

Les biofilms

Présentation

Les biofilms : 1^{ère} **forme de vie** organisée sur Terre depuis environ 3,5 milliards d'années. Ils se retrouvent dans l'environnement terrestre à tous les niveaux, même dans les **environnements extrêmes** (*pores au sein des glaciers, les fumeurs noirs des abysses sous des hautes pressions ou hautes concentrations salines, milieu irradié, etc..*).

Ces formations vivantes constituent des **processus de colonisation** de divers environnements associés à des **processus de survie et d'adaptation**.

Ces biofilms se développent **en santé** sur des très nombreuses surfaces, dans des conditions physiologiques et pathologique.
65% des infections bactériennes chez l'homme sont dues à des biofilms.

Dans les suspensions liquides, la plupart de ces micro-organismes sont regroupés en **amas mobiles**, animés par des mouvements browniens et sont **dépourvus de toutes attaches à une surface** : on parle d'**état planctonique**.

Sur les surfaces (naturelles ou synthétiques), la plupart de ces micro-organismes forment des **amas adhérents** en remaniement permanent : on parle d'**état sessile**.

Toutes ces formes de communautés vivantes plus ou moins organisées sont regroupées sous le vocable de « **Biofilm** » (*termes plus employé pour la forme sessile*).

L'étude des micro-organismes dans leur environnement naturel, *in vivo* montre une organisation en **communautés structurées**, de composition plus souvent **hétérogène** dans l'espace comme le temps et liées à une **matrice de polymères exocellulaires** (EPS).

Tous les micro-organismes se développent **non isolément** sous la forme **de microcolonies, de taille, forme, densité et organisation variées** (*en agrégat, en monocouche, ou multicouche, en suspension dans les gaz, les liquides ou adhérent à une surface*).

Définition et Critères généraux

- **Définition**

« Un biofilm est une communauté microbienne adhérente à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires ».

Cette matrice est aussi appelée « couche muqueuse ».

Les biofilms sont des **couches de micro-organismes associés à un type de surface** et constitués **d'un seul type ou de plusieurs types de micro-organismes** (*levures, bactéries, protozoaires ou des combinaisons de toutes ces espèces*).

- **Principaux critères**

Les microorganismes sont moins importants par rapport à la matrice exocellulaire : environ 15% de microorganismes pour 85% de matrice extracellulaire.

Un biofilm est une structure qui a un âge et une densité avec une **limite de visibilité** considérée non visible en dessous du seuil de 10^4 cellules/cm² et visible au-dessus de celui de 10^8 cellules /cm².

Les biofilms se développent souvent **de manière hétérogène** sous la forme de microcolonies discontinues, séparées par des espaces où circule librement des liquides et des molécules.

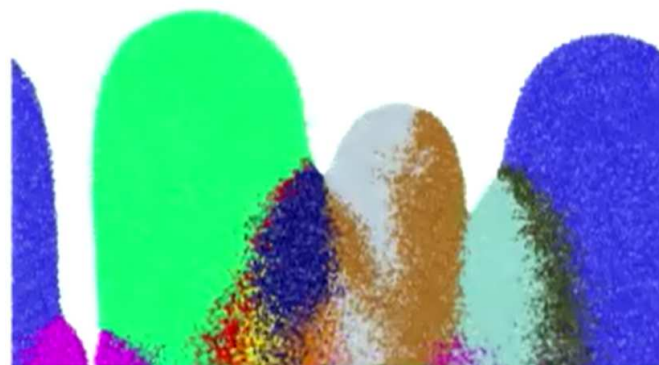
Les biofilms se développent parfois **de manière homogène** lorsqu'ils sont organisés par des champs de forces et le plus souvent dans des conditions expérimentales.

La structure des biofilms dépend non seulement **des micro-organismes** qui le composent, **des molécules** engagées dans leur formation et **des variations physico-chimiques** de leur environnement.

Une micro colonie grandit pour former un **clone** composé de plusieurs colonies : toutes les bactéries du clone sont identiques.

⇒ Au début, il n'y a pas de mélange de clones différents

⇒ Au-delà d'une certaine croissance, les clones différents vont s'interpénétrer



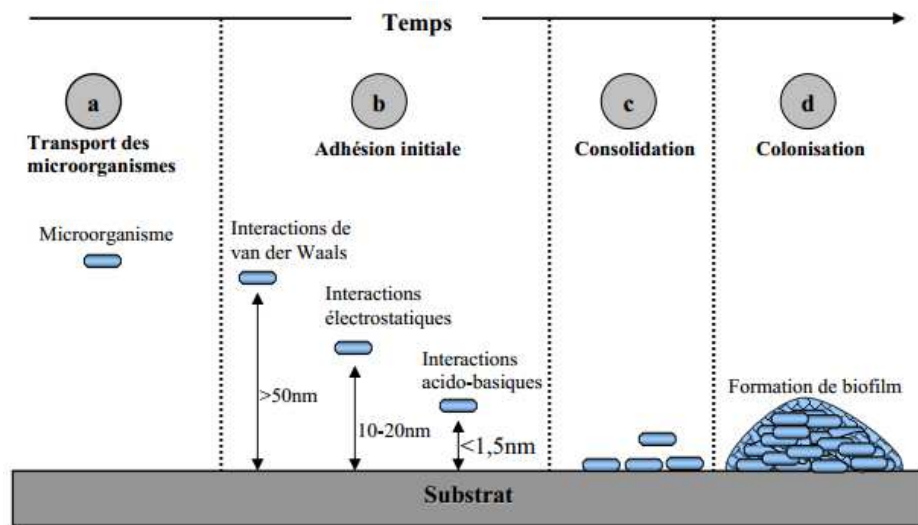
Bases de l'adhésion des biofilms

L'adhésion est une accumulation de micro-organismes et de matériels extracellulaires sur une **surface solide**.

C'est un processus s'effectuant en plusieurs étapes :

- Transport vers la surface
- Adhésion non spécifique ou réversible
- Adhésion spécifique ou irréversible

L'adhésion est un phénomène purement physico-chimique qui est suivi de phénomènes biologiques.



C'est un processus au cours duquel on constate :

- Des modifications **génétiques, phénotypiques et métaboliques**
- Tous les micro-organismes n'ont pas la même **capacité d'adhésion** aux surfaces et des différences intra-espèces existent
- Des variations d'adhésion selon la **nature et l'état de surface** : la rugosité et les altérations des surfaces modifient la structure de formation des biofilms
- Des variations d'adhésion selon les **conditions physico-chimiques et biologiques** :
 - La concentration locale en cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++} ..) facilite plus ou moins l'adhésion.
 - Les surfaces modifiées par du poly-éthylène glycol (PEG) ou les groupements Arg-Gly-Asp (RGD) facilitent l'adhésion.

- **Adhésion non spécifique**

L'adhésion non spécifique des microorganismes est décrite au travers de la théorie DVLO, du nom des auteurs de cette théorie (Dejarguin-Landau-Verwey-Overbeek).

Elle consiste dans un premier temps en **l'interaction des charges en milieu liquide avec une surface solide**.

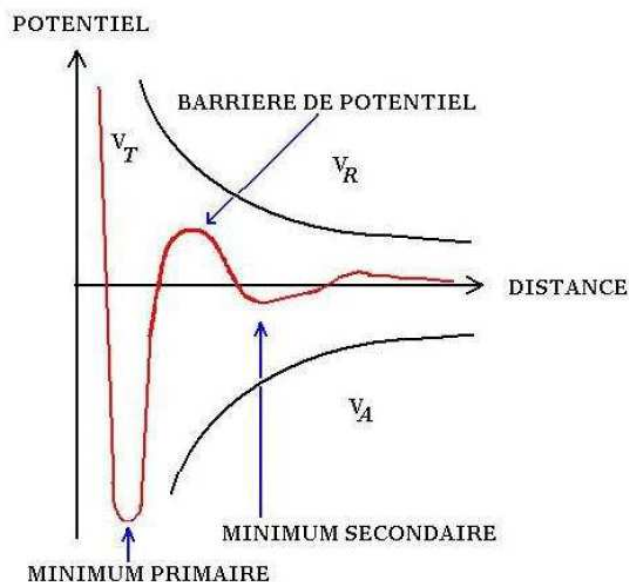
Mécanismes

Elle combine les effets d'attraction de **forces de Van der Waals** et les **effets de répulsion** (Coulomb) générés par la double couche des ions chargés formée en surface.

La théorie DVLO prend en compte la variation d'énergie entre **l'énergie d'attraction (V_A)** dues aux interactions dipolaires intermoléculaires et **l'énergie de répulsion (V_R)** en fonction de la distance entre deux particules. La somme des deux énergies V_A et V_R donne **l'énergie totale d'interaction V_T** .

Les cations polyvalents augmentent l'adhésion entre les cellules souvent chargée négativement dans les milieux biologiques. Un **pont intermoléculaire** se constitue entre les cellules par interaction électrostatique.

La répulsion électrostatique est fortement influencée par la concentration ionique du milieu : plus la concentration ionique est importante, plus la force de répulsion électrostatique est faible et plus la distance entre les surfaces cellulaires se réduit.



Rapport des forces d'attraction et de répulsion pour un micro organisme à l'approche d'une surface solide

- **Adhésion spécifique**

L'adhésion spécifique est le fait des **structures moléculaires** à la surface des microorganismes bactériens (*phospholipides, acides teichoïques, LPS, résidus d'acides gras*) et des **appendices filamenteux ou organelles** propres aux microorganismes (*pili ou fimbriae et flagelles*).

Structure des pili (*pilus = poil*) ou fimbriae (= frange)

Il existe deux types de pili (fimbriae) :

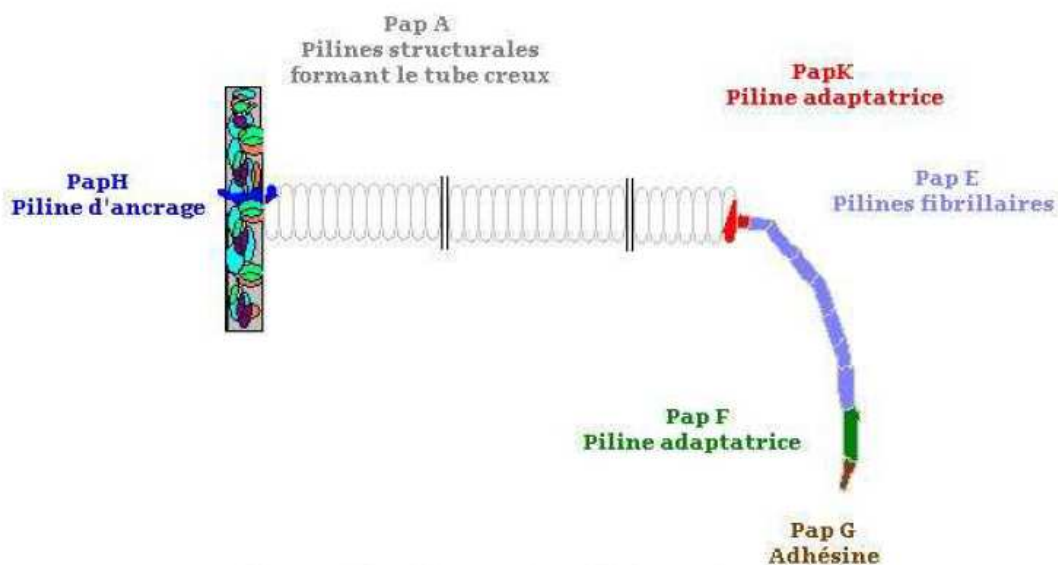
- **Les pili communs d'attachements** : courts, nombreux sur la surface bactérienne
- **Les pilis « sexuels »** : longs, peu nombreux et favorisant les échanges intercellulaires (conjugaison)

Les pili ou fimbriae communs sont composés de la polymérisation de structures protéiques tubulaires fines, dites **pilines** assemblées à des polypeptides comme **l'adhésine**. L'assemblage protéique des pilines polymérisées aboutit à la formation d'un **tube creux**.

A l'extrémité du tube, on a une structure protéique, **l'adhésine**, ayant une conformation moléculaire capable d'interagir et de fixer aux récepteurs glycolipidiques ou glycoprotéiques des cellules eucaryotes.

Ils sont suffisamment minces (3-10 μm épais / 0,3 à 2 μm long) pour que les cellules **surmontent la répulsion électrostatique**.

Ils se répartissent principalement à la surface des microorganismes bactériens **gram négatifs**, rarement gram positifs et sont principalement à l'origine **d'une stabilisation de l'adhésion aux surfaces ou aux cellules**.



Structure du P-pilus chez *Escherichia coli*

Fonction des pili ou fimbriae

Les microorganismes bactériens mobiles disposent aussi de ces pili communs pour leur mobilité au sein de systèmes de ciliatures divers :

- **Ciliature monotriche** pour un seul pili à un pôle
- **Ciliature péritriche** pour plusieurs pili autour de la cellule bactérienne
- **Ciliature amphitriche** pour un pili à chaque pôle opposé de la cellule bactérienne
- **Ciliature lophotriche** pour plusieurs pili sur le même pôle de la cellule bactérienne

Les pili communs d'attachement sont des **organelles d'adhésion** pour la colonisation des surfaces de l'environnement et la résistance aux flux.

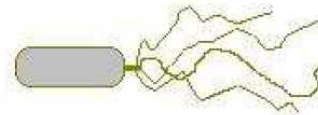
Les pili sexuels **porteurs d'un facteur protéique de transfert F de matériel génétique**, assurent l'échange génétique entre les cellules lors de la conjugaison.

Les différents types de ciliatures des pili ou fimbriae

Monotriche : unique et en position polaire



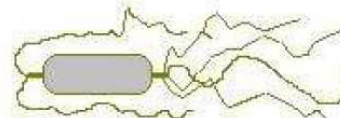
Lophotriche : multiples et en position polaire



Amphitriche : deux et en position bipolaire



Péritriche : multiples autour de la cellule



L'adhésion spécifique intercellulaire

L'un des éléments essentiels à la formation d'un biofilm et son maintien à la surface d'un tissu cellulaire réside dans la **liaison spécifique** qui relie les micro-organismes bactériens et la surface cellulaire.

L'adhésine bactérienne **se lie spécifiquement à un récepteur cellulaire** complémentaires différents selon le type de tissu.

Différents récepteurs cellulaires interagissent selon une spécificité intra ou inter espèces :

- ⇒ La colonisation par *Escherichia. coli* CFA/I et CFA/II reste limitée à l'homme
- ⇒ La colonisation par *Escherichia. coli* K88 infecte le porc
- ⇒ La colonisation par *E. coli* K99 concerne les agneaux, les veaux et les porcelets

Formation du biofilm

Trois niveaux influencent la formation d'un biofilm :

- Le phénotype et le métabolisme bactérien
- Le type et l'état de surface
- L'environnement physico-chimique et biologique.

Cinq étapes établissent la formation d'un biofilm :

- **L'adhésion initiale** (non spécifique) des micro-organismes avec une entrée en contact avec la surface : **cette adhésion est réversible**
- **L'adhésion irréversible** (spécifique) avec la formation de colonie à la surface avec des attachements par leurs organelles
- **La colonisation** avec deux étapes de maturation :
 - **Une maturation primaire** marquée par une croissance en surface, la formation d'une matrice de polymères exocellulaires sur laquelle se développe la fine monocouche de biofilm (10 *mm*)
 - **Une maturation secondaire** marquée par une croissance en multicouches donnant un biofilm important (100 *mm*)
- **La dispersion/dissolution** par rupture des liaisons inter-cellulaires et avec la matrice de polymères exocellulaires

La formation, la croissance du biofilm comme la dissociation du biofilm dépendent de l'équilibre et du gradient des molécules biologiques circulantes autour et au sein du biofilm par :

- ⇒ Les gradients de molécules signaux bactériennes **assurant la croissance** de la même espèce (notion de **quorum sensing**)
- ⇒ Les interactions entre molécules signaux bactériennes d'espèces différentes **limitant la croissance** (notion de **quorum quenching**)

L'adhésion des micro-organismes

- **1^{ère} étape rapide** : adsorption des molécules du milieu liquide sur une surface
- **2^{ème} étape lente** : adhésion des micro-organismes à la suite des interactions physico-chimiques des forces d'attraction (Van der Waals) et de répulsion (électrostatiques et acido-basiques). Cette formation aléatoire dépend du mouvement et de la composition ionique du milieu qui modifie la distance d'interaction entre la cellule et la surface.

La colonisation

Dès l'adhésion, les micro-organismes se multiplient et stimule la synthèse des polysides entrant dans la composition des polymères exocellulaires du biofilm, dits exopolymères, qui vont former la matrice exocellulaire (EPS).

Les micro-organismes sont interpénétrés dans cette matrice et constituent un « tissu » avec des échanges entre les colonies de bactéries par la circulation de nutriments.

La production d'exopolymères n'a lieu que si le micro-organisme possède l'information génétique correspondante. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* active l'expression d'un gène promoteur algC dès que son adhésion en biofilm est effectuée pour la formation d'une matrice faite d'alginate.

L'arrêt de la multiplication bactérienne ne correspond pas à un arrêt de la formation du biofilm.

- ⇒ L'activité ATP est toujours présente 4 mois après l'arrêt de la multiplication bactérienne
- ⇒ La croissance d'un biofilm peut se faire sur des mois et des années.

La formation du biofilm aboutit à des structures en forme de champignons :

- Structures évoluant avec les conditions de croissance du milieu
- Structures de cellules génétiquement et phénotypiquement différentes

Ces champignons sont composés de tiges ascendantes et de chapeaux :

- Tiges : cellules non mobiles (dites mutant non mobile pilA)
- Chapeaux : cellules mobiles (dites sauvage mobile pilA)

On observe une migration de cellules de plus en plus mobiles vers le haut des chapeaux.

Dispersion / dissolution

La dispersion et la dissolution sont liées à un **retour vers l'état planctonique**.

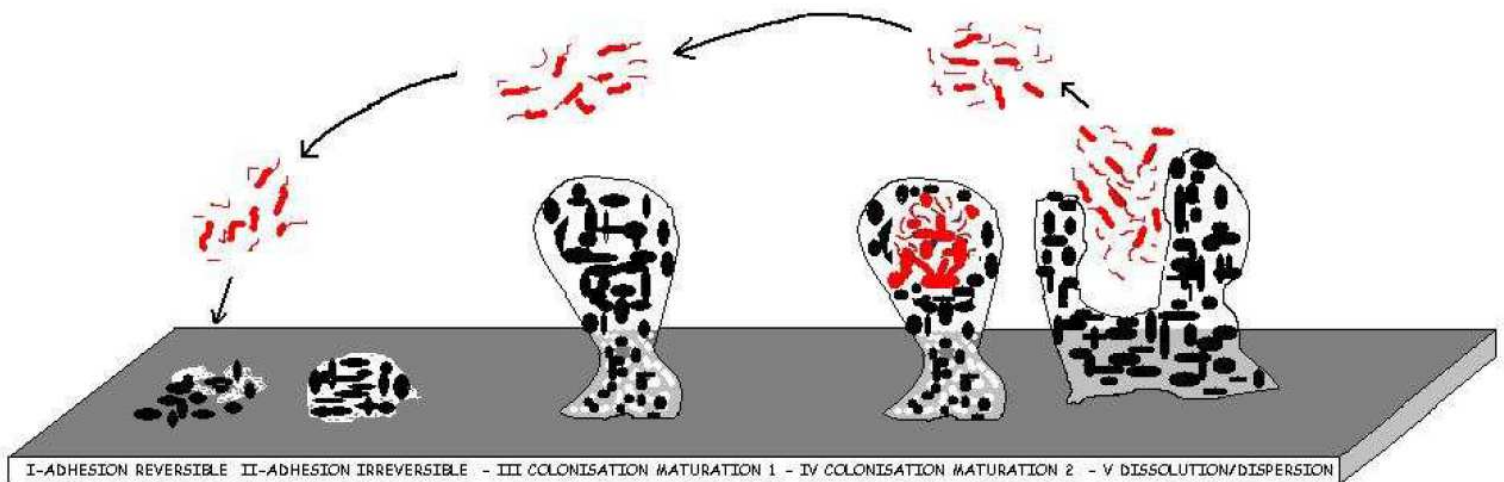
Cette dispersion et dissolution du biofilm sont intimement dues à l'impact biochimique des molécules régissant la croissance du biofilm (**quorum sensing**) ou le diminuant (**quorum quenching**) par interactions de ces molécules pour une régulation génétique et phénotypique des bactéries. Cet impact biochimique est dépendant de **l'environnement moléculaire et physicochimique du biofilm**.

La dispersion est souvent liée à des modifications dans **l'apport en nutriments** du biofilm, les fluctuations des **concentrations locales d'oxygène** ou l'augmentation d'**oxyde nitrique (NO)**.

Les colonies mobiles permettent la **dissociation du biofilm** dès que la dissolution des liaisons de la matrice exocellulaire (EPS) a lieu.

Par exemple : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a.)*, une bactérie à l'origine de maladies des gencives (maladie parodontale), synthétise une enzyme la Dispersine B qui hydrolyse l'exopolymère du biofilm et libère les bactéries.

Etapes de formation du biofilm



Régulation et contrôle génétique des biofilms

Les bactéries adhérentes sont phénotypiquement différentes des bactéries en suspension par l'expression de gènes particuliers. La production d'exopolymères a lieu que si le micro-organisme possède l'**information génétique correspondante**. Sans cela, il n'y a pas de formation de micro colonies.

- **Notion de « Quorum Sensing » (QS)**

La notion de « Quorum sensing » a commencée dans les années 1960 avec l'étude de la bactérie bioluminescente marine *Vibrio fischeri* capable en milieu liquide de produire de la lumière à partir d'une **certaine concentration d'une molécule** dite activatrice de la luminescence ou **autoinducteur AI**

C'est la capacité des bactéries à juger de leur densité ou nombre par l'intermédiaire de molécules appelées *auto-inducteurs* (AI). Avant d'atteindre ce seuil ou « quorum » le génome bactérien n'est **pas totalement exprimé**. Ce seuil atteint, les AI activent de nouveaux gènes qui confèrent aux bactéries des **phénotypes différents** mieux adaptés au milieu.

Le « Quorum Sensing » correspond à l'**atteinte d'un seuil de concentration moléculaire** à partir d'une certaine population bactérienne, seuil à partir duquel la formation des biofilms s'effectue.

Les bactéries utilisent différents types de molécules de signalisation QS

Chez les **Gram négatifs**, cette communication est le fait d'une petite molécule soluble diffusible ou molécule signal et d'une protéine de régulation de la transcription appelée **protéine R**. La majorité des molécules signaux sont des N-acyl L-homosérine lactones ou homosérine lactone (HSL) qui **s'accumulent dans le milieu** avec la croissance bactérienne et **se fixent** à la surface de la cellule **sur un récepteur** de la protéine R qu'il active pour la **transcription de gènes** qui **diminue la mobilité**, induisant des modifications de phénotypes cellulaires à l'origine de la **formation du biofilm**.

Chez les Gram positifs, cette communication est le fait de trois composants moléculaires :

- Un **peptide signal**
- Un **ligand membranaire** (Histidine-Kinase HK)
- Une **molécule régulatrice de la réponse intracellulaire** (RR)

Les molécules peptidiques signal interagissent avec les histidine-kinases HK portées par des récepteurs membranaires pour une transduction du signal transmembranaire grâce aux molécules régulatrices intracellulaires RR.

Par exemple, chez *Streptococcus mutans* à l'origine du processus carieux, le peptide signal de 21 acides aminés appelé CSP (*Competence Stimulating Peptide*) active, à partir d'une valeur seuil, la stimulation de l'histidine kinase membranaire HK et celle de la molécule régulatrice intracellulaire RR. Ces molécules RR enclenche la transcription des gènes pour la formation du biofilm.

- **Notion de « Quorum Quenching » (QQ)**

Si le « Quorum Sensing » est une communication inter-cellulaire via un gradient moléculaire signal pour la **stimulation du biofilm**, le « Quorum Quenching » correspond à toutes les molécules ou mécanismes d'interactions capables de **réguler (limiter) la formation d'un biofilm** en modifiant la communication inter-cellulaire et les gradients inter-moléculaires entre bactéries.

Les interactions moléculaires du « Quorum Quenching » **limitent la formation du biofilm** ou **assure la co-aggrégation entre espèces différentes**.

Plusieurs enzymes ou molécules bloquent la communication inter-cellulaire :

- Le triclosan induit la production de HSL
- Les furanones halogénées limitent aussi l'activité de HSL
- Les lactonases et les acylases dégradent les molécules de HSL dans les milieux

Les bactéries deviennent résistantes aux Antibiotiques (ATB), ce qui pose de sérieux problèmes dans le cas d'infections agressives et résistantes = **bactéries Multi-Drug Résistantes (MDR)**.

La recherche d'enzymes ou de molécules **inactivant les auto-inducteurs (QQ)** est une alternative, d'actualité et prometteuse, parallèlement à la mise au point de nouveaux antibiotiques.

Ce qu'il faut retenir

- Formation du biofilm : on part d'une structure très homogène pour arriver au fur et à mesure à une structure hétérogène par imbrication de différents biofilms pour former des micro-colonies.
- « Quorum Sensing » et « Quorum Quenching » jouent par gradient moléculaire, une fois le biofilm constitué, soit pour encourager sa croissance, soit pour la limiter (il y a toujours une limite à la croissance d'un biofilm).
- Les caractéristiques de formation d'un biofilm sont conditionnées par les conditions physico-chimiques et biologiques (besoins de systèmes d'adhésion spécifiques au milieu pour une bonne adhésion).
- Certaines bactéries terminent par ne plus devenir mobiles et sont résidentes d'un milieu (*par exemple, E. coli est retrouvé presque exclusivement dans nos intestins*).