Figures S3: homotypic interactions between the Pil[−] VE17061 cells, Figure S4: homotypic interactions between the Pil⁺ VE17173 cells, and Figure S5: homotypic interactions between the Pil⁺ VE17176 cells). For each force curve, the adhesion force (Figure 2a–c), rupture length (Figure 2e–g), and adhesion work values (Figure 3a–c) were extracted. The quantification of the adhesion frequency (19.1% of adhesive curves) showed that the Pil[−] VE17061 control strain cells that do not display pili adhered weakly to each other with adhesion forces in the range of 47 ± 30 pN (mean $\pm$ SD; total number of force curves = 1225 from three different cell pairs) and an

D

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

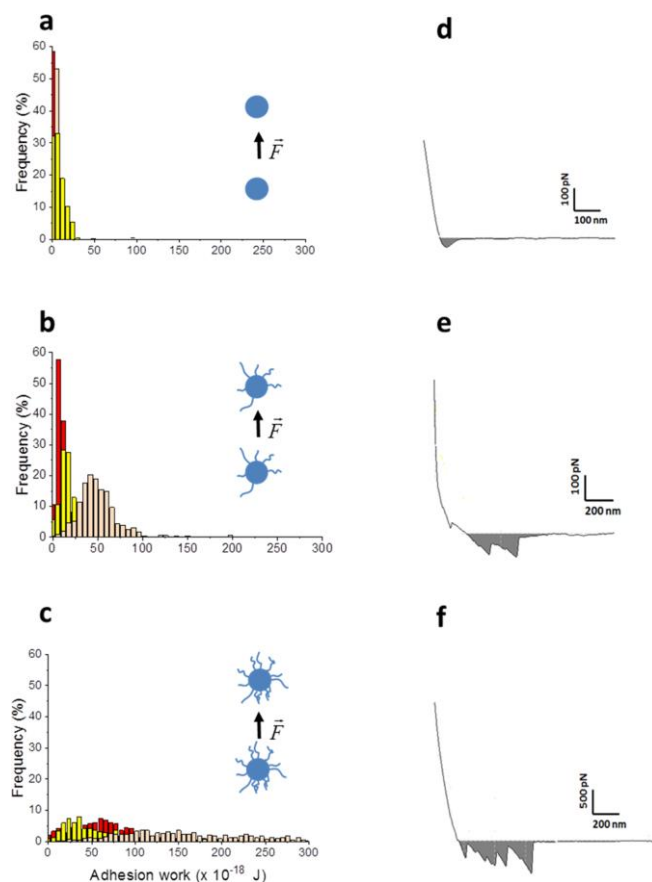


Figure 3. Role of pili–pili homotypic interactions in *L. lactis*–*L. lactis* adhesion work. Frequency histograms and typical force distance curves showing the adhesion work observed for (a) the Pil[−] VE17061 control strain, (b) the Pil⁺ VE17173, and (c) the Pil⁺ VE17176 strains. The adhesion work is expressed in joule ($\times 10^{-18}$ J) and is determined by measuring the area under the force–distance curves as exemplified on panels (d–f). For each strain, three independent experiments were conducted (one experiment means three pairs of independent cells).

average rupture distance of 52 ± 40 nm. In pilated strains, higher adhesion frequencies were found, i.e., 78.0% in Pil⁺ VE17173 and 90.1% in Pil⁺ VE17176 strains. The adhesion forces ranged from 150 ± 60 to 198 ± 99 pN (mean $\pm$ SD; total number of force curves = 1817 from three different cell pairs) for the Pil⁺ VE17173 strain and from 182 ± 75 to 452 ± 150 pN (mean $\pm$ SD; total number of force curves = 2914 from three different cell pairs) for the Pil⁺ strain. As for the rupture lengths, they reached 634 ± 103 nm for the Pil⁺ VE17173 strain and 874 ± 147 nm for the Pil⁺ VE17176 strain. Force curves recorded for pilated strains showed multiple adhesive events that were absent in the Pil[−] VE17061 control strain suggesting that they were related to pili–pili interaction (see below). To further investigate this point, we performed several control tests in which we probed the interactions between pilated and pili-devoided control strain cells (Supporting Information, Figure S1: heterotypic interaction between Pil⁺ VE17173 and Pil[−] VE17061). This showed

a weak adhesion force (73 ± 47 pN) similar to the interaction between cell pairs of the control strain. Moreover, other control tests were performed to study the specificity of pili–pili interactions. To go one step further in the probing of pilus–pilus interactions, we reasoned that because the pilus backbone is constituted of oligomers of the YhgE pilin and because these oligomers have been shown to be the essential determinant for the adhesion of pilated cells under shear flow conditions,²⁰ anti-YhgE antibodies¹⁶ should be able to block pilus–pilus interactions. As reported in Figure 2d,e, major reductions in the adhesion force (24.1 ± 11.6 to 64.8 ± 43.8 pN for the Pil⁺ VE17173 strain and 31.4 ± 22.5 to 75.2 ± 55.3 pN for the Pil⁺ VE17176 strain) were monitored thus proving that the interactions probed were indeed due to interactions between YhgE pilins.

To further probe the homotypic interactions between pili, we determined the work of adhesion involved. The adhesion work was calculated as the area between the retract force curve

E

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

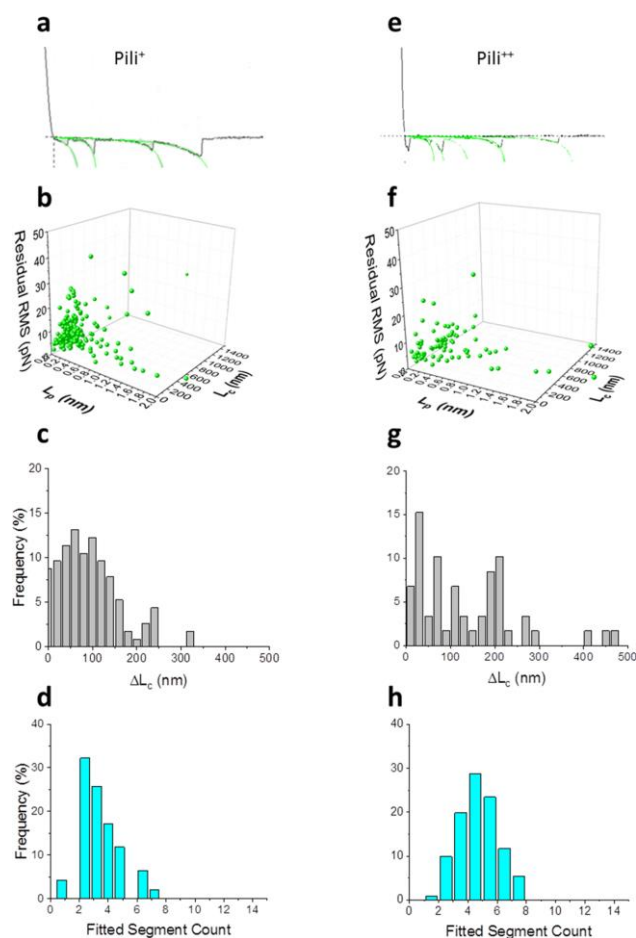


Figure 4. Pili–pili homotypic interaction: analysis of the force signature. Unfolding curves were fitted using the worm-like chain model (WLC). (a, e) Typical unfolding curves (black lines) respectively from the Pil⁺ VE17173 and Pil⁺⁺ VE17176 strains and typical fits (green lines). The contour length (L_c), persistence length (L_p), and RMS residual relations are presented in (b) and (f). The distance between (c, g) two consecutive rupture (ΔL_c) and (d, h) the number of fitted segment per curve respectively from the Pil⁺ VE17173 and the Pil⁺⁺ VE17176 strains were analyzed.

and the baseline of this force curve, as illustrated in Figure 3d–f. The results presented in Figure 3a–c showed that interactions between cells of pilated strains engage an important energy, ranging from $15 \times 10^{-18} \pm 7$ to $47 \times 10^{-18} \pm 15$ joule (J) for the Pil⁺ cells and up to $108 \times 10^{-18} \pm 27$ J for the Pil⁺⁺ ones, compared to the Pil[−] control strain that engages only $7 \times 10^{-18} \pm 0.5$ J. These values indicate stronger interactions between pilated cells and suggest that pili play a crucial role in adhesion of cell to cells.

Force Curve Signatures Description Using the Worm-like Chain (WLC) Model. To understand, at the physical level, the different force peaks observed during the extension of a pilus–pilus complex (or pili–pili complex) (Figure 2e–g), we used the WLC model. The WLC model is commonly used to describe the force–extension response of linear polymers

that undergo thermal fluctuations. This model is usually used to describe macromolecule extension and is expressed in the following equation:^{34–36}

$$F(x) = -k_b T / L_p [1/4(1 - x/L_c) - 2 + x/L_c - 1/4]$$

where F is the force (N), k_b is the Boltzmann constant (J/Kelvin), T is the temperature (Kelvin), L_p is the persistence length (m), L_c is the total contour length (m) of the macromolecule, and x is the molecule extension (m). Other conformational parameters were determined such as the distance between two consecutive ruptures (ΔL_c) (Figure 4c,g), the number of fitted segment per force curve (Figure 4d,h), and the fitting quality, evaluated by the residual Root Mean Square (residual RMS) values. The fitting of typical unfolding force curves (Figure 4a,e) respectively from the Pil⁺

F

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

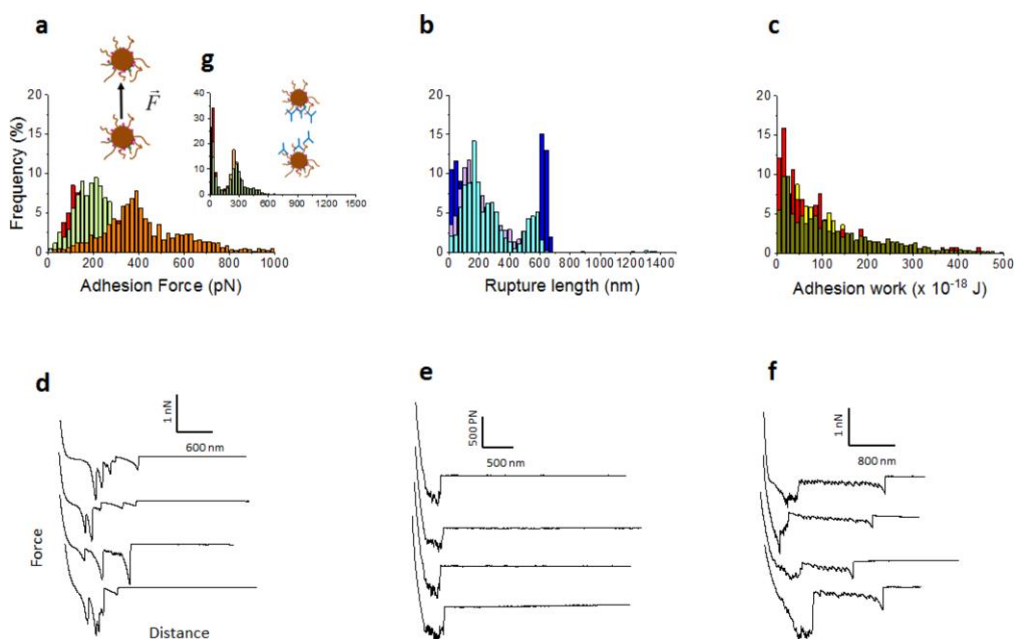


Figure 5. Cell–cell interactions of the plant isolate *L. lactis* TIL448 involve pili–pili homotypic interactions and more complex interactions. (a–c) Histograms of the adhesion force, rupture length, and adhesion work of the self-interaction of TIL448, respectively. (d–f) Representative of the three types of force curves recorded for this self-interaction. Force curves of three pairs of cells, representing three independent experiments, have been analyzed ($n > 1000$). Force measurements were also performed in the presence of anti-YhgE, and the histogram frequency of the adhesion force is represented in (g) ($n > 1000$).

VE17173 ($n = 92$) and the Pil⁺⁺ VE17176 strains ($n = 50$) were analyzed. The frequency distribution of L_c , L_p , and residual RMS values are presented on 3D graphs in Figure 4b,f. The L_p values obtained for both the Pil⁺ VE17173 and the Pil⁺⁺ VE17176 strains were in between 0.05 and 0.6 nm and reach 1 nm at maximum. The L_c values were variable and ranged from 50 to 800 nm for the Pil⁺ VE17173 strain and from 100 to 1000 nm for the Pil⁺⁺ VE17176 strain. The fit parameters were those providing the lowest RMS values, or in other words, those providing the best quality of the fit. We found the smallest residual RMS when L_p and L_c were freely adjustable parameters. Indeed, the residual RMS on L_p and L_c for the Pil⁺ VE17173 strain or the Pil⁺⁺ VE17176 strain were found to be 3 and 6.7 pN, respectively, in the case of freely adjustable parameters, and increased up to 379 pN in the case of an L_p value fixed to 0.4 nm (Supporting Information, Figure S10: analysis of various force signatures obtained in pili–pili interactions between the Pil⁺⁺ VE17176 cells and Figure S11: analysis of various force signatures obtained in pili–pili interactions in Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strains).

In these conditions, we found ΔL_c values between 25 and 200 nm and three to four unfolding events (corresponding to the number of interacting pili) for the Pil⁺ VE17173 strain (Figure 4c,d). As for the Pil⁺⁺ VE17176 strain, the ΔL_c values ranged from 25 to 300 nm (Figure 4g) and the numbers of fitted segment were of 5 to 6 (Figure 4h). These values of L_p (which are small, i.e., in the range of 0.05 to 0.6 nm), L_c (up to 800 nm), and ΔL_c (up to 300 nm) measured in both Pil⁺

VE17173 and Pil⁺⁺ VE17176 strains indicate that pili are long, rigid, but flexible biopolymers. This results in long range interactions between cells that are hydrodynamically stable.⁵⁰ The interactions exhibited, randomly, different lengths, as it can also be seen in the microscopic images (Figure 1).

Cell–Cell Interactions in a Plant Isolate *L. lactis* TIL448. In order to strengthen the above conclusions, we decided to challenge our results obtained with engineered laboratory strains by comparing them with those obtained in an environmental strain that naturally produces pili (TIL448). To reach this goal, we studied the interactions between two TIL448 cells. *L. lactis* TIL448 not only produces pili but also produces Mub proteins known for their adhesive properties to mucin layers. Using SCFS experiments, the adhesion between individual cell pairs was measured with three independent cell pairs (Figure 5) showing large adhesion forces ranging from 197 ± 83 to 372 ± 82 pN ($n = 3795$ force curves in Figure 5a) on almost all the recorded force curves (the adhesion frequency is 97.9%). The rupture length was as high as 627 ± 21 nm (Figure 5b) and could reach $1.2 \mu\text{m}$ (shown in Figure S6: homotypic interactions between the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 cells). These values, in addition to the adhesion work values over $50 \times 10^{-18} \pm 16$ J (Figure 5c), were of the same order of magnitude to that of the adhesion frequency, force, rupture distance, and work obtained with the laboratory pilated strains (Pil⁺ and Pil⁺⁺). To challenge the importance of pili in the interactions measured, we once again performed the blocking test by adding anti-YhgE antibody in the solution; this

G

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

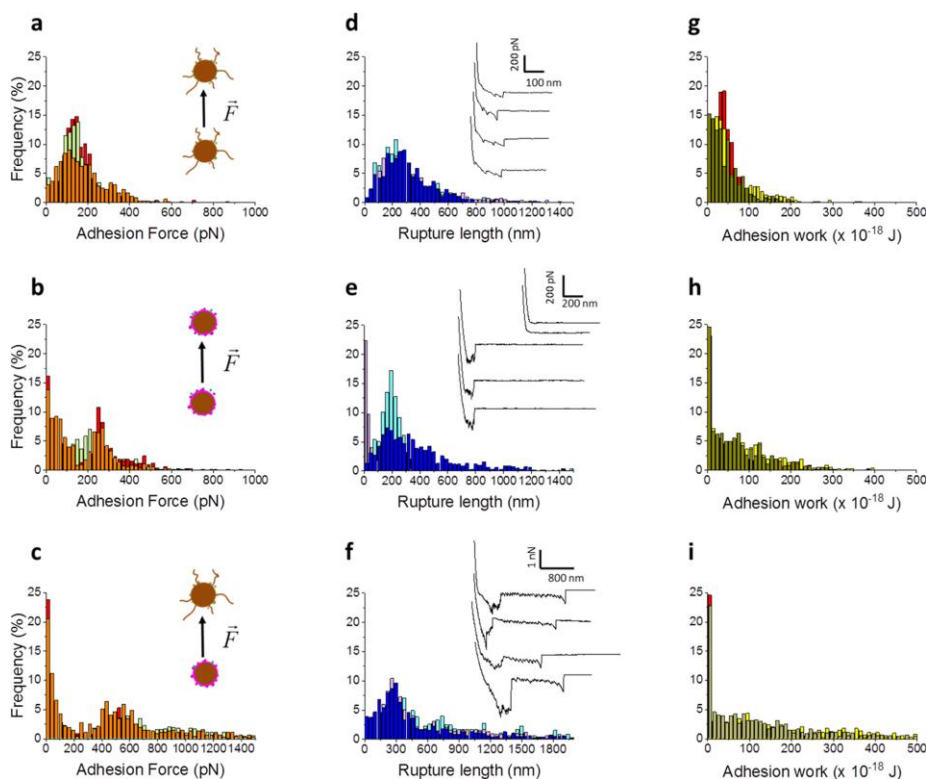


Figure 6. Analysis of cell–cell interactions on mutants from TIL448. (a–c) Adhesion frequency, (d–f) rupture distance and typical force distance curves, and (g, h, i) adhesion work were measured between cell pairs of (a, d, f) Pil⁺ Mub[−] TIL1290, (b, e, h) cell pairs of Pil[−] Mub⁺ TIL1289, and heteropairs of TIL1290 with TIL1289. Each condition has been tested three times with three pairs using cells coming from independent cultures. The results presented here are coming from three pairs, representative of the three independently performed experiments. The other two cultures are in Figure S7: homotypic interactions between Pil⁺ Mub[−] TIL1290 cells, Figure S8: homotypic interactions between Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells, and Figure S9: heterotypic interactions between Pil⁺ Mub[−] TIL1290 and Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells.

resulted in a dramatic decrease in the adhesion rate to only 30.3% (Figure 5g).

By taking a closer look at the force curves obtained, we were able to decipher three different classes of signatures (examples showed in Figure 5d–f) indicating different types of interaction modes probably resulting from different molecules interacting with each others at the surface of TIL448 cells.

To identify the nature of these different interacting proteins and their correspondence to the typical force curves observed in Figure 5d–f, we used three TIL448 strain derivatives (Table 1): Pil⁺ Mub[−] TIL1290, Pil[−] Mub⁺ TIL1289, and Pil[−] Mub[−] TIL1230. Using these strains, we analyzed both homotypic interactions for each strain and heterotypic interactions taking place between the Pil⁺ Mub[−] TIL1290 strain and Pil[−] Mub⁺ TIL1289 strain.

In the Pil⁺ Mub[−] TIL1290 strain, cell–cell interactions showed that the adhesion force, rupture length, and adhesion work were 130 ± 55 pN, 255 ± 138 nm, and $39 \times 10^{-18} \pm 11$ J, respectively, for 89.7% of the force curves (Figure 6a,d,g) (mean $\pm$ SD; total number of force curves = 1319 and from

three different cell pairs). The other two cultures are in Figure S7: homotypic interactions between Pil⁺ Mub[−] TIL1290 cells. The force curve shape between Pil⁺ Mub[−] TIL1290 cells was very similar to those obtained above with the Pil⁺ and Pil⁺⁺ strains (Figure 2f,g), indicating that the pili–pili interactions had a specific force signature corresponding to Figures 4a,e, 5d, or 6d). For the Pil[−] Mub⁺ TIL1289 strain, we observed both a high level of nonadhesive events (63.4%) and a high adhesion force (36.6% of curves) of 255 ± 23 pN (Figure 6b). The rupture length (Figure 6e) was measured to be 202.0 ± 0.2 nm and most of the cells (63.4% of force curves) showed low energy ($9.1 \times 10^{-18} \pm 10.4$ J), while a high energy ($38.8 \times 10^{-18} \pm 17$ J) was observed for only 36.6% of force curves (Figure 6h). The force curve signatures presenting a sawtooth-shaped pattern are comparable to those observed in Figure 5e corresponding to Mub protein unfolding. The interaction between the Pil⁺ Mub[−] TIL1290 and Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells ($n = 2227$ force curves) (Figure 6c,i) showed nonadhesive frequency for 55.9% of the force curves and only 44.1% present a high adhesion force (559 ± 165 pN) and work of adhesion

H

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

Table 2. Summary Table of Results^a

strains	Pil/Mub	adhesion frequency (%)	adhesion force (pN)	rupture distance (nm)	adhesion work ($\times 10^{-18}$ J)	L_c (nm)	L_p (nm)	ΔL_c (nm)	number of fitted segments	RMS (pN)
VE17061	—/—	19.1	47 $\pm$ 30	52 $\pm$ 40	7 $\pm$ 0.5	nd	nd	nd	nd	nd
VE17173	+/-	78.0	150 $\pm$ 60 to 198 $\pm$ 99	reach 634 $\pm$ 103	15 $\pm$ 7 to 47 $\pm$ 15	50 to 800	0.05 to 0.6	25 to 200	3 to 4	6.7
VE17176	++/-	90.1	182 $\pm$ 75 to 452 $\pm$ 150	874 $\pm$ 147	up to 108 $\pm$ 27	100 to 1000	0.05 to 0.6	25 to 300	5 to 6	3.0
TIL448	+/+	97.9	197 $\pm$ 83 to 372 $\pm$ 82	up to 627 $\pm$ 21	over 50 $\pm$ 16	nd	nd	nd	nd	nd
TIL1230	—/—	16.8	29 $\pm$ 16	59 $\pm$ 32	5.3 $\pm$ 1.5	nd	nd	nd	nd	nd
TIL1289	-/+	36.6	255 $\pm$ 23	202 $\pm$ 0.2	38.8 $\pm$ 17	200 to 600	0.051	50	8 to 10	20.0
TIL1290	+/-	89.7	130 $\pm$ 55	255 $\pm$ 138	39.1 $\pm$ 11	200 to 1200	0.05 to 0.15	25 to 250	12 to 18	6.7
TIL1290/ TIL1289	+/- -/+	44.1	559 $\pm$ 165	up to 1500 $\pm$ 95	131 $\pm$ 125	300 to 1500	until 0.2	50	12 to 18	10.0

^and = not determined.

($131 \times 10^{-18} \pm 125$ J). The rupture length was up to 1500 ± 95 nm. The analysis of the different force curves shows three different profile types. Among the adhesive curves, some showed typical Mub protein unfoldings while others were similar to those observed in Figure 5f and included the detachment of Mub protein before the sliding of pili on the Mub protein. The hypothesis is that several Mub proteins on the cell surface act as adhesins along the pili. The force applied on the pili then results in successive detachment of Mub–pili interactions, which we called sliding and was also described as zipper interactions in *L. rhamnosus* GG.¹⁴

Finally, and as expected, the Pil[−] Mub[−] TIL1230 strain showed a dramatic decrease in the adhesion force, distance rupture, and adhesion work to 29 ± 16 pN, 59 ± 32 nm, and $5.3 \times 10^{-18} \pm 1.5$ J, respectively (Supporting Information, Figure S2: homotypic interaction in TIL1230).

To facilitate the comparison between strains, the results concerning the adhesion, force and work, rupture distance, adhesion frequency, etc., are gathered in a recapitulative table (Table 2).

Description of Various Force Signatures in the Plant Isolate *L. lactis* TIL448. Similar to pilated derivatives from IL1403 strains (Table 1), the different force peaks obtained in TIL448 cell interactions were well described by the WLC model. The typical force curves for pili (Figure 7a) and Mub protein (Figure 7e) unfolding and the signatures resulting of the sliding of pili to Mub proteins (Figure 7i) were analyzed. For pili signatures, as shown in Figure 7b, the L_p values were between 0.05 to 0.15 nm, the L_c values were from 200 to 1200 nm, and the ΔL_c were variable (between 25 to 250 nm) (Figure 7c). The number of fitted segment varied between 2 and 6 (Figure 7d). These values were similar to those found with the laboratory IL1403 pilated strains. Figure 7f shows that the L_p and L_c values of Mub protein unfolding (sawtooth signatures) were more homogeneous and about 0.051 nm and from 200 to 600 nm, respectively. The ΔL_c value was fixed at 50 nm (Figure 7g) and the number of fitted segments from 8 to 10 (Figure 7h). The ΔL_c value was also at 50 nm (Figure 7k) when we analyzed the peak obtained by the pili sliding on Mub proteins (sawtooth signatures and the last corresponds to the pili detachment, Figure 7i). The L_p was up to 0.2 nm, the L_c was between 300 to 1500 nm (Figure 7j), depending on the length of the pili sliding on the Mub proteins. The number of fitted segments was 12 to 18 (Figure 7l). All the fits had

residual RMS values below 20 pN demonstrating the good fitting quality compared to the values obtained when we fixed L_p to one value (Supporting Information, Figure S12: analysis of various force signatures of Mub proteins obtained in the interactions between the Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells, Figure S13: analysis of various force signatures obtained in the interactions between the Pil⁺ Mub[−] TIL1290 and the Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells).

DISCUSSION

For several decades, most of the investigations on pili were conducted in pathogens because of their role in colonization, infection, and virulence.^{1,4,37} It was only recently that pili were also evidenced and characterized in food and probiotic bacteria such as *L. lactis* or *Lactobacillus rhamnosus* GG.¹³ In this study, we raised the question of the pili function in the group of lactic acid bacteria (LAB).

LAB were natural inhabitants of agricultural products such as plants and milk and they were used as starters in a number of food fermentation processes. As such, LAB were likely to occur as biofilms on various food (processing) surfaces and host mucosal cells.^{38,39} In this regard, the role of pili in mucin and collagen binding, the two major extracellular components of host epithelial layers, have been extensively investigated in *L. rhamnosus*.¹⁴ Further, single-cell approaches were used to probe interactions of LAB cells through their surface proteins, in order to understand biofilm formation in positive or detrimental situations.

In laboratory strains, the results showed that pilated strains reached an adhesion force of ~ 600 pN while it was less than 100 pN for control cells. These results suggested that pili are involved in the interactions between cell pairs. In addition, we observed a difference in adhesion force between cell pairs from the same culture and between Pil[−] and Pil⁺⁺ bacteria suggesting that (i) the number of pili at the bacterial surface is not constant and (ii) the number of pili can influence the adhesion abilities. To clear this point, we performed several control experiments including the one presented in Figure S1: heterotypic interaction between Pil⁺ VE17173 and Pil[−] VE17061. This revealed weak adhesion force and work combined with short rupture length, clearly demonstrating that such interactions have no role in cell–cell interactions. To further validate the direct implication of homotypic interactions of pili in cell–cell interactions, we used anti-YhgE

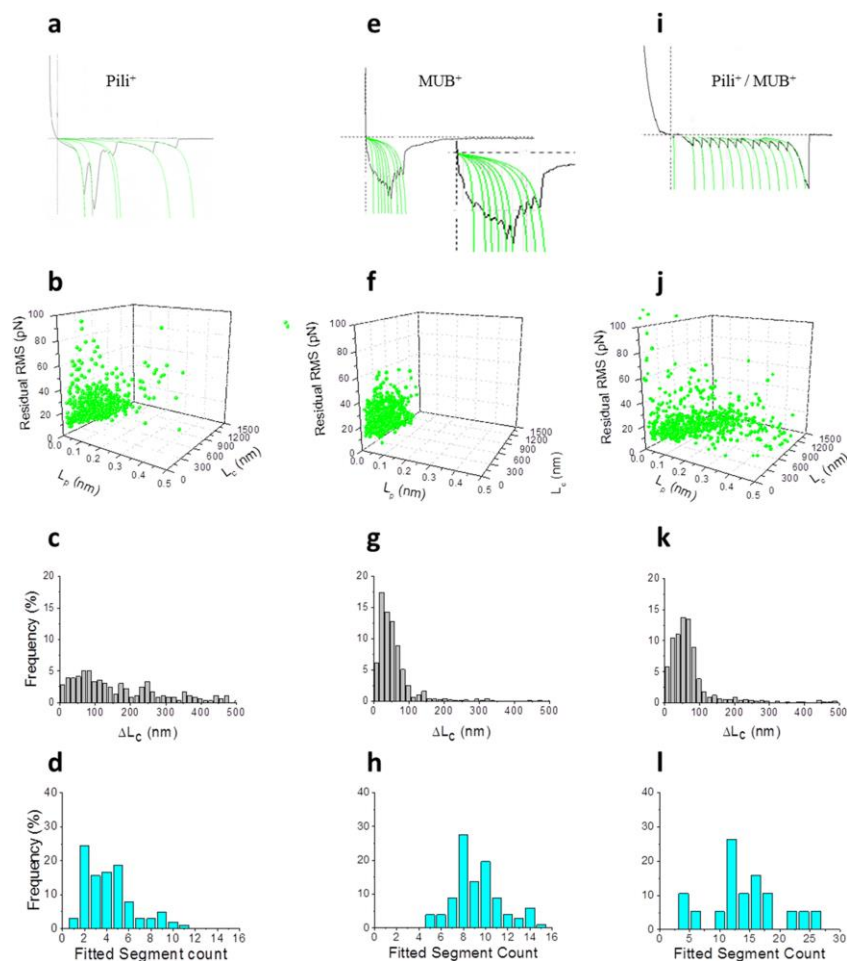


Figure 7. Physical analysis of various force signatures obtained in homotypic interactions for the vegetal isolate TIL448 and its derivatives. Typical unfolding curves from (a) Pil⁺ Mub⁺ and (e) Pil⁺ Mub⁺ (i) were fitted (green lines) with the WLC model. The fitting of 100 typical force curves was made, and the persistence length (L_p), contour length (L_c), and residual RMS are represented in (b), (f), and (j), respectively. (c, g, k) Distance between two consecutive rupture (ΔL_c) and (d, h, l) number of fitted segment per curve were analyzed.

antibodies to block the pili–pili interactions. Blocking pili–pili interactions with anti-YhgE antibodies resulted in a major reduction in adhesion forces, work, and distance rupture, thus showing the central role of the pili backbone (YhgE or PilB) in the homotypic interaction. The histograms of the blocking experiment in TIL448 (inset in Figure 5g) were similar to the interactions between Pil⁺ Mub⁺ TIL1289 cells (Figure 6b) or between Pil⁺ Mub⁺ TIL1290 and Pil⁺ Mub⁺ TIL1289 cells (Figure 6c). These observations demonstrated the implication of pili in homotypic cell–cell interactions in both laboratory and environmental strains. This was consistent with a previous report focused on the specific interactions between small adhesins along the pili of *L. rhamnosus* GG.¹⁴ Indeed, the authors in this study concluded that pili have multisite

attachment and may have an important functional role in strengthening bacterial–bacterial interactions in the intestinal environment.

Another interesting parameter to better describe the role and function of pili homotypic interactions in cell–cell adhesion was the work of adhesion. The low values measured for control strains (less than 10×10^{-18} J) were in line with those found by Wang et al.⁴⁰ in control cells of *Klebsiella pneumoniae*, a Gram-negative bacteria, able to produce type 3 fimbriae (pili-like). In this study, the adhesion work was 17×10^{-18} to 19×10^{-18} J for type 3 fimbriae-producing bacteria and 11×10^{-18} J in the fimbriae-deficient strain. These values were in the same order of magnitude with those obtained here in the Pil⁺, Pil⁺, and Pil⁺ strains ($7 \times 10^{-18} \pm 0.5$ J, $15 \times 10^{-18} \pm 7$ to $47 \times$

J

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

$10^{-18} \pm 15$ J, and up to $108 \times 10^{-18} \pm 27$ J, respectively). These congruent values illustrate favorable interactions between piliated cells and suggest that pili play a crucial role in cell–cell adhesion. This was consistent with previous observations of the tight aggregation phenotype of piliated *L. lactis* cells in liquid culture and with the structuration of piliated lactococci biofilms.¹⁶

The analysis of rupture event distances (Figure 2f,g and Figure 6d) showed the existence of short and long distances (up to 1500 ± 95 nm), which were coherent with the differences in pili length observed in the images presented in Figure 1. The force signatures of pili from *L. lactis* strains were different from those described in *L. rhamnosus* GG, which showed sawtooth patterns composed of multiple small force peaks corresponding to the detachment of small adhesins along the pili.¹⁴ However, in the environmental Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strain, no adhesins along the pili were found (Figures 5d and 6d), but sawtooth patterns, due to the sliding of the pili on Mub proteins, were observed. These Mub proteins do not interact with each other (data not shown) but rather with other components of the cell surface or other surface proteins including pilins. The sliding of pili on Mub proteins was observed in retraction profiles and showed sawtooth patterns (Figures 5f and 6f). This confirms the interaction between pili and Mub proteins. The interactions between pili and other surface proteins, such as milk proteins, were also demonstrated in *L. rhamnosus* GG^{14,41,42} and can be related to the better ability of these strains to form biofilms and interact with the proteins of the extracellular matrix.

The unfolding of both the pili–pili and pili–Mub interactions were described by the WLC model, which has often been used to analyze the unfolding of polypeptidic molecules. In this model, the unfolded macromolecule was considered as an irregular curved filament, which was linear at the scale of the persistence length L_p . In addition to L_p , other parameters such as contour length L_c and ΔL_c were also extracted from the data. L_c is the length of the fully extended molecule and ΔL_c is the distance in between each unfolding peak. L_p , L_c , and ΔL_c were key parameters to describe and to understand the unfolding profiles that were obtained. The L_p values ranged from 0.05 to 0.6 nm, which is close to the values found by Lu et al. on type IV pili in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ($L_p = \sim 0.8$ nm) and to the L_p values found by Fahs et al.⁴³ (0.02 to 0.7 nm) for the pili of *L. rhamnosus* GG. These two studies both used the same physical model as we did (WLC model). Fahs et al.⁴³ and Guerin et al.⁴² explained that the low values of L_p were related to a weak potential of deformation. This means that pili were most probably rigid structures. Our data were in line with these interpretations that were also confirmed by Castelain et al.²¹ in their study of pili using optical tweezers. Moreover, Miller et al.⁴⁴ also showed that the low value of the L_p meant that the globular subunit of PilB was not unfolded but that the pili polypeptidic chain was stretched.⁴⁴ The variability of the L_c values (between 50–1500 nm) showed that pili were made of macromolecules of different lengths. L_c reflects the distance between two cells when the pili–pili interaction vanished.⁴⁵ The differences in L_c values can be explained by the variation in the number of polymerized monomers (100 to 200 monomers¹⁶) that form the backbone of the pili. Our result for L_c were comparable with the values obtained by Rheinlaender et al.⁴⁶ with the pili of *Corynebacterium diphtheria*. Using the WLC model, these authors measured dispersed L_c , ranging from 260 to 1590 nm.

This could be due to random locations of the interactions in between pili resulting in unfoldings of random lengths.⁴³ This interpretation was confirmed by our ΔL_c analysis, which actually showed multimodal distribution (between 25–200 nm, Figures 4c,g and 7c).

CONCLUSIONS

SCFS is a powerful technique to quantify the adhesion behavior between individual bacteria. Using this technique, we demonstrated in this work that in *L. lactis*, cell–cell adhesion abilities were driven by the presence of pili on their surface. In addition, both laboratory and environmental *L. lactis* showed a high adhesion force and work, in the case of piliated strains. This allowed us to demonstrate that pili–pili interactions were specific and homotypic. Based on the sawtooth signatures obtained when pili interact with Mub proteins, we assume that along the pili, there are several binding sites for proteins but there are no adhesins. This behavior of pili helped to understand the cell–cell adhesion step of biofilm formation and thus their influence on cell cohesion and biofilm structuring. From the nanomechanical point of view, the low L_p and variable L_c values, in addition to the observation of pili by TEM and AFM imaging, showed that pili of *L. lactis* were rigid and possessed a highly flexible polypeptide chain. The ability of LAB such as *L. lactis* cells to interact with each others through pili could be further used in medical applications such as mucosal vaccines or therapeutic drug delivery. In the industrial environment, the understanding of the pili–pili interactions and their role in the cell–cell adhesion step of biofilm formation could be useful to use positive biofilms in order to control proliferative undesired species.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.0c03069>.

Heterotypic interactions between Pil⁺ VE17173 and Pil[−] VE17061; homotypic interactions between TIL1230 cells; interactions between Pil[−] VE17061 cells, cultures 2 and 3; homotypic interactions between Pil⁺ VE17173 cells, cultures 2 and 3; homotypic interactions between Pil⁺⁺ VE17176 cells, cultures 2 and 3; homotypic interactions between Pil⁺ Mub⁺ TIL448 cells, cultures 2 and 3; homotypic interactions between Pil[−] Mub[−] TIL1290 cells, cultures 2 and 3; homotypic interactions between Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells, cultures 2 and 3; heterotypic interactions between Pil⁺ Mub[−] TIL1290 and Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells, cultures 2 and 3; analysis of various force signatures obtained in pili–pili interactions between the Pil⁺⁺ VE17176 cells; analysis of various force signatures obtained in pili–pili interactions in Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strains; analysis of various force signatures of Mub proteins obtained in the interactions between the Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells; and analysis of various force signatures obtained in the interactions between the Pil⁺ Mub[−] TIL1290 and the Pil[−] Mub⁺ TIL1289 cells (PDF)

K

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Etienne Dague — LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, 31000 Toulouse, France; orcid.org/0000-0003-3290-9166; Email: edague@laas.fr

Authors

Ibrahima Dramé — TBI, Université de Toulouse, INSA, INRAE, CNRS, 31000 Toulouse, France; LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, 31000 Toulouse, France

Cécile Formosa-Dague — TBI, Université de Toulouse, INSA, INRAE, CNRS, 31000 Toulouse, France; orcid.org/0000-0002-8627-3784

Christine Lafforgue — TBI, Université de Toulouse, INSA, INRAE, CNRS, 31000 Toulouse, France

Marie-Pierre Chapot-Chartier — Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France

Jean-Christophe Piard — Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France

Mickaël Castelain — TBI, Université de Toulouse, INSA, INRAE, CNRS, 31000 Toulouse, France

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsami.0c03069>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

E.D. and C.F.-D are researchers at Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). M.C. is a researcher at Institut National pour la Recherche Agronomique (INRA). C.L. is an Associate-Professor at INSA de Toulouse. I.D.'s PhD is funded by MESR (Doctoral School MEGEP). I.D. thanks the technical team at LAAS, particularly, Charline Blatché and Sandrine Souleille for their help in all experiments.

■ REFERENCES

- (1) Drake, S. L.; Sandstedt, S. A.; Koomey, M. PilP, a Pilus Biogenesis Lipoprotein in *Neisseria Gonorrhoeae*, Affects Expression of PilQ as a High-Molecular-Mass Multimer. *Mol. Microbiol.* **1997**, *23*, 657–668.
- (2) Andersson, M.; Fällman, E.; Uhlin, B. E.; Axner, O. Dynamic Force Spectroscopy of *E. Coli* P Pili. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2717–2725.
- (3) Lu, S.; Giuliani, M.; Harvey, H.; Burrows, L. L.; Wickham, R. A.; Dutcher, J. R. Nanoscale Pulling of Type IV Pili Reveals Their Flexibility and Adhesion to Surfaces over Extended Lengths of the Pili. *Biophys. J.* **2015**, *108*, 2865–2875.
- (4) Craig, L.; Pique, M. E.; Tainer, J. A. Type IV Pilus Structure and Bacterial Pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 363–378.
- (5) Telford, J. L.; Barocchi, M. A.; Margarit, I.; Rappuoli, R.; Grandi, G. Pili in Gram-Positive Pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 509–519.
- (6) Murphy, E. C.; Janulczyk, R.; Karlsson, C.; Mörgelin, M.; Frick, I.-M. Identification of Pili on the Surface of *Finagoldia Magna*—a Gram-Positive Anaerobic Cocci. *Anaerobe* **2014**, *27*, 40–49.
- (7) Krishnan, V. Pilins in Gram-Positive Bacteria: A Structural Perspective. *IUBMB Life* **2015**, *67*, 533–543.
- (8) Yanagawa, R.; Shinagawa, M. Characteristics of *Corynebacterium Renale* Phage. *Jpn. J. Vet. Res.* **1968**, *16*, 137–143.
- (9) Ton-That, H.; Schneewind, O. Assembly of Pili on the Surface of *Corynebacterium Diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 1429–1438.
- (10) Hendrickx, A. P. A.; Budzik, J. M.; Oh, S.-Y.; Schneewind, O. Architects at the Bacterial Surface — Sortases and the Assembly of Pili with Isopeptide Bonds. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 166–176.

- (11) Wang, Y.; Wang, J.; Dai, W. Use of GFP to Trace the Colonization of *Lactococcus Lactis* WH-C1 in the Gastrointestinal Tract of Mice. *J. Microbiol. Methods* **2011**, *86*, 390–392.
- (12) Lebeer, S.; Claes, I.; Tytgat, H. L. P.; Verhoeven, T. L. A.; Marien, E.; von Ossowski, I.; Reunanen, J.; Palva, A.; de Vos, W. M.; de Keersmaecker, S. C. J.; Vanderleyden, J. Functional Analysis of *Lactobacillus Rhamnosus* GG Pili in Relation to Adhesion and Immunomodulatory Interactions with Intestinal Epithelial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 185–193.
- (13) Kankainen, M.; Paulin, L.; Tynkkynen, S.; von Ossowski, I.; Reunanen, J.; Partanen, P.; Satokari, R.; Vesterlund, S.; Hendrickx, A. P. A.; Lebeer, S.; De Keersmaecker, S. C. J.; Vanderleyden, J.; Hämäläinen, T.; Laukkanen, S.; Salovuori, N.; Ritari, J.; Alatalo, E.; Korpela, R.; Mattila-Sandholm, T.; Lassig, A.; Hatakka, K.; Kinnunen, K. T.; Karjalainen, H.; Saxelin, M.; Laakso, K.; Surakka, A.; Palva, A.; Salusjärvi, T.; Auvinen, P.; de Vos, W. M. Comparative Genomic Analysis of *Lactobacillus Rhamnosus* GG Reveals Pili Containing a Human-Mucus Binding Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 17193–17198.
- (14) Tripathi, P.; Beausart, A.; Alsteens, D.; Dupres, V.; Claes, I.; von Ossowski, I.; de Vos, W. M.; Palva, A.; Lebeer, S.; Vanderleyden, J.; Dufrene, Y. F. Adhesion and Nanomechanics of Pili from the Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* GG. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3685–3697.
- (15) Turroni, F.; Serafini, F.; Mangifesta, M.; Arioli, S.; Mora, D.; van Sinderen, D.; Ventura, M. Expression of Sortase-Dependent Pili of *Bifidobacterium Bifidum* PRL2010 in Response to Environmental Gut Conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *357*, 23–33.
- (16) Oxaran, V.; Ledue-Clier, F.; Dieye, Y.; Herry, J.-M.; Péchoux, C.; Meylheuc, T.; Briandet, R.; Juillard, V.; Piard, J.-C. Pilus Biogenesis in *Lactococcus Lactis*: Molecular Characterization and Role in Aggregation and Biofilm Formation. *PLoS One* **2012**, *7*, No. e50989.
- (17) Madsen, K.; Cornish, A.; Soper, P.; McKaigney, C.; Jijon, H.; Yachimec, C.; Doyle, J.; Jewell, L.; De Simone, C. Probiotic Bacteria Enhance Murine and Human Intestinal Epithelial Barrier Function. *Gastroenterology* **2001**, *121*, 580–591.
- (18) Wells, J. Mucosal Vaccination and Therapy with Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2011**, *2*, 423–445.
- (19) Veiga, P.; Pons, N.; Agrawal, A.; Oozer, R.; Guyonnet, D.; Brazeilles, R.; Faurie, J.-M.; van Hylckama Vlieg, J. E. T.; Houghton, L. A.; Whorwell, P. J.; Ehrlich, S. D.; Kennedy, S. P. Changes of the Human Gut Microbiome Induced by a Fermented Milk Product. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6328.
- (20) Castelain, M.; Duviau, M.-P.; Oxaran, V.; Schmitz, P.; Coccagn-Bousquet, M.; Loubière, P.; Piard, J.-C.; Mercier-Bonin, M. Oligomerized Backbone Pilin Helps Piliated *Lactococcus Lactis* to Withstand Shear Flow. *Biofouling* **2016**, *32*, 911–923.
- (21) Castelain, M.; Duviau, M.-P.; Canette, A.; Schmitz, P.; Loubière, P.; Coccagn-Bousquet, M.; Piard, J.-C.; Mercier-Bonin, M. The Nanomechanical Properties of *Lactococcus Lactis* Pili Are Conditioned by the Polymerized Backbone Pilin. *PLoS One* **2016**, *11*, No. e0152053.
- (22) Meyrand, M.; Guillot, A.; Goin, M.; Furlan, S.; Armalyte, J.; Kulakauskas, S.; Cortes-Perez, N. G.; Thomas, G.; Chat, S.; Péchoux, C.; Dupres, V.; Hols, P.; Dufrene, Y. F.; Trugnan, G.; Chapot-Chartier, M.-P. Surface Proteome Analysis of a Natural Isolate of *Lactococcus Lactis* Reveals the Presence of Pili Able to Bind Human Intestinal Epithelial Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 3935–3947.
- (23) Le, D. T. L.; Tran, T.-L.; Duviau, M.-P.; Meyrand, M.; Guérardel, Y.; Castelain, M.; Loubière, P.; Chapot-Chartier, M.-P.; Dague, E.; Mercier-Bonin, M. Unraveling the Role of Surface Mucus-Binding Protein and Pili in Mucosa-Adhesion of *Lactococcus Lactis*. *PLoS One* **2013**, *8*, No. e79850.
- (24) Florin, E. L.; Moy, V. T.; Gaub, H. E. Adhesion Forces between Individual Ligand-Receptor Pairs. *Science* **1994**, *264*, 415–417.

L

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

- (25) Bowen, W. R.; Lovitt, R. W.; Wright, C. J. Atomic Force Microscopy Study of the Adhesion of *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *237*, 54–61.
- (26) Dague, E.; Le, D. T. L.; Zanna, S.; Marcus, P.; Loubière, P.; Mercier-Bonin, M. Probing In Vitro Interactions between *Lactococcus Lactis* and Mucins Using AFM. *Langmuir* **2010**, *26*, 11010–11017.
- (27) Boekhorst, J.; Helmer, Q.; Kleerebezem, M.; Siezen, R. J. Comparative Analysis of Proteins with a Mucus-Binding Domain Found Exclusively in Lactic Acid Bacteria. *Microbiology* **2006**, *152*, 273–280.
- (28) Juge, N. Microbial Adhesins to Gastrointestinal Mucus. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 30–39.
- (29) Mercier-Bonin, M.; Chapot-Chartier, M.-P. Surface Proteins of *Lactococcus Lactis*: Bacterial Resources for Muco-Adhesion in the Gastrointestinal Tract. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2247.
- (30) Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *322*, 207–228.
- (31) Hutter, J. L.; Bechhoefer, J. Calibration of Atomic-force Microscope Tips. *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 1868–1873.
- (32) Benoit, M.; Gabriel, D.; Gerisch, G.; Gaub, H. E. Discrete Interactions in Cell Adhesion Measured by Single-Molecule Force Spectroscopy. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 313–317.
- (33) Beaussart, A.; Herman, P.; El-Kirat-Chatel, S.; Lipke, P. N.; Kuchariková, S.; Van Dijk, P.; Dufrene, Y. F. Single-Cell Force Spectroscopy of the Medically Important *Staphylococcus Epidermidis*-*Candida Albicans* Interaction. *Nanoscale* **2013**, *5*, 10894–10900.
- (34) Bustamante, C.; Marko, J. F.; Siggia, E. D.; Smith, S. Entropic Elasticity of Lambda-Phage DNA. *Science* **1994**, *265*, 1599–1600.
- (35) Janshoff, A.; Neitzert, M.; Oberdörfer, Y.; Fuchs, H. Force Spectroscopy of Molecular Systems—Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 3212–3237.
- (36) Francius, G.; Lebeer, S.; Alsteens, D.; Wildling, L.; Gruber, H. J.; Hols, P.; De Keersmaecker, S.; Vanderleyden, J.; Dufrene, Y. F. Detection, Localization, and Conformational Analysis of Single Polysaccharide Molecules on Live Bacteria. *ACS Nano* **2008**, *2*, 1921–1929.
- (37) Kline, K. A.; Kau, A. L.; Chen, S. L.; Lim, A.; Pinkner, J. S.; Rosch, J.; Nallapareddy, S. R.; Murray, B. E.; Henriques-Normark, B.; Beatty, W.; Caparon, M. G.; Hultgren, S. J. Mechanism for Sortase Localization and the Role of Sortase Localization in Efficient Pili Assembly in *Enterococcus Faecalis*. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 3237–3247.
- (38) de Weirtdt, R.; de Wiele, T. V. Micromanagement in the Gut: Microenvironmental Factors Govern Colon Mucosal Biofilm Structure and Functionality. *npj Biofilms Microbiomes* **2015**, *1*, 15026.
- (39) Piard, J.-C.; Briandet, R. Lactic Acid Bacteria Biofilms. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd, 2015; pp 341–361, DOI: 10.1002/9781118868386.ch20.
- (40) Wang, H.; Wilksch, J. J.; Chen, L.; Tan, J. W. H.; Strugnell, R. A.; Gee, M. L. Influence of Fimbriae on Bacterial Adhesion and Viscoelasticity and Correlations of the Two Properties with Biofilm Formation. *Langmuir* **2016**, *33*, 100–106.
- (41) Burgain, J.; Scher, J.; Lebeer, S.; Vanderleyden, J.; Cailliez-Grimal, C.; Corgneau, M.; Francius, G.; Gaiani, C. Significance of Bacterial Surface Molecules Interactions with Milk Proteins to Enhance Microencapsulation of *Lactobacillus Rhamnosus* GG. *Food Hydrocolloids* **2014**, *41*, 60–70.
- (42) Guerin, J.; Bacharouche, J.; Burgain, J.; Lebeer, S.; Francius, G.; Borges, F.; Scher, J.; Gaiani, C. Pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG Mediate Interaction with β -Lactoglobulin. *Food hydrocolloids* **2016**, *58*, 35–41.
- (43) Fahs, A.; Quilès, F.; Jamal, D.; Humbert, F.; Francius, G. In Situ Analysis of Bacterial Extracellular Polymeric Substances from a *Pseudomonas Fluorescens* Biofilm by Combined Vibrational and Single Molecule Force Spectroscopies. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 6702–6713.
- (44) Miller, E.; Garcia, T.; Hultgren, S.; Oberhauser, A. F. The Mechanical Properties of *E. Coli* Type 1 Pili Measured by Atomic Force Microscopy Techniques. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3848–3856.
- (45) Huang, Q.; Wu, H.; Cai, P.; Fein, J. B.; Chen, W. Atomic Force Microscopy Measurements of Bacterial Adhesion and Biofilm Formation onto Clay-Sized Particles. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16857.
- (46) Rheinlaender, J.; Gräbner, A.; Ott, L.; Burkovski, A.; Schäffer, T. E. Contour and Persistence Length of *Corynebacterium Diphtheriae* Pili by Atomic Force Microscopy. *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41*, 561–570.

M

<https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

4.2. Relations entre structure et propriétés nanomécaniques du biofilm de *L. lactis* : influence de la production des pili et d'autres protéines de surfaces

4.2.1. Contexte et objectifs

Dans la première partie des résultats, nous avons étudié le rôle des pili dans les interactions intercellulaires chez *L. lactis*. Nous avons démontré que les cellules présentant des pili à leur surface étaient plus susceptibles d'interagir entre elles de façon homotypique et spécifique que les cellules non piliées. Cette capacité des pili à interagir entre eux et avec d'autres protéines de surface comme les protéines à domaines Mub, permet de nous interroger sur leur potentiel rôle à l'échelle du biofilm. Ce second volet de la thèse s'est d'abord intéressé au rôle des pili dans l'architecture du biofilm, déjà étudié par Oxaran (Oxaran et al. 2012) sur la souche de laboratoire IL1403. Les expériences menées au cours de la thèse ont été effectuées avec des mutants issus de la souche IL1403, c'est à dire un mutant dépourvu de pili (contrôle) et un mutant surproduisant des pili, ainsi qu'une souche environnementale TIL448 présentant à la fois des pili et des protéines à domaines Mub (codés par des plasmides) et sa souche contrôle pour laquelle les plasmides ont été éliminés. L'utilisation de ces différentes souches a permis d'analyser l'influence des pili et/ou d'autres protéines de surface, en particulier les protéines à domaines Mub, sur les propriétés nanomécaniques du biofilm. L'existence de corrélations entre la structure des biofilms et leurs propriétés nanomécaniques du biofilm permettrait de mieux comprendre la cohésion des cellules, la morphologie et la persistance des biofilms soumis à un écoulement.

Ainsi ce second volet de la thèse a permis d'analyser la structure, la topographie, la biomécanique et la cohésion de cellules organisées en biofilms mono-espèce obtenus après 24h en conditions statiques pour les différentes souches de *L. lactis*. Nous avons utilisé d'une part la CLSM combinée à l'AFM pour étudier le rôle des pili dans l'architecture et la topologie du biofilm de *L. lactis* et d'autre part la spectroscopie de force pour mesurer les forces d'adhésion homotypique à l'échelle du biofilm.

4.2.2. Principaux résultats et conclusions

Les résultats obtenus ont montré que si les pili sont bien impliqués dans l'architecture, la biomécanique et la cohésion des cellules en biofilm de *L. lactis*, d'autres protéines de surface semblent également contribuer à la structuration. Cependant, ces protéines n'ont aucun

rôle ni dans les propriétés nanomécaniques ni dans l'adhésion homotypique des cellules en biofilm. La détermination des modules de Young des différents biofilms a montré que ceux formés par les souches piliées sont mille fois plus mous/élastiques que les pour souches témoins (dépourvues pili) qui sont rigides, ce qui démontre le rôle déterminant des pili dans la texture du biofilm. Dans le cas de la souche produisant à la fois les pili et des protéines à domaines Mub le biofilm obtenu est de structure homogène avec une surface lisse, à la différence de la souche produisant uniquement les pili où le biofilm apparaît hétérogène et rugueux.

Cette comparaison entre souches dépourvues de pili, portant de pili et/ou des protéines MUB, a permis de mettre en lumière que si les pili interviennent dans la structuration du biofilm, d'autres protéines de surface jouent également un rôle important dans l'aspect des biofilms formés. En revanche, seule la présence des pili semble avoir un effet sur l'élasticité du biofilm. Par ailleurs, les forces d'interactions homotypiques mesurées entre des cellules immobilisées sur une microbille fixée sur le microlevier et l'interface du biofilm, étant plus élevées chez des souches piliées que chez les souches contrôle, les pili pourraient favoriser la cohésion du biofilm.

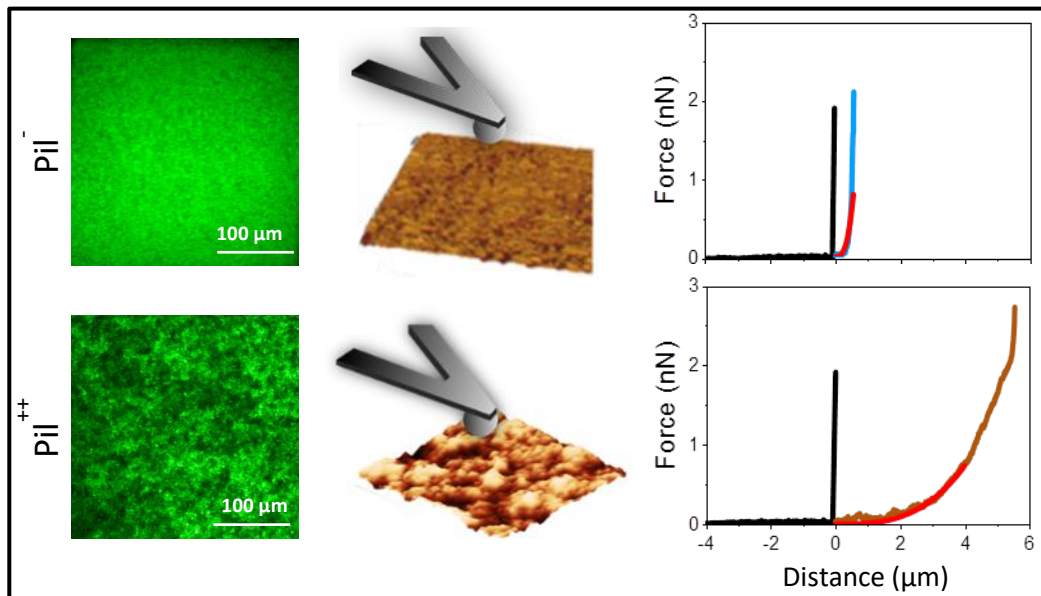
Ce résultat permet donc d'avancer l'hypothèse que les pili pourraient jouer un rôle dans la persistance d'un biofilm soumis à un écoulement.

L'objet du dernier volet de la thèse présenté dans la partie suivante s'attachera à vérifier cette hypothèse.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article publié en Mars 2021 dans le journal « *Scientific Reports* ».

4.2.3. Article 2 : Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms

Graphical abstract:



Investigation of *L. lactis* biofilms by CLSM and AFM: role of pili in the structure and nanomechanical properties. Pil^- strains form homogeneous, compact and stiffer biofilm than Pil^{++} strains whose biofilms appeared heterogeneous and smooth. On the left, confocal images of Pil^- and Pil^{++} biofilms are presented. In the middle, AFM 3D images of the same biofilms and on the right, typical force-distance curves recorded between colloidal probe and the biofilms.



OPEN Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms

Ibrahima Drame^{1,2}, Christine Lafforgue¹, Cecile Formosa-Dague¹, Marie-Pierre Chapot-Chartier³, Jean-Christophe Piard³, Mickaël Castelain^{1,4} & Etienne Dague^{2,4}✉

Lactic acid bacteria, in particular *Lactococcus lactis*, are widely used in the food industry, for the control and/or the protection of the manufacturing processes of fermented food. While *L. lactis* has been reported to form compact and uniform biofilms it was recently shown that certain strains able to display pili at their surface form more complex biofilms exhibiting heterogeneous and aerial structures. As the impact of those biofilm structures on the biomechanical properties of the biofilms is poorly understood, these were investigated using AFM force spectroscopy and imaging. Three types of strains were used *i.e.*, a control strain devoid of pili and surface mucus-binding protein, a strain displaying pili but no mucus-binding proteins and a strain displaying both pili and a mucus-binding protein. To identify potential correlations between the nanomechanical measurements and the biofilm architecture, 24-h old biofilms were characterized by confocal laser scanning microscopy. Globally the strains devoid of pili displayed smoother and stiffer biofilms (Young Modulus of 4–100 kPa) than those of pilated strains (Young Modulus around 0.04–0.1 kPa). Additional display of a mucus-binding protein did not affect the biofilm stiffness but made the biofilm smoother and more compact. Finally, we demonstrated the role of pili in the biofilm cohesiveness by monitoring the homotypic adhesion of bacteria to the biofilm surface. These results will help to understand the role of pili and mucus-binding proteins withstanding external forces.

Bacterial biofilms are complex communities, growing on a surface and embedded in a self-produced extracellular polymeric matrix^{1–4}. Extracellular polymeric substances (EPS) are composed of proteins, extracellular DNA, and mainly polysaccharides. They are considered as key components that determine the physicochemical and biological properties of biofilms and contribute to their mechanical stability^{4,5}. Bacterial biofilms have been extensively studied since the 1970s, particularly biofilms of pathogenic bacteria. Indeed, they have been described to be responsible for different issues including persistent infections⁶, antibiotic resistance⁷ and quality/safety problems in food industry⁸.

On the other hand, beneficial biofilms formed by non-pathogenic bacteria have received increasing interest over the last 10 years. Bacteria such as the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG^{9,10}, the commensal bifidobacteria¹¹ or the food lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*^{12–15}, have been increasingly studied for their implication in the safety of food fermented products and in their probiotic properties. Among these bacterial species, the archetypal lactic acid bacterium *L. lactis* has been studied for its capacity to adhere and to form biofilm on biotic and abiotic surfaces^{13,16–18}. *L. lactis* is a Gram-positive bacterial species living in nutrient-rich ecological niches (plants, gut mucus and milk) and is the most widely used bacteria in dairy industry for cheese or lactic products manufacturing^{19,20}. *L. lactis* can be used to form beneficial biofilms that have the potential to prevent and control food spoilage induced by pathogenic bacteria in food processing environments^{8,21}. In addition, *L. lactis* has been proposed as a potent candidate in biotechnological applications as cell factories organism and as delivery vehicles of beneficial molecules (antigens and cytokines) in the development of live mucosal vaccines^{22,23}.

¹TBI, Université de Toulouse, INSA, INRAE, CNRS, Toulouse, France. ²LAAS-CNRS, Université de Toulouse CNRS, Toulouse, France. ³Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350 Jouy-en-Josas, France. ⁴Fédération de Recherche Ferment, CNRS, Toulouse, France. ✉email: edague@laas.fr

To better exploit *L. lactis* biofilms, it is essential to improve the description and the understanding of their behaviors and the relation between their structuration (adhesion, cohesion, and organization) and their function. While the role of surface proteins and appendages such as pili in the mechanisms of single cell adhesion to a surface²⁴ or of cell–cell interactions have been studied²⁵, the global biomechanical properties of the entire biofilm are still largely ignored. In a previous study²⁵ we have demonstrated and described, at the molecular scale, the role of pili in homotypic interactions between *L. lactis* cells. Indeed, applying the single cell force spectroscopy technic, we showed that cell–cell adhesion abilities were driven by the presence of pili on their surface. Both laboratory and environmental *L. lactis* showed a high adhesion force and work, in the case of piliated strains whereas strains devoid of pili showed weak interactions. The objective of the present work is to go further and establish the role and functions of pili in the structuration and organization of the biofilm. We aim at linking our previous findings (pili–pili molecular and homotypic interactions between cells) with their consequences at the biofilm level. Pili are crucial for bacterial cell adhesion to a solid surface that is the first step of biofilm formation, but pili are likely to play a role also in the nanomechanical properties of the formed biofilms. Thus, the understanding of the complex microstructuration of biofilms is essential if we are to control them²⁶. Such a role of pili has been widely studied in the biofilms formed by pathogenic bacteria. For example, *Pseudomonas aeruginosa*, a model organism used to study pathogenic biofilms is able to form biofilms with spatial structures^{27–29} because it displays type IV pili at its surface³⁰. Type IV pili have been shown, by confocal laser scanning microscopy (CLSM), to play a role in cell aggregation, micro-colony formation and biofilm differentiation³⁰. They are also involved in the formation of heterogeneous biofilms showing mushroom-shaped multicellular structures^{28,31}. In another study, Yi and al.³² investigated the role of pili in the formation of biofilm by the human pathogen *Neisseria meningitidis*. This study showed that pili and EPS of *N. meningitidis* are involved both in the attachment of cells to a suitable surface and in the biofilm architecture³². Finally, in Gram-positive pathogens such as *Enterococcus faecalis*³³ or *Streptococcus pyogenes*³⁴, the importance of pili in biofilm development was highlighted in studies where the authors demonstrated that pili-devoid strains were defective in binding to epithelial cells and presented prominent defects in biofilm formation. More recently, pili have been investigated in non-pathogenic Gram-positive bacteria, including lactic acid bacteria such as *Lactobacillus rhamnosus* GG³⁵ and *L. lactis*^{14,36}. Pili of *L. rhamnosus* GG cells allow to establish both long and short distance contacts with host tissues³⁷ thus allowing to strengthen adhesion and to withstand shear stresses in natural environments.

Despite the high potential of *L. lactis* to form biofilms on abiotic and biotic surfaces, the nanomechanical properties of these biofilms and the influence of pili on their structure and porosity properties are still poorly understood. A study by Oxaran and co-workers¹⁴ reported that the model laboratory strain *L. lactis* IL1403 usually forms compact and uniform biofilms. However, when isogenic *L. lactis* IL1403 cells displayed pili, the formed biofilms were highly reticulated and appeared heterogeneous, rough and aerial¹⁴. The authors also demonstrated that pili have a key role in auto-aggregation phenotypes and in the formation of thicker biofilms than those observed with pilus-deficient wild-type strains (85 µm versus 45 µm). While biofilms formed by *L. lactis* strain IL1403 and its isogenic derivatives have been studied, no studies have yet been carried out on the biofilms formed by the environmental isolate *L. lactis* TIL448 that is natively able to display pili. In this strain, the genes required for pilus biogenesis are harbored in a plasmid and the backbone pilin (YhgE2) exhibits 28% of amino acid sequence similarity with YhgE of *L. lactis* IL1403³⁸. The pili were shown to be involved in adhesion of TIL448 strain to biotic surfaces including Caco-2 intestinal epithelial cells³⁸ and mucins^{38,39}. Another difference between *L. lactis* IL1403 and TIL448 is the ability of the latter to harbor a plasmid-borne gene for a mucin-binding protein (Mub) involved in adhesion to mucins³⁹.

The presence of pili at the cell surface is therefore involved in the biofilm structure and most probably plays a role in the architecture and the mechanical properties of biofilms. The organization of biofilms and their surface morphology have often been investigated by confocal laser scanning microscopy (CLSM) or transmission electron microscopy (TEM), and more recently atomic force microscopy (AFM)⁴⁰ which is powerful to get information at the molecular level. To investigate the mechanical properties of biofilms, specific nanoindentation measurements⁴¹ as well as phonatory rheometry⁴² can be used to characterize the bulk properties. Such techniques are however limited because of their inability to measure the properties of intact, hydrated biofilms on native surfaces. In recent years, AFM techniques^{43,44} offered the possibility to characterize the topology and roughness of a biofilm surface⁴⁵ and to access its mechanical properties⁴⁶, in an aqueous environment. AFM also becomes the most common and efficient technique to understand the force involved in cell adhesion and biofilm cohesiveness^{47–49}.

In a previous work²⁵, we have investigated the role of pili in the interactions between bacterial cells and demonstrated that piliated cells were more likely to interact with each other compared to non-piliated cells. In the present work, our aim is to investigate (i) the role of pili in the structure and the organization of *L. lactis* biofilm and (ii) the relation between its nanomechanical properties and its architecture. To reach this goal, CLSM was used to analyze the biofilm structure combined with AFM to image at high resolution the biofilm surface topology and to measure its nanomechanical properties. The interactions between cells immobilized on an AFM colloidal probe and 24-h old biofilms were also measured to demonstrate the role of pili in cells adhesion to more or less cohesive biofilms. Studying the role of pili in *L. lactis* biofilms should allow to better understand their adhesion and persistence in environments such as the human gut or the dairy industry in which this bacteria occurs and may control the development of pathogenic or spoilage species.

Materials and methods

***L. lactis* strains and their growth conditions.** Bacterial strains derived from *L. lactis* subsp. *lactis* used in this study are described in Table 1. Strains were grown in M17 broth (Oxoid) medium containing 0.5% (w/v) of D-glucose (M17 Glc). When required, erythromycin (Ery) and/or tetracycline (Tet) were added to the

Strains	Genotype or phenotype	Source/reference
VE17061	Pil ⁻ , control (pili minus)	¹⁴
VE17176	Pil ⁺ , over expression of both the <i>pil</i> operon and the <i>srtA</i> gene	¹⁴
TIL448	Pil ⁺ /Mub ⁺ , vegetal isolate from peas	³⁸
TIL1230	Pil ⁻ /Mub ⁻ , TIL448 derivative obtained by plasmid curing	³⁸

Table 1. *L. lactis* strains used in this study.

medium to a final concentration of 5 µg/mL. The cultures were incubated overnight at 30 °C under static conditions as described elsewhere²⁵.

Biofilm culture. First, 3 mL of phosphate buffered saline (PBS, 1X) solution containing 4 mg/mL of dopamine hydrochloride (99%, Sigma) were introduced in Culture-treated Petri dish (TPP, ø×h = 40×11 mm) and incubated for 1 h under sterile conditions. After removing the dopamine hydrochloride solution from the Petri dish, a droplet of 50 µL of overnight culture was deposited in the Petri dish containing 3 mL of culture medium. After 24-h of growth at 30 °C under static conditions and formation of the biofilm, the old medium was removed and replaced by fresh PBS to conduct AFM experiments.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM). To analyze the biofilm structure and thickness, 24-h biofilm-embedded cells in PBS were stained with Syto-9 dye from the *BacLight* bacterial viability kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and observed with Confocal Leica DMR TCS SP2 (Leica microsystems, Wetzlar, Germany, with magnification of 10×) fitted with water immersion dipping lenses. The excitation wavelength at 488 nm (blue laser) generated green fluorescence and all light rays emitted above 500 nm were collected. Biofilm structure was analyzed by taking a series of horizontal sections (stacks) to evaluate its thickness. All images were processed using Leica Confocal Software Lite.

AFM imaging and force measurements. To analyze the surface topography of biofilms from each *L. lactis* strain, AFM images of an area of 50 µm × 50 µm (JPK Instruments, Bruker, USA) were recorded in contact mode in PBS at room temperature. MLCT cantilevers (Bruker, USA, nominal spring constant of ~0.01 N/m, as determined using the thermal noise method³⁰) were used with a scanning rate of 1 Hz and a resolution of 128 × 128 pixels. The images acquired were analyzed using the Data Processing software from JPK Instruments (Bruker, USA).

Mechanical properties of the different *L. lactis* biofilms were measured in force spectroscopy experiments by recording a grid map of 16-by-16 force curves on an area of 50 µm × 50 µm in PBS. For that, AFM colloidal probes were used and prepared using the protocol described in³¹. Briefly, colloidal probes were obtained by attaching a single silica microsphere (5 µm diameter, Bangs Laboratories) with a thin layer of UV-curable glue (NOA 63, Norland Edmund Optics) on triangular tipless cantilevers (NP-O10, Bruker, USA) and using a Nanowizard III AFM (Bruker USA). The nominal spring constant of the colloidal probe cantilever was 0.04–0.08 N/m as determined using the thermal noise method³⁰. The maximal applied force was 0.5 nN for each condition, the constant approach/retract speed of 12 to 30 µm/s and the z-length of the piezo was adjusted up to 15 µm. Force curves obtained were then converted into indentation curves and fitted to the Hertz model to obtain Young's modulus values. The Hertz model for spherical indentation follows the equation $F_{\text{cont}} = 4/3 (E^* R^{1/2} \delta^{3/2})$, where F is the nanoindentation force applied, E^* is the reduced Young's modulus, δ is the deformation of the sample in contact, and R is the spherical colloidal probe radius, taken as 2.5 µm.

To measure the adhesion forces between single cells and biofilms, AFM colloidal probes were first immersed for 1 h in 50 µL of PBS (1X) containing 4 mg/mL of dopamine hydrochloride (99%, Sigma), rinsed in PBS and used directly for cell probes preparation. For that, single-cells from 50 µL of diluted bacterial suspension (×100) were immobilized on the colloidal probes. Cell probes were then used to measure cells-biofilm interaction forces. All the force curves obtained were analyzed using Data Processing software from JPK Instruments (Bruker, USA). Adhesion force histograms were obtained by calculating the maximum adhesion force of the last peak for each curve. For each strain, experiments were repeated at least three times with cells coming from independent cultures.

Statistical analysis. In this work, for each parameter (Biofilms thickness, average roughness, Young's modulus and adhesion force), a statistical analysis was performed to compare the biofilms of the different strains. To do this, IBM Spss Statistic 25 and Microsoft Excel software were used to perform the ANOVA test. The test was done at the threshold of 5%, 1% and 0.1%.

Results

Pili influence the structural development of *L. lactis* biofilms. To reproduce the result of Oxaran and *al.*¹⁴ demonstrating that *L. lactis* biofilms are, somehow, structured by the display of pili at the surface of lactococci cells, biofilms were obtained with IL1403 derivatives, Pil⁻ VE17061 and Pil⁺ VE17176 and they were analyzed by CSLM. In addition, to evaluate the role of pili in biofilm structuration, biofilms formed by the environmental strain TIL448 that displays both pili and Mub proteins (Pil⁺ Mub⁺ TIL448) and its control (Pil⁻ Mub⁻

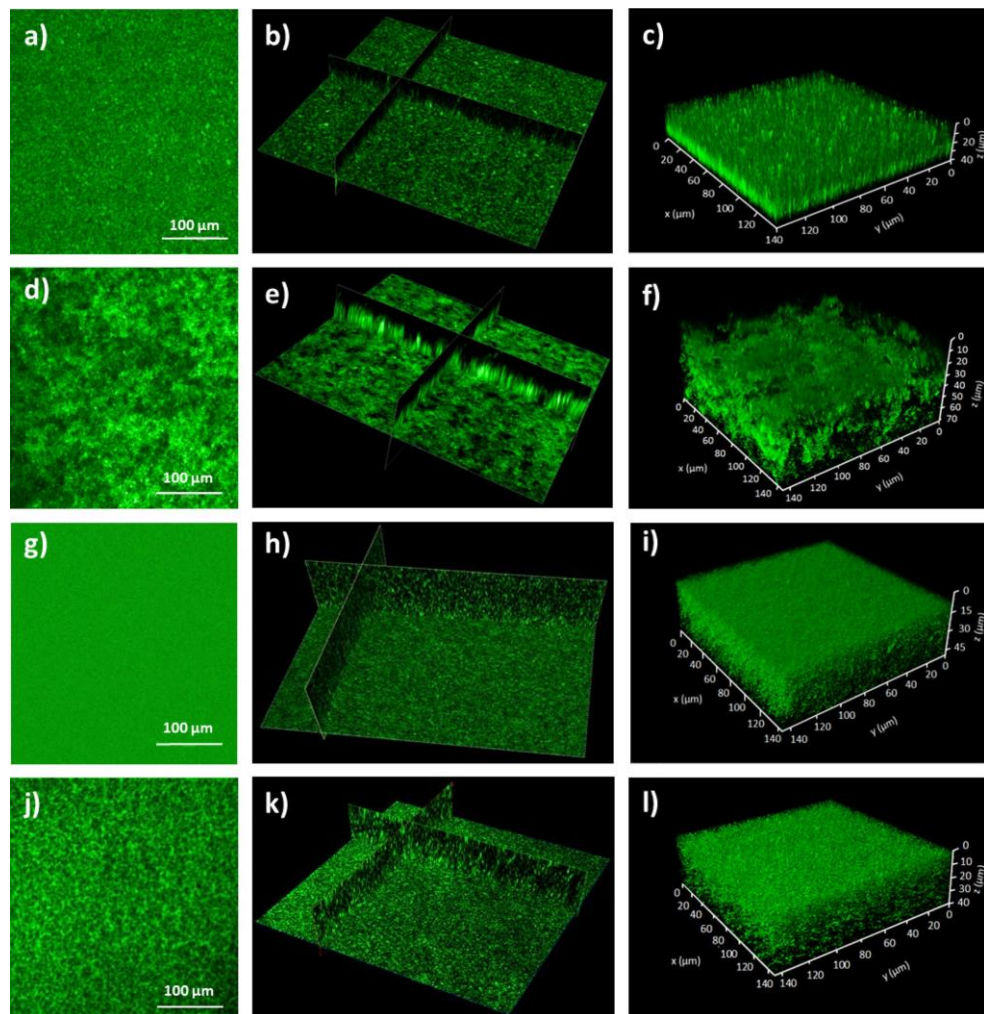


Figure 1. CLSM analyses of 24-h biofilms formed by *Lactococcus lactis* strains. (a–c) Biofilms of Pil[−] VE17061, (d–f) Pil⁺ VE17176, (g–i) Pil[−] Mub[−] TIL1230 and (j–l) Pil⁺ Mub⁺ TIL448 were stained with Syto-9 dye from the *BacLight* and processed for CLSM. 2D views (a,d,g,j), cross-section of 3D volume image (b,e,h,k) and surface plot of 3D volume images (c,f,i,l) are presented for each strain.

TIL1230) were also analyzed. The results presented in Fig. 1 show that the biofilm of the Pil[−] VE17061 control strain (Fig. 1a–c) exhibited a compact and uniform biofilm while the biofilm of Pil⁺ VE17176 was thicker and heterogeneous (Fig. 1d–f) thus confirming previous observations¹⁴. In addition, as expected, a compact structure was observed for the biofilm of the Pil[−] Mub[−] TIL1230 control strain (Fig. 1g–i) even more homogeneous than the biofilm of Pil[−] VE17061 (Fig. 1g–i). Interestingly, despite the presence of pili, the biofilm of Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strain (Fig. 1j–l) was more homogeneous than the biofilm of Pil⁺ VE17176 and less compact than the two Pil[−] control strains.

The height of the biofilms was monitored by making cross sections on the different biofilms. Figure 1e showed that the structure of the Pil⁺ VE17176 biofilm was thicker than that of the control Pil[−] VE 17061 strain (Fig. 1b). In contrast, the biofilms of the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 (Fig. 1k) and Pil[−] Mub[−] TIL1230 vegetal strains (Fig. 1h) did not show such high structures. This could be due to the presence of additional surface proteins displayed in the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strain. The height of all biofilms was evaluated on the z-scale (Fig. 1c,f,i,l). The 3-D image of

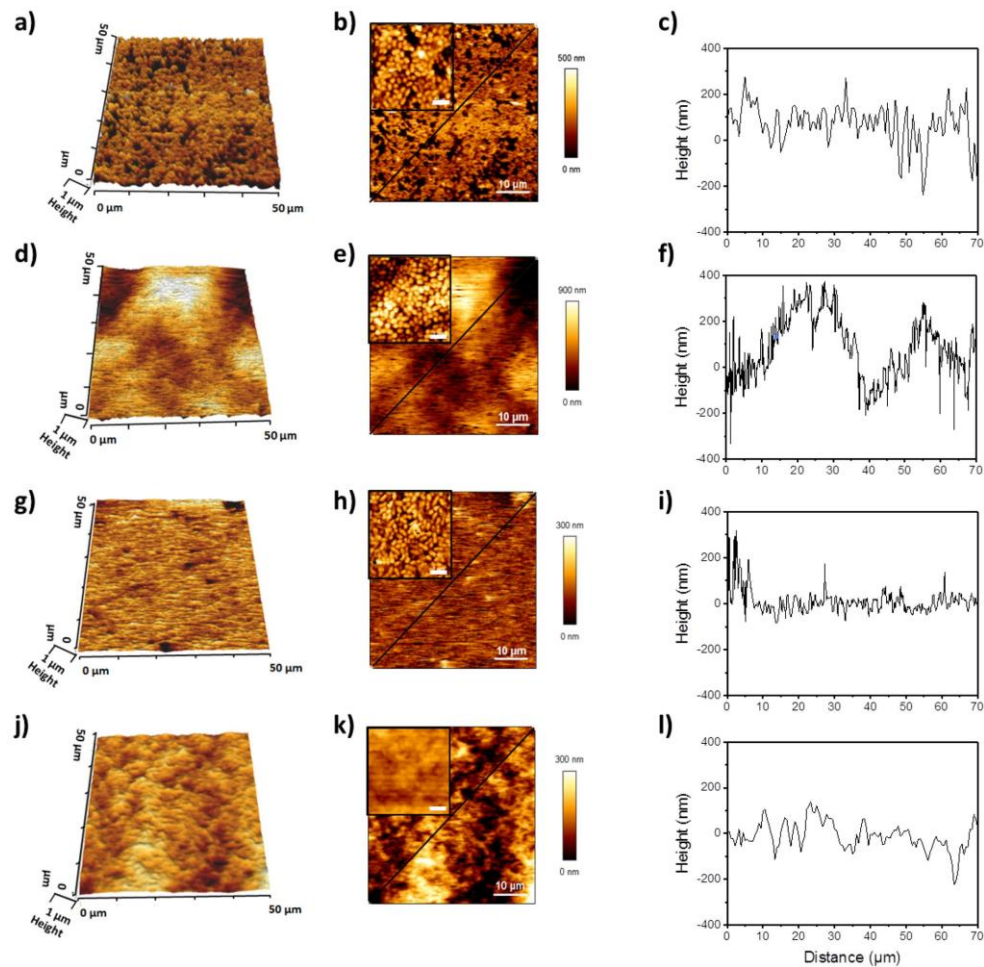


Figure 2. Topography analysis of 24-h *L. lactis* biofilms using AFM. High-resolution 3D images were recorded for an area of $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ with 16×16 pixels. Cross section profiles are indicated by the black lines. Studied strains: Pil⁻ VE17061 (a–c), Pil⁺ VE17176 (d–f), Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 (g–i) and Pil⁺ Mub⁺ TIL448 (j–l). The scale bar in the insert b, e, h and k, corresponds to $2 \mu\text{m}$.

the biofilm of Pil⁻ VE17061 was obtained from 113 stacks corresponding to a thickness of $38.7 \mu\text{m}$. The number of recorded stacks and the biofilm thicknesses were of 139 ($47.2 \mu\text{m}$), 116 ($40.0 \mu\text{m}$) and 206 ($70.9 \mu\text{m}$) for Pil⁻ Mub⁻ TIL1230, Pil⁺ Mub⁺ TIL448 and Pil⁺ VE17176 strains, respectively.

AFM imaging reveals the topography of *L. lactis* biofilm surface. Biofilm surface topography was obtained from AFM images recorded on areas of $50 \times 50 \mu\text{m}$. High-resolution images obtained from the scans as well as 2D and 3D micrographs are presented in Fig. 2. Cross sections made transversely were taken on these images according to the black line (Fig. 2c,f,i,l). The surface of the biofilms of Pil⁻ VE17061 (Fig. 2a–c) and Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 (Fig. 2g–i) appeared to be flatter and more compact than that of Pil⁺ VE17176 and Pil⁺ Mub⁺ TIL448 biofilms (Fig. 2j–l). The biofilm of Pil⁺ Mub⁺ TIL448 showed dense micro-aggregate (Fig. 2j,l) compared to the biofilm of Pil⁺ VE17176 which exhibited large cell agglomerates (Fig. 2d,e), as could be seen also in the cross-section profiles showing large pics (Fig. 2f) corresponding to macro-aggregates. Cross section profiles of

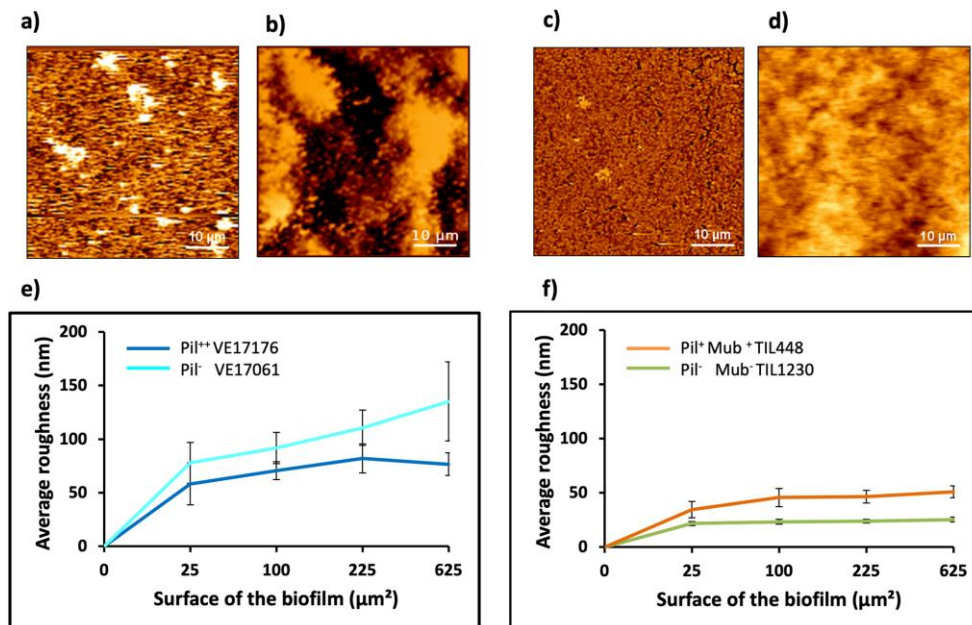


Figure 3. Roughness analyses of *L. lactis* biofilms using AFM technique. High resolution images of 24-h biofilms were recorded for Pil⁺ VE17061 (a), Pil⁺ VE17176 (b), Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 (c) and Pil⁻ Mub⁺ TIL448 (d) strains. (e) and (f) showed the average roughness (Ra) measured on each biofilm for an area of 5 μm × 5 μm, 10 μm × 10 μm, 15 μm × 15 μm and 25 μm × 25 μm. The error bars in panel's e and f denote three measurements from three independent biofilms.

the two control strains (Fig. 2c,i) confirmed that the biofilm of Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 was more compact and more homogeneous than that of Pil⁻ VE17061.

Roughness analyses of *L. lactis* biofilms. The average roughness (Ra) at the biofilm surface was estimated from the topography AFM scans with high-resolution images (Fig. 3a–d) and analyzed for each strain. In each case, the roughness was measured on different areas of the surface on the images recorded as shown in Fig. 2. For the laboratory strains (Fig. 3e), the Ra varied from 58.2 ± 19.6 to 76.6 ± 10.4 nm for the Pil⁻ VE17061 biofilm and from 77.8 ± 19.1 to 135.1 ± 36.8 nm for the Pil⁺ VE17176 biofilm. For the vegetal strains, the control Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 biofilms (Fig. 3f) displayed more homogeneous and smoother (21.6 ± 1.8 to 25.3 ± 2.2 nm) surface than all other biofilms thus confirming the previous results, and the Ra of the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 biofilms was in the range of 34.5 ± 7.5 to 50.5 ± 5.5 nm. Clearly the biofilm surface obtained with the vegetal strains was smoother than those observed in laboratory strains. This could be due to the presence of other components of the extracellular matrix in addition to the pili, which makes the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 biofilms more compact and smoother than the Pil⁺ VE17176 biofilms.

Nanomechanical properties of the *L. lactis* biofilms surface. To investigate whether the display of pili at the cell surface affects the nanomechanical properties of the different *L. lactis* biofilms, force spectroscopy experiments⁵¹ were performed using spherical AFM probes (Fig. 4a,e,i,m). The elastic modulus of biofilms from at least three biofilms of pilated and control strains in each case were compared by recording 16 × 16 force curves for an area of 50 μm × 50 μm. The results obtained from one culture are represented in Fig. 4; the data corresponding to the other biofilms for the same strain respectively are presented in the supplementary material section (Figure S1). Figure 4b,f,j,n show the elastic maps for the biofilm of the four strains. On each map, each little square corresponds to one force curve. As expected, and shown in Fig. 4f,n, the maps obtained for pilated strains display dark contrast near to 0 kPa compared to the control strains maps showing heterogeneous contrast and high elastic modulus (Fig. 4b,j). This significant difference in elasticity between pilated and control strains (Table 3) was quantified by fitting the indentation curves with the Hertz model. The indentation curves were calculated by subtracting the cantilever deflection to the force–distance curves. The indentation is therefore the penetration depth of the probe into the biofilm. For the same applied force, the indentation in a soft material is higher than in a hard material. The comparison of the indentation curves recorded on the different biofilms,

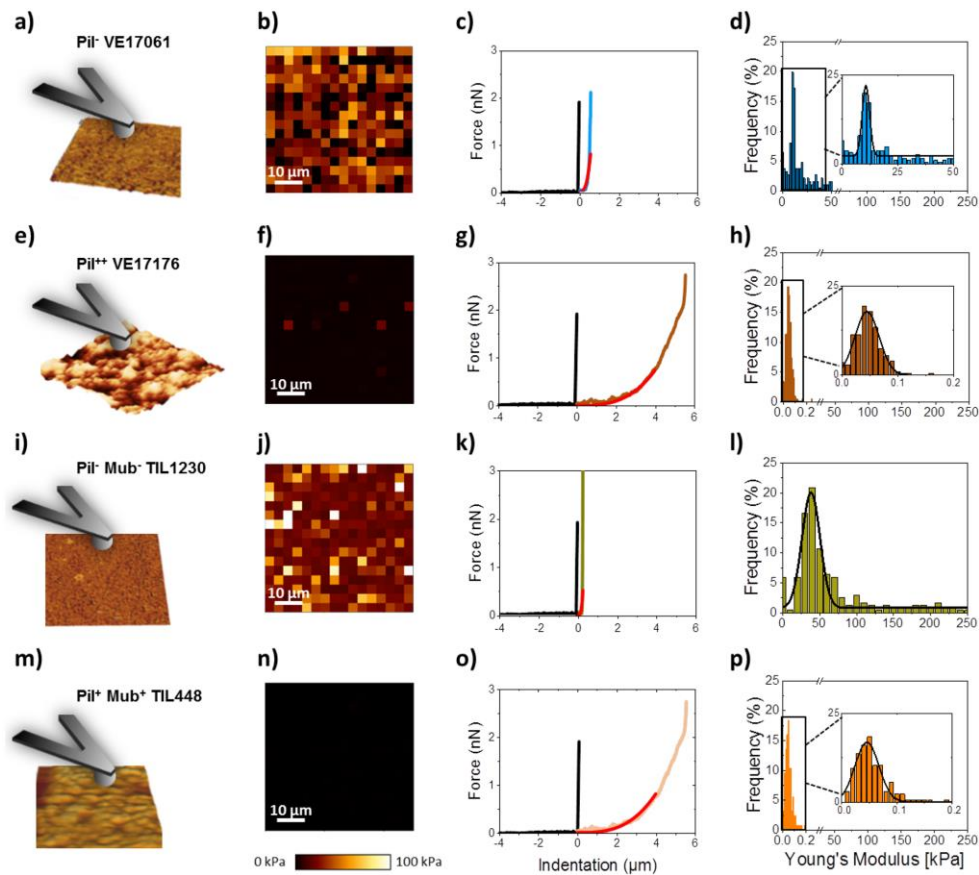


Figure 4. Nanomechanical properties of *L. lactis* biofilm surface. (a,e,i,m) Schematic representation of the measurement of the interactions between a colloidal probe (silica microsphere) and 24 h-biofilm. Statistical distribution of the Young's modulus (b,f,j,n), elasticity maps (c,g,k,o) and force-indentation curves with theoretical model (red line) taken from the substrate (black line) and the biofilm of Pil⁻ VE17061 (blue line) (d), Pil⁺⁺ VE17176 (brown line) (h), Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 (green line) (l) and Pil⁺ Mub⁺ TIL448 (orange line) (p). All force-curves were recorded for an area of 50 μm × 50 μm corresponding to 16 × 16 pixels.

fitted to the Hertz model (plain red lines in Fig. 4c,g,k,o), clearly confirmed that the two pilated strains biofilms showed higher indentation, and therefore exhibited a much softer behavior than the control strains. These observations were confirmed by the quantitative analyses of the Young's modulus distributions represented in the histograms: Fig. 4d,h,l,p. The Young's modulus value of the Pil⁻ VE17061 biofilm varied from 4 to 50 kPa and was on the average of 11 ± 2 kPa (Fig. 4d). For the biofilm of Pil⁻ Mub⁻ TIL1230, the Young's modulus ranged from 25 to 100 kPa with an average of 48 ± 12 kPa (Fig. 4l). In contrast, in pilated strains, the Young's modulus values were lower: 0.05–0.20 kPa with an average of 0.04 ± 0.02 kPa for the Pil⁺⁺ VE17176 (Fig. 4h) and 0.01–0.40 kPa with the average of 0.04 ± 0.02 kPa for the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 (Fig. 4p) strains. These results indicated that the biofilms of pilated strains Pil⁺⁺ VE17176 and Pil⁺ Mub⁺ TIL448 were softer than the biofilms of pil-devoid strains Pil⁻ VE17061 and Pil⁻ Mub⁻ TIL1230. The more compact biofilm of Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 was stiffer than the biofilm of Pil⁻ VE17061 which may be due to the display of additional surface proteins in the Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 strain³⁸.

Cell cohesiveness in *L. lactis* biofilms. In order to demonstrate the influence of pili in the cohesive strength of the biofilms, we decided to quantify cell-biofilm interactions using colloidal probes functionalized with bacteria and brought in contact of the biofilm-interface (Fig. 5a,c,e,g). Force spectroscopy experiments were therefore conducted between cells on the probe and 24-h biofilms of *L. lactis*. The histograms showing the distribution of the adhesion forces recorded, as well as typical force-distance curves obtained in each case,

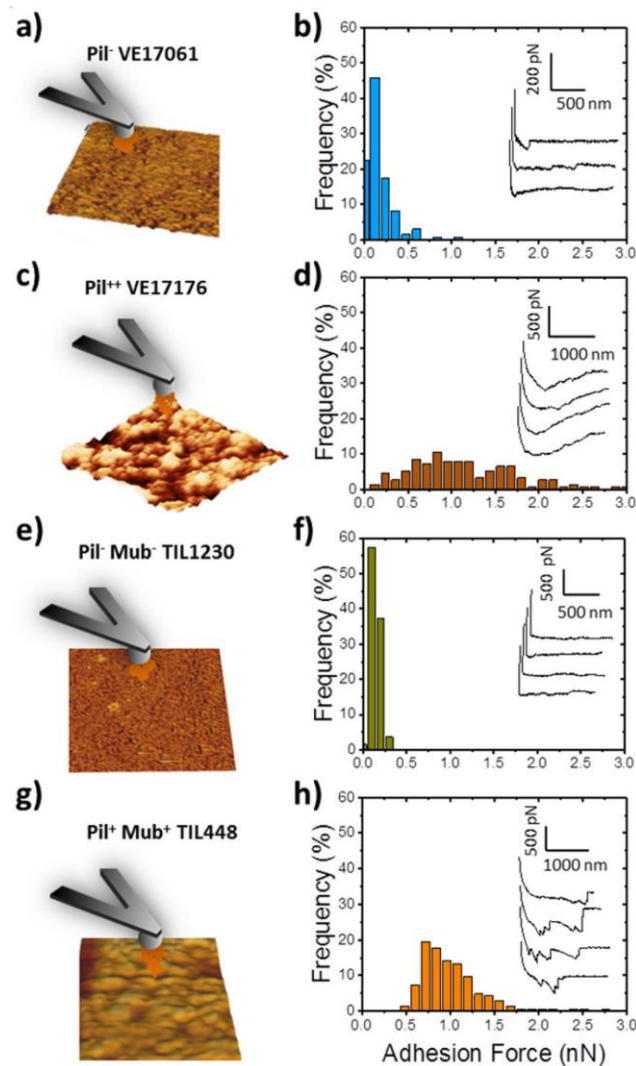


Figure 5. Quantification of the interactions between individual cells and 24 h-biofilms of *L. lactis*. (a,c,e,g) show measurement methods. (b,d,f,h) Adhesion force histograms and typical force curves obtained by recording force curves on $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ biofilm surface with 16×16 pixels in Pil⁻ VE17061 (b), Pil⁺⁺ VE17176 (d), Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 (f), and Pil⁺ Mub⁺ TIL448 (h) strains.

are presented Fig. 5d,f,h. As it can be seen in Fig. 5b,f, the measurements between the two-control strains (Pil⁻ VE17061 and Pil⁻ Mub⁻ TIL1230) and their respective biofilms resulted in adhesion forces in the range of 0.12–0.25 nN. The adhesion forces for the two pilated strains, Pil⁺⁺ VE17176 (Fig. 5d) and Mub⁺ TIL448 (Fig. 5h) were stronger, and ranged from 0.5 to 2 nN. The typical force curves observed for pilated strains showed multi-signatures that were more frequent for Pil⁺ Mub⁺ TIL448 because of the unfolding of several proteins (Mub among others) in addition to pili. These signatures were missing for pili-devoid strains. These results demonstrated that pili were clearly involved in the high adhesion of the cells in mature biofilm.

To facilitate the comparison between strains, the results concerning the thickness, average roughness, Young's modulus and adhesion force values are gathered in a recapitulative table (Table 2). For the sake of transparency,

Strains	Pil/Mub phenotypes	Thickness (μm)	Average roughness (nm)	Young's modulus (kPa)	Adhesion force (nN)
VE 17061	-/-	30-53	45.0-76.6	4-50	0.12-0.25
VE17176	++/-	70-80	77.8-135.1	0.02-0.20	0.5-2.3
TIL1230	-/-	34-47	21.6-25.3	25-100	0.15-0.19
TIL448	+/+	40-60	34.5-50.5	0.01-0.40	0.5-2.5

Table 2. Summary table of results: biofilm thickness, average roughness, Young's modulus and adhesion force are reported for the four studied strains. For each parameter, a statistical analysis was performed by the ANOVA test at the threshold of 5% (*), 1% (**) and 0.1% (***). NSD: no significant difference.

Comparison of strains	Thickness	Average roughness	Young modulus	Adhesion force
Pil ⁻ VE 17061/Pil ⁺ VE17176	**	**	***	***
Pil ⁻ VE 17061/Pil ⁻ Mub ⁻ TIL1230	NSD	*	NSD	NSD
Pil ⁻ VE 17061/Pil ⁻ Mub ⁺ TIL448	NSD	NSD	***	***
Pil ⁺ VE17176/Pil ⁻ Mub ⁻ TIL1230	**	***	***	***
Pil ⁺ VE17176/Pil ⁺ Mub ⁺ TIL448	**	**	NSD	NSD
Pil ⁻ Mub ⁻ TIL448/Pil ⁻ Mub ⁻ TIL1230	NSD	*	***	***

Table 3. Comparison of the average values obtained for one strain against those obtained for another one. For this, the ANOVA test for each parameter (thickness, average roughness, Young modulus and Adhesion force) was used with threshold of 5% (*), 1% (**) and 0.1% (***). NSD: no significant difference.

we also gathered the results of the ANOVA test applied to the 4 different parameters for the 4 different strains (Table 3). Globally the strains devoid of pili displayed stiffer biofilms (4–100 kPa) and smoother surface than the pilated strains (Young Modulus around 0.04–0.1 kPa). The presence of others surface proteins does not seem to affect the stiffness but make the biofilm smoother and more compact, as observed in the environmental strain. Finally, we demonstrated the role of pili and other surface proteins in the biofilms cohesiveness by testing the homotypic adhesion of bacteria to the biofilm surface.

Discussion

In the present work, we demonstrate the role of *L. lactis* pili in biofilm architecture and nanomechanical properties. Confocal scanning laser microscopy (CSLM) and AFM imaging were used to examine the structure and the topography of biofilms of different *L. lactis* strains. CSLM image of 24-h biofilms revealed that the biofilm obtained with the Pil⁻ VE17061 strain was compact and uniform whereas the Pil⁺ VE17176 strain formed a heterogeneous biofilm with dense aggregates and aerial structure. These results confirmed the previous works carried out on the same strains¹⁴. Similar observations on the role of pili in biofilm architecture are in line with the results obtained on the hyperpilated mutant's of *Pseudomonas aeruginosa*⁵². Indeed, using CLSM it was shown that the mutants devoid of type IV pili did not form microcolonies during the biofilm formation and leads to the formation of a homogeneous biofilm structure.

To go one step further in the complexity of the system, we shifted to a couple of natural vegetal isolates, the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strain harboring both pili and Mub-domain proteins at its surface and the Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 derivative devoid of those two surface determinants^{25,38}. As illustrated in Fig. 4, the biofilm obtained for the Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strain was surprisingly homogeneous despite the presence of pili. However, it appeared to be less compact than the biofilm of the control strain (Pil⁻ Mub⁻ TIL1230) pointing out the influence of pili. These results were unexpected for the strain Pil⁺ Mub⁺ TIL448 as we rather expected a biofilm with a structure close to that of the laboratory pilated strain Pil⁺ VE17176. This discrepancy could be attributed to several hypotheses (i) the Mub-proteins may play a role in the more compact structure of Pil⁺ Mub⁺ TIL 448 biofilms, (ii) Pil⁺ Mub⁺ TIL 448 might produce other surface proteins³⁸ that could increase the adhesion of the bacteria within the biofilm, (iii) the Pil⁺ Mub⁺ TIL 448 strain produced high number of exopolysaccharides, compared to the laboratory strains, that could be involved in the building of a homogenous and compact biofilm matrix. In addition, it is highly probable that the expression level of the pilus biosynthesis genes in the natural Pil⁺ Mub⁺ TIL448 strain is lower than that of the laboratory Pil⁺ VE17176 strain in which the whole *pil* operon and the *srtA* gene involved

in cell–wall attachment of the pilus, are both overexpressed at high level¹⁴. This could also explain the difference of the thickness of the two biofilms. As a result, the Pil⁺⁺ VE17176 strain exhibits an aerial biofilm with macro-aggregates as observed by AFM high-resolution images and cross-section profiles (Fig. 2d–f). These characteristics of the Pil⁺⁺ VE17176 biofilm have also been correlated with a high surface roughness compared to that of the Pil⁻ VE17061 biofilm and to those obtained with the environmental strains that were flat and smooth (Fig. 3).

Interestingly, the experiments performed in the environmental strain TIL448 shed light on the relationship between pili, Mub-proteins and extracellular polymeric substances at the biofilm level. The interactions discovered between pili and Mub-proteins²⁵, at the molecular scale and the significant presence of a diversity of proteins on the surface of strain TIL448³⁸ seems to have an impact at the biofilm scale and lead to the production of a denser and more compact biofilm than in the absence of Mub-protein and pili (Pil⁻ Mub⁻ TIL1230).

The relationship between pili and other surface proteins at the biofilm scale is increasingly being studied. Recently, Wang and coworkers⁵³ investigated, using AFM, the role of the interactions between type 3 fimbriae and the polysaccharidic capsule of *Klebsiella pneumoniae* in biofilm formation. They concluded that the type 3 fimbriae help maintaining the fluidity of the polysaccharidic capsule that is involved in the biofilm organization. In another study⁵⁴, it has been shown that the curli-like pili produced by *Salmonella*, and the other components of the extracellular matrix played an important role in biofilm morphology and curli seem to be indispensable for the formation of cell aggregates rather than the other components of the matrix⁵¹.

AFM has been extensively used during the last decades to study single bacteria or even single molecules at the bacterial surface. However, studies at the scale of the biofilm are uncommon and very few have been developed on hydrated biofilms. In this work, it should be noted that AFM imaging and force spectroscopy were carried out in an aqueous medium because it has been shown that dried biofilms change in morphology, roughness or adhesion forces when compared to moist biofilms⁵⁵. Drying biofilms before imaging permits to obtain high-resolution images of the microbial interfaces^{46,57}, but the experimental conditions are quite different from the biological reality of a biofilm that is only formed in aqueous solution.

Next to the fact that AFM allows to obtain high-resolution images and to compare the topology and roughness of biofilm surfaces in aqueous environment, it can also be used to evaluate biofilms elastic behavior. In the present work, we have also measured the mechanical properties of hydrated *L. lactis* biofilms and their relationship with biofilm architecture. We clearly demonstrate the influence of pili in the mechanical properties of biofilms. As shown in Fig. 4 and in supplementary material (Figure S1), the biofilms of pilated strains exhibited a dramatic reduction of their Young's modulus (up to a thousand times) compared to control strains devoid of pili (in average 0.04 ± 0.02 kPa for pilated strains versus 11 ± 2 kPa and 48 ± 12 kPa for Pil⁻ VE17061 and Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 control strains, respectively). This demonstrated a dramatic softening of the biofilms related to the display of pili and to the aerial structuration that they cause. To formulate the Young's modulus values differently, it can be said that, for the same applied force of 0.5 nN, the probe penetrates 20 nm into the biofilms of non-piliated strains and about 4000 nm into the biofilms of pilated strains. To further confirm this substantial significant difference (Table 3), we compared the spring constant of each biofilm by measuring the slope of the indentation curves. The results confirmed that the biofilms of pilated strains were much softer (0.23 ± 0.13 to 0.42 ± 0.21 nN/ μ m) than the biofilm of control strains that exhibited spring constant ranging from 7.25 ± 3.5 to 38.01 ± 13.01 nN/ μ m (supplementary material, Figure S2). These results demonstrated the key role of pili in the elasticity of biofilms whatever the organization of the cells.

The potential role of *L. lactis* pili in cell adhesion within biofilms was investigated by measuring the interaction between bacterial cells attached to the colloidal probe and the biofilm–interface. The measured adhesion forces were higher for the pilated strains, in the range of 0.5 to 2 nN, than for the pili-devoid cells with values of 0.12 to 0.25 nN. The high adhesion level obtained for pilated cells is most likely due to the elasticity of biofilm surfaces, suggesting that the pili played key role in cell–cell interactions in biofilm formation. Other studies have shown that the production of extracellular polymeric substances could also be involved in cell cohesion^{40,58}. This measure of interaction between cells and a biofilm surface are scarce in the literature. It is due to the difficulty to perform experiments on a hydrated biofilm. However, the biofilm ability to interact with other cells is the key information to evaluate for example, the capacity of a beneficial biofilm to trap pathogenic bacteria³⁸.

Conclusion

This work reports on the analysis of the architecture, the structuration, the biomechanics and the cohesiveness of hydrated biofilms of *L. lactis* strains expressing or not, pili, Mub proteins and other surface proteins. We demonstrate that probing a hydrated biofilm by AFM is possible and provide valuable data on its structure.

In summary, the use of CSLM and AFM made it possible to analyze and study the role of pili in the architecture and surface morphology of *L. lactis* hydrated biofilms. We were able to demonstrate on one hand that pili were involved in the structuration, the biomechanics and the cohesiveness of *L. lactis* biofilms, and on the other hand, that other surface proteins were involved in the structuration but have no role nor in the biomechanics, nor on the biofilm cohesiveness. The pilated biofilms were a thousand times softer than biofilms of the control strains proving the crucial role of pili in biofilm biomechanics. The higher adhesion forces between the cells attached on colloidal probe and the biofilm of pilated strains proved that pili were responsible for a global increase of the biofilm cohesiveness. Their interactions with other surface proteins result in a modification of the structure, architecture and surface roughness but do not modify the biofilm biomechanical properties and cohesiveness. This analysis of biofilm biomechanical properties and cohesiveness would contribute, in the future, to elucidate the influence of pili in the resistance of *L. lactis* biofilms to hydrodynamic flow.

Altogether, this work showing that pili and surface proteins can shape the biofilms of *L. lactis* may open new doors in probiotic and biotechnological applications in which this bacteria is used. In probiotic issues, for example, it has been shown in lactobacilli that the biofilm mode of life boosts the biological activity mediated by

Lactobacilli^{59,60}. Also, it can be hypothesized that more stable biofilms of *L. lactis* might increase the persistence and retention time of the bacteria in the gastrointestinal tract and thus increase the beneficial effects mediated by this bacteria. In biotechnological issues including food processing, *L. lactis* biofilms are involved in a number of applications⁴⁵. Therefore, they are proposed as candidates in the growing-interest field of bioprotective biofilms able to prevent or hamper the development of pathogenic and spoilage bacteria on (a) biotic surfaces present in the food chain. In this field, the possibility to modulate the spatial structure of biofilms is of great interest to optimize their ability to trap unwanted bacteria. In addition, the ability to modulate biofilm robustness will be important to allow their resistance to shear flow likely encountered in food industry environments.

Received: 3 November 2020; Accepted: 9 February 2021

Published online: 01 March 2021

References

- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322 (1999).
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187–209 (2002).
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167–193 (2002).
- Flemming, H.-C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010).
- Wingender, J., Neu, T. R. & Flemming, H.-C. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? in *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function* (eds. Wingender, J., Neu, T. R. & Flemming, H.-C.) 1–19 (Springer, 1999). https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_1.
- Costerton, J. W. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 435–464 (1987).
- Mah, T.-F. *et al.* A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**, 306–310 (2003).
- Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P. & van der Veen, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 172–179 (2011).
- Terraf, M. C. L., Mendoza, L. M., Tomás, M. S. J., Silva, C. & Nader-Macías, M. E. F. Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal *Lactobacilli*. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 1761–1772 (2014).
- Vélez, M. P. *et al.* Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 386–398 (2010).
- Mantzourani, M., Gilbert, S. C., Fenlon, M. & Beighton, D. Non-oral bifidobacteria and the aciduric microbiota of the denture plaque biofilm. *Mol. Oral Microbiol.* **25**, 190–199 (2010).
- Lerich, V., Chassaing, D. & Carpentier, B. Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* **51**, 169–182 (1999).
- Mercier, C. *et al.* Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **46**, 235–243 (2002).
- Oxaran, V. *et al.* Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: Molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. *PLoS ONE* **7**, e50989 (2012).
- Piard, J.-C. & Briand, R. Lactic acid bacteria biofilms. in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* 341–361 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). <https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch20>.
- Rodrigues, L., van der Mei, H., Teixeira, J. A. & Oliveira, R. Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 306–311 (2004).
- Zhao, Q., Wang, C., Liu, Y. & Wang, S. Bacterial adhesion on the metal-polymer composite coatings. *Int. J. Adhes. Adhes.* **27**, 85–91 (2007).
- Arena, M. P., Capozzi, V., Spano, G. & Fiocco, D. The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 2641–2657 (2017).
- Bolotin, A. *et al.* The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**, 731–753 (2001).
- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.-A. & Gruss, A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **3**, 37–58 (2012).
- Ross, T. Microbial ecology in food safety risk assessment. in *Microbial Risk Analysis of Foods* 51–97 (2008). <https://doi.org/10.1128/9781555815752.ch3>.
- Mercenier, A., Müller-Alouf, H. & Grange, C. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**, 17–25 (2000).
- Bermúdez-Humarán, L. G. *et al.* A novel mucosal vaccine based on live *Lactococci* expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J. Immunol.* **175**, 7297–7302 (2005).
- Dague, E. *et al.* Probing in vitro interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM. *Langmuir* **26**, 11010–11017 (2010).
- Dramé, I. *et al.* Analysis of homotypic interactions of *Lactococcus lactis* pili using single-cell force spectroscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 21411–21423 (2020).
- Epstein, A. K., Hochbaum, A. L., Kim, P. & Aizenberg, J. Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry. *Nanotechnology* **22**, 494007 (2011).
- Drenkard, E. & Ausubel, F. M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**, 740–743 (2002).
- Barken, K. B. *et al.* Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**, 2331–2343 (2008).
- Baniasadi, M. *et al.* Nanoindentation of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilm using atomic force microscopy. *Mater. Res. Express* **1**, 045411 (2014).
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295–304 (1998).
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **50**, 61–68 (2003).
- Yi, K., Rasmussen, A. W., Gudlavalleti, S. K., Stephens, D. S. & Stojiljkovic, I. Biofilm Formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **72**, 6132–6138 (2004).
- Nallapareddy, S. R. *et al.* Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* **116**, 2799–2807 (2006).
- Manetti, A. G. O. *et al.* *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **64**, 968–983 (2007).

35. Kankainen, M. *et al.* Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17193–17198 (2009).
36. Castelain, M. *et al.* The nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* pili are conditioned by the polymerized backbone pilin. *PLoS ONE* **11**, e0152053 (2016).
37. Tripathi, P. *et al.* Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano* **7**, 3685–3697 (2013).
38. Meyrand, M. *et al.* Surface proteome analysis of a natural isolate of *Lactococcus lactis* reveals the presence of pili able to bind human intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3935–3947 (2013).
39. Le, D. T. L. *et al.* Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE* **8**, e79850 (2013).
40. Oh, Y. J., Lee, N. R., Jo, W., Jung, W. K. & Lim, J. S. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **109**, 874–880 (2009).
41. Cense, A. W. *et al.* Mechanical properties and failure of *Streptococcus mutans* biofilms, studied using a microindentation device. *J. Microbiol. Methods* **67**, 463–472 (2006).
42. Chan, R. W. & Rodriguez, M. L. A simple-shear rheometer for linear viscoelastic characterization of vocal fold tissues at phonatory frequencies. *J. Acoust. Soc. Am.* **124**, 1207–1219 (2008).
43. Wright, C. J., Shah, M. K., Powell, L. C. & Armstrong, I. Application of AFM from microbial cell to biofilm. *Scanning* **32**, 134–149 (2010).
44. Ozkan, A. D., Topal, A. E., Dana, A., Guler, M. O. & Tekinay, A. B. Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. *Micron* **89**, 60–76 (2016).
45. Boyd, R. D., Verran, J., Jones, M. V. & Bhakoo, M. Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. *Langmuir* **18**, 2343–2346 (2002).
46. Roa, J. J., Oncins, G., Diaz, J., Sanz, F. & Segarra, M. Calculation of Young's modulus value by means of AFM. *Recent Pat. Nanotechnol.* **5**, 27–36 (2011).
47. Papi, M. *et al.* Detection of biofilm-grown *Aspergillus fumigatus* by means of atomic force spectroscopy: Ultrastructural effects of alginate lyase. *Microsc. Microanal.* **18**, 1088–1094 (2012).
48. Dufrène, Y. F. Atomic force microscopy in microbiology: New structural and functional insights into the microbial cell surface. *mBio* **5**, e01363-14 (2014).
49. Huang, Q., Wu, H., Cai, P., Fein, J. B. & Chen, W. Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles. *Sci. Rep.* **5**, 16857 (2015).
50. Hutter, J. L. & Bechhoefer, J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1868–1873 (1993).
51. Beaussart, A. *et al.* Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*–*Candida albicans* interaction. *Nanoscale* **5**, 10894–10900 (2013).
52. Chiang, P. & Burrows, L. L. Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**, 2374–2378 (2003).
53. Jonas, K. *et al.* Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol.* **7**, 70 (2007).
54. Wang, H., Wilksch, J. J., Strugnell, R. A. & Gee, M. L. Role of capsular polysaccharides in biofilm formation: An AFM nanomechanics study. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 13007–13013 (2015).
55. Auerbach, I. D., Sorensen, C., Hansma, H. G. & Holden, P. A. Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *J. Bacteriol.* **182**, 3809–3815 (2000).
56. Méndez-Vilas, A. *et al.* Surface characterisation of two strains of *Staphylococcus epidermidis* with different slime-production by AFM. *Appl. Surf. Sci.* **238**, 18–23 (2004).
57. Volle, C. B., Ferguson, M. A., Aidala, K. E., Spain, E. M. & Núñez, M. E. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B* **67**, 32–40 (2008).
58. Kreis, C. T. & Sullan, R. M. A. Interfacial nanomechanical heterogeneity of the *E. coli* biofilm matrix. *Nanoscale* **12**, 16819–16830 (2020).
59. Rieu, A. *et al.* The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell. Microbiol.* **16**, 1836–1853 (2014).
60. Heumann, A. *et al.* Intestinal release of biofilm-like microcolonies encased in calcium-pectinate beads increases probiotic properties of *Lactocaseibacillus paracasei*. *NPJ Biofilms Microbiomes* **6**, 44 (2020).

Author contributions

C.L., M.C., and E.D. designed the experiments. I.D. and C.F.D. performed the experiments and analyzed the results. M.P.C.C. and J.C.P. constructed and provided the microbial strains used in the study. I.D. and E.D. wrote the manuscript draft. All the authors commented on the manuscript draft and agreed on the final submitted version.

Funding

Funding was provided by CNRS, INSA, and INRAE.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84030-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.D.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

www.nature.com/scientificreports/



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

4.3. Influence des pili sur la structure et la cohésion d'un biofilm de *L. lactis* soumis à une contrainte de cisaillement

4.3.1. Contexte et objectifs

L'étude de l'organisation structurale de la composition et des spécificités rhéologiques des biofilms (Rupp et al. 2004 ; Gloag et al. 2020), permet de mieux comprendre comment les contraintes de cisaillement générées dans un fluide en écoulement vont agir sur leur développement et leurs propriétés. Les caractéristiques des biofilms soumis à des contraintes hydrodynamiques, notamment chez des bactéries pathogènes fréquentes dans les milieux hospitaliers, en particulier l'adhésion initiale, l'architecture, la cohésion des cellules et les propriétés nanomécaniques, ont été largement documentées ces dernières années. Les objectifs sont multiples ; il s'agit de mieux comprendre les mécanismes de dégradation ou de détachement ainsi que les phénomènes de transfert de masse couplés aux processus mécaniques afin de maîtriser le développement des biofilms (Stoodley et al. 2000; Klapper et al. 2002). Par ailleurs, en plus des effets liés aux conditions hydrodynamiques, l'influence de certains facteurs biologiques, comme par exemple la production de protéines de surface telles que les pili (Wang et al. 2018) ou la production de la matrice d'EPS (Branda et al. 2005 ; Karim et al. 2015), est de plus en plus considérée. Ainsi, les travaux de Wang et al. (2018) ont montré que dans un biofilm précoce (8h) d'*E. coli*, les fimbria de type I favorisaient clairement l'adhésion irréversible de microcolonies résistant fortement au détachement en réponse à l'écoulement (Wang et al. 2018).

Dans le cas de *L. lactis*, le rôle des pili dans la mise en place et le développement d'un biofilm dans un écoulement reste à déterminer ainsi que l'existence éventuelle d'une réponse au stress mécanique de cisaillement exercé par le flux. En conséquence, après avoir étudié le rôle médiateur des pili de *L. lactis* dans les interactions entre bactéries, leur influence sur l'architecture et l'élasticité du biofilm, nous nous intéressons au comportement dynamique du biofilm, en particulier son détachement ou sa reconstitution, dans des conditions d'écoulement maîtrisées en chambre à écoulement cisailé (CEC). L'existence de corrélations entre la présence des pili et la persistance d'un biofilm déjà formé face à des variations de contrainte de cisaillement sera recherchée. Le rôle de l'apport nutritif sur la croissance et la compacité du biofilm sera pris en compte dans l'analyse.

4.3.2. Résultats et discussion

4.3.2.1. Effets du débit sur les caractéristiques des biofilms de *L. lactis*

L'effet des conditions hydrodynamiques sur la structure des biofilms a été étudié en utilisant le dispositif CEC décrit dans le chapitre « matériels et méthodes ». Différentes souches exprimant des phénotypes différents vis-à-vis de la production de pili et de protéines de surface ont été considérées.

Pour chaque expérience indépendante, le biofilm de *L. lactis* a été initialement installé dans la CEC durant 24h en condition statique. Dans un essai de référence mené pour chaque souche, après ces 24h, la partie supérieure de la chambre a été enlevée afin d'éliminer le liquide et les cellules planctoniques en aspirant délicatement à la pipette. Une coloration à l'éosine a été réalisée afin d'observer l'aspect des structures formées par les bactéries à la fin de cette phase de prolifération statique (**Fig. 23**). Les parties apparaissant noires sur les images sont des zones sans cellules. Elles correspondent soit à des cavités dans l'épaisseur de la structure, soit à des zones du support sur lesquelles les bactéries n'ont pas adhéré. Pour chaque souche, les images enregistrées avant la mise en route de la pompe d'alimentation montrent des aspects très différents des colonies ; en particulier la souche Pil^{++} VE17176 présente un aspect hétérogène, génère des structures très aériennes et flocculeuses, qui semblent se développer en hauteur (**Fig. 23b**), ce qui confirme les observations faites en microscopie confocale par Oxaran et al. (2012) ainsi que nos précédents résultats. En revanche, on note peu de différences pour les images obtenues pour les autres souches, Pil^- VE17061 (**Fig. 23a**), $\text{Pil}^- \text{Mub}^-$ TIL1230 (**Fig. 23c**) et $\text{Pil}^+ \text{Mub}^+$ TIL448 (**Fig. 23d**), pour lesquelles le tapis bactérien apparaît relativement homogène et compact.

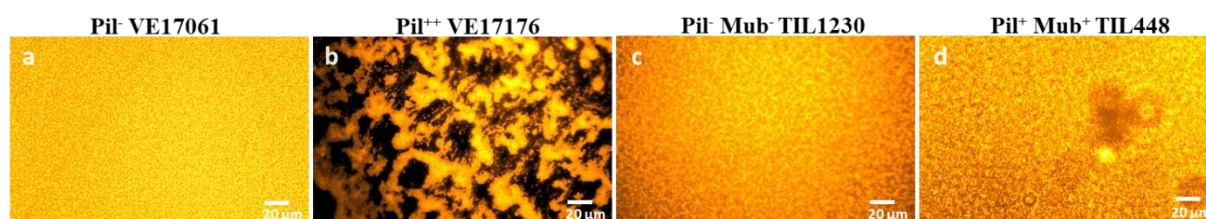


Figure 23 : Images de microscopie à fluorescence montrant l'aspect des structures formées par les cellules après 24h de prolifération statique. (a), (b), (c) et (d) sont respectivement les souches Pil^- VE17061, Pil^{++} VE17176, $\text{Pil}^- \text{Mub}^-$ TIL1230 et $\text{Pil}^+ \text{Mub}^+$ TIL448. Pour chaque souche de *L. lactis*, les bactéries (en jaune orangé) sont marquées par l'éosine à 2 %.

Dans les expériences de développement d'un biofilm en condition d'écoulement, la phase de 24h en condition statique est suivie d'une phase dynamique pendant laquelle une contrainte de cisaillement pariétale constante est appliquée pendant 24h (**Table 4**). Lors des observations après la première étape en conditions statiques, malgré l'élimination du liquide et des cellules libres dans la chambre, il est difficile d'affirmer si la structure observée correspond réellement à un biofilm ou si elle résulte de l'accumulation des bactéries sédimentées après la phase statique. En revanche, l'écoulement en assurant l'élimination des cellules non adhérentes ou planctoniques, garantit que l'observation réalisée après 24h est celle d'un réel biofilm. Les images qui sont alors obtenues pour les différentes souches soumises à des niveaux de contraintes différents, sont comparées après marquage à l'éosine 2 %. Les parties de l'image apparaissant noires correspondent à des zones sans cellules, cavités dans l'épaisseur du biofilm, zones du support sur lesquelles les bactéries ne se sont pas attachées ou encore des régions où le biofilm a été éliminé par l'écoulement.

Ainsi la mise en place de l'écoulement élimine rapidement les cellules non ou mal adhérentes. Ce phénomène illustré sur la **Fig. 24 e-h** dans le cas du débit de 5 mL/min, montre en effet une réduction très importante du nombre de bactéries sur la surface après quelques minutes d'écoulement (3 min), seules quelques macro-colonies restent adhérentes dans la chambre. Le taux de recouvrement du support reste cependant supérieur pour la souche Pil^{++} VE17176, ce qui est cohérent avec leur aptitude à produire des pili dont le rôle dans l'adhésion a déjà été démontré (Castelain et al. 2016b; Dramé et al. 2020). A ce stade, la souche $Pili^{++}$ VE17176 semble présenter des structures se développant davantage en hauteur. Quant à la souche $Pil^{+}Mub^{+}$ TIL448, c'est celle qui apparaît donner le taux de couverture le plus important, les protéines de surface Mub favorisant probablement l'attachement des bactéries au support.

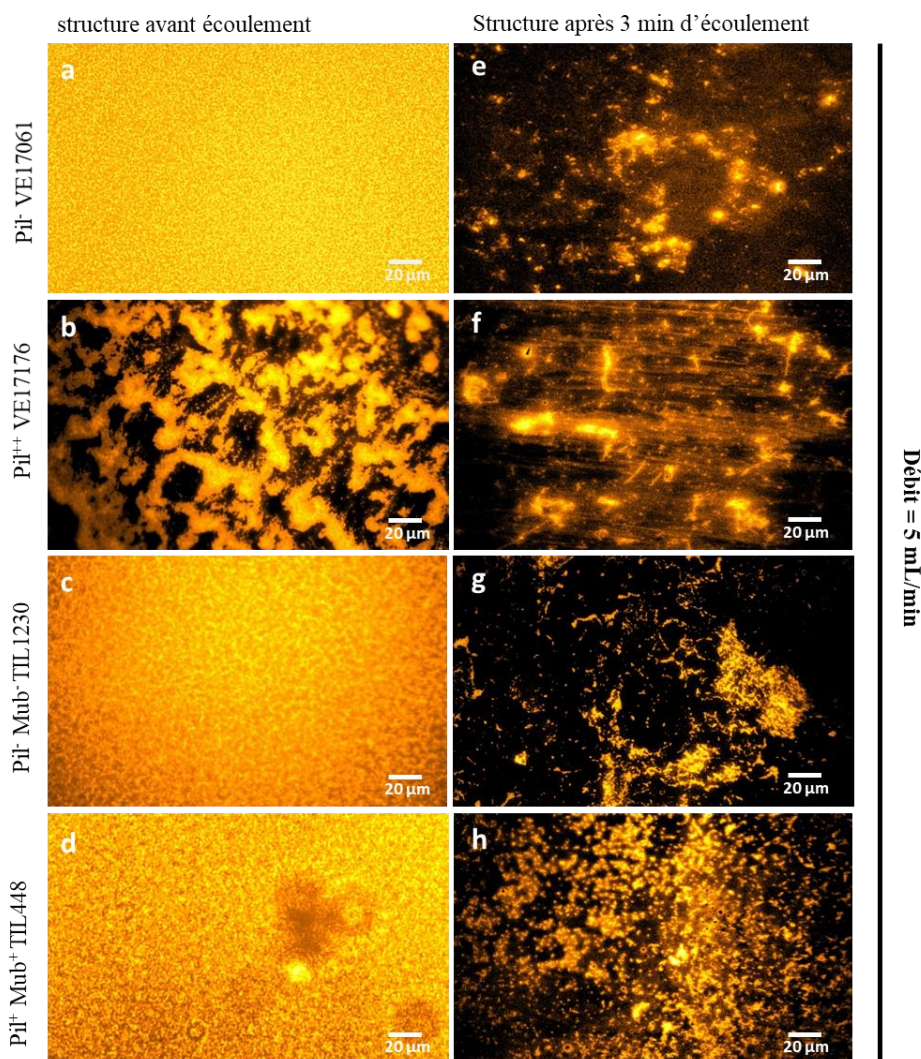


Figure 24 : Images de microscopie à fluorescence montrant la structure des biofilms de *L. lactis* pour les différentes souches après 3 min d'écoulement (e-h) à un débit de 5 mL/min soit 1 Pa. (a-d) est la référence avant l'écoulement. Les bactéries sont marquées à l'éosine à 2 %.

L'influence du niveau de contrainte appliquée sur l'aptitude des différentes souches à générer des biofilms et sur les caractéristiques de ces derniers a été étudiée en faisant varier le débit d'alimentation sur une plage de 0,1 à 5 mL/min, correspondant à des niveaux de contrainte pariétale variant de 0,02 à 1 Pa respectivement. Cependant, pour le débit de 0,1 mL/min, quelle que soit la souche considérée, on observe dans le canal des agrégats ou flocs immobiles malgré l'écoulement. On peut supposer que dans ces conditions le débit est trop faible pour entraîner ces agrégats (flocs en suspension ou parties de biofilm détachées), qui se retrouvent alors immobilisés dans le canal. Dans ces conditions, quelle que soit la souche les structures observées qui sont très hétérogènes sont certainement davantage le reflet de

l'organisation des bactéries croissant sous forme planctonique en flocons qu'en biofilm. On retrouve en effet des structures en amas floconneux (**Fig. 25 e-h**).

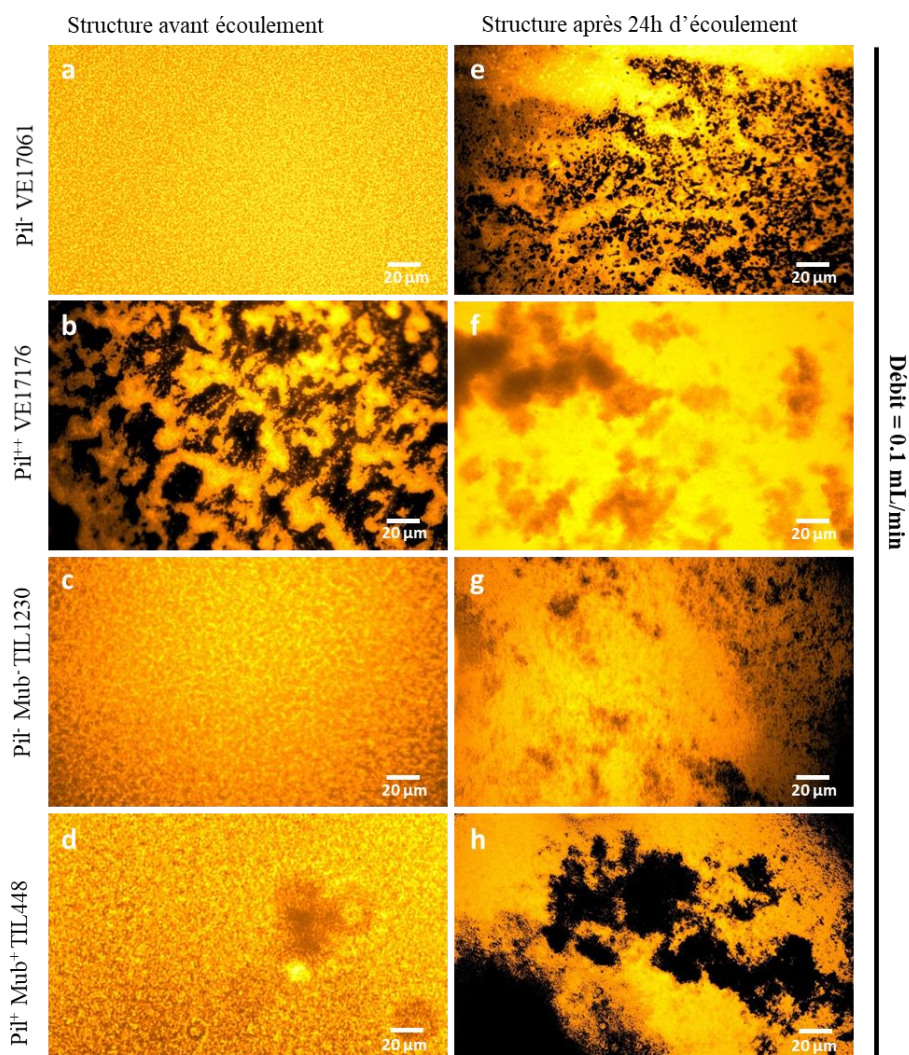


Figure 25 : Images de microscopie à fluorescence montrant l'organisation des bactéries de *L. lactis* avant (a-d) et après 24h d'écoulement (e-h) à un débit de 0.1 mL/min (contrainte de 0,02 Pa). Les cellules sont marquées à l'éosine 2 %.

Pour les autres conditions opératoires, c'est-à-dire des débits variant de 1 à 5 mL/min, les bactéries non adhérentes après 24h en conditions statique sont bien éliminées et les cellules adhérentes prolifèrent et génèrent un biofilm structuré (**Fig. 26 e-p**). Ceci indique que, quel que soit le phénotype des souches considérées ; Pil⁺⁺ VE17176 / Pil⁻ VE17061, Pil⁺Mub⁺ TIL448 / Pil⁻Mub⁻ TIL1230, toutes parviennent à se développer sous forme de biofilm malgré l'écoulement. Cependant, les caractéristiques morphologiques de ces biofilms diffèrent selon la souche considérée. Ainsi, les souches contrôle Pil⁻ VE17061 et Pil⁻Mub⁻ TIL1230 et la souche Pil⁺Mub⁺ TIL448 donnent des biofilms relativement homogènes et peu épais

(respectivement **Fig. 26 e, i et m ; g, k et o et h, l et p**) alors que la souche Pil^{++} VE17176 se développe en biofilm plus épais, hétérogène et avec des structures aériennes présentant de nombreuses cavités (**Fig. 26 f-n**). De façon générale, les structures et organisations des biofilms obtenus sous écoulement pour toutes les souches apparaissent similaires à celles obtenues pour les mêmes souches en conditions statiques (**Fig. 26 a-d**). Dans les conditions de ces essais, l'écoulement ne semble pas modifier la façon globale dont s'organisent les biofilms pour chaque phénotype (**Fig. 26**).

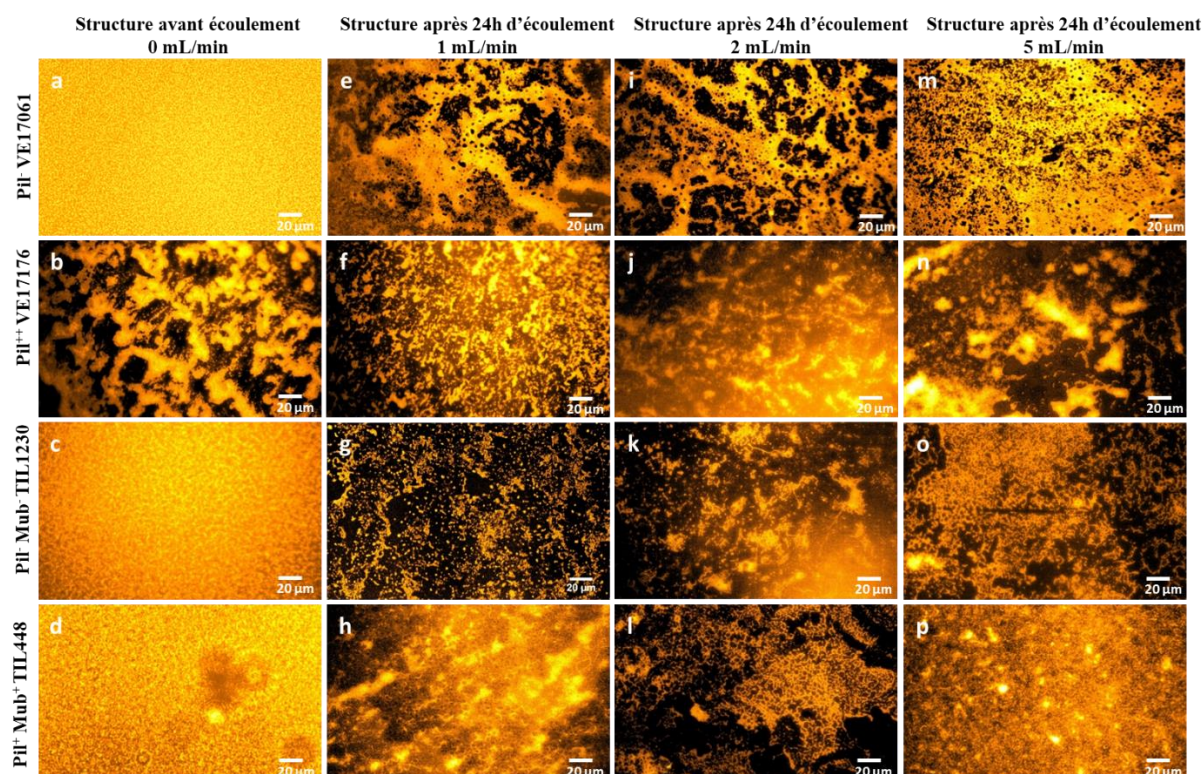


Figure 26 : Images de microscopie à fluorescence montrant la structure des biofilms des souches de *L. lactis* avant écoulement, et après 24h d'écoulement à 1 (e-h), 2 (i-l) et 5 mL/min (m-p) correspondant à 0,2, 0,4 et 1 Pa. (a-d) Structures formées pendant la phase de prolifération (phase statique). Les bactéries sont marquées à l'éosine à 2 %.

Dans les conditions expérimentales testées, l'augmentation du niveau de contrainte conduit à un taux de recouvrement du support après 24h qui augmente également, même si l'arrachement et l'élimination des bactéries initialement attachées doivent être plus importantes aux débits les plus élevés. Ce constat suggère que les débits les plus élevés, correspondant aux niveaux de contrainte les plus forts, pourraient favoriser la prolifération des

bactéries adhérees, qui forment alors le biofilm. Cette hypothèse a été également émise dans de nombreux travaux (Paul et al. (2012), Teodósio et al. (2011), Pereira et al. (2020), Stoodley et al. (1999), Vieira et al. (1993)) qui ont aussi démontré que l'augmentation de la contrainte de cisaillement pouvait générer un stress mécanique pour les bactéries conduisant au développement d'un biofilm dense, compact, cohésif et avec une diminution de l'épaisseur et de la masse.

Si l'émergence de mutants, sous pression de sélection due aux conditions expérimentales, dont les propriétés faciliteraient l'adhésion et l'établissement de biofilms, semble peu probable en raison de la durée des expériences, elle ne peut être exclue. Un contrôle du génotype pourrait ainsi être envisagé dans une étude ultérieure pour infirmer cette hypothèse.

L'augmentation de la contrainte mécanique, susceptible d'arracher des cellules mais aussi de limiter la croissance des biofilms par érosion, participe également à l'intensification des transferts de matière, en particulier la diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le biofilm qui, au contraire, peuvent être favorables à la croissance cellulaire (Tsai 2005; Jones et Buie 2019). Par ailleurs, l'augmentation du débit d'alimentation s'accompagne aussi de vitesses d'apports de substrat supérieures. Le développement qui est observé pour les différents biofilms résulte donc des effets cumulés, favorables et défavorables, de ces différents phénomènes qui, dans le cas de ces expériences, sont étroitement couplés.

Afin d'essayer de séparer ces effets, une modification de la concentration du milieu a été envisagée.

4.3.2.2. Découplage de l'apport en nutriments de la contrainte mécanique de cisaillement

En condition d'écoulement et donc d'alimentation, l'évolution du biofilm dépend à la fois de l'apport nutritif, croissant avec le débit, de l'intensification des phénomènes de transfert au voisinage du biofilm (renouvellement de l'interface) mais aussi du cisaillement qui peut l'éroder. Afin de contrôler indépendamment ces paramètres, et pour tenter d'isoler l'influence du cisaillement, des expériences ont été menées avec un débit d'écoulement fixé à 5 mL/min, mais avec un milieu de culture dilué (2,5 fois). Les biofilms obtenus avec ce milieu dilué et un écoulement de 5 mL/min (**Fig. 27 e-h**) ont été comparés à ceux obtenus avec un débit de 2 mL/min avec un milieu riche (**Fig. 27 a-d**), permettant dans les 2 cas d'aboutir à la même vitesse d'apport de substrat.

Les images des différents biofilms obtenus après 24h montrent pour toutes les souches des aspects très différents entre les deux conditions opératoires. En effet, avec le milieu dilué mais apporté à un débit plus élevé, les structures formées après 24h apparaissent plus denses et/ou plus épaisses. Pour les souches contrôles (Pil^- VE17061 et Pil^-Mub^- TIL1230) et la souche Pil^+Mub^+ TIL448, le taux de recouvrement est plus important (**Figure 27e, g et h**) alors que pour les souches Pil^{++} VE17176 les biofilms montrent des agrégats plus épais (**Figure 27f**). Le développement des biofilms semble donc favorisé quel que soit le phénotype de la souche par l'augmentation du débit/diminution de la concentration du milieu.

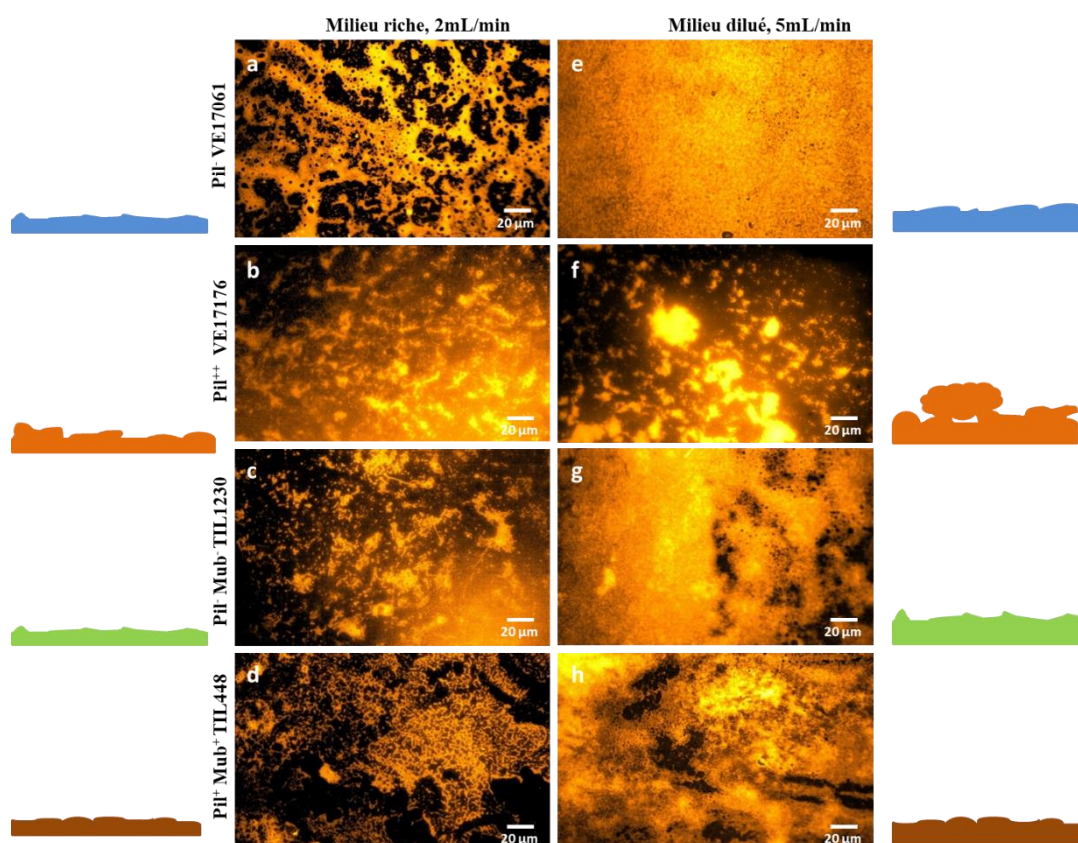


Figure 27 : Images en microscopie à fluorescence des biofilms obtenus après 24h d'écoulement pour les souches de *L. lactis* et leurs représentations schématiques. (a-d) sont les biofilms alimentés avec un milieu riche à 2 mL/min (0,4 Pa) après 24h et (e-h) les biofilms alimentés avec le milieu dilué et à 5 mL/min. Les biofilms (en jaune orangé) sont marqués à l'éosine à 2 %.

Toutes les images enregistrées montrent une croissance des biofilms, ce qui traduirait l'absence de limitations nutritionnelles quelles que soient les conditions opératoires, même dans le cas du milieu appauvri.

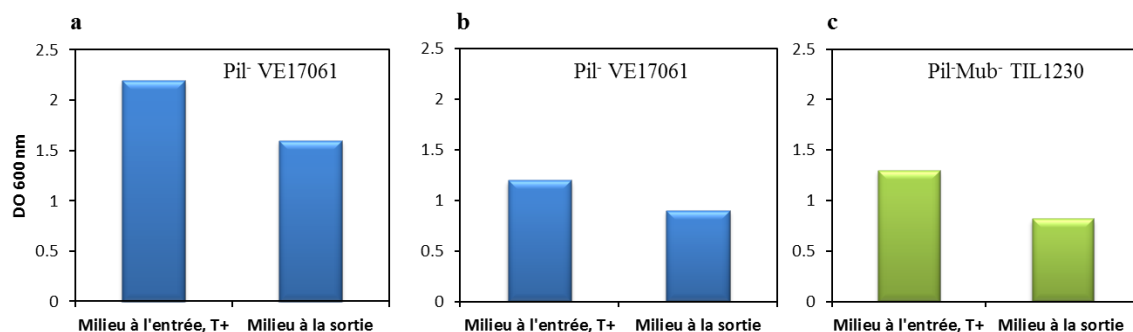


Figure 28 : Test de culture sur les milieux entrants et sortants de la chambre à un débit de 5 mL/min par mesure de la DO après 24h de culture : milieu richeensemencé avec la Pil⁻ VE17061 en (a), milieu appauvriensemencé avec la Pil⁻ VE17061 (b), milieu appauvriensemencé avec la souche Pil⁻Mub⁻ TIL1230 (c).

La disponibilité des substrats a été vérifiée par un test de croissance en tube réalisé en inoculant des échantillons de milieux prélevés à l'entrée et à la sortie de la chambre, après les avoir centrifugés et filtrés (voir la section « Matériels et méthodes »). Les précultures utilisées pour inoculer ont été réalisées avec les mêmes bactéries que celles cultivées dans la chambre. La DO_{600 nm} de chaque culture a été mesurée après 24h, en phase stationnaire, afin de mettre en évidence la croissance bactérienne. Par exemple pour la souche Pil⁻ VE17061, la DO_{600 nm} obtenue en 24h pour la culture sur le milieu sortant est environ 70 % de celle atteinte pour le milieu d'alimentation à l'entrée de la chambre (**Fig. 28 a-b**).

Il ressort de ces essais que globalement, malgré la consommation d'une fraction des substrats durant le temps de séjour du liquide dans le dispositif, le milieu sortant de la chambre, contient toujours des nutriments en quantité suffisante pour permettre une multiplication importante des bactéries. Le biofilm, qu'il soit obtenu en milieu riche ou en milieu appauvri, associé aux cellules en suspension dans la chambre, ne consomme qu'une faible part des substrats.

On pourrait donc supposer que, s'il n'y a pas de limitation nutritionnelle susceptible de pénaliser le développement du biofilm, les différences structurales observées entre les deux

conditions opératoires résultent principalement du changement de contrainte mécanique. Cependant, la mesure réalisée n'est qu'une évaluation globale de la disponibilité des substrats qui ne reflète pas réellement les phénomènes au voisinage du biofilm. En effet, la présence du biofilm induit des hétérogénéités de comportement avec en particulier des vitesses locales de consommation des substrats différant entre celles des bactéries planctoniques en suspension et celles des lactocoques concentrés dans le biofilm. Par ailleurs, des limitations nutritionnelles locales pourraient résulter d'un taux de renouvellement de l'interface insuffisant par rapport à la vitesse de consommation des substrats au niveau du biofilm. Dans cette hypothèse, l'augmentation du débit qui favoriserait le transfert convectif, améliorerait l'accès aux substrats et stimulerait la croissance du biofilm.

A même débit de 5 mL/min, la comparaison des biofilms obtenus avec un milieu dilué (**Fig. 27 e-h**) ou avec un milieu plus concentré (**Fig. 26 m-p**) montre des structures qui semblent plus épaisses en milieu appauvri. Comme cela a été suggéré dans des études antérieures, l'appauvrissement du milieu de culture au voisinage du biofilm pourrait induire un stress d'ordre nutritionnel au voisinage du biofilm, ce qui stimulerait la production d'exopolymères qui sont favorables à l'adhésion (Kadam et al. 2013) et contribueraient au développement du biofilm Qi et al. (2008). Ce stress nutritionnel qui favoriserait une croissance en épaisseur des biofilms, avec toutefois une densité plus faible, pourrait donc résulter soit, à contrainte identique, d'un appauvrissement du milieu dès la phase d'installation et de croissance des bactéries en statique (avant l'écoulement), soit à vitesse d'apport du substrat identique d'une diminution de la contrainte. Cependant cette hypothèse, même si elle paraît être confirmée pour les 4 souches, mériterait d'être vérifiée par la réalisation de nouvelles expériences dans les mêmes conditions et, en complément, par des essais à différents débits, en ajustant la concentration du milieu.

4.3.2.3. L'influence des pili de *L. lactis* sur la persistance du biofilm

Pour analyser l'influence des pili sur la persistance du biofilm de *L. lactis* lorsque les contraintes hydrodynamiques augmentent, le canal d'écoulement a été inoculé avec l'une des souches, laissé pendant 24h en condition statique, puis soumis à des niveaux de contrainte croissant en réalisant une augmentation graduelle du débit d'alimentation. Avant la mise en œuvre de l'écoulement, les structures obtenues pour les différentes souches présentent des structures homogènes et compactes sauf dans le cas de la souche Pil⁺⁺VE17176 (**Fig. 29 a-d**) qui apparaît avoir une rugosité importante avec la présence de nombreux amas ou agrégats.

Un écoulement à un débit de 5 mL/ min, correspondant à une contrainte de 1 Pa, est appliqué pendant 3 min, les cellules sont alors colorées et les biofilms résiduels sont observés. Dans le cas de Pil⁻ VE17061 seules quelques rares microcolonies subsistent sur la surface du support. De façon étonnante, pour la souche Pil⁻Mub⁻ TIL1230, le tapis cellulaire résiduel semble un peu plus important et on peut observer des sillons probablement dus à un écoulement qui s'installe préférentiellement sur certaines zones. C'est pour les deux souches piliées (Pil⁺⁺VE17176 et Pil⁺Mub⁺ TIL448) que le taux de couverture de la surface du support reste le plus important (**Fig. 29f et h**), avec toutefois une densité qui semble supérieure pour la souche Pili⁺⁺ VE17176. Lorsque le débit est graduellement augmenté à 10 mL/min, puis 20 mL min, ce qui correspond à des contraintes de cisaillement de 2 Pa et 4 Pa respectivement, les bactéries correspondant aux souches contrôle Pil⁻ sont pratiquement éliminées en totalité (**Fig. 29 i-m et k-o**) ; les structures organisées en biofilms qui ont pu être initiées à partir des cellules initialement adhérentes sont fortement érodées, voire totalement dégradées pour la Pil⁻ VE17061. En revanche, pour les souches exprimant des pili, malgré une érosion importante qui se traduit par une épaisseur plus homogène des biofilms, on retrouve toujours la persistance d'un tapis bactérien, même aux contraintes les plus fortes testées dans ces essais (**Fig. 29j, n, l et p**), témoignant de l'existence de biofilms plus cohésifs et résistant davantage aux contraintes mécaniques.

Ces essais confirment les rôles déterminants des pili à la fois dans l'ancrage initial des cellules et dans la cohésion et la robustesse des biofilms développés. En effet, les souches de *L. lactis* de phénotypes différents conduisent à biofilms d'architectures différentes avec, pour les souches piliées, l'existence d'interactions entre cellules qui leur confèrent une cohérence plus importante en comparaison avec les phénotypes n'exprimant pas de pili. En conséquence, ces biofilms plus solides, persistent sous des contraintes allant jusqu'à 4 Pa alors que seules quelques cellules restent adhérentes sur le support dès qu'une contrainte de 2 Pa est appliquée pour les souches dépourvues de pili.

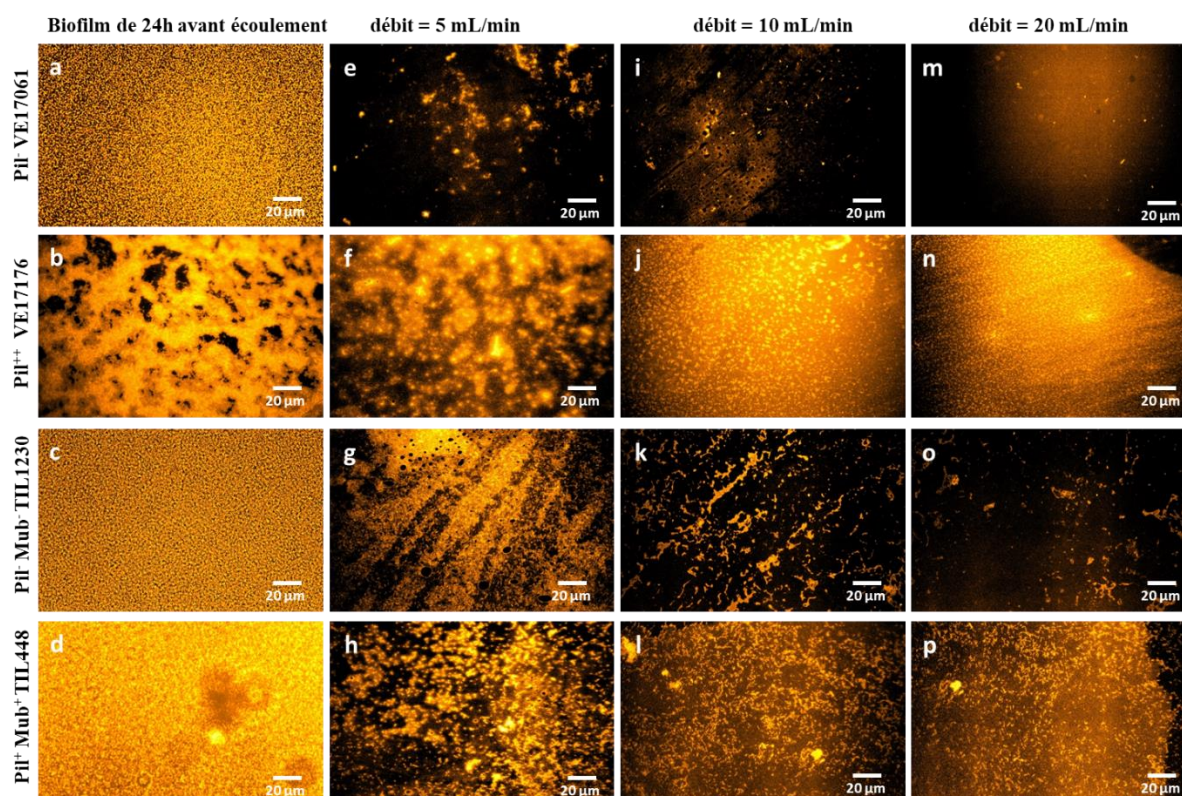


Figure 29 : Images de microscopie à fluorescence montrant la persistance des biofilms des souches de *L. lactis* avant (a-d) et après écoulement sous des débits de 5 (e-h), 10 (i-l) et 20 mL/min (m-p). Les biofilms (en jaune orangé) sont marqués par l'éosine à 2 %.

4.3.3. Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons tenté de montrer les effets de l'écoulement pour des débits croissants (0,1 à 5 mL/min) sur la morphologie et la croissance du biofilm de *L. lactis*. Après une phase d'installation en condition statique, l'écoulement à un débit d'alimentation donné provoque une érosion importante de la surface du biofilm conduisant à une structure hétérogène dès les premières minutes quelle que soit la souche considérée. L'allongement du temps d'écoulement à 24h, permet de voir que le biofilm est capable de persister et de se développer sous contrainte hydrodynamique. Ce développement est plus important lorsque le débit d'écoulement augmente à 5 mL/min conduisant à des biofilms plus structurés, compacts et cohésifs. Ces structures observées après 24h d'écoulement, sont comparables à celles obtenues avant l'écoulement (en condition statique). Cela suggère que l'augmentation des contraintes de cisaillement induites par le flux, entraînerait une réponse au stress mécanique chez les bactéries se traduisant par une croissance et une restructuration du biofilm. Cette hypothèse est explorée en contrôlant l'apport nutritif, autre paramètre pouvant

influer sur la croissance d'un biofilm. Les résultats de ces premières expériences (**Fig. 27**) montrent que les biofilms ne sont pas en limitations nutritionnelles et leur croissance pourrait être liée à l'augmentation de la contrainte mécanique. Cependant, en comparant les biofilms alimentés par un milieu dilué avec ceux alimentés par un milieu riche à même contrainte (1Pa), la croissance est plus importante en milieu appauvri et les biofilms sont plus compacts et plus épais. On peut supposer que lors de la mise en place du biofilm, l'appauvrissement du milieu de culture, pourrait générer un stress nutritionnel qui permettrait de favoriser les bactéries sous forme adhérentes plutôt que les planctoniques. Ces dernières hypothèses restent à confirmer par la réalisation de nouvelles expériences.

Au cours de la mise en place et du développement du biofilm, la production des pili est déterminante. Son rôle dans la persistance du biofilm a été évalué en augmentant le débit par paliers jusqu'à 20 mL/min (**Fig. 29**). Ces expériences ont permis de voir que les biofilms des souches piliées persistent sous un débit de 20 mL/min malgré une érosion importante, alors que pour les souches « contrôle » seules, quelques bactéries isolées restent adhérentes au support. Ces observations permettent de confirmer que les pili contribuent à la persistance du biofilm soumis à un cisaillement ainsi qu'à son développement et sa restructuration.

Chapitre 5 :

Conclusion générale et
perspectives

Chapitre 5 : Conclusion générale et perspectives

Les travaux réalisés par Oxaran et al. (2012) sur la biogénèse des pili chez *Lactococcus lactis* et les travaux menés dans l'équipe TIM de TBI ont été le point de départ de ces travaux de thèse. En effet, le rôle des pili dans l'adhésion aux mucines et dans l'architecture du biofilm et également les travaux récemment menés par Castelain et al. (2016a) sur leurs propriétés nanomécaniques et leur rôle adhésif au polystyrène en chambre à écoulement cisailé (CEC) (Castelain et al. 2016b) ont permis d'apporter différentes briques élémentaires dans la compréhension du rôle joué par les pili dans l'adhésion initiale, la structuration et la cohésion d'un biofilm. L'étude a porté sur la bactérie à Gram-positif non-pathogène *L. lactis*, dont les biofilms positifs pourraient être mis à profit dans divers contextes industriel et médicaux. Les expériences se sont appuyées sur l'existence de banques de mutants aux phénotypes variés dépourvus de pili ou exprimant des pili et/ou des protéines à domaines Mub (Oxaran et al. 2012; Meyrand et al. 2013).

Chez *L. lactis*, l'hypothèse que les pili soient des médiateurs d'interactions entre les bactéries, a constitué le premier volet de ce projet. Dans cette partie, la microscopie électronique à transmission (MET) et l'imagerie en microscopie à force atomique (AFM) ont permis d'observer les pili portés par différentes souches (sauvages ou modifiées) et la spectroscopie de force (SCFS pour Single-Cell Force Spectroscopy) de quantifier les interactions homotypiques entre paires de bactéries. La SCFS, associée à la technique d'immobilisation d'une bactérie sur une microbille, constitue une stratégie pertinente et performante pour évaluer les forces, le travail d'adhésion et les distances de rupture entre paires de cellules (Beaussart et al. 2013). L'utilisation d'une banque de souches comportant des mutants aux phénotypes différents, dépourvus ou surproduisant des pili, a permis de démontrer que le nombre et/ou la longueur des pili exprimés à la surface des bactéries seraient corrélés à l'ampleur de l'adhésion cellulaire. L'ensemble des résultats résumés dans un tableau récapitulatif (Annexe 5) montre que les forces et travail d'adhésion entre paires de cellules sont plus importants chez les souches piliées et plus faibles pour les souches dépourvues de pili pour lesquelles une réduction drastique des fréquences et du travail d'adhésion sont aussi observés. La capacité et l'intensité d'adhésion des cellules les unes des autres est donc clairement fonction de la présence des pili à leurs surfaces. Le rôle du pilus dans l'interaction homotypique entre bactéries est également confirmé par l'ajout d'anticorps anti-PilB (protéine spécifique du squelette du pilus) qui conduit à une diminution importante des forces d'adhésion. L'analyse des courbes de force, notamment chez une souche environnementale

exprimant à la fois des pili et des protéines à domaines Mub, a montré des signatures particulières (« en dents de scie ») pouvant se rapporter à différents types d'interactions, en comparaison avec la souche de laboratoire exprimant uniquement des pili. L'analyse de ces événements, réalisée en caractérisant les interactions hétérotypiques avec des mutants Pil^+Mub^- / Pil^-Mub^+ , a montré que les pili interagissaient également fortement avec les protéines à domaines Mub. Cela suggère que les pili de *L. lactis* pourraient interagir avec différentes autres protéines à la surface des bactéries ou de supports, ce qui impacterait l'étape d'adhésion initiale ainsi que la formation et la cohésion des biofilms.

La détermination des propriétés nanomécaniques des pili a été réalisée grâce à l'analyse des courbes de forces par un modèle physique statistique de chaîne polymère vermiforme (WLC pour Worm-Like Chain). Les pili apparaissent être des macromolécules flexibles avec des longueurs de persistance L_p de 0,05 à 0,15 nm, et des longueurs de contour L_c de 200 à 1200 nm avec une valeur de ΔL_c comprise entre 25 et 250 nm selon la souche piliée considérée (Annexe 5). Cette variabilité liée à la différence de longueurs des pili corrobore les observations réalisées par MET et par AFM. En revanche lorsque les interactions font intervenir des protéines à domaines Mub, les valeurs de L_p et de L_c sont de 0,051 nm et 200 à 600 nm respectivement mais la distance d'écart (ΔL_c) entre les signatures apparaît plus constante vers 50 nm, ce qui prouve le déploiement d'un seul type de macromolécule.

Le rôle médiateur des pili dans les interactions homotypiques et la détermination de leurs propriétés nanomécaniques permettent de mieux comprendre leur influence dans l'adhésion des bactéries les unes aux autres et son ampleur. Ces données laissent également entrevoir l'importance cruciale que les pili peuvent avoir dans la formation, la structure et la cohésion du biofilm de *L. lactis*, en particulier lorsque ce dernier est soumis à des contraintes mécanique ce qui est le cas des écoulements cisailés. Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'influence des pili dans l'organisation du biofilm et ses propriétés nanomécaniques. Les travaux réalisés par Oxaran et al. (2012) ont été repris et reproduits pour une autre souche de *L. lactis*, la souche environnementale TIL448. En complément de cette étude, nos différents résultats ont permis de montrer que si les pili interviennent dans l'auto-agrégation des bactéries, l'organisation et la structure apparente des biofilms de *L. lactis* (homogénéité, épaisseur, compacité, rugosité...), d'autres protéines, telles que les protéines à domaines Mub, contribuent également à leur structuration. Dans les expériences menées, l'apparence du biofilm ne semble pas corrélée à sa biomécanique, car quelle que soit l'origine de la souche (souche de laboratoire IL1403 ou souche

environnementale TIL448), les biofilms obtenus pour les bactéries portant des pili à leur surface présentent des valeurs d'élasticité beaucoup plus grandes que celles des souches contrôle (voir tableau récapitulatif, Annexe 6). Les forces d'adhésion homotypique mesurées entre des cellules fixées sur la sonde colloïdale et l'interface du biofilm formé par les bactéries piliées montrent que les pili favorisent la cohésion des cellules au sein du biofilm. Ces investigations ont été possibles en associant la microscopie confocale à balayage laser (MCBL).

Dans le dernier volet de la thèse, la mise en place et le développement du biofilm en présence d'un écoulement a été étudié. Les expériences menées avec les différentes souches a permis d'examiner le rôle des pili sur l'effet de la contrainte de cisaillement sur le détachement des biofilms et/ou leur reconstitution dans le temps. Dans des conditions d'écoulement maîtrisées en CEC, nous avons montré que l'augmentation d'une contrainte de cisaillement pouvait influencer le développement du biofilm (après 24h d'écoulement), quelle que soit la souche considérée (piliée ou non). L'hypothèse avancée est que les modifications de l'organisation et des caractéristiques du biofilm sont une réponse au stress induit par l'augmentation du débit d'alimentation. Ce stress pourrait avoir une composante mécanique liée à l'augmentation de la contrainte de cisaillement mais pourrait également être dû à la modification de l'apport nutritif au sein du biofilm, au renouvellement du milieu de culture apporté par le flux qui influencerait ainsi la croissance et la structuration. L'augmentation de la contrainte de cisaillement (jusqu'à 1 Pa) conduit à un biofilm compact et cohésif et de faible épaisseur, alors que la dilution du milieu de culture semble stimuler la croissance du biofilm en épaisseur. Dans un écoulement, les pili de *L. lactis* apparaissent jouer un rôle majeur dans la persistance du biofilm formé par les bactéries qui restent adhérentes au support même sous le débit le plus élevé testé (jusqu'à 20 mL/min). Ce comportement des biofilms de souches piliées ouvre des perspectives d'applications prometteuses comme par exemple leur adaptation dans le tractus intestinal ou dans l'industrie laitière comme moyens de lutte contre les contaminations par les espèces d'altérations ou pathogènes.

Les perspectives et développements de ces travaux de thèse multidisciplinaires sont nombreux et variés. Ils peuvent se décliner en 4 volets :

L'approfondissement de l'analyse biophysique et des relations entre la composition du pilus et ses propriétés pourra s'appuyer sur des outils complémentaires (pince optique) et déclinée dans le cas d'autres microorganismes. Sur le rôle des pili dans l'adhésion cellulaire,

il serait important de s'intéresser à la partie du pilus indispensable à la médiation des cellules. Cela conforterait les résultats sur le rôle du squelette du pilus qui au cours des tests de blocage par les anticorps anti-PilB a conduit une diminution drastique des fréquences d'adhésion. Si la coiffe du pilus n'a aucun effet sur l'adhésion des cellules individuelles sur le polystyrène (Castelain et al. 2016b) et sur la flexibilité du pilus (Castelain et al. 2016a), son rôle potentiel dans les interactions intercellulaires, à l'échelle de la cellule et du biofilm pourrait faire l'objet d'étude et de comparaison avec celle des pili d'autres bactéries.

L'influence des conditions nutritionnelles sur le développement du biofilm et de ses caractéristiques (composition, EPS...) pourrait être associée à la caractérisation des pili. Ainsi, à l'échelle du biofilm, l'effet du milieu de culture (choix d'un milieu de culture pour la production de biofilm de *L. lactis*) devrait être évalué en conditions statiques, en comparant leur épaisseur, leur rugosité, leur structure aérienne et leurs propriétés nanomécaniques pour mieux comprendre le rôle des pili et d'éventuelle production d'EPS dans la structuration du biofilm. En outre, le comportement du biofilm de la souche environnementale Pil⁺Mub⁺TIL448 semble indiquer que les pili, même s'ils sont indispensables à l'élasticité du biofilm, ne seraient pas les seuls à intervenir dans sa structure, d'autres protéines de surface pourraient également être impliquées. Ainsi, il serait d'un intérêt majeur de s'intéresser à la capacité de ces souches de *L. lactis* à produire des EPS, des pili et d'autres protéines de surface afin de corréler ces caractéristiques aux propriétés mécaniques des biofilms constitués.

Dans le dernier volet de la thèse, dans lequel des conditions d'écoulement variées ont été mises en œuvre, s'il a été mis en évidence que les pili sont nécessaires à la persistance du biofilm, la capacité à les surproduire par les souches de *L. lactis* en réponse au stress mécanique induit par le flux, doit être approfondie. Comme cela a été montré chez des bactéries comme *E. coli* (Wang et al. 2018), la production ou la surproduction des protéines de surface comme les pili en réponse à un stress mécanique ou nutritionnel, doivent être analysées en prenant en compte le quorum sensing, dont le rôle est essentiel pour contrôler la prolifération des biofilms. Dans cette optique, des expériences sur des durées plus importantes, dans des conditions environnementales et mécaniques parfaitement maîtrisées devront être entreprises et complétées par une analyse fine de l'expression des bactéries.

Enfin, dans une optique d'application industrielle, il serait intéressant d'une part d'étudier l'effet protecteur d'un biofilm établi de *L. lactis* face à une contamination ainsi que

sa résistance lors des nettoyages en place (NEP) dans l'industrie alimentaire. De tels essais pourraient être aisément envisagés en mettant à profit la CEC.

Annexes

Annexe 1 : Propriétés physico chimiques de surface des souches de *L. lactis*

Caractère hydrophobe de la surface des cellules bactérienne :

Le caractère hydrophobe des bactéries est déterminé par la méthode de l'adhésion microbienne aux solvants (MATS) (Bellon-Fontaine et al. 1996). Le solvant utilisé pour évaluer le caractère hydrophobe de la surface des cellules est l'hexadécane (alcane apolaire, non toxique). Les bactéries sont récoltées après la pré-culture (correspondant à une DO_{600nm} de $\sim 2,5$ équivalents à 10^9 ufc/mL), centrifugées (1 000 g, 10 min, température ambiante) et lavées avec 150 mM de NaCl. Elles sont ensuite remises en suspension dans la même solution à une DO_{600nm} finale de $\sim 0,5$. La suspension bactérienne (2,4 mL) est modérément homogénéisée pendant 1min avec 0,4 mL d'hexadécane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le mélange est laissé au repos pendant 15 min afin d'assurer une séparation complète des deux phases. Un échantillon de 1 ml est prélevé de la phase aqueuse pour la mesure de la DO_{600nm} . Le pourcentage d'affinité microbienne à l'hexadécane est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$(4) \quad \text{Affinité (\%)} = (1 - (DO / DO_0)) \times 100,$$

Où DO_0 est la densité optique initiale de la suspension bactérienne avant le mélange avec le solvant, et DO est l'absorbance finale après mélange et séparation des deux phases. Les expériences ont été réalisées en triplicatas et avec trois cultures bactériennes indépendantes. Il est à préciser que, selon Bellon-Fontaine et al. (1996), une affinité des cellules à l'hexadécane à plus de 40 % correspond à un caractère hydrophobe.

Ces résultats ont montré que les mutants issus de la souche IL1403 testées ont une affinité à l'hexadécane inférieure à 40 %, donc une faible hydrophobicité. Ces valeurs obtenues sont comparables à celles trouvées par Castelain et al. (2016b) et dans la thèse de Virgine Oxaran (2012) sur les souches Pil^- et Pil^{++} . En revanche la souche sauvage TIL448 et son contrôle TIL1230 ont présenté une forte affinité à l'hexadécane, ce qui correspond à une forte hydrophobicité, observée également par Meyrand et al. (2013).

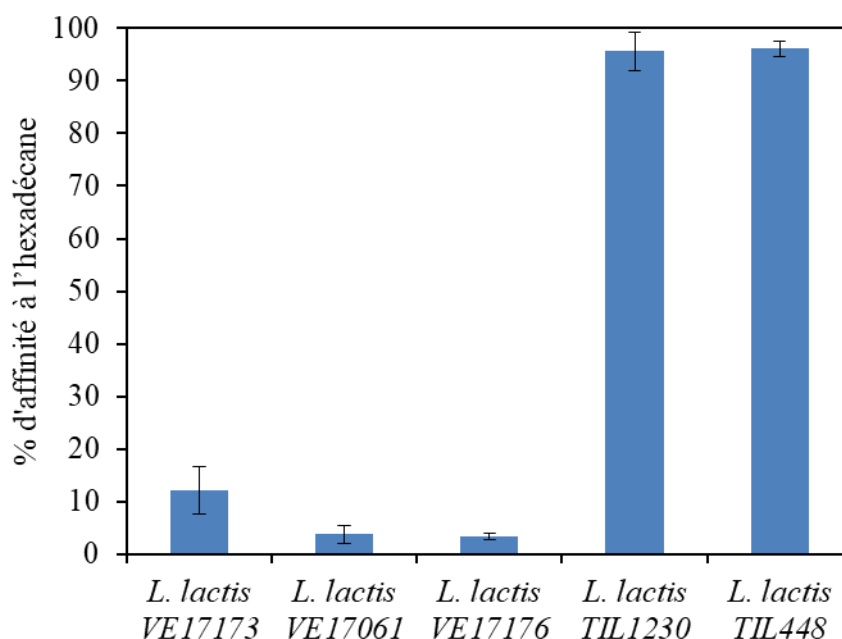


Figure S1-1 : Affinité (en %) des cellules de *L. lactis* à l'hexadécane. L'affinité des cellules à plus de 40 % est considérée hydrophobe.

Charge électrique de la surface des cellules bactériennes :

Les propriétés électriques globales de la surface des différentes souches de *L. lactis* ont été évaluées en mesurant la mobilité électrophorétique des bactéries qui correspond à la vitesse des cellules en suspension exposées à un champ électrique. Pour cela, à partir de la préculture, les cellules sont récupérées par centrifugation (1 000 g, 10 min, température ambiante) et lavées avec 1 mM de KNO₃ pH = 7.4. Elles sont remises en suspension dans la même solution à une concentration cellulaire finale correspondant à une DO_{600 nm} de ~ 0.3. Le pH de la suspension bactérienne a été ajusté à des valeurs de 3, 5 et 7 en utilisant soit de l'acide nitrique (HNO₃, Sigma-Aldrich), soit de l'hydroxyde de potassium (KOH, Sigma-Aldrich). La mobilité électrophorétique a été mesurée à l'aide d'un zétamètre laser automatisé (Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments SARL, Orsay, France) sous un champ électrique de 50 V et a été exprimée en m²s⁻¹V. Les expériences ont été menées avec au moins trois cultures bactériennes indépendantes. Les résultats obtenus sur différentes souches montrent que la charge de surface des cellules de *L. lactis* est négative à différents pH. Il est à souligner que la charge électrique diminue lorsque le milieu de culture s'acidifie.

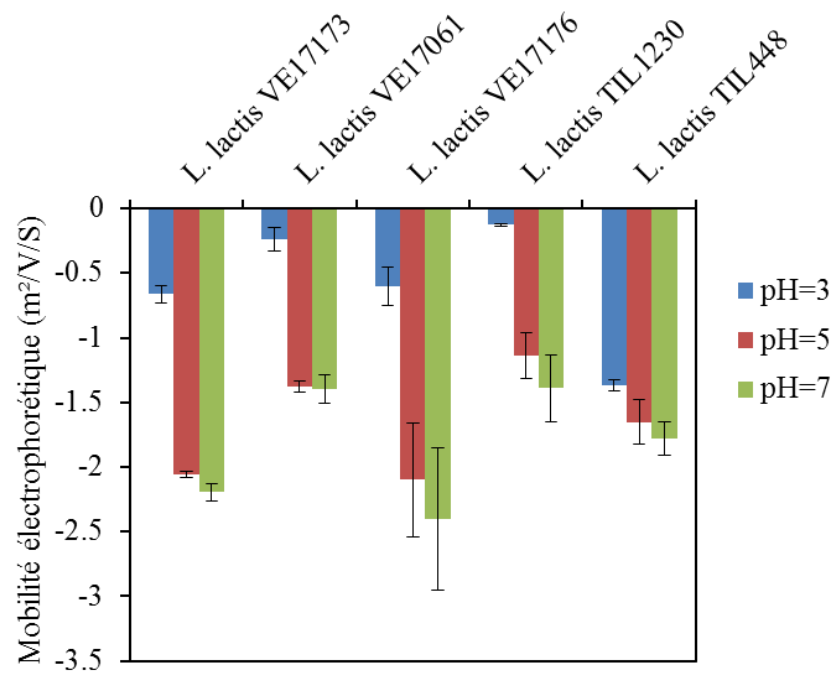


Figure S1-2 : Mobilité électrophorétique des souches de *L. lactis* déterminée par zétamétrie.

Annexe 2 : Etude de la morphologie des cellules de *L. lactis*

Une analyse de la morphologie des cellules de *L. lactis* (formation de chainettes, nombre cellules par chainette, et phénotype d'agrégation due à la présence des pili), a été faite sur deux souches de *L. lactis* (la souche Pil⁺ et la souche contrôle Pil⁻). Pour cela, une culture sur une nuit de chacune des souches a été faite. Après centrifugation, le culot est repris dans 10 mL de PBS, 1X. Sur une lame de verre propre est déposée 50 µL de culture bactérienne diluée (DO 0,2) préalablement mélangée (vortex) de façon à avoir une suspension homogène. Grâce à l'analyseur de morphologie, (Morphologi G3S, Malvern Instruments SARL, Orsay, France, SN : MAL1033756, software Morphologi v 8.11), la taille des cellules (largeur apparente), le nombre de cellules par chainette et la présence ou non d'agrégats cellulaires ont été déterminés. Cet appareil fonctionne comme un microscope équipé d'un objectif vertical à grossissement 20 × et d'un appareil photo (Nikon CFI60, Nikon France SA, Champigny-sur-Marne, France). Les cellules observées ont une largeur apparente moyenne de $1,0 \pm 0,2$ µm. les chainettes sont constituées en moyenne de $2,3 \pm 1,2$ et $3,2 \pm 1,2$ cellules respectivement chez la souche contrôle Pil⁻ et la souche Pil⁺. Des agrégats de cellules sont visibles pour la souche Pil⁺ malgré le mélange au vortex, dénotant la présence de pili à la surface des cellules. Ces résultats sont conformes à ceux de (Castelain et al. 2016b).

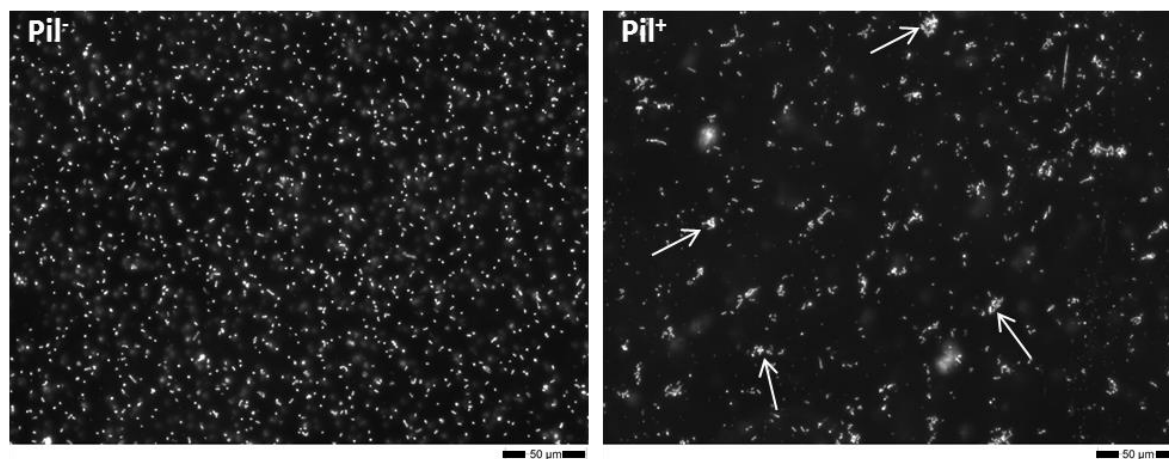


Figure S2 : Analyse des cellules de *L. lactis* par un analyseur de morphologie, (Morphologi G3S, Malvern Instruments SARL, Orsay, France, SN : MAL1033756, software Morphologi v 8.11). Les flèches blanches montrent les agrégats de cellules observés chez la souche Pil⁺.

Annexe 3 : Analyse topologique d'une cellule de *L. lactis* par l'imagerie AFM

Grace à l'imagerie AFM, nous avons également imagée des cellules isolées de *L. lactis* en milieu aqueux pour évaluer leurs dimensions (longueur et largeur de la cellule). La forme et les dimensions des cellules sont mesurées par le logiciel JPK. Les images montrent que la cellule de *L. lactis* est une coque de forme ovoïde de $1,4 \pm 0,2$ de longueur et de $0,8 \pm 0,1$ de diamètre, ce qui est proche de la littérature.

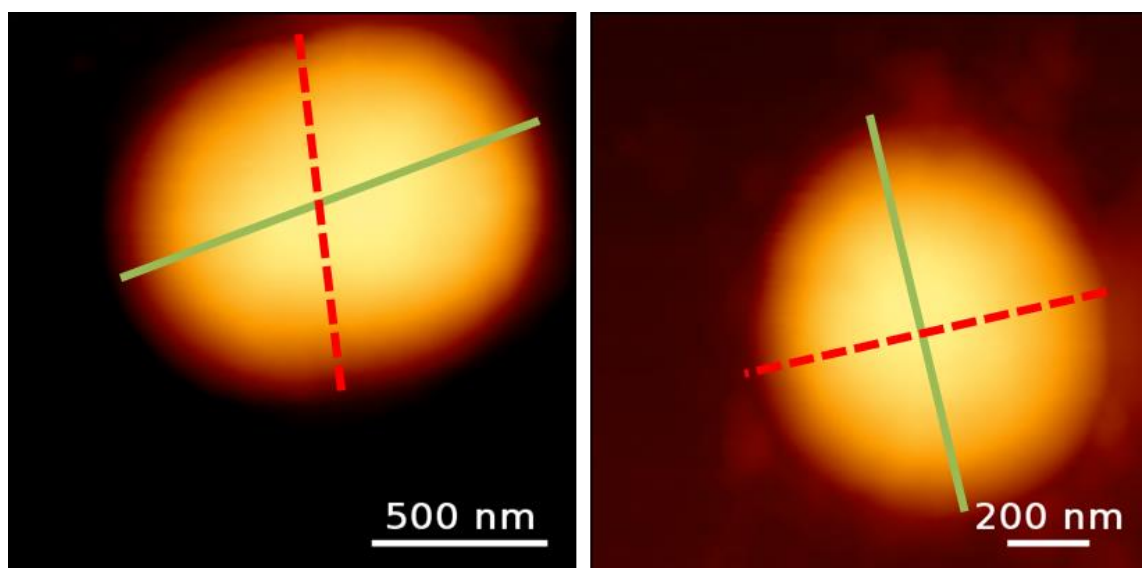


Figure S3 : Images de cellules de *L. lactis* isolées obtenues par l'AFM en mode contact permettant de déterminer leur morphologie. La cellule a une forme de coque ovoïde de $1,4 \pm 0,2$ de longueur et de $0,8 \pm 0,1$ de diamètre.

Annexe 4 : Phénotype d'auto-agrégation des souches piliées

Pour s'assurer du phénotype d'auto-agrégation des souches, due à la présence des pili à leur surface, deux cultures sur une nuit de la souche contrôle Pil⁻ et de la souche Pil⁺ sont comparées. Cela a permis de confirmer la production des pili des souches de la collection de mutants et leur rôle dans l'agrégation déjà démontré par Oxaran et al. (2012).

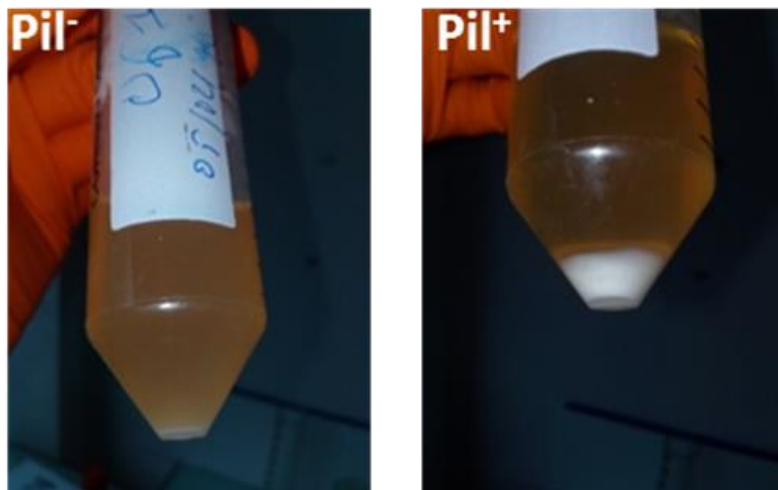


Figure S4 : Rôle d'agrégation des pili de *L. lactis* en milieu liquide. La souche contrôle Pil⁻ montre un milieu de culture trouble, concentré de bactéries. La souche Pil⁺ forme un gros culot au fond du tube avec un milieu clair : les bactéries s'auto-agrègent.

Annexe 5 : Tableau récapitulatif des résultats des travaux de l'article 1 (Dramé et al. 2020).

Strains	Pil/Mub phénotypes	Adhesion frequency (%)	Adhesion Force (pN)	Rupture distance (nm)	Adhesion work ($\times 10^{-18}$ J)	L_c (nm)	L_p (nm)	delta L_c (nm)	Number of fitted segments	RMS (pN)
VE17061	-/-	19.1	47 $\pm$ 30	52 $\pm$ 40	7 $\pm$ 0.5	nd	nd	nd	nd	nd
VE17173	+/-	78.0	150 $\pm$ 60 to 198 $\pm$ 99	reach 634 $\pm$ 103	15 $\pm$ 7 to 47 $\pm$ 15	50 to 800	0.05 to 0.6	25 to 200	3 to 4	6.7
VE17176	++/-	90.1	182 $\pm$ 75 to 452 $\pm$ 150	874 $\pm$ 147	up to 108 $\pm$ 27	100 to 1000	0.05 to 0.6	25 to 300	5 to 6	3.0
TIL 448	+/+	97.9	197 $\pm$ 83 to 372 $\pm$ 82	up to 627 $\pm$ 21	over 50 $\pm$ 16	nd	nd	nd	nd	nd
TIL1230	-/-	16.8	29 $\pm$ 16	59 $\pm$ 32	5.3 $\pm$ 1.5	nd	nd	nd	nd	nd
TIL1289	-/+	36.6	255 $\pm$ 23	202 $\pm$ 0.2	38.8 $\pm$ 17	200 to 600	0.051	50	8 to 10	20.0
TIL1290	+/-	89.7	130 $\pm$ 55	255 $\pm$ 138	39.1 $\pm$ 11	200 to 1200	0.05 to 0.15	25 to 250	12 to 18	6.7
TIL1290/ TIL1289	+/- -/+	44.1	559 $\pm$ 165	up to 1500 $\pm$ 95	131 $\pm$ 125	300 to 1500	until 0.2	50	12 to 18	10.0

Annexe 6 : Tableau récapitulatif des résultats des travaux de l'article 2 (Dramé et al. 2021).

L'expression des Pili et/ou des protéines à domaines Mub, l'épaisseur des biofilms, la rugosité moyenne, le module de Young et la force d'adhésion sont indiqués pour les quatre souches de *L. lactis* étudiées.

Strains	Pil/Mub phenotypes	Thickness (µm)	Average roughness (nm)	Young's modulus (kPa)	Adhesion force (nN)
VE 17061	-/-	30-53	45.0-76.6	4-50	0.12-0.25
VE17176	++/-	70-80	77.8-135.1	0.02-0.20	0.5-2.3
TIL1230	-/-	34-47	21.6-25.3	25-100	0.15-0.19
TIL448	+/+	40-60	34.5-50.5	0.01-0.40	0.5-2.5

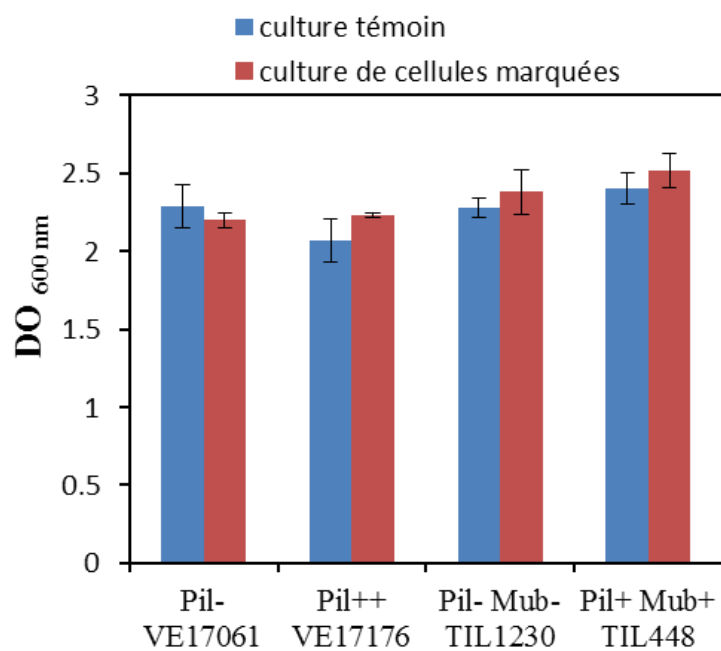
Statistical significance markers (NSD, **, ***) are indicated between strains for each parameter.

Tableau récapitulatif montrant les résultats des tests statistiques réalisé pour chaque paramètre (épaisseur des biofilms, rugosité moyenne, module de Young et force d'adhérence) étudié. Pour ce faire, le test ANOVA a été réalisé à l'aide des logiciels IBM Spss Statistic 25 et Microsoft Excel. Le test a été effectué aux seuils de 5 %, 1 % et 0.1 %.

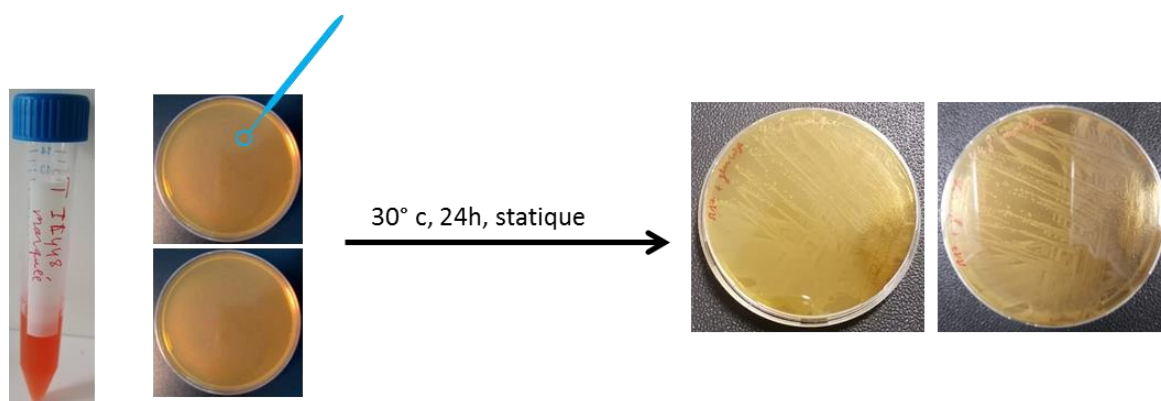
Comparaison of Strains	Thickness **	Average roughness ***	Young modulus ***	Adhesion force ***
Pil ⁻ VE 17061/Pil ⁺⁺ VE17176	**	**	***	***
Pil ⁻ VE 17061/Pil ⁻ Mub ⁻ TIL1230	NSD	*	NSD	NSD
Pil ⁻ VE 17061/Pil ⁺ Mub ⁺ TIL448	NSD	NSD	***	***
Pil ⁺⁺ VE17176/Pil ⁻ Mub ⁻ TIL1230	**	***	***	***
Pil ⁺⁺ VE17176/Pil ⁺ Mub ⁺ TIL448	**	**	NSD	NSD
Pil ⁺ Mub ⁺ TIL448/Pil ⁻ Mub ⁻ TIL1230	NSD	*	***	***

Annexe 7 : Effet de l'éosine sur la viabilité des cellules de *L. lactis*

En milieu liquide :



En milieu solide :



Annexe 8 : Figures supplémentaires de l'article 1.

**Analysis of homotypic interactions of *Lactococcus lactis* pili using
single-cell force spectroscopy**

Ibrahima DRAMÉ^{1,2}, Cécile FORMOSA-DAGUE¹,
Christine LAFFORGUE¹, Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER³,
Jean-Christophe PIARD³, Mickaël CASTELAIN¹, Etienne DAGUE^{*2}

1- TBI, Université de Toulouse, INSA, INRAE, CNRS, Toulouse, France

2- LAAS- CNRS, Université de Toulouse CNRS, Toulouse, France

3- FranceUniversité Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France.

* Corresponding author: Etienne Dague: edague@laas.fr

Supplementary material 1: Heterotypic interaction between Pil^+ VE17173 and Pil^- VE17061

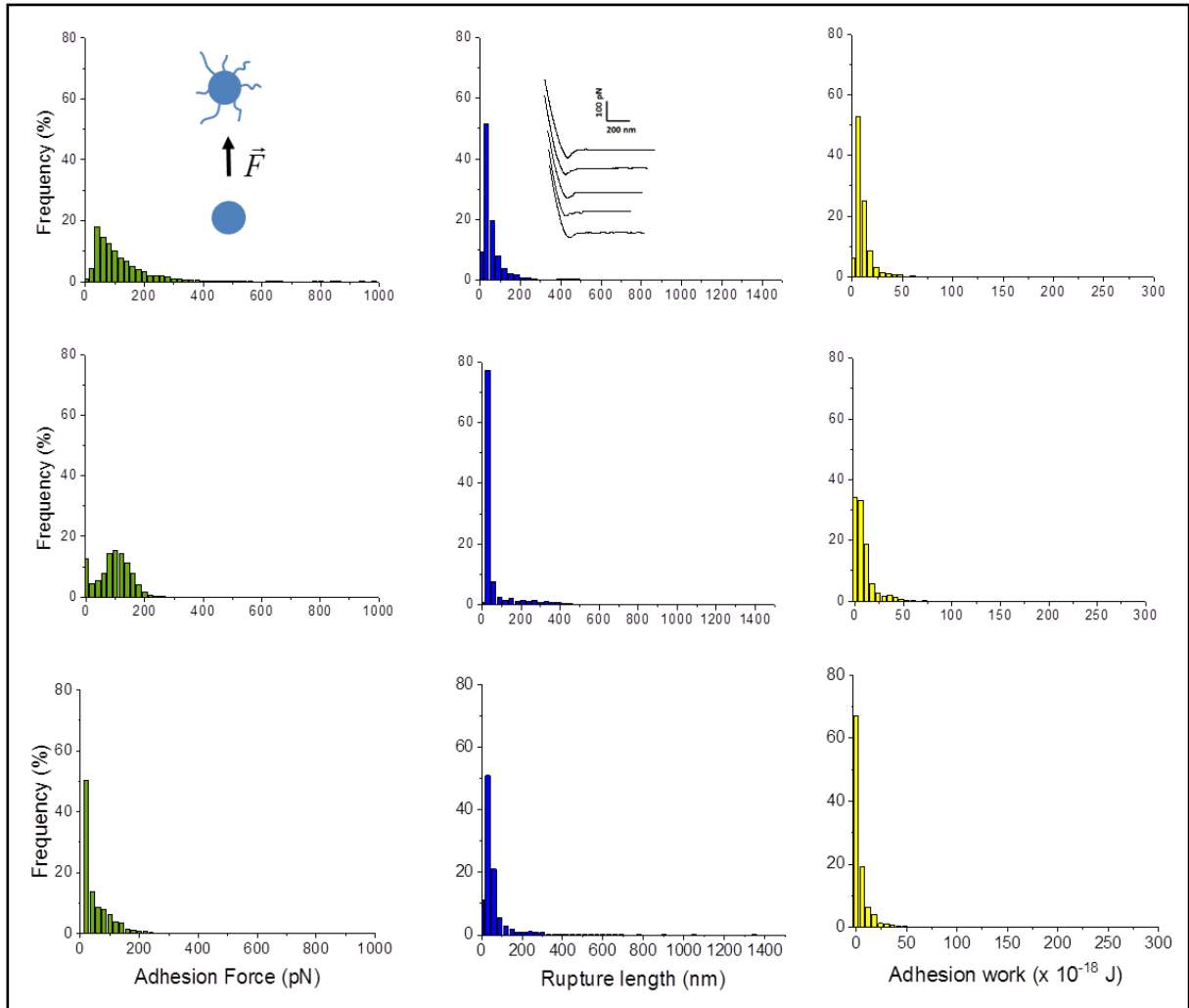


Figure S1: Quantifying of heterotypic interaction between the Pil^+ VE17173 and the Pil^- VE17061 cells by Single Cell Force Spectroscopy. Histograms representing the adhesion force (green histograms), rupture lengths (blue histograms) with typical retraction force curves and adhesion work (yellow histograms) were obtained by recording force curves of 3 independent experiments (for 1 experiment, the means of 3 pairs of independent cells are represented). For culture 1, $n = 2284$, culture 2, $n = 3571$ and culture 3, $n = 2318$.

Supplementary material 2: homotypic interaction in TIL1230

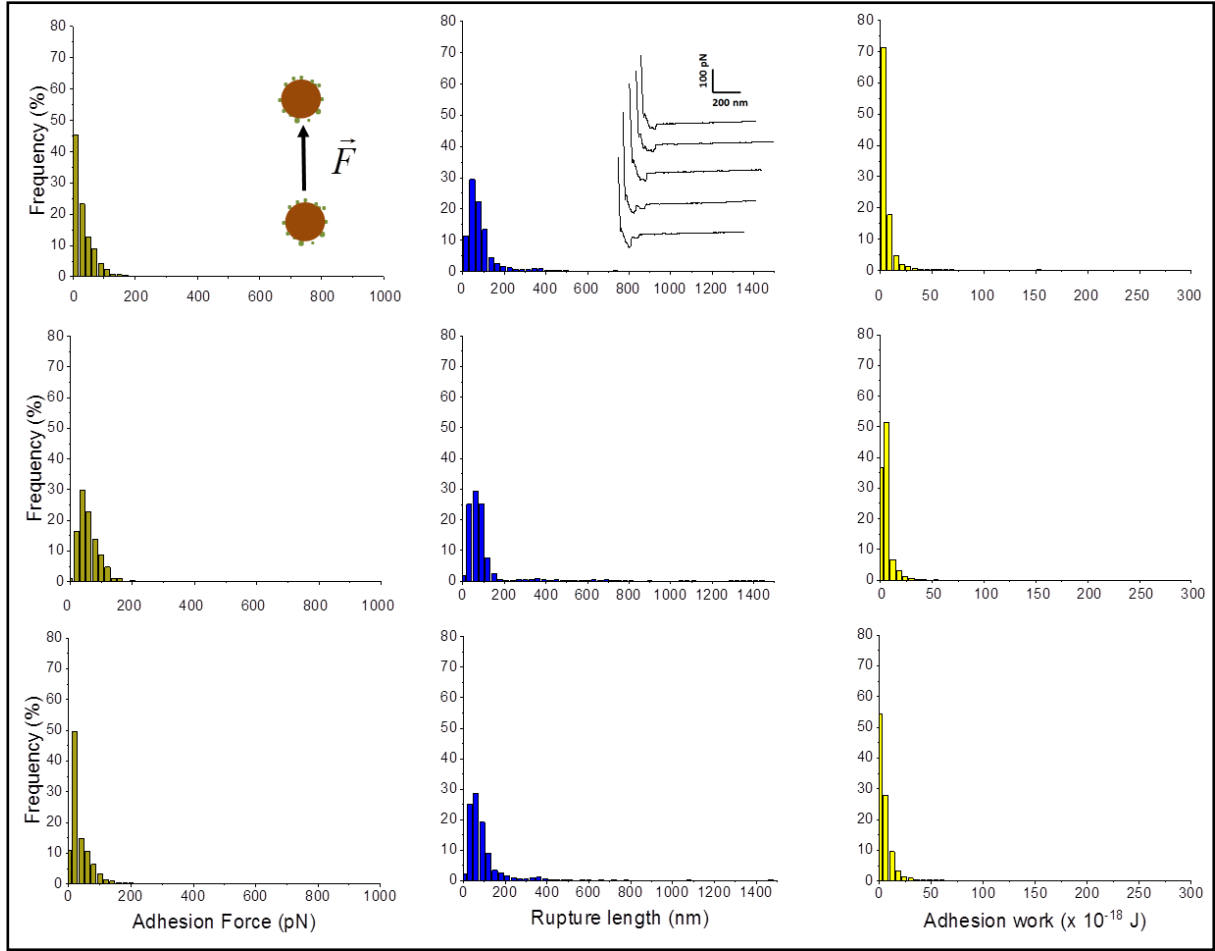


Figure S2: Single Cell Force Spectroscopy quantifying of homotypic interactions in the Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 cells. Histograms frequency of the adhesion force (a), rupture lengths with typical retraction force curves (b) and adhesion work (c) were obtained by recording (n) force curves. 3 independent experiments were conducted (1 experiment means 3 pairs of independent cells). The results presented in this figure are those representatives of the 3 experiments (n1 = 2264, n2 = 2101 and n3 = 2265).

Supplementary material 3: culture 2 and 3 of the Pil⁻ VE17061 strain

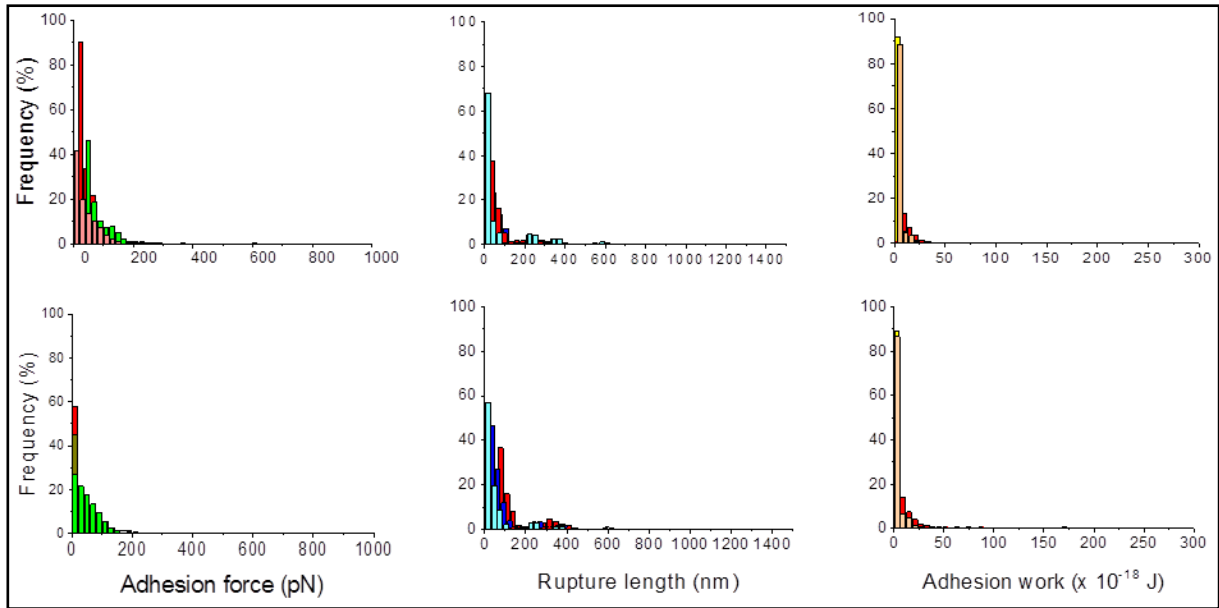


Figure S3: The homotypic interactions between the Pil⁻ VE17061 cells. Histograms representing the adhesion force, rupture lengths and adhesion work obtained by recording forces curves on two cultures of the Pil⁻ VE17061 strain (n₂ = 3099 and n₃ = 2950).

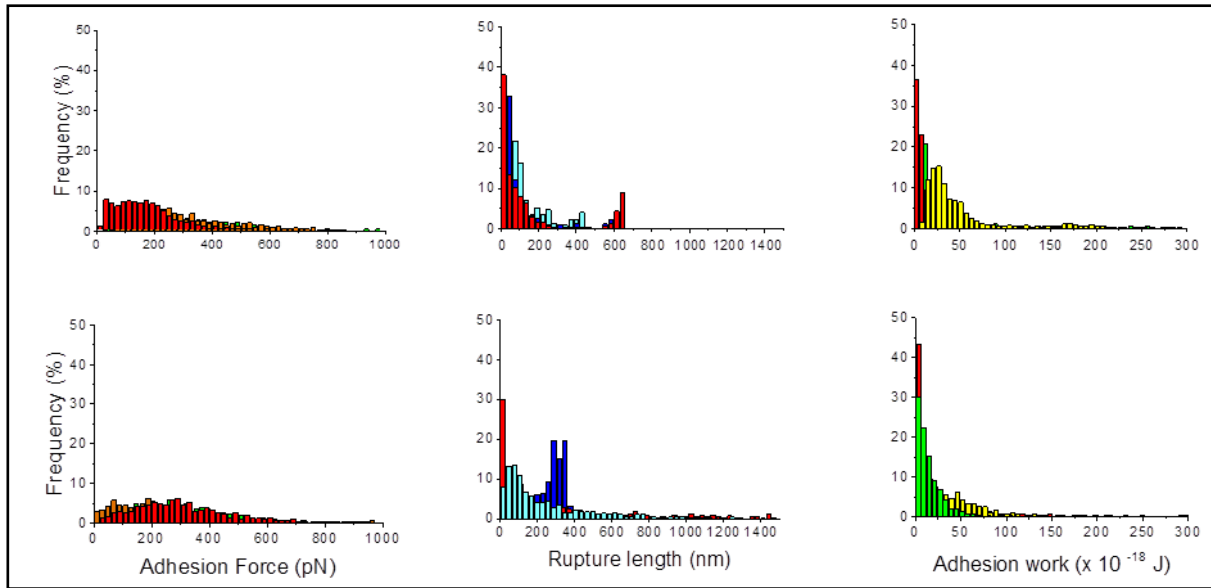
Supplementary material 4: culture 2 and 3 of the Pil⁺ VE17173 strain

Figure S4: The homotypic interactions between the Pil⁺ VE17173 cells. Histograms representing the adhesion force rupture lengths and adhesion work obtained by recording forces curves on two different cultures. (n₂ = 3251 and n₃ = 2605).

Supplementary material 5: culture 2 and 3 of VE17176

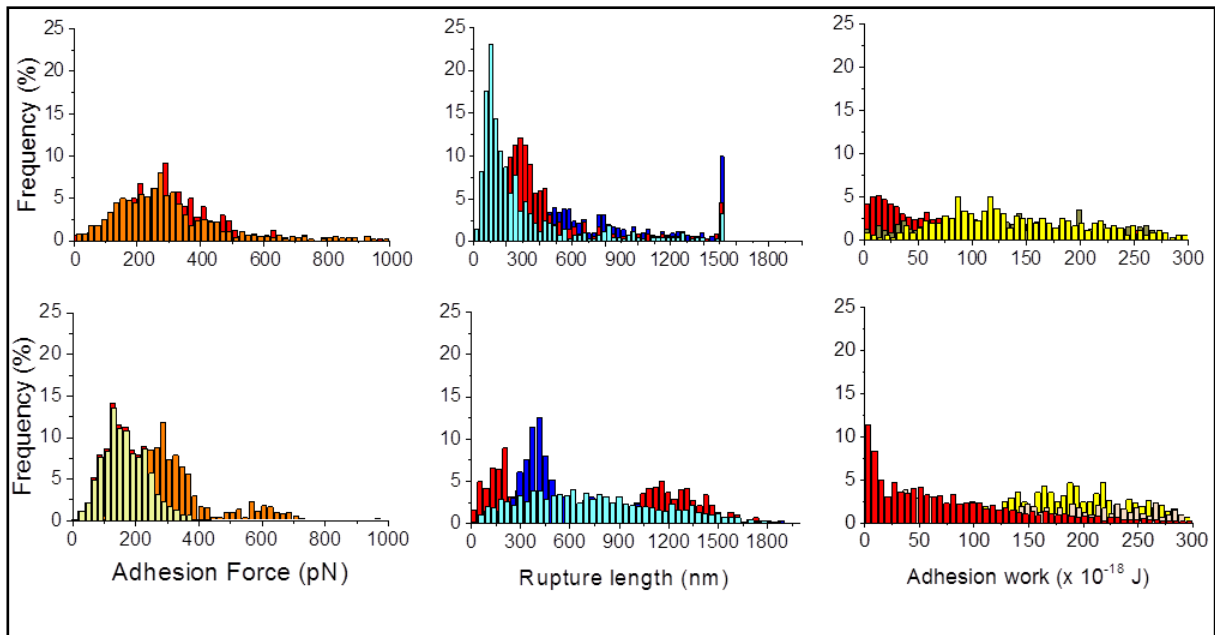


Figure S5: The homotypic interactions between the Pil^{++} VE17176 cells. Histograms representing the adhesion force, rupture lengths and adhesion work obtained by recording forces curves on two different cultures ($n_2 = 1454$ and $n_3 = 3215$).

Supplementary material 6: culture 2 and 3 of TIL448

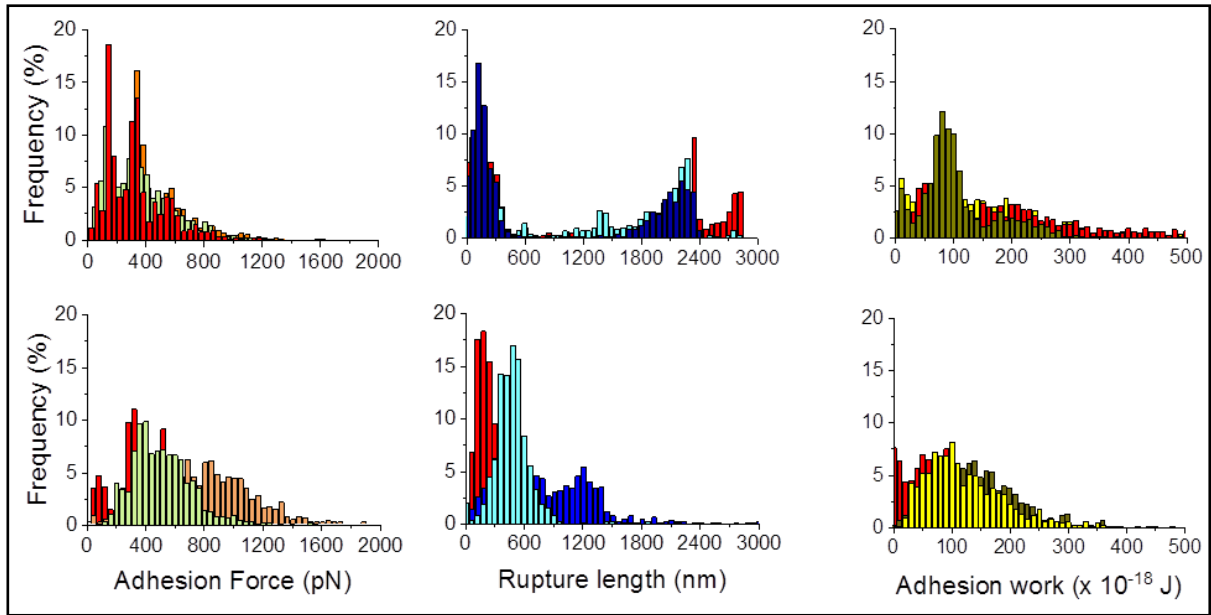


Figure S6: The homotypic interactions between the $\text{Pil}^+ \text{Mub}^+$ TIL448 cells. Histograms representing the adhesion force, rupture lengths and adhesion work obtained by recording forces curves on two different cultures ($n_2 = 3032$ and $n_3 = 2293$).

Supplementary material 7: culture 2 and 3 of TIL1290

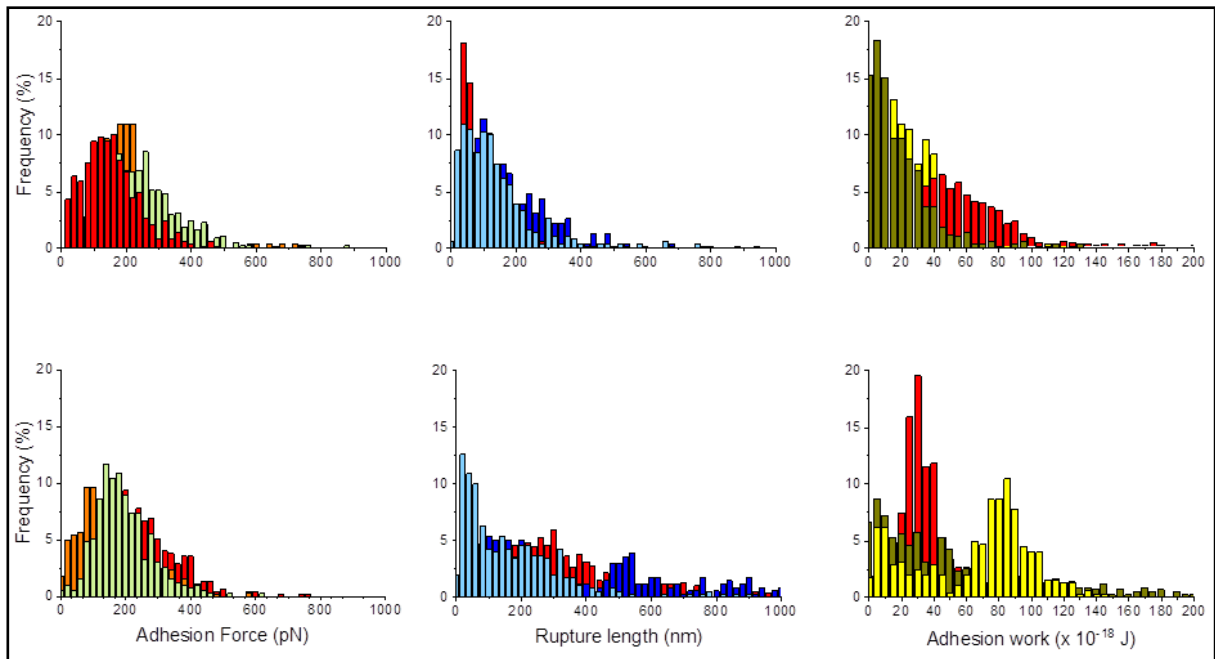


Figure S7: The homotypic interactions between Pil^+ Mub^- TIL1290 cells. Histograms representing the adhesion force, rupture lengths and adhesion work obtained by recording forces curves on two differents cultures ($n_2 = 3032$ and $n_3 = 2293$).

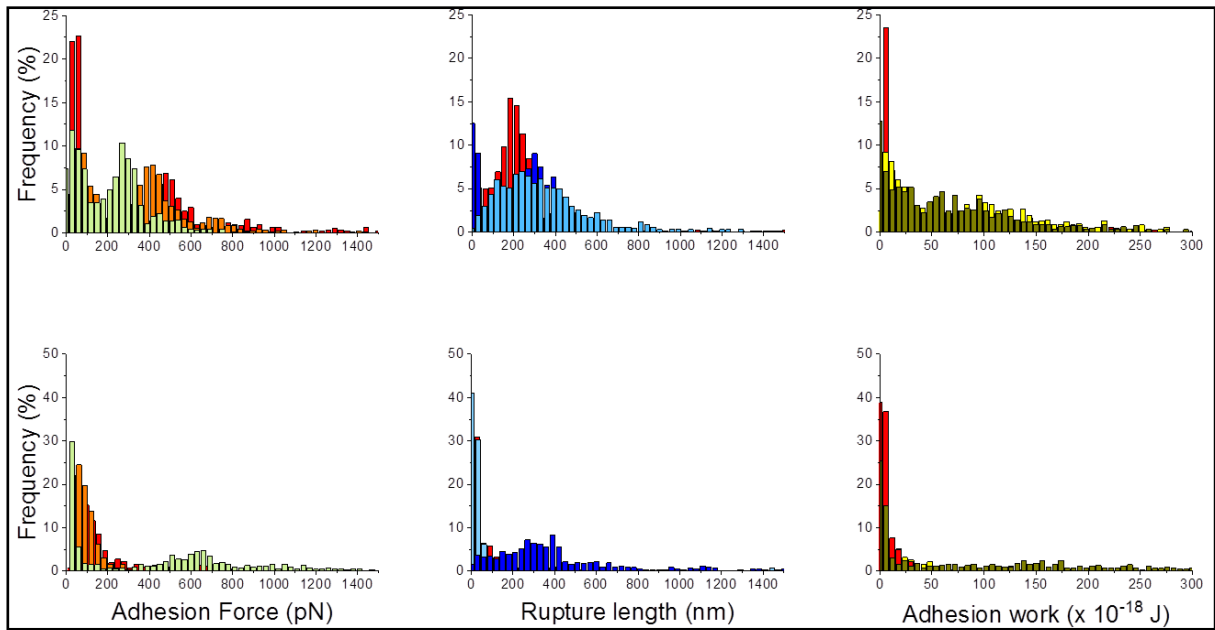
Supplementary material 8: culture 2 and 3 of $\text{Pil}^- \text{Mub}^+$ TIL1289

Figure S8: The homotypic interactions between $\text{Pil}^- \text{Mub}^+$ TIL1289 cells. Histograms representing the adhesion force, rupture lengths and adhesion work obtained by recording forces curves on two different cultures ($n_2 = 2176$ and $n_3 = 2135$).

Supplementary material 9: culture 2 and 3 of the interaction between pili and Mub proteins.

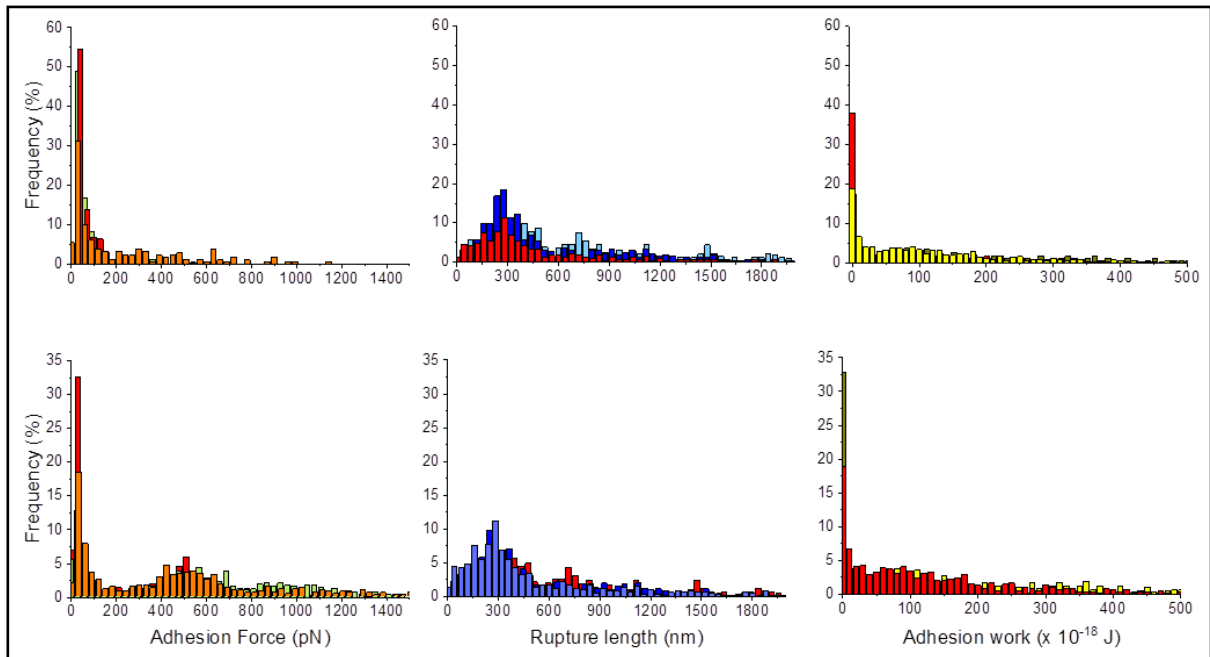


Figure S9: The heterotypic interactions between $\text{Pil}^+ \text{Mub}^- \text{TIL1290}$ and $\text{Pil}^- \text{Mub}^+ \text{TIL1289}$ cells. Histograms representing the adhesion force, rupture lengths and adhesion work obtained by recording forces curves on two cultures. (n2 = 1275 and n3 = 2227).

Supplementary material 10: Residual RMS

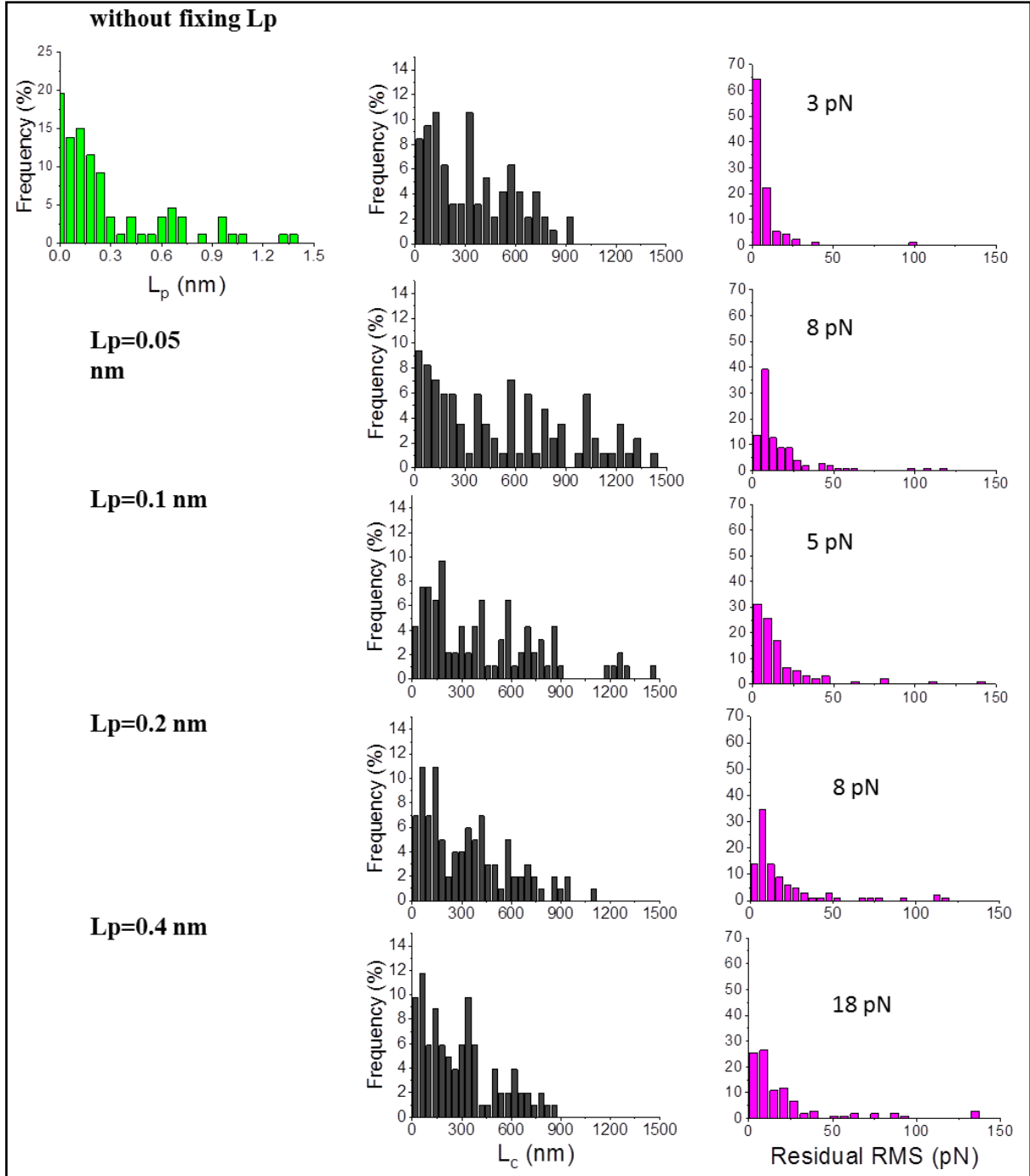


Figure S10: Analysis of various force signatures obtained in pili-pili interactions between the Pil^{++} VE17176 cells. 23 typical unfolding curves were fitted with the WLC model and showed the increase of residual RMS (pN) values when we fixed the L_p values between 0.05 nm to 0.4 nm.

Supplementary material 11: Residual RMS

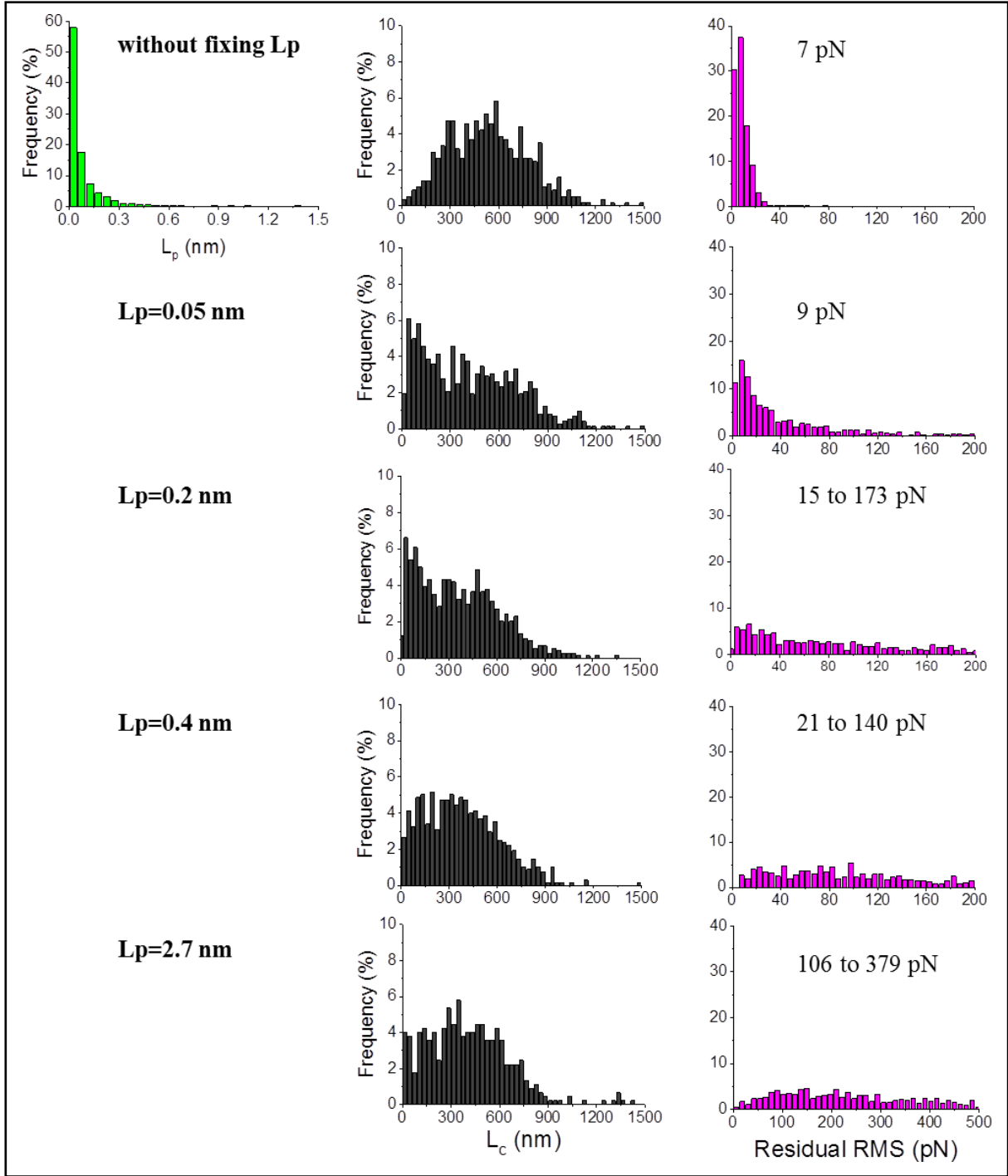


Figure S11: Analysis of various force signatures obtained in pili-pili interactions in Pil^+ Mub^+ TIL448 strains. 93 typical unfolding curves were fitted with the WLC model and showed the increase of residual RMS (pN) values when we varied the L_p values from 0.05 to 2.7 nm.

Supplementary material 12: Residual RMS

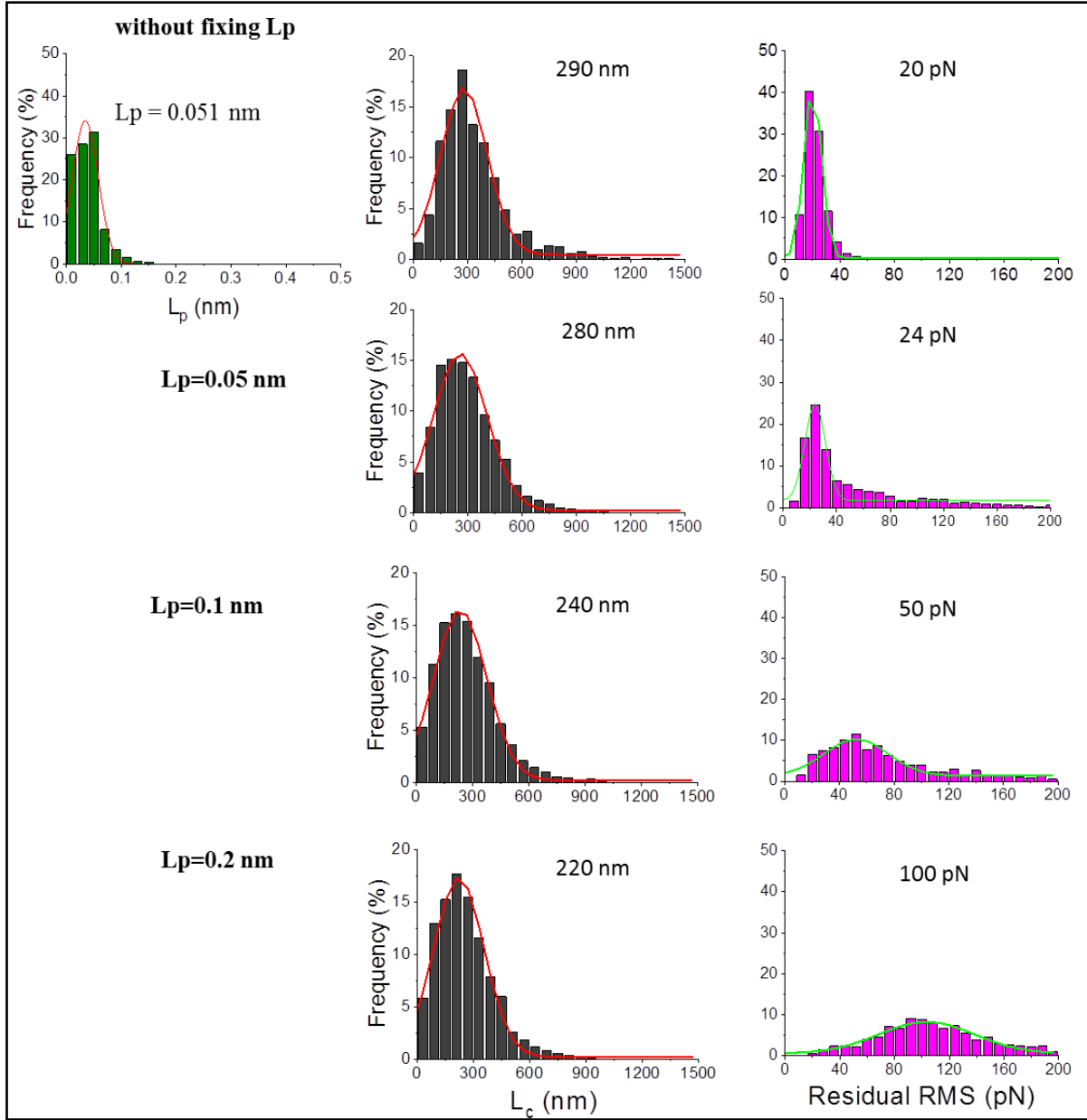


Figure S12: Analysis of various force signatures of Mub proteins obtained in the interactions between the $\text{Pil}^- \text{Mub}^+$ TIL1289 cells. 116 typical unfolding curves were fitted with the WLC model and showed the increase of Residual RMS (pN) values when we varied the L_p values from 0.05 to 0.2 nm.

Supplementary material 13: Residual RMS

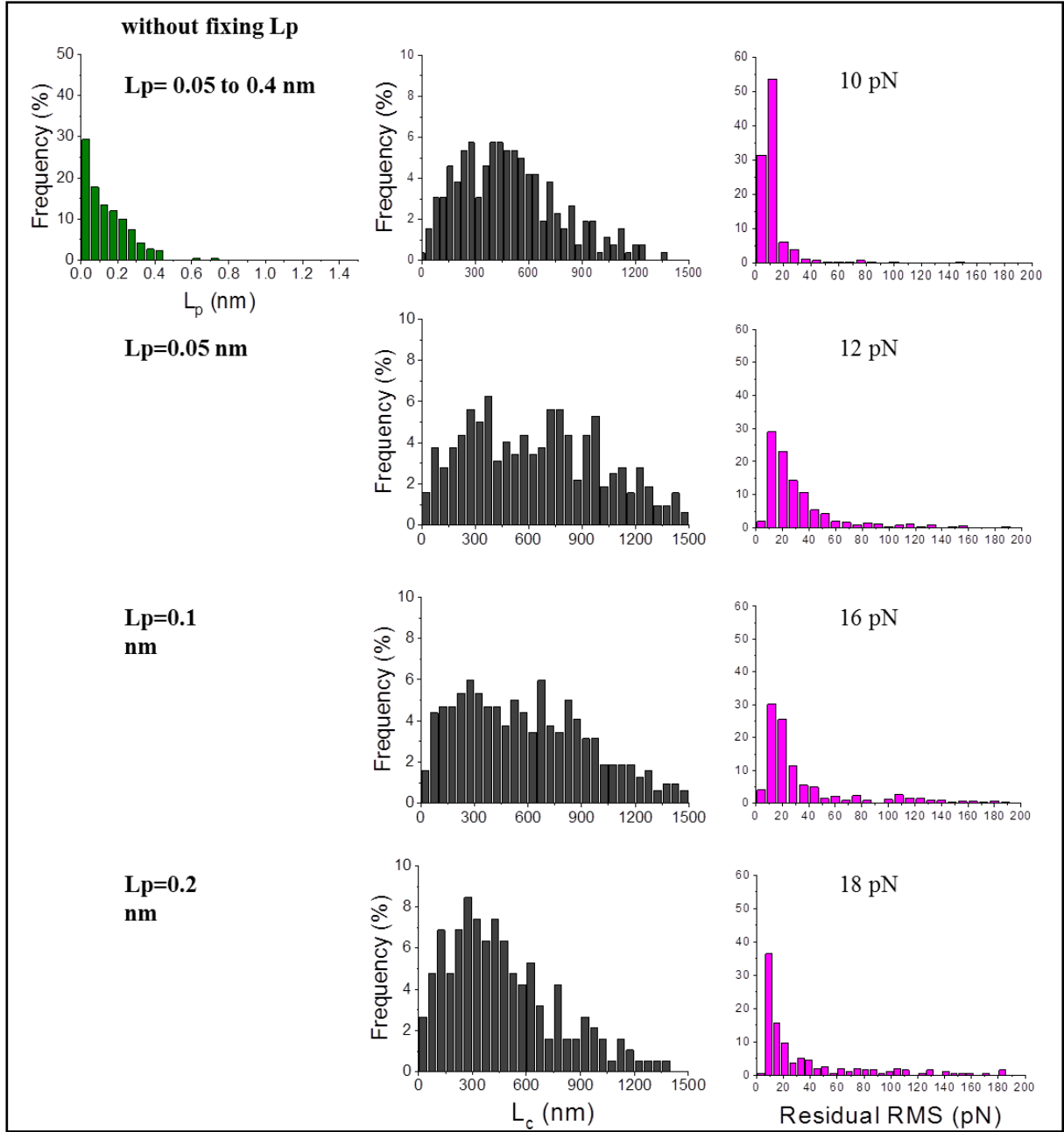


Figure S13: Analysis of various force signatures obtained in the interactions between the $\text{Pil}^+ \text{Mub}^- \text{TIL1290}$ and the $\text{Pil}^- \text{Mub}^+ \text{TIL1289}$ cells. 116 typical unfolding curves were fitted with the WLC model and showed the increase of residual RMS (pN) values when we varied the L_p values from 0.05 to 0.2 nm.

Annexe 9 : Figures supplémentaires de l'article 2.

Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms

Ibrahima DRAMÉ^{1,2}, Christine LAFFORGUE¹, Cécile FORMOSA-DAGUE¹, Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER³, Jean-Christophe PIARD³, Mickaël CASTELAIN¹, Etienne DAGUE^{*2}

1- TBI, Université de Toulouse, INSA, INRAE, CNRS, Toulouse, France

2- LAAS- CNRS, Université de Toulouse CNRS, Toulouse, France

3- Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France.

* Corresponding author: Etienne Dague: edague@laas.fr

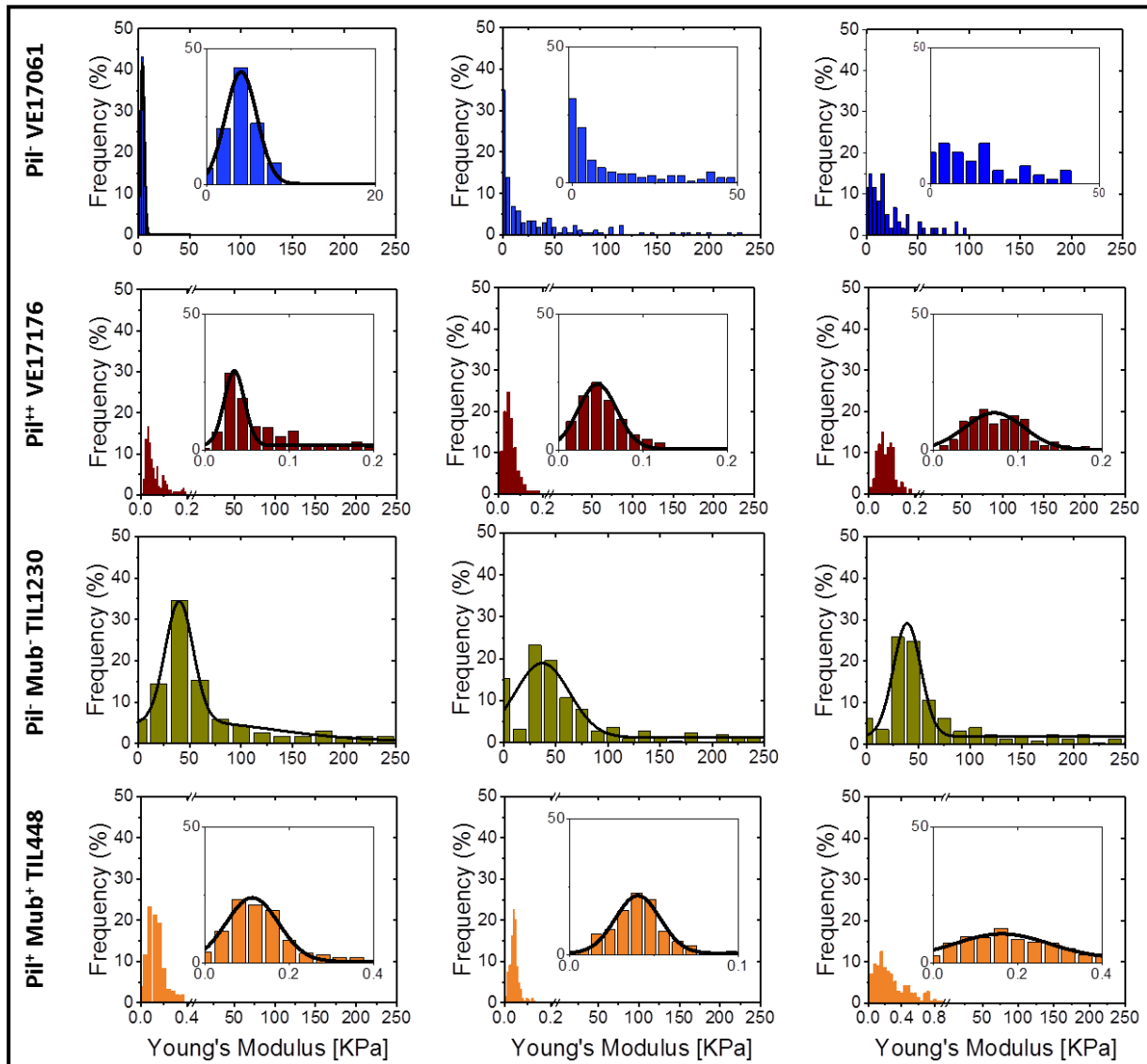
Supplementary material 1: Nanomechanical properties of *L. lactis* biofilm surface.

Figure S1: Statistical distributions of Young's modulus values of the different strains of *L. lactis* are presented. For each strain, four independent experiments were recorded. All force-curves were recorded for an area of $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ with 16×16 pixels.

Supplementary material 2: The stiffness constants of the biofilms surface of different strains of *L. Lactis*.

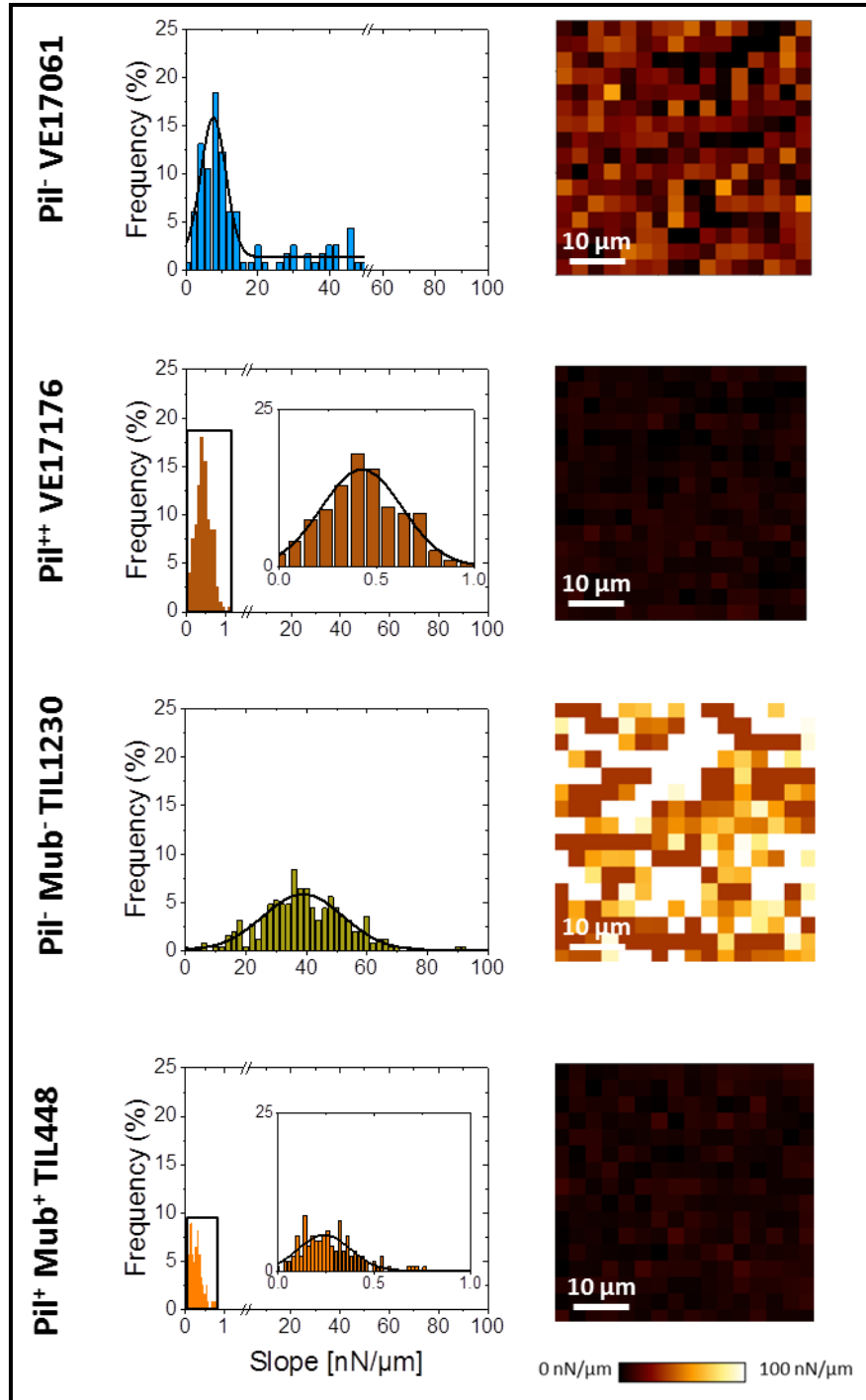


Figure S2: The slope of the force-curves and the elastic maps recorded from an area of 50 μm × 50 μm on the Pil⁻ VE17061, the Pil⁺⁺ VE17176, the Pil⁻ Mub⁻ TIL1230 and the Pil⁺ Mub⁺ TIL448.

Supplementary material 3: Interaction between individual cells on coated colloidal probe and biofilm of *L. lactis*.

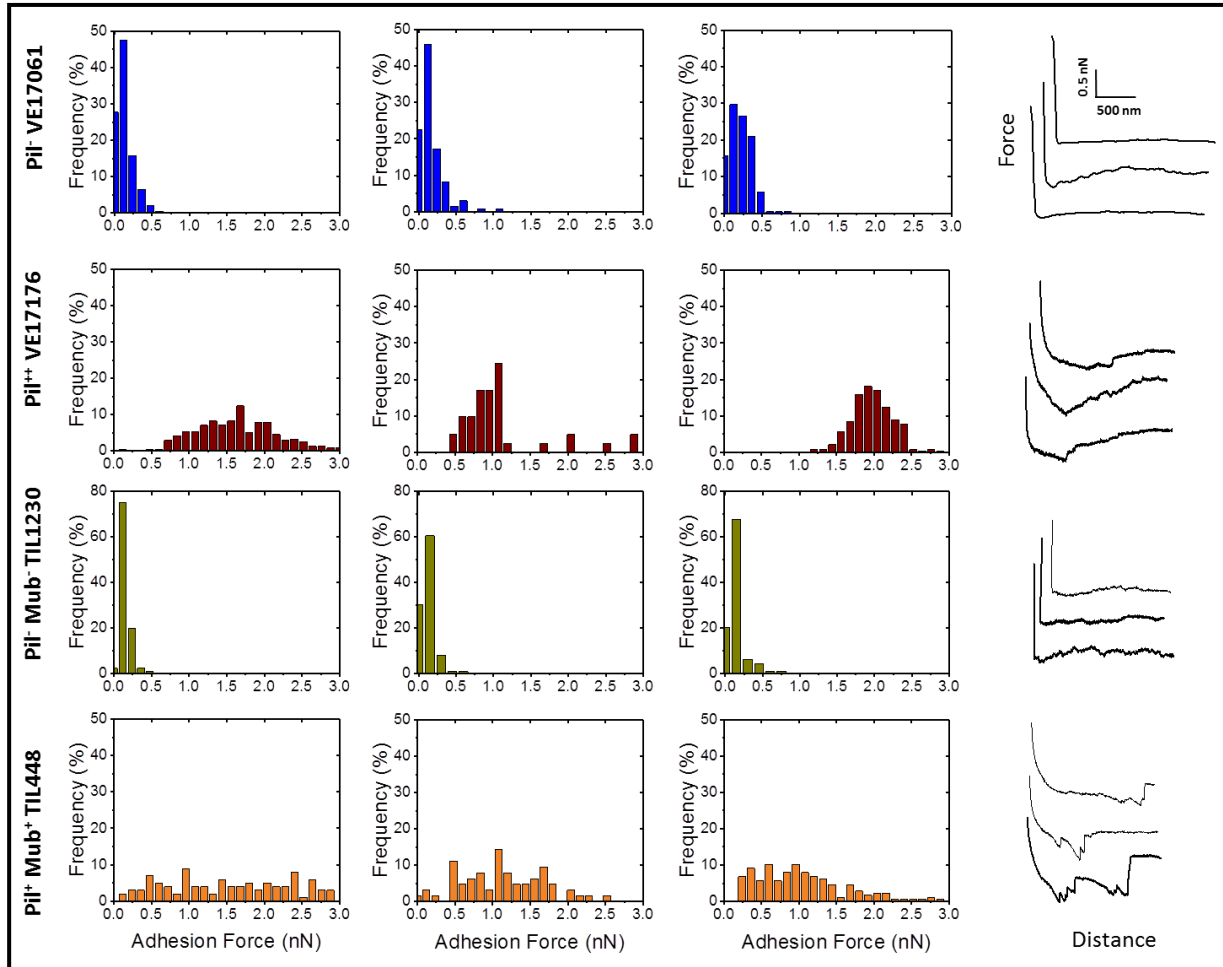


Figure S3: Adhesion force histograms and typical force curves obtained by recording force curves on $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ biofilm surfaces with 16×16 pixels in $\text{Pil}^- \text{VE17061}$ (b), $\text{Pil}^{++} \text{VE17176}$, $\text{Pil}^- \text{Mub}^- \text{TIL1230}$, and $\text{Pil}^+ \text{Mub}^+ \text{TIL448}$ strains. For each strain, four independent cultures were represented.

Valorisation du travail de thèse

Communication orale :

- ✓ Ibrahima Dramé, Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Christine Lafforgue, Etienne Dague, Mickaël Castelain. Analysis of Homotypic Interactions of *Lactococcus lactis* Pili Using Single-Cell Force Spectroscopy. Communication orale en anglais, 20 min, à la conférence internationale « BioPhysAdh » à Toulouse, 10-11 Septembre 2018, France.
- ✓ Dramé I, Formosa-Dague C, Lafforgue C, Chapot-Chartier M-P, Piard J-C, Castelain M, Dague E. Influence of pili on nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms. Communication orale en anglais, 20 min, à la 9e édition du colloque du Réseau National Biofilms, à Nancy, 3-4 Décembre 2019.

Articles scientifiques :

- ✓ Dramé I, Formosa-Dague C, Lafforgue C, Chapot-Chartier M-P, Piard J-C, Castelain M, Dague E (2020), Analysis of Homotypic Interactions of *Lactococcus lactis* Pili Using Single-Cell Force Spectroscopy. ACS Appl Mater Interfaces 12:21411–21423.
- ✓ Dramé I, Lafforgue C, Formosa-Dague C, Chapot-Chartier M-P, Piard J-C, Castelain M, Dague E (2021) Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms. Scientific Reports 11:4846. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84030-1>

Posters :

- ✓ Ibrahima Dramé, Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Christine Lafforgue, Etienne Dague, Mickaël Castelain. Role of *Lactococcus lactis* pili in homotypic interactions using single-cell force spectroscopy. Poster présenté à la conférence internationale « BioPhysAdh » à Toulouse, 10-11 Septembre 2018, France. Ce poster a été aussi présenté à Linz en Autriche, à la conférence annuelle d'hiver « XXI. Annual Linz Winter Workshop », 1-4 Février 2019.

- ✓ Dramé I, Formosa-Dague C, Lafforgue C, Chapot-Chartier M-P, Piard J-C, Castelain M, Dague E. Analysis and role of *Lactococcus lactis* pili in biofilm structuring. Poster présenté à l'école thématique CNRS « BIOSURF 2019 » à Porquerolles (Var), 3-7 Juin 2019.

- ✓ Ibrahima Dramé, Jean-Christophe Piard, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Christine Lafforgue, Etienne Dague, Mickaël Castelain. Analysis of Homotypic Interactions of *Lactococcus lactis* Pili Using Single-Cell Force Spectroscopy. Ce poster légèrement modifié et qui résume tous les travaux du premier volet de la thèse a été présenté à l'occasion de la 9e édition du colloque du Réseau National Biofilms, à Nancy, 3-4 Décembre 2019.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aas FE, Wolfgang M, Frye S, Dunham S, Løvold C, Koomey M (2002) Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Molecular Microbiology* 46:749–760 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03193.x>
- Abe Y, Skali-Lami S, Block J-C, Francius G (2012) Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Res* 46:1155–1166 . <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.013>
- Abee T, Kovács ÁT, Kuipers OP, van der Veen S (2011) Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 22:172–179 . <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.016>
- Aguayo S, Bozec L (2016) Mechanics of Bacterial Cells and Initial Surface Colonisation. In: Leake MC (ed) *Biophysics of Infection*. Springer International Publishing, Cham, pp 245–260
- Aguayo S, Donos N, Spratt D, Bozec L (2015) Single-bacterium nanomechanics in biomedicine: unravelling the dynamics of bacterial cells. *Nanotechnology* 26:062001 . <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/6/062001>
- Aguayo S, Donos N, Spratt D, Bozec L (2016) Probing the nanoadhesion of *Streptococcus sanguinis* to titanium implant surfaces by atomic force microscopy. *Int J Nanomedicine* 11:1443–1450 . <https://doi.org/10.2147/IJN.S100768>
- Alakomi H-L, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM (2000) Lactic Acid Permeabilizes Gram-negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl Environ Microbiol* 66:2001–2005 . <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
- Amano A (2010) Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology* 2000 52:12–37
- Amano A (2003) Molecular Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with Host Cells: Implication for the Microbial Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology* 74:90–96 . <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.1.90>

- Andersson M, Axner O, Almqvist F, Uhlin BE, Fallman E (2008) Physical properties of biopolymers assessed by optical tweezers: analysis of folding and refolding of bacterial pili. *Chemphyschem* 9:221–35 . <https://doi.org/10.1002/cphc.200700389>
- Ando T, Uchihashi T, Kodera N (2013) High-Speed AFM and Applications to Biomolecular Systems. *Annual Review of Biophysics* 42:393–414 . <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130324>
- Andre G, Kulakauskas S, Chapot-Chartier M-P, Navet B, Deghorain M, Bernard E, Hols P, Dufrêne YF (2010) Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nature Communications* 1:27. <https://doi.org/10.1038/ncomms1027>
- Ashkin A, Dziedzic JM (1987) Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 235:1517–1520. <https://doi.org/10.1126/science.3547653>
- Auerbach ID, Sorensen C, Hansma HG, Holden PA (2000) Physical Morphology and Surface Properties of Unsaturated *Pseudomonas putida* Biofilms. *Journal of Bacteriology* 182:3809–3815 . <https://doi.org/10.1128/JB.182.13.3809-3815.2000>
- Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Bonaventura GD, Hébraud M, Jaglic Z, Kačániová M, Knöchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C (2017) Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* 43:313–351 . <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Bai AJ, Rai VR (2011) Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10:183–193 . <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00150.x>
- Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Givskov M, Whitchurch CB, Engel JN, Tolker-Nielsen T (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 10:2331–2343 . <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x>

Références bibliographiques

- Barnhart MM, Chapman MR (2006) Curli Biogenesis and Function. *Annu Rev Microbiol* 60:131–147 . <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>
- Beaussart A, Herman P, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharíková S, Van Dijck P, Dufrêne YF (2013) Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale* 5:10894–10900 . <https://doi.org/10.1039/c3nr03272h>
- Beech IB, Zinkevich V, Hanjansit L, Gubner R, Avci R (2000) The effect of *Pseudomonas* NCIMB 2021 biofilm on AISI 316 stainless steel. *Biofouling* 15:3–12 . <https://doi.org/10.1080/08927010009386293>
- Bellon-Fontaine M-N, Rault J, van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7:47–53 . [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)
- Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Guéguen M (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126:278–285 . <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015>
- Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F, Pozzetto B (2005) Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie* 53:341–348 . <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.09.006>
- Bieber D, Ramer SW, Wu C-Y, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GK (1998) Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280:2114–2118 . <https://doi.org/10.1126/science.280.5372.2114>
- Binnig G, Quate CF, Gerber Ch (1986) Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* 56:930–933 . <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Binnig G, Rohrer H, Gerber Ch, Weibel E (1982) Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys Rev Lett* 49:57–61 . <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.49.57>

Références bibliographiques

- Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M, Siezen RJ (2006) Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* (Reading, Engl) 152:273–280 . <https://doi.org/10.1099/mic.0.28415-0>
- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A (2001) The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11:731–753 . <https://doi.org/10.1101/gr.169701>
- Bolshakova AV, Kiselyova OI, Yaminsky IV (2004) Microbial Surfaces Investigated Using Atomic Force Microscopy. *Biotechnology Progress* 20:1615–1622 . <https://doi.org/10.1021/bp049742c>
- Boudarel H, Mathias J-D, Blaysat B, Grédiac M (2018) Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *npj Biofilms and Microbiomes* 4:1–15 . <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0062-5>
- Brinton CC (1965) The Structure, Function, Synthesis and Genetic Control of Bacterial Pili and a Molecular Model for Dna and Rna Transport in Gram Negative Bacteria*. *Transactions of the New York Academy of Sciences* 27:1003–1054 . <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1965.tb02342.x>
- Bullitt E, Makowski L (1995) Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature* 373:164–167 . <https://doi.org/10.1038/373164a0>
- Bustamante C, Marko JF, Siggia ED, Smith S (1994) Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* 265:1599–1600 . <https://doi.org/10.1126/science.8079175>
- Cai Y, Yang J, Pang H, Kitahara M (2011) *Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:1590–1594 . <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.025130-0>
- Castelain M, Duviau M-P, Canette A, Schmitz P, Loubière P, Cocaïgn-Bousquet M, Piard J-C, Mercier-Bonin M (2016a) The Nanomechanical Properties of *Lactococcus lactis* Pili Are Conditioned by the Polymerized Backbone Pilin. *PLoS ONE* 11:e0152053 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152053>

Références bibliographiques

- Castelain M, Duviau M-P, Oxaran V, Schmitz P, Coccagn-Bousquet M, Loubière P, Piard J-C, Mercier-Bonin M (2016b) Oligomerized backbone pilin helps pilated *Lactococcus lactis* to withstand shear flow. *Biofouling* 32:911–923 . <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1213817>
- Cavanagh D, Fitzgerald GF, McAuliffe O (2015) From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology* 47:45–61 . <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>
- Cense AW, Peeters E a. G, Gottenbos B, Baaijens FPT, Nuijs AM, van Dongen MEH (2006) Mechanical properties and failure of *Streptococcus mutans* biofilms, studied using a microindentation device. *J Microbiol Methods* 67:463–472 . <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.023>
- Ceredig R (2020) George Gabriel Stokes as a biologist. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 378:20200105 . <https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0105>
- Chan RW, Rodriguez ML (2008) A simple-shear rheometer for linear viscoelastic characterization of vocal fold tissues at phonatory frequencies. *J Acoust Soc Am* 124:1207–1219 . <https://doi.org/10.1121/1.2946715>
- Chang HT, Rittmann BE, Amar D, Heim R, Ehlinger O, Lesty Y (1991) Biofilm detachment mechanisms in a liquid-fluidized bed. *Biotechnology and Bioengineering* 38:499–506 . <https://doi.org/10.1002/bit.260380508>
- Chapot-Chartier M-P, Kulakauskas S (2014) Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* 13:S9 . <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- Chapot-Chartier M-P, Vinogradov E, Sadovskaya I, Andre G, Mistou M-Y, Trieu-Cuot P, Furlan S, Bidnenko E, Courtin P, Péchoux C, Hols P, Dufrêne YF, Kulakauskas S (2010) Cell Surface of *Lactococcus lactis* Is Covered by a Protective Polysaccharide Pellicle. *J Biol Chem* 285:10464–10471 . <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082958>
- Chen M, Kasahara N, Keene DR, Chan L, Hoeffler WK, Finlay D, Barcova M, Cannon PM, Mazurek C, Woodley DT (2002) Restoration of type VII collagen expression and

Références bibliographiques

- function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature Genetics* 32:670–675 .
<https://doi.org/10.1038/ng1041>
- Chiang P, Burrows LL (2003) Biofilm Formation by Hyperpiliated Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 185:2374–2378 .
<https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2374-2378.2003>
- Cho S-L, Nam S-W, Yoon J-H, Lee J-S, Sukhoom A, Kim W (2008) *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:1844–1849 .
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.65527-0>
- Christensen LD, Moser C, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Kjelleberg S, Kumar N, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2007) Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model. *Microbiology (Reading)* 153:2312–2320 .
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006122-0>
- Collins MD, Farrow JAE, Phillips BA, Kandler O (1983a) *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *Microbiology*, 129:3427–3431 .
<https://doi.org/10.1099/00221287-129-11-3427>
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* 41:435–464 . <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49:711–745 .
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms : A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284:1318–1322 .
<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Cozzi R, Malito E, Lazzarin M, Nuccitelli A, Castagnetti A, Bottomley MJ, Margarit I, Maione D, Rinaudo CD (2015) Structure and Assembly of Group B *Streptococcus*

Références bibliographiques

- Pilus 2b Backbone Protein. PLOS ONE 10:e0125875 .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125875>
- Dague E, Jauvert E, Laplatine L, Viallet B, Thibault C, Ressler L (2011) Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments. *Nanotechnology* 22:395102 . <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/39/395102>
- Dague E, Le DTL, Zanna S, Marcus P, Loubière P, Mercier-Bonin M (2010) Probing In Vitro Interactions between *Lactococcus lactis* and Mucins Using AFM. *Langmuir* 26:11010–11017 . <https://doi.org/10.1021/la101862n>
- Davidson BE, Kordias N, Dobos M, Hillier AJ (1996) Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:161–183 . <https://doi.org/10.1007/BF00395932>
- Deng X, Xiong F, Li X, Xiang B, Li Z, Wu X, Guo C, Li X, Li Y, Li G, Xiong W, Zeng Z (2018) Application of atomic force microscopy in cancer research. *J Nanobiotechnol* 16:102 . <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0428-0>
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard J-C (2001) Design of a Protein-Targeting System for Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology* 183:4157–4166 .
<https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4157-4166.2001>
- Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, Pelletier DA, Wu S, Allison DP (2003) AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* 97:209–216 . [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(03\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(03)00045-7)
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15:167–193 .
<https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Dorobantu LS, Gray MR (2010) Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning* 32:74–96 . <https://doi.org/10.1002/sca.20177>
- Dramé I, Formosa-Dague C, Lafforgue C, Chapot-Chartier M-P, Piard J-C, Castelain M, Dague E (2020) Analysis of Homotypic Interactions of *Lactococcus lactis* Pili Using

Références bibliographiques

- Single-Cell Force Spectroscopy. *ACS Appl Mater Interfaces* 12:21411–21423 .
<https://doi.org/10.1021/acsami.0c03069>
- Drenkard E, Ausubel FM (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416:740–743 . <https://doi.org/10.1038/416740a>
- Drouault S, Corthier G, Ehrlich SD, Renault P (1999) Survival, Physiology, and Lysis of *Lactococcus lactis* in the Digestive Tract. *Appl Environ Microbiol* 65:4881–4886 .
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4881-4886.1999>
- Dufrêne YF (2014) Atomic Force Microscopy in Microbiology: New Structural and Functional Insights into the Microbial Cell Surface. *mBio* 5: .
<https://doi.org/10.1128/mBio.01363-14>
- Dufrêne YF, Ando T, Garcia R, Alsteens D, Martinez-Martin D, Engel A, Gerber C, Müller DJ (2017) Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology* 12:295–307 .
<https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>
- Duguid JP, Campbell I (1969) Antigens Of The Type-1 Fimbriae Of Salmonellae And Other Enterobacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 2:535–553 .
<https://doi.org/10.1099/00222615-2-4-535>
- Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmunds PN (1955) Non-Flagellar Filamentous Appendages (" Fimbriae ") and Haemagglutinating Activity in *Bacterium coli*. *Journal of Pathology and Bacteriology* 70:335–48
- Dunst S, Tomancak P (2019) Imaging Flies by Fluorescence Microscopy: Principles, Technologies, and Applications. *Genetics* 211:15–34 .
<https://doi.org/10.1534/genetics.118.300227>
- Dygico LK, O'Connor PM, Hayes M, Gahan CGM, Grogan H, Burgess CM (2019) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as a natural anti-listerial agent in the mushroom industry. *Food Microbiology* 82:30–35 . <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.015>

Références bibliographiques

- Elzo D, Schmitz P, Houi D, Joscelyne S (1996) Measurement of particle/membrane interactions by a hydrodynamic method. *Journal of Membrane Science* 109:43–53 . [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(95\)00181-6](https://doi.org/10.1016/0376-7388(95)00181-6)
- Epstein AK, Hochbaum AI, Kim P, Aizenberg J (2011) Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry. *Nanotechnology* 22:494007 . <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/49/494007>
- Evans AN (2013) The effect of nutrient limitations on the production of extracellular polymeric substances by drinking-water bacteria
- Fällman E, Schedin S, Jass J, Andersson M, Uhlin BE, Axner O (2004) Optical tweezers based force measurement system for quantitating binding interactions: system design and application for the study of bacterial adhesion. *Biosens & Bioelec* 19:1429–1437
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–633 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Formosa-Dague C, Speziale P, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrêne YF (2016) Zinc-dependent mechanical properties of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming surface protein SasG. *PNAS* 113:410–415 . <https://doi.org/10.1073/pnas.1519265113>
- Foroni E, Serafini F, Amidani D, Turrone F, He F, Bottacini F, O’Connell Motherway M, Viappiani A, Zhang Z, Rivetti C, van Sinderen D, Ventura M (2011) Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microb Cell Fact* 10:S16 . <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S16>
- Francius G, Polyakov P, Merlin J, Abe Y, Ghigo J-M, Merlin C, Beloin C, Duval JFL (2011) Bacterial Surface Appendages Strongly Impact Nanomechanical and Electrokinetic Properties of *Escherichia coli* Cells Subjected to Osmotic Stress. *PLOS ONE* 6:e20066 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020066>
- Freitag NE, Seifert HS, Koomey M (1995) Characterization of the pilF—pilD pilus-assembly locus of *Neisseria gonorrhoeae*. *Molecular Microbiology* 16:575–586 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02420.x>

- Fronzes R, Remaut H, Waksman G (2008) Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. The EMBO Journal 27:2271–2280 . <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.155>
- Gao Y, Lu Y, Teng K-L, Chen M-L, Zheng H-J, Zhu Y-Q, Zhong J (2011) Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a Probiotic Strain Isolated from the Vaginas of Healthy Women. Journal of Bacteriology 193:2886–2887 . <https://doi.org/10.1128/JB.00358-11>
- García-Almendárez BE, Cann IKO, Martin SE, Guerrero-Legarreta I, Regalado C (2008) Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Control 19:670–680 . <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.015>
- Gravie EI (1978) *Streptococcus raffinolactis* Orla-Jensen and Hansen, a Group N *Streptococcus* Found in Raw Milk. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 28:190–193 . <https://doi.org/10.1099/00207713-28-2-190>
- Gerber C, Lang HP (2006) How the doors to the nanoworld were opened. Nature Nanotechnology 1:3–5 . <https://doi.org/10.1038/nnano.2006.70>
- Giaouris E, Chapot-Chartier M-P, Briandet R (2009) Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. International Journal of Food Microbiology 131:2–9 . <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.006>
- Gibiansky ML, Conrad JC, Jin F, Gordon VD, Motto DA, Mathewson MA, Stopka WG, Zelasko DC, Shrout JD, Wong GCL (2010) Bacteria Use Type IV Pili to Walk Upright and Detach from Surfaces. Science 330:197–197 . <https://doi.org/10.1126/science.1194238>
- Giltner CL, Schaik EJ, Audette GF, Kao D, Hodges RS, Hassett DJ, Irvin RT (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. Molecular Microbiology 59:1083–1096 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05002.x>

Références bibliographiques

- Goh HMS, Yong MHA, Chong KKL, Kline KA (2017) Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. *Virulence* 8:1525–1562 . <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1279766>
- Gómez-Sala B, Muñoz-Atienza E, Diep DB, Feito J, del Campo R, Nes IF, Herranz C, Hernández PE, Cintas LM (2019) Biotechnological potential and in vitro safety assessment of *Lactobacillus curvatus* BCS35, a multibacteriocinogenic strain isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*). *LWT* 112:108219 . <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.117>
- Goss JW, Volle CB (2020) Using Atomic Force Microscopy To Illuminate the Biophysical Properties of Microbes. *ACS Appl Bio Mater* 3:143–155 . <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00973>
- Guerin J, Bacharouche J, Burgain J, Lebeer S, Francius G, Borges F, Scher J, Gaiani C (2016) Pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG mediate interaction with β -lactoglobulin
- Guerin J, Burgain J, Francius G, El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Scher J, Gaiani C (2018) Adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG surface biomolecules to milk proteins. *Food Hydrocolloids* 82:296–303 . <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.016>
- Guillemot G, Vaca-Medina G, Martin-Yken H, Vernhet A, Schmitz P, Mercier-Bonin M (2006) Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: Influence of yeast and solid surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49:126–135 . <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.001>
- Habimana O, Le Goff C, Juillard V, Bellon-Fontaine M-N, Buist G, Kulakauskas S, Briandet R (2007) Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci. *BMC Microbiology* 7:36 . <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-36>
- Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Häner M, Taschner N, Burkhard P, Aebi U, Müller SA (2002) Exploring the 3D Molecular Architecture of *Escherichia coli* Type I Pili. *Journal of Molecular Biology* 323:845–857 . [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01005-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01005-7)

Références bibliographiques

- Hammer BK, Bassler BL (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* 50:101–104 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x>
- Hancock V, Witsø IL, Klemm P (2011) Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *International Journal of Medical Microbiology* 301:570–576 . <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.018>
- Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR (1989) Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 52:384–387 . <https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.6.384>
- He SY, Nomura K, Whittam TS (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694:181–206 . <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.011>
- Heumann A, Assifaoui A, Da Silva Barreira D, Thomas C, Briandet R, Laurent J, Beney L, Lapaquette P, Guzzo J, Rieu A (2020) Intestinal release of biofilm-like microcolonies encased in calcium-pectinate beads increases probiotic properties of *Lactocaseibacillus paracasei*. *NPJ Biofilms Microbiomes* 6:44 . <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00159-3>
- Higashi DL, Biais N, Weyand NJ, Agellon A, Sisko JL, Brown LM, So M (2011) *N. elongata* Produces Type IV Pili That Mediate Interspecies Gene Transfer with *N. gonorrhoeae*. *PLOS ONE* 6:e21373 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021373>
- Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G (2017) A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 15:365–379 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.40>
- Houwink AL, van Iterson W (1950) Electron microscopical observations on bacterial cytology II. A study of flagellation. *Biochimica et Biophysica Acta* 5:10–44 . [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90144-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90144-2)
- Huang Q, Wu H, Cai P, Fein JB, Chen W (2015) Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles. *Scientific Reports* 5:16857 . <https://doi.org/10.1038/srep16857>

Références bibliographiques

- Hunt SM, Werner EM, Huang B, Hamilton MA, Stewart PS (2004) Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Appl Environ Microbiol* 70:7418–7425 . <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7418-7425.2004>
- Hutter JL, Bechhoefer J (1993) Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments* 64:1868–1873 . <https://doi.org/10.1063/1.1143970>
- Imhaus A-F, Duménil G (2014) The number of *Neisseria meningitidis* type IV pili determines host cell interaction. *The EMBO Journal* 33:1767–1783 . <https://doi.org/10.15252/embj.201488031>
- James SA, Powell LC, Wright CJ (2016) Atomic Force Microscopy of Biofilms—Imaging, Interactions, and Mechanics. *Microbial Biofilms - Importance and Applications*. <https://doi.org/10.5772/63312>
- Jass J, Schedin S, Fällman E, Ohlsson J, Nilsson UJ, Uhlin BE, Axner O (2004) Physical Properties of *Escherichia coli* P Pili Measured by Optical Tweezers. *Biophysical Journal* 87:4271–4283 . <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.044867>
- Johansen P, Jespersen L (2017) Impact of quorum sensing on the quality of fermented foods. *Current Opinion in Food Science* 13:16–25 . <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.001>
- Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova LM, Melefors Ö (2007) Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology* 7:70 . <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-70>
- Jones A-AD, Buie CR (2019) Continuous shear stress alters metabolism, mass-transport, and growth in electroactive biofilms independent of surface substrate transport. *Scientific Reports* 9:2602 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39267-2>
- Juge N (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology* 20:30–39 . <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.10.001>
- Kadam SR, den Besten HMW, van der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T (2013) Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth

- condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology* 165:259–264 . <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Kang S, Elimelech M (2009) Bioinspired Single Bacterial Cell Force Spectroscopy. *Langmuir* 25:9656–9659 . <https://doi.org/10.1021/la902247w>
- Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, Satokari R, Vesterlund S, Hendrickx APA, Lebeer S, De Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J, Hämäläinen T, Laukkanen S, Salovuori N, Ritari J, Alatalo E, Korpela R, Mattila-Sandholm T, Lassig A, Hatakka K, Kinnunen KT, Karjalainen H, Saxelin M, Laakso K, Surakka A, Palva A, Salusjärvi T, Auvinen P, de Vos WM (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17193–17198 . <https://doi.org/10.1073/pnas.0908876106>
- Karimi A, Karig D, Kumar A, M. Ardekani A (2015) Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods. *Lab on a Chip* 15:23–42 . <https://doi.org/10.1039/C4LC01095G>
- Kasas S, Ikai A (1995) A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophysical Journal* 68:1678–1680 . [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80344-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80344-9)
- Khalilzadeh PK, Lajoie BL, Hage SEHE, Furiga AF, Baziard GB, Berge MB, Roques CR (2010) Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by an N-butanoyl-l-homoserine lactone analog. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/W10-013>
- Khare B, Narayana SVL (2017) Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria: Roles of sortases and implications for assembly. *Protein Science* 26:1458–1473 . <https://doi.org/10.1002/pro.3191>
- Kievit TRD (2009) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 11:279–288 . <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>
- Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S (2005) Curli Fibers Are Required for Development of Biofilm Architecture in *Escherichia coli* K-12 and Enhance Bacterial

- Adherence to Human Uroepithelial Cells. *Microbiology and Immunology* 49:875–884 . <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03678.x>
- Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T (2003a) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* 50:61–68 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x>
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T (2003b) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* 48:1511–1524 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>
- Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ (2010) A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends in Microbiology* 18:224–232 . <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.03.002>
- Kline KA, Kau AL, Chen SL, Lim A, Pinkner JS, Rosch J, Nallapareddy SR, Murray BE, Henriques-Normark B, Beatty W, Caparon MG, Hultgren SJ (2009) Mechanism for Sortase Localization and the Role of Sortase Localization in Efficient Pilus Assembly in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 191:3237–3247 . <https://doi.org/10.1128/JB.01837-08>
- Konto-Ghiorghi Y, Mairey E, Mallet A, Duménil G, Caliot E, Trieu-Cuot P, Dramsi S (2009) Dual Role for Pilus in Adherence to Epithelial Cells and Biofilm Formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLOS Pathogens* 5:e1000422 . <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000422>
- Körstgens V, Flemming H-C, Wingender J, Borchard W (2001) Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 46:9–17 . [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00248-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00248-2)
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010306 . <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>

- Kreis CT, Sullan RMA (2020) Interfacial nanomechanical heterogeneity of the *E. coli* biofilm matrix. *Nanoscale* 12:16819–16830 . <https://doi.org/10.1039/D0NR03646C>
- Le DTL, Tran T-L, Duviau M-P, Meyrand M, Guérardel Y, Castelain M, Loubière P, Chapot-Chartier M-P, Dague E, Mercier-Bonin M (2013) Unraveling the Role of Surface Mucus-Binding Protein and Pili in Muco-Adhesion of *Lactococcus lactis*. *PLOS ONE* 8:e79850 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079850>
- Lebeer S, Claes I, Tytgat HLP, Verhoeven TLA, Marien E, von Ossowski I, Reunanen J, Palva A, Vos WM de, Keersmaecker SCJD, Vanderleyden J (2012) Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 78:185–193 . <https://doi.org/10.1128/AEM.06192-11>
- Lecuyer S, Rusconi R, Shen Y, Forsyth A, Vlamakis H, Kolter R, Stone HA (2011) Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J* 100:341–350 . <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.078>
- Lei Q, Qi-Shan L, Shu-Fang Y, Joo-Hwa T, Yu L (2004) Stressful Conditions-Induced Production of Extracellular Polysaccharides in Aerobic Granulation Process. 4
- Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M (2015) The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms. *Food and Bioprocess Processing* 93:242–248 . <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.005>
- Leriche V, Chassaing D, Carpentier B (1999) Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* 51:169–182 . [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00128-2)
- Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R (1975) Development of Dental Plaque on Epoxy Resin Crowns in Man: A Light and Electron Microscopic Study. *Journal of Periodontology* 46:10–26 . <https://doi.org/10.1902/jop.1975.46.1.10>
- Liu Y, Tay J-H (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36:1653–1665 . [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00379-7)

- López LAG, Veiga MC, Nogueira R, Aparicio A, Melo LF (2003) A technique using a membrane flow cell to determine average mass transfer coefficients and tortuosity factors in biofilms. *Water Sci Technol* 47:61–67 . <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0282>
- Lorthois S, Schmitz P, Anglés-Cano E (2001) Experimental Study of Fibrin/Fibrin-Specific Molecular Interactions Using a Sphere/Plane Adhesion Model. *Journal of Colloid and Interface Science* 241:52–62 . <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7679>
- Louise Meyer R, Zhou X, Tang L, Arpanaei A, Kingshott P, Besenbacher F (2010) Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* 110:1349–1357 . <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2010.06.010>
- Lukyanov KA, Chudakov DM, Fradkov AF, Labas YA, Matz MV, Lukyanov S (2005) Discovery and Properties of GFP-Like Proteins from Nonbioluminescent Anthozoa. In: *Green Fluorescent Protein*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 121–138
- Lvov Y, Ariga K, Onda M, Ichinose I, Kunitake T (1999) A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 146:337–346 . [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00789-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00789-4)
- Ly MH, Aguedo M, Goudot S, Le ML, Cayot P, Teixeira JA, Le TM, Belin J-M, Waché Y (2008) Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. *Food Hydrocolloids* 22:742–751 . <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.03.001>
- Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M, Tegos GP (2018) Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clinical Microbiology Reviews* 31: . <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16>
- Maguin E, Prévost H, Ehrlich SD, Gruss A (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 178:931–935 . <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.931-935.1996>

Références bibliographiques

- Mah T-F, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426:306–310 . <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee J-H, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* 103:15611–15616 . <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H (2008) Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in Microbiology* 16:33–40 . <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.010>
- Manetti AGO, Zingaretti C, Falugi F, Capo S, Bombaci M, Bagnoli F, Gambellini G, Bensi G, Mora M, Edwards AM, Musser JM, Graviss EA, Telford JL, Grandi G, Margarit I (2007a) *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol* 64:968–983 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05704.x>
- Mann EE, Wozniak DJ (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* 36:893–916 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x>
- Mantzourani M, Gilbert SC, Fenlon M, Beighton D (2010) Non-oral bifidobacteria and the aciduric microbiota of the denture plaque biofilm. *Molecular Oral Microbiology* 25:190–199 . <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2009.00565.x>
- Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O (2006) Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:192–221 . <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.192-221.2006>

Références bibliographiques

- Marti O, Binnig G, Rohrer H, Salemink H (1987) Low-temperature scanning tunneling microscope. *Surface Science* 181:230–234 . [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(87\)90163-4](https://doi.org/10.1016/0039-6028(87)90163-4)
- Martinez JJ, Hultgren SJ (2002) Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type I-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 4:19–28 . <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00166.x>
- Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ (2000) Type I pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal* 19:2803–2812 . <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2803>
- Martinez RCR, Alvarenga VO, Thomazini M, Fávaro-Trindade CS, Sant’Ana A de S (2016) Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT - Food Science and Technology* 68:67–75 . <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.027>
- Mattick JS (2002) Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology* 56:289–314 . <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>
- Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT (2018) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 58:428–439 . <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>
- Mbaye S, Séchet P, Pignon F, Martins JMF (2013) Influence of hydrodynamics on the growth kinetics of glass-adhering *Pseudomonas putida* cells through a parallel plate flow chamber. *Biomicrofluidics* 7:054105 . <https://doi.org/10.1063/1.4821244>
- Méndez-Vilas A, Gallardo-Moreno AM, González-Martín ML, Calzado-Montero R, Nuevo MJ, Bruque JM, Pérez-Giraldo C (2004) Surface characterisation of two strains of *Staphylococcus epidermidis* with different slime-production by AFM. *Applied Surface Science* 238:18–23 . <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.05.183>
- Mercenier A, Müller-Alouf H, Grangette C (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues Mol Biol* 2:17–25

- Mercier C, Durrieu C, Briandet R, Domakova E, Tremblay J, Buist G, Kulakauskas S (2002a) Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Molecular Microbiology* 46:235–243 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03160.x>
- Mercier-Bonin M, Duviau M-P, Ellero C, Lebleu N, Raynaud P, Despax B, Schmitz P (2012) Dynamics of detachment of *Escherichia coli* from plasma-mediated coatings under shear flow. *Biofouling* 28:881–894 . <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.719160>
- Meyrand M, Guillot A, Goin M, Furlan S, Armalyte J, Kulakauskas S, Cortes-Perez NG, Thomas G, Chat S, Péchoux C, Dupres V, Hols P, Dufrêne YF, Trugnan G, Chapot-Chartier M-P (2013) Surface proteome analysis of a natural isolate of *Lactococcus lactis* reveals the presence of pili able to bind human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Proteomics* 12:3935–3947 . <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.029066>
- Mierau I, Kleerebezem M (2005) 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:705–717 . <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0107-6>
- Mokoena MP (2017) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* 22:1255 . <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Mueller LN, de Brouwer JF, Almeida JS, Stal LJ, Xavier JB (2006) Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP. *BMC Ecol* 6:1. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-1>
- Müller DJ, Helenius J, Alsteens D, Dufrêne YF (2009) Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nature Chemical Biology* 5:383–390 . <https://doi.org/10.1038/nchembio.181>
- Murphy EC, Janulczyk R, Karlsson C, Mörgelin M, Frick I-M (2014) Identification of pili on the surface of *Finnegoldia magna*--a gram-positive anaerobic cocci. *Anaerobe* 27:40–49 . <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.03.008>
- Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, Murray BE (2006) Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* 116:2799–2807 . <https://doi.org/10.1172/JCI29021>

Références bibliographiques

- Navarre WW, Schneewind O (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 14:115–121 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01271.x>
- Núñez ME, Martin MO, Chan PH, Duong LK, Sindhurakar AR, Spain EM (2005) Atomic Force Microscopy of Bacterial Communities. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 256–268
- Odamaki T, Xiao JZ, Yonezawa S, Yaeshima T, Iwatsuki K (2011a) Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *Journal of Dairy Science* 94:1112–1121 . <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3286>
- Odamaki T, Yonezawa S, Sugahara H, Xiao J, Yaeshima T, Iwatsuki K (2011b) A one step genotypic identification of *Lactococcus lactis* subspecies at the species/strain levels. *Systematic and Applied Microbiology* 34:429–434 . <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.01.011>
- Oh YJ, Jo W, Yang Y, Park S (2007) Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 107:869–874 . <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.01.021>
- Oh YJ, Lee NR, Jo W, Jung WK, Lim JS (2009) Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 109:874–880 . <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2009.03.042>
- O’Hanley P, Lark D, Falkow S, Schoolnik G (1985) Molecular basis of *Escherichia coli* colonization of the upper urinary tract in BALB/c mice. Gal-Gal pili immunization prevents *Escherichia coli* pyelonephritis in the BALB/c mouse model of human pyelonephritis. *J Clin Invest* 75:347–360 . <https://doi.org/10.1172/JCI111707>
- Ossowski I von, Reunanen J, Satokari R, Vesterlund S, Kankainen M, Huhtinen H, Tynkkynen S, Salminen S, Vos WM de, Palva A (2010) Mucosal Adhesion Properties of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED Pilin Subunits. *Appl Environ Microbiol* 76:2049–2057 . <https://doi.org/10.1128/AEM.01958-09>

Références bibliographiques

- O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30:295–304 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Ottow JCG (1975) Ecology, Physiology, and Genetics of Fimbriae and Pili. *Annual Review of Microbiology* 29:79–108 . <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.29.100175.000455>
- Oxaran V, Ledue-Clier F, Dieye Y, Herry J-M, Péchoux C, Meylheuc T, Briandet R, Juillard V, Piard J-C (2012) Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. *PLoS ONE* 7:e50989 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050989>
- Ozkan AD, Topal AE, Dana A, Guler MO, Tekinay AB (2016) Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. *Micron* 89:60–76 . <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.07.011>
- Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G (2007) High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. lactiscells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BMC Biotechnol* 7:15 . <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-15>
- Papi M, Maiorana A, Bugli F, Torelli R, Posteraro B, Maulucci G, Spirito MD, Sanguinetti M (2012) Detection of Biofilm-Grown *Aspergillus fumigatus* by Means of Atomic Force Spectroscopy: Ultrastructural Effects of Alginate Lyase. *Microscopy and Microanalysis* 18:1088–1094 . <https://doi.org/10.1017/S1431927612001067>
- Paul E, Ochoa JC, Pechaud Y, Liu Y, Liné A (2012) Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Research* 46:5499–5508 . <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.029>
- Pécastaings S, Bergé M, Dubourg KM, Roques C (2010) Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling* 26:809–819 . <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.520159>
- Pedersen MB, Gaudu P, Lechardeur D, Petit M-A, Gruss A (2012) Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology* 3:37–58 . <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255>

Références bibliographiques

- Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol* 63:1725–1731
- Percival SL, Knapp JS, Edyvean R, Wales DS (1998) BIOFILM DEVELOPMENT ON STAINLESS STEEL IN MAINS WATER. *Water Research* 32:243–253 . [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00132-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00132-2)
- Pérez T, Balcázar JL, Peix A, Valverde A, Velázquez E, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I (2011) *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:1894–1898 . <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023945-0>
- Piard J-C, Briandet R (2015) Lactic Acid Bacteria Biofilms. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 341–361
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C (2005) Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22:495–512 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>
- Piciooreanu C, Loosdrecht MCM van, Heijnen JJ (2000) A theoretical study on the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 68:355–369 . [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000520\)68:4<355::AID-BIT1>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4<355::AID-BIT1>3.0.CO;2-A)
- Pillet F, Lemonier S, Schiavone M, Formosa C, Martin-Yken H, Francois JM, Dague E (2014) Uncovering by Atomic Force Microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock. *BMC Biology* 12:6 . <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-6>
- Pinheiro MM, Melo LF, Bott TR, Pinheiro JD, Leitão L (1988) Surface phenomena and hydrodynamic effects on the deposition of *pseudomonas fluorescens*. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 66:63–67 . <https://doi.org/10.1002/cjce.5450660109>

Références bibliographiques

- Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30:285–293 .
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x>
- Proft T, Baker EN (2008) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* 66:613 .
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8477-4>
- Qi P, Wang W, Qi Z (2008) Effect of Shear Stress on Biofilm Morphological Characteristics and the Secretion of Extracellular Polymeric Substances. In: 2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. pp 3438–3441
- Radziwill-Bienkowska JM, Robert V, Drabot K, Chain F, Cherbuy C, Langella P, Thomas M, Bardowski JK, Mercier-Bonin M, Kowalczyk M (2017) Contribution of plasmid-encoded peptidase S8 (PrtP) to adhesion and transit in the gut of *Lactococcus lactis* IBB477 strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:5709–5721 .
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8334-1>
- Ramasamy P, Zhang X (2005) Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Sci Technol* 52:217–223 .
<https://doi.org/10.2166/wst.2005.0204>
- Reunanen J, Ossowski I von, Hendrickx APA, Palva A, Vos WM de (2012) Characterization of the SpaCBA Pilus Fibers in the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 78:2337–2344 . <https://doi.org/10.1128/AEM.07047-11>
- Rieu A, Aoudia N, Jegou G, Chluba J, Yousfi N, Briandet R, Deschamps J, Gasquet B, Monedero V, Garrido C, Guzzo J (2014) The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cellular Microbiology* 16:1836–1853 .
<https://doi.org/10.1111/cmi.12331>
- Roa JJ, Oncins G, Diaz J, Sanz F, Segarra M (2011) Calculation of Young's modulus value by means of AFM. *Recent Pat Nanotechnol* 5:27–36 .
<https://doi.org/10.2174/187221011794474985>

Références bibliographiques

- Rodrigues L, Mei H van der, Teixeira JA, Oliveira R (2004) Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:306–311 . <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1674-7>
- Rodrigues UM, Aguirre M, Facklam RR, Collins MD (1991) Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *Journal of Applied Bacteriology* 71:509–516 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb03825.x>
- Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiäho-Lassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY (1997) Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3459–3464 . <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3459>
- Ross T (2008) Microbial Ecology in Food Safety Risk Assessment. *Microbial Risk Analysis of Foods* 51–97 . <https://doi.org/10.1128/9781555815752.ch3>
- Rozenbaum RT, Mei HC van der, Woudstra W, Jong ED de, Busscher HJ, Sharma PK (2019) Role of Viscoelasticity in Bacterial Killing by Antimicrobials in Differently Grown *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63: . <https://doi.org/10.1128/AAC.01972-18>
- Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12:163–171 . [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00160-1)
- Rusconi R, Lecuyer S, Autrusson N, Guglielmini L, Stone HA (2011) Secondary Flow as a Mechanism for the Formation of Biofilm Streamers. *Biophysical Journal* 100:1392–1399 . <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.01.065>
- Ruyter PG de, Kuipers OP, Vos WM de (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* 62:3662–3667
- Saar Dover R, Bitler A, Shimoni E, Trieu-Cuot P, Shai Y (2015) Multiparametric AFM reveals turgor-responsive net-like peptidoglycan architecture in live streptococci. *Nature Communications* 6:7193 . <https://doi.org/10.1038/ncomms8193>

Références bibliographiques

- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland S-E, Mattila-Sandholm T (1998) Demonstration of safety of probiotics — a review. *International Journal of Food Microbiology* 44:93–106 . [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00128-7)
- Sauer FG, Pinkner JS, Waksman G, Hultgren SJ (2002) Chaperone Priming of Pilus Subunits Facilitates a Topological Transition that Drives Fiber Formation. *Cell* 111:543–551 . [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01050-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01050-4)
- Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology* 16:204–211 . <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003>
- Scatassa ML, Gaglio R, Cardamone C, Macaluso G, Arcuri L, Todaro M, Mancuso I (2017) Anti-Listeria Activity of Lactic Acid Bacteria in Two Traditional Sicilian Cheeses. *Ital J Food Saf* 6: . <https://doi.org/10.4081/ijfs.2017.6191>
- Schaer-Zammaretti P, Ubbink J (2003) Imaging of lactic acid bacteria with AFM—elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. *Ultramicroscopy* 97:199–208 . [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(03\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(03)00044-5)
- Schembri MA, Klemm P (2001) Biofilm Formation in a Hydrodynamic Environment by Novel FimH Variants and Ramifications for Virulence. *Infection and Immunity* 69:1322–1328 . <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1322-1328.2001>
- Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ (2001) Structure and Function of Escherichia coli Type I Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections. *J Infect Dis* 183:S36–S40 . <https://doi.org/10.1086/318855>
- Scott JR, Zähler D (2006) Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. *Molecular Microbiology* 62:320–330 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05279.x>
- Shimomura O, Musicki B, Kishi Y (1988) Semi-synthetic aequorin. An improved tool for the measurement of calcium ion concentration. *Biochem J* 251:405–410 . <https://doi.org/10.1042/bj2510405>

Références bibliographiques

- Siezen RJ, Bayjanov J, Renckens B, Wels M, Hijum SAFT van, Molenaar D, Vlieg JET van H (2010) Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a Plant-Associated Lactic Acid Bacterium. *Journal of Bacteriology* 192:2649–2650 . <https://doi.org/10.1128/JB.00276-10>
- Smacchi E, Gobetti M (1998) Peptides from several italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 22:687–694 . [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00261-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00261-5)
- Soto GE, Hultgren SJ (1999) Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *Journal of Bacteriology* 181:1059–1071 . <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1059-1071.1999>
- Speranza B, Liso A, Russo V, Corbo MR (2020) Evaluation of the Potential of Biofilm Formation of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and *Lactobacillus reuteri* as Competitive Biocontrol Agents Against Pathogenic and Food Spoilage Bacteria. *Microorganisms* 8:177 . <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020177>
- Starks AM, Froehlich BJ, Jones TN, Scott JR (2006) Assembly of CS1 Pili: the Role of Specific Residues of the Major Pilin, CooA. *Journal of Bacteriology* 188:231–239 . <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.231-239.2006>
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E (2000) Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10. *Science* 289:1352–1355 . <https://doi.org/10.1126/science.289.5483.1352>
- Stewart PS (2012) Mini-review: Convection around biofilms. *Biofouling* 28:187–198 . <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.662641>
- Stokes GG (1853) XVI. On the change of refrangibility of light.—No. II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 143:385–396 . <https://doi.org/10.1098/rstl.1853.0016>
- Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD, Lappin-Scott HM (1999) Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol Bioeng* 65:83–92

Références bibliographiques

- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology* 56:187–209 .
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Tan Y, Leonhard M, Moser D, Ma S, Schneider-Stickler B (2018) Inhibitory effect of probiotic lactobacilli supernatants on single and mixed non-albicans *Candida* species biofilm. *Archives of Oral Biology* 85:40–45 .
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.10.002>
- Tarazanova M, Huppertz T, Kok J, Bachmann H (2018) Altering textural properties of fermented milk by using surface-engineered *Lactococcus lactis*. *Microbial Biotechnology* 11:770–780 . <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13278>
- Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, Rappuoli R, Grandi G (2006) Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* 4:509–519 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro1443>
- Teodósio JS, Simões M, Melo LF, Mergulhão FJ (2011) Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. *Biofouling* 27:1–11 . <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.535206>
- Terraf MCL, Mendoza LM, Tomás MSJ, Silva C, Nader-Macías MEF (2014) Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 117:1761–1772 . <https://doi.org/10.1111/jam.12642>
- Tierra G, Pavissich JP, Nerenberg R, Xu Z, Alber MS (2015) Multicomponent model of deformation and detachment of a biofilm under fluid flow. *Journal of The Royal Society Interface* 12:20150045 . <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0045>
- Ton-That H, Schneewind O (2003) Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* 50:1429–1438
- Touhami A, Jericho MH, Boyd JM, Beveridge TJ (2006) Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by Using Atomic Force Microscopy. *Journal of Bacteriology* 188:370–377 .
<https://doi.org/10.1128/JB.188.2.370-377.2006>

- Tremblay YDN, Caron V, Blondeau A, Messier S, Jacques M (2014) Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Veterinary Microbiology* 172:511–518 . <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.007>
- Tripathi P, Beaussart A, Alsteens D, Dupres V, Claes I, von Ossowski I, de Vos WM, Palva A, Lebeer S, Vanderleyden J, Dufrêne YF (2013) Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano* 7:3685–3697 . <https://doi.org/10.1021/nn400705u>
- Tsai Y-P (2005) Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria. *Biofouling* 21:267–277 . <https://doi.org/10.1080/08927010500398633>
- Turner RD, Thomson NH, Kirkham J, Devine D (2010) Improvement of the pore trapping method to immobilize vital coccoid bacteria for high-resolution AFM: a study of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microscopy* 238:102–110 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03333.x>
- Turroni F, Serafini F, Foroni E, Duranti S, Motherway MO, Taverniti V, Mangifesta M, Milani C, Viappiani A, Roversi T, Sánchez B, Santoni A, Gioiosa L, Ferrarini A, Delledonne M, Margolles A, Piazza L, Palanza P, Bolchi A, Guglielmetti S, Sinderen D van, Ventura M (2013) Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium–host interactions. *PNAS* 110:11151–11156 . <https://doi.org/10.1073/pnas.1303897110>
- Turroni F, Serafini F, Mangifesta M, Arioli S, Mora D, van Sinderen D, Ventura M (2014) Expression of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in response to environmental gut conditions. *FEMS Microbiol Lett* 357:23–33 . <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12509>
- Vélez MP, Petrova MI, Lebeer S, Verhoeven TLA, Claes I, Lambrichts I, Tynkkynen S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ (2010) Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:386–398 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00680.x>

Références bibliographiques

- Vieira MJ, Melo LF, Pinheiro MM (1993) Biofilm formation: Hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 7:67–80 .
<https://doi.org/10.1080/08927019309386244>
- Volle CB, Ferguson MA, Aidala KE, Spain EM, Núñez ME (2008) Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 67:32–40 .
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.021>
- Vuotto C, Longo F, Donelli G (2014) Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International Journal of Oral Science* 6:189–194 .
<https://doi.org/10.1038/ijos.2014.52>
- Vuyst LD, Falony G, Leroy F (2008) Probiotics in fermented sausages. *Meat Science* 80:75–78 . <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.038>
- Wall D, Kaiser D (1999) Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology* 32:01–10 .
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01339.x>
- Wang C, Miao L, Hou J, Wang P, Qian J, Dai S (2014) The effect of flow velocity on the distribution and composition of extracellular polymeric substances in biofilms and the detachment mechanism of biofilms. *Water Sci Technol* 69:825–832 .
<https://doi.org/10.2166/wst.2013.785>
- Wang H, Wilksch JJ, Strugnell RA, Gee ML (2015) Role of Capsular Polysaccharides in Biofilm Formation: An AFM Nanomechanics Study. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:13007–13013 . <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03041>
- Wang L, Keatch R, Zhao Q, Wright JA, Bryant CE, Redmann AL, Terentjev EM (2018) Influence of Type I Fimbriae and Fluid Shear Stress on Bacterial Behavior and Multicellular Architecture of Early *Escherichia coli* Biofilms at Single-Cell Resolution. *Appl Environ Microbiol* 84: . <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-17>
- Wasfi R, El-Rahman OAA, Zafer MM, Ashour HM (2018) Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22:1972–1983 .
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13496>

Références bibliographiques

- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* 182:2675–2679 . <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>
- Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R (2001) The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* 39:223–235 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02195.x>
- Wegmann U, O’Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ, Kuipers OP, Sinderen D van, Kok J (2007) Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology* 189:3256–3270 . <https://doi.org/10.1128/JB.01768-06>
- Wells J (2011) Mucosal Vaccination and Therapy with Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology* 2:423–445 . <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133640>
- Wells JM, Mercenier A (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6:349–362 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro1840>
- Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860–864 . <https://doi.org/10.1038/35101627>
- Williams AM, Fryer JL, Collins MD (1990) *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol Lett* 68:109–113 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04132.x>
- Wingender J, Neu TR, Flemming H-C (1999) What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In: Wingender J, Neu TR, Flemming H-C (eds) *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–19
- Wright CJ, Shah MK, Powell LC, Armstrong I (2010) Application of AFM from microbial cell to biofilm. *Scanning* 32:134–149 . <https://doi.org/10.1002/sca.20193>

Références bibliographiques

- Yanagawa R, Shinagawa M (1968) Characteristics of Corynebacterium renale phage. Jpn J Vet Res 16:137–143
- Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP (2004) Quorum Sensing in Staphylococcus aureus Biofilms. Journal of Bacteriology 186:1838–1850 . <https://doi.org/10.1128/JB.186.6.1838-1850.2004>
- Yeung MK, Cisar JO (1990) Sequence homology between the subunits of two immunologically and functionally distinct types of fimbriae of Actinomyces spp. Journal of Bacteriology 172:2462–2468 . <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2462-2468.1990>
- Yeung MK, Donkersloot JA, Cisar JO, Ragsdale PA (1998) Identification of a Gene Involved in Assembly of Actinomyces naeslundii T14V Type 2 Fimbriae. Infection and Immunity 66:1482–1491 . <https://doi.org/10.1128/IAI.66.4.1482-1491.1998>
- Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS, Stojiljkovic I (2004) Biofilm Formation by Neisseria meningitidis. Infection and Immunity 72:6132–6138 . <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6132-6138.2004>
- Zhang Z, Lunter DJ (2018) Confocal Raman microspectroscopy as an alternative to differential scanning calorimetry to detect the impact of emulsifiers and formulations on stratum corneum lipid conformation. European Journal of Pharmaceutical Sciences 121:1–8 . <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.013>
- Zhao Q, Wang C, Liu Y, Wang S (2007) Bacterial adhesion on the metal-polymer composite coatings. International Journal of Adhesion and Adhesives 27:85–91 . <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2006.01.001>