



HAL
open science

Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus*: apport de la microscopie de fluorescence multimodale

Samia Daddi Oubekka

► **To cite this version:**

Samia Daddi Oubekka. Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus*: apport de la microscopie de fluorescence multimodale. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112011 . tel-00713410

HAL Id: tel-00713410

<https://theses.hal.science/tel-00713410>

Submitted on 1 Jul 2012

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.

Doctorat en Sciences

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Université Paris Sud XI

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Samia DADDI OUBEKKA

Le 30 janvier 2012

Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* Apport de la microscopie de fluorescence multimodale

Directeur de thèse : **Marie-Pierre FONTAINE-AUPART**
Karine STEENKESTE
Romain BRIANDET

Devant le jury composé de :

M. Romain BRIANDET, Chargé de recherche, INRA de Massy
Mme. Marie-Pierre FONTAINE-AUPART, Directeur de recherche, Université Paris Sud
M. Armel GUYONVARCH, Professeur d'université, Université Paris Sud
Mme. Rachel MEALLET-RENAULT, Maître de conférences-HDR, ENS de Cachan
M. Antoine MONSEL, Chef de clinique assistant, Hôpital Pitié-Salpêtrière (Paris)
Mme. Christine ROQUES, Professeur d'université de Toulouse
Mme. Karine STEENKESTE, Maître de conférences, Université Paris Sud

Examineur
Directeur
Président
Rapporteur
Examineur
Rapporteur
Examineur

*A mes très chers parents
A ma sœur et mes frères
A tous ceux que j'aime*

Remerciements

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu le plaisir de participer à ce projet de recherche interdisciplinaire, financé par le CNRS, au sein de l'équipe Biophysique, Biophotonique, Biomédical, Bioenvironnement de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO) et au Centre de Photonique BioMédicale (CPBM) de l'Université Paris Sud 11 (Orsay), une expérience très enrichissante. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'unité Biofilm-Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (B2HM) de l'Institut MICALIS (INRA, Massy).

Je remercie tout d'abord M. Philippe Bréchnac, directeur de l'ISMO, de m'avoir accueillie dans son unité de recherche.

Je suis très reconnaissante à mes trois directeurs de thèse, Marie-Pierre Fontaine-Aupart, Karine Steenkeste et Romain Briandet pour m'avoir encadrée durant les trois années de thèse. Je les remercie pour leur disponibilité, leur aide à améliorer mon manuscrit de thèse et leurs encouragements à présenter les résultats de mon travail dans des congrès et des journées scientifiques. Merci Karine de m'avoir formée à l'utilisation des techniques de microscopie de fluorescence multimodale.

Je remercie Mme Christine Roques et Mme Rachel Méallet-Renault d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse. J'adresse mes remerciements également à M. Armel Guyonvarch et M. Antoine Monsel pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier François Waharte de l'Institut Curie qui nous a fait bénéficier de son expérience pour traiter les données de FRAP.

Mes remerciements vont à toute l'équipe du CPBM, de l'ISMO et du Centre Laser de l'Université Paris Sud 11, particulièrement aux collègues que j'ai côtoyés ou croisés quotidiennement : Sandrine Lécart, Chantal Jucha, Viviane Devauges, Sandrine Lévêque-Fort, Guillaume Dupuis et Christophe Jouvet. Je tiens à remercier Alan Chan, Sid Sivankutty, Gabriella Paul, Ivan Alata et Emilie Bulard pour leur sympathie. Merci également à Catherine Marquer, Laurent Dupic et Anatole Harrois.

Je remercie le personnel du service Instrumentation Scientifique de l'ISMO particulièrement Christophe Lefumeux pour le contrôle du laser et des instruments de microscopie de fluorescence de la plateforme d'imagerie du CPBM.

Je remercie Ariane Deniset-Besseau, maître de conférences au Laboratoire de Chimie-Physique (LCP) pour sa gentillesse et sa disponibilité pour répondre à mes questions pour le traitement des images.

Mes remerciements vont au personnel administratif de l'ISMO : Marie-Claire Paul, Bénédicte Daly et Melanie Decraene.

Je remercie sincèrement toute l'équipe de l'unité B2HM de l'INRA de Massy pour leur aide à réaliser ce travail, pour leur accueil chaleureux et leur sympathie, en particulier Arnaud Bridier et Florance Dubois-Brissonnet pour leurs conseils, Marie-Noelle Bellon-Fontaine pour les discussions intéressantes lors du congrès JSIB d'Annaba et de la journée scientifique Bioadh. Merci à Thierry Meylheuc, Mogane Guilbaud et Jean-Marie Herry. Je remercie également les techniciens du laboratoire en particulier Julien Deschamps, Margareth Renault et Bruno Carnez.

Je garde un bon souvenir d'Andrew Mayne, chargé de recherche dans l'équipe Nanosciences Moléculaires de l'ISMO, et des discussions enrichissantes en sa compagnie dans le RER B entre Orsay et Antony.

Je présente mes remerciements à mes anciens encadrants de l'AFSSA de Maisons-Alforts Brigitte Carpentier et Olivier Firmesse pour leurs encouragements. Merci également à Anne-Marie Leconte pour son amitié.

Merci à mes amis qui m'ont soutenu au cours des trois années de thèse. Merci à Cherif pour sa disponibilité en absence de ma famille, Anne-Marie et Pauline pour leur gentillesse et leur amitié.

Merci à Nicole pour son hospitalité et son aide à mon arrivée en France en 2006.

Merci aux familles Berlioz, Nicolas et Cherih de Rennes qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours d'études.

Je tiens à remercier Anneliese, Paulette et Frédéric Nef pour leur amitié.

Je suis très reconnaissante à mes chers parents qui m'ont encouragé à poursuivre mes études et fourni tout le nécessaire pour finir cette expérience avec succès. Grand merci à ma sœur Leila et mes frères Nadir, Mounir et Amine qui m'ont beaucoup soutenu à distance. Merci papa pour la relecture de mes écrits et pour m'avoir supporté ces derniers mois.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	15
PARTIE A : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	17
CHAPITRE I: L'infection chronique chez l'homme...une impasse thérapeutique ?.....	19
I. Le corps humain est couvert de biofilms	21
I.1. Le biofilm est le mode de vie majoritaire des microorganismes	21
I.2. Notre corps est couvert par un ensemble de biofilms protecteurs	23
I.3. Un équilibre fragile	24
II. Biofilms de Staphylocoques : Quand l'infection devient chronique.....	25
II.1. Structure, composition et régulation génétique des biofilms de <i>S. aureus</i>	29
II.1.1. Nature de la matrice extracellulaire	30
II.1.2. Régulation génétique	31
II.2. Mécanismes de virulence de <i>S. aureus</i> chez l'hôte	33
II.2.1. Colonisation de l'hôte	33
II.2.2. Prolifération tissulaire.....	33
II.2.3. Contournement du système immunitaire	34
II.3. Infections communautaires à <i>S. aureus</i>	35
II.4. Infections nosocomiales à Staphylocoques	36
II.5. Comment survient l'infection à <i>S. aureus</i> à l'hôpital ?	38
III. Antibiothérapie : une impasse thérapeutique ?	39
III.1. L'antibiothérapie	39
III.2. Résistance des bactéries à l'action des antibiotiques	42
III.2.1. Transport transmembranaire de l'antibiotique	43
III.2.2. Synthèse d'enzymes inactivant l'antibiotique	43
III.2.3. Modification structurale de la cible de l'antibiotique.....	44
III.3. L'émergence des « super bactéries ».....	45
III.4. Le biofilm face aux antibiotiques.....	46
III.4.1. Adaptation phénotypique des cellules incluses dans un biofilm	47
III.4.2. Mutations et transferts génétiques	50
III.4.3. Le biofilm, une barrière à la diffusion des antibiotiques ?.....	50

CHAPITRE II: L'imagerie de fluorescence pour l'étude <i>in situ</i> des biofilms	53
I. L'imagerie des biofilms	55
II. L'imagerie de fluorescence dynamique.....	58
II.1. Article 1 : Deciphering Biofilm Structure and Reactivity by Multiscale Time-Resolved Fluorescence Analysis.....	59
II.2. L'imagerie Time-lapse.....	77
II.3. Retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)	81
II.4. Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS)	83
II.5. Imagerie de durées de vie de fluorescence (FLIM)	85
 PARTIE B : RESULTATS.....	 87
CHAPITRE I : La matrice d'exopolymères du biofilm : une barrière à la diffusion des antibiotiques ?.....	91
I. Article 2 : Image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to dissect vancomycin diffusion-reaction processes in <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms	99
II. Article 3 : Correlative time-resolved fluorescence microscopy (Time Lapse, FRAP, FCS, FLIM) to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms	109
 CHAPITRE II : L'état physiologique des bactéries du biofilm comme facteur de tolérance : l'association d'antibiotiques pour sortir de l'impasse thérapeutique ?	 135
1. Introduction	137
2. Matériel et méthodes	139
2.1. Souches bactériennes et conditions de culture	139
2.2. Préparation des biofilms	139
2.3. CMI des antibiotiques.....	140
2.4. Sensibilité des bactéries planctoniques aux antibiotiques	140
2.5. Sensibilité des biofilms aux antibiotiques	141
2.6. Activité de synthèse de l'ADN au sein des biofilms	142
2.7. Viabilité des biofilms par imagerie confocale de fluorescence.....	143
3. Résultats	145
3.1. Visualisation et quantification de la survie cellulaire des biofilms traités à la vancomycine	145
3.2. Etat métabolique des bactéries incluses dans les biofilms de <i>S. aureus</i>	148
3.3. Visualisation et quantification de l'inactivation cellulaire au sein de biofilms traités avec l'association vancomycine-rifampicine	150
 CONCLUSION GENERALE	 161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	169
 ANNEXE : Valorisation scientifique.....	 187

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Principales étapes de développement de la structure spatiale d'un biofilm.

Figure 2 : Schéma décrivant la différence entre une infection aigüe et une infection chronique due à la présence de biofilm.

Figure 3 : Principales étapes de formation du biofilm de *Staphylococcus epidermidis* sur un implant transcutané.

Figure 4 : Photo prise au microscope électronique montrant la forme de coques des cellules de *S. aureus*.

Figure 5 : Images obtenues par microscopie électronique de cellules de *S. aureus* adhérentes et formant des biofilms chez l'hôte sur une valve cardiaque et un tube endotrachéal.

Figure 6 : Système agr chez *S. aureus*.

Figure 7 : Mécanismes d'échappement de *S. aureus* à l'opsonophagocytose.

Figure 8 : Modèle montrant le mécanisme commun induisant la mort cellulaire par des antibiotiques bactéricides.

Figure 9 : Biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 Gfp de 4 jours cultivés en conditions dynamiques présentant deux sous-populations qui ont une sensibilité différente à la colistine et à la ciprofloxacine.

Figure 10 : Modèle d'une infection récurrente due à la formation d'un biofilm d'après Lewis.

Figure 11 : Evolution de la matrice d'exopolymères et de la structure spatiale du biofilm de *P. aeruginosa*.

Figure 12 : Visualisation de la perte de fluorescence du marqueur V6 Chemchrome au sein d'un biofilm d'une souche clinique de *P. aeruginosa* à différents temps après traitement avec le désinfectant chlorure de benzalkonium (BAC).

Figure 13 : Schéma de la résolution temporelle des différentes techniques : Time-lapse, FRAP, FCS et FLIM.

Figure 14 : Une séquence d'une pile d'images enregistrées en mode « x-y-z-t » illustrant le principe de l'imagerie Time lapse et montrant la pénétration de molécules fluorescentes (BODIPY®-vancomycine) dans un biofilm (ici, *S. aureus*) au cours du temps.

Figure 15 : Schéma d'un biofilm formé sur une surface inerte décrivant les paramètres physiques utilisés dans la modélisation du processus de diffusion.

Figure 16 : Coefficients de diffusion relative de différents solutés dans les biofilms.

Figure 17 : Principe de la méthode FRAP.

Figure 18 : Schéma montrant la diffusion de molécules à travers le volume d'excitation pouvant générer un signal de fluctuations d'intensité de fluorescence.

Figure 19 : Exemple de vecteur d'intensité et de courbe d'autocorrélation de fluorescence obtenus par les mesures de FCS.

Figure 20 : Exemple de courbe de déclin de fluorescence.

Figure 21 : Structure chimique du BODIPY®-vancomycine montrant le fluorophore BODIPY® (PM =292 g/mol) et l'antibiotique vancomycine (PM=1450 g/mol) avec ses différents pKa(s)

Figure 22 : Mode d'action de la vancomycine sur la paroi de *S. aureus*.

Figure 23 : Images prises au microscope confocal des biofilms de 24 heures des souches de *S. aureus* ATCC 6538 (a) et ATCC 27217 (b) montrant en section la structure des biofilms et leur viabilité cellulaire.

Figure 24 : Structure chimique de la rifampicine.

Figure 25 : Schéma montrant le plan expérimental des tests de sensibilité aux antibiotiques des biofilms des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*.

Figure 26 : photographie du microscope confocale Leica SP5

Figure 27 : Action spatiotemporelle de la vancomycine (20 µg/ml) sur des biofilms de 24 heures des deux souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*.

Figure 28 : Courbes de survie à 20 µg/ml de vancomycine des cultures planctoniques en phase exponentielle (3 h de culture) et stationnaire (18 h de culture) de croissance ainsi que des cellules en biofilms de 24 heures des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*, observées pendant 48 heures.

Figure 29 : Images d'intensité de fluorescence montrant l'activité cellulaire au sein des biofilms de 5 h et de 24 h marqués avec l'anticorps anti-BrdU.

Figure 30 : Histogramme montrant les taux des cellules actives dans les biofilms de la souche ATCC 6538 de *S. aureus* de 5 heures et de 24 heures. Les mesures contrôles correspondent à des biofilms préparés sans le BrdU marqués avec l'anticorps fluorescent.

Figure 31: Courbes de survie des cultures planctoniques de 3 heures et de 18 heures de croissance ainsi que des biofilms de 24 heures des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*, en présence de 20 µg/ml de vancomycine, 10 µg/ml de rifampicine et l'association vancomycine (20 µg/ml)-rifampicine (10 µg/ml) suivies pendant 48 heures.

Figure 32 : Action spatiotemporelle de la vancomycine (20 µg/ml), la rifampicine (10 µg/ml) et à l'association vancomycine (20 µg/ml)-rifampicine (10 µg/ml) sur des biofilms de 24 heures de la souche *S. aureus* ATCC 6538.

Figure 33 : Action spatiotemporelle de la vancomycine (20 µg/ml), la rifampicine (10 µg/ml) et à l'association vancomycine (20 µg/ml)-rifampicine (10 µg/ml) sur des biofilms de 24 heures de la souche *S. aureus* ATCC 27217.

Tableau 1 : Exemples d'infections chroniques liées au développement de biofilms chez l'homme.

Tableau 2 : Différentes molécules d'antibiotiques et leur cible.

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection

BrdU : Bromodeoxyuridine

CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy

FLIM : Fluorescence Lifetime IMaging

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

IP : iodure de propidium

PDT : Thérapie Photodynamique

pH : potentiel Hydrogène

SARM : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méricilline

SCVs : Small Colony Variants

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

UFC : Unité Formant Colonie

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'«union fait la force», cette maxime bien connue pourrait résumer la stratégie communautaire de survie de nombreuses populations animales (fourmis, abeilles pour ne citer que deux exemples). Elle est également vraie dans le cas des microorganismes. Prenons l'exemple du biofilm bactérien, il peut être 1000 fois plus résistant à des agents antimicrobiens que les mêmes bactéries cultivées dans un liquide! Et pourtant cette organisation microscopique représente le mode de vie majoritaire des microorganismes et elle peut porter atteinte à notre santé lorsqu'elle héberge des agents pathogènes parmi lesquels les médiateurs *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, mais également *Staphylococcus aureus* sur lequel a porté l'ensemble de ce travail de thèse.

La bactérie de *S. aureus* est l'une des principales causes d'infections chroniques (sinusites, plaies suppuratives...), mais également d'infections nosocomiales, ces infections contractées à l'hôpital impliquant le plus souvent (2 cas sur 3) des biofilms ! Le rôle intrinsèque des biofilms dans la résistance de ces bactéries aux antimicrobiens implique la proximité spatiale des cellules favorisant en particulier la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques. Ce processus de résistance génétique est l'un des sujets les plus préoccupants de la médecine actuelle : il s'est développé en quelques décennies et aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'est attendue dans les prochaines années... C'est le cas de la méticilline, antibiotique prescrit en première intention pour les infections staphylococciques. Si l'on isole des souches résistantes chez un patient, le traitement s'oriente alors vers une antibiothérapie de seconde intention incluant notamment la vancomycine utilisée seule ou en association.

L'étude de cet antibiotique clef avec *S. aureus* a suscité notre intérêt dans le cadre de cette thèse. Alors que les connaissances sur sa réactivité proviennent essentiellement d'études réalisées sur des cellules en suspension (planctoniques), l'originalité de notre approche a été d'étudier sa diffusion/réaction *in situ* dans l'épaisseur des biofilms en utilisant en particulier des outils avancés d'imagerie de fluorescence. Nous avons exploré sur des modèles de biofilms de *Staphylococcus aureus* la biodisponibilité de la vancomycine dans la matrice d'exopolymères, ainsi que l'impact de la physiologie spécifique des bactéries incluses dans les biofilms sur l'activité de cet antibiotique.

Cette étude a très largement fait appel aux techniques photophysiques non-invasives ultrasensibles (time-lapse, FRAP, FCS, et FLIM) développées à l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay et au Centre de Photonique BioMédicale de l'université Paris-Sud, ainsi qu'aux compétences de l'équipe Bioadhésion-Biofilm et Hygiène des Matériaux (B2HM) de l'institut Micalis (INRA, Massy) sur la croissance et la caractérisation des bactéries incluses en biofilm.

Ce manuscrit comporte deux parties subdivisées en chapitres.

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique. Dans le premier chapitre il est décrit la problématique des biofilms, de leur résistance aux antimicrobiens et de leur implication dans les infections chroniques communautaires ou nosocomiales. Un second chapitre est consacré aux apports de la microscopie de fluorescence multimodale pour l'étude des biofilms. Il est à noter que ce second chapitre a fait l'objet d'une publication de revue dans le journal *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

La seconde partie du manuscrit est dédiée à la présentation des résultats de nos travaux expérimentaux. Dans un premier chapitre, l'étude des propriétés de diffusion-réaction de la vancomycine dans les biofilms de *S. aureus* est présentée. Ce chapitre fait l'objet de deux publications scientifiques : une parue dans *Proceeding of SPIE OSA Biomedical Optics* et une seconde soumise dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Le second chapitre traite de l'état physiologique des bactéries du biofilm comme facteur de tolérance. Ce chapitre souligne l'apport de l'imagerie non invasive aux techniques plus classiques de microbiologie dans la compréhension des mécanismes de tolérance des biofilms. L'article correspondant à ce chapitre est en cours de rédaction pour soumission dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

PARTIE A : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

L'infection chronique chez l'homme...une impasse thérapeutique ?

I. Le corps humain est couvert de biofilms

I.1. Le biofilm est le mode de vie majoritaire des microorganismes

Les microorganismes constituent la majorité de la biomasse vivante sur Terre et plus de 90% vivent en communauté, associés à une surface - le biofilm. Comprendre les mécanismes d'organisation de ces sociétés microscopiques constitue un enjeu scientifique important pour répondre à des problématiques sociétales, en particulier dans les filières industrielles et médicales. La présence de ces biostructures peut être bénéfique, comme c'est le cas lors du traitement des eaux usées (Singh *et al.*, 2006), ou négative : selon le National Institute of Health (NIH, USA), 80% des infections humaines seraient dues à des biofilms. Ainsi, la compréhension des spécificités de ce mode de vie communautaire des microorganismes est devenue une priorité dans les secteurs de la recherche biomédicale, environnementale et alimentaire nécessitant la mise en synergie de différentes compétences en physique, chimie et (micro)biologie.

L'existence du mode de vie en biofilm a été envisagée depuis les travaux de Henrici et Zobell au début des années 40 (Henrici, 1933; Zobell, 1943). Ce n'est qu'à partir des années 1980 que ce concept a été généralisé à des environnements variés par Bill Costerton (Costerton, 1978). Depuis, l'intérêt pour la recherche scientifique sur les biofilms croît de manière exponentielle : plus de 5000 publications sur le sujet sont recensées entre 2000 et 2010 (Karunakaran *et al.*, 2011).

Il n'existe pas de consensus absolu sur la définition d'un biofilm et il est encore possible de trouver quelques divergences suivant les auteurs. Bill Costerton a défini le biofilm comme un ensemble de cellules immobilisées sur un support, le plus souvent incluses dans une matrice de polymères extracellulaires (Costerton, 1999). Certains auteurs considèrent les agrégats microbiens formés dans les boues d'épuration (flocs) (Weber *et al.*, 2007), les pellicules microbiennes qui se développent à l'interface liquide-air (Branda *et al.*, 2001) ou encore de simples cellules adhérentes (Wimpenny *et al.*, 2000) comme des biofilms. Les biofilms rencontrés dans les environnements naturels sont le plus souvent hétérogènes et constitués de différentes espèces microbiennes (Branda *et al.*, 2005). Outre les bactéries, ils peuvent contenir des levures, des champignons, des moisissures, des virus et des algues.

Nous définirons un biofilm comme une association dense et structurée de cellules enrobées dans une matrice extracellulaire hydratée (Sutherland, 2001 ; Branda *et al.*, 2005). Cette dernière est majoritairement constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et d'ions divalents. A l'échelle micrométrique, la distribution des composants de la matrice extracellulaire et des cellules du biofilm est hétérogène (De Beer *et al.*, 1994). Les nombreuses interactions physico-chimiques covalentes et non covalentes (Van der Waals, hydrogène, électrostatiques...) entre ces différents constituants assurent une cohésion viscoélastique du biofilm (Mayer *et al.*, 1999). En fonction des conditions environnementales disponibles (oxygène, nutriments,...), des espèces formant le biofilm et des conditions hydrodynamiques, la matrice extracellulaire peut avoir une composition chimique variable. Les polysaccharides, composants majoritaires de la matrice extracellulaire, peuvent être polyanioniques, tels les alginates produites par les biofilms de *P. aeruginosa* (Wozniak *et al.*, 2003) ou polycationiques, comme les poly-N-acetylglucosamine (PNAG) produits par les biofilms de *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Götz, 2002).

La transition de l'état de croissance planctonique à la croissance en communautés sessiles est un processus dynamique qui comporte une première étape d'adhésion cellulaire au cours de laquelle on distingue une phase d'adhésion précoce dite réversible, où les cellules ont la possibilité de se détacher, et une phase d'adhésion tardive dite irréversible, où les cellules sont fortement attachées à la surface du support. Il s'ensuit une étape de colonisation où les bactéries adhérentes se multiplient et produisent une matrice extracellulaire qui renforce leur adhésion, puis une étape de développement spatial et de maturation du biofilm. Une fois le biofilm formé, certaines cellules s'en détachent pour aller coloniser d'autres surfaces (Kjelleberg *et al.*, 2007) (figure 1).

Ce processus de développement des biofilms est basé sur la régulation génétique qui conditionne la coordination dans l'expression de certains déterminants moléculaires extracellulaires (adhésines, flagelles,...) et de composants cellulaires (Sauer *et al.*, 2002).

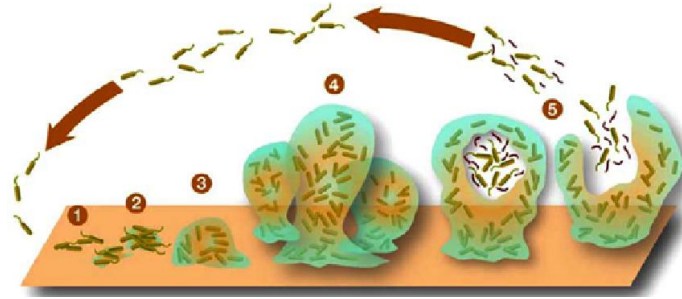


Figure 1 : Principales étapes de développement de la structure spatiale d'un biofilm (advancedhealing.com).

La formation d'un biofilm constitue une stratégie de survie étonnamment efficace, conférant aux microorganismes la capacité de résister à différents stress. La structure tridimensionnelle gouverne la mise en place de gradients en nutriments, en oxygène et en produits métabolites qui induisent l'apparition d'une hétérogénéité chimique et biologique dans le biofilm. En réponse à leur microenvironnement local, les cellules peuvent alors évoluer vers des phénotypes de résistance par des modifications physiologiques et/ou l'expression de gènes spécifiques. La résistance globale de la communauté bactérienne apparaît donc être un processus multifactoriel dépendant de la structure qui implique des phénomènes locaux.

Dans la suite de cette présentation bibliographique, après un bref survol des différents écosystèmes du corps humain, nous nous focaliserons sur la problématique des infections chroniques à *S. aureus* et les limites des antibiothérapies utilisées.

I.2. Notre corps est couvert par un ensemble de biofilms protecteurs

In utero, l'être humain baigne dans un environnement stérile, et ce n'est que lors de l'accouchement qu'il entre en contact avec les microorganismes de la flore commensale maternelle : l'écosystème corporel s'installe avant sa première respiration pour ne plus le quitter (Rosenthal *et al.*, 2011). Les microorganismes de ces écosystèmes tapissent la peau et les muqueuses des différents organes de l'homme (la bouche, les voies respiratoires, les tractus digestifs et génitaux, ...) formant la flore commensale de l'hôte. Cette dernière est estimée à environ 10^{14} cellules, et surpasse en nombre les cellules eucaryotes du corps humain (estimées à 10^{13}) (Foxman *et al.*, 2008). Elle est le plus souvent constituée de bactéries issues

de communautés mixtes composées de différentes espèces bénéfiques ou neutres vis-à-vis de l'hôte. La diversité en espèces de ces communautés microbiennes varie selon les conditions environnementales locales : les paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température, ou l'humidité conditionnent la nature et la dynamique de développement de ces flores. Par ailleurs, cette flore commensale peut ne pas être un continuum entre individus. C'est le cas récemment mis en évidence par un consortium international pour l'écosystème digestif humain : quel que soit notre continent, notre âge et nos activités, seuls trois «entérotypes», ou signatures bactériennes intestinales, ont été identifiés dans cette étude (Arumugam *et al.*, 2011). Elles sont principalement déterminées par l'abondance de certains types de bactéries mais aussi par leur potentiel génétique (c'est-à-dire par les fonctions que leurs gènes codent). Cette découverte ouvre de nombreuses perspectives d'application dans le domaine de la nutrition et de la santé humaine. Peut-être qu'à l'avenir, en plus de notre groupe sanguin, il nous faudra déterminer à quel « entérotipe » nous appartenons pour cibler certains traitements. Il en sera probablement de même pour nos autres flores, qu'elles soient buccale, cutanée, respiratoire ou génitale... Ces biofilms résidents sont en interaction permanente avec les microorganismes de l'environnement, potentiellement pathogènes, et protègent normalement l'organisme des infections (Kranich *et al.*, 2011). Ils jouent également un rôle essentiel dans le développement de notre système immunitaire (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004).

I.3. Un équilibre fragile

Comme nous venons de le décrire, chez un être sain, la relation entre les biofilms résidents de la flore commensale et leur hôte est maintenue à l'équilibre. En présence de certains facteurs déclencheurs (antibiothérapie, chimiothérapie, faiblesse du système immunitaire, traumatisme, pose d'implants...) cette « bio-harmonie » peut être rompue et favoriser l'apparition d'infections (Sixou *et al.*, 2007).

Par exemple, une antibiothérapie, en déséquilibrant la composition microbienne du microbiote intestinal, peut conduire à une croissance excessive et/ou à l'implantation de souches pathogènes opportunistes telles que *Clostridium difficile* à l'origine d'une surinfection (Stevens *et al.*, 2011). On citera également le cas de l'apparition de vaginoses à *Gardnerella vaginalis* ou de candidoses faisant suite à des traitements antibiotiques locaux

perturbant le biofilm protecteur naturel de la flore vaginale (*Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus fermentum*) (Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Costerton, 2007).

Certaines maladies génétiques peuvent aussi avoir pour conséquence la rupture de l'homéostasie qui existe entre la microflore et son hôte. Par exemple, il a été montré pour les patients atteints de la maladie de Crohn une modification du rapport des deux principaux groupes bactériens du microbiote intestinal (Firmicutes/Bacteroidetes) avec un rapport qui s'échelonne de 1/1 à 3/1 au lieu de 10/1 chez le sujet sain. Autre exemple chez les patients atteints de mucoviscidose pour lesquels la surproduction du mucus bronchique favorise la colonisation par des biofilms de pathogènes tels que *P. aeruginosa* (Lyczak *et al.*, 2002).

Un autre cas d'intérêt concerne la flore résidente de la peau (constituée majoritairement de *S. epidermidis* et *Propionibacterium acnes*) (Dekio *et al.*, 2005), normalement non pathogène, mais dont les bactéries peuvent devenir des pathogènes opportunistes à l'origine d'infections. Celles-ci sont dues au franchissement par les bactéries de la barrière cutanée et de leur dissémination dans la circulation sanguine consécutivement à un traumatisme de la surface de la peau (plaie ouverte, insertion d'un dispositif médical, piqûre, cathéter...) (Otto, 2008).

Qu'il s'agisse de pathogènes opportunistes, d'un déséquilibre du système immunitaire, de maladies génétiques, ces déséquilibres de la flore commensale génèrent des surinfections qui compliquent l'état de santé des patients (Costerton *et al.*, 1999) mais sont aussi une voie d'accès pour les microorganismes pathogènes externes. Il peut alors s'en suivre la formation de biofilms à l'origine d'infections chroniques comme nous allons le détailler.

II. Biofilms de Staphylocoques : Quand l'infection devient chronique

L'infection chronique est une infection qui persiste malgré l'intervention du système immunitaire et l'application d'une antibiothérapie (Hall-Stoodley et Stoodley 2009), des conditions réunies en présence d'un biofilm (figure 2). Quelques exemples d'infections chroniques liées au développement de biofilms chez l'homme sont répertoriés dans le tableau 1. Peuvent être chroniques des infections communautaires (infection rencontrée dans la vie quotidienne) mais plus particulièrement des infections nosocomiales (infection rencontrée en milieu hospitalier), certaines souches comme les staphylocoques, *E. coli* et *P. aeruginosa* pouvant générer les deux types d'infections.

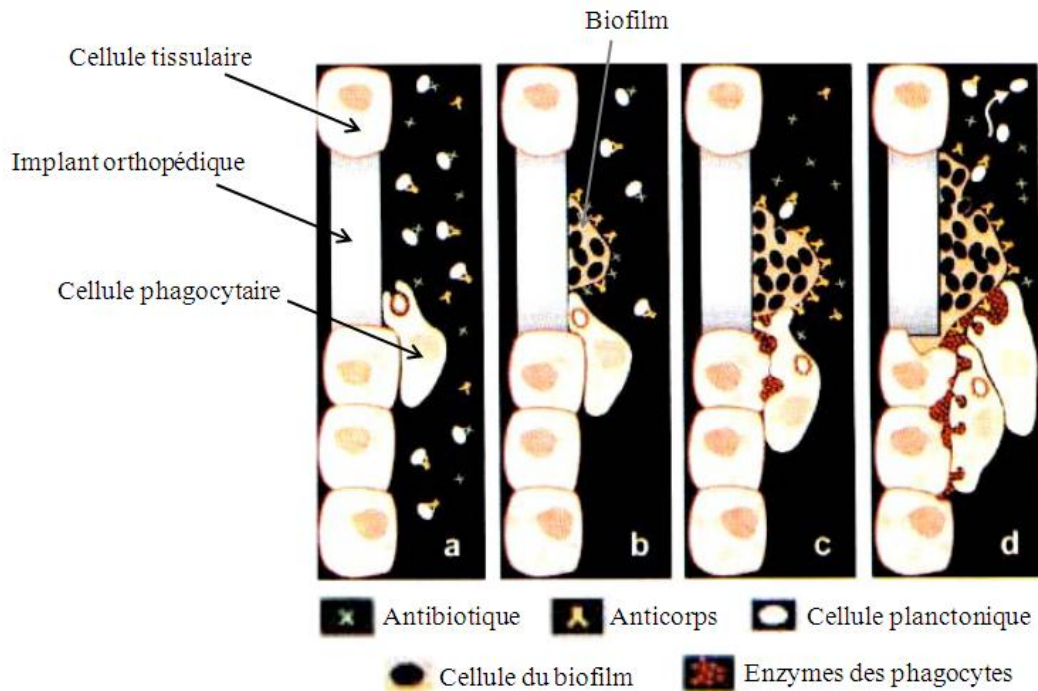


Figure 2 : Schéma décrivant la différence entre une infection aiguë et une infection chronique due à la présence de biofilm. (a) Les bactéries planctoniques (en blanc) sont tuées par les antibiotiques et les anticorps et phagocytées par les cellules immunitaires. (b) Les bactéries planctoniques acquièrent un nouveau phénotype (en noir) en formant un biofilm qui résiste aux antibiotiques et aux mécanismes de défense. (c) Le biofilm se détache et libère des bactéries planctoniques qui sont facilement contrôlées par les anticorps et les antibiotiques. (d) Le biofilm mature libère un nombre important de bactéries planctoniques suffisantes pour générer une infection aiguë. Les cellules phagocytaires produisent des enzymes qui dégradent les tissus avoisinants (d'après Costerton et al., 1999). (Figure reproduite et adaptée avec la permission de l'éditeur « Springer » : The Biofilm Primer, Costerton, 2007).

Notre intérêt pour les staphylocoques repose sur leur prévalence dans les infections chroniques chez l'homme. On les retrouve par exemple dans les plaies suppuratives, les rhinosinusites, les otites moyennes, les infections chez les patients sur lesquels ont été implantés des cathéters veineux centraux, des prothèses orthopédiques. Ils sont classés en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre détectée facilement par un test biochimique. On distingue les staphylocoques à coagulase négative (SCN) tels que *S. epidermidis* et les staphylocoques à coagulase positive (SCP) tels que *S. aureus*.

Tableau 1 : Exemples d'infections chroniques liées au développement de biofilms chez l'homme (Fux et al., 2009). (Tableau adapté avec la permission de l'éditeur « Elsevier » : Trends in Microbiology, Fux et al., 2005).

Infection or disease	Common bacterial species involved
Dental caries	Acidogenic Gram-positive cocci (<i>Streptococcus sp.</i>)
Periodontitis	Gram-negative anaerobic oral bacteria
Otitis media	Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>
Chronic tonsillitis	Various species
Cystic fibrosis pneumonia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Endocarditis	Viridans group streptococci, staphylococci
Necrotizing fasciitis	Group A streptococci
Musculoskeletal infections	Gram-positive cocci
Osteomyelitis	Various species
Biliary tract infection	Enteric bacteria
Infectious kidney stones	Gram-negative rods
Bacterial prostatitis	<i>Escherichia coli</i> and other Gram-negative bacteria
<i>Infections associated with foreign body material</i>	
Contact lens	<i>P. aeruginosa</i> , Gram-positive cocci
Sutures	Staphylococci
Ventilation-associated pneumonia	Gram-negative rods
Mechanical heart valves	Staphylococci
Vascular grafts	Gram-positive cocci
Arteriovenous shunts	Staphylococci
Endovascular catheter infections	Staphylococci
Peritoneal dialysis (CAPD) peritonitis	Various species
Urinary catheter infections	<i>E. coli</i> , Gram-negative rods
IUDs	<i>Actinomyces israelii</i> and others
Penile prostheses	Staphylococci
Orthopedic prosthesis	Staphylococci

S. epidermidis, espèce dominante de la flore résidente de la peau, a été considérée pendant de longues années comme une bactérie non pathogène mais l'émergence d'infections nosocomiales à *S. epidermidis* sur des dispositifs médicaux a été récemment rapportée (voir ci-dessous) (von Eiff et al., 2001a ; 2002). Par comparaison avec *S. aureus*, cette espèce exprime moins de facteurs de virulence tels que la sécrétion de toxines ou la résistance au système immunitaire, mais sa capacité à former des biofilms très mucoïdes lui permet de devenir un pathogène opportuniste (Fey et Olson, 2010).

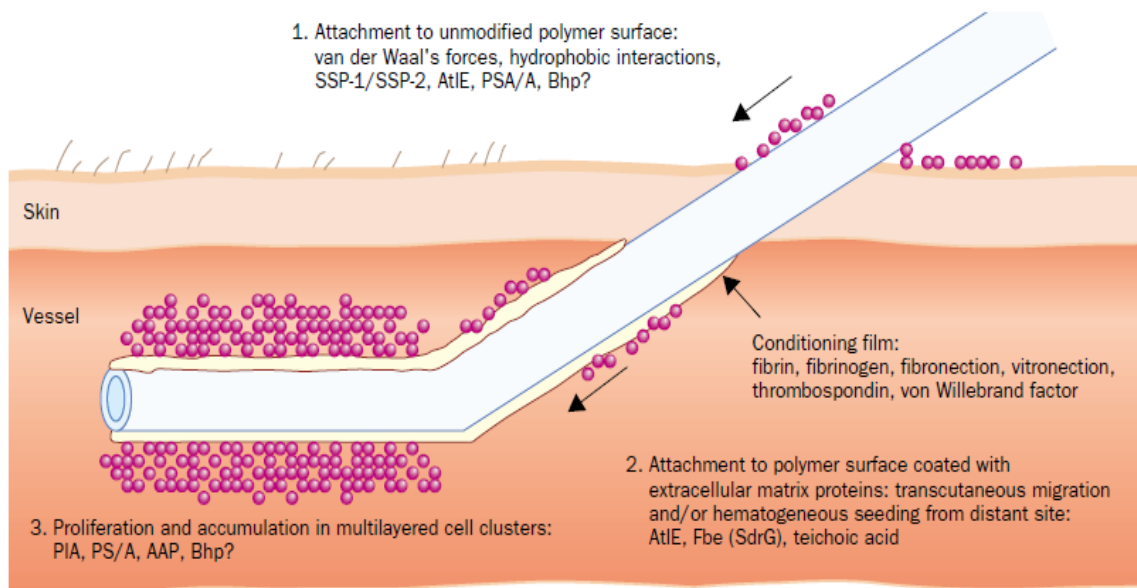


Figure 3 : Principales étapes de formation du biofilm de *Staphylococcus epidermidis* sur un implant transcutané (von Eiff et al., 2002). 1. Les bactéries adhèrent à la surface de l'implant par des interactions non spécifiques (forces de Van der Waals, interactions hydrophobes, adhésines présentes à la surface des cellules telles que SSP-1 et SSP-2 (SSP pour Staphylococcal Surface Protein)). 2. L'adhésion des bactéries s'effectue par reconnaissance spécifique de certains constituants du film de plasma formé sur la surface du cathéter. L'adhésine Fbe (SdrG) se lie au fibrinogène, l'autolysine AtlE se fixe à la vitronectine, l'autolysine Aae peut avoir également un rôle dans ce processus (Heilmann et al., 2003). 3. Les bactéries se multiplient, produisent une matrice d'exopolymères PIA (PIA pour Polysaccharide Intercellular Adhesin) pour former des communautés sessiles persistantes. (Figure reproduite avec permission de l'éditeur « Elsevier » : The Lancet Infectious Diseases, von Eiff et al., 2002).

Le développement de biofilms sur les cathéters veineux centraux peut être influencé par certains facteurs environnementaux tels que la nature des anti-coagulants utilisés en perfusion par voie intraveineuse. Des études menées *in vitro* ont montré que l'héparine favorise le développement des biofilms de *S. aureus* (Shanks et al., 2005) alors que des anti-coagulants alternatifs tels que le citrate de sodium ou l'EDTA de sodium, à des concentrations élevées, minimisent ce risque (Shanks et al., 2006). *S. aureus* est le deuxième pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales après *E. coli*. Son isolement chez des patients en milieu communautaire est également de plus en plus fréquent (ECDC, 2008). C'est l'espèce d'intérêt pour ce travail de thèse sur laquelle nous nous focaliserons dans la suite de ce manuscrit.

II.1. Structure, composition et régulation génétique des biofilms de *S. aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries en forme de coques (figure 4), à paroi Gram positif, sans flagelle, pouvant croître en conditions aérobies ou anaérobies. C'est une espèce ubiquitaire : on la retrouve aussi bien dans le sol, dans l'eau que chez les animaux (Le Loir et Gautier, 2010). A ce jour, une cinquantaine d'espèces sont identifiées. Leur implication dans des infections chez l'homme a été mise en évidence en 1879 par Louis Pasteur dans des abcès et autres lésions cutanées. En 1881, Alexander Ogston a décrit la première souche de l'espèce *S. aureus* appelée couramment staphylocoque doré en raison de la couleur des colonies bactériennes observées en milieu gélosé.

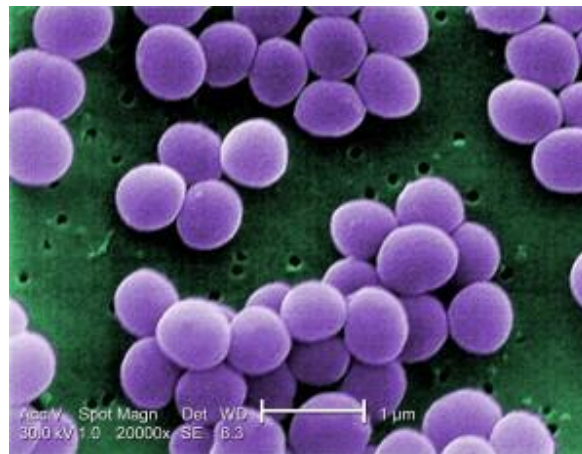


Figure 4 : Photographie prise au microscope électronique montrant la forme de coques des cellules de *S. aureus* (http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

Un des facteurs de virulence des staphylocoques est leur capacité à adhérer à une surface et former des biofilms (Parsek et Singh, 2003 ; Del Pozo et Patel, 2007). Un exemple de structure de biofilms de *S. aureus* formés sur des dispositifs médicaux retirés des patients et observés par microscopie électronique à balayage est présenté dans la figure 5. On remarquera une organisation spatiale multi-couches de cellules coccoïdes associées à la surface et formant une structure 3D dense et macroscopiquement homogène (Boles et Horswill, 2011).

De nombreuses études ont été réalisées sur des modèles de biofilms de *S. aureus in vitro* (biofilms synthétiques sur matériaux inertes) et *in vivo* (modèles animaux) afin de disséquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ces biostructures (Knobloch *et al.*, 2002 ; Coenye et Nelis, 2010).

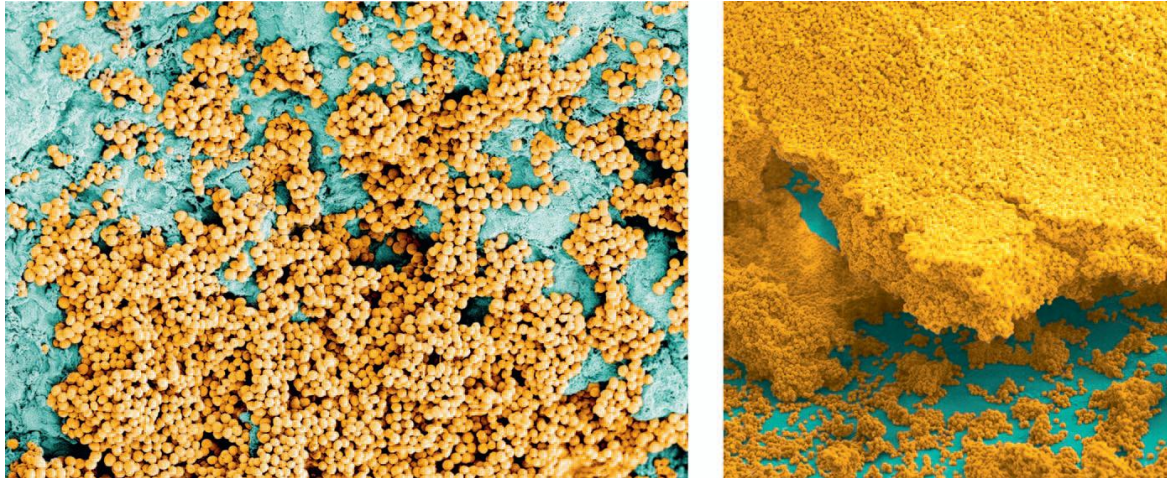


Figure 5 : Images obtenues par microscopie électronique de cellules de *S. aureus* adhérentes et formant des biofilms chez l'hôte sur une valve cardiaque (à gauche) et un tube endotrachéal (à droite) (Boles et Horswill, 2011). (Figure reproduite avec permission de l'éditeur « Elsevier » : Trends in Microbiology, Boles et Horswill, 2011).

II.1.1. Nature de la matrice extracellulaire

Il a été montré qu'un polysaccharide extracellulaire « poly- β (1,6)-*N*-acétyl-D-glucosamine» (PNAG) également nommé PIA (for Polysaccharide Interacellular Adhesin) était l'un des constituants majeurs de la matrice d'EPS des biofilms de *S. aureus*. Ce PIA est synthétisé par des enzymes codées par l'opéron *ica* *ADBC* retrouvé dans la plupart des souches de *S. aureus* cliniques (Arciola *et al.*, 2001 ; Fowler *et al.*, 2001 ; Fitzpatrick *et al.*, 2006 ; Tu Quoc *et al.*, 2007).

Cependant, des études récentes ont mis en évidence que ce polymère PIA n'était pas indispensable à la formation de biofilms pour toute souche de *S. aureus*. Ceci a été démontré aussi bien pour des souches cliniques ne produisant pas naturellement de PIA (Fitzpatrick *et al.*, 2005 ; O'Neill *et al.*, 2007a ; O'Gara, 2007 ; Lauderdale *et al.*, 2009) que pour des mutants de la synthèse du PIA (mutation du locus *ica*) (Boles *et al.*, 2008). Ces biofilms de *S. aureus* «*ica* indépendant» ne sont pas sensibles à l'action d'enzymes d'hydrolyse spécifiques du PNAG telle que la Dispersine B (Izano *et al.*, 2008), mais sont déstructurés par l'action de protéases (Lauderdale *et al.*, 2010 ; Marti *et al.*, 2011), mettant ainsi en évidence que la matrice EPS de ces biofilms est de nature essentiellement protéique. Certaines protéines extracellulaires, présentes à la surface des enveloppes bactériennes ou excrétées dans la matrice EPS et pouvant être impliquées dans la formation des biofilms ont été identifiées, telles que la protéine A (Spa) (Merino *et al.*, 2009) , FnBPA, FnBPB (O'Neill *et*

al., 2009) et SasG (Corrigan *et al.*, 2007). D'autres travaux ont montré que la formation des biofilms de *S. aureus* mettait en jeu de l'ADN extracellulaire (Rice *et al.*, 2007, Mann *et al.*, 2009). Cet ADN extracellulaire provient de la lyse cellulaire, elle-même contrôlée chez *S. aureus* par l'opéron *cidABC*. En effet, une mutation au niveau du gène *cidA* réduit significativement la formation des biofilms de *S. aureus* (Rice *et al.*, 2007).

II.1.2. Régulation génétique

L'expression des gènes codants pour les déterminants moléculaires impliqués dans la formation des biofilms de *S. aureus* et leur virulence est gouvernée par des réseaux de régulations complexes qui répondent aux facteurs environnementaux extérieurs (force ionique, pH, nutriments, oxygène, etc.) ainsi qu'à des signaux de communication intercellulaires (quorum sensing). Chez *S. aureus*, ces voies de signalisation sont principalement gouvernées par deux régulateurs transcriptionnels, *sarA* (for *Staphylococcal accessory regulator*) et *agr* (for *accessory gene regulateur*), activés chacun à des stades de croissance différents des biofilms.

- *sarA* est activé à un stade précoce de la formation des biofilms pour exprimer les gènes codants pour des protéines de surface chez *S. aureus* impliquées dans l'étape d'adhésion cellulaire et d'agrégation intercellulaire (Valle *et al.*, 2003 ; Beenken *et al.*, 2003 ; O'Neill *et al.*, 2007a ; Shenkman *et al.*, 2001). *SarA* contrôle l'expression d'environ 120 gènes (Dunman *et al.*, 2001), y compris le système *agr* (Novick, 2003). On notera que des mutations au niveau du régulateur *sarA*, réduisent significativement la formation des biofilms de *S. aureus* (Valle *et al.*, 2003 ; Beenken *et al.*, 2003) illustrant le rôle majeur de ce régulateur.

- *agr* est un régulateur transcriptionnel essentiel du Quorum sensing (QS) de *S. aureus* (Otto, 2004), c'est-à-dire du système de réponse collective des bactéries à partir d'un seuil critique de densité cellulaire. Ainsi *agr* ne sera activé qu'à un stade avancé de la formation du biofilm (Shenkman *et al.*, 2001). Les médiateurs chimiques du QS sont des molécules « signal » dénommées phéromones ou auto-inducteurs. Chez *S. aureus* ces molécules sont des petits peptides diffusibles dénommés AIP (autoinducing peptide) produit du gène *agrD* du locus *agr*. La Figure 6 décrit l'ensemble du locus *agr* composé outre d'*agrD*, des gènes *agrA*, *agrC*, *agrB*, et *hld*. Ces 5 gènes codent pour deux transcrits l'ARNII et l'ARNIII initiés par deux promoteurs distincts P2 et P3. C'est l'ARNII qui codera pour la production de la phéromone AIP dont le système de maturation et de transport est assuré par la protéine AgrB,

et également pour les protéines du système à deux composantes AgrA et Agr C qui sont impliquées dans la transduction du signal. Le transcrit ARN III réprime l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion et active ceux responsables de la virulence (Novick, 2003).

Le système *agr* intervient également dans le processus de dispersion des biofilms (Yarwood *et al.*, 2004) en activant l'expression de petits peptides tensio-actifs (phenol-soluble modulins ou PSM) (Vuong *et al.*, 2000) responsables de la dislocation du biofilm.

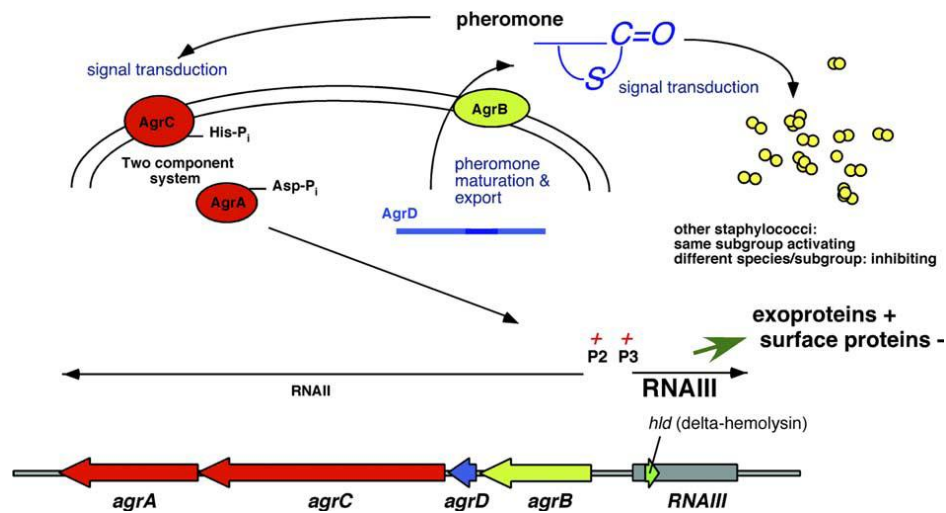


Figure 6 : Système *agr* chez *S. aureus* (Otto, 2004). A partir d'une concentration cellulaire critique dans les stades avancés du développement des biofilms, la concentration de la phéromone AIP (AgrD) devient importante, l'histidine kinase transmembranaire AgrC détecte ce signal et ainsi s'autophosphoryle. Une cascade de transduction du signal est alors déclenchée par cette phosphorylation, pour activer le régulateur cytoplasmique AgrA. Une fois que ce régulateur est phosphorylé à son tour, il active les promoteurs P2 et P3 pour la transcription de l'ARNIII et de l'ARNII. La transcription de l'ARNII donne lieu à une auto-induction de ce cycle. Le transcrit ARNIII active l'expression de certains gènes codants pour des exoprotéines tels que *hla* (α toxine) (Morfeldt *et al.*, 1995), *sspA* (sérine protéase) (Oscarsson *et al.*, 2006) et réprime l'expression d'autres gènes codants pour des protéines de surface telles que *fnbA* (protéines liant le fibronectine A et B) et *spa* (protéine A) (Novick *et al.*, 1993). (Figure reproduite avec la permission de l'éditeur « John Wiley and Sons » : FEMS Microbiology Letters, Otto, 2004).

En complément de *sarA* et *agr*, le facteur transcriptionnel sigma B (SigB) régule l'expression des gènes dans des conditions environnementales de stress (privation de nutriments, choc osmotique,...) (Bronner *et al.*, 2004). Ce facteur SigB active en particulier la transcription du régulateur *sarA* et réprime l'expression du locus *agr* (Bischoff *et al.*, 2001).

D'autres régulateurs transcriptionnels peuvent participer aux réseaux de régulations génétiques dans les biofilms de *S. aureus* tels que :

- IcaR et TcaR qui contrôlent négativement la transcription de l'opéron *ica* (Jefferson *et al.*, 2004),
- Le système à deux composantes *arlRS* (*autolysin related locus*) qui régule négativement la formation des biofilms de *S. aureus* et qui peut interagir avec *sarA* et *agr* (Toledo-Arana *et al.*, 2005),
- Rbf (regulator of biofilm formation) qui intervient dans la phase d'agrégation cellulaire et est affecté par la présence du glucose et du NaCl (Lim *et al.*, 2004).

II.2. Mécanismes de virulence de *S. aureus* chez l'hôte

La pathogénicité des infections à *S. aureus* est liée à sa capacité à **coloniser** les tissus de l'hôte, à **proliférer** et à **contourner le système de défense immunitaire** grâce à des facteurs de virulence spécifiques (facteurs d'adhésion, production d'enzymes et de toxines) (Lowy *et al.*, 1998).

II.2.1. Colonisation de l'hôte

S. aureus possède un grand nombre de protéines de surface dénommées adhésines de la classe MSCRAMMs « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules » (Foster et Hook, 1998, Chavakis *et al.*, 2007), tel que leur classification l'indique, elles permettent une adhésion spécifique à des composants du tissu de l'hôte. On citera la protéine liant le fibrinogène (Clumping factor A ou ClfA), les protéines liant la fibronectine FnBPA et FnBPB (fibronectin-binding protein A et B) (Greene *et al.*, 1995, Vaudaux *et al.*, 1995), la protéine liant le collagène (Cna) ainsi que la protéine liant l'élastine (EbpS ou Elastin binding Protein) (Foster et Hook, 1998). D'autres protéines de surface décrites également chez *S. aureus* peuvent avoir un rôle dans la colonisation comme Eap (for Extracellular adherence protein) (Harraghy *et al.*, 2003), Ebh (for Extracellular matrix binding homologue protein) (Clarcke *et al.*, 2002) et Emp (for Extracellular matrix binding protein) (Hussain *et al.*, 2001).

II.2.2. Prolifération tissulaire

Après son adhésion aux tissus grâce aux protéines spécifiques décrites précédemment, *S. aureus* sécrète de nombreuses enzymes extracellulaires qui lui permettent de détériorer les tissus de l'hôte. Parmi ces enzymes, on cite : les protéases, l'élastase, et la hyaluronidase (Vincenot *et al.*, 2008). Simultanément, la production de toxines par *S. aureus* telles que les

hémolysines α , β , δ , et γ , la leucocidine et les toxines formant des pores qui peuvent lyser les membranes cytoplasmiques des cellules immunitaires, favorisent la multiplication et la propagation du pathogène (Dinges *et al.*, 2000, Vincenot *et al.*, 2008). Le système immunitaire de l'hôte est alors stimulé pour combattre l'infection mais est-ce toujours efficace ?

II.2.3. Contournement du système immunitaire

S. aureus est doté de facteurs qui lui permettent d'échapper au système de défense de l'hôte (figure 7). Tout d'abord, il est partiellement protégé de la phagocytose grâce à la capsule polysaccharidique qui décore sa paroi externe (Foster, 2005). Ce pathogène produit des protéines CHIPS (CHemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci), présentes chez environ 60% des souches de *S. aureus*, qui se lient à certains récepteurs de leucocytes et empêchent leur recrutement vers le site d'infection. De plus, la protéine A de *S. aureus* est capable de neutraliser les anticorps en se liant à leur partie fixe. *S. aureus* sécrète également une sérine protéase V8 qui clive les chaînes lourdes d'immunoglobulines (Vincenot *et al.*, 2008, Chavakis *et al.*, 2007).

Ces trois mécanismes de virulence sont accentués par la capacité de *S. aureus* à former des biofilms tridimensionnels lors du cycle infectieux. En effet, lors de la phase initiale de construction de ces biostructures, la synthèse de matrice exopolymérique par les cellules adhérentes va renforcer leur ancrage aux tissus et favoriser leur colonisation et prolifération chez l'hôte. Le développement d'assemblages biologiques tridimensionnels va également conférer aux cellules de nouvelles propriétés leur permettant en particulier une très forte aptitude à résister aux agressions locales du système immunitaire : résistance à la prédation des macrophages, la matrice exopolymérique leur condamnant l'accès aux cellules cibles, résistance au stress oxydant associé à une réponse inflammatoire par une physiologie adaptée (Leid *et al.*, 2002) mais également, comme nous le verrons plus en détail dans la partie III.4, à l'action des antibiotiques utilisés pour juguler l'infection. En échappant à la fois au système immunitaire de l'hôte et aux traitements prophylactiques, *S. aureus* possède une très grande faculté à persister dans l'organisme (parfois pendant plusieurs années)... l'infection devient alors chronique.

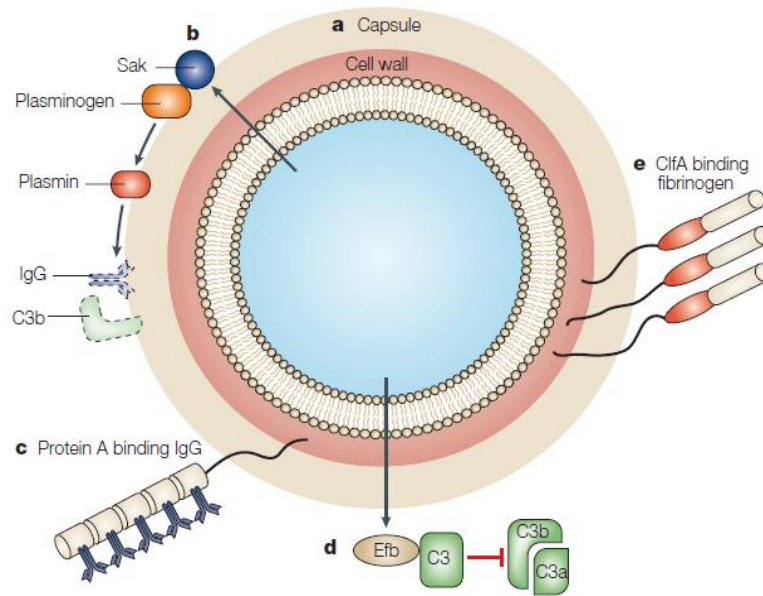


Figure 7 : Mécanismes d'échappement de *S. aureus* à l'opsonophagocytose (Foster, 2005). Cette figure illustre : (a) la capsule polysaccharidique qui empêche l'accès des neutrophiles pour leur fixation au complément et à l'anticorps. (b) l'enzyme staphylokinase extracellulaire (Sak) active le plasminogène lié à la cellule et coupe IgG et C3b. (c) la protéine A avec 5 domaines de fixation pour l'immunoglobuline G (IgG). (d) la protéine extracellulaire liant le fibrinogène (Efb) se lie au complément C3 et bloque son dépôt sur la surface de la bactérie, l'inactivation du complément C3 empêche l'opsonisation. (e) le Clumping facteur A (ClfA) se fixe à la chaîne- γ du fibrinogène. (Figure reproduite avec la permission de l'éditeur Macmillan Ltd : Nature Reviews Microbiology, Foster, 2005).

II.3. Infections communautaires à *S. aureus*

Au quotidien, une simple blessure cutanée peut devenir une porte d'entrée pour des bactéries pathogènes telles que *S. aureus* ce qui aura pour conséquence l'apparition d'une infection superficielle de la peau (abcès, panaris, impétigo) (Diekema *et al.*, 2001 ; Dryden, 2010). Ces infections superficielles, normalement bénignes, peuvent dégénérer en des pathologies plus sérieuses telles que bactériémies, méningites, endocardites, pneumopathies ou encore arthrites septiques (Lowy, 1998). Certaines pathologies telles que le diabète ou certaines maladies vasculaires prédisposent les patients au développement d'infections chroniques à *S. aureus*. Pour 1 à 2% de ces patients, cette infection se traduit par une inflammation et l'apparition de plaies suppuratives chroniques (Percival *et al.*, 2011 ; Diegelmann *et al.*, 2003 ; Fazli *et al.*, 2011). Les biopsies réalisées au niveau de ces plaies révèlent quasiment systématiquement la présence de *S. aureus*, dont l'organisation spatiale en biofilm est avérée dans 60% des cas (James *et al.*, 2008). Cette organisation en biofilm serait à l'origine de l'absence de cicatrisation des plaies (Mustoe *et al.*, 2006 ; Fazli *et al.*, 2011).

Les muqueuses externes telles les sinus, les tympans ou les tissus conjonctifs de l'œil peuvent également être le siège d'infections à *S. aureus* : sinusites récidivantes et otites suppuratives (von Eiff *et al.*, 2001b ; Brook, 2008). Ces infections sont favorisées par le portage nasal asymptomatique de *S. aureus* avéré de manière permanente ou transitoire chez près de 50% des individus (Wertheim *et al.*, 2005). La fréquence de ce portage dans la population serait reliée à la capacité de *S. aureus* à s'internaliser et à proliférer dans les cellules de la muqueuse nasale qui deviennent ainsi un réservoir de ces agents pathogènes (Clement *et al.*, 2005 ; Plouin-Gaudon *et al.*, 2006 ; Niederfuhr *et al.*, 2008). Ici aussi, certaines pathologies primaires peuvent aggraver le tableau clinique. C'est le cas des patients atteints de mucoviscidose, maladie qui se traduit notamment par l'augmentation de la viscosité du mucus pulmonaire, rendant plus difficile son évacuation par les cils, ce qui conduit à une obstruction chronique des bronches ainsi qu'à la non-évacuation des bactéries. Au fil du temps, différentes bactéries colonisent les voies respiratoires d'un même malade. Le pathogène *S. aureus* est le plus souvent isolé des expectorations des jeunes patients (Goerke *et al.*, 2007). L'utilisation de différentes molécules antibiotiques pour traiter ces infections entraîne un changement de l'écosystème des voies respiratoires des malades (Hassett *et al.*, 2009). A l'âge adulte, *P. aeruginosa* devient ainsi le colonisateur principal, ce qui constitue un tournant dans l'évolution de la maladie respiratoire qui n'est alors plus contrôlable par les approches d'antibiothérapies conventionnelles (Lyczak *et al.*, 2002 ; Hoiby, 2011).

II.4. Infections nosocomiales à Staphylocoques

En France, on estime que 6 à 7% des patients hospitalisés contractent des infections qu'ils n'auraient pas développées hors de l'établissement de santé. On parle d'infections nosocomiales. D'après les données du rapport du centre européen de prévention et de contrôle des maladies ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), sur les quatre millions de personnes touchées par une infection nosocomiale chaque année dans l'Union Européenne, le nombre de décès est estimé à plus de 37000, soit près de 1 % des personnes contaminées (<http://www.ecdc.eu.int/index.html>). Outre leur incidence sur le pronostic vital, les infections nosocomiales rallongent la durée d'hospitalisation des malades. Les malades concentrent les microorganismes pathogènes d'autant plus qu'ils peuvent être immunodéprimés ou exposés à divers dispositifs invasifs (sondes, cathéter, ...).

Parmi ces infections nosocomiales, les infections urinaires représentent 27% des contaminations, les infections respiratoires 24%, les infections post-opératoires 17%, les bactériémies nosocomiales 10,5% (ECDC, 2008). A l'intérieur des établissements de soins, les services les plus touchés sont la réanimation avec des proportions moyennes de l'ordre de 30 % de personnes infectées, la chirurgie (de 7 % à 9 % selon le type). De plus, il a été rapporté que 60 à 70% des infections nosocomiales sont liées à l'implantation de dispositifs médicaux (les cathéters veineux centraux, les sondes urinaires, les prothèses orthopédiques, les valves cardiaques artificielles, les dispositifs intra-utérins, les sondes endotrachéales et les lentilles de contact) (Donlan, 2001a ; Donlan et Costerton, 2002 ; Bryers, 2008). Parmi les bactéries pathogènes identifiées dans ces infections figure *S. aureus* qui est impliqué dans 32 à 44% des infections cutanées et des tissus mous, dans 20 à 25% des pneumonies et dans 19 à 25% des bactériémies (Diekema *et al.*, 2001). Plus globalement, selon les données de l'enquête Raisin (Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales) de prévalence des infections nosocomiales réalisée en 2006 en France, *S. aureus* est responsable d'environ 19% des infections nosocomiales.

Comme mentionné précédemment, ce pathogène est capable de former des biofilms aussi bien sur les surfaces biotiques de l'hôte que sur les matériaux abiotiques des dispositifs médicaux (PTFE, silicone, latex, polymères). Le conditionnement de la surface des dispositifs médicaux par les fluides du corps du patient (sang, sécrétions bronchiques,...) favorise la formation de biofilms une fois le dispositif implanté (Sousa *et al.*, 2011). Ainsi en France, il y aurait 1 à 2 % des 100 000 prothèses de hanche et de genoux qui s'infecteraient suite à une contamination par des Staphylocoques organisés en biofilms. Comme mentionné précédemment, l'antibiothérapie ne sera pas ou peu opérante sur ces biofilms prothétiques. La guérison passera donc par le retrait obligatoire de la prothèse et l'excision des tissus infectés. Aux USA, près de 5 pour 1000 cathéters veineux posés conduisent à une infection staphylococcique. Ce développement de biofilms infectieux sur les cathéters causerait environ 10 000 morts et coûterait plus de 11 milliards de dollars.

II.5. Comment survient l'infection à *S. aureus* à l'hôpital ?

Il existe quatre grands modes de transmission :

- **L'auto-infection** : le malade s'infecte avec ses propres microorganismes, les « portes d'entrée » étant les lésions des muqueuses, les lésions cutanées (plaies, brûlures, maladies de peau). Ce mécanisme est favorisé par différents facteurs, tels que la dissémination des pathogènes du patient dans son environnement (comme par exemple le lit), l'utilisation de traitement pouvant altérer l'immunocompétence (corticostéroïdes, immunosuppresseurs...), l'administration de traitements sélectionnant certaines bactéries (antibiothérapie à spectre large...).

- **L'hétéro-infection**: dans ce cas, le microorganisme responsable de l'infection nosocomiale provient d'un autre malade, la transmission étant le plus souvent manuportée par le personnel soignant intervenant auprès de plusieurs patients, disséminant ainsi les pathogènes d'une personne à l'autre.

- **La xéno-infection** : dans ce cas, les agents pathogènes sont transmis par des personnes venant de l'extérieur (personnel soignant, visiteurs, sous-traitants), et présentant eux-mêmes une pathologie infectieuse, déclarée ou en cours d'incubation.

- **L'exo-infection** : ce mode de transmission inclut un dysfonctionnement technique d'un matériel (filtre à air, autoclave...) normalement destiné à la protection des patients. Ce matériel ne remplit plus son office, et laisse le patient en contact avec des microorganismes (aspergillose, légionellose, etc.) qui devraient, en principe, être détruits. L'exo-infection peut aussi être la conséquence d'une erreur commise dans l'exécution des procédures de traitement du matériel médico-chirurgical.

Au-delà de tous les facteurs qui viennent d'être décrits, c'est l'émergence, la concentration et la persistance de « super-bactéries » insensibles à la plupart de notre arsenal clinique (multi-résistance aux antibiotiques) qui font trembler nos hôpitaux. Ainsi 52% des *S. aureus* impliqués dans une infection nosocomiale seraient résistants à la méticilline. L'antibiothérapie serait-elle une impasse thérapeutique ?

III. Antibiothérapie : une impasse thérapeutique ?

III.1. L'antibiothérapie

Une antibiothérapie peut être **préventive**, pour éviter par exemple la surinfection des plaies des grands brûlés ou le développement d'infection postopératoire après un acte chirurgical, ou **curative** pour éradiquer un agent pathogène responsable d'une infection déjà localisée. Qu'est ce qu'un antibiotique ? C'est une molécule antimicrobienne, actuellement définie comme un médicament, qui détruit (effet bactéricide) ou bloque (effet bactériostatique) la croissance des microorganismes. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée (Kohanski *et al.*, 2010). Dans tous les cas, les concentrations thérapeutiques d'antibiotiques sont définies de sorte à limiter la toxicité chez l'hôte (Cerf *et al.*, 2010).

Le choix de l'antibiotique est basé sur la gravité de l'infection et sur les résultats de l'antibiogramme réalisé en laboratoire d'analyse qui renseigne sur le spectre de sensibilité de la souche bactérienne aux antibiotiques. Cette sensibilité est déterminée par la mesure de la **Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique entraînant une inhibition de toute croissance bactérienne visible en 24 heures (Lambert et Pearson, 2000 ; CA-SFM, 2003). Expérimentalement, différentes techniques permettent d'estimer les CMI dans les laboratoires d'analyses médicales selon les procédures imposées par les normes nationales et internationales (Woods et Yam, 1988; Keel *et al.*, 2010). Il est à noter que selon le protocole adopté (densité de l'inoculum bactérien, temps d'incubation des bactéries en présence de l'antibiotique, etc...) les résultats obtenus peuvent varier de manière significative pour le même couple antibiotique-souche bactérienne (Schuurmans *et al.*, 2009). Pour homogénéiser les méthodes et les valeurs de CMI mesurées entre les différents pays Européens, l'Europe s'est dotée en 2002 d'un organisme fédéral : l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

En fonction de leur mode d'action les antibiotiques sont classés en :

- antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne ;
- antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique ;
- antibiotiques inhibant la synthèse des protéines ;
- antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques.

Cette classification est complétée en tenant compte de la structure chimique des antibiotiques tels que les fluoroquinolones, les glycopeptides, etc...) (tableau 2) (Kohanski *et al.*, 2010).

Tableau 2 : Différentes molécules d'antibiotiques et leur cible (d'après Kohanski *et al.*, 2010). (Tableau reproduit avec la permission de l'éditeur Macmillan Ltd : Nature Reviews Microbiology, Kohanski *et al.*, 2010).

Drug type	Drug	Derivation	Species range	Primary target	Pathways affected
Fluoroquinolones*					
DNA synthesis inhibitor	Nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin and gemifloxacin	Synthetic	Aerobic Gram-positive and Gram-negative species, some anaerobic Gram-negative species (<i>C. perfringens</i>) and <i>M. tuberculosis</i>	Topoisomerase II (DNA gyrase), topoisomerase IV	DNA replication, SOS response, cell division, ATP generation, TCA cycle, Fe-S cluster synthesis, ROS formation, and envelope and redox-responsive two-component systems
Trimethoprim-sulfamethoxazole					
DNA synthesis inhibitor	Co-trimoxazole (a combination of trimethoprim and sulfamethoxazole in a 1:5 ratio)	Synthetic	Aerobic Gram-positive and Gram-negative species	Tetrahydrofolic acid synthesis inhibitors	Nucleotide biosynthesis and DNA replication
Rifamycins					
RNA synthesis inhibitor	Rifamycins, rifampin and rifapentine	Natural and semi-synthetic forms of ansamycins (derived from <i>S. mediterranei</i>)	Gram-positive and Gram-negative species, and <i>M. tuberculosis</i>	DNA-dependent RNA polymerase	RNA transcription, DNA replication and SOS response
β-lactams*					
Cell wall synthesis inhibitors	Penicillins (penicillin, ampicillin, oxacillin), cephalosporins (cefazolin, cefoxitin, ceftriaxone, cefepime) and carbapenems (imipenem)	Natural and semi-synthetic forms of carbonyl lactam ring-containing azetidione molecules (from <i>P. notatum</i> , <i>C. acremonium</i> and <i>S. cattleya</i>)	Aerobic and anaerobic Gram-positive and Gram-negative species	Penicillin-binding proteins	Cell wall synthesis, cell division, autolysin activity (regulated by LytSR-VncRS two-component system), SOS response, TCA cycle, Fe-S cluster synthesis, ROS formation, and envelope and redox-responsive two-component systems
Glycopeptides and glycolipopeptides					
Cell wall synthesis inhibitor	Vancomycin; teicoplanin	Natural and semi-synthetic forms of amino sugar-linked peptide chains (for glycopeptides) or of fatty acid-bearing, amino sugar-linked peptide chains (for glycolipopeptides) derived from actinobacteria	Gram-positive species	Peptidoglycan units (terminal D-Ala-D-Ala dipeptide)	Cell wall synthesis, transglycosylation, transpeptidation and autolysin activation (VncRS two-component system)
Lipopeptides					
Cell wall synthesis inhibitors	Daptomycin and polymyxin B	Natural and semi-synthetic forms of fatty acid-linked peptide chains (from <i>S. roseosporus</i> and <i>B. polymyxa</i>)	Gram-positive species (daptomycin), Gram-negative species (polymyxins)	Cell membrane	Cell wall synthesis and envelope two-component systems
Aminoglycosides					
Protein synthesis inhibitors	Gentamicin, tobramycin, streptomycin and kanamycin	Natural and semi-synthetic forms of amino sugars (-mycins from <i>Streptomyces</i> spp. and -micins from <i>Micromonospora</i> spp.)	Aerobic Gram-positive and Gram-negative species, and <i>M. tuberculosis</i>	30S ribosome	Protein translation (mistranslation by tRNA mismatching), ETC, SOS response, TCA cycle, Fe-S cluster synthesis, ROS formation, and envelope and redox-responsive two-component systems
Tetracyclines					
Protein synthesis inhibitors	Tetracycline and doxycycline	Natural and semi-synthetic forms of four-ringed polyketides (from <i>S. aureofaciens</i> and <i>S. rimosus</i>)	Aerobic Gram-positive and Gram-negative species	30S ribosome	Protein translation (through inhibition of aminoacyl tRNA binding to ribosome)
Macrolides					
Protein synthesis inhibitors	Erythromycin and azithromycin	Natural and semi-synthetic forms of 14- and 16-membered lactone rings (from <i>S. erythraea</i> and <i>S. ambofaciens</i>)	Aerobic and anaerobic Gram-positive and Gram-negative species	50S ribosome	Protein translation (through inhibition of elongation and translocation steps) and free tRNA depletion

Drug type	Drug	Derivation	Species range	Primary target	Pathways affected
Streptogramins					
Protein synthesis inhibitors	Pristinamycin, dalbapristin and quinupristin	Natural and semi-synthetic forms of pristinamycin I (group B, macrolactone ringed-peptides) and pristinamycin II (group A, endolactone oxazole nucleus-bearing depsipeptides) (from <i>Streptomyces</i> spp.)	Aerobic and anaerobic Gram-positive and Gram-negative species†	50S ribosome	Protein translation (through inhibition of initiation, elongation and translocation steps) and free tRNA depletion
Phenicols					
Protein synthesis inhibitor	Chloramphenicol	Natural and semi-synthetic forms of dichloroacetic acid with an aromatic nucleus and aminopropanediol chain (from <i>S. venezuelae</i>)	Some Gram-positive and Gram-negative species, including <i>B. fragilis</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> and <i>S. pneumoniae</i>	50S ribosome	Protein translation (through inhibition of elongation step)

Récemment, Kohanski *et al.* ont proposé un mécanisme d'action qui pourrait être commun à tous les antibiotiques bactéricides (Kohanski *et al.*, 2007); l'antibiotique créerait un stress oxydatif délétère chez la bactérie hôte (Gram+ et Gram-) tel qu'illustré figure 8. D'après ce modèle, l'altération de l'activité métabolique des bactéries pourrait modifier leur sensibilité aux antibiotiques (Martinez et Rojo, 2011).

En fonction des types d'infection et du profil du patient (immunodéprimé, polytraumatisé, allergique, etc...) plusieurs stratégies thérapeutiques peuvent être déployées. Prenons le cas de notre souche d'étude, *S. aureus*, l'antibiothérapie initiale prescrite pourra être basée sur des β -lactamines (amoxicilline, oxacilline,...) associées ou non à un aminoglycoside généralement la gentamicine (tableau 2). Si le patient présente des allergies aux β -lactamines telles les pénicillines, d'autres antibiotiques peuvent être prescrits de type fluoroquinolones par exemple. Dans le cas où la souche de *S. aureus* est résistante à la méticilline (voir ci-après), l'antibiotique de choix prescrit sera un glycopeptide (vancomycine ou teicoplanine) associé ou non à un autre antibiotique de type lipopeptide (daptomycine, autorisée aux Etats-Unis et en France) ou de type rifamycine (rifampicine, ...) (Domart, 2002).

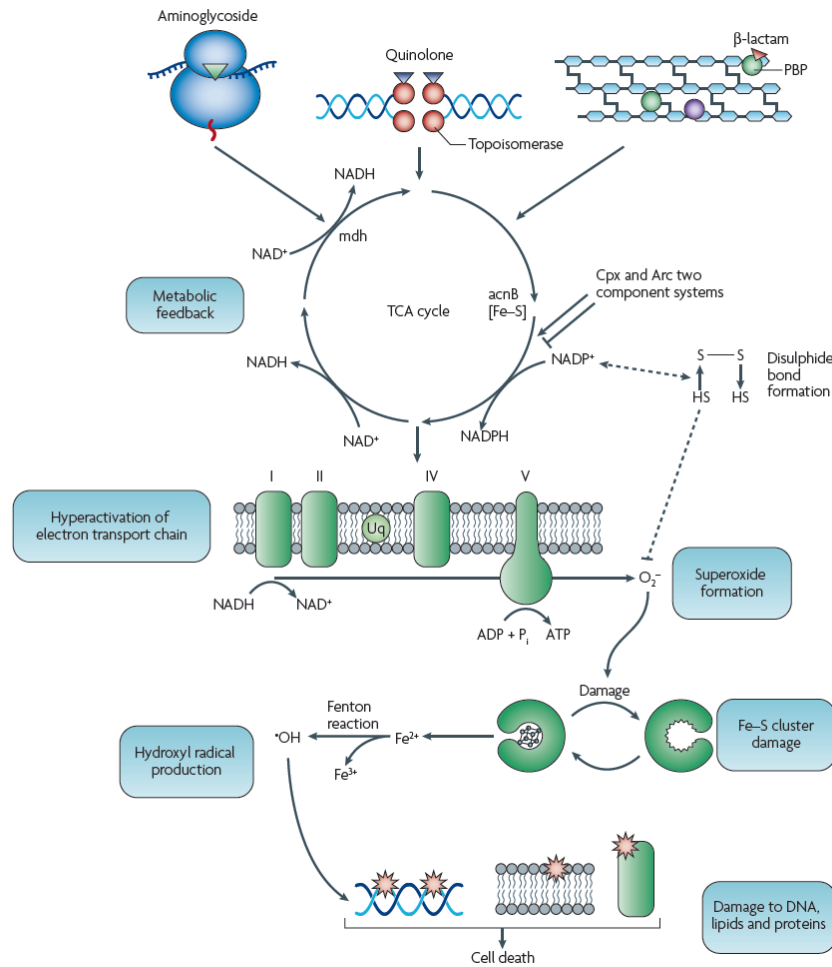


Figure 8 : Modèle montrant le mécanisme commun induisant la mort cellulaire par des antibiotiques bactéricides (Kohanski et al., 2010). L'interaction primaire de l'antibiotique avec sa cible stimule l'oxydation du NADH via la chaîne de transport d'électrons qui est dépendante du cycle TCA. L'hyperactivation de la chaîne de transport d'électrons stimule la formation du superoxyde (O_2^-) qui endommage à son tour les clusters fer-soufre. L'endommagement de ces clusters a comme résultat la libération du fer ferreux (Fe^{2+}) qui sera oxydé par la réaction Fenton. Les radicaux hydroxyles libres générés endommagent l'ADN, les protéines et les lipides de la cellule bactérienne et causeraient la mort cellulaire. (Figure reproduite avec la permission de l'éditeur Macmillan Ltd : Nature Reviews Microbiology, Kohanski et al., 2010).

III.2. Résistance des bactéries à l'action des antibiotiques

De par la nature des bactéries (Gram+, Gram -, ...) et des cibles spécifiques des antibiotiques (enveloppes, ribosomes, ADN,..) toutes les bactéries ne sont pas sensibles à toutes les classes d'antibiotiques (aussi appelée résistance naturelle aux antibiotiques). De plus, la plasticité du génome des bactéries peut générer une résistance acquise. Celle-ci peut résulter de mutations spontanées au niveau du génome ou de l'acquisition de gènes exogènes

de résistance situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmide, transposon) (Davison *et al.*, 2000). Ces derniers peuvent être transmis à une espèce ou à un genre bactérien différent (transfert horizontal) (Davies et Webb, 1998). L'utilisation abusive et inappropriée d'antibiotiques depuis des décennies a induit l'émergence de bactéries résistantes (Otto, 2004) telles que *S. aureus* vis-à-vis de la méticilline.

Trois mécanismes de résistance principaux concernent la plupart des espèces bactériennes, y compris *S. aureus*. Ces mécanismes concernent (Jayaraman, 2009) :

- le transport de l'antibiotique à travers l'enveloppe de la bactérie,
- la synthèse d'enzymes inactivant l'antibiotique,
- la modification structurale de la cible de l'antibiotique.

III.2.1. Transport transmembranaire de l'antibiotique

Chez tous types de bactéries à paroi Gram+ ou Gram-, des modifications de l'enveloppe (rigidification, épaissement,...) selon les processus décrits ci-dessus, peuvent inhiber la pénétration des antibiotiques et donc les rendre inactifs. Par exemple, chez les souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine, cela correspond à une surproduction de peptidoglycane riche en résidus D-alanine-D-alanine qui piègent la vancomycine à la surface de la bactérie et l'empêche d'atteindre sa cible d'activité au niveau du septum de la cellule en division (Lowy, 2003 ; Cui *et al.*, 2006). Plus spécifiquement, pour les bactéries à paroi Gram négatif qui possèdent une membrane externe, il existe à leur niveau des pompes d'efflux qui favorise l'éjection de l'antibiotique hors de la cellule. Le système d'efflux le mieux étudié chez *E. coli* correspond au système AcrAB/TolC (Normark et Normark, 2002).

III.2.2. Synthèse d'enzymes inactivant l'antibiotique

L'exemple classique décrivant ce mécanisme de résistance correspond à l'action des enzymes β -lactamases qui désactivent les antibiotiques de la famille des β -lactamines en clivant le cycle β -lactame. Environ 90% des souches de *S. aureus* résistent aux pénicillines par la production d'une pénicillinase, produit de l'expression du gène *blaZ* d'origine plasmidique ou porté par un transposon, et dont l'expression n'est induite qu'en présence de la pénicilline (Lowy, 2003). L'oxacilline (pénicilline M) est insensible à l'action des pénicillinases par la présence d'un radical chimique encombrant sur son cycle β -lactame. Le mécanisme de résistance aux aminoglycosides est également d'origine enzymatique, comme

par exemple l'aminoglycoside phosphotransférase qui inactive la néomycine, la kanamycine et partiellement l'amikacine ou l'enzyme adényltransférase qui inactive la kanamycine, la tobramycine et partiellement l'amikacine.

III.2.3. Modification structurale de la cible de l'antibiotique

La modification structurale de la cible de l'antibiotique est sans aucun doute le processus le plus largement impliqué dans la résistance des bactéries aux antibiotiques (perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible). L'exemple médiatique du monde hospitalier est celui des souches de *S. aureus* Résistant à la Méricilline (SARM). Dans ce cas d'école, l'expression d'une nouvelle protéine PLP (Protéine Liant les Pénicillines), la PLP2a, confère à *S. aureus* une résistance à tous les antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines (Chambers et DeLeo, 2009). Cette modification protéique est liée à l'acquisition du gène *mecA* à partir d'un élément mobile.

Récemment, il a été montré que des souches de *S. aureus* étaient aussi résistantes à la vancomycine en raison d'une substitution du dipeptide D-alanine-D-alanine par le dipeptide D-alanine-D-lactate. Cette résistance reste rare et pourrait provenir d'un transfert de plasmide portant l'opéron *vanA* de résistance à la vancomycine rencontré précédemment chez des souches d'*Enterococcus faecalis* (Showsh *et al.*, 2001).

On rencontre également une résistance aux traitements des infections Staphylococciques à la rifampicine, liée à une mutation au niveau du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. Le taux de mutation élevé ($\sim 10^{-7}$) nécessite d'associer la rifampicine à un autre antibiotique afin d'éviter la sélection de souches résistantes. La résistance à la rifampicine a été essentiellement observée chez des souches SARM (environ 30% des souches) (Dupont, 2000). D'autres antibiotiques sont concernés par ce mécanisme de résistance tels que : les MLSs (Macrolides, Lincosamides, Streptogramines) et le linézolide.

Le traitement des infections cutanées par l'acide fusidique, un inhibiteur de la synthèse protéique (fixation au facteur d'élongation EF-G empêchant la liaison des aminoacyl-ARNt), peut aussi être inefficace à cause d'une mutation du gène chromosomique *fusA* codant pour le facteur EF-G (O'Neill *et al.*, 2007b).

III.3. L'émergence des « super bactéries »

Comme il vient d'être décrit, *S. aureus* est un pathogène ayant développé de nouveaux mécanismes de résistance corrélativement au développement de nouvelles molécules d'antibiotiques (Chambers et DeLeo, 2009). Les premiers cas cliniques ont été rapportés dès l'utilisation de la pénicilline G (années mille neuf cent quarante). La première souche SARM a été identifiée en milieu hospitalier dès 1961 en Grande-Bretagne. L'émergence de souches SARM en communauté (en dehors de l'hôpital), différentes des clones SARM isolés en milieu hospitalier est aussi constatée au début des années 1990 (Chambers et DeLeo, 2009). L'incidence des souches SARM est beaucoup moins importante dans les pays localisés au nord de l'Europe (Danemark, Estonie, Finlande, Islande, Pays-Bas, Norvège et la Suède) avec une incidence de moins de 5%, exception faite de la Grande-Bretagne et de l'Irlande (incidence ~ 25%) que dans les pays du sud de l'Europe: au Portugal, l'incidence des souches SARM dépasse les 50% (ECDC, 2010).

La vancomycine apparaissait alors comme un antibiotique de choix pour traiter les infections impliquant des SARM. Cependant, un VISA (Vancomycin Intermediate *S. aureus*) a été isolé en 1996 simultanément dans différents pays (Japon, France, Etats Unis, Grande Bretagne, Brésil, Chine, Allemagne, Afrique du Sud, Grèce). Plus préoccupant encore, en 2002, une première souche VRSA (Vancomycin Resistant *S. aureus*), résistante à tous les antibiotiques de type glycopeptides a été identifiée dans les hôpitaux aux Etats-Unis, en France et en Angleterre.

L'émergence de souches présentant un phénotype de résistance croisée (« super bactéries »), résistantes à plusieurs antibiotiques appartenant à la même famille (Arias *et al.*, 2009) est devenue le sujet de préoccupation des organismes de surveillance comme l'EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) (EARSS, 2005). Ces souches résistantes aux antibiotiques sont isolées du sang ou du liquide céphalorachidien (EARSS, 2005). Leur résistance aux antibiotiques est due à un seul mécanisme, ce qui a comme conséquence la sélection croisée : n'importe quel antibiotique de la classe peut sélectionner des bactéries résistantes à toutes les molécules (Courvalin, 2008), cas par exemple des souches appartenant à la famille des Entérobactéries telles qu'*E. coli* et *Klebsiella*, productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), capables d'hydrolyser un grand nombre d'antibiotiques de la famille des β -lactamines. Ces souches sont éradiquées par l'imipénème,

mais récemment certaines d'entre elles ont développé des mécanismes de résistance à cet antibiotique par la production d'une enzyme dénommée carbapénémase ou par l'expression de porines qui bloquent l'entrée de l'antibiotique dans la cellule (Arias *et al.*, 2009). Autre exemple à citer, la résistance aux fluoroquinolones chez *Streptococcus pneumoniae* par des mutations au niveau des enzymes, topoisomérase de type II, gyrase et topoisomérase de type IV.

Cette situation est devenue plus compliquée avec l'apparition (i) de phénotype de résistance croisée « étendu », ce qui signifie que les souches bactériennes deviennent résistantes à des antibiotiques appartenant à différentes familles, par un seul mécanisme de résistance tel que l'expression de pompes d'efflux qui peuvent affecter plusieurs classes d'antibiotiques comme les quinolones, les aminoglycosides et les tigécyclines (Arias *et al.*, 2009) ou (ii) de phénotype de co-résistance (résistance à plusieurs classes d'antibiotiques) qui est dû à l'expression de plusieurs mécanismes de résistance (Courvalin, 2008). Environ 14% des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des cas de bactériémies présentent une résistance croisée aux céphalosporines de 3^{ème} génération, aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides (ECDC, 2010). D'autres espèces bactériennes sont concernées : *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes et à d'autres classes d'antibiotiques, *Enterococcus* résistant à la vancomycine et aux aminoglycosides (Arias *et al.*, 2009 ; ECDC, 2010).

III.4. Le biofilm face aux antibiotiques

Comme décrit précédemment, la persistance des infections chroniques même en présence d'une antibiothérapie et d'un système immunitaire actif, peut être due à l'émergence de phénomènes de résistance bactérienne. Il faut aussi prendre en considération le cas où les bactéries s'organisent spatialement pour former des biofilms (Fux *et al.*, 2005 ; Bjarnsholt *et al.*, 2005).

La notion de «résistance» des biofilms aux antibiotiques mérite d'être clarifiée. En effet, une souche bactérienne est définie comme étant résistante si sa croissance n'est pas inhibée à une concentration critique (CMI) d'antibiotique généralement observée pour la majorité des souches de l'espèce considérée. Les cellules d'un biofilm sont quant à elles décrites comme résistantes par comparaison avec leurs homologues planctoniques. Par ailleurs, il est parfois plus exact de parler de tolérance plutôt que d'une véritable «résistance» lorsque le mécanisme

impliqué est de nature phénotypique (adaptation des cellules à la vie en biofilm) et donc réversible (les bactéries revenues à l'état planctonique retrouvent leur sensibilité initiale). Le terme de résistance devrait être restreint à des mécanismes génétiquement transmissibles. Cependant, il est rarement possible d'identifier la nature de l'insensibilité aux antibiotiques des bactéries incluses en biofilms; c'est la raison pour laquelle on privilégie le terme générique de « résistance des biofilms ». Il est aujourd'hui bien établi que la résistance des biofilms à l'action des agents antimicrobiens est multifactorielle.

III.4.1. Adaptation phénotypique des cellules incluses dans un biofilm

Du fait de l'hétérogénéité des biofilms, le microenvironnement des cellules peut être excessivement variable à travers l'épaisseur de la biomasse : les zones les plus profondes sont le plus souvent caractérisées par une atmosphère appauvrie en oxygène voire anaérobie (Walters III *et al.*, 2003 ; Anderl *et al.*, 2000 ; Rani *et al.*, 2007) et les nutriments y sont moins disponibles (Anderl *et al.*, 2000 ; Zheng et Stewart, 2004 ; Martinez et Rojo, 2011 ; Allison *et al.*, 2011). Ces conditions locales d'environnement gouvernent l'hétérogénéité physiologique des cellules du biofilm, facteur très fréquemment invoqué pour expliquer la résistance aux antimicrobiens (Stewart et Costerton, 2001). Il a ainsi été montré une stratification de l'activité métabolique dans des biofilms de *S. epidermidis* (Rani *et al.*, 2007), les cellules les plus actives se trouvant principalement à l'interface entre le biofilm et le fluide externe. Le faible métabolisme des cellules des couches les plus profondes (« slow growth cells ») est par exemple proposé pour expliquer l'insensibilité des biofilms aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (qui agissent sur les cellules en division) (Gilbert et Brown, 1998 ; Fux *et al.*, 2004 ; Fux *et al.*, 2005). A l'inverse, une autre étude d'intérêt a permis de mettre en évidence que des antibiotiques peuvent aussi agir spécifiquement sur ces cellules « slow growth » tel que représenté sur la figure 9 (Pamp *et al.*, 2008).

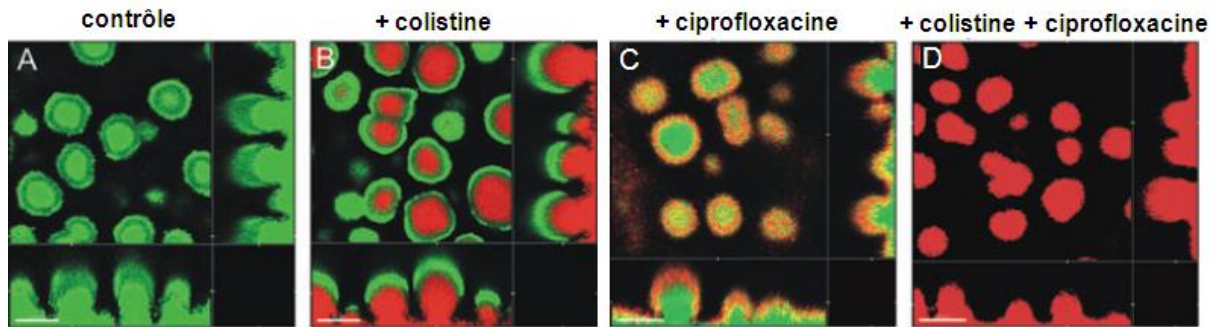


Figure 9 : Biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 Gfp de 4 jours cultivés en conditions dynamiques, présentant deux sous-populations qui ont une sensibilité différente à la colistine (25 µg/ml) et à la ciprofloxacine (60 µg/ml). Les cellules mortes sont marquées en rouge par l'iodure de propidium. (A) Biofilm contrôle qui fait apparaître des structures bactériennes denses appelées structures en champignons. (B, C) La sous-population proche de la surface des structures en champignons formée de cellules actives, caractérisées par un métabolisme aérobie, est résistante à la colistine mais sensible à la ciprofloxacine alors que celle qui est localisée en profondeur composée de cellules moins actives est sensible à la colistine et résistante à la ciprofloxacine. (D) Le biofilm est sensible à l'association des deux antibiotiques (Pamp *et al.*, 2008). (Figure adaptée avec la permission de l'éditeur « John Wiley and Sons » : Molecular Microbiology, Pamp *et al.*, 2008).

La présence de cellules « persisters » dans les biofilms est une idée proposée par Lewis pour expliquer la tolérance des biofilms aux antibiotiques (Lewis, 2008). Ces « persisters » représentent une sous-population très minoritaire de bactéries hyper-résistantes dont la proportion dépend de l'état physiologique des cellules (Keren *et al.*, 2004) mais dont la physiologie reste encore mal définie. Lorsque ces « persisters » survivants à l'action d'un antibiotique, sont remis en culture on recouvre un biofilm sauvage ce qui démontre que cette hyper-résistance n'est pas liée à un mécanisme génétique (Brooun *et al.*, 2000 ; Lewis, 2007 ; Singh *et al.*, 2009). La présence de « persisters » a été démontrée dans des biofilms de *S. aureus* après traitement par différentes molécules d'antibiotiques telles que : l'oxaciline, la céfotaxime, l'amikacine, la ciprofloxacine et la vancomycine (Singh *et al.*, 2009). Ainsi, ces « persisters » pourraient être à l'origine de l'occurrence d'infections chez l'homme (figure 10).

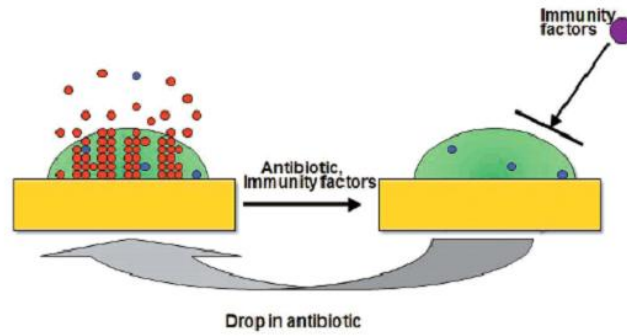


Figure 10 : Modèle d'une infection récurrente due à la formation d'un biofilm (d'après Lewis, 2008). L'antibiotique tue les cellules bactériennes (rouge) du biofilm et le système immunitaire élimine les « persisters » (bleu) qui se trouvent à l'état planctonique. Les persisters inclus dans la matrice d'exopolymères du biofilm sont quant à eux protégés de l'action de l'antibiotique et du système immunitaire. Lorsque la concentration d'antibiotique diminue, ces cellules « persisters » se multiplient pour former un nouveau biofilm responsable de la récurrence de l'infection. (Figure reproduite avec la permission de l'éditeur « Springer » : Current Topics in Microbiology and Immunology, Lewis, 2008).

La régulation génétique liée au système de communication Quorum sensing (défini précédemment) pourrait aussi contribuer aux phénomènes de résistance. En effet, il a été montré que lorsque l'on réalise des mutations de gènes impliqués dans le système Quorum sensing, on peut changer la sensibilité d'un biofilm vis-à-vis d'un antibiotique. Par exemple, un biofilm d'une souche mutante Δ lasR/hlR de *P. aeruginosa* est plus sensible à la tobramycine qu'un biofilm de la souche sauvage correspondante (Bjarnsholt *et al.* 2005).

D'autres adaptations phénotypiques très particulières des bactéries incluses dans des biofilms et étant susceptibles d'induire une résistance aux antibiotiques sont décrites dans la littérature. L'une concerne l'implication de l'ADN extracellulaire (ADNe) contenu dans la matrice d'exopolymères de biofilms de *P. aeruginosa*. En raison de sa très forte concentration, l'ADNe chélate massivement les ions cationiques Mg^{2+} du biofilm : il en résulte une baisse importante de la concentration de ces cations qui pourrait déclencher la réponse de régulateurs impliqués dans la synthèse des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane cellulaire et induire la tolérance des biofilms aux polymyxines (Mulcahy *et al.*, 2008).

Un autre exemple concerne la synthèse d'enzymes spécifiques inactivant certains antibiotiques. Il est rapporté que les bactéries incluses dans des biofilms de *P. aeruginosa* pouvaient produire des β -lactamases qui inactivent les antibiotiques de la famille des

β -lactamines (tableau 2) (Anderl *et al.*, 2000 ; Gilbert et Brown, 1998), dont la synthèse pourrait être spatialement hétérogène (Bagge *et al.*, 2004a ; 2004b).

III.4.2. Mutations et transferts génétiques

Durant le développement d'un biofilm, des cellules mutantes (ou variantes) peuvent émerger. Elles résultent de délétion, mutation ou polymorphisme d'un nucléotide simple dans divers gènes codant pour des facteurs impliqués dans la synthèse de polysaccharides, la morphologie cellulaire ou la résistance aux antibiotiques. Ces cellules mutées forment des colonies sur boîte de Pétri (petites colonies variantes (SCVs), colonies rugueuses, etc..) qui peuvent se distinguer du reste de la population. Un lien entre l'apparition de ces variants génétiques et le développement d'infections chroniques persistantes aux antibiotiques a pu être établi (von Eiff *et al.*, 2006 ; Sendi et Proctor, 2008). Des SCVs ont été isolées à partir de biofilms de *S. aureus* provenant notamment de sécrétions des patients atteints de mucoviscidose (Goerke et Wolz, 2010), de prélèvements de malades atteints d'ostéomyélite chronique (Rolauffs *et al.*, 2002) et de prothèses orthopédiques contaminées et explantées (Rolauffs *et al.*, 2002 ; Sendi et al., 2006). Ces SCVs sont résistants à plusieurs antibiotiques par comparaison aux souches de *S. aureus* originelles (Proctor *et al.*, 1995 ; Sendi *et al.*, 2006).

La proportion de ces variants peut être augmentée au sein des biofilms en raison des multiples pressions de sélection qui s'y exercent. On citera en exemple, le cas des biofilms se développant chez des patients atteints de mucoviscidose, dans lesquels plusieurs espèces bactériennes, en particulier *S. aureus* et *P. aeruginosa*, co-existent. Certains métabolites sécrétés par *P. aeruginosa* (pyocyanine, cyanide d'hydrogène, LasA endopeptidase staphylolytique, N-oxide de quinoline,...) et toxiques pour *S. aureus* favorisent la sélection de SCVs de *S. aureus* tolérantes à cette pression de sélection (Voggu *et al.*, 2006 ; Qazi *et al.*, 2006 ; Biswas *et al.*, 2009) et résistantes en particulier à l'action des aminoglycosides (Hoffman *et al.*, 2006).

III.4.3. Le biofilm, une barrière à la diffusion des antibiotiques ?

La structure et la composition de la matrice d'exopolymères produite par les cellules du biofilm incitent tout naturellement à proposer que cette biomasse pourrait jouer un rôle de barrière à la diffusion et être aussi un facteur responsable de la résistance aux antibiotiques. L'existence d'interactions électrostatiques entre la matrice d'EPS et l'antibiotique peut

affecter sa libre pénétration dans un biofilm. Ce phénomène a été mis en évidence pour les aminoglycosides, polycationiques, (exp. tobramycine) qui interagissent de manière électrostatique avec les alginates polyanioniques de la matrice d'EPS de biofilms modèles de *P. aeruginosa* (Nichols *et al.*, 1988). Il se crée alors un gradient de concentration de l'antibiotique dans l'épaisseur de la biomasse jusqu'à atteindre des concentrations inférieures aux CMI dans la profondeur du biofilm (Nichols *et al.*, 1988).

Les propriétés visco-élastiques de la matrice d'EPS peuvent aussi être un frein à la pénétration des antibiotiques. C'est le critère évoqué pour expliquer la résistance à la vancomycine de biofilms hypermucoïdes obtenus à partir de variants de *S. aureus* (Jefferson *et al.*, 2005) : la diffusion ralentie de l'antibiotique due à la viscosité importante du milieu environnant, conduit à une exposition des bactéries à une concentration sublethale de l'agent antimicrobien et permet ainsi aux cellules une adaptation physiologique progressive.

L'hétérogénéité structurale de la matrice du biofilm (présence d'amas cellulaires denses, présence de canaux aqueux, etc.) peut aussi induire une inhomogénéité de son irrigation par l'antibiotique. Ainsi les cellules sont localement exposées à des concentrations variables d'antibiotiques pouvant être sub-inhibitrices.

En résumé, si les infections chroniques liées à des bactéries libres sont bien identifiées, celles se développant au sein de biofilms demeurent largement moins connues et pas assez prises en compte en milieu hospitalier. C'est à cette problématique que nous nous sommes attachés dans le cadre de ce travail de thèse.

CHAPITRE II

L'imagerie de fluorescence pour l'étude *in situ* des biofilms

Comme nous venons de le décrire, il reste beaucoup à comprendre sur la réactivité des biofilms pour mettre au point des moyens efficaces de leur éradication surtout lorsqu'ils sont pathogènes. C'est un défi majeur d'une recherche pluri- et interdisciplinaire (microbiologie, biologie, physique, chimie, physico-chimie, biomédecine, etc.) qui génère ainsi des synergies extrêmement fécondes entre les chercheurs. Grâce à elles, nous disposons aujourd'hui de concepts et de méthodologies qui permettent d'apporter des explications aux niveaux moléculaire et cellulaire de processus qui étaient auparavant abordés essentiellement à l'échelle macroscopique.

I. L'imagerie des biofilms

Si l'on évalue les méthodologies utilisées, on peut constater que les techniques de microscopie sont les plus largement répandues car elles constituent des moyens performants d'investigation en terme de résolution spatiale et/ou temporelle. A partir des années 1980, la microscopie électronique à balayage (SEM) a permis l'observation de la structure des groupements de bactéries et de composés exocellulaires constitutifs des biofilms. La présence de biofilms sur des dispositifs médicaux a également pu être révélée par SEM (Fux *et al.*, 2009). Les méthodes SEM ou TEM (microscopie électronique à transmission) sont hautement performantes en terme de résolution spatiale (Lawrence *et al.*, 2003 ; Branda *et al.*, 2005) en permettant de détailler la composition élémentaire des biofilms adhérents à une surface. L'inconvénient majeur de ces méthodes est de nécessiter une déshydratation et une métallisation des échantillons, ce qui peut induire une déformation de l'architecture du biofilm par rapport à sa configuration hydratée. Or pour la majorité des questions biophysico-chimiques qui se posent, il est indispensable de pouvoir suivre la dynamique réactionnelle et structurale des biofilms en conditions natives. Dans ce champ d'applications, les techniques en émergence depuis une dizaine d'années telle la microscopie par force atomique (AFM), l'imagerie par résonance magnétique (MRI) et la microscopie en transmission de rayons X (STXM) sont des outils d'étude d'intérêt. L'AFM permet plus spécifiquement d'étudier la topographie des surfaces bactériennes et plus récemment les interactions moléculaires de surface (Wright *et al.*, 2010). Elle a été utilisée pour mesurer les forces d'interaction des molécules antibiotiques avec leur cible biologique, cas par exemple de la vancomycine avec le dipeptide D-alanine-D-alanine (Gilbert *et al.*, 2007). Les méthodes MRI et STXM ont fait l'objet d'une revue récente (Neu *et al.*, 2010) et s'appliquent particulièrement pour l'étude des

propriétés du transport d'éléments chimiques (ions, oxygène,...) dans les biofilms. Elles permettent également d'imager la distribution de biomolécules (protéines, acides nucléiques, polysaccharides et lipides) et d'ions dans l'espace intercellulaire à l'échelle de la bactérie unique.

La renaissance de la microscopie de fluorescence observée depuis l'avènement du microscope confocal à balayage laser (CLSM) (Minsky, 1961) en fait aujourd'hui encore l'outil de choix pour les études en milieux vivants. Elle permet de détecter, quantifier et fournir des signaux aussi bien des composants naturels des systèmes biologiques (acides aminés, collagène, NAD(P)H, flavines oxydées, porphyrines,..) que des sondes extrinsèques (marqueurs d'entités cellulaires, d'ions, désinfectants, antibiotiques, etc.) aussi bien pour une localisation spécifique que pour une investigation de l'espace tridimensionnel des biostructures. La CLSM est devenue une méthode d'analyse de routine dans de nombreux laboratoires de microbiologie. Dès le début des années quatre vingt dix, Lawrence *et al.* ont montré pour la première fois les avantages de la CLSM pour l'étude de l'architecture de biofilms hydratés, en imageant des coupes optiques microniques dans l'épaisseur de biofilms de *Pseudomonas sp.* et de *Vibrio sp.* (Lawrence *et al.*, 1991). Depuis, les outils d'imagerie de fluorescence (microscopes, sources d'excitation et de détection, nouveaux marqueurs, logiciels de traitement d'images...) ne cessent d'évoluer permettant d'acquérir des images 6D (x-y-z-t- λ -anisotropie) et de suivre ainsi la dynamique réactionnelle depuis quelques picosecondes et à l'échelle de quelques nanomètres comme nous le décrirons dans la partie II de ce chapitre. L'apport du traitement d'images est aussi considérable avec la possibilité non seulement de visualiser l'architecture 3D des biofilms mais aussi de quantifier les constituants de ces biostructures, leur biovolume, etc. (Neu *et al.*, 2010 ; Haagensen *et al.*, 2011).

L'utilisation de la méthode CLSM pour l'étude des biofilms est déjà largement documentée et concerne principalement les aspects suivants :

- La formation des biofilms : Ce processus multi-étapes tel que décrit précédemment et schématisé (figure 11), a été établi à partir d'un biofilm modèle de *P. aeruginosa* où les cellules ont été modifiées génétiquement pour exprimer la protéine fluorescente verte, GFP (Kjelleberg *et al.*, 2007). Il est aussi possible de marquer les bactéries avec un marqueur fluorescent de la gamme Syto (marqueurs des acides nucléiques de chez Molecular Probes) (Stewart, 2008). Les processus d'évolution spatiale de la structure des biofilms peuvent être

suivis dans le temps pendant des heures par la méthode CLSM (Lakins *et al.*, 2009). La construction de la matrice d'exopolymères peut également être observée grâce à l'utilisation de lectines marquées avec un fluorophore qui se lient spécifiquement à des résidus polysaccharidiques (Ma *et al.*, 2009).

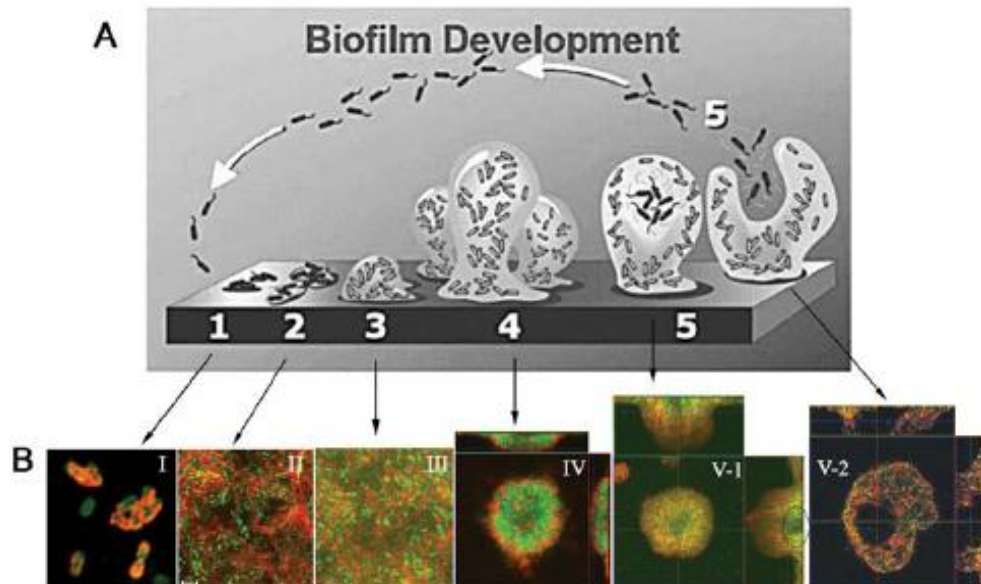


Figure 11 : Evolution de la matrice d'exopolymères et de la structure spatiale du biofilm de *P. aeruginosa*. (A) Schéma montrant les cinq étapes de formation d'un biofilm. (B) Les images correspondant à chaque étape du développement du biofilm. Le polysaccharide Psl de la matrice d'exopolymères est marqué en rouge. Les cellules exprimant la GFP fluorescent en vert. (Ma *et al.*, 2009). (Figure extraite de PLoS Pathogens, Ma *et al.*, 2009, en accès libre).

- **L'hétérogénéité structurale des biofilms** : La méthode CLSM permet d'analyser la diversité structurale entre biofilms (plats, en forme de champignons, ...) (Bridier *et al.*, 2010). Il est également possible d'accéder à l'hétérogénéité au sein d'un même biofilm en utilisant des marqueurs spécifiques de chacun de ses composants. On peut ainsi mesurer des profils d'activité métabolique ou de viabilité tel que décrit figure 12 (Rani *et al.*, 2007 ; Haagenen *et al.*, 2007 ; Bridier *et al.*, 2011). La localisation d'espèces bactériennes d'intérêt au sein d'un biofilm complexe est quant à elle accessible par la technique FISH (fluorescence *in situ* hybridization). Le principe est basé sur l'utilisation de sondes d'oligonucléotides marquées avec un fluorophore et qui se fixent spécifiquement à l'ARN ou l'ADN (Dige *et al.*, 2007). Comme mentionné ci-dessus, en plus des lectines spécifiques aux exopolysaccharides, il existe des sondes pour visualiser les protéines de la matrice d'exopolymères (Ma *et al.*, 2009)

(Di Poto *et al.*, 2009). Les poches d'ADN extracellulaire peuvent être également détectées par l'utilisation de l'iodure de propidium.

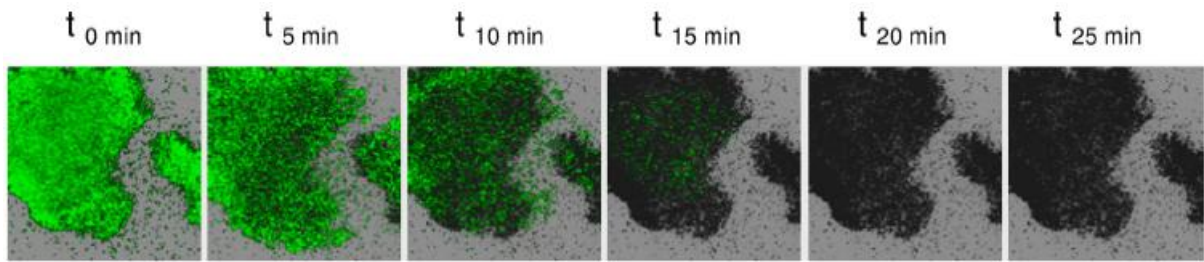


Figure 12 : Visualisation de la perte de fluorescence du marqueur V6 Chemchrome au sein d'un biofilm d'une souche clinique de *P. aeruginosa* à différents temps après traitement avec le désinfectant chlorure de benzalkonium (BAC). La perte de la fluorescence correspond à la perte de l'intégrité membranaire des cellules (Bridier *et al.*, 2011). (Figure adaptée avec la permission de l'éditeur «American Society for Microbiology» : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Bridier *et al.*, 2011).

Aujourd'hui, ces mesures par imagerie d'intensité de fluorescence de la structure des biofilms sont complétées par des études *in situ* de la dynamique moléculaire de diffusion-réaction au moyen de différentes méthodes décrites ci-après.

II. L'imagerie de fluorescence dynamique

Les récentes études des processus de diffusion-réaction dans les structures tridimensionnelles des biofilms utilisent des méthodes de la dynamique d'imagerie de fluorescence non-invasives, ultrasensibles et performantes en termes de résolution spatiale (jusqu'à l'échelle sub-micrométrique) et temporelle tel que schématisé ci-dessous (figure 13).

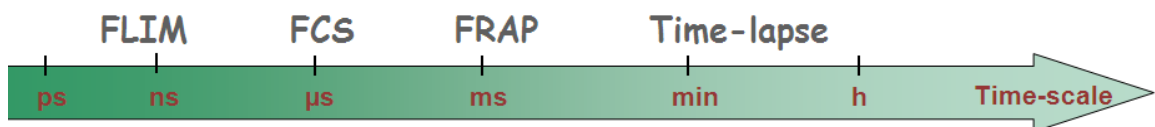


Figure 13 : Schéma de la résolution temporelle des différentes techniques : Time-lapse, FRAP, FCS et FLIM.

L'apport de ces méthodes pour la compréhension de la dynamique réactionnelle des biofilms fait l'objet de l'article 1 suivant. Chacune d'elles sera ensuite détaillée plus précisément.

II.1. Article 1 : Deciphering Biofilm Structure and Reactivity by Multiscale Time-Resolved Fluorescence Analysis

Article reproduit avec la permission de l'éditeur « Springer » : Springer eBook. Bridier *et al.*, *Advances in Experimental medicine and Biology* 715: 333-49 (2011).

Chapter 21

Deciphering Biofilm Structure and Reactivity by Multiscale Time-Resolved Fluorescence Analysis

Arnaud Bridier, Ekaterina Tischenko, Florence Dubois-Brissonnet,
Jean-Marie Herry, Vincent Thomas, Samia Daddi-Oubekka,
François Waharte, Karine Steenkeste, Marie-Pierre Fontaine-Aupart,
and Romain Briandet

Abstract In natural, industrial and medical environments, microorganisms mainly live as structured and organised matrix-encased communities known as biofilms. In these communities, microorganisms demonstrate coordinated behaviour and are able to perform specific functions such as dramatic resistance to antimicrobials, which potentially lead to major public health and industrial problems. It is now recognised that the appearance of such specific biofilm functions is intimately related to the three-dimensional organisation of the biological edifice, and results from multifactorial processes. During the last decade, the emergence of innovative optical microscopy techniques such as confocal laser scanning microscopy in combination with fluorescent labelling has radically transformed imaging in biofilm research, giving the possibility to investigate non-invasively the dynamic mechanisms of formation and reactivity of these biostructures. In this chapter, we discuss the contribution of fluorescence analysis and imaging to the study at different timescales of various processes: biofilm development (hours to days), antimicrobial reactivity within the three-dimensional structure (minutes to hours) or molecular diffusion/reaction phenomena (pico- to milliseconds).

21.1 Microbial Biofilms in Our Environment

Biofilms have a considerable impact on human existence and well-being because of their involvement in various beneficial ecological phenomena (Singh et al., 2006). Moreover, the ability of microbes to perform specific chemical reactions in surface associated consortia can be used to produce energy (Yadvika et al., 2004; Cournet et al., 2010). Nevertheless, bacterial communities are involved in a large number of detrimental processes such as biofouling or biocorrosion (Beech et al., 2005), and

R. Briandet (✉)
INRA, UMR 1319 MICALIS, Massy, France
e-mail: romain.briandet@jouy.inra.fr

in infectious diseases such as periodontitis, endocarditis, cystic fibrosis pneumonia and most hospital-acquired infections (Costerton et al., 1999). This phenomenon can be explained by the high resistance of biofilm-dwelling cells to antimicrobial agents (Mah and O'Toole, 2001), which enables pathogens to persist on medical devices or industrial equipment, leading thus to critical problems in terms of public health. Although the precise mechanisms of resistance remain unclear, it appears to be a multifactorial process directly or indirectly related to the architectural features of multicellular bacterial edifices. The depletion of active antimicrobial agents in the bulk of biofilm due to diffusion and/or reaction limitations (Huang et al., 1995; Campanac et al., 2002) illustrates the vital role of the shape of the matrix in the resistance of such communities. The biofilm matrix is also known to play a key role in protection against the human innate immune system by decreasing phagocytosis, for example (Vuong et al., 2004). In addition, the development of a complex three-dimensional (3D) biofilm architecture results in the appearance of nutrient and oxygen gradients. These lead to differential gene expression and specific physiological activities throughout the biofilm in response to local microenvironmental conditions (Stewart, 2003; Rani et al., 2007). Consequently, the emergence of phenotypic variants in biofilm subpopulations contributes to the expression of novel community functions such as tolerance to antimicrobial stress, which can increase population fitness (Lewis, 2005; Stewart and Franklin, 2008).

Until now, biofilm imaging has concentrated on identifying and understanding the sequence of events leading to biofilm formation and its structure (Lakins et al., 2009). Specifically, it is now appreciated that biofilm formation can be defined as a process that consists of defined stages including: reversible and irreversible attachment; surface motility and initiation of the formation of microcolonies or other arrangements; maturation, ageing and differentiation of microcolonies; and finally, biofilm dissolution and generation of specialised dispersal cells (Kjelleberg et al., 2007). Numerous studies have shown that this biological process involves a coordinated spatio-temporal expression of adhesion, motility, matrix or cell death genes in response to micro-environmental conditions and signalling molecules (Rieu et al., 2007; Vlamakis et al., 2008). The regulated death of bacterial cells in biofilms constitutes an important component of multicellular development and a telling example of temporal and spatial regulation (Bayles, 2007). In *B. subtilis* biofilms for example, Lopez et al. (2009) showed that matrix-producing cells exhibit cannibalistic behaviour by producing toxins that lyse a part of the population. The nutrients released are preferentially consumed by the surviving matrix-producing subpopulation as they are the only cells expressing resistance to toxins. This phenomenon leads to increase of matrix production and thus favours biofilm formation. The authors showed that this coordinated mechanism may constitute a defense mechanism of *B. subtilis* in adverse conditions. In *Pseudomonas aeruginosa*, some cells in the centre of the microcolonies undergo prophage-mediated autolysis, providing nutrients to the remaining cells that can disseminate and colonise novel ecological niches (Webb et al., 2003; Rice et al., 2009). Moreover, most dispersed cells exhibit specific phenotypes that are associated with increased resistance to environmental stress and higher virulence (Hall-Stoodley and Stoodley, 2005). Both these

competitive or altruistic behaviours are deleterious at the single-cell level, but benefit the global community fitness, demonstrating that biofilm typically results from a balance between these two social behaviours (Dunny et al., 2008; Nadell et al., 2009). It is important to consider that, even if most experimental studies are performed on single species models, biofilms usually contain multiple bacterial species, fungi, viruses and protozoa. This diversity increases the complexity of the relationships between dwelling organisms and can lead to the emergence of specific traits (Hansen et al., 2007).

The functional properties of biofilms therefore result from the complex spatial and temporal differentiation of cells in the dynamic three-dimensional structure in response to environmental signals and cell-cell interactions. The development of tools enabling in-situ observation of dynamic processes within biofilms is required to improve our understanding of biofilm traits and to develop advanced control strategies. Recent developments in confocal laser scanning microscopy (CLSM), and new fluorescent molecules and protein reporters allowing the labelling of specific matrix components or cell states, have deepened our knowledge of biofilms. These new tools allow researchers to explore non-invasively the dynamic architectural and physiological evolution in the three-dimensional structure of biofilms (Palmer and Sternberg, 1999). In this chapter, we review the use of fluorescence imaging for the study of biofilm structure and reactivity at different timescales. We first present the contribution of the method to analyse the 3D architecture and development of the biofilm (hours to days). We then discuss the use of fluorescence in monitoring biocide activity in biofilms by 4D imaging (minutes to hours). Finally, we describe the use of FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) and FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) in insitu molecular diffusion/reaction studies in biofilms (picoseconds to minutes).

21.2 From Free Cells to 3D Organised Multicellular Architecture

21.2.1 Laboratory Biofilms Assays

In laboratories, different devices are used to produce biofilms: we only present here the most commonly used systems in live-cell imaging studies. Two types of systems, “dynamic” or “static”, can be distinguished.

In “dynamic” systems such as flow-cells, biofilms are formed under the flow of medium, which enables continuous renewal of nutrients. This kind of device enables the elimination of planktonic cells by the flow and is particularly well adapted to the monitoring of biofilm development in “real time” using fluorescent strains and CLSM (Pamp et al., 2009). Different flow-cell designs exist, varying according to the number and the dimension of channels, as well as the nature of the base. One major drawback of these systems is the cumbersome and expensive nature of the growth protocol, which does not allow the screening of many samples. Furthermore, the difficulty of standardising biofilm growth in flow-cells and the weak control of

hydrodynamic parameters can limit the repeatability between different experiments or laboratories.

In “static” systems, biofilms are produced without any flow and thus result from the multiplication of attached cells on the surface and also partially from the sedimentation of the planktonic fraction. Static systems also suffer from a lack of standardisation, in particular in the key step of rinsing that can severely affect the biofilm 3D structure.

Using microtiter plates, many high-throughput static assays have been developed to quantify biofilm formation in a large number of strains (Peeters et al., 2008). These methods are very useful for screening mutants and identifying the genes involved in biofilm formation and maintenance, but they do not provide structural information. Recently, a method based on a microtiter plate compatible with high resolution imaging by CLSM was proposed to overcome this limitation (Bridier et al., 2010). The ability of some species to form a floating pellicle at the air-liquid interface or complex macrocolonies on agar can also be exploited to identify developmental steps and genes required in biofilm formation (Branda et al., 2005; Enos-Berlage et al., 2005).

The choice of growth protocol is a critical step in biofilm study because it greatly influences biofilm formation and architecture: this has been clearly illustrated by Yarwood et al. (2004), who demonstrated that mutating a gene involved in *Staphylococcus aureus* biofilm formation had opposing effects depending on the system (microtiter plate, rotating disk reactor or flow-cell).

21.2.2 CLSM for Multi-dimensional Biofilm Fluorescence Imaging

As mentioned previously, most of what makes microbial cells in a biofilm different from their planktonic counterparts is their multicellular spatial organization. The analysis of such structure/function relationships has considerably evolved during the last decade, in line with technical advances in microscopy. To gain access to in situ observations, much effort has been directed toward photonic microscopy associated with the fluorescent labelling of biofilm elements. Hence, in conventional widefield fluorescence microscopy, the biofilm is illuminated by a cone of light, thus obtaining almost uniform sample excitation and fast image acquisition. The drawback is poor depth resolution due to the collection of light coming from regions of the sample located at different depths. Practically, it means that only very thin biofilms (close to a monolayer in structure) can be adequately observed. Deconvolution can in some cases allow 3D imaging enhancement in such systems (Conchello and Lichtman, 2005).

The emergence of CLSM has radically transformed biofilm optical imaging, and in particular allows the analysis of thick biofilms. Due to the introduction of a “pinhole” in the path of the fluorescence light emitted by the sample, only the fluorescence coming from the focal plane reaches the detector and the contribution

of out-of-focus light is eliminated. This optical sectioning ensures a submicron resolution compatible with observation of a single bacterium within the biofilm. It is also now possible to add two other dimensions to these image stacks: time (t) for 2D or 3D dynamics analysis, and wavelength (λ) for spectral imaging, for example to unmix multi-fluorescent labels or subtract interference from a fluorescent background. Therefore, the introduction of CLSM has led to considerable progress in studying the architecture, physiology and molecular interactions within the biofilm without prior chemical fixation (in situ observations in aqueous medium).

The widespread use of lasers has led to the emergence of new methods, including approaches based on nonlinear optics. Hence, the limited depth penetration of CLSM can be overcome by employing two-photon laser scanning microscopy (2PLSM). Experimentally, two-photon excitation of the fluorescent molecule is obtained by the quasi-simultaneous absorption of two photons of half the energy of the photons used in CLSM (Vroom et al., 1999), typically using near-infrared lasers (Neu et al., 2010; Lakins et al., 2009).

These laser microscopy methods are constantly evolving to improve both image acquisition rate (fast confocal spinning-disk microscopes, multiphoton multifocal microscopy; Deniset-Besseau et al., 2007) and spatial resolution, for instance: structured illumination, total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF), stimulated emission depletion microscopy (STED), photoactivation localisation microscopy (PALM), stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) and 4pi microscopy. Researchers involved in the study of biofilms may benefit from these new developments in fluorescence microscopy.

The extensive use of CLSM in biofilm research is also intrinsically related to the development of dedicated specific fluorophores. Available fluorophores allow visualisation of different components of the biofilms, of individual cells and their local physiology or patterns of gene expression, or of the organic matrix and the existence of heterogeneous microdomains.

The analysed fluorescence can come either from fluorescent labels incorporated into the biofilm or from the microorganism. The main requirement is that it is a good fluorophore: i.e. that it has high brightness (product of fluorescence quantum yield and molar extinction coefficient ϵ) and suitable photostability.

The most widespread methods of fluorescent labelling of biofilm components are:

- Indicators of microbial membrane integrity, e.g. Live/dead stain (Pamp et al., 2008).
- Indicators of metabolic activity markers, e.g. Calcein AM (Takenaka et al., 2008).
- Fluorescent lectins to label extracellular polysaccharides, e.g. concanavalin A (Neu et al., 2001).
- Fluorescent in situ hybridisation (FISH) for identification of community members within complex biofilms (Amann et al., 1990).
- Expression of fluorescent proteins from the microbial genome: green fluorescent protein (GFP) has proven to be a powerful method to study in vivo gene expression in a broad range of hosts (Veening et al., 2004).

21.2.3 Time-Course Structural Analysis of Events Leading to Biofilm Formation

Tracking of the time-course of biofilm construction was pioneered in the last decade by the Tolken-Nielsen group on *P. aeruginosa* biofilms grown in flow-cells (Tolker-Nielsen et al., 2000; Klausen et al., 2006). The ideal situation for non-destructive time-course biofilm imaging is to grow bacterial cells expressing fluorescent reporter protein(s) for the biofilm assay on a transparent substratum compatible with in situ CLSM observation (i.e. flowcells or dedicated microtiter plates). In this configuration, it is possible to record 4D image series (3D images as a function of time) of the same microscopic field and to trace in “real time” the multicellular assemblage as a movie. This approach was used to identify the molecular determinants involved in biofilm construction. The experimental method compares the sequence of events involved in the formation of a wild type biofilm

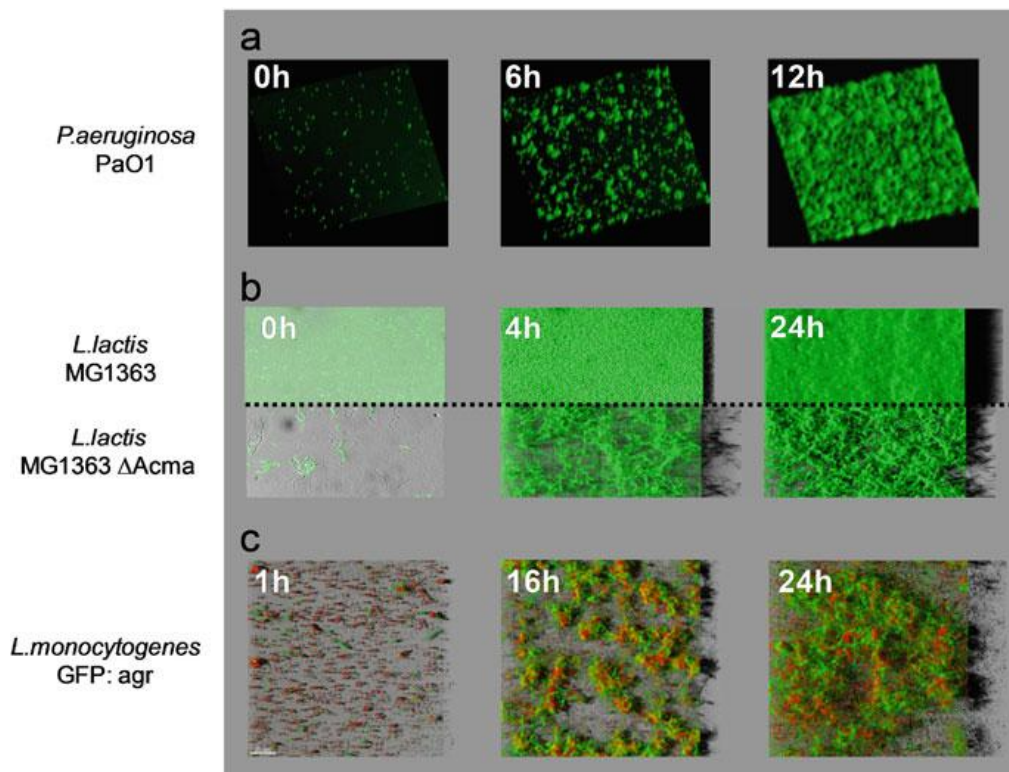


Fig. 21.1 3D reconstruction of biofilm development under flowing conditions from confocal image series. (a) Structural development of GFP-tagged *Pseudomonas aeruginosa* PaO1 biofilm using time-lapse CLSM. (b) Time-course CLSM of GFP-tagged WT *Lactococcus lactis* MG1363 (top) and its cell wall mutant, Δ acmA (inactivation of N-acetyl glucosaminidase) (bottom). The mutation leads to the development of cell chains forming a biofilm with different architectural properties than wild-type. Adapted from Habimana et al. (2009). (c) Sequence illustrating the spatiotemporal regulation of *agr* expression during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. Green indicates cells expressing GFP from the reporter plasmid pGID128, which contain a fusion of the *agr* promoter region with *gfp*. The red cells are stained with the nucleic acid SYTO61 dye (cells in red lacks *agr* activity). Adapted from Rieu et al. (2008)

with the sequence of events in a series of mutants. Using this scheme, it has been possible for example to identify the involvement of F plasmid, pilus and putative membrane proteins in *E. coli* biofilms (Beloin et al., 2004; May and Okabe, 2008), and the involvement of exopolysaccharide synthesis in *Lactococcus lactis* biofilms (Habimana et al., 2009).

As the understanding of biofilm complexity increases, “simple” descriptive architectural studies are being replaced by those in which the three-dimensional organization of the biofilm is related to other information, such as species composition, relationship with substrate or physiology (Palmer and Sternberg, 1999). Indeed, most studies of gene expression by bacteria in biofilms described levels that reflect the average gene expression over the entire population (Lenz et al., 2008). CLSM associated with fluorescent reporter fusions has recently been used to trace the spatio-temporal expression of specific genes at the single cell level in the overall biofilm structure. The approach has shown that some genes are specifically expressed on the interfacial layers of the biofilm (Lenz et al., 2008; Ito et al., 2009; Rieu et al., 2008), while others are expressed in more specific patterns, such as the *agr* system implicated in quorum sensing regulation in *Staphylococcus aureus* biofilms, which is expressed in patches within cell clusters and where the expression oscillates with time (Yarwood et al., 2004). Some examples of biofilm structural dynamics are presented in Fig. 21.1.

21.3 Real Time 3D Visualization of Biofilm Inactivation by Antimicrobials

The latest surge of interest in biofilms was triggered by the observation of their unprecedented microbial tolerance to antimicrobial agents e.g. antibiotics or biocides. Previous studies suggested that biofilm resistance is clearly multifactorial, and only a combination of different mechanisms could account for the observed resistance levels in biofilm communities (Anderson and O’Toole, 2008). Exopolymeric matrix can serve as a protective environment. For example, the activity of an antibiotic on mucoid *P. aeruginosa* biofilms can be significantly enhanced by addition of alginate lyase and DNAase, suggesting that alginate and extracellular DNA function as antibiotic barriers (Alipour et al., 2010; Harmsen et al., 2010). The heterogeneity of cell physiology within the biofilm matrix due to oxygen and nutrient gradients can also constitute a protective phenotype (Xu et al., 1998; Stewart and Franklin, 2008). In addition, regulated cell differentiation, collective coordinated behaviour and inter-cellular genetic exchange can contribute to the resistance of biofilm cells to antimicrobial stress. As a result, there is particular interest in developing biocides able to overcome such tolerance.

Conventional methods to study biofilm inactivation, such as bacterial enumeration on agar plates, are time-consuming, static and incompatible with structural observations. Therefore, the development of fast (minutes to hours), dynamic and non-destructive methods is required. Non-invasive direct time-lapse microscopic observation of biofilm viability was pioneered by Hope and Wilson (2004). Cells

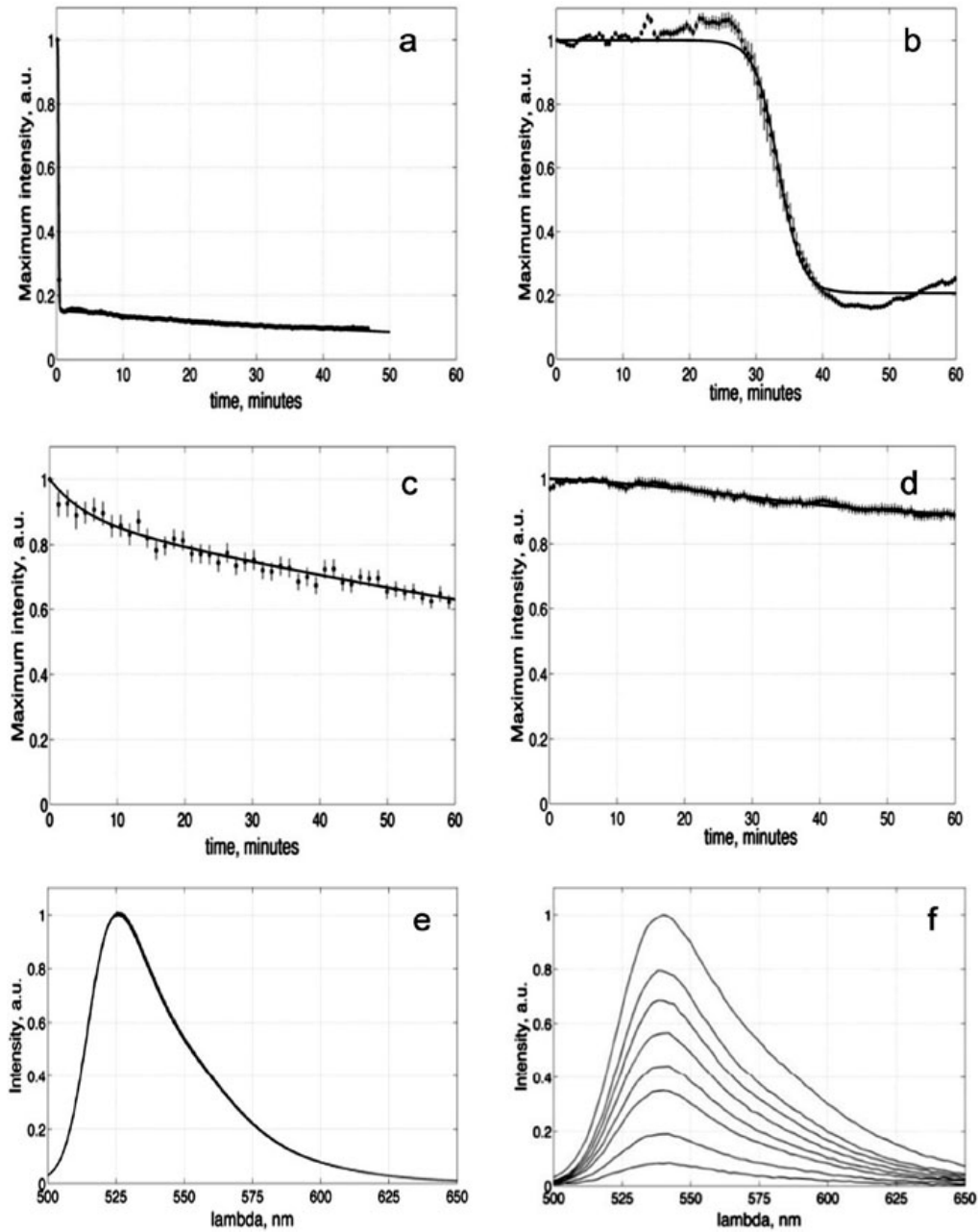


Fig. 21.2 Dynamics of *Staphylococcus aureus* biofilm inactivation by (a) 0.3% Peracetic Acid; (b) 0.05% C14-benzalkonium chloride; (c) 0.03% O-phthaldialdehyde and (d) saline solution. Fluorescent intensity of ChemChrome V6 is integrated over the image and normalized to the maximal value. Each *curve* represents the evolution of the mean fluorescent intensity of biofilm during biocide treatments. Dynamic profiles obtained illustrate the different modes of action of the three biocides tested. Fluorescent spectra ChemChrome V6 during: (e) C14-benzalkonium chloride and (f) 0.3% Peracetic acid action. Time between subsequent measurements (*curves*) is 5 min. Results show the loss of fluorescence intensity of the marker in presence of PAA showing an interaction between the two molecules. There was no interaction between ChemChrome V6 and the other biocides tested, as shown for C14-benzalkonium chloride as example

were visualised with the commercial BacLight Live/Dead kit (Invitrogen) composed of DNA-intercalating dyes, which is widely used for the time-independent measurements of bacterial membrane integrity. Later, the Stewart group (Takenaka et al., 2008) further improved the method by using the esterase activity marker Calcein-AM, which meets the basic requirements for cell viability tagging, i.e. it is stable and it efficiently tags the intracellular space in live cells without any changes in morphology or physiology of the cells and bacterial community structure. There is another essential requirement for “direct time-lapse microscopic observation”: either the marker should not interact at all with the biocide, or the biocide-marker interactions should be fully understood and subtracted from the observed effect. Focusing on chemical biocides, there is evidence that such strongly reactive molecules and fluorescent dye or its target can interact (Phe et al., 2007). In this case, intracellular fluorescent reporters such as metabolic activity fluorophores are the most relevant. Their foremost advantage is that the marker is already inside cells, and is only affected by biocide after the biocide penetrates the cell or after the marker leaks out.

As an illustration, we measured the time and spatial inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms by three biocides used for disinfection of medical equipment and food processing areas (Fig. 21.2). In the absence of antimicrobials, the cell viability reporter used (esterasic marker V6 ChemChrome, AES Chemunex) stays inside the cell without any noticeable influence on the cell. When the plasma membrane is damaged during disinfection, the fluorophore leaks out of the cell, which allows direct visualization of biocide action within the 3D structure. The profiles of inactivation dynamics obtained underlined the specific mode of action of each biocide tested and enabled a deeper understanding of the treatment limitations. We could determine how well the dynamics of marker fluorescence intensity and biofilm cell inactivation correlate using model systems. For instance, using fluorescent spectroscopy in an in vitro system containing DNA and esterase enzyme to mimic the intracellular environment, we detected a strong biocide-marker interaction only with peracetic acid (PAA) (Fig. 21.2e–f). Consequently, the evolution of the intracellular marker fluorescent intensity under PAA action in biofilm tells us that the contact between marker and antimicrobial agent took place, and thus that the antimicrobial agent at least penetrated the cell. Moreover, the classical cell enumeration on agar was in good agreement with the fluorescent kinetics for the three biocides, including PAA.

CLSM 4D time-lapse experiments allow direct in situ visualization of antimicrobial action throughout the biofilm and the standardization of tools for the selection of active molecules in order to achieve efficient biofilm treatments.

21.4 Understanding the Process of Diffusion-Reaction Within Biofilms

Both the physiological properties of microorganisms and the structure of the extracellular polymeric substances play a crucial role in the reactivity of biofilms towards scattering entities. To analyse the molecular interactions within biofilms, it is

necessary to have non-invasive efficient methods of investigation in terms of spatial resolution, sensitivity and acquisition speed. Besides fluorescence intensity imaging techniques, more advanced fluorescence-based approaches can be implemented for in situ molecular diffusion/reaction studies within “live” biofilms, including FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) and FLIM (Fluorescence Lifetime IMaging).

21.4.1 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

As described previously, time-lapse imaging in CLSM allows following the diffusion of fluorescent molecules in such spatially organised biofilms (Rani et al., 2005; Takenaka et al., 2009). However, this method only allows estimating average and global diffusion coefficients over the macrostructure and ignores its heterogeneity (e.g. water channel, mushroom-like structures).

To measure local diffusion/reaction through a 3D biological structure, FRAP is a simple method that is now routinely implemented on commercial CLSMs (Waharte et al., 2010). FRAP is based on a brief excitation of fluorescent molecules by a very intense light source in the volume defined by the confocal microscope objective (for single spot FRAP) or in a user-defined region to quench their fluorescence (photobleaching) irreversibly (Fig. 21.3a,b). Fluorescence redistribution is then observed if the fluorophores are allowed to move in the sample. The analysis of the time course of fluorescence intensity recovery with proper mathematical models thus gives access to the quantitative mobility of the fluorescent molecules (determination of diffusion coefficient and/or rate of molecular association) (Fig. 21.3a).

FRAP typically requires micromolar concentrations of fluorescent tracers, and consequently gives access only to average diffusion coefficients unlike FCS (see below), potentially masking the effects of local heterogeneity. FRAP is not sensitive enough to detect the motion of a single molecule. Furthermore, the quantification of FRAP measurements requires mathematical models adapted to the experimental conditions and the geometrical/structural configuration of the sample; these difficulties explain why most FRAP studies are essentially based on a qualitative and relative analysis. Recently, an image-based FRAP protocol and its corresponding analysis that can be readily applied by anyone familiar with a CLSM has been published; it improves the accuracy and accessibility of FRAP measurements of molecular diffusion inside bacterial biofilms (Fig. 21.3d,e). The method was supported by an original representation that allows checking the presence of bacterial movement during image acquisition that would alter the measurements (Fig. 21.3c) (Waharte et al., 2010).

21.4.2 Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

FCS, on the other hand, is the most appropriate technique to analyse diffusion/reaction processes within biological entities with single molecule

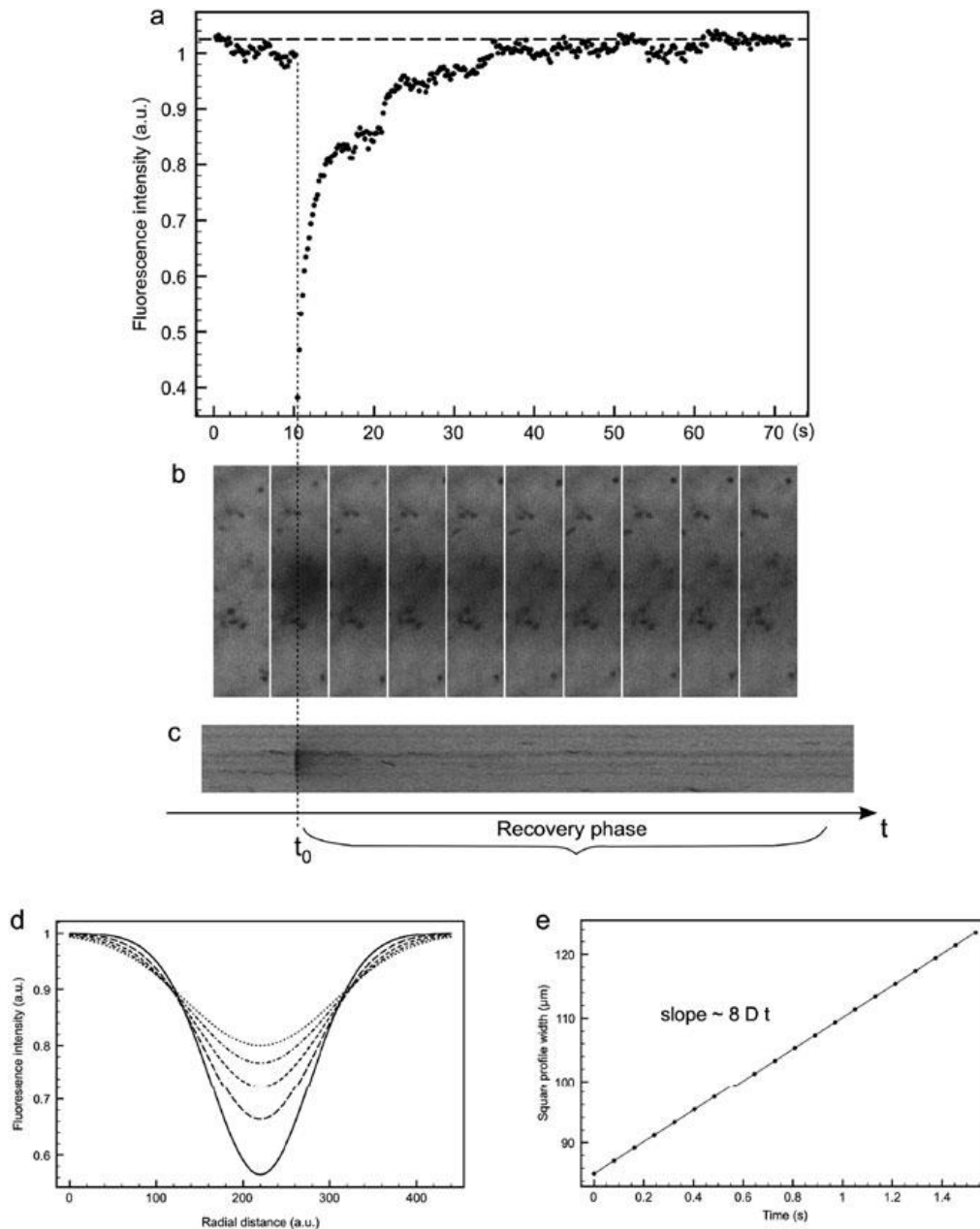


Fig. 21.3 Principle of molecular diffusion measurements in biofilms by FRAP (a) Example of fluorescence recovery curve. The *vertical points* show the start of the recovery phase just after photobleaching. The *horizontal dashed line* shows the initial level of fluorescence to estimate the mobile fraction (100% here). (b) Image sequence taken during the FRAP experiment on a *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm loaded with FITC-dextran. The *dark area* in the centre of the images is the photobleached area. (c) Kymogram representation (intensity along a *vertical centered line* crossing the image for each time point) giving a graphical representation of spatial position over time. (d) Illustration of the evolution of the intensity spatial profile overtime (*dark line* is the initial profile after photobleaching and successive profiles in *dashed lines* with decreasing amplitudes with time). (e) Evolution of the squared intensity profile width with time showing the proportionality of the slope of the graph with the diffusion coefficient (profile analysis)

resolution. FCS is based on monitoring the emission intensity fluctuations due to a small number of molecules passing through the confocal excitation volume. These fluctuations can be quantified in their amplitude and duration by temporally autocorrelating the recorded intensity signal.

The experimental conditions required for this technique (a small number of fluorophores, characterization and control of the excitation volume) explain why FCS was mainly developed after the advent of confocal and two-photon microscopy (excitation volume < 1 fL) and of ultrasensitive new systems for detecting fluorescence photons (photomultipliers, avalanche photodiodes) allowing the use of low fluorophore concentrations (Guiot et al., 2000). Fluorescence intensity fluctuations reflect not only the diffusion of fluorescent molecules through the 3D structure of the biofilm, but also the photophysical and photochemical reactions that quench the fluorescence (charge transfer transition to the triplet state of the molecule), or conformational changes of molecules (molecular complexation, aggregate formation). Thus the FCS signal analysis quantifies a range of reaction parameters on a large time scale from microseconds to several seconds.

In practice, although this method is highly sensitive, has high resolution and is non-invasive, it remains difficult to use and imposes some constraints. In particular, the fluorophores must have high fluorescence quantum yields and low photo-destruction yields. Furthermore, because of the small number of molecules involved, it is often necessary to temporally accumulate the fluorescence signal to obtain a representative statistic of fluctuation correlations with a satisfactory signal to noise ratio. This condition can be greatly improved by the use of two-photon excitation (TPE). The probability of fluorophore excitation by quasi-simultaneous (10^{-16} s delay) absorption of two photons is very low, thus significant TPE only occurs at the objective focal volume where the concentration of photons (also temporally concentrated by the use of femtosecond pulsed lasers) is very high. These properties give TPE microscopy several advantages over one photon excitation microscopy, in particular in a classical confocal setup: (i) intrinsic localisation of the excitation allows fluorescence detection with extremely low background noise and thus easier detection of single molecules, (ii) use of an infrared excitation wavelength (e.g. from a Titanium-sapphire laser) results in greater penetration of biological samples, (iii) photodamage is limited and restricted to the excitation volume and (iv) the excitation volume can easily be characterised and mathematically modelled.

FCS was first explored using homemade equipment and the associated specific know-how. The method has now been adapted to commercial CLSM and TPE setups. Whatever the setup used, FCS has allowed the following of the penetration, diffusion and reaction capabilities of fluorescent probes (latex beads and fluorescein isothiocyanate–dextran) of different sizes and electrical charge (Guiot et al., 2002), of fluorescently stained bacteriophages (Briandet et al., 2008), and of antimicrobial agents in models of static and dynamic biofilms with different EPS density. Steric hindrance and even total inhibition of diffusion have been observed, particularly in areas with a high content of extracellular polymeric substances. Alternative explanations for this were attractive electrostatic interactions between cationic particles and negatively charged bacteria, specific interactions between the diffusing fluorophore

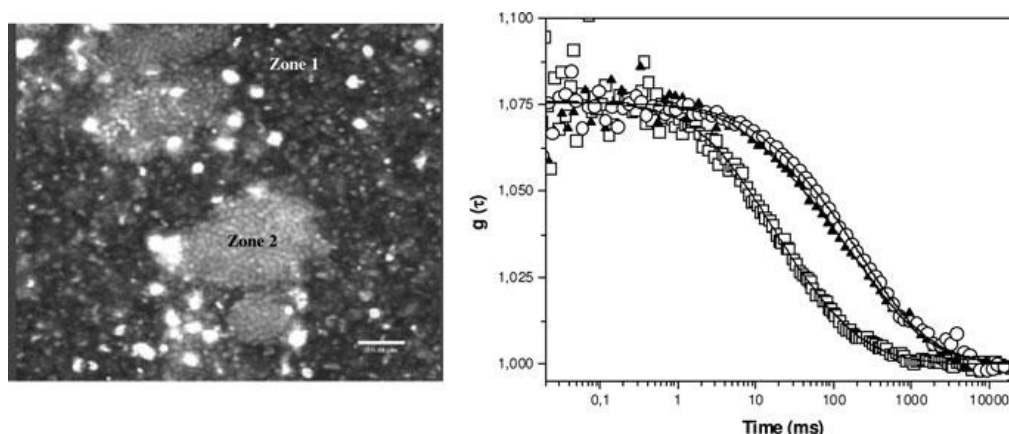


Fig. 21.4 (a) CLSM image of *S. maltophilia* biofilms near the substratum. Zone 1 and zone 2 correspond to homogeneous and heterogeneous parts of the biofilm respectively. Cells were stained with SYTO nucleic acid stain (scale bar = 20 μm). (b) Fluorescence correlation curves ($g(\tau)$) corresponding to c2 bacteriophages stained with sytox green in solution (\square), in zone 1 (\blacktriangle) and zone 2 (\circ) of *S. maltophilia* biofilms. The curve fits (straight lines) were obtained using a two diffusional component equation

and elements in the biofilm (e.g. sugar-matrix interaction, cell envelope and phage) (Fig. 21.4) or antibiotics. Such studies have given a better understanding of the role of the exopolymer matrix as a molecular “reservoir” and of its ability to modulate the transport and interaction of entities within the biofilm.

21.4.3 Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)

FLIM is well-suited for characterising such molecular interaction processes as fluorescence lifetime is an intrinsic property of a fluorophore, independent of its concentration. The fluorescence lifetime of a molecule varies locally depending on its reactivity with the biological environment. It is hence possible to build fluorescence lifetime images that allow assessment of the reactivity of a fluorophore at the molecular level throughout a 3D biological structure such as a biofilm. FLIM was used in biofilm studies to characterise the interaction between sugars in the exopolymeric matrix (Guiot et al., 2002), to probe the local pH (Vromm et al., 1999) and more recently to measure the differentiation of active and inactive bacteria by the estimation of the intracellular RNA:DNA ratio (Walcysko et al., 2008).

21.5 Conclusion

Recent advances in photonic microscopy, fluorophore design and molecular tools have dramatically transformed biofilm experimental analysis by making it possible to explore the dynamic structure and reactivity of these biological edifices non-invasively. The current development of high content screening automated systems

(Bridier et al., 2010), alternative label-free imaging methods such as scanning transmission X-ray microscopy (STXM) and magnetic resonance imaging (MRI) (Neu et al., 2010), and the development of correlative microscopy (Schaudinn et al., 2009) will dramatically improve our understanding of biofilm structure/function relationships, offering new perspectives in the field of biofilm research.

Acknowledgements Funding for our work from the French “Pole de Compétitivité Ile-de-France MEDICEN” is greatly appreciated. AES-Chemunex is warmly acknowledged for providing ChemChrom V6 fluorophore. We thank the “department of Essonne” for financial support of the confocal microscope (ASTRE n° A02137) and the INRA MIMA2 microscopic facilities for CLSM imaging. O. Habimana, P. Latour-Lambert and P. Piveteau are acknowledged for their contribution to image acquisition.

References

- Alipour M, Suntres ZE, Lafrenie RM, Omri A (2010) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor and biofilms by co-encapsulation of bismuth-ethanedithiol with tobramycin in liposomes. *J Antimicrob Chemother* 65:684–693
- Amann RI, Binder BJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial population. *Appl Environ Microbiol* 56:1919–1925
- Anderson GG, O'Tolle GA (2008) Innate and Induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322:85–105
- Bayles KW (2007) The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 5:721–726
- Beech IB, Sunner JA, Hiraoka K (2005) Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *Int Microbiol* 8:157–168
- Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, Haagensen JA, Molin S, Prensier G, Arbeille B, Ghigo JM (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 51:659–674
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13:20–26
- Briandet R, Lacroix-Gueu P, Lecart S, Renault M, Meylheuc T, Bidnenko E, Bellon-Fontaine M-N, Fontaine-Aupart M-P (2008) Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion-reaction of bacteriophages inside bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:2135–2143
- Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R (2010) The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods* 82:64–70
- Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C (2002) Interaction between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agent Chemother* 46:1469–1474
- Conchello J-A, Litchman J (2005) Optical sectioning microscopy. *Nat Methods* 2:920–931
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms, a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322
- Cournet A, Delia M-L, Bergel A, Roques C, Bergé M (2010) Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive. *Electrochem Commun* 12: 505–508
- Deniset-Besseau A, Lévêque-Fort S, Fontaine-Aupart M-P, Roger G, Georges P (2007) Three-dimensional time-resolved imaging by multifocal multiphoton microscopy for a photosensitizer in living cells. *Appl Optics* 46:8045–8051
- Dunny GM, Brickman TJ, Dworkin M (2008) Multicellular behavior in bacteria communication, cooperation, competition and cheating. *BioEssays* 30:296–298

- Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL (2005) Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* 55: 1160–1182
- Guiot E, Enescu M, Arrio B, Johannin G, Roger G, Tosti S, Tfibel F, Mérola F, Brun A, Georges P, Fontaine-Aupart MP (2000) Molecular dynamics of biological probes by fluorescence correlation microscopy with two-photon excitation. *J Fluoresc* 10:413–419
- Guiot E, Georges P, Brun A, Fontaine-Aupart MP, Bellon-Fontaine MN, Briandet R (2002) Heterogeneity of the diffusion inside microbial biofilms using fluorescence correlation microscopy under two-photon excitation. *Photochem Photobiol* 75:570–578
- Habimana O, Meyrand M, Meylheuc T, Kulakauskas S, Briandet R (2009) Genetic features of resident biofilm determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 75:7814–7821
- Hall-Stoodley L, Stoodley P (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 13:7–10
- Hansen SK, Rainey PB, Haagenen JAJ, Molin S (2007) Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* 445:533–536
- Harmen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T (2010) An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:253–268
- Hope CK, Wilson M (2004) Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1461–1468
- Huang CT, Yu FP, McFeters GA, Stewart PS (1995) Non-uniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 61:2252–2256
- Ito A, May T, Taniuchi A, Kawata K, Okabe S (2009) Localized expression profiles of *rpoS* in *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol Bioeng* 103:975–983
- Kjelleberg S, Marshall KC, Givskov M (2007) The biofilm mode of life. In: Kjelleberg S, Marshall KC, Givskov M (eds) *The biofilm mode of life, mechanisms and adaptations*. Horizon Bioscience, Wymondham
- Klausen M, Gjermansen M, Kreft J-U, Tolker-Nielsen T (2006) Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 261:1–11
- Lakins MA, Marrison JL, O'Toole PJ, Van der Woude MW (2009) Exploiting advances in imaging technology to study biofilms by applying multiphotons laser scanning microscopy as an imaging and manipulation tool. *J Microsc* 235:128–137
- Lenz AP, Williamson KS, Pitts B, Stewart PS, Franklin MJ (2008) Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:4463–4471
- Lewis K (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry* 70:267–274
- Lopez D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2009) Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 74:609–618
- Mah T-F C, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9:34–39
- May T, Okabe S (2008) *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and curli. *J Bacteriol* 190:7479–7490
- Nadell CD, Xavier JB, Foster K (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 33:206–224
- Neu TR, Manz B, Volke F, Dynes JJ, Hitchcock AP, Lawrence JR (2010) Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol Ecol* 72:1–21
- Neu TR, Swerhone GDW, Lawrence JR (2001) Assessment of lectin binding analysis for *in situ* detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology* 147:299–313
- Palmer RJ, Sternberg C (1999) Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr Opin Biotechnol* 10:263–268

- Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T (2008) Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 68:223–240
- Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T (2009) Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* 75:90–103
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72:157–165
- Phe MH, Dossot M, Guilloteau H, Block JC (2007) Highly chlorinated *Escherichia coli* cannot be stained by propidium iodide. *Can J Microbiol* 53:664–670
- Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Buckingham-Meyer K, Stewart PS (2007) Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 189:4223–4233
- Rani SA, Pitts B, Stewart PS (2005) Rapid diffusion of fluorescent tracers into *Staphylococcus epidermidis* biofilms visualized by time lapse microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 49:728–732
- Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M, Hauser A, McDougald D, Webb SA, Kjelleberg S (2009) The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J* 3:271–282
- Rieu A, Briandet R, Habimana O, Garmyn D, Guzzo J, Piveteau P (2008) *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted-chains structures. *Appl Environ Microbiol* 74:4491–4497
- Rieu A, Weidmann S, Garmyn D, Piveteau P, Guzzo J (2007) Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Appl Environ Microbiol* 73:6125–6133
- Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P (2009) Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM – SEM). *J Microsc* 235:124–127
- Singh R, Debarati P, Rakesh KJ (2006) Biofilms, implications in bioremediation. *Trends Microbiol* 14:389–397
- Stewart PS (2003) Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 185:1485–1491
- Stewart PS, Franklin MJ (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6:199–210
- Takenaka S, Pitts B, Trivedi HM, Stewart PS (2009) Diffusion of macromolecules in model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75:1750–1753
- Takenaka S, Trivedi HM, Corbin A, Pitts B, Stewart PS (2008) Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:1869–1875
- Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms *J Bacteriol* 182:6482–6489
- Veening JW, Smits WK, Hamoen LW, Jongbloed JD, Kuipers OP (2004) Visualization of differential gene expression by improved cyan fluorescent protein and yellow fluorescent protein production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 70:6809–6815
- Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, Kolter R (2008) Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev* 22:945–953
- Vroom JM, De Grauw KJ, Gerritsen HC, Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Birmingham JJ, Allison C (1999) Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol* 65:3502–3511
- Vuong C, Kocianova VJM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 279:54881–54886
- Waharte F, Steenkeste K, Briandet R, Fontaine-Aupart MP (2010) Local diffusion measurements inside biofilms by FRAP analysis with a commercial confocal laser scanning microscope. *Appl Environ Microbiol* 76:5860–5869

- Walczyński P, Kuhlicke U, Knappe S, Cordes C, Neu TR (2008) *In situ* activity of suspended and immobilized microbial communities as measured by fluorescence lifetime imaging. *Appl Environ Microbiol* 74:294–299
- Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M, Kjelleberg S (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 185:4585–4592
- Xu KD, Stewart PS, Xia F, Huang C-T, McFeters GA (1998) Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* 64:4035–4039
- Yadvika S, Sreerishnan TR, Kohli S, Rana V (2004) Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review. *Bioresour Technol* 95:1–10
- Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186:1838–1850

II.2. L'imagerie Time-lapse

L'imagerie time lapse a été initialement utilisée pour visualiser l'inactivation des biofilms par des agents antimicrobiens tel que détaillé dans l'article 1. Les récents développements technologiques en terme de vitesse d'acquisition des images rendent aussi la méthode time lapse performante pour contrôler la pénétration au sein des biofilms bactériens, de nanoparticules (quantum dots, polymères,...) et en particulier des antibiotiques dans la mesure où ces molécules sont fluorescentes ou peuvent être marquées avec un fluorophore extrinsèque (Rani *et al.*, 2005 ; Jefferson *et al.*, 2005 ; Stewart *et al.*, 2009). Le principe de la méthode repose sur la détermination de la vitesse de pénétration d'un soluté dans un biofilm par estimation du temps mis par le soluté pour atteindre la base du biofilm (Stewart, 2003). Cette mesure repose sur l'acquisition d'une pile d'images « x-y-z-t » tel que schématisé ci-dessous (figure 14).

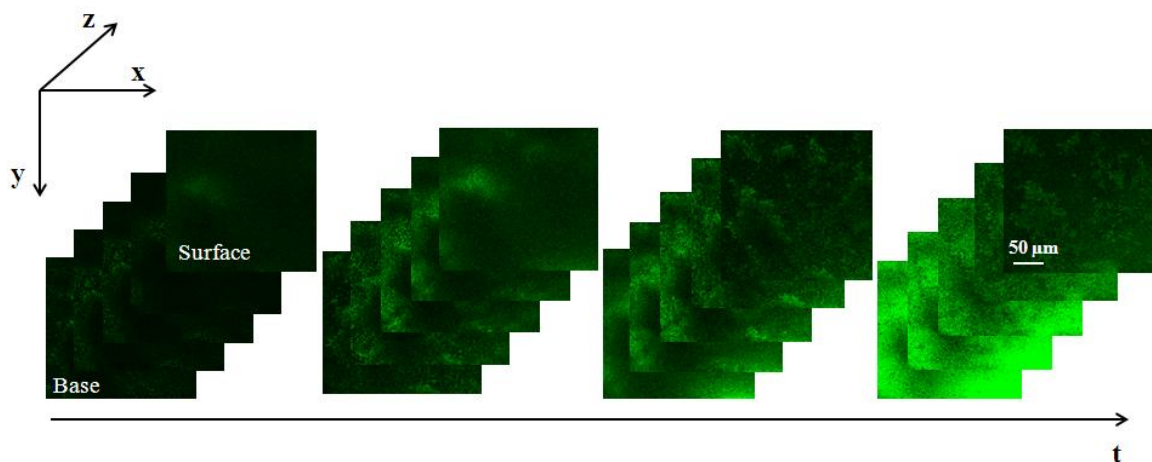


Figure 14 : Une séquence d'une pile d'images enregistrées en mode « x-y-z-t » illustrant le principe de l'imagerie Time-lapse et montrant la pénétration de molécules fluorescentes (BODIPY®-vancomycine) dans un biofilm (ici, *S. aureus*) au cours du temps.

Ce processus de diffusion macroscopique au sein de biofilms a été modélisé par Stewart dès 1996 (Stewart, 1996). Il a considéré qu'un soluté peut diffuser librement dans l'épaisseur d'un biofilm mais qu'il peut aussi être adsorbé de manière réversible ou irréversible, ou encore être hydrolysé par une enzyme ou soumis à tout autre processus d'interaction avec son environnement. Ce modèle intègre les hypothèses suivantes : i) le biofilm est supposé être uniforme, ii) la répartition des cellules et de la matrice d'exopolymères dans le biofilm est

homogène (figure 15). Il s'appuie sur la loi de Fick et permet donc de définir le coefficient de diffusion D_e selon l'expression suivante :

$$t_{90} = 1.03 \times L^2 / D_e$$

où le paramètre t_{90} , déterminé expérimentalement, correspond au temps nécessaire pour que 90% du soluté atteigne la base du biofilm. L est l'épaisseur du biofilm.

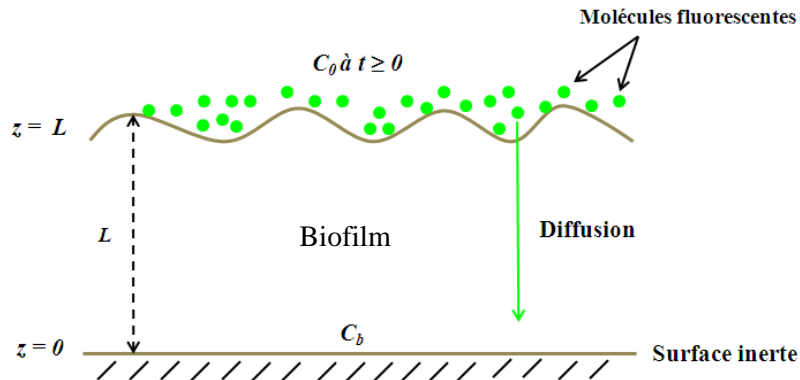


Figure 15 : Schéma d'un biofilm formé sur une surface inerte décrivant les paramètres physiques utilisés dans le modèle mathématique décrit ci-dessus pour analyser la diffusion de molécules fluorescentes. La concentration du soluté appliquée est C_0 et C_b correspond à la concentration du soluté à la base du biofilm. Le biofilm est d'épaisseur L . Les molécules fluorescentes diffusent de la surface du biofilm vers la base dans le sens de la flèche verte (d'après **Nichols et al., 1989**).

Stewart a initialement testé son modèle pour prédire la diffusion de gaz, d'ions et de composés organiques dans des biofilms de densité cellulaire variable. Sur la figure 16 sont reportés les rapports des coefficients de diffusion dans le biofilm et dans l'eau (D_{aq}) de ces différents solutés montrant ainsi que les molécules « légères » diffusent quasi librement au sein de la biomasse alors que les composés organiques sont largement contraints dans leur diffusion sans doute à cause de leur interaction avec l'environnement (Stewart 1998).

Ce modèle a été ensuite affiné pour tenir compte des structures « en champignon » (agrégats cellulaires pseudo sphériques) fréquemment rencontrées dans les biofilms. Pour une structure de rayon R , l'expression utilisée pour la détermination du coefficient de diffusion devient :

$$t_{90} = 0.37 \times R^2 / D_e$$

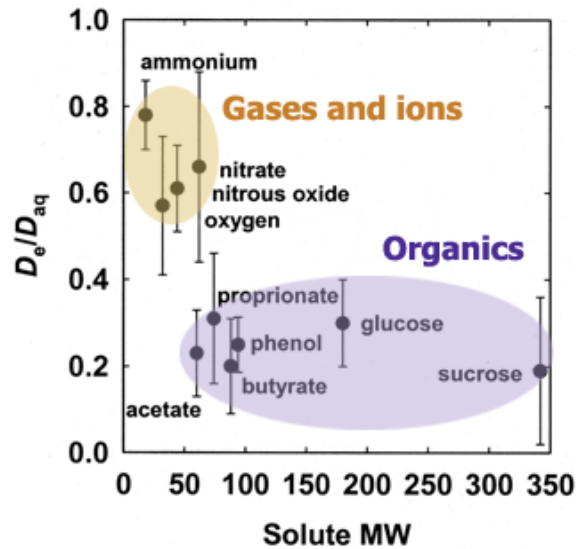


Figure 16 : Coefficients de diffusion relatifs de différents solutés dans les biofilms (Stewart, 1998). (Figure reproduite avec la permission de l'éditeur « American Society for Microbiology » : Journal of Bacteriology, Stewart, 2003).

Comme il vient d'être décrit, la méthode time lapse permet de sonder la diffusion d'un soluté à l'échelle de la structure 3D du biofilm. Du fait de cette échelle globale d'analyse, on peut ignorer des processus locaux liés à l'hétérogénéité micrométrique de la biomasse auxquels permettent d'accéder les méthodes de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*) et FLIM (*Fluorescence Lifetime IMaging*).

II.3. Retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

La première publication décrivant la technique FRAP date de 1974 (Peters *et al.*, 1974). C'est une méthode bien adaptée pour étudier la mobilité de molécules en phase condensée que ce soit en solution visqueuse (afin que la diffusion soit ralentie), dans des gels ou au sein de cellules eucaryotes. Les premières études utilisant la FRAP en biologie cellulaire, ont porté sur la diffusion de lipides et de protéines marquées par des fluorophores au travers de membranes cytoplasmiques (Axelrod *et al.*, 1976 ; Edidin *et al.*, 1976). Son application à l'étude des processus de diffusion dans les biofilms reste encore limitée (Lawrence *et al.*, 1994 ; Bryers et Drummond, 1998 ; Waharte *et al.*, 2010). Pourtant, la méthode FRAP est simple à mettre en œuvre et est aujourd'hui souvent disponible sur les microscopes confocaux commerciaux.

Une mesure FRAP se décompose en trois étapes au cours desquelles on mesure des variations d'intensité de fluorescence. On commence par imager normalement une zone du biofilm ($F_{\text{prebleach}}$, $P_{\text{observation}}$, figure 17) puis à un instant t_i on augmente très fortement la puissance du laser d'excitation (P_{FRAP}) de sorte à éteindre irréversiblement la fluorescence des molécules du volume confocal défini par l'objectif du microscope (photobleaching). On mesure ensuite le temps de retour de la fluorescence au sein du volume photoblanchi provenant de la diffusion des molécules environnantes non irradiées. Il est ainsi possible d'avoir accès aux fractions de molécules mobiles et immobilisées au sein d'un système.

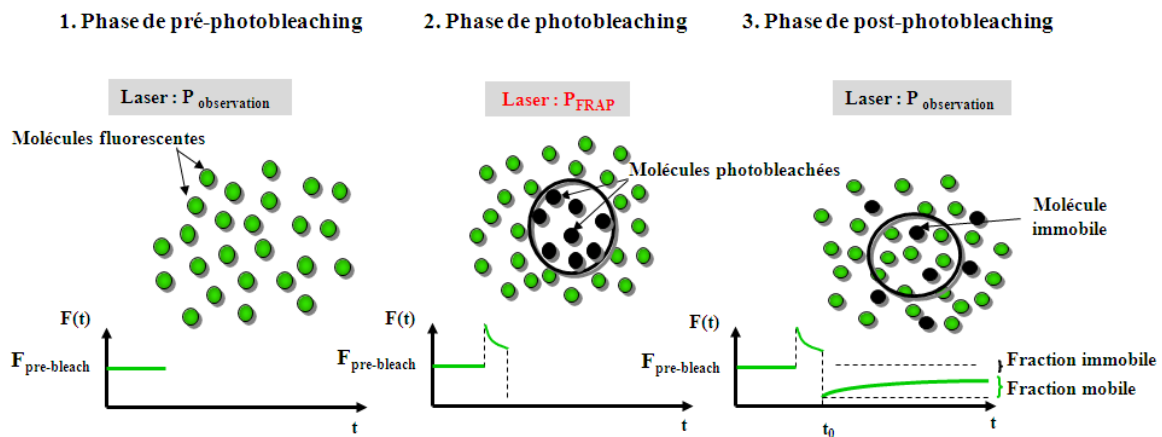


Figure 17 : Principe de la méthode FRAP

Le grand avantage apporté par l'utilisation d'un microscope confocal commercial est qu'il est possible (i) de visualiser la zone photoblanchie au sein d'un plan image et (ii) d'acquérir une série d'images d'intensité de fluorescence x-y-z à haute fréquence et au cours du temps, permettant la détermination des paramètres de diffusion d'un soluté dans un microenvironnement du biofilm (Waharte *et al.*, 2010). C'est à ce stade du traitement du signal que la FRAP se révèle être une méthode complexe nécessitant des outils d'analyse adaptés. Les logiciels d'analyse implantés sur les microscopes confocaux commerciaux ne permettent qu'une exploitation qualitative des données (temps de retour de la fluorescence) et ne donnent pas accès aux paramètres physiques tels que les coefficients de diffusion. Notre équipe a récemment développé une méthode complète d'analyse des données FRAP à partir des profils d'intensité et/ou de modèles mathématiques, adaptée aux mesures dans les biofilms (Waharte *et al.*, 2010).

II.4. Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS)

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est la méthode la plus adaptée pour l'étude des processus de diffusion-réaction à l'échelle de la molécule unique. Ses premières applications ont permis de déterminer des cinétiques de réactions chimiques, comme la réaction réversible entre le bromure d'éthidium et l'ADN (Magde et al., 1972).

Le principe de la FCS repose sur la mesure des fluctuations temporelles de l'intensité de fluorescence émise par un petit nombre de molécules présentes dans un faible volume d'excitation confocal (~ 1 femtolitre) (figure 18), suivie d'une analyse mathématique du signal temporel de fluorescence enregistré (figure 19a). Pour des temps supérieurs à quelques microsecondes, ces fluctuations de l'intensité de fluorescence reflètent la diffusion des molécules à travers le volume d'excitation. La FCS est également utilisée pour étudier des processus plus courts de réactions photophysiques et photochimiques tels que : le transfert de charge, le passage à l'état triplet de la molécule et le changement de conformation des molécules (Schwille et Haustein, 2004 ; Wenger et Rigneault, 2010).

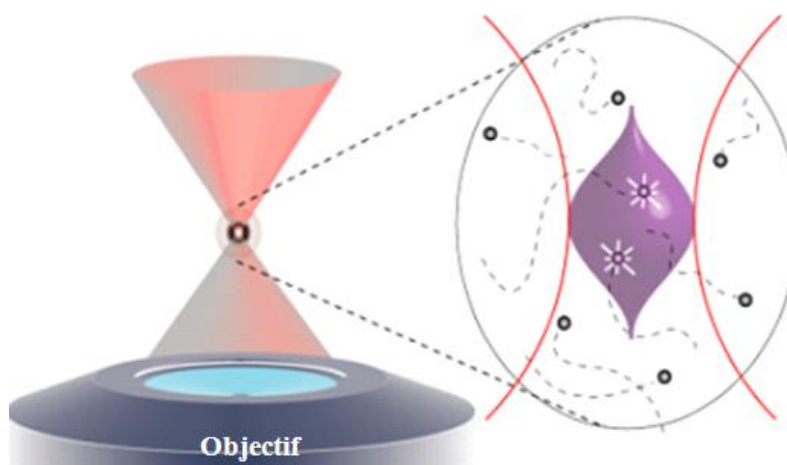


Figure 18 : Schéma montrant la diffusion de molécules à travers le volume d'excitation pouvant générer un signal de fluctuations d'intensité de fluorescence.

Contrairement à la méthode FRAP, la FCS requiert d'utiliser un dispositif de détection du signal de fluorescence ayant une résolution de l'ordre de la picoseconde (photomultiplicateurs, photodiodes à avalanche) et un dispositif expérimental réservé à un utilisateur averti aux méthodes optiques. En contrepartie, l'analyse du signal est simplifiée par rapport à celle utilisée pour les données FRAP.

Pour chaque vecteur d'intensité, le calcul de la fonction d'autocorrélation du signal de fluorescence enregistré est obtenu à partir de la relation :

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

où $I(t)$ est l'intensité de fluorescence à l'instant t et $I(t+\tau)$ à l'instant $t+\tau$. Les crochets représentent la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence sur la durée de l'expérience.

La courbe d'autocorrélation caractéristique correspondante est représentée sur la figure 19b. Elle peut être analysée par un modèle de diffusion brownienne à une ou plusieurs composantes ou par un modèle de diffusion anormale donnant ainsi accès aux paramètres caractéristiques de la molécule diffusante tels que son temps de diffusion, le nombre de molécules fluorescentes diffusantes dans le volume d'excitation et le coefficient de diffusion de la molécule (Haustein et Schwille, 2007). L'amplitude du signal d'autocorrélation est inversement proportionnelle au nombre de molécules N présentes dans le volume d'excitation, d'où la nécessité de travailler avec de très faibles concentrations de fluorophore de l'ordre du nM pour accéder à l'échelle de la molécule unique.

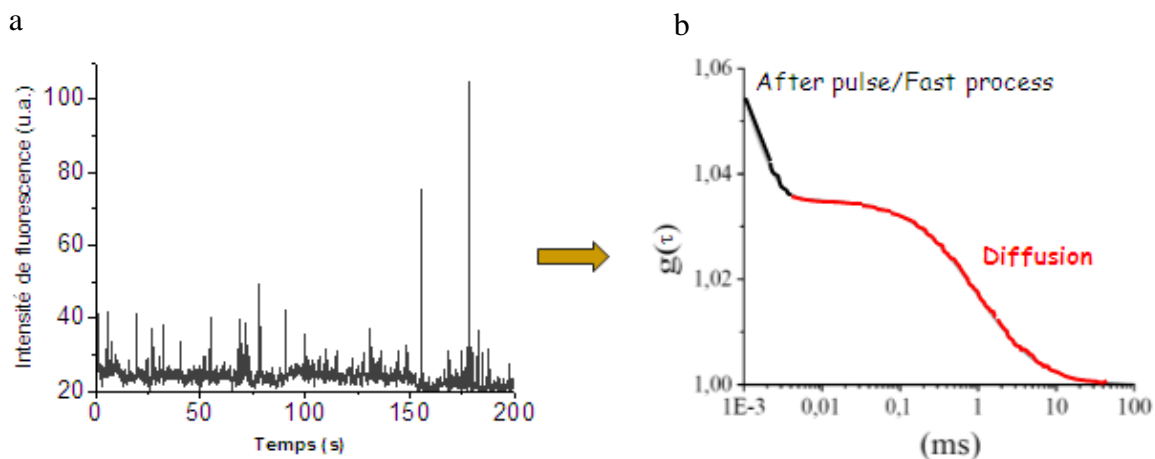


Figure 19 : Exemples de vecteur d'intensité (a) et de courbe d'autocorrélation de fluorescence (b) obtenus par des mesures de FCS. Le signal d'autocorrélation comprend dans ce cas, le signal de diffusion et le signal lié à l'appareil « after pulse ».

II.5. Imagerie de durées de vie de fluorescence (FLIM)

Les méthodes FRAP et FCS précédemment décrites permettent de mettre en évidence des fractions immobiles de chromophores (retour partiel du signal de fluorescence en FRAP, fluctuations d'intensité de fluorescence sans corrélation en FCS) ce qui suggère leur interaction avec le milieu environnant. La mesure des durées de vie de fluorescence peut dans ce cas apporter des données complémentaires. En effet, la durée de vie de fluorescence est indépendante de la concentration d'une molécule mais peut varier suite à des interactions ou au changement des paramètres physico-chimiques de son environnement (viscosité, température, pH,...) (Valeur, 2002 ; Periasamy *et al.*, 2003).

Du point de vue expérimental, il est aujourd'hui possible d'enregistrer des images de durées de vie de fluorescence (FLIM) en déplaçant le faisceau laser d'excitation sur l'ensemble du plan focal de l'échantillon et en mesurant en chaque point un déclin de fluorescence. Diverses méthodes existent pour mesurer ces déclins de fluorescence (Lacroix-Gueu, 2007) dont l'une des plus répandues est la méthode de comptage de photons uniques corrélés en temps (CPUCT) (O'Connor et Phillips, 1984) utilisée dans le cadre de notre étude. Cette méthode nécessite l'utilisation d'un laser impulsionnel comme source d'excitation et repose sur le principe suivant : la détection d'un photon de fluorescence sert de signal de déclenchement à un analyseur en temps de résolution picoseconde. L'impulsion laser détectée immédiatement après ce photon de fluorescence au moyen d'une photodiode rapide arrête l'analyseur en temps. Le décalage temporel Δt mesuré entre la détection d'un photon de fluorescence et l'arrivée de l'impulsion laser permet de construire l'histogramme du nombre de photons de fluorescence détectés pour chaque valeur du décalage Δt , appelé déclin de fluorescence (figure 20).

L'analyse de ce déclin de fluorescence permet ensuite de déterminer la durée de vie de fluorescence du fluorophore étudié (temps moyen pendant lequel la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état fondamental). Ce déclin F_{exp} est défini comme la convolution du déclin réel de fluorescence F avec la réponse instrumentale R du système de détection :

$$F_{\text{exp}}(t) = R * F(t) = \int_0^t R(t') \cdot F(t-t') \cdot dt'$$

et peut être ajusté par une fonction mono-exponentielle ou multi-exponentielle selon l'équation suivante :

$$F(t) = \sum_i a_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

où $F(t)$: intensité de fluorescence mesurée au temps t

i : espèce fluorescente

τ_i : durée de vie de fluorescence de l'espèce i .

a_i : amplitude du signal relatif à l'espèce i .

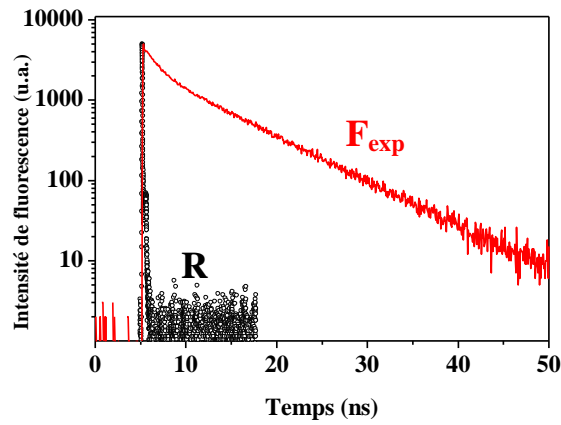


Figure 20 : Exemple de courbes de déclin de fluorescence.

PARTIE B : RESULTATS

Les infections aggravées dues au développement de biofilms à *S. aureus* constituent actuellement un vrai problème de santé publique. Rappelons que cette situation peut être critique, tel le cas des implants chirurgicaux dont l'explantation est souvent requise pour éradiquer l'infection ! Le traitement de ces infections devient de plus en plus compliqué du fait du développement de phénomènes de multi-résistance (voir partie A III), ce qui réduit l'arsenal des antibiotiques disponibles que ne compense pas la mise sur le marché de nouvelles molécules. Par ailleurs, la prise en charge thérapeutique est aussi souvent mal adaptée du fait que les concentrations d'antibiotiques utilisées sont dictées par des mesures réalisées à partir de bactéries planctoniques (Anderl *et al.*, 2000 ; Walters III *et al.*, 2003) alors qu'il est aujourd'hui bien établi que la croissance en biofilm peut induire une adaptation phénotypique des bactéries qui y sont incluses. On ne peut que regretter que la prise en compte de la structuration et de la physiologie bactérienne en biofilms reste encore trop restreinte au milieu de la recherche !

Qu'il s'agisse de biofilms extraits de malades ou de modèles de laboratoire, la sensibilité limitée de ces biostructures aux antibiotiques est constatée mais aujourd'hui encore pas totalement comprise. Il apparaît donc essentiel de renforcer la recherche portant sur l'identification des mécanismes moléculaires responsables de la plus grande tolérance des biofilms aux antibiotiques. C'est l'objectif de ce travail de thèse que nous avons approché en étudiant (i) la capacité de la matrice d'exopolymères auto-produite à moduler le transport et l'interaction des antibiotiques au sein de ces biostructures (chapitre 1) et (ii) le rôle de la structure du biofilm pour créer un environnement favorable aux cellules pour acquérir des propriétés phénotypiques différentes de leurs homologues planctoniques (chapitre 2).

Ce travail mené en concertation étroite avec le milieu médical, tente de répondre à des problématiques cliniques actuelles, ce qui justifie le choix des modèles de biofilms et des antibiotiques utilisés. Ainsi l'on s'est intéressé aux infections impliquant des SARM (*S. aureus* Résistant à la Meticilline) (voir première partie du manuscrit III.2 et III.3) couramment traitées avec la vancomycine ou une association vancomycine/rifampicine. Pour des raisons de sécurité au laboratoire, nous n'avons pas pu travailler directement avec une telle souche SARM. Nous avons utilisé des souches de *S. aureus*, la souche ATCC 6538 isolée à partir d'une lésion chez l'homme et utilisée comme référence dans les normes de désinfection (EN 13727), et la souche ATCC 27217 isolée de la muqueuse nasale d'une

infirmière. De plus il n'est pas rapporté de résistance particulière de ces souches à l'action des antibiotiques vancomycine et rifampicine.

CHAPITRE I

La matrice d'exopolymères du biofilm : une barrière à la diffusion des antibiotiques ?

CHAPITRE I : La matrice d'exopolymères du biofilm : une barrière à la diffusion des antibiotiques ?

L'objectif de l'étude rapportée dans les articles 2 et 3 est d'évaluer le rôle et la fonction de la matrice d'exopolymères (EPS) qui compose l'espace intercellulaire des biofilms sur la pénétration - diffusion - reconnaissance de la cible biologique d'antibiotiques. Pour ce faire, nous avons utilisé la microscopie de fluorescence multimodale (imagerie time lapse, FRAP, FCS, FLIM) méthodes non destructrices, qui peuvent comme détaillé dans la partie A II.2 renseigner en temps réel sur la diffusion- réaction *in situ* jusqu'à l'échelle moléculaire des entités diffusantes tels les antibiotiques. Les études de ce type rapportées dans la littérature se limitent à l'utilisation de l'imagerie time-lapse et concernent la diffusion de la daptomycine et de la tétracycline dans des biofilms de *S. epidermidis*, (Stewart *et al.*, 2009), *E. coli* (Stone *et al.*, 2002), et une seule publication par Jefferson *et al* (2005) se rapporte à la diffusion de la vancomycine marquée avec le fluorophore BODIPY au sein d'un biofilm anormalement mucoïde de *S. aureus* (Jefferson *et al.*, 2005).

Notre travail a porté sur l'étude de la diffusion de cet antibiotique fluorescent, BODIPY-vancomycine, dans les biofilms de *S. aureus*. La vancomycine dont la structure est illustrée figure 21, est un bactéricide à action lente, appartenant à la famille des glycopeptides (tableau 2 partie A.III.1). Son mode d'action consiste en l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par encombrement stérique lors de la réplication cellulaire. Plus précisément, la vancomycine bloque l'action de deux enzymes, la transglycosylase et la transpeptidase (dénommée également PBP pour Penicilin Binding Protein) impliquées dans la formation des chaînes saccharidiques latérales et dans la réticulation du peptidoglycane (figure 22). Lors de la synthèse du peptidoglycane (division cellulaire), l'enzyme transglycosylase polymérise les monomères de la muréine (disaccharide-pentapeptide), puis la PBP se lie au motif D-alanine-D-alanine du pentapeptide terminal de ces monomères. Il s'ensuit une dé-alanisation terminale : le térapeptide restant sur le monomère muréique se lie alors à une chaîne de peptidoglycane existant pour former une nouvelle chaîne de peptidoglycane.

En présence de vancomycine, l'action de la transglycosylase est empêchée stériquement, dû à l'association spécifique de l'antibiotique sur le dipeptide D-alanine-D-alanine du

monomère de muréine : la bactérie ne peut plus alors produire de peptidoglycane ce qui inhibe le mécanisme de division cellulaire (Hiramatsu, 2001). Il est à noter que pour *S. aureus*, il a été identifié l'existence de séquences résiduelles D-alanine-D-alanine à la surface du peptidoglycane mature, qui sont autant de cibles possibles de fixation spécifique de la vancomycine. Cette interaction n'est pas corrélée à l'action bactéricide de la molécule mais rappelons qu'elle est mise à profit par certaines souches de *S. aureus* qui surproduisent un peptidoglycane riche en résidus D-alanine-D-alanine « séquestrant » le principe actif (partie A III.2.1) et conduisant à terme à une résistance à l'antibiotique.

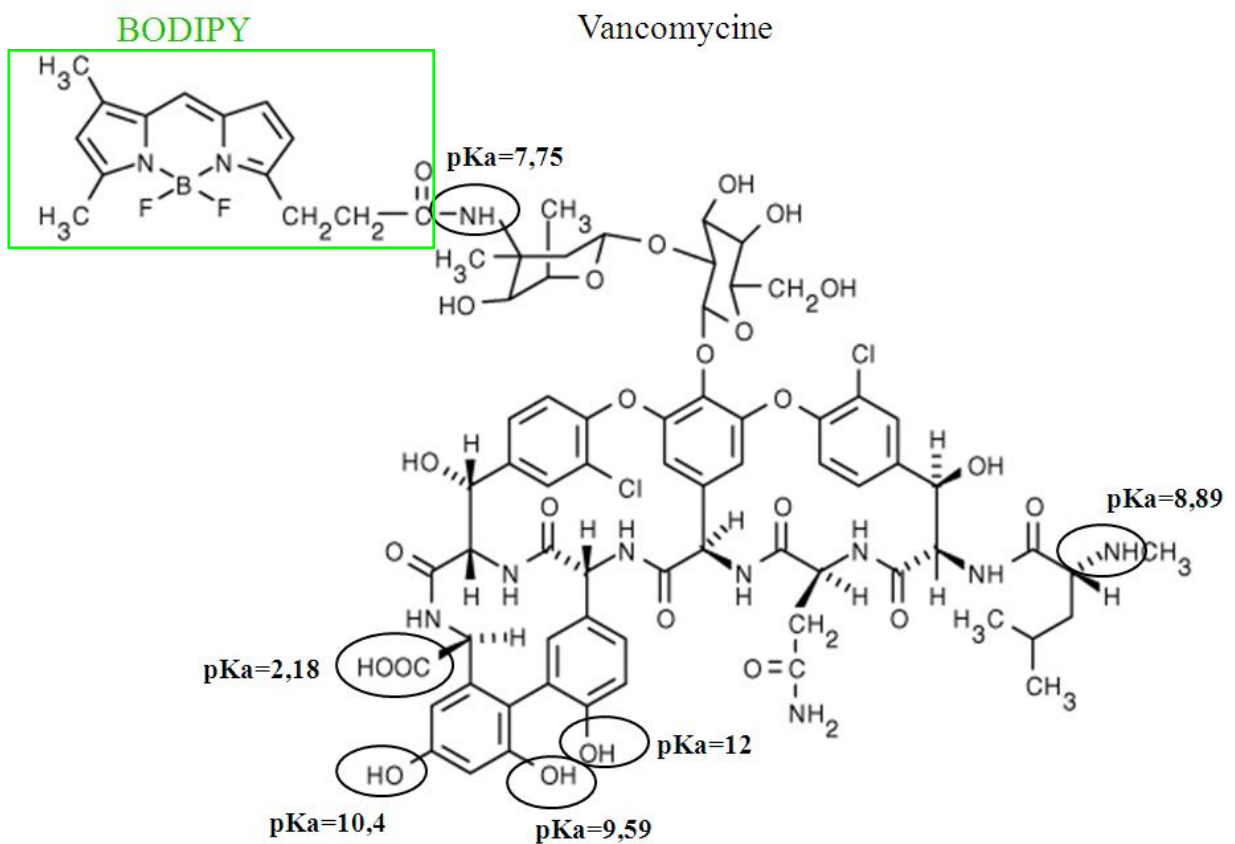


Figure 21 : Structure chimique du BODIPY®-vancomycine (Invitrogen) montrant le fluorophore BODIPY® (PM=292 g/mol) et l'antibiotique vancomycine (PM=1450 g/mol) avec ses différents pKa(s) (Vijan, 2009).

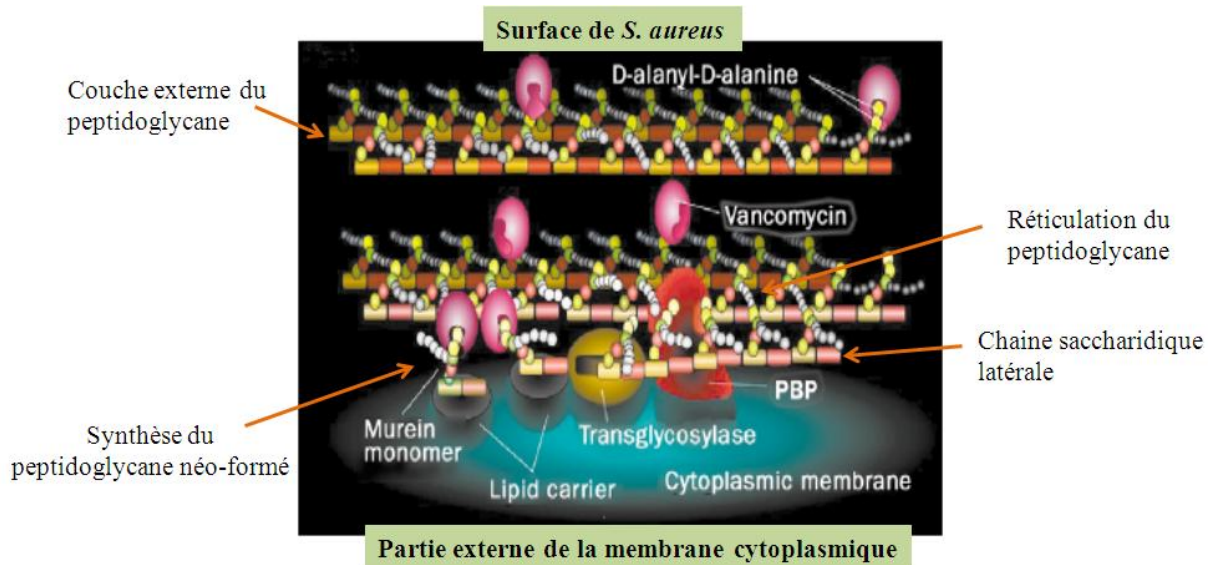


Figure 22 : Mode d'action de la vancomycine sur la paroi de *S. aureus* (Hiramatsu, 2001). (Figure reproduite et adaptée avec la permission de l'éditeur « Elsevier » : The Lancet Infectious Diseases, Hiramatsu, 2001).

La vancomycine est une petite molécule $\sim 10\text{\AA}$, hydrophile, très faiblement cationique à pH 7.0 (Vijan, 2009) (figure 21). Ainsi les interactions électrostatiques avec les parois bactériennes globalement chargées négativement au pH physiologique seront négligeables. Le greffage du BODIPY modifie peu la taille et la charge du complexe (figure 21).

La figure 23 illustre les structures tridimensionnelles des biofilms utilisés dans notre étude. En plus de la souche ATCC 6538 qui présente une structure lisse, dense et homogène (figure 23a) nous avons aussi utilisé la souche de *S. aureus*, ATCC 27217. Il s'agissait de compléter nos observations en prenant en compte l'hétérogénéité de la matrice d'EPS dans le processus de diffusion des antibiotiques. En effet, cette souche produit un biofilm de structure plus complexe avec des zones de densité cellulaire variable et surtout la présence dans l'épaisseur du biofilm de pores et de poches d'ADN extracellulaire comme le révèle le marquage à l'iodure de propidium (figure 23b).

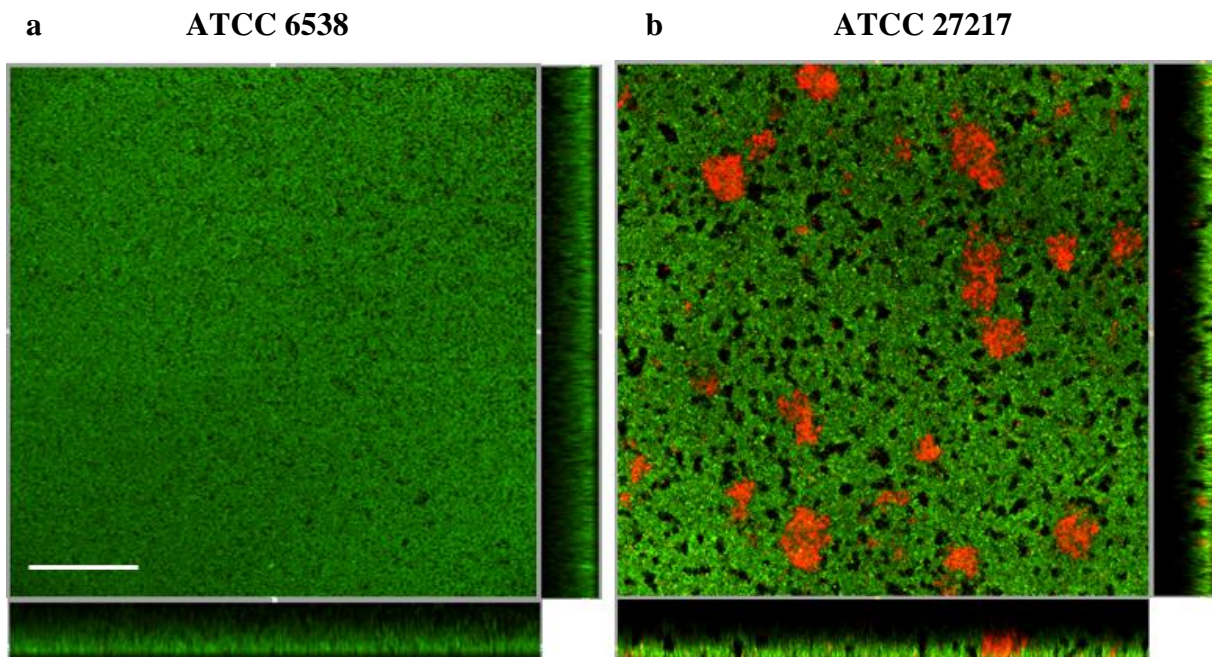


Figure 23 : Images prises au microscope confocal des biofilms de 24 heures des souches de *S. aureus* ATCC 6538 (a) et ATCC 27217 (b) montrant en section la structure des biofilms et leur viabilité cellulaire. Les cellules vivantes (en vert) et mortes (en rouge) des biofilms sont marquées avec le Syto9 et l'iodure de propidium (IP) respectivement. Notons que l'IP, intercalant de l'ADN révèle les poches d'ADN extracellulaire du biofilm de la souche ATCC 27217. La barre d'échelle représente 50 μm .

L'article 2 « Image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to dissect vancomycin diffusion-reaction processes in *Staphylococcus aureus* biofilms » (SPIE) est la première description de l'utilisation de la méthode FRAP pour l'analyse de la diffusion au sein de biofilms de molécules aussi petites que les antibiotiques. Il permet de détailler l'analyse originale des données développée par notre équipe (Waharte *et al.*, 2010) à partir de séquences d'images et non plus à partir de la seule intensité de fluorescence dans la zone photoblanchie.

Les résultats de cet article associés à ceux de l'article 3 « Correlative time resolved fluorescence microscopy (Time-lapse, FCS, FLIM, FRAP) to analyse antibiotic diffusion-reaction in biofilms » (soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy) ont permis de visualiser et de quantifier la diffusion-réaction de la vancomycine au sein de biofilms de *S. aureus*. Il a été démontré que l'antibiotique pouvait pénétrer dans toute l'épaisseur de la matrice. Un ralentissement de la diffusion moléculaire par rapport à la libre diffusion dans

l'eau a été observé, un processus lié à l'hétérogénéité du microenvironnement et/ou à une accumulation locale de l'antibiotique (fixation à la paroi des bactéries, fixation à l'ADN extracellulaire, etc.) bien que la vancomycine à la concentration thérapeutique utilisée dans notre étude reste biodisponible en tout point des biofilms.

I. Article 2 : Image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to dissect vancomycin diffusion-reaction processes in *Staphylococcus aureus* biofilms

Article reproduit avec la permission de l'éditeur "SPIE" : SPIE Proceeding. Daddi Oubekka *et al.*, Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II - Vol. 8087 1I: 1-8 (2011).

I. Article 2

Image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to dissect vancomycin diffusion-reaction processes in *Staphylococcus aureus* biofilms

S. Daddi Oubekka^{1,2,3}, R. Briandet^{4,5}, F. Waharte⁶, M.-P. Fontaine-Aupart^{1,2,3} and K. Steenkeste^{1,2,3,*}

¹Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, UMR 8214, Orsay, F-91405 ;

²CNRS, Orsay, F-91405 ;

³Univ Paris-Sud, Centre de Photonique Biomédicale, LUMAT FR 2764, Orsay, F-91405 ;

⁴INRA, UMR 1319 Micalis, Jouy-en-Josas, F-78352 ;

⁵AgroParisTech, UMR Micalis, Massy, F-91300 ;

⁶Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBiSA), CNRS - Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, F-75005.

ABSTRACT

The diffusion capabilities of free fluorophores inside the heterogeneous three dimensional structure of *Staphylococcus aureus* biofilm were studied by an original image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching method. The study was extended to BODIPY-vancomycin in order to better understand the mechanisms involved in the high tolerance of the bacteria embedded in a biofilm to the antibiotic.

Keywords: fluorescence recovery after photobleaching, biofilm, antibiotic resistance, molecular diffusion.

1. INTRODUCTION

In natural environments, bacteria grow on biotic surfaces (mucosa, tissues...) or abiotic surfaces (medical devices, food workshops surfaces...). They are usually embedded in a matrix of exopolymers (EPS) forming communities organized in heterogeneous structures, the biofilms. When these biostructures are composed of pathogenic bacteria, they are frequently tolerant to the action of antibiotics and, therefore, extremely difficult to eradicate. Such behaviour leads to major public health problems including hospital acquired infections. It is now recognized that this antimicrobial resistance is intimately related to the three-dimensional organisation of the biological edifice, and results from multifactorial processes involving both the physiological properties of microorganisms and the nature of the extracellular matrix.

What makes antimicrobial activity in biofilms different from that in culture suspensions can be explored by probing the diffusion and reaction of antimicrobials in *in situ* conditions. To this aim, Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) allowed significant advances in particular in deciphering the functions of the extracellular matrix.¹ Recently, the emergence of fluorescence labelled antibiotics allowed the direct visualisation of these molecules penetration through the organized biostructures by time-lapse microscopy.^{2,3} Hence it was revealed that the EPS matrix was not always an obstacle to the penetration of antibiotics through the biofilm thickness while a total tolerance of biofilm cells to the antibiotic was observed in the same time. Such effect can be due to a specific physiological state of bacterial cells in biofilms (e.g. biofilm related physiology, slow-growth or senescence), but also to local diffusion/reaction limitations of the antibiotic that can prevent the interaction between the drug and the bacterial envelop targets.

* karine.steenkeste@u-psud.fr; phone: +33 1 69 15 73 64; fax: +33 1 69 15 67 77

Our challenge was to dissect non-invasively these local diffusion/reaction processes through a 3D biofilm structure by using image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP), an efficient method of investigation in terms of spatial resolution, sensitivity and acquisition speed.⁴ FRAP can be as resolved as Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and has the advantage to preclude any constraint on the fluorophore concentration. The principle of FRAP is based on a brief excitation of fluorescent molecules by a high-intensity laser pulse spatially confined to the volume defined by the confocal microscope objective (for single spot FRAP) or in a user-defined region, to quench irreversibly their fluorescence (photobleaching). Fluorescence redistribution is then observed if the fluorophores are able to move in the sample.

A classical FRAP experiment is recorded only as a function of time and is represented as fluorescence recovery curves. The quantification of these measurements requires mathematical models adapted to the experimental conditions and the geometrical/structural configuration of the sample, which explains why only qualitative models are implemented on most commercial CLSM systems. But using such recent microscopes, FRAP can also be analyzed on a spatial scale, exploiting information included in image-time series. This is the principle of our image-based FRAP protocol (image acquisition, data sorting and dedicated analysis tools)⁴ that can be readily applied by anyone familiar with a CLSM, and well adapted to study *in situ* local molecular diffusion with accuracy.

Another original approach of our FRAP protocol is that we also consider that bacterial movements may invalidate FRAP analysis (incorrect estimation of molecular diffusion coefficients). To control such cellular dynamics, we have transferred the kymogram representation, initially developed to follow trafficking in living cells,⁵ to biofilm motion. Kymograms are two-dimensional graphs showing fluorescence intensity fluctuations over time along a chosen trajectory, allowing the characterization of the bacteria motion in the biofilm.⁴ Such representation is essential in order to discard distorted acquisitions.

The present study is related to BODIPY-vancomycin diffusion-reaction in *Staphylococcus aureus* biofilms by reference to free BODIPY molecule in order to contribute to a better understanding of the well-established *Staphylococcus aureus* biofilms tolerance to this antibiotic.⁶ The FRAP results are also related to previous measurements performed by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)⁶ and the complementarity of the methods was discussed.

2. METHODOLOGY

2.1 Bacterial strain, media and antibiotics

The stock culture of the *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain was kept at -80°C in Tryptic Soy Broth (TSB, Difco- France) containing 20% (vol/vol) glycerol. Prior to each experiment, the frozen cells were subcultured twice in TSB at 30°C.

The fluorescently labelled antibiotic BODIPY[®]FL-vancomycin (BODIPY-vancomycin) and free BODIPY were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). The lyophilisates of BODIPY and BODIPY-vancomycin were dissolved in DMSO and sterile MilliQ water, to obtain stock-solutions of 34.5 mM and 69 μM respectively. These stock-solutions, kept at -20°C before use, were then diluted in NaCl 150 mM to obtain final concentrations of 345 μM for BODIPY and 4.3 μM for BODIPY-vancomycin for FRAP experiments.

2.2 Biofilm preparation

500 μL of an overnight subculture of *Staphylococcus aureus* adjusted to an OD_{600 nm} of 0.03 (corresponding to ~10⁷ CFU/ml) were added into each well of 4-well sterile microscopic chambers (Lab-Tek; Nunc, Thermo Scientific France) in humidified-air conditions. After 1h30 of adhesion at 30°C, the wells were rinsed with 150 mM NaCl in order to eliminate non-adherent cells and refilled with 500 μL of sterile TSB prior incubation for 24 h at 30°C to allow biofilm development. The following day, the biofilms were rinsed with 150 mM NaCl and refilled with the non-fluorescent RPMI 1640 medium (x1) (GIBCO[®], Invitrogen, France).

2.3 FRAP measurements

FRAP experiments were performed at CPBM (Center of Biomedical Photonics of Orsay, <http://www.clups.u-psud.fr>) on a confocal microscope Leica SP5 equipped with an oil-immersion 63× objective of numerical aperture NA=1.4 and at room temperature (~20°C). BODIPY fluorescence was excited with the 488-nm laser line of an argon laser and detected on the 500-650 nm spectral bandwidth. The fluorescence intensity image size was fixed to 512 × 128 pixels with 80-nm pixel size in order to ensure usable spatial information on the biofilm (~40 × 10 μm²) and recorded using 16-bit resolution to improve image analysis. The line scan rate frequency was fixed to 1400 Hz that corresponds to a total time between frames of ~265 ms. The full widths at half

maximum (FWHM) in xy and z (along the optical axis) of the bleached profile were 0.8 μm and 14 μm respectively as determined previously.⁴

Each FRAP experiment started with the acquisition of 50-image scans and 3 % of laser maximum intensity (which was measured to be $\sim 7 \mu\text{W}$ at the object level) and followed by a single bleached spot of 500 ms at 100 % laser intensity. A series of 300 single section images were then collected with the laser power attenuated to its initial value (3 % of the bleach intensity); the first image was recorded 765 ms after the beginning of bleaching. Under these image acquisition conditions, FRAP measurements could be acquired in 94 s and ensure bacteria viability as controlled with a live-dead staining labeling. It must be noted that the goal is to reach the best compromise between 2D image size and time resolution. In consequence, image acquisition frame rate is constrained: increasing acquisition frame rate would require reducing the region size and therefore precludes the acquisition of large biofilm sections.

2.4 FRAP analysis

We have first controlled using Monte-Carlo simulations, that the diffusion process inside our *Staphylococcus aureus* biofilm can be analyzed considering pure isotropic diffusion in a homogenous medium. Furthermore, a 2D diffusion was considered in view of the axial (14 μm) and lateral (0.8 μm) extents of the photobleaching pattern: diffusion along the axial/vertical axis can be neglected. Fluorescence recovery curves were extracted using circular region of $\sim 25 \mu\text{m}^2$ inside the photobleached region as shown on Fig. 2.

FRAP data analysis was first performed using the intensity profile analysis method.⁴ Briefly, the profile width of the photobleached zone was extracted by fitting a series of intensity profiles obtained from images taken during the recovery process with a Gaussian function:

$$I(x) = I_0 e^{-\frac{2(x-x_0)^2}{d^2}} + K \quad (1)$$

where K is a constant and x_0 the profile center. For a 2D diffusion process, the Gaussian width d is related to the diffusion coefficient by the relation:

$$d^2 = 8Dt \quad (2)$$

Therewith it is possible to determine the diffusion coefficient by plotting d^2 as a function of time and using linear regression to estimate the slope of the graph, keeping only the first 6-10 images (corresponding to the first two seconds of the recovery). This procedure was implemented with the macro language included in ImageJ software version 1.43 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and is available upon request (contact: Francois.Waharte@curie.fr).

The speed-optimized image acquisition conditions gave noisy images. To reduce noise, an azimuthally averaged line profile centred on the photobleached region was measured on the few first images of the series (typically 20 images) after photobleaching phase. This consists in measuring intensity profiles along a rotating line centred on the photobleached area and calculating the mean of each pixel of the line for all angles. For the data presented here, we used a 30° rotation with a 180-pixel line length (on images 512×128 pixels).

FRAP data were also analyzed following the model from Braga et al.,⁷ keeping only the first 3 terms of the series in the Equation (9) of this reference in agreement with a 2D diffusion model.

3. RESULTS

3.1 Acquisition of FRAP time-series images

We have first checked biofilm stability during the measurements by kymogram representation (Fig. 1). When bacteria do not move, this representation leads to continuous adjacent vertical lines as observed in Fig. 1a. On the opposite, when a motion of the biomass occurs during FRAP acquisitions, the corresponding kymograms are distorted (Fig. 1b). This movement can induce fluorescence intensity fluctuations in the bleached region, impairing quantitative analysis. In this study, before any FRAP experiment analysis, the biomass movement by a kymogram representation was controlled.

Typical image-based FRAP experiments of BODIPY and BODIPY-vancomycin in *Staphylococcus aureus* biofilms are presented in Fig. 2a and 2b. On these images, unlabeled bacterial cells were visible in dark grey and the photobleached area in dark at the center of the images. In both cases, this later disappeared progressively inline with the fluorophore diffusion in the biofilms.

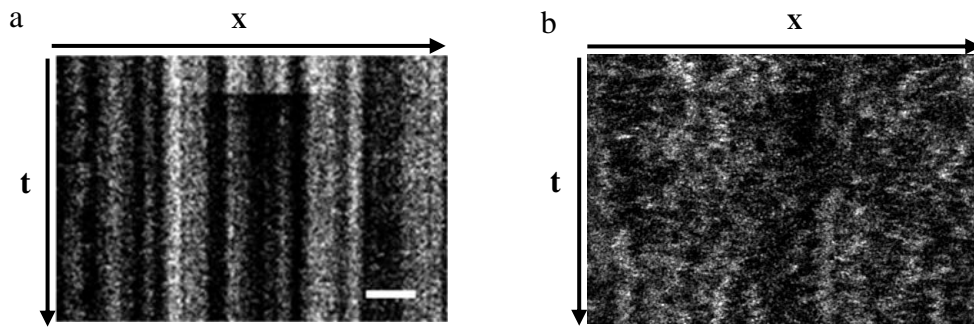


Figure 1: Kymogram representation (xt) of the image sequence without (a) or with (b) biomass motion. The total acquisition time is 94 s. The scale bar represents 5 μm .

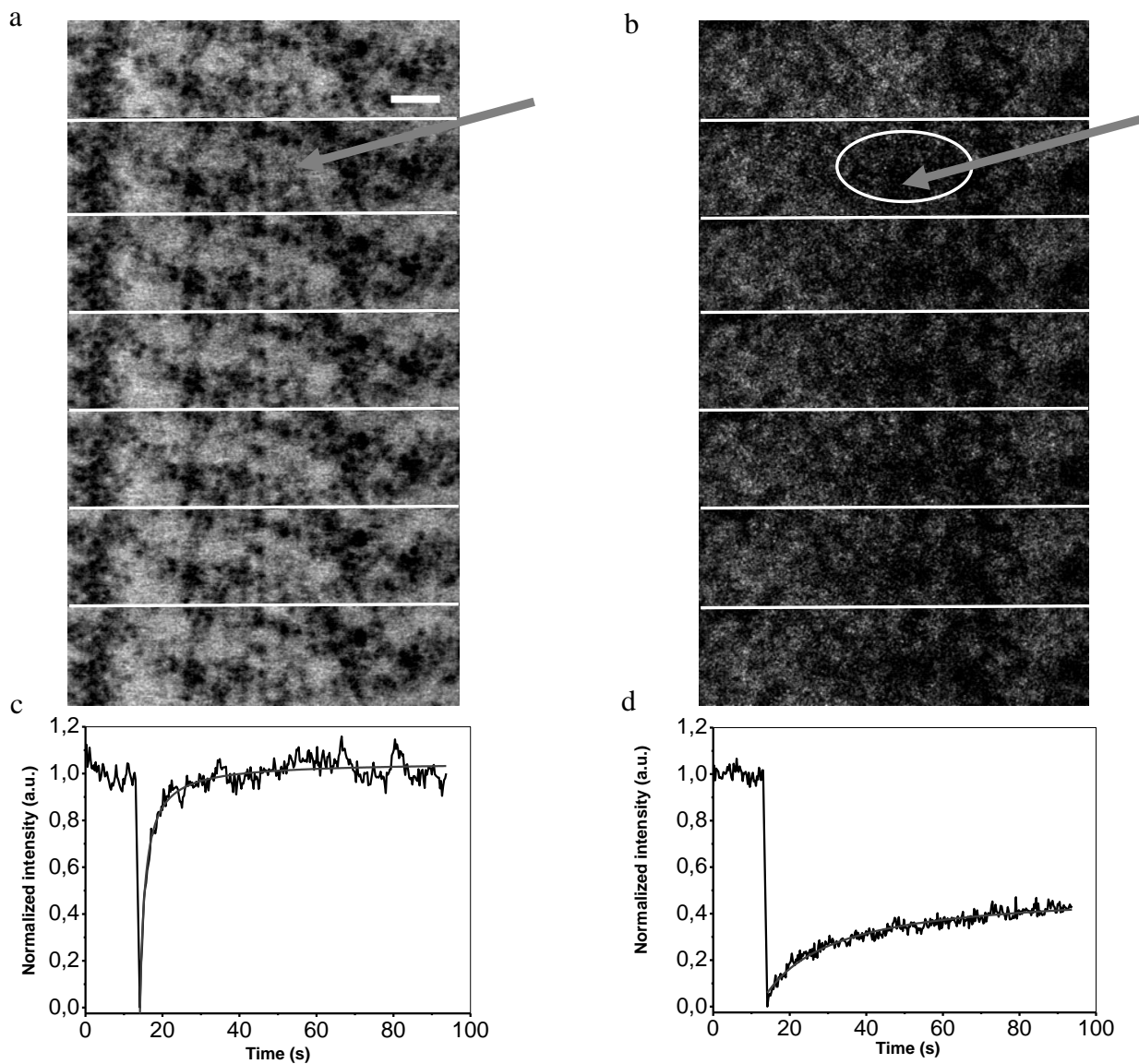


Figure 2: Typical image-based FRAP acquisitions of BODIPY (a) and BODIPY-vancomycin (b) inside *S. aureus* biofilms. Image sequence starts just before photobleaching and shows the beginning of the recovery phase (indicated by the grey arrows). (c and d) Corresponding fluorescence recovery curves, over the full sequence. The white ellipse on (b) series corresponds to the area on which the fluorescence recovery curve is calculated. The time interval between 2 images is 265 ms. The scale bar represents 5 μm .

The quantification of fluorescence recovery in the photobleached area can be visualized over time as presented in Fig. 2c and 2d. On these graphs, it can be observed that whatever the biofilm zone which is photobleached, the fluorescence recovery after the BODIPY bleach returns to its initial value that means that no fluorophore immobilisation occurred (no interaction of BODIPY with bacterial cell wall in our conditions). By contrast, no or partial fluorescence recovery is observed for BODIPY-vancomycin revealing that only a part of antibiotic molecules can diffuse in the biofilm.

3.2 Diffusion coefficient determination

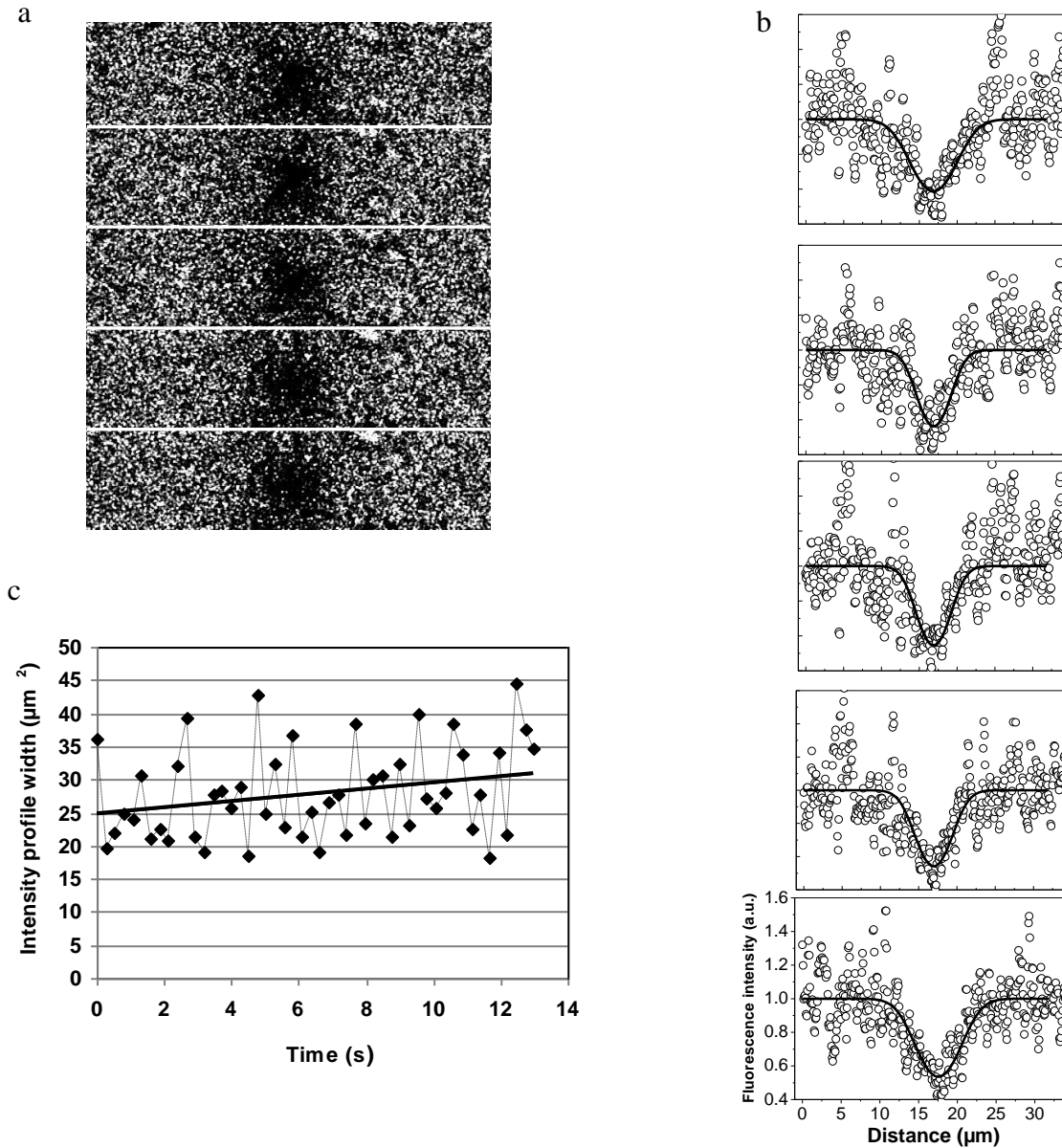


Figure 3: Determination of the diffusion coefficients by image analysis using the intensity profile method. (a) Calculated image sequence just after photobleaching, showing the beginning of the recovery. Time between two frames is 265 ms. Calculation method is developed in the ref 4. (b) Corresponding intensity profiles across the photobleached region. (c) Graph of the squared profile width as a function of time for 50 images acquired just after photobleaching. Diamonds represent experimental points; solid line results from the linear regression.

The determination of diffusion coefficients by intensity profile analysis required that the widening of the photobleached region can be visualized that was not the case for BODIPY (Fig. 2a). This result pointed out a limitation of the method which precludes to be used for fast diffusion process. Intensity profile can be extracted from the image stack sequence of BODIPY-vancomycin inside *Staphylococcus aureus* biofilm (Fig. 3a) and was fitted by a Gaussian (profiles in Fig. 3b).

We observed a low but linear variation of the squared width of the intensity profile (Fig. 3c) over time that validated some diffusion process of BODIPY-vancomycin inside the biofilm. The corresponding mean diffusion coefficient value was $0.10 \pm 0.03 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Quantitative analysis of FRAP measurements were also performed using the mathematical model of Braga.⁷ Some variability between the different BODIPY fluorescence recovery curves was observed which can be likely due to the biofilm structural heterogeneity and/or variations in the local concentration of fluorophores leading to different photobleaching amplitudes. The curve fitting (Fig. 2c) gave a mean diffusion coefficient value of $180 \pm 60 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, in agreement with the biofilm viscosity by comparison to pure water ($D = 395 \pm 60 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ as determined by FCS⁶). FRAP analysis of BODIPY-vancomycin in the biofilm (Fig. 2d) revealed that no more than $60 \pm 10 \%$ of fluorescence recovery was obtained and that the mean diffusion coefficient ($0.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) was very low by comparison to the value determined in solution by FCS ($290 \pm 60 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).⁶ Furthermore, an important dispersion of the fluorescence recovery curves was observed leading to diffusion coefficients between $0.1 - 3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

4. DISCUSSION

The image-based FRAP protocol developed under a commercial confocal microscope was successfully applied to the diffusion-reaction through a biofilm of molecules as small as antibiotic. The quality of our commercial confocal microscope allowed acquiring image sequences of 512×128 pixels size with a 265 ms time interval which gave satisfactory information on the biofilm structure and dynamics, essential for the validation of the diffusion process quantification. One interest in performing such FRAP experiments was to be able to extract information on molecular diffusion directly from the temporal intensity profile evolution. Then, the evaluation of diffusion coefficients in biofilms was only based on experimental support without any calibration measurements and was easier and more straightforward to implement on a workstation than analytical models which require strong mathematical background. Nevertheless, this FRAP measurement analysis presented some limitations,⁶ one pointed out in this study being its insufficient resolution to follow rapid molecular motion as observed for BODIPY. This could be counterpart by increasing the image acquisition rate, which can be obtained by reducing the image size. However, in that case the spatial information on the biofilm structure was not retained. Finally, we have controlled that FRAP was not destructive for the biological molecules contrary to belief due to the punctual but high laser intensity required in such experiments.

Thus should FRAP be considered as an alternative or a complementary method to FCS? There are two major experimental differences between the methods which are the used concentration (3-10 times lower for FCS than for FRAP) and the probed volume (a confocal volume of ~ 0.5 fL for FCS compared to at least 25 fL photobleached volume in our FRAP experimental conditions). Despite these experimental differences, for a pure diffusion process as observed for BODIPY inside *Staphylococcus aureus* biofilms, similar diffusion coefficients were obtained with both FRAP and FCS methods. In this case, FRAP appears as an alternative method but more convenient and attractive than FCS due to its implementation on commercial confocal microscopes.

In addition, we must keep in mind that in the "high" concentration and volume regimens encountered in FRAP experiments, the sensitivity to discriminate processes other than pure diffusion was reduced because only the average behavior of a set of molecules was observed. This corresponds to the case of BODIPY-vancomycin inside *Staphylococcus aureus* biofilm. With the low concentration range used in FCS experiments (345 nM), we have obtained correlation curves corresponding to the biofilm motion due to total interaction of the labeled antibiotic to the bacterial cell wall.⁶ In the context of FRAP experiments, fluorescence recovery curves are obtained (corresponding to a mean fluorescence recovery of 60%) but the signal analysis gave rise to a BODIPY-vancomycin diffusion coefficient drastically different to that obtained in water (580 times lower) or to that of BODIPY (360 times lower) in the same bio-environment. This can be explained neither by viscosity changes in the biofilm (by comparison to water) nor by molecular size differences between BODIPY and the labelled antibiotic. Thus, additional processes to pure diffusion must be considered, including molecular interactions with the EPS matrix and/or bacterial envelope. Confocal microscopy images had shown that after injection of BODIPY-vancomycin inside a biofilm, highly fluorescent and localized spots can be observed, revealing a selected antibiotic confinement on the bacterial cell wall by comparison to the EPS environment.⁶ Thereby, the marked effect on the FRAP measured apparent diffusion rate of BODIPY-vancomycin inside *Staphylococcus aureus* biofilm was the consequence of the equilibrium dynamic between free and linked

vancomycin with the bacterial cell wall. This was in good agreement with the molecular description of the interaction between vancomycin and bacteria which was described to be of hydrogen bond nature.⁸ It was a very interesting and specific contribution of FRAP method, to highlight the type of interaction between two molecules.

Different behaviors were observed by FCS and FRAP regarding to the diffusion-reaction of BODIPY-vancomycin in the biofilm. At nanomolar concentrations, no free diffusion of the antibiotic occurred (FCS) while at micromolar concentration FRAP measurements showed some mobility of the antibiotic, which strongly suggested that all the bacterial receptors were saturated. These complementary results provided by FRAP and FCS were of biological importance in the evaluation of bacterial receptor site number and allowed to discard a limited interaction between the drug and the bacterial envelop target to explain the biofilm tolerance to the antibiotic.⁶

5. CONCLUSION

This study demonstrates *in situ* the possible access of vancomycin to its bacterial targets in biofilms, even in the presence of an abundant organic matrix. Additional measurements also indicate i) the low activity of the antibiotic on planktonic cells when they are harvested in the stationary growth phase and ii) the high proportion of cells at reduced metabolism in biofilms of *S. aureus*. Together, these observations tend to incriminate physiological mechanisms ("slow growth") in the observed resistance phenomenon, and not a diffusion barrier of the antibiotic with its biological targets induced by the organic matrix of these bio-structures. These results stressed out the importance to consider the "biofilm phenotype" in medical therapeutics.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Mrs Sandrine Lécart (Center of biomedical photonics, Orsay, France) and Margaret Renault, Arnaud Bridier, Julien Deschamps (MIMA2 platform, INRA, Massy, France) for their technical assistance.

REFERENCES

- [1] Neu, T. R., Manz, B., Volke, F., Dynes J. J., Hitchcock, A. P. and Lawrence, J. R., "Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilms systems," *FEMS Microbiology Ecology* 72, 1-21 (2010).
- [2] Stewart, P. S., Davison, W. M., Steenbergen, J. N., "Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8), 3505-7 (2009).
- [3] Jefferson, K. K., Goldmann, D. A., Pier, G. B., "Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (6), 2467-73 (2005).
- [4] Waharte, F., Steenkeste, K., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M.-P., "Diffusion measurements inside biofilms by image-based fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis with a commercial confocal laser scanning microscope," *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (17), 5860-9 (2010).
- [5] Racine, V., Sachse, M., Salamero, J., Fraissier, V., Trubuil, A. and Sibarita, J.-B., "Visualization and quantification of vesicle trafficking on a three-dimensional cytoskeleton network in living cells," *J. Microsc.* 225, 214-228 (2007).
- [6] Daddi Oubekka, S., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M.-P., Steenkeste, K., (article submitted), "Correlative time-resolved fluorescence microscopy (Confocal Time lapse, FRAP, FCS, FLIM) to analyze antibiotic diffusion-reaction in biofilms," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2011).
- [7] Braga, J., Desterro, J. M. P. and Carmo-Fonseca, M., "Intracellular macromolecular mobility measured by fluorescence recovery after photobleaching with confocal laser scanning microscopes," *Mol. Biol. Cell.* 15, 4749-4760 (2004).

- [8] Nitanaï, Y., Kikuchi, T., Kakoi, K., Hanamaki, S., Fujisawa, I. and Aoki, K., "Crystal structures of complexes between vancomycin and cell-wall precursor analogs," J. Mol. Biol. 385, 1422-1432 (2009).

II. Article 3 : Correlative time-resolved fluorescence microscopy (Time Lapse, FRAP, FCS, FLIM) to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms

Article accepté pour publication. Daddi Oubekka *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2012).

II. Article 3

Correlative time-resolved fluorescence microscopy (Time-Lapse, FRAP, FCS, and FLIM) to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms

Running title: Diffusion of antibiotics in biofilms

S. Daddi Oubekka,^{1,2,3} R. Briandet,^{4,5} M.-P. Fontaine-Aupart,^{1,2,3} and K. Steenkeste^{1,2,3#}

¹Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, UMR 8214, Orsay, F-91405;

²CNRS, Orsay, F-91405;

³Univ Paris-Sud, Centre de Photonique Biomédicale, Fédération LUMAT, FR2764, Orsay, F-91405;

⁴INRA, UMR 1319 Micalis, Jouy-en-Josas, F-78352;

⁵AgroParisTech, UMR Micalis, Massy, F-91300;

to whom correspondence should be addressed: karine.steenkeste@u-psud.fr

ABSTRACT

Failure of antibiotics to inactivate *in vivo* pathogens organized in biofilms is described to trigger chronic infections. Besides mechanisms involving specific genetic or physiological cell properties, antibiotic sorption and/or reaction with biofilm components may lessen the antibiotic bioavailability and consequently decrease their efficiency. To assess locally and accurately the antibiotic diffusion-reaction, we used for the first time a set of advanced fluorescence microscopic tools (FRAP, FLIM, and FCS) that open up spatio-temporal resolution not available with the commonly used time-lapse confocal imaging method. This correlative approach was applied to the fluorescently labeled vancomycin in *Staphylococcus aureus* biofilms. We demonstrated that, at therapeutic concentration of vancomycin, the biofilm matrix was not an obstacle to the diffusion-reaction of the antibiotic that can reach all cells through the biostructure.

INTRODUCTION

Biofilms are composed of micro-organisms entrapped in a hydrated matrix of organic exopolymeric substances (EPS) produced by the cells themselves. EPS are mainly composed of polysaccharides, proteins, nucleic acids, lipids, and heteropolymers that are interlaced by a vast number of weak interactions (hydrogen bonds, hydrophobic, electrostatic, van der Waals interactions, divalent cation bridges, etc.) giving the 3D assemblage a viscoelastic nature (8). Such reactive molecular environment pointed to the proposal that this biomass could act as a diffusion barrier that lessens the antimicrobial bioavailability and thus be a contributing factor to biofilm antibiotic tolerance. It is the case of tobramycin, a polycationic aminoglycoside that interacts electrostatically with the polyanionic alginate matrix of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms (21). In addition, antibiotic sorption may be highly dependent on microenvironment heterogeneity (dense clusters of polysaccharides, DNA resulting from cell lysis, etc.) that can also induce heterogeneity of the antibiotic irrigation. The cells are thus locally exposed to varying concentrations of antibiotics leading to some subinhibitory concentrations of the antibiotic through the biofilms.

Fluorescence microscopy represents an essential and non-invasive method to assess antimicrobial dynamics and reactivity in biofilms, contributing to understand what makes bacteria resistance in these biostructures (2, 4, 7, 28). In this respect, Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) has been shown to be a powerful tool to analyze antimicrobial actions indirectly by a time-course (hour to day scale) visualization of live and dead cells through the biofilm structure (3, 16, 28, 32). However, this approach is unlikely to allow distinguishing survivor cells that were not reached by the active molecules (diffusion-reaction limitation through the matrix) from survivors with resistant physiology (biofilm “phenotype”).

More recently, the emergence of fluorescently tagged antimicrobials, including antibiotics, allowed their direct tracking (second to minute scale) through biofilms by time-lapse microscopy (17, 27). The available studies highlight various behaviors depending on the biofilm models and/or the antibiotics considered. For example, it was observed that tetracycline and daptomycin quickly (few minutes) make their way into *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms respectively (26, 27), while it takes about one hour for vancomycin to diffuse through a mucoid model of *Staphylococcus aureus* biofilm (17). From these studies, it can be noted that no consensus has been reached yet on the role of the EPS matrix of biofilms as a barrier to the diffusion–reaction of antibiotics.

Although time-lapse imaging represents an essential versatile tool, visualizing in real time the penetration of the antibiotic through the biofilm depth, the method is limited in its temporal resolution giving only access to initial diffusive rates. No further measurements are available when the antimicrobials have reached equilibrium inside the biomatrix though it is of importance to follow their reactivity on the time scale of antibiotic exposure (several hours to days). To overcome this limitation, we took advantage of the large potential offered by advanced CLSM methods including Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) (6, 30), Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) (1, 12, 13), and Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) (4, 12, 20). These methods have not only allowed significant advances owing to their performance in terms of spatial resolution (sub-micrometric) and sensitivity (nanomolar to micromolar therapeutic antibiotic concentrations), but they have also provided non-invasive conditions of observation consistent with studies on biofilms after several hours of contact with the antibiotics. They allow discriminating free from restricted diffusion of the antibiotics, as well as quantifying their reaction with biofilm components.

The purpose of the current study was to highlight the strength of such correlative time-resolved fluorescent microscopy approaches to assess / understand the diffusion-reaction of vancomycin labeled with BODIPY® within *Staphylococcus aureus* biofilms.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain, media, and antibiotics

Two *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains, ATCC 6538 and ATCC 27217, and one *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) strain, ATCC 15442, were used in the present study. The stock cultures were kept at -80°C in Tryptic Soy Broth (TSB, BD-DIFCO, France) containing 20% (vol/vol) glycerol. Prior to each experiment, the frozen cells were subcultured twice in TSB. Bacteria growth and experiments were both conducted at 30°C. The fluorescently labeled antibiotic BODIPY®-vancomycin and free BODIPY® were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). The lyophilisates were dissolved in sterile MilliQ water for BODIPY®-vancomycin and in DMSO for BODIPY® to obtain stock-solutions of 69 µM and 34.5 mM, respectively. These stock-solutions, kept at -20°C before use, were then diluted to working concentrations: 345 nM for FCS, 6.9 µM for FLIM, and in the range 6.9-345 µM for FRAP measurements.

Biofilm preparation

For preparation of *S. aureus* biofilms, 500 μL of an overnight subculture adjusted to an $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ of 0.03 (corresponding to $\sim 10^7$ CFU/ml) were added into 4-well sterile microscopic chambers (Lab-Tek; Nunc, Thermo Scientific, France) or 250 μL in 96-well microplates ($\mu\text{Clear}^{\text{®}}$, Greiner Bio-One, France) under humidified air conditions. After a 1.5 h adhesion period at 30°C, the wells were rinsed with 150 mM NaCl in order to eliminate non-adherent cells, refilled with sterile TSB, and then incubated for 24 h at 30°C to allow biofilm growth. As TSB contains traces of fluorescent compounds the biofilms were rinsed with 150 mM NaCl and refilled with the non-fluorescent RPMI 1640 medium (GIBCO $^{\text{®}}$, Invitrogen, France) prior measurements. Three-day-old *P. aeruginosa* biofilms were prepared according to *S. aureus* biofilm protocol but using M9 minimal growth media (DIFCO, France) that was replaced with fresh medium every day. Examples of the distribution of cells, EPS, and interstitial voids after a 24 h biofilm growth period are provided in supplemental materials (Fig. S1).

Visualization of antibiotic-cell wall binding

The antibiotic-cell binding was visualized as described by Gilbert et al. (10). Briefly, BODIPY $^{\text{®}}$ -vancomycin was mixed with an equal amount of unlabeled vancomycin giving a final concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the mixture added to *S. aureus* cells from exponentially growing cultures. After a 30 min incubation period at 30°C, cells were deposited on a polylysine coated slide (Kindler GmbH, VWR, France) and then visualized by fluorescence microscopy. In addition, the visualization of the nascent peptidoglycan was obtained using the protocol of Pinho and Errington (22).

Visualization of antibiotic penetration

BODIPY $^{\text{®}}$ -vancomycin diffusive penetration through our biofilm models was measured by time-lapse microscopy using a Leica SP2 AOBS Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) (Leica Microsystems, France), implemented at the MIMA2 microscopy platform of Massy). For these experiments, the labeled antibiotic was excited with a continuous argon laser line at 488 nm through a 63 \times oil immersion objective and the emitted fluorescence was recorded within the range 500-650 nm. The focal plane inside the biofilms (thickness $\sim 30\mu\text{m}$) was set approximately 5 μm above the glass surface. An x-y time series was then initiated in which an image of 512 \times 128 pixels corresponding to $\sim 40 \times 10 \mu\text{m}^2$ was collected every 3 s.

The time series was recorded for 10 min. Images were analyzed with the Leica software (Lite, Leica Microsystems, France). BODIPY® and BODIPY®-vancomycin solutions were added very gently to the medium over the biofilm: transmission imaging ascertains that no structural alteration of the biofilm occurred during this process.

The corresponding diffusive penetration coefficients (D_p) through the biofilms were determined according to the relationship described by Stewart for flat structures (25):

$$D_p = 1.03 \times L^2/t_{90} \quad (1)$$

where L corresponds to the biofilm thickness and t_{90} to the time required to attain 90% of the equilibrium staining intensity at the deeper layers of the biofilm.

Time-resolved fluorescence microscopies

All time-resolved fluorescence measurements were obtained on the same confocal microscope Leica SP5 (Leica Microsystems, France, implemented at the Centre de Photonique Biomédicale of Orsay) equipped with a high numerical aperture (1.4) 63× oil immersion objective and coupled with either continuous lasers for FCS and FRAP acquisitions or a femtosecond Titanium:sapphire laser (Chameleon-XR, Coherent USA) running at 80 MHz repetition rate and delivering pulses of 150 fs for fluorescence decay time and FLIM measurements.

FRAP: For all FRAP experiments, the fluorescence intensity image size was fixed to 512×128 pixels with a 80 nm pixel size in order to ensure usable spatial information on the biofilm ($\sim 40 \times 10 \mu\text{m}^2$) and recorded using 16-bit resolution to improve image analysis. The line scan rate frequency was fixed to 1400 Hz that corresponds to a total time between frames of ~ 265 ms. The full widths at half maximum in xy and z (along the optical axis) of the bleached profile were 0.8 μm and 14 μm , respectively, as determined previously (30).

Each FRAP experiment started with the acquisition of 50 image scans at 3% of laser maximum intensity (which was measured to be $\sim 7 \mu\text{W}$ at the object level) and followed by a single bleached spot of 100 ms at 100% laser intensity. A series of 300 single section images was then collected with the laser power attenuated to its initial value (3% of the bleach intensity); the first image was recorded 365 ms after the beginning of bleaching. Under these image acquisition conditions, FRAP measurements could be acquired in 74 s and ensured bacteria viability as controlled with a live-dead staining labeling.

The fluorescence recovery curves here reported were analyzed using the adapted mathematical model of Braga as previously detailed (30). It must be noted that a 2D diffusion

was considered in view of the axial (14 μm) and lateral (0.8 μm) extents of the photobleaching pattern: diffusion along the axial/vertical axis can be neglected.

FCS: Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements were performed point-by-point using the 488 nm line of a continuous Ar laser. The emission output was focused on a PicoHarp 300 module (PicoQuant, Germany) equipped with a Single Photon Avalanche Diode detector (SPAD, time resolution of 250 ps). The emitted fluorescence was recorded within the range 500-650 nm. Data acquisition was performed with the SymPhoTime software (PicoQuant, Germany) which computes on-line the correlation function of fluorescence fluctuations. To measure the translational diffusion time with 10% to 20% accuracy, fluorescence temporal signals in water were collected in runs of 60 s (number of iterations 5-10). In the biofilms, acquisition time was increased to 120 s and each experiment was repeated 10 times at ~15 randomly selected locations (to account for biofilm heterogeneity). The data were analyzed using both the SymPhoTime software (PicoQuant, Germany) and an in-house Matlab routine which enabled: (i) the selection and averaging of chosen successive acquisitions, (ii) the adaptation of different diffusion models to analyze the autocorrelation function, and (iii) the calculation of associated standard deviations. The incident laser energy was attenuated to less than 1 mW at the sample in order to reduce the risk of photobleaching. In these experiments, we assumed that the excitation intensity profile could be approximated using a three-dimensional Gaussian distribution and that no additional “blinking” dynamics of the fluorophore occurred other than its diffusion through the excitation volume; then each fluorescence autocorrelation ($g(\tau)$) curve was fitted using a two-component free Brownian motion model:

$$g(\tau) = \frac{1}{\sqrt{8N}} \left[a \left(\frac{1}{1+(\tau/\tau_1)} \right) \left(\frac{1}{1+(\omega_0/z_0)^2(\tau/\tau_1)} \right)^{1/2} + (1-a) \left(\frac{1}{1+(\tau/\tau_2)} \right) \left(\frac{1}{1+(\omega_0/z_0)^2(\tau/\tau_2)} \right)^{1/2} \right] \quad (2)$$

where N is the number of fluorescent molecules in the excitation volume; a and $(1-a)$ are the fractions of the molar concentrations of the two diffusive species, and τ_1 and τ_2 their respective translational diffusion times; ω_0 and z_0 are the radial and axial radii of the confocal volume. They were determined by previous calibration experiments ($\omega_0 = 0.25 \pm 0.04 \mu\text{m}$ and $z_0 = 0.84 \pm 0.1 \mu\text{m}$) and fixed throughout the fittings.

The diffusion coefficient (D) could be related to the translational diffusion time τ_i using the equation:

$$D = \omega_0^2/4\tau_i. \quad (3)$$

All the FCS data reported here are averages of at least 10 independent sample preparations.

Fluorescence lifetime and FLIM measurements: The BODIPY®-labeled samples were biphotonically excited at 950 nm. The fluorescence signal was collected by the PicoHarp 300 device based on time-correlated single-photon counting method. A 800 nm short-pass emission filter was used to remove any residual laser light and the emitted fluorescence was recorded within the range 500-650 nm.

The observed time-resolved decays were deconvoluted with the instrumental response function obtained on a picric acid solution. They were fitted by a sum of discrete exponentials, which allowed us to obtain the kinetic parameters (fluorescence lifetimes and populations) of the sample with a 100 ps time resolution. To obtain 2D-fluorescence lifetime images, the laser beam was scanned on the cell surface at 400 Hz, which gave an acquisition mean-time of about 10 min to cover a field of view of $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ (64×64 pixels).

RESULTS

Assessing BODIPY®-vancomycin interaction with planktonic *S. aureus* bacteria

The specific binding of BODIPY®-vancomycin to planktonic *S. aureus* bacteria was determined using both FCS and time-resolved fluorescence emission.

Before carrying out studies in the presence of bacteria, FCS measurements were performed using the free BODIPY® and BODIPY®-vancomycin probes in aqueous solution (water viscosity $\eta = 0.96$ cp at 295 K). Typical experimental fluorescence correlation curves are presented in Fig. 1a, showing a reproducible shift of BODIPY®-vancomycin curve by comparison to that of free BODIPY®. The diffusion times obtained by fitting the experimental curves (Eq. 2) and the corresponding diffusion coefficient values calculated using Eq. 3 are summarized in Table 1. The slight difference in the data measured between the two fluorescent probes was in line with the influence of the probe size on mobility.

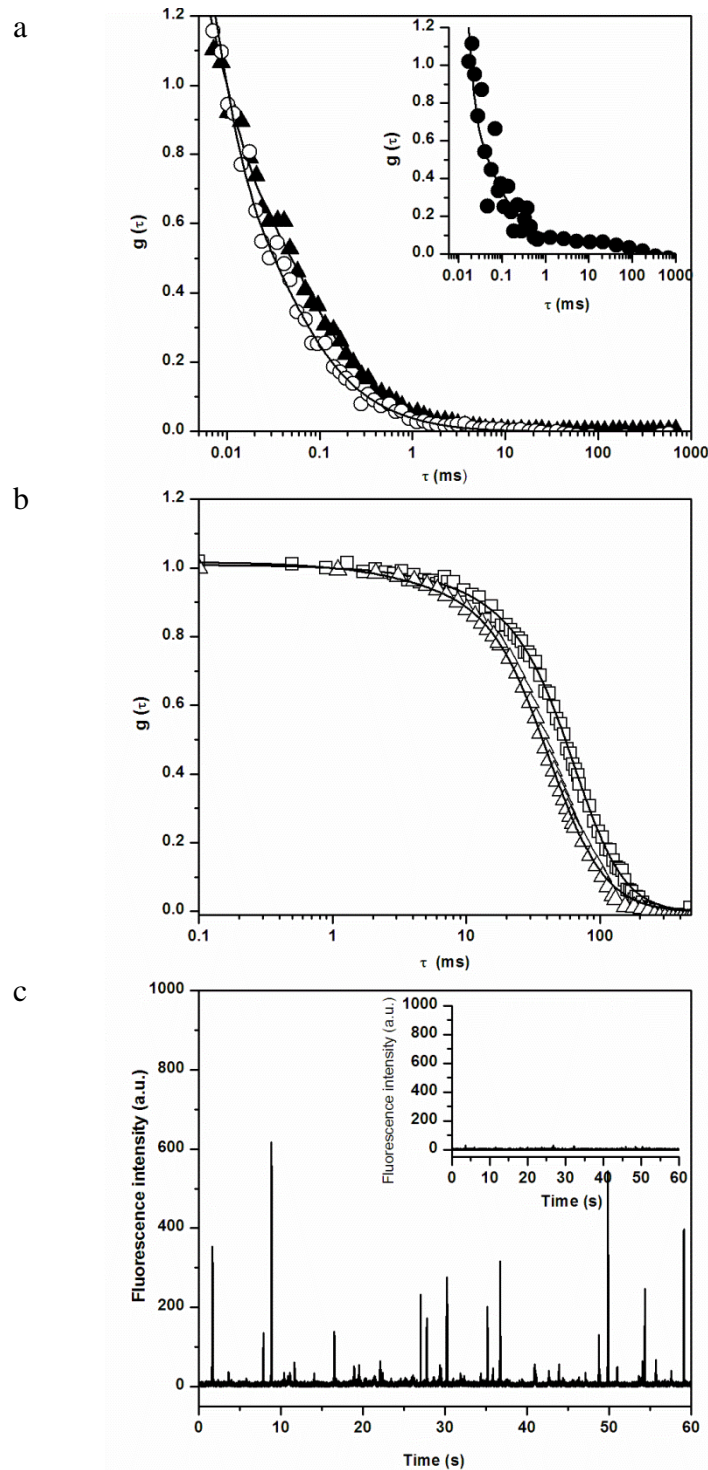


Fig. 1: (a) Normalized fluorescence autocorrelation curves $g(\tau)$ for BODIPY® (○) and BODIPY®-vancomycin (▲) in solution. Insert (●) correlation curve $g(\tau)$ for BODIPY® in the presence of *S. aureus* planktonic cells. (b) Normalized fluorescence autocorrelation curves $g(\tau)$ for *S. aureus* planktonic cells without (□) and with (Δ) BODIPY®-vancomycin revealing interaction of vancomycin with *S. aureus* cell wall. (c) Fluorescence time traces for *S. aureus* planktonic cells without (insert) and with BODIPY®-vancomycin. In the presence of labeled vancomycin the fluorescence intensity is much higher confirming the presence of the antibiotic in the excited volume.

We checked that the remaining autofluorescence of planktonic *S. aureus* bacteria was high enough to create an additional correlation signal as illustrated in Fig. 1b. The corresponding time range of bacteria diffusion was ~30-100 ms, depending on the presence of cell aggregates. In the presence of free BODIPY®, the fluorescence correlation curve analysis using Eq. 2 corresponds to a combination of the diffusion coefficients for BODIPY® and planktonic bacteria (Fig. 1a, insert, Table 1). Because of this bacteria contribution, some dispersion in the fast BODIPY® diffusion time was observed by comparison to water. This must not be interpreted as an effect of the probe diffusion that remains unchanged in the presence of bacteria.

		In water		With <i>S. aureus</i> planktonic cells	
		BODIPY®	BODIPY®-vancomycin	BODIPY®	BODIPY®-vancomycin
FCS	τ_1	38 ± 6 μ s (100%)	52 ± 11 μ s (92%)	54 ± 9 μ s (87%)	30-100 ms (100%)
	D_1	395 ± 60 μ m ² /s	290 ± 60 μ m ² /s	278 ± 46 μ m ² /s	0.15-0.50 μ m ² /s
	τ_2	/	1.26 ± 0.62 ms (8%)	30-100 ms (13%)	/
	D_2	/	12 ± 6 μ m ² /s	0.15-0.50 μ m ² /s	/
FLIM		5.7 ± 0.2 ns	5.7 ± 0.2 ns	5.7 ± 0.2 ns	4.5 ± 0.2 ns

Table 1: Diffusion time (τ_1 and τ_2) obtained from fitting with the equation from the fluorescent correlation curves, their corresponding diffusion coefficients calculated and fluorescence lifetime for BODIPY® and BODIPY®-vancomycin in water and with *S. aureus* planktonic cells. The percentage presented between brackets corresponds to the ratio of free diffusion and hindered diffusion.

By contrast, the correlation curves measured after adding BODIPY®-vancomycin to a bacterial suspension could be superposed on those obtained with planktonic bacteria in solution (Fig. 1b, Table 1). Furthermore, a much more intense fluorescence count rate burst was recorded in the presence of BODIPY®-vancomycin (Fig. 1c) by comparison to planktonic bacteria that ascertain the presence of the antibiotic in the bacterial suspension. Altogether, these results demonstrate that BODIPY®-vancomycin interacts with planktonic

bacteria from the vancomycin part of the molecule, which is confirmed by time-resolved fluorescence emission.

In the absence of bacteria, the fluorescence decay of BODIPY®-vancomycin could be superposed on that of free BODIPY®. It is monoexponential, corresponding to a fluorescence lifetime of 5.7 ± 0.2 ns (Table 1, Fig. 2a), which is in good agreement with a previous report (18). The presence of bacteria does not affect the dynamic fluorescence properties of BODIPY®. Combining this result with FCS data suggests the absence of strong interaction between the fluorescent probe and the bacterial cell wall. By contrast, BODIPY®-vancomycin fluorescence lifetime is shortened to 4.5 ± 0.2 ns in the presence of bacteria (Table 1, Fig. 2). Such a variation in the fluorescence decay time reflects a change in the vicinity of the fluorophore, consistent with an interaction of the vancomycin part of the labeled antibiotic with the bacteria surface.

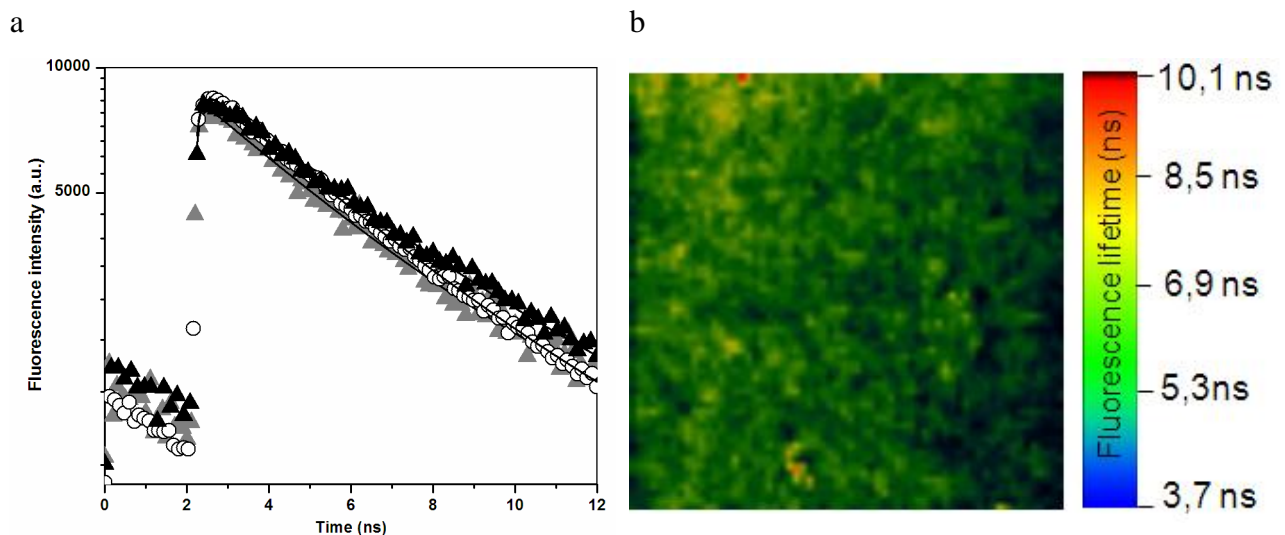


Fig. 2: (a) Fluorescence lifetime decay for BODIPY®-vancomycin in solution (\blacktriangle), with *S. aureus* planktonic cells (grey triangle) and in biofilms (\circ). (b) FLIM map of BODIPY®-vancomycin inside *S. aureus* biofilms.

In the light of these data, we examined the possibility to visualize the cellular binding pattern of the fluorescent conjugated antibiotic by fluorescence microscopy using the protocol described in the Materials and Methods section. Figure 3a shows that BODIPY®-vancomycin was distributed evenly around the planktonic cell wall but preferentially to the division septum sites upon cell division (Fig. 3b). This is in good agreement with the reported

specificity and affinity of the antibiotic to bind preferentially to the terminal D-Ala-D-Ala of nascent peptidoglycan at the cell septum but also to the dipeptide present on the surface of the bacteria (10, 22). Similar fluorescence imaging was also performed in the presence of free BODIPY®: neither bacteria nor BODIPY® fluorescence was detected confirming that the fluorophore did not interact with the *S. aureus* cell wall.

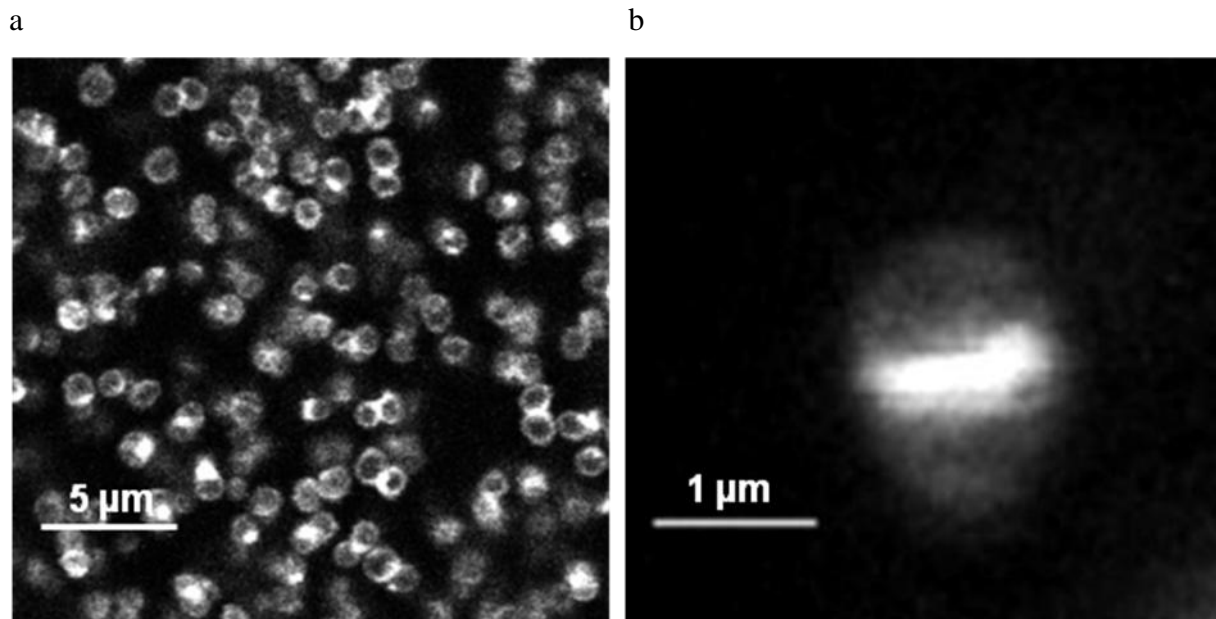


Fig. 3: Fluorescence imaging of BODIPY®-vancomycin interacting with *S. aureus* planktonic cells (a) at the single cell level (b) allowing peptidoglycan synthesis to be visualized.

BODIPY®-vancomycin diffusion-reaction inside *S. aureus* biofilms

Time-lapse imaging: Visualization of both BODIPY® and BODIPY®-vancomycin penetration through *S. aureus* biofilm depths (thickness ~30 µm) was performed. The fluorescence signals at the deeper layers of the biofilm (biofilm slide adjacent to the coverslip) were measured within 2-3 min for *S. aureus* ATCC 6538 and ~8 min for *S. aureus* ATCC 27217 (Fig. 4 and Movie 1 in the supplementary material). The fluorescence intensity reached a plateau that remained steady. The equilibrium distribution of the labeled antibiotic through each *S. aureus* strain is illustrated in Fig. 4c and 4d. We can observe that the antibiotic labeled preferentially bacterial cell walls through all depths of the biofilms. By comparison, maximal fluorescence of free BODIPY® occurred within the time taken to obtain an x-y plane image (less than 3 s). The corresponding D_p values obtained from Eq. 1

are listed in Table 2. Diffusion of free BODIPY® was too fast to be quantified by time-lapse confocal imaging.

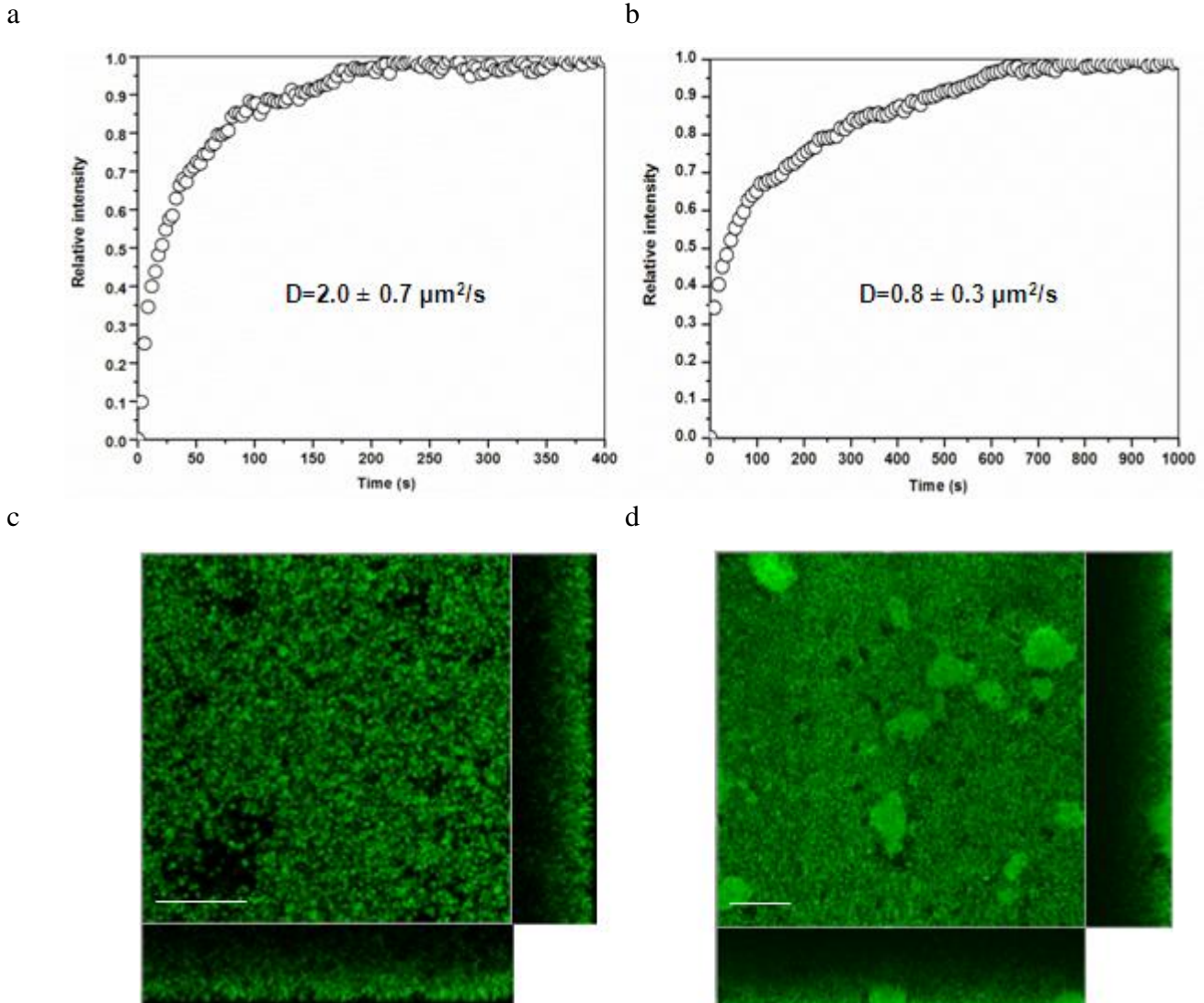


Fig. 4: Time course of BODIPY®-vancomycin penetration measured at the bottom of *S. aureus* ATCC 6538 (a) and ATCC 27217 (b) biofilms. The relative intensity corresponds to a normalization of the maximum intensity value to one. (c and d) The corresponding intensity images showing BODIPY®-vancomycin penetration in the whole structure of biofilms. The scale bar represents 20 μm .

FRAP imaging: Our group has recently developed an image-based FRAP protocol to improve the accuracy of FRAP measurements inside biofilms (6, 30). In particular, we have introduced the kymogram representation as illustrated in Fig. 5a and 5d, to check biofilm stability during fluorescence recovery curve acquisitions and validate the data.

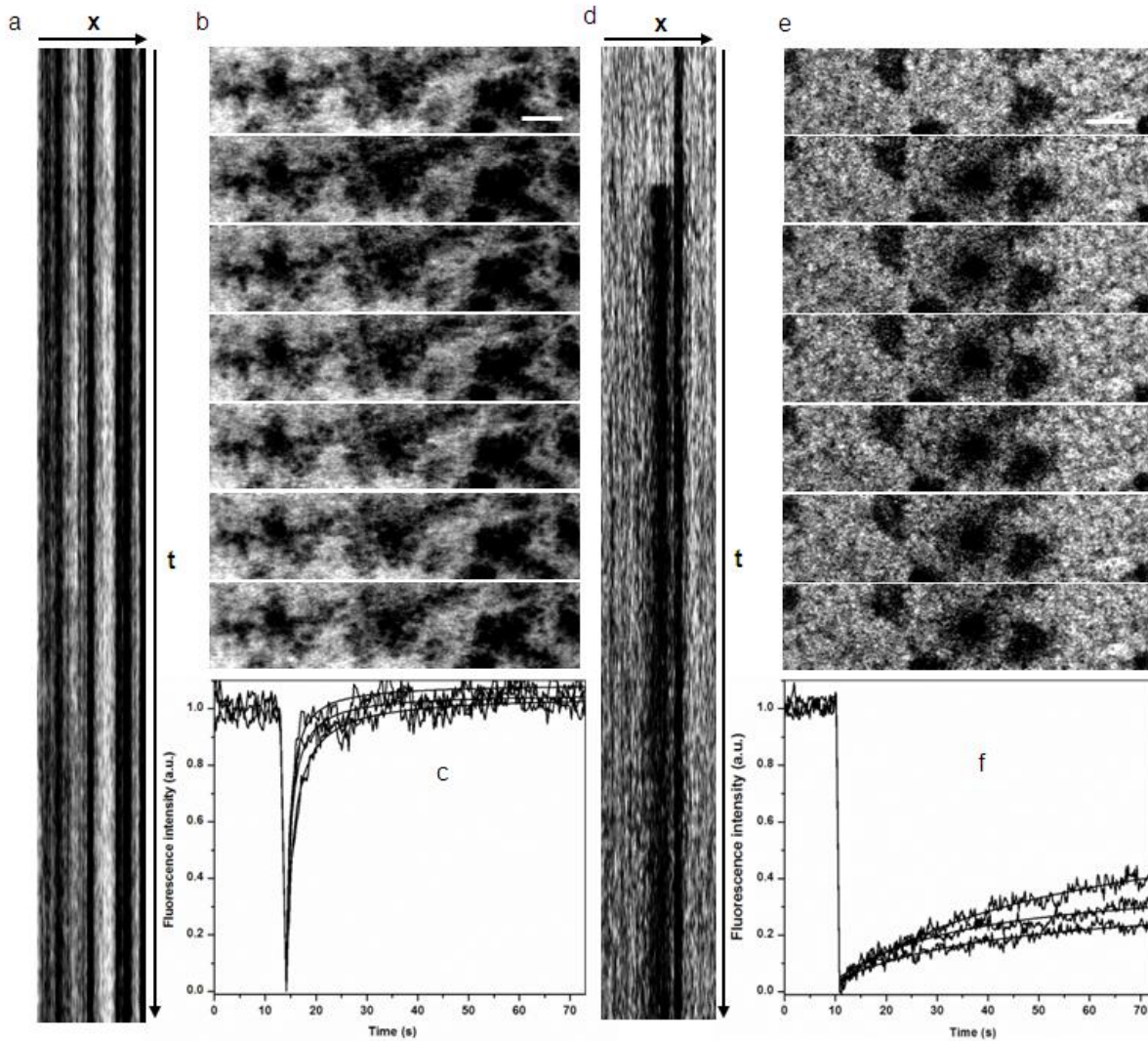


Fig. 5: FRAP acquisitions for BODIPY® and BODIPY®-vancomycin inside *S. aureus* ATCC 27217 biofilms. (a and d) kymogram representation (xy) of FRAP acquisitions. (b and e) Image sequence starting just before photobleaching and showing the beginning of the recovery phase. (c and f) Typical fluorescence recovery curves recorded in three different zones of the biofilms showing a total fluorescence recovery for BODIPY® and a partial fluorescence recovery for BODIPY®-vancomycin. The time interval between two images is 265 ms. The scale bar represents 5 µm.

FRAP experiments (image acquisition, fluorescence recovery curve) of BODIPY® and BODIPY®-vancomycin in each type and different parts of *S. aureus* biofilms were performed (Fig. 5b and 5e). Over the time range of our observation (74 s), complete fluorescence recovery of BODIPY® was observed (Fig. 5c). By contrast, only partial recovery of BODIPY®-vancomycin was measured inside each strain of *S. aureus* biofilm corresponding to a mobile fraction respectively of $\sim 60\% \pm 10\%$ in *S. aureus* ATCC 6538 biofilm and ranging from 20% to 60% in *S. aureus* ATCC 27217 biofilm (Fig. 5f) depending on the local EPS nature: FRAP measurements acquired in extracellular DNA clusters (corresponding to red zones in Fig. S1) reveal much lower mobile fractions. A control experiment ascertains that without the photobleaching phase, the fluorescence signal is stable during the acquisition time. The local diffusion coefficients at equilibrium (D) determined using the mathematical model of Braga are summarized in Table 2. They are of the same order of magnitude as D_p estimated from time-lapse confocal imaging analysis.

Otherwise, the image sequences acquired during FRAP measurements (Fig. 5b and 5e) reinforce the privileged location of the antibiotic on the bacterial cell surface while free BODIPY® localized in the intercellular space.

		BODIPY®	BODIPY®-vancomycin	
			ATCC 6538 strain	ATCC 27217 strain
Time lapse	D_p ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	< 140	2.0 ± 0.7	0.8 ± 0.3
FRAP	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	180 ± 60	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1
FCS	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	242 ± 36	Biofilm motion	/

Table 2: Diffusion coefficients of BODIPY® and BODIPY®-vancomycin measured in ATCC 6538 and ATCC 27217 *S. aureus* biofilms using different time resolved fluorescence techniques (Time-lapse, FRAP and FCS).

FLIM measurements: Atypical fluorescence lifetime image of BODIPY®-vancomycin in *S. aureus* biofilm is reported in Fig. 2b. On a x-y plane, the fluorescence lifetime appears homogeneous over the entire surface and corresponds to a mean value between 5-7 ns. It must be noted that in our images, only few thousand of photons were counted in each pixel. Regarding the fluorescence decay times in details (Fig. 2b) thus required to collect all the

photons acquired in a x-y plane. An average lifetime τ_f of 5.0 ± 0.2 ns for BODIPY®-vancomycin in *S. aureus* biofilm was obtained that can be correlated with 50% of the molecules in their free form ($\tau_f = 5.7$ ns) and 50% in their bound form as determined in the presence of planktonic bacteria ($\tau_f = 4.5$ ns).

FCS measurements: FCS measurements were also performed in different areas of *S. aureus* biofilms (at the biofilm base and surface, and in the biofilm thickness). In the absence of BODIPY®-vancomycin, only small fluorescence intensity fluctuations around a low mean value are observed (Fig. 6a, insert). The analysis of corresponding autocorrelation curves leads to a diffusion time of a few hundred milliseconds (Fig. 6b). This value higher than that obtained for planktonic cells, is consistent with the constrict movement of bacteria embedded in an exopolymeric matrix, more viscous than a culture medium (1). We also checked that free BODIPY® has similar diffusion properties inside the biofilm as in aqueous environment, confirming that no strong interaction occurs between the fluorophore and bacteria and/or the EPS matrix (Fig. 6b, insert).

For *S. aureus* biofilms treated with BODIPY®-vancomycin, the recorded fluorescence time trace (Fig. 6a) shows a significant increase in the fluorescence intensity fluctuations by comparison to the time trace obtained in the absence of the antibiotic. Whatever the area considered, diffusion times of the same order of magnitude as in non-treated biofilms are obtained corresponding to that of biofilm motion (Fig. 6a) suggesting at the nanomolar concentration used in FCS measurements, a total interaction of vancomycin with *S. aureus* biomass.

In order to test whether the inhibition of free antibiotic diffusion could be attributed to non-specific interactions with the biomass, FCS experiments were extended to *P. aeruginosa* biofilm incubated with BODIPY®-vancomycin. This Gram negative bacterium is known to be insensitive to the antibiotic due to the absence of the D-Ala-D-Ala targets on the outer cell envelope. Figure 6c shows that the typical autocorrelation curve, obtained over several horizontal scans and at different depths within low dense zones of the biofilm matrix (Fig. S1c). The corresponding BODIPY®-vancomycin diffusion time τ_1 is 67 ± 25 μs ($D=224 \pm 80$ $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$), close to the value obtained for unreactive BODIPY® in *S. aureus* biofilm). This ascertain that the labeled antibiotic freely diffuses through a biofilm composed of cells devoid of antibiotic targets.

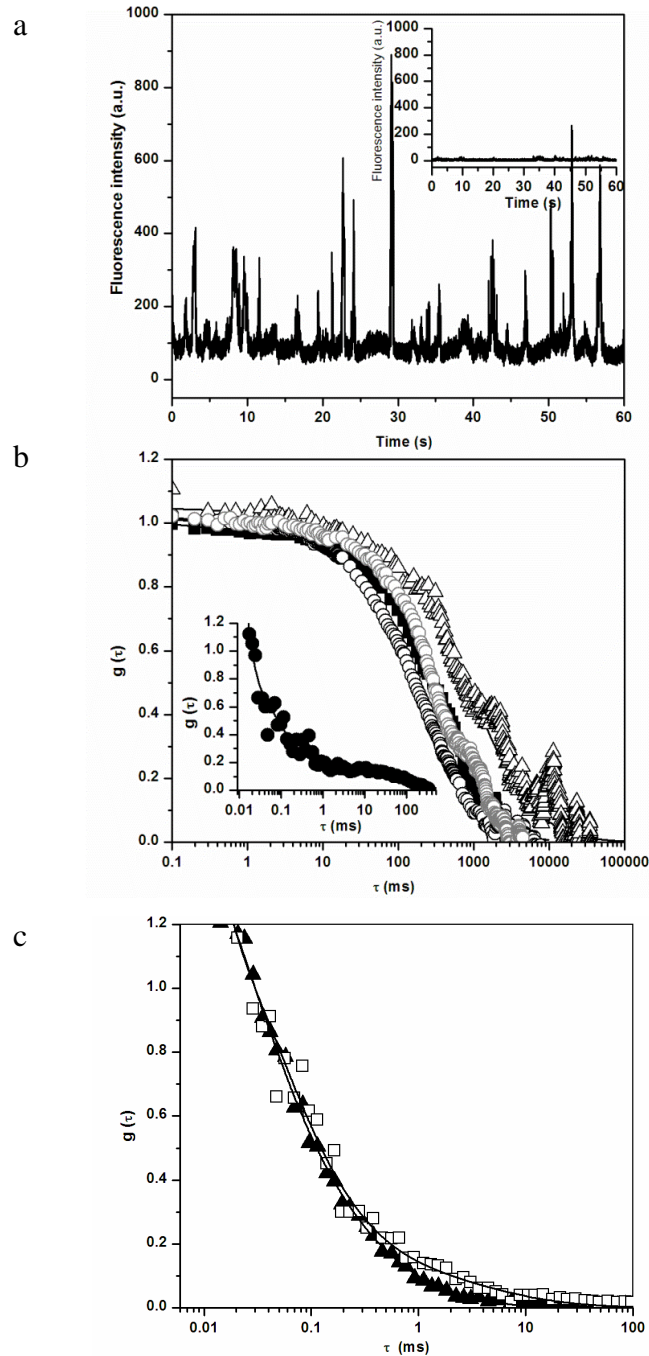


Fig. 6: (a) Fluorescence time traces for *S. aureus* biofilm without (insert) and with BODIPY®-vancomycin. In the presence of labeled vancomycin the fluorescence intensity of biofilm cells increases which corresponds to the motion of fluorescently cell aggregates in the excitation volume. (b) Normalized autocorrelation fluorescence curves $g(\tau)$ for BODIPY®-vancomycin interaction with *S. aureus* cells inside biofilm. The measures were taken in different zones (Δ) ~ 3 μm , (\blacksquare) ~ 10 μm and (\circ) ~ 25 μm from the biofilm coverslip interface. The fit of the curves (straight lines) was obtained using Equation 2. The gray curve corresponds to the motion of *S. aureus* biofilm without BODIPY®-vancomycin. (insert) $g(\tau)$ for BODIPY® diffusion inside *S. aureus* biofilm. (c) Autocorrelation fluorescence curves $g(\tau)$ for BODIPY®-vancomycin diffusion with *P. aeruginosa* biofilm. The measures were taken in (\square) (zone 1) and outside (\blacktriangle) (zone 2) the mushroom structure of the biofilm. The fit of the curves (straight lines) was obtained using Equation 2.

DISCUSSION

Medicine today is faced with the consideration of infections involving biofilms on both the surface and the internal tissues of the host or on invasive devices such as catheters and implants (5). The presence of biofilms (vs planktonic cells) during infection is not diagnosed by current methods of medical bacteriology (except in few cases for superficial infections) and thus all infections are treated the same way. However, experimental evidence have accumulated showing that the biofilm can be a shield to the action of antimicrobials and of the immune system (9). Hence, antibiotics with high performance against planktonic exponential growth phase bacteria *in vitro* may be less successful in clearing biofilm infections *in vivo*.

Understanding the mechanisms of biofilm resistance to antimicrobials, especially antibiotics, has become a challenge for the medical community. This is especially important at a time when bacterial strains resistant to any form of conventional antibiotherapy are emerging, as it is the case for *S. aureus* (14).

It is now well established that horizontal gene transfers, and in particular those related to antibiotic resistance, occur at a much higher frequency between cells in a biofilm than between their planktonic counterparts (15). However, besides these acquired traits of genetic resistance, biofilm spatial organization may also be the cause of high antibiotic tolerance (15). The associated mechanisms may involve specific cell physiology and the matrix of the biofilm that could act as a barrier to the diffusion-reaction of the antibiotics by retarding its penetration and/or restricting its bioavailability.

This work aimed to dissect non-invasively the action of vancomycin on *S. aureus* biofilms using a set of advanced dynamic fluorescence imaging methods including confocal time-lapse imaging already widely used, but also FLIM, FRAP, and FCS methods.

Is the exopolymeric matrix of *S. aureus* biofilms an obstacle to the diffusion-reaction of vancomycin?

The only results available in the literature on the mobility of BODIPY®-vancomycin inside *S. aureus* biofilms were reported by Jefferson *et al* (17). They observed a low rate of penetration of the antibiotic through their highly mucoïd matrix (full biofilm irrigation with vancomycin can take more than one hour). It was then hypothesized that a gradual cell exposure to the antibiotic could allow bacteria to undergo stress induced by metabolic or transcriptional changes that could increase their tolerance toward the antibiotic (17).

Our data obtained by time-lapse microscopy and fluorescence imaging demonstrated that BODIPY®-vancomycin penetrates within the deepest layers (~30 µm) of our *S. aureus* biofilms within minutes (2-3 min for ATCC 6538 biofilm and 8 min for ATCC 27217 biofilm) to reach preferentially the cell walls of the embedded bacteria (Fig. 4c and 4d). Remarkably, no measurable activity of the antibiotic on biofilm cell viability was recorded, neither by time-lapse imaging using the fluorescent live-dead staining, nor by conventional plating on agar (data not shown). This fast irrigation by the antibiotic of the whole biofilm structure excludes bacterial stress response. The findings by Jefferson may be related to the particular density of the EPS matrix due to Poly-N-acetylglucosamine (PNAG) overproduction by the MN8m strain used.

In this study, we have shown that fluorescently-tagged vancomycin penetrates each *S. aureus* biofilm (time-lapse measurements) and further diffuses through the biomass (FRAP measurements) with similar diffusion coefficients. However, the relative values (ratio between the diffusion coefficients measured in a biofilm and in water) of BODIPY®-vancomycin in the *S. aureus* biofilms (~0.01-0.03) do not range over the same scale as that commonly obtained for molecules of comparable molecular weight (0.1-0.35) (23). Furthermore, both FRAP and FLIM results reveal that at equilibrium (after a lag phase of about 30 min) approximately half of the antibiotic molecules are immobilized inside the biofilms.

The weak change in viscosity (ratio of ~1.5) (1) between water and biofilm cannot be the only explanation for this diffusion limitation. Electrostatic interaction must also be considered due to the weak cationic charge of vancomycin (+0.7) (29), the globally negative charge of the cell surfaces at neutral pH (11, 19), and to a lesser extent the charged components of the EPS matrix. Indeed, it was previously reported by FCS measurements that electrostatic attraction between the probe and the biofilm resulted in a reduced diffusion of the probes (12, 31). Nonetheless, if such an electrostatic attractive effect governed the molecular mobility of the antibiotic, it would have also been observed in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm which also has anionic charges on its cell walls and possibly on its extracellular polysaccharides (24); however, such was not the case.

More reasonably, the slow vancomycin diffusion through the *S. aureus* biofilms was likely due to specific adsorption of the antibiotic to the biofilm components. As mentioned above, the bacterial cell walls appeared as hot spots on fluorescence images revealing the specific interaction of the antibiotic with its target. Nevertheless, some EPS components (proteins,

polysaccharides, eDNA, divalent ions, etc.) may also be expected to play a part in vancomycin immobilization inside the biomass. FRAP experiments in the eDNA pockets of the ATCC 27217 biofilm matrix support this hypothesis. Indeed, in these specific zones, much higher immobilized fractions of the antibiotic are measured (60% *versus* ~40%), which is in good agreement with the reported ability of vancomycin to intercalate into DNA molecules (29).

Is vancomycin bioavailability an obstacle to its activity inside *S. aureus* biofilms?

Failure for some antibiotics to be active on cell viability in biofilms is often attributed to the failure of the drug to penetrate the biostructure. Our study is an additional contribution to support that biofilm matrix is not an absolute physical barrier to the penetration of molecules of the size of antibiotics. But sorption to, or reaction with, biofilm components, may reduce antibiotic bioavailability and also be put forward to explain the decrease in antibiotic efficiency in biofilms.

To answer this question, two factors must be considered: (i) comparison between FRAP and FCS measurements, and (ii) the difference in the concentration of antibiotics each method requires (a few hundreds of nanomolars for FCS and 3-10 times more for FRAP). With the low concentration range used for FCS experiments, we have obtained correlation curves corresponding to the biofilm motion due to a total interaction of BODIPY®-vancomycin with the biomass. In the context of FRAP experiments, as mentioned above, a significant percentage of the antibiotic (50%-60%) can freely diffuse in all parts of the biofilm, in agreement with an excess of antibiotic relatively to the concentration fixed on biofilm components. Thus, it seems unlikely that the lack of vancomycin bioavailability could explain the failure of the antibiotic activity in such biofilms. Shielding mechanisms of biofilms that derive from the specific physiology of embedded bacteria should be further studied.

In conclusion, we have demonstrated that advanced fluorescence imaging methods (Time-lapse, FLIM, FRAP, and FCS) represent versatile and non-destructive tools for studying diffusion-reaction of molecules as small as antibiotics through the depth of biofilms. Time-lapse is accessible on current commercial confocal microscopes and its advantage lies in the possibility to follow the time penetration of fluorescent antibiotics in all parts of the biofilm. FRAP, FLIM, and FCS require more experience in data analysis and/or additional instrumental acquisition (4). However, they allow diffusion-reaction measurements when the antimicrobials have reached equilibrium inside the biomatrix (several hours). The use of these

correlative time-resolved fluorescence microscopies has expanded our knowledge on the role of the biofilm structure on the local diffusion-reaction properties of antibiotics.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank Antoine Monsel, physician at the Pitié Salpêtrière Hospital (Paris, France) for valuable discussions. Samia Daddi Oubekka was funded by CNRS, France. Celine Merlin is acknowledged for English revision of the manuscript.

REFERENCES

1. **Briandet, R., P. Lacroix-Gueu, M. Renault, S. Lecart, T. Meylheuc, E. Bidnenko, K. Steenkeste, M. N. Bellon-Fontaine, and M. P. Fontaine-Aupart.** 2008. Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**:2135-43.
2. **Bridier, A., R. Briandet, V. Thomas, and F. Dubois-Brissonnet.** 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* **27**:1017-32.
3. **Bridier, A., F. Dubois-Brissonnet, G. Greub, V. Thomas, and R. Briandet.** 2011. Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:2648-54.
4. **Bridier, A., E. Tischenko, F. Dubois-Brissonnet, J. M. Herry, V. Thomas, S. Daddi-Oubekka, F. Waharte, K. Steenkeste, M. P. Fontaine-Aupart, and R. Briandet.** 2011. Deciphering biofilm structure and reactivity by multiscale time-resolved fluorescence analysis. *Adv Exp Med Biol* **715**:333-49.
5. **Bryers, J. D.** 2008. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng* **100**:1-18.
6. **Daddi Oubekka, S., R. Briandet, F. Wharate, M.-P. Fontaine-Aupart, and K. Steenkeste.** 2011. Image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to dissect vancomycin diffusion-reaction processes in *Staphylococcus aureus* biofilms. *SPIE-OSA Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II* **8087 1I**:1-8.
7. **Davison, W. M., B. Pitts, and P. S. Stewart.** 2010. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2920-7.

8. **Flemming, H. C., and J. Wingender.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**:623-33.
9. **Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart, and P. Stoodley.** 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**:34-40.
10. **Gilbert, Y., M. Deghorain, L. Wang, B. Xu, P. D. Pollheimer, H. J. Gruber, J. Errington, B. Hallet, X. Haulot, C. Verbelen, P. Hols, and Y. F. Dufrene.** 2007. Single-molecule force spectroscopy and imaging of the vancomycin/D-Ala-D-Ala interaction. *Nano Lett* **7**:796-801.
11. **Gross, M., S. E. Cramton, F. Gotz, and A. Peschel.** 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* **69**:3423-6.
12. **Guiot, E., P. Georges, A. Brun, M. P. Fontaine-Aupart, M. N. Bellon-Fontaine, and R. Briandet.** 2002. Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation. *Photochem Photobiol* **75**:570-8.
13. **Habimana, O., K. Steenkeste, M. P. Fontaine-Aupart, M. N. Bellon-Fontaine, S. Kulakauskas, and R. Briandet.** 2011. Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol* **77**:367-8.
14. **Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, and T. Ito.** 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **9**:486-93.
15. **Høiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, and O. Ciofu.** 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **35**:322-32.
16. **Hope, C. K., and M. Wilson.** 2004. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1461-8.
17. **Jefferson, K. K., D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2467-73.
18. **Karolin, J., L. B. A. Johansson, L. Strandberg, and T. Ny.** 1994. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **116**:7801-7806.

19. **Klodzinska, E., M. Szumski, K. Hryniewicz, E. Dziubakiewicz, M. Jackowski, and B. Buszewski.** 2009. Differentiation of *Staphylococcus aureus* strains by CE, zeta potential and coagulase gene polymorphism. *Electrophoresis* **30**:3086-91.
20. **Neu, T. R., B. Manz, F. Volke, J. J. Dynes, A. P. Hitchcock, and J. R. Lawrence.** 2010. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol Ecol* **72**:1-21.
21. **Nichols, W. W., S. M. Dorrington, M. P. Slack, and H. L. Walmsley.** 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:518-23.
22. **Pinho, M. G., and J. Errington.** 2003. Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol Microbiol* **50**:871-81.
23. **Rani, S. A., B. Pitts, and P. S. Stewart.** 2005. Rapid diffusion of fluorescent tracers into *Staphylococcus epidermidis* biofilms visualized by time lapse microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:728-32.
24. **Shephard, J., A. J. McQuillan, and P. J. Bremer.** 2008. Mechanisms of Cation Exchange by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and PAO1 wbpL, a Strain with a Truncated Lipopolysaccharide. *Appl Environ Microbiol* **74**:6980-6.
25. **Stewart, P. S.** 2003. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* **185**:1485-91.
26. **Stewart, P. S., W. M. Davison, and J. N. Steenbergen.** 2009. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3505-7.
27. **Stone, G., P. Wood, L. Dixon, M. Keyhan, and A. Matin.** 2002. Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2458-61.
28. **Takenaka, S., H. M. Trivedi, A. Corbin, B. Pitts, and P. S. Stewart.** 2008. Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**:1869-75.
29. **Vijan, L. E.** 2009. The interaction of vancomycin with DNA. *Rev Roum Chem* **54**:807–813.
30. **Waharte, F., K. Steenkeste, R. Briandet, and M. P. Fontaine-Aupart.** 2010. Diffusion measurements inside biofilms by image-based fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis with a commercial confocal laser scanning microscope. *Appl Environ Microbiol* **76**:5860-9.

31. **Zhang, Z., E. Nadezhina, and K. J. Wilkinson.** 2010. Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1075-81.
32. **Zheng, Z., and P. S. Stewart.** 2004. Growth limitation of *Staphylococcus epidermidis* in biofilms contributes to rifampicin tolerance. *Biofilms* **1**:31-35.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

FIGURE S1:

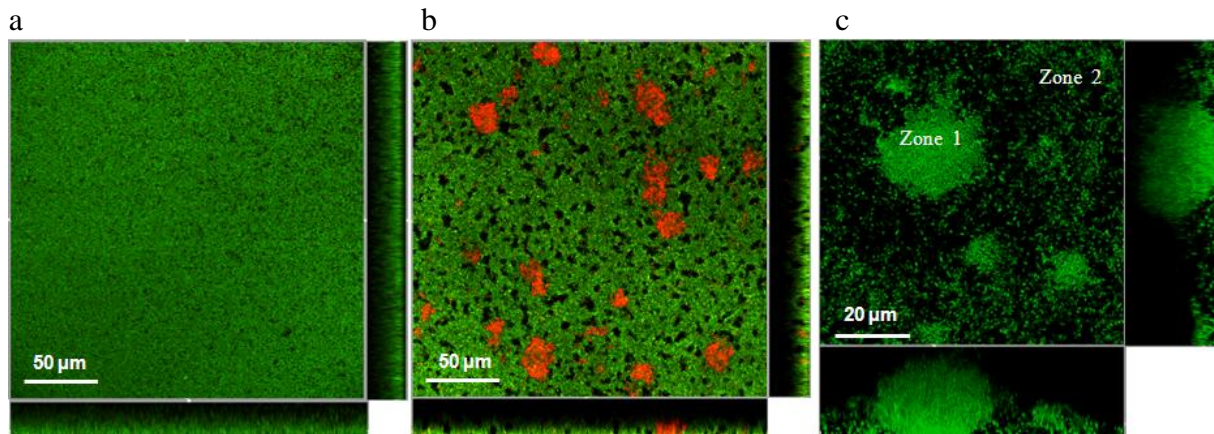
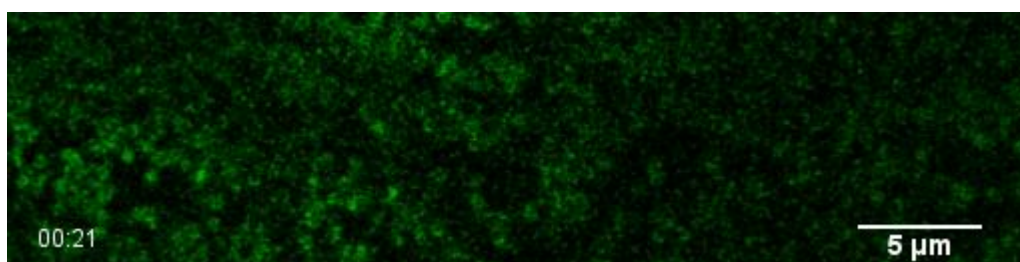


Fig. S1: A section representation of 3D structure of ATCC 6538 (a) and ATCC 27217 (b) *S. aureus* biofilms stained with live-dead probe and ATCC 15442 *P. aeruginosa* biofilm (c) stained with Syto9. For *P. aeruginosa* biofilm, FCS measurements were taken in two zones 1 and 2.

MOVIE M1:



Movie 1: A movie sequence of BODIPY®-vancomycin penetration inside *S. aureus* ATCC 6538 biofilm obtained by time-lapse imaging. It shows the evolution of fluorescence intensity in the biofilm 5 µm above the glass surface. Real time (4 min) is indicated in the lower left hand corner.

CHAPITRE II

L'état physiologique des bactéries du biofilm comme facteur de tolérance : l'association d'antibiotiques pour sortir de l'impasse thérapeutique ?

CHAPITRE II : L'état physiologique des bactéries du biofilm comme facteur de tolérance : L'association d'antibiotiques pour sortir de l'impasse thérapeutique ?

1. Introduction

Les méthodes d'imagerie de fluorescence ont révélé qu'il fallait rechercher d'autres causes à la tolérance à la vancomycine de nos biofilms qu'un manque de sa biodisponibilité au sein de la biomasse. L'étape suivante de notre étude a été d'utiliser la méthode CLSM pour visualiser la dynamique d'inactivation cellulaire au sein de nos biofilms modèles soumis à l'action de la vancomycine. Fait surprenant, l'antibiotique n'a eu aucun effet léthal.

Rappelons que le mode d'action de la vancomycine repose sur l'inhibition de la synthèse de la paroi des bactéries et est celle-ci n'est donc en principe active que sur les cellules en phase de division cellulaire. Est-ce à dire que l'essentiel des bactéries de nos modèles de biofilms ne sont pas dans cet état physiologique ? La structure en biofilm conduit généralement à une privation en nutriments, oxygène, etc. (voir partie A III.4.1) dans l'épaisseur de la biomasse, privation à laquelle les bactéries répondent en adaptant et modifiant leur physiologie (Rani *et al.*, 2007). Une hypothèse majeure aujourd'hui pour expliquer la tolérance aux antibiotiques qui agissent sur les processus de division cellulaire comme la vancomycine, repose sur la présence de cellules en état de croissance ralentie (« slow growth ») dans les strates les plus profondes des biofilms (Fux *et al.*, 2005). Dans ce contexte nous avons imagé l'état métabolique des bactéries dans nos modèles de biofilms de *S. aureus* par une méthode originale de contrôle de la réplication de l'ADN cellulaire en utilisant une technique d'immunofluorescence et ainsi pu montrer que seules 20 à 30% des cellules répliquent leur ADN dans toute l'épaisseur des biofilms modèles. Résultat inattendu, l'essentiel de la population bactérienne a un métabolisme ralenti et pas uniquement les cellules dans la profondeur de la biomasse. En croisant cette observation avec le mécanisme d'action de la vancomycine, on comprend alors son inefficacité sur nos modèles de biofilms.

En nous inspirant des protocoles cliniques actuellement mis en place, nous avons alors testé l'action d'une combinaison d'antibiotiques ayant des cibles biologiques différentes pour éradiquer les biofilms de *S. aureus*, thérapie largement répandue pour contrôler des infections bactériennes résistantes à l'action d'un seul antibiotique (Cottarel et Wierzbowski, 2007). Par exemple la rifampicine (figure 24) est associée à la vancomycine pour traiter des infections à *S. aureus* développées suite à la pose de prothèses orthopédiques (Zimmerli *et al.*, 1994). Rappelons que la vancomycine est un antibiotique à action lente alors que la rifampicine agit très rapidement mais génère la sélection de mutants résistants à l'antibiotique (Tupin *et al.*, 2010). Ainsi une telle combinaison de principes actifs doit (i) retarder ou diminuer l'apparition de mutations chez le pathogène, (ii) permettre une action prolongée dans le temps de l'antibiothérapie (Coates *et al.*, 2002).

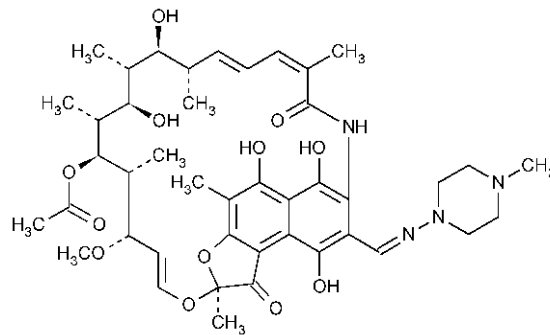


Figure 24 : Structure chimique de la rifampicine.

Dans notre étude nous avons choisi cette combinaison d'antibiotiques. La rifampicine est une molécule lipophile dont le site d'action se localise sur l'enzyme ARN polymérase et qui inhibe la synthèse de l'ARNm. Elle est active non seulement sur les bactéries en répllication mais aussi sur les cellules en phase stationnaire de croissance (Coates et Hu, 2008).

Deux niveaux d'évaluation d'efficacité des antibiotiques ont été entrepris, d'une part à partir des mesures classiques de dénombrement sur agar mais aussi à partir de l'imagerie de fluorescence « live-dead ». Cette dernière méthode encore trop peu répandue en microbiologie permet tout à la fois de suivre *in situ* et en temps réel la viabilité/mortalité cellulaire (par un marquage fluorescent spécifique) tout en visualisant l'évolution de l'organisation spatiale du biofilm traité. Un autre avantage de l'imagerie CLSM est qu'elle permet de conserver le biofilm natif et de s'affranchir ainsi des éventuels artefacts de la méthode du dénombrement:

décrochage partiel du biofilm, présence d'agrégats cellulaires, stress cellulaire, etc. Cependant, il faut garder à l'esprit que la proportion quantifiable de cellules mortes par imagerie de fluorescence « live-dead » est restreinte par rapport à la méthode de dénombrement conventionnelle. Il n'est en effet pas possible de visualiser plus de ~ 99% de bactéries mortes ce qui correspond à des variations de populations bactériennes inférieures à 2 log alors que la méthode de dénombrement peut couvrir plus de 6 log. Il apparaît ainsi que les deux méthodes sont complémentaires, la méthode CLSM étant plus sensible pour quantifier les premières étapes décisives de l'action des antibiotiques alors que la méthode de dénombrement permet de mesurer des effets forts de mortalité cellulaire (> 2 log) qui se produisent dans le temps (jusqu'à plusieurs jours).

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Dans cette partie de l'étude nous avons utilisé les deux mêmes souches de *S. aureus*, ATCC 6538 et ATCC 27217 dont le mode de préparation est décrit dans l'article 3.

2.2. Préparation des biofilms

Les biofilms des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus* ont pour cette étude été cultivés en conditions statiques sur des microplaques en polystyrène de 96 puits (Greiner Bio-One, France), adaptées à l'imagerie à haute résolution et permettant l'observation simultanée d'un grand nombre d'échantillons. Les conditions de croissance sont légèrement modifiées par rapport à celles décrites dans les chambres d'incubation Lab-Tek (article 3) et correspondent à des conditions physiologiques de croissance bactérienne *in vivo* chez l'homme. Dans chaque puits de la microplaque on introduit 250 µl d'une solution bactérienne cultivée durant une nuit dans du TSB à 37°C. L'absorbance de cette sub-culture a été ajustée au préalable à 0,02 à 600 nm (ce qui correspond à ~ 10⁷ UFC/ml). Après 1h30 d'adhésion toujours à 37°C, les différents puits sont rincés avec de l'eau physiologique stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes, puis à nouveau remplis avec 250 µl de TSB. La microplaque est ensuite incubée pendant 24 h à 37°C pour permettre le développement du biofilm.

2.3. CMI des antibiotiques

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la vancomycine et de la rifampicine vis-à-vis des deux souches bactériennes ont été déterminées. Pour ces mesures, nous avons utilisé de la vancomycine non marquée au BODIPY (V8138-chlorhydrate de vancomycine obtenu à partir de *Streptomyces orientalis*) et de la rifampicine (R3501) toutes deux de chez Sigma-Aldrich, France. Des solutions stock de concentration 2 mg/ml de vancomycine dans l'eau et de rifampicine dans du DMSO ont été préparées pour l'ensemble des expériences à partir du lyophilisat commercial et conservées à -20°C. Ces solutions stock sont ensuite diluées dans de l'eau physiologique stérile pour l'obtention des concentrations d'études.

Les CMI des deux antibiotiques vis à vis des cellules planctoniques en phase exponentielle de croissance des deux souches de *S. aureus* ATCC 6538 et ATCC27217 ont été déterminées dans du milieu TSB à 37°C en utilisant l'appareil Bioscreen (B2HM-MICALIS, INRA de Massy). Pour les deux souches, les CMI sont de 1 µg/ml et 0,004 µg/ml pour la vancomycine et la rifampicine respectivement.

2.4. Sensibilité des bactéries planctoniques aux antibiotiques

L'effet des antibiotiques sur la survie des bactéries planctoniques en phase exponentielle (3h de culture à 37°C) et en phase stationnaire (18h de culture à 37°C) de croissance des souches de *S. aureus* ATCC 6538 et ATCC 27217 a été contrôlé sur une période de 72 heures. Les concentrations d'antibiotiques ont été fixées eu égard aux doses thérapeutiques recommandées pour traiter des infections sévères à *S. aureus* (Hidayat *et al.*, 2006 ; Zeller et Desplaces, 2006). Ainsi, nous avons utilisé la vancomycine à la concentration de 20 µg/ml (20x CMI), la rifampicine à la concentration de 10 µg/ml (2500x CMI). Les mêmes concentrations individuelles d'antibiotiques ont été utilisées pour l'étude de leur association.

Pour ces mesures de sensibilité, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 7000g pendant 10 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot bactérien est suspendu dans de l'eau physiologique et re-centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot bactérien obtenu est re-suspendu dans du milieu TSB stérile. L'absorbance est lors mesurée afin de fixer la concentration bactérienne à $\sim 10^6$ UFC/ml pour les cellules en phase exponentielle et à $\sim 10^9$ UFC/ml pour les cellules en phase stationnaire. Les suspensions bactériennes obtenues

sont alors réparties équitablement dans des flacons de culture cellulaire (Nunc, France) auxquels les antibiotiques sont ajoutés, puis placés à 37°C sous agitation (100 rpm). Dans chaque expérience, l'un de ces flacons est un contrôle sans antibiotique. Les cellules viables sont dénombrées à intervalles de temps réguliers (voir courbes ci-après). Pour ce faire, on prélève à chaque temps, 1,5 ml de culture bactérienne. Afin d'éliminer l'excès d'antibiotique, la suspension est centrifugée 10 min à 5600g puis rincée à l'eau physiologique et re-centrifugée dans les mêmes conditions. Le culot bactérien final est ensuite re-suspendu dans 1,5 ml d'eau physiologique. Des dilutions successives au dixième sont ensuite réalisées. Pour chacune des 3 dilutions les plus importantes, six gouttes de 10 µl sont déposées sur des géloses TSA qui sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures. Les colonies bactériennes sont alors comptées et moyennées. La limite inférieure de détection des cellules viables est de 100 UFC/ml. Deux expériences indépendantes de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisées.

2.5. Sensibilité des biofilms aux antibiotiques

Les courbes de survie des biofilms des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus* à l'action de chacun des antibiotiques et de leur mélange ont aussi été réalisées. Les biofilms « de 24 heures » sont rincés une fois avec de l'eau physiologique avant l'ajout de 250 µl de TSB additionnés d'antibiotiques aux concentrations définies. Ils sont ensuite incubés à 37°C. Le dénombrement de cellules viables au sein des biofilms est effectué à intervalles de temps réguliers comme pour les cellules planctoniques et concerne à chaque temps de prélèvement quatre biofilms différents: un biofilm contrôle sans ajout d'antibiotique, et trois biofilms incubés respectivement avec de la vancomycine, de la rifampicine et un mélange de ces deux entités. Un schéma caractéristique illustrant le plan d'expérience est présenté figure 25. Le dénombrement cellulaire s'effectue ainsi : à chaque temps de prélèvement, le biofilm est détaché et collecté dans 1 ml de TSB. Ce prélèvement est ensuite centrifugé et ultérieurement traité jusqu'au décompte des colonies bactériennes comme il vient d'être décrit pour les cellules planctoniques.

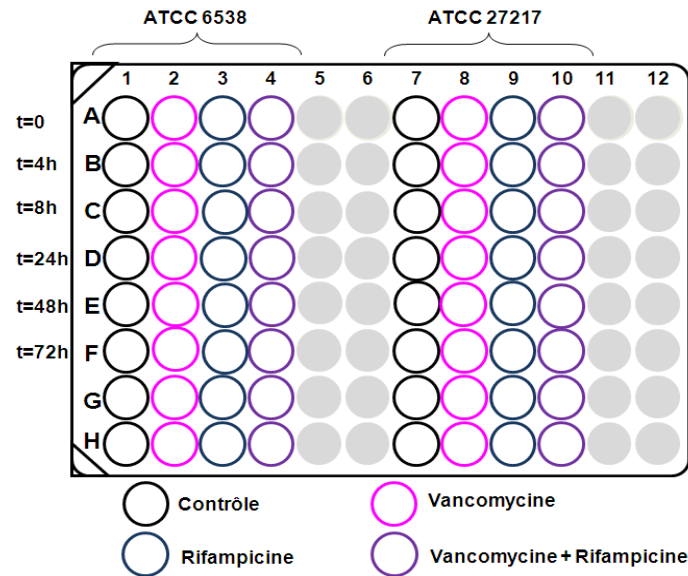


Figure 25 : Schéma montrant le plan expérimental des tests de sensibilité aux antibiotiques des biofilms des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*.

2.6. Activité de synthèse de l'ADN au sein des biofilms

L'activité des cellules bactériennes au sein des biofilms de *S. aureus* de la souche ATCC 6538 a été sondée par la mesure de la réplication de l'ADN cellulaire en utilisant la technique « BrdU ». Le protocole retenu est celui adapté de Rani *et al.* (2007). Le BrdU (5-bromo-2-désoxyuridine) est un analogue de thymine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules bactériennes lors de la phase de réplication. Le complexe BrdU-ADN formé est révélé par addition d'un anticorps anti-BrdU fluorescent (anticorps monoclonal de souris (clone MOBU-1) conjugué avec de l'Alexa Fluor 488 nm (Invitrogen, France)). Au moyen de cette technique d'immunomarquage, nous avons contrôlé l'activité de réplication des cellules au cours de la croissance des biofilms (T=5h et T=24 heures) en microplaques tel que décrit précédemment. Le BrdU est ajouté au surnageant du puits de la microplaque 4h avant le contrôle de l'activité cellulaire (soit à 1h ou 20h de croissance du biofilm) de sorte que sa concentration finale soit de 1 mM. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 4 heures. Les biofilms sont alors rincés deux fois avec du PBS et fixés chimiquement (arrêt de l'activité métabolique cellulaire) et physiquement (renforcement de l'attachement du biofilm à la surface) avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes. La révélation des cellules actives par l'anticorps anti-BrdU requiert une étape de perméabilisation de la membrane cellulaire suivie d'une dénaturation de l'ADN. Pour ce faire, plusieurs étapes biochimiques de traitement du biofilm

sont requises. Il est tout d'abord nécessaire d'incuber les biofilms fixés pendant 5 min avec une solution de chlorure d'ammonium (NH_4Cl 50 mM) puis d'appliquer un traitement au lysozyme (50 mg/litre pendant 5 min) qui assure la perméabilisation membranaire. Une solution d'acide chlorhydrique 4N est ensuite appliquée pendant 10 min pour dénaturer l'ADN cellulaire. En effet, selon ce protocole, seul le BrdU fixé à l'ADN simple brin peut être reconnu par son anticorps. Une solution de Tween 80 (0,3%) dans un tampon Tris a été ajoutée pendant 5 min afin de limiter toute liaison non spécifique de l'anti-BrdU. Deux rinçages avec du PBS ont été effectués entre deux étapes.

La solution stock de l'anticorps anti-BrdU, diluée au $1/20^{\text{ème}}$ dans l'eau physiologique, est ajoutée aux biofilms, l'ensemble étant ensuite incubé pendant 1 heure à l'obscurité pour protéger les anticorps de tout processus de photoblanchiment. Les biofilms ont enfin été colorés avec le Syto 61 (Invitrogen, France, solution stock diluée au $1/1000^{\text{ème}}$) et incubés pendant 20 min pour révéler l'ensemble des cellules des biofilms indépendamment de leur activité cellulaire. Pour valider ces mesures, des biofilms contrôles sans incorporation du BrdU mais marqués avec l'anticorps anti-BrdU ont été préparés. L'activité de synthèse de l'ADN au sein des biofilms a été réalisée par microscopie confocale de fluorescence en utilisant un objectif à immersion à huile de grossissement x 63 (microscope Leica SP5 décrit dans l'article 3). L'anticorps anti-BrdU a été excité à 488 nm et sa fluorescence collectée entre 500 nm et 550 nm. Le marqueur Syto 61 a été excité à 633 nm et sa fluorescence collectée entre 640 nm et 770 nm.

2.7. Viabilité des biofilms par imagerie confocale de fluorescence

La visualisation spatio-temporelle de l'action de la vancomycine et de la rifampicine seules ou en association au sein des biofilms a été suivie par imagerie de fluorescence (microscope confocal Leica SP5 équipé d'une enceinte thermostatée maintenue à 37°C et d'un objectif à immersion à huile avec un grossissement x63 et d'une ouverture numérique de 1,4) (figure 26). Pour cela, nous avons appliqué à des biofilms de 24 heures des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus* les mêmes concentrations d'antibiotiques que celles définies pour la détermination des courbes de survie. Pour suivre l'action spatio-temporelle des antibiotiques au sein des biofilms et distinguer les cellules vivantes des cellules mortes, les marqueurs fluorescents Syto9 (marqueur de toutes les cellules) et Iodure de Propidium (IP, marqueur des cellules mortes) ont été ajoutés dans chaque puits entre 20 min (biofilms

contrôles et biofilms incubés avec la vancomycine seule) et 2h (biofilms incubés avec la rifampicine seule et en association avec la vancomycine) avant leur observation. La concentration finale de chacun des marqueurs Syto9 et IP était de 5 μM et 58 μM respectivement. Nous avons vérifié que ces marqueurs n'impactaient pas la viabilité cellulaire.

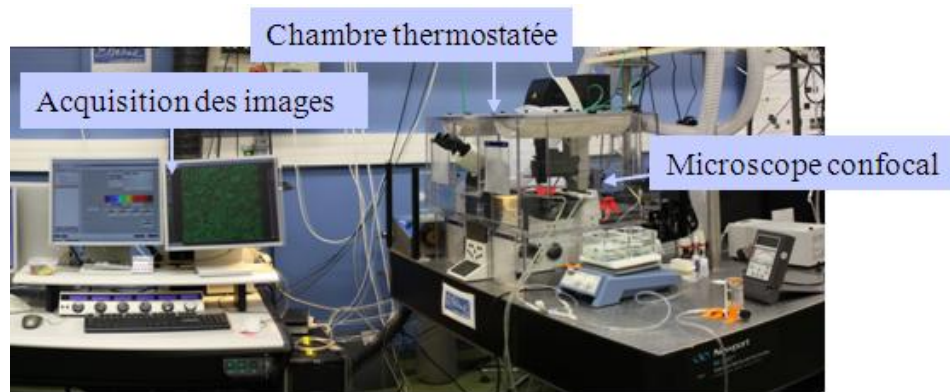


Figure 26 : photographie du microscope confocale Leica SP5

Le microscope confocal SP5 utilisé pour nos études a permis une excitation-détection séquentielle des marqueurs afin de bien différencier le recouvrement partiel de leurs domaines d'absorption et de fluorescence : le Syto9 a été excité à 488 nm et son émission de fluorescence collectée entre 500 et 550 nm (maximum d'absorption 470 nm, maximum d'émission de fluorescence 525 nm), alors que l'IP a été excité à 543 nm et son émission de fluorescence collectée entre 570 et 760 nm (maximum d'absorption 540 nm, maximum d'émission de fluorescence 625 nm). Les images d'intensité de fluorescence présentées correspondent à des acquisitions sur toute l'épaisseur des biofilms en mode « xyz ». Chaque plan focal xy couvre une surface de $120 \times 120 \mu\text{m}^2$ et le déplacement axial se fait par pas de 1 μm . Le taux de cellules vivantes et de cellules mortes dans les biofilms a été déterminé par quantification à partir des piles d'images acquises en mode « xyz » en utilisant le logiciel Image J.

3. Résultats

3.1. Visualisation et quantification de la survie cellulaire des biofilms traités à la vancomycine

Chacun des deux biofilms de *S. aureus*, en absence et en présence de l'antibiotique vancomycine (dose thérapeutique de 20 µg/ml) a été imagé par microscopie confocale durant 2 jours. La figure 27 rend compte pour chacune des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de la viabilité cellulaire et de la structuration des biofilms au cours du temps.

Il n'a pas été mesuré de mortalité des bactéries plus importante dans les biofilms traités à la vancomycine par rapport aux biofilms contrôles (6-30% pour ATCC 6538 et 2-12% pour ATCC 27217) durant les 2 jours d'observation y compris au niveau des couches superficielles en contact direct avec la solution d'antibiotique. Une évolution morphologique n'est observée que pour le biofilm de la souche ATCC 27217 aussi bien en présence qu'en absence d'antibiotique. Alors qu'à t=0 des clusters sont visibles sur toute la surface, la densité cellulaire s'uniformise ensuite (t=24h) avant la réapparition d'une structure poreuse (t=48h). Cette dynamique structurale est au moins en partie corrélée à une lyse cellulaire localisée (accompagnée d'une libération de l'ADN), comme révélé par la présence des poches d'ADN marquées à l'IP. Cette lyse résulte sans doute d'une carence nutritionnelle et/ou en oxygène au sein du biofilm. On notera que pour la souche ATCC 6538, une faible lyse cellulaire est également observée en absence et en présence de vancomycine, mais uniquement à la surface du biofilm à partir de t=24h.

Si l'on se réfère aux données de la littérature, il n'y a qu'un seul cas où la vancomycine utilisée à une concentration équivalente à celle de notre étude (entre 15-20 µg/ml) a un effet d'inhibition bactérienne quantifiable (réduction cellulaire moins de 2 log) sur des biofilms de *S. aureus* (Rose et Poppens, 2009). Au contraire, plusieurs études (LaPlante et Woodmansee 2009 ; Kostenko 2007) montrent que dans cette gamme de concentrations cliniques, la vancomycine n'a aucun effet sur les biofilms de souches de *S. aureus* même après 48 heures de traitement ce qui est en accord avec nos observations.

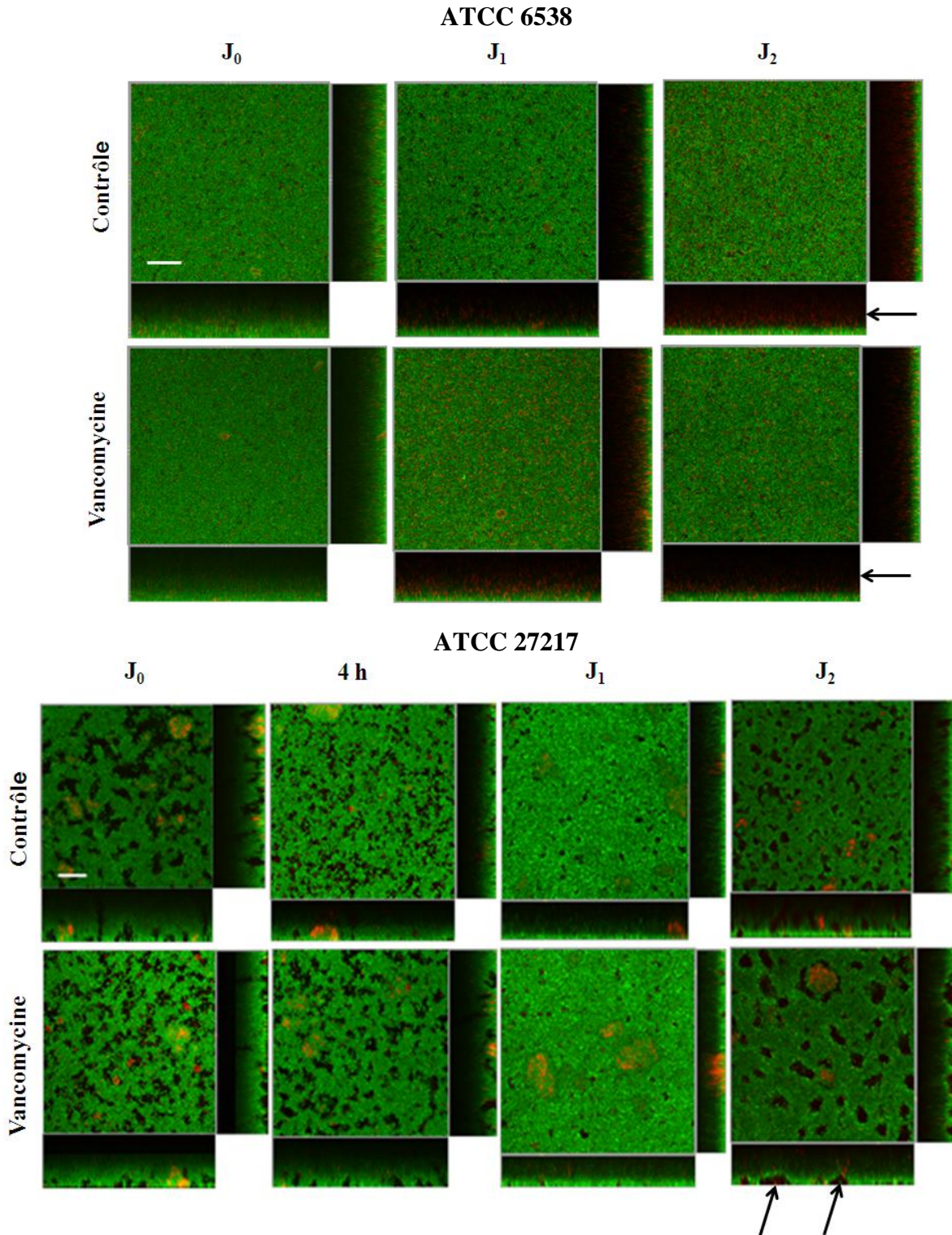


Figure 27 : Action spatiotemporelle de la vancomycine (20 µg/ml) sur des biofilms de 24 heures des deux souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*. Les cellules vivantes (en vert) et mortes (en rouge) des biofilms sont marquées avec le Syto9 et l'iodure de propidium respectivement. Les piles d'images prises en mode «xyz» des biofilms en présence de la vancomycine sont comparées avec celles des biofilms contrôles sans l'antibiotique. Elles sont projetées selon deux plans perpendiculaires au plan d'observation. Les flèches noires indiquent une lyse cellulaire. La barre d'échelle représente 20 µm.

En utilisant les tests conventionnels de dénombrement sur agar nutritif, il a été possible de comparer la sensibilité à la vancomycine des biofilms des deux souches de *S. aureus* ATCC 6538 et ATCC 27217 à celle mesurée sur des cultures planctoniques de 3h (phase exponentielle de croissance) et de 18h (phase stationnaire de croissance) (figure 28). Il a ainsi été vérifié que la vancomycine avait un effet bactéricide significatif¹ sur les deux souches en phase exponentielle de croissance. Dans ce cas, les dénombrements bactériens sont inférieurs à notre seuil de détection (2 log) après 24 h de contact avec l'antibiotique.

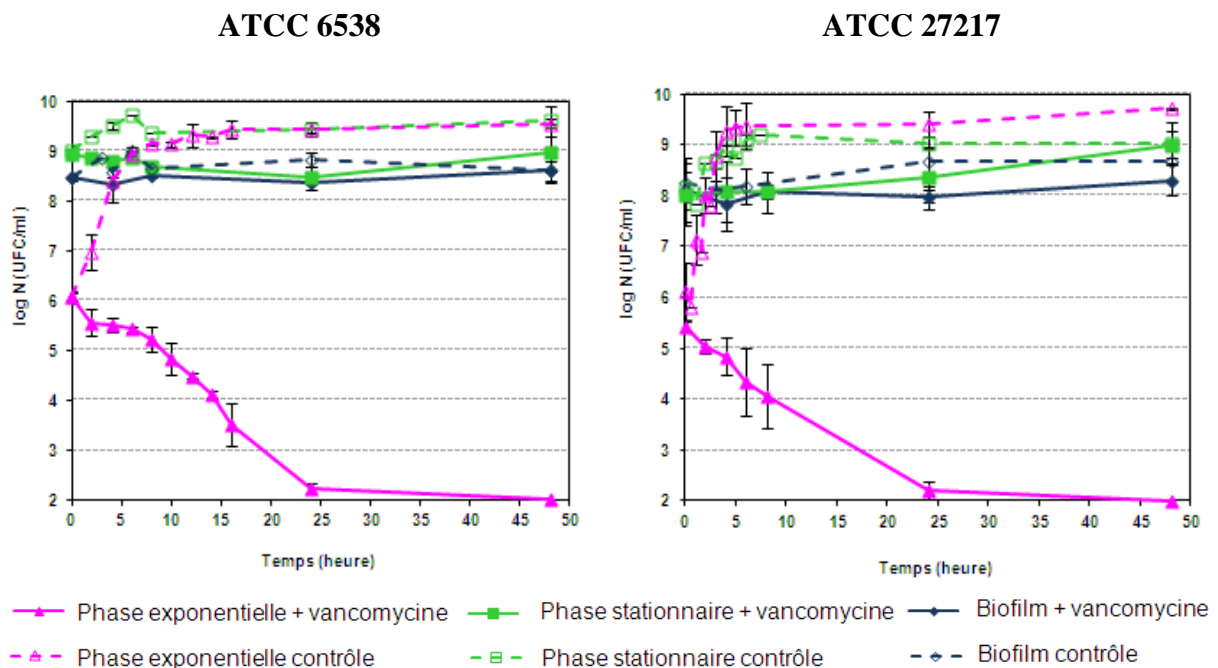


Figure 28 : Courbes de survie à 20 µg/ml de vancomycine des cultures planctoniques en phase exponentielle (3 h de culture) et stationnaire (18 h de culture) de croissance ainsi que des cellules en biofilms de 24 heures des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*, observées pendant 48 heures. Ces courbes sont comparées avec celles des populations bactériennes sans l'antibiotique. Deux expériences indépendantes sont réalisées.

Si l'on considère les courbes de survie obtenues à partir de suspensions bactériennes de 18 h (phase stationnaire de croissance) de chacune des deux souches, on constate une faible reprise de croissance (~1 log) due au renouvellement du milieu nutritif lors de l'ajout de

¹Un effet bactéricide correspond à une réduction de plus de 3 log de la population bactérienne au bout de 24 h

l'antibiotique (le même procédé a été utilisé pour les échantillons contrôles sans antibiotique). Pendant cet intervalle de temps (~6 h), on observe une stabilisation de la population bactérienne en présence de vancomycine puis une augmentation de la population cellulaire pour atteindre les valeurs contrôles au bout de 48 h, et ce quelle que soit la souche de *S. aureus* considérée. Ces résultats sont à rapprocher de données de la littérature (Tsuji *et al.*, 2009) qui montrent une activité de la vancomycine fortement dépendante de la densité cellulaire correspondant à différents états physiologiques des bactéries.

Les courbes de survie cellulaire obtenues à partir du décrochage des biofilms confirment les données d'imagerie de fluorescence « live-dead » à savoir que la vancomycine n'a aucune efficacité quantifiable sur les bactéries incluses dans ces biostructures. L'ensemble de ces résultats suggère que les biofilms de 24 h de *S. aureus* sont principalement formés de bactéries métaboliquement ralenties de type « phase stationnaire de croissance » ou « slow growth », hypothèse que nous avons explorée en quantifiant la proportion de cellules ayant une activité de réplication génomique.

3.2. Etat métabolique des bactéries incluses dans les biofilms de *S. aureus*

L'état métabolique des cellules au sein des biofilms de *S. aureus* ATCC 6538 a été caractérisé par la mesure de la proportion de cellule en division (réplication de l'ADN cellulaire), au moyen de la technique de marquage fluorescent par le BrdU (voir matériel et méthodes). Dans un premier temps, la méthode a été validée sur un biofilm « naissant » (moins de 5 heures). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 29. Les plans focaux imagés ont été sélectionnés à la base des biofilms, indiquant que le BrdU et son anticorps ont diffusé dans toute l'épaisseur de la biomasse pendant leurs temps d'incubation respectifs. Il apparaît que la très grande majorité des cellules du biofilm sont marquées à la fois avec l'anticorps anti-BrdU (fluorescence en vert) et le contre-marqueur rouge (marquage au Syto 61 qui marque l'ensemble des cellules du biofilm). Une quantification de ces images au moyen du logiciel Image J a permis de montrer que 84% des cellules d'un biofilm de 5h répliquent leur ADN (figure 30).

Si l'on s'intéresse à un biofilm de 24 heures (temps de croissance des biofilms de cette étude), la fluorescence des cellules marquées avec l'anticorps anti-BrdU est nettement moins

importante, et ce dans toute l'épaisseur du biofilm. La quantification de ces images révèle que seules 25% des cellules sont actives (25 % de cellules fluorescent à la fois dans le vert et le rouge). Ces mesures permettent de conclure qu'au sein de nos biofilms de *S. aureus*, la très grande majorité des cellules sont dans une phase de croissance très ralentie (« slow growth ») que l'on peut rapprocher de la phase stationnaire de croissance des bactéries planctoniques. Ainsi, l'inactivité de la vancomycine en biofilm s'explique et justifie les expériences suivantes.

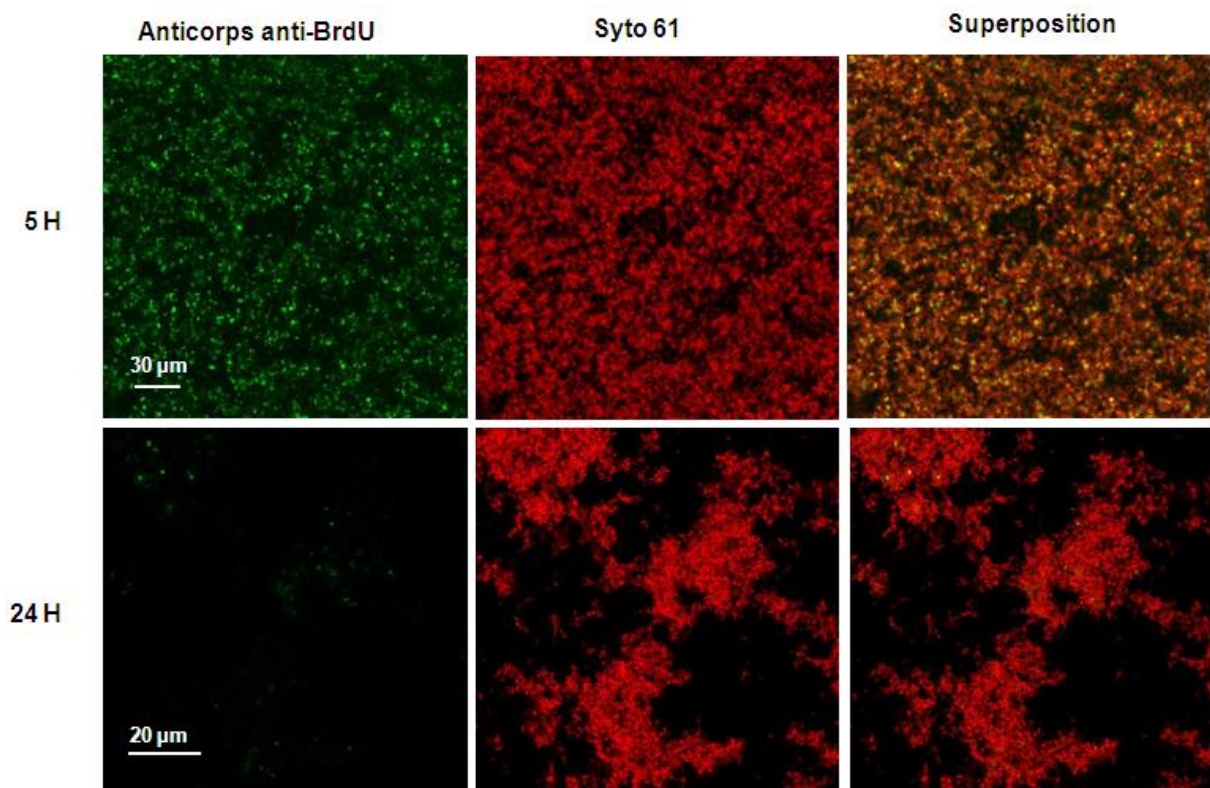


Figure 29 : Images d'intensité de fluorescence montrant l'activité cellulaire au sein des biofilms de 5 h et de 24 h marqués avec l'anticorps anti-BrdU (fluorescence verte). L'ensemble des cellules est contre marqué en rouge par le Syto 61 tel que décrit dans matériel et méthodes. On notera que la méthode de marquage et de fixation biochimique du biofilm nécessaire à la révélation de la fluorescence du complexe anticorps-antigène génère une perte de biomasse.

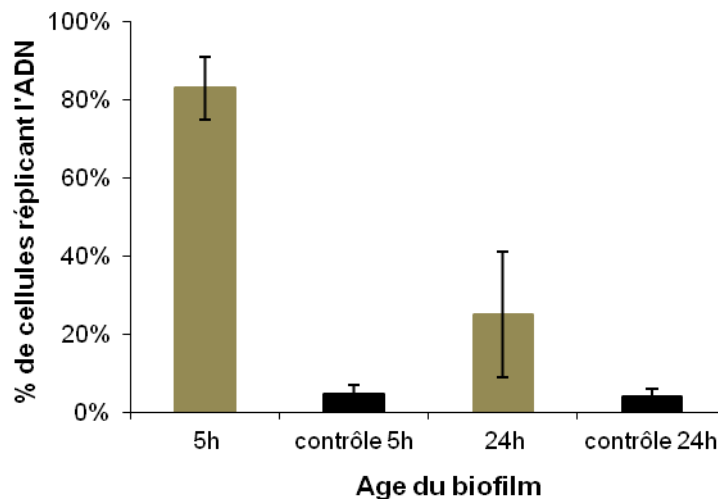


Figure 30 : Histogramme montrant les taux des cellules actives dans les biofilms de la souche ATCC 6538 de *S. aureus* de 5 heures et de 24 heures. Les mesures contrôles correspondent à des biofilms préparés sans le BrdU marqués avec l'anticorps fluorescent. Le faible signal de fluorescence mesuré au sein de ces biofilms contrôles pourrait correspondre à un marquage non spécifique de l'anticorps anti-BrdU ou au bruit de fond.

3.3. Visualisation et quantification de l'inactivation cellulaire au sein de biofilms traités avec l'association vancomycine-rifampicine

Dans une première partie de l'étude, nous avons détaillé l'action de la rifampicine seule, utilisée également à une concentration thérapeutique (10 µg/ml) (Zeller et Desplaces, 2006).

3.3.1. Effet de la rifampicine seule : L'effet de cet antibiotique sur nos deux souches bactériennes est significativement différent de celui de la vancomycine, qu'il s'agisse des bactéries planctoniques ou incluses en biofilms. Dans tous les cas, les courbes de dénombrement montrent une mortalité cellulaire générée par la rifampicine, maximale au bout de 4 h d'incubation. Cependant, l'amplitude de cet effet va dépendre de la nature de la souche et de l'état physiologique des cellules. Pour la souche ATCC 6538, seul un log de réduction de la population est atteint, que les bactéries soient cultivées en suspension (3 h et 18 h de croissance) ou en biofilm (figure 31). Si l'on considère la souche ATCC 27217, la mortalité cellulaire engendre une réduction ~3 log de la population en phase exponentielle de croissance et seulement 1 à 1,5 log pour les bactéries en phase stationnaire de croissance ou dans les biofilms. Comme pour la vancomycine, l'effet de la rifampicine dépend donc fortement de la densité cellulaire présente dans le milieu. Il est à noter que l'antibiotique n'a

un effet bactéricide (au sens strict du terme défini dans les normes, réduction >3 log) que sur la souche ATCC 27217 récoltée en phase exponentielle de croissance.

Au delà de 4 h d'incubation avec l'antibiotique, on mesure une reprise de la croissance bactérienne quelle que soit la souche considérée et quel que soit l'état physiologique des bactéries pour atteindre les mêmes densités bactériennes que sur les contrôles à 24 h de culture (figure 31). Ce résultat, bien décrit pour certains antibiotiques et notamment pour la rifampicine, traduit la sélection et l'enrichissement de la culture en bactéries mutantes résistantes à l'antibiotique (Rose et Poppens, 2009 ; Raad *et al.*, 2007 ; Tang *et al.*, 2011).

Ces données de survie cellulaire peuvent être confrontées aux images d'intensité de fluorescence mesurées sur les biofilms natifs. Lorsque les biofilms sont incubés avec de la rifampicine (figures 32,33), la plus forte mortalité cellulaire est aussi mesurée à $t=4h$ pour la souche ATCC 27217 (50% de cellules mortes à comparer à 3% pour le biofilm contrôle) et à $t=24h$ pour la souche ATCC 6538 (40% de cellules mortes à comparer à 9% pour le biofilm contrôle), et ce dans toute l'épaisseur de la biomasse, y compris à la base. Les proportions de cellules viables mesurées au-delà de 24 h d'incubation ne sont plus différentes de celles des biofilms contrôles (en absence de l'antibiotique).

Ces résultats confirment les données de la littérature sur l'efficacité rapide et bactéricide de la rifampicine, cet effet étant significatif uniquement pour les cellules de la souche ATCC 27217 récoltées en phase exponentielle de croissance. Pour la souche ATCC 6538 et pour les bactéries au métabolisme ralenti (phase stationnaire de croissance ou biofilm), la rifampicine agit également rapidement mais avec un effet réduit sur la mortalité cellulaire. Un autre effet confirmé et d'importance est la sélection très rapide de mutants résistants à l'antibiotique, ce qui justifie qu'il ne soit jamais utilisé seul cliniquement pour des traitements prolongés. Ainsi, comme le prescrivent de nombreux praticiens hospitaliers, nous avons poursuivi notre étude en associant la vancomycine à la rifampicine.

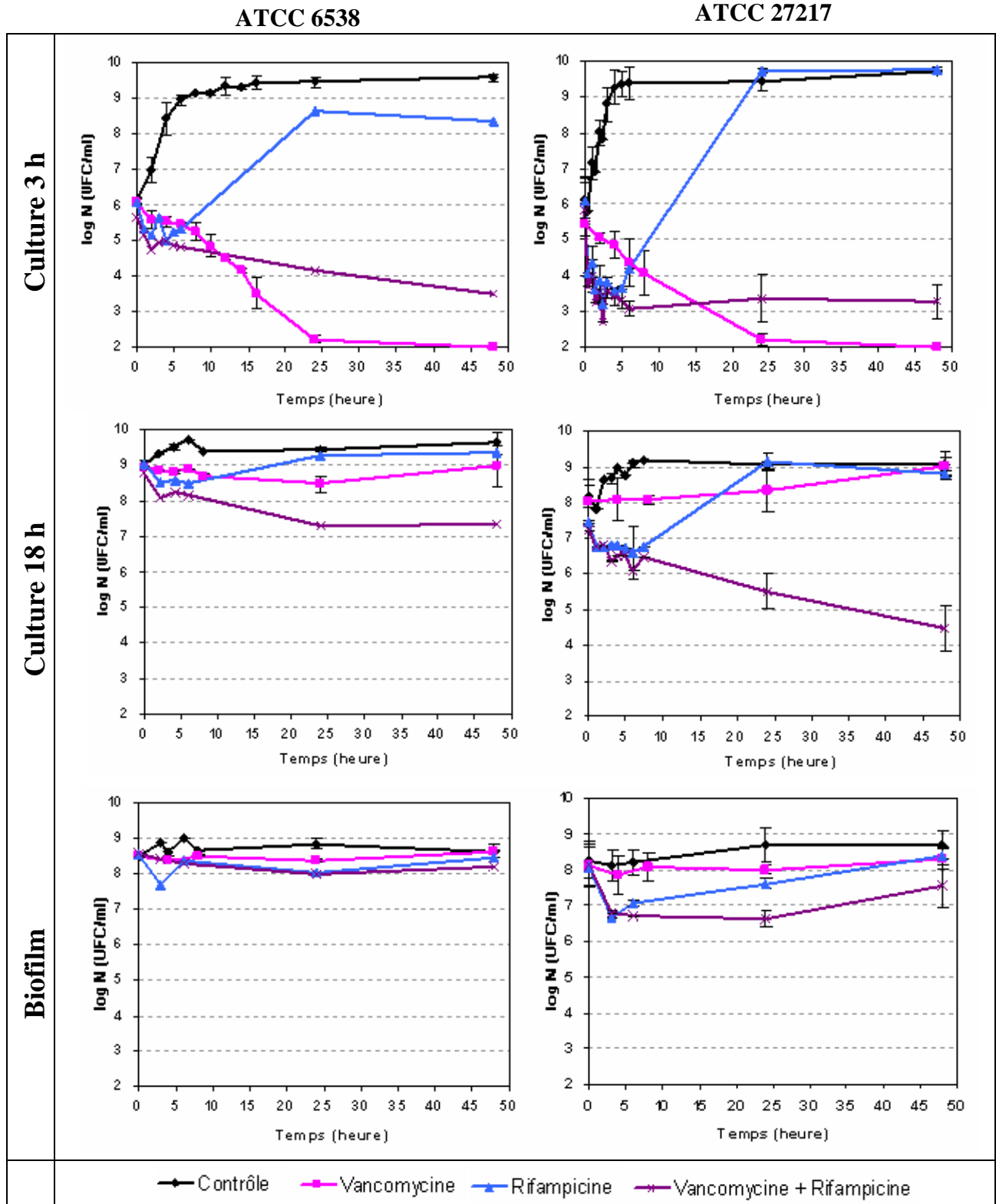


Figure 31: Courbes de survie des cultures planctoniques de 3 heures et de 18 heures de croissance ainsi que des biofilms de 24 heures des souches ATCC 6538 et ATCC 27217 de *S. aureus*, en présence de 20 µg/ml de vancomycine, 10 µg/ml de rifampicine et l'association vancomycine (20 µg/ml)-rifampicine (10 µg/ml) suivies pendant 48 heures.

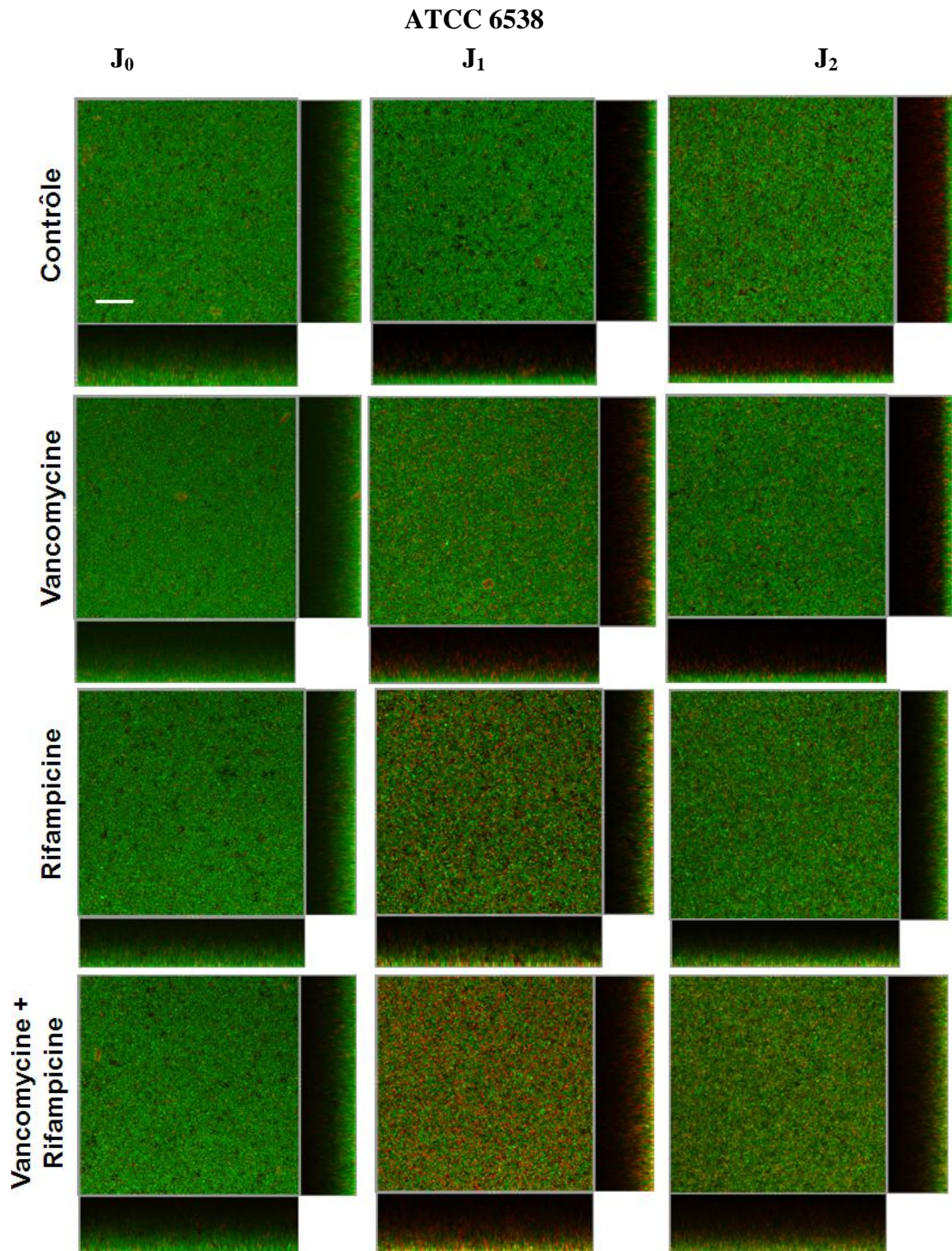


Figure 32 : Action spatiotemporelle de la vancomycine (20 µg/ml), la rifampicine (10 µg/ml) et à l'association vancomycine (20 µg/ml)-rifampicine (10 µg/ml) sur des biofilms de 24 heures de la souche *S. aureus* ATCC 6538. Les cellules vivantes (en vert) et mortes (en rouge) des biofilms sont marquées avec le Syto9 et l'iodure de propidium respectivement. Les piles d'images prises en mode «xyz» des biofilms en présence des antibiotiques sont comparées avec celles des biofilms contrôles sans l'antibiotique. Elles sont projetées selon deux plans perpendiculaires au plan d'observation. La barre d'échelle représente 20 µm.

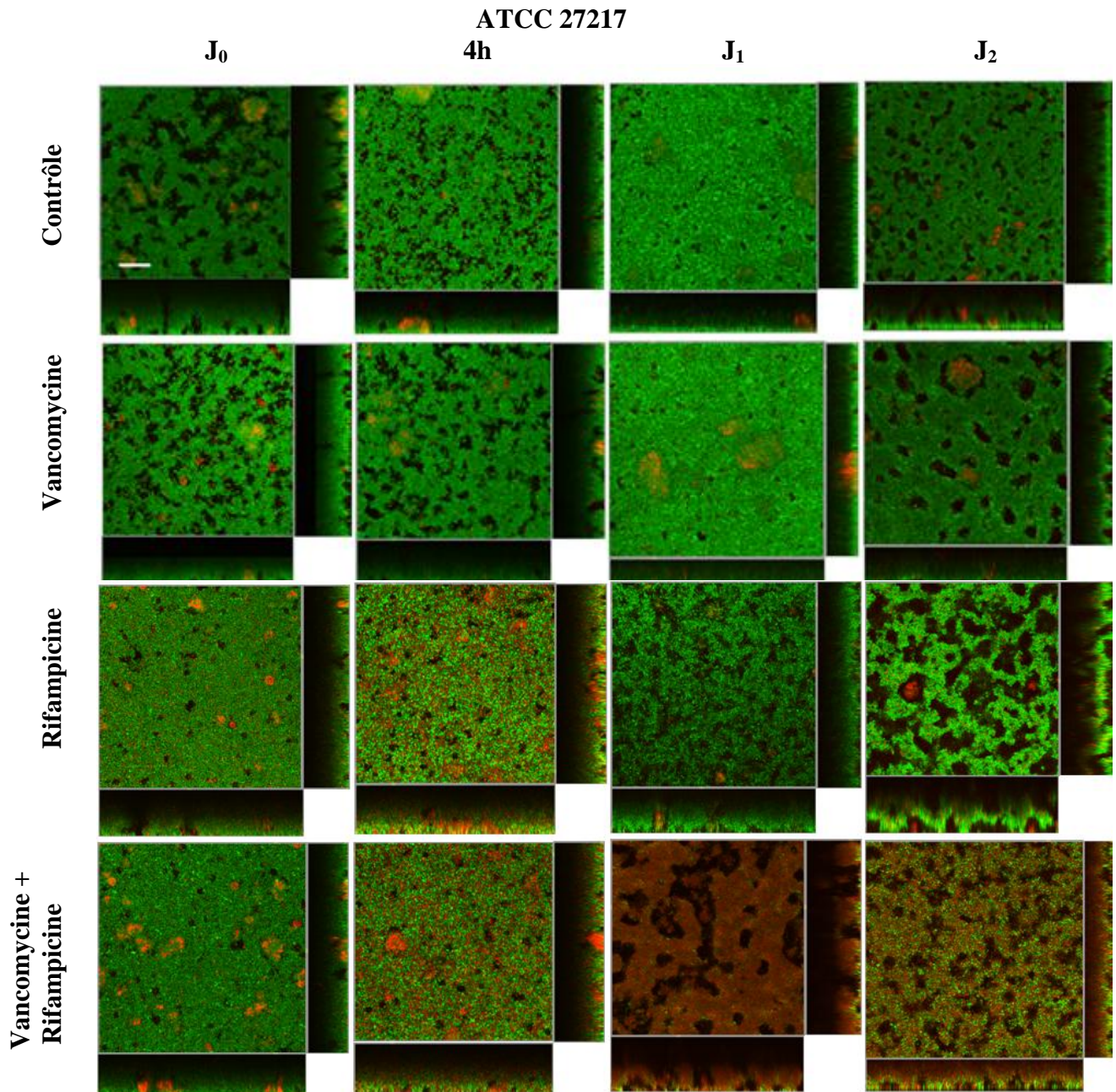


Figure 33 : Action spatiotemporelle de la vancomycine (20 µg/ml), la rifampicine (10 µg/ml) et à l'association vancomycine (20 µg/ml)-rifampicine (10 µg/ml) sur des biofilms de 24 heures de la souche *S. aureus* ATCC 27217. Les cellules vivantes (en vert) et mortes (en rouge) des biofilms sont marquées avec le Syto9 et l'iodure de propidium respectivement. Les piles d'images prises en mode «xyz» des biofilms en présence des antibiotiques sont comparées avec celles des biofilms contrôles sans l'antibiotique. Elles sont projetées selon deux plans perpendiculaires au plan d'observation. La barre d'échelle représente 20 µm.

3.3.2. Association vancomycine-rifampicine : L'imagerie de fluorescence met en évidence pour le mélange d'antibiotiques une mortalité cellulaire supérieure à celle observée pour la vancomycine et rifampicine utilisées isolément. L'inactivation bactérienne est maximale au bout d'un jour d'incubation du mélange pour chacune des deux souches de *S. aureus* (figures 32,33). Dans ce cas également, l'effet apparaît plus important pour la souche ATCC 27217 (80% de cellules mortes à J₁) (figure 33) que pour la souche ATCC 6538 (60% de cellules mortes à J₁) (figure 32). Cette action de l'association des deux antibiotiques ne perdure pas et l'on retrouve au bout de 3 jours un taux de cellules identique à celui observé sur les biofilms contrôles non traité (30% de cellules mortes).

Ces données corroborent les résultats de dénombrement cellulaire réalisé à partir des biofilms détachés (figure 31). L'association de la vancomycine à la rifampicine n'a qu'un faible effet (~0,5 log) sur les biofilms de la souche ATCC 6538. Concernant les biofilms de la souche ATCC 27217, on observe rapidement une mortalité cellulaire quoique limitée en amplitude (réduction d'un log) et dans le temps puisque la croissance cellulaire reprend au bout de ~24h.

Un fait intéressant est que l'effet de cette combinaison d'antibiotiques sur les biofilms de chacune des deux souches n'est en rien aussi important que celui observé sur les bactéries planctoniques. Lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance (cas des infections circulantes), la bithérapie combine l'effet rapide et bactéricide de la rifampicine (4 premières heures de traitement) et celui prolongé dans le temps de la vancomycine qui inhibe la sélection des mutants résistants à la rifampicine (figure 31). On notera que la plus forte efficacité apparente de la vancomycine seule par rapport au mélange des deux antibiotiques au-delà d'un jour de traitement ne peut être interprétée au regard de la faible statistique de nos données expérimentales.

L'effet de cette combinaison de principes actifs reste efficace pour des cellules en phase stationnaire de croissance, même si son amplitude est moindre que celle mesurée pour les bactéries en phase exponentielle de croissance. Ce résultat est concordant avec les effets de chacun des deux antibiotiques utilisés seuls, qui dépendent fortement de la densité cellulaire du milieu comme décrit précédemment. Si l'on se réfère à la définition d'une synergie d'effet entre antibiotiques (réduction supplémentaire de 2 log à 24 h par rapport à la réduction obtenue avec le meilleur des antibiotiques), l'association de la vancomycine et de la

rifampicine n'a un effet synergique que sur la souche ATCC 27217 pour des bactéries récoltées en phase stationnaire de croissance.

Ainsi, pour des densités bactériennes initiales comparables ($\sim 10^8$ UFC/ml), l'action de la vancomycine et de la rifampicine seules est similaire que les bactéries soient planctoniques ou incluses en biofilms. Comment alors expliquer les différentes cinétiques d'action à partir de 24 h du mélange des deux antibiotiques sur ces mêmes populations? Tout se passe en biofilm comme si la vancomycine n'avait plus la faculté d'inhiber la sélection des mutants résistants à la rifampicine. Pour comprendre ce phénomène, deux hypothèses peuvent être proposées. L'une doit prendre en considération la physiologie bactérienne. Nous avons montré que la majorité des cellules de *S. aureus* au sein des biofilms se trouvaient dans un état métabolique proche de celui des cellules planctoniques en phase stationnaire de croissance c'est-à-dire dans un état de faible réplication cellulaire. Cependant de telles cellules peuvent être dans des états physiologiques différents surtout à partir d'un stade avancé de maturation du biofilm. Comme décrit dans la partie A de ce manuscrit (II.1.2), l'activation de régulateurs transcriptionnels du quorum sensing tel *agr* chez *S. aureus* peut profondément moduler l'expression génétique de la cellule et pourquoi pas certains déterminants impliqués dans la réactivité avec les antibiotiques. Une voie qui reste à explorer ! La seconde hypothèse considère une perte de biodisponibilité des antibiotiques au-delà d'un jour de traitement résultant de leurs interactions avec la matrice du biofilm. La littérature rapporte des travaux qui étayaient cette seconde hypothèse (Vijan, 2009). Il a été montré que l'ajout de matrice extraite de biofilms de *S. aureus* à une suspension bactérienne peu dense (10^6 CFU/ml) n'avait aucun effet sur l'activité de la rifampicine mais au contraire réduisait très significativement l'effet bactéricide de la vancomycine (Mathur, 2005). Ceci suggère une perte de biodisponibilité de cet antibiotique résultant d'interactions avec les constituants de la matrice. Récemment des travaux de Vijan *et al.* (2009) ont démontré des interactions spécifiques de la vancomycine avec l'ADN, soit par intercalation de l'antibiotique entre les paires de bases soit par effets électrostatiques avec les groupements phosphates de la surface de la double hélice. Un tel effet peut être considéré en particulier avec la souche ATCC 27217 pour laquelle nous avons identifié des poches d'ADN extracellulaire (ADNe) au sein de sa matrice. Mais il est aussi très probable que la lyse cellulaire résultant de l'action précoce de la rifampicine libère une concentration importante d'ADNe susceptible de réduire la biodisponibilité de la vancomycine en deçà de sa concentration active.

En conclusion de cette partie, il apparaît qu'en biofilms, l'efficacité des deux antibiotiques testés, la vancomycine et la rifampicine, seuls ou en association est bien moindre (souche ATCC 27217) voire inexistante (souche ATCC 6538) par rapport à l'efficacité observée sur des cellules planctoniques en division. C'est un résultat qui illustre que pour une même concentration d'antibiotiques, on arrivera à traiter une infection circulante (cellules planctoniques en division) alors qu'une infection impliquant des biofilms pourra devenir chronique. Par ailleurs, l'efficacité du traitement est fortement dépendante de la souche testée. Dans toutes nos expériences, la souche ATCC 6538 isolée d'un patient infecté s'est toujours révélée plus tolérante à l'action des antibiotiques que la souche ATCC 27217 isolée d'un porteur sain. Si l'on considère que la première souche est potentiellement plus virulente que la seconde, y aurait-il une relation entre la résistance aux antibiotiques d'une souche de *S. aureus* et sa virulence? Le cadre restreint de notre étude le suggère mais il est bien entendu que l'examen d'un grand nombre de souches d'origine différente est requis pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La médecine d'aujourd'hui doit faire face à la prise en compte des infections impliquant des biofilms qui se forment aussi bien sur les tissus superficiels ou internes de l'hôte que sur des dispositifs invasifs tel que les cathéters et les implants. La présence de biofilms lors d'une infection n'est pas diagnostiquée par les méthodes actuelles d'analyse bactériologique (sauf peut-être pour les infections superficielles) et de ce fait toutes les infections (circulantes, biofilms) sont traitées de la même manière. Cependant les preuves expérimentales s'accumulent pour reconnaître que le biofilm est un véritable bouclier à l'action des antimicrobiens et à celle du système immunitaire.

La compréhension des mécanismes de résistance des biofilms aux antimicrobiens, et en particulier aux antibiotiques, est devenue un challenge aussi bien de la communauté médicale que de la recherche fondamentale, d'autant plus que cette problématique rejoint très intimement la propagation de souches multirésistantes qui défraient tant la chronique ces dernières années. En effet, il est maintenant bien établi que les transferts horizontaux de gènes et en particulier ceux relatifs à la résistance aux antibiotiques se font à une fréquence beaucoup plus importante entre cellules d'un biofilm qu'entre leurs homologues planctoniques. Outre ces résistances génétiques, l'organisation spatiale des biofilms (matrice d'exopolymères, privation nutritionnelle, quorum sensing, réponse physiologique des bactéries...) peut être à l'origine de tolérance aux antibiotiques et de chronicité d'infections tout aussi préoccupantes. C'est à cette problématique que se rattache ce travail de thèse concernant la résistance de biofilms de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques. La bibliographie sur le sujet pointe deux grands types de mécanismes qui apparaissent d'importance pour notre modèle, l'un concernant le rôle de barrière à la diffusion-réaction de la matrice organique du biofilm, l'autre étant relié à la physiologie spécifique des bactéries dans ces biostructures.

La matrice d'exopolymères est-elle un frein à la diffusion -réaction des antibiotiques au sein des biofilms de *S. aureus*?

Pour cette étude nous avons utilisé pour la première fois un ensemble de méthodes d'imagerie de fluorescence dynamiques (time-lapse, FRAP, FCS et FLIM) dédiées au suivi d'un antibiotique fluorescent et montré que nous avons atteint la sensibilité nécessaire pour le suivi *in situ* jusqu'à l'échelle de la molécule unique, de la mobilité et de l'interaction des molécules d'antibiotiques fluorescents au sein de biofilms.

La méthode time-lapse nous a permis de visualiser en temps réel que la vancomycine marquée au fluorophore BODIPY pénétrait rapidement dans toute l'épaisseur de nos biofilms de *S. aureus*. Jefferson avait déjà réalisé de telles mesures sur un modèle de biofilm très mucoïde et conclu que la très lente diffusion observée pouvait laisser le temps aux bactéries d'adapter leur physiologie dans les couches profondes du biofilm et ainsi expliquer la plus grande tolérance du biofilm à l'antibiotique (Jefferson *et al.*, 2005). Cette interprétation ne peut être valide dans le cas de notre modèle d'étude.

Dans les premières heures après l'injection de l'antibiotique au sein des biofilms nous avons pu mettre en évidence par FCS que pour des concentrations nano-molaires de l'antibiotique, l'ensemble des molécules est fixé au biofilm (cellules et matrice). Au contraire pour une concentration clinique, les mesures FRAP et FLIM montrent qu'une proportion significative de l'antibiotique peut diffuser dans la biomasse cependant avec une constante de diffusion réduite par rapport au milieu aqueux et dépendant de la densité de la biomasse. Par ailleurs, le rapport des molécules d'antibiotique libres et liées est différent pour les deux modèles de biofilms : il y a plus de molécules fixées dans la souche ATCC 27217, en bon accord avec l'observation de poches d'ADN extracellulaire sur lequel la vancomycine peut se fixer. Pour nos modèles de biofilms, la matrice d'EPS ralentit mais n'empêche pas la pénétration et la diffusion de la vancomycine, au moins durant les premières heures après l'injection du principe actif, période pendant laquelle la rifampicine est active mais pas la vancomycine. La matrice d'EPS n'est donc pas impliquée dans le processus de résistance aux temps courts. Il serait intéressant de contrôler ces paramètres sur un lapse de temps plus long en particulier pour contrôler si dans le cas du mélange d'antibiotiques, l'arrêt de l'action de la vancomycine à partir de 24 h est liée à l'immobilisation totale de l'antibiotique

Ce travail a permis d'obtenir les premières mesures FCS avec des molécules aussi petites que les antibiotiques au sein de biofilms. La nouveauté de l'approche fait que nous avons utilisé un marqueur ayant un fort rendement de fluorescence mais il est aujourd'hui prouvé que la méthode peut s'appliquer à tout type d'antibiotique fluorescent.

L'état physiologique des cellules en biofilm contribue-t-il au phénomène de tolérance aux antibiotiques ?

L'étude de la sensibilité à la vancomycine des biofilms des deux souches de *S. aureus* utilisées dans nos travaux, nous a montré que les cellules en biofilm sont peu sensibles à cet antibiotique par rapport à leurs homologues planctoniques bien que l'antibiotique diffuse dans toute la biomasse. Nous avons alors exploré l'hypothèse de la physiologie spécifique des cellules en biofilm pour expliquer ces différences. Nous avons en premier lieu caractérisé l'état métabolique des cellules incluses en utilisant une technique originale d'immunofluorescence (méthode « BrdU »). Cette approche nous a permis de déterminer que seule une très faible minorité de cellules (~25%) présentait une activité de synthèse d'ADN dans des biofilms de 24h de *S. aureus*. Ces observations suggèrent ainsi que plus des 3/4 des cellules du biofilms sont dans un état métabolique très ralenti que l'on peut rapprocher de la physiologie de cellules planctoniques en phase stationnaire de croissance décrite dans la littérature comme un facteur de tolérance à certains antimicrobiens telle que la vancomycine.

Face à cette observation se pose alors la question suivante : existe-il une antibiothérapie efficace pour éradiquer les biofilms de *S. aureus* ? En vue de se rapprocher d'une réalité clinique nous avons testé la combinaison de la vancomycine et de la rifampicine, une bithérapie utilisée dans le cas d'infections aux SARM. L'effet bénéfique de cette association de principes actifs a été vérifié sur nos cultures planctoniques de *S. aureus*, mais une fois encore, les biofilms se sont montrés tolérants à ce traitement, et en particulier la souche isolée du patient infecté (ATCC 6538).

On peut bien sûr avoir un regard critique sur nos modèles d'étude par rapport aux infections aux biofilms rencontrés *in vivo* :

- dans ces expériences de laboratoire, on ne simule pas le système immunitaire de l'hôte qui *in vivo* pourrait minimiser les effets de tolérance observés. Cependant, si ces cellules immunitaires sont efficaces sur des bactéries libres circulantes, leur action sur les biofilms

- se limite aux cellules interfaciales : leur taille (de l'ordre de la dizaine de microns) ne leur permet pas d'atteindre les strates les plus profondes.
- la structure de nos biofilms synthétiques peut ne pas être représentative de celle existant *in vivo*. En effet, ces biofilms modèles se développent sur des supports de verre ou de polystyrène en présence de milieux de culture stériles sans nul doute différents des fluides physiologiques. On manque d'informations sur la topologie de « vrais » biofilms rencontrés chez l'hôte. C'est une mise en perspective à l'issue de ce travail de thèse de reprendre ce type d'étude sur des biofilms extraits de patients et/ou de modèles animaux.
 - nos résultats ont suggéré qu'après une seule application de vancomycine, une perte de biodisponibilité de l'antibiotique dans nos modèles de biofilms au delà de 24 h pouvait être évoquée pour expliquer la résistance observée. Cependant cliniquement l'antibiothérapie est administrée à intervalles de temps réguliers (typiquement 12 h) ou de manière continue (perfusion) ce qui n'a pas été exploré dans le cadre de ce travail. On peut supposer une amélioration de l'effet thérapeutique dans ces conditions, mais rappelons que sur nos biofilms il n'a jamais été observé un effet bactéricide des antibiotiques même aux temps courts (<4 h).

Malgré toutes les restrictions apportées à cette étude en laboratoire, et compte tenu des données des autres groupes, il apparaît que l'antibiothérapie n'est peut être pas un traitement « universel » pour éradiquer les infections chroniques « à biofilms ». On peut bien sûr espérer le développement de nouveaux principes actifs plus efficaces. Dans ce domaine, une littérature conséquente existe, par exemple sur la daptomycine, une nouvelle molécule d'antibiotique active sur les SARM et les bactéries au métabolisme ralenti (Mascio *et al.*, 2007). Cependant, l'efficacité de ce nouveau composé reste controversée (Hayden *et al.*, 2005 ; Skiest, 2006) et son utilisation clinique en France est limitée du fait d'effets secondaires délétères constatés. D'une manière générale, la mise sur le marché de nouvelles molécules fait défaut et constitue un problème majeur de la médecine moderne. On citera néanmoins comme thérapie alternative prometteuse le transfert de la thérapie photodynamique (PDT) au traitement des infections bactériennes en biofilm (Di Poto *et al.*, 2009).

Ainsi la recherche internationale s'oriente vers des stratégies alternatives à l'antibiothérapie qui concernent aussi bien la prévention de l'adhésion bactérienne initiale que l'inhibition de la maturation des biofilms ou encore leur dénaturation.

Les traitements préventifs concernent essentiellement le développement de surfaces fonctionnalisées ou « coatings » sur les dispositifs médicaux. Certains sont aujourd'hui recouverts de polymères hydrophiles tels que l'acide hyaluronique (Cassinelli *et al.*, 2000) et le poly-*N*-vinylpyrrolidone (Boelens *et al.*, 2000) qui réduisent l'adhésion bactérienne, ou encore de polymères imprégnés d'antimicrobiens à libération différée susceptibles d'éradiquer les bactéries pathogènes pionnières adhérentes à la surface du matériau. Ainsi, il a déjà été montré que des surfaces recouvertes de billes biodégradables de poly-triméthylène carbonate et imprégnées de gentamicine inhibaient à 80% le développement de biofilms de *S. aureus* (Neut *et al.*, 2009). Autre exemple, l'imprégnation de cathéters veineux centraux par un mélange de rifampicine et minocycline réduit significativement leur contamination bactérienne. (Sampath *et al.*, 2001).

L'inhibition de la maturation des biofilms adopte une stratégie bioinspirée utilisant « le brouillage » de la régulation du quorum sensing (Francolini et Donelli, 2010). Ce processus observé naturellement chez l'algue rouge *Delisea pulchra* et certains coraux et éponges marines a été appliqué avec succès pour traiter les infections chroniques de *P. aeruginosa* (Rasmussen *et al.*, 2000 ; Manefield *et al.*, 2001 ; Henzter *et al.*, 2002).

La dernière stratégie en cours est de déstructurer la matrice des biofilms avant l'application des antimicrobiens. Pour ce faire, différentes enzymes utilisées seules ou en cocktail vont cibler les constituants de la matrice du biofilm, protéines, ADN, polysaccharides, etc. Ainsi l'utilisation de la dispersine B, une enzyme bactérienne naturelle va dégrader le motif poly-*N*-acétylglucosamine rencontré en particulier dans la matrice des biofilms de *S. aureus* (Kaplan *et al.*, 2003). Cette enzyme est maintenant commercialisée par la société *Kane Biotech* comme principe actif de gels antiseptiques pour les infections cutanées chroniques. Selon cette même stratégie, la nature nous inspire de nouveau en proposant des virus spécifiques aux bactéries : c'est la thérapie phagique (Lu et Collin, 2007 ; Gross, 2011) dont le potentiel avait été perçu avant la mise sur le marché des antibiotiques qui en a stoppé le développement. Il s'agit dans ce cas d'introduire des particules virales inertes pour l'hôte mais reconnaissant spécifiquement une famille de bactéries cibles qu'elles vont infecter et lyser, y compris en biofilms (Lacroix-Gueu *et al.*, 2005 ; Briandet *et al.*, 2008). Avec l'émergence des multirésistances bactériennes, c'est une approche prometteuse comme en témoigne déjà leur acceptation réglementaire dans les procédés de bioprotection de la filière alimentaire américaine (Food and Drug Administration). Certains chercheurs vont plus

loin en utilisant les outils de la biologie synthétique qui leur permet de créer des molécules s'inspirant de sites actifs de bactériophages, mais dont ils ont décuplé l'efficacité bactéricide (Fischetti, 2008). Les premiers résultats obtenus avec ces nouveaux composés sur le traitement de biofilms infectieux chez la souris sont tout à fait encourageants (Pastagia *et al.*, 2011).

Encore plus prospectif, le traitement vaccinal à base d'antigènes protéiniques et saccharidiques de constituants de la matrice des biofilms est en voie de développement (Brady *et al.*, 2011).

La révolution microbienne du XIX^{ème} siècle et les travaux de Pasteur ont gonflé l'homme d'optimisme dans sa lutte contre les infections bactériennes. C'était sans compter sur l'infinie faculté d'adaptation et d'évolution de cette société microscopique qui s'échange des gènes et se structure en biofilm et nous amène encore aujourd'hui dans une impasse thérapeutique. A quand la révolution « biofilmienne » pour la thérapie de ces infections ?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Allison, K.R., Brynildsen, M.P. and Collins, J.J. (2011) Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 473, 216-220.
- [2] Anderl, J.N., Franklin, M.J. and Stewart, P.S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 1818-1824.
- [3] Arciola, C.R., Baldassarri, L. and Montanaro, L. (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 39, 2151-2156.
- [4] Arias, C.A. and Murray, B.E. (2009) Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge. *The New England journal of medicine* 360, 439-443.
- [5] Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Dore, J., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'Rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. and Bork, P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174-180.
- [6] Axelrod, D., Ravdin, P., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Webb, W.W., Elson, E.L. and Podleski, T.R. (1976) Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 4594-4598.
- [7] Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M. and Hoiby, N. (2004a) Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 1168-1174.
- [8] Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P. and Hoiby, N. (2004b) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 1175-1187.
- [9] Beenken, K.E., Blevins, J.S. and Smeltzer, M.S. (2003) Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun* 71, 4206-4211.

- [10] Bischoff, M., Entenza, J.M. and Giachino, P. (2001) Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 183, 5171-5179.
- [11] Biswas, L., Biswas, R., Schlag, M., Bertram, R. and Gotz, F. (2009) Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 75, 6910-6912.
- [12] Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Burmolle, M., Hentzer, M., Haagensen, J.A., Hougen, H.P., Calum, H., Madsen, K.G., Moser, C., Molin, S., Hoiby, N. and Givskov, M. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology (Reading, England)* 151, 373-383.
- [13] Boelens, J.J., Tan, W.F., Dankert, J. and Zaat, S.A. (2000) Antibacterial activity of antibiotic-soaked polyvinylpyrrolidone-grafted silicon elastomer hydrocephalus shunts. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 45, 221-224.
- [14] Boles, B.R. and Horswill, A.R. (2008) Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 4, e1000052.
- [15] Boles, B.R. and Horswill, A.R. (2011) Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in microbiology* 19, 449-455.
- [16] Brady, R.A., O'May, G.A., Leid, J.G., Prior, M.L., Costerton, J.W. and Shirtliff, M.E. (2011) Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infection and immunity* 79, 1797-1803.
- [17] Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. and Kolter, R. (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11621-11626.
- [18] Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology* 13, 20-26.
- [19] Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkeste, K., Bellon-Fontaine, M.N. and Fontaine-Aupart, M.P. (2008) Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Applied and environmental microbiology* 74, 2135-2143.
- [20] Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V. and Briandet, R. (2010) The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of microbiological methods* 82, 64-70.
- [21] Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Greub, G., Thomas, V. and Briandet, R. (2011) Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55, 2648-2654.
- [22] Bronner, S., Monteil, H. and Prevost, G. (2004) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 28, 183-200.
- [23] Brook, I. (2008) The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: implications for medical therapy. *Anaerobe* 14, 297-300.

- [24] Brooun, A., Liu, S. and Lewis, K. (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 640-646.
- [25] Bryers, J.D. (2008) Medical biofilms. *Biotechnology and bioengineering* 100, 1-18.
- [26] Bryers, J.D. and Drummond, F. (1998) Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Biotechnology and bioengineering* 60, 462-473.
- [27] CA-SFM (2003) COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE, Communiqué 2003. *Société Française de Microbiologie*, 1-47.
- [28] Cassinelli, C., Morra, M., Pavesio, A. and Renier, D. (2000) Evaluation of interfacial properties of hyaluronan coated poly(methylmethacrylate) intraocular lenses. *Journal of biomaterials science* 11, 961-977.
- [29] Cerf, O., Carpentier, B. and Sanders, P. (2010) Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. *Int J Food Microbiol* 136, 247-254.
- [30] Chambers, H.F. and Deleo, F.R. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7, 629-641.
- [31] Chavakis, T., Preissner, K.T. and Herrmann, M. (2007) The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol* 28, 408-418.
- [32] Clarke, S.R., Harris, L.G., Richards, R.G. and Foster, S.J. (2002) Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70, 6680-6687.
- [33] Clement, S., Vaudaux, P., Francois, P., Schrenzel, J., Huggler, E., Kampf, S., Chaponnier, C., Lew, D. and Lacroix, J.S. (2005) Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 192, 1023-1028.
- [34] Coates, A., Hu, Y., Bax, R. and Page, C. (2002) The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature reviews* 1, 895-910.
- [35] Coates, A.R. and Hu, Y. (2008) Targeting non-multiplying organisms as a way to develop novel antimicrobials. *Trends in pharmacological sciences* 29, 143-150.
- [36] Coenye, T. and Nelis, H.J. (2010). In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 83, 89-105.
- [37] Corrigan, R.M., Rigby, D., Handley, P. and Foster, T.J. (2007) The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)* 153, 2435-2446.
- [38] Costerton, J.W. (1999) Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents* 11, 217-221; discussion 237-219.
- [39] Costerton, J.W. (2007) The Biofilm Primer. *Springer-Heidelberg*.
- [40] Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J. (1978) How bacteria stick. *Scientific American* 238, 86-95.

- [41] Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, NY)* 284, 1318-1322.
- [42] Cottarel, G. and Wierzbowski, J. (2007) Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends in biotechnology* 25, 547-555.
- [43] Courvalin, P. (2008) Bacterial antibiotic resistance resistance combinations of biochemical and genetic mechanisms. *Bull Acad Vét France* 161, 7-12.
- [44] Cui, L., Iwamoto, A., Lian, J.Q., Neoh, H.M., Maruyama, T., Horikawa, Y. and Hiramatsu, K. (2006) Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 428-438
- [45] Davies, J. and Webb, V. (1998) Antibiotic resistance in bacteria. In *Emerging Infections (Krause, RM,ed)*, 239-273.
- [46] Davison, H.C., Low, J.C. and Woolhouse, M.E. (2000) What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in microbiology* 8, 554-559.
- [47] De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. and Lewandowski, Z. (1994) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and bioengineering* 43, 1131-1138.
- [48] Dekio, I., Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., Nishikawa, T., Suematsu, M. and Benno, Y. (2005) Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. *Journal of medical microbiology* 54, 1231-1238.
- [49] Del Pozo, J.L. and Patel, R. (2007) The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 82, 204-209.
- [50] Diegelmann, R.F. (2003) Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 11, 490-495.
- [51] Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N. and Beach, M. (2001) Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 2, S114-132.
- [52] Dige, I., Nilsson, H., Kilian, M. and Nyvad, B. (2007) In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *European journal of oral sciences* 115, 459-467.
- [53] Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13, 16-34, table of contents.
- [54] Di Poto, A., Sbarra, M.S., Provenza, G., Visai, L. and Speziale, P. (2009) The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials* 30, 3158-3166.
- [55] Domart, Y. (2002) [Therapeutic principles of staphylococcal infections--Role and limitations of standard compounds]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* 21, 392-398.

- [56] Donlan, R.M. (2001a) Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7, 277-281.
- [57] Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.
- [58] Dryden, M.S. (2010). Complicated skin and soft tissue infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65 Suppl 3, iii35-44.
- [59] Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D. and Projan, S.J. (2001) Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *Journal of bacteriology* 183, 7341-7353.
- [60] Dupont, H. (2000) Infections à staphylocoques. Conférences d'actualisation (scientifiques et médicales Elsevier SAS, et SFAR), 447-463.
- [61] ECDC (2008) Healthcare-associated infections. http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/HAI/Documents/2008_HAI_%20special_chapterpdf, 16-38.
- [62] ECDC (2010) SURVEILLANCE REPORT-Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. *European Centre for Disease Prevention and Control (ecdc), Sweden*, 1-181.
- [63] Edidin, M., Zagyansky, Y. and Lardner, T.J. (1976) Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science (New York, NY)* 191, 466-468.
- [64] EARSS (2005) EARSS Manual 2005. EARSS
- [65] <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/EARS-Net-Microbiological-manualpdf>, 2-59.
- [66] Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Moller, K., Jorgensen, A., Andersen, C.B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. (2011). Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 19, 387-391.
- [67] Fey, P.D. and Olson, M.E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol* 5, 917-933.
- [68] Fischetti VA. (2008) Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol*. Oct;11(5):393-400.
- [69] Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2005) Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43, 1973-1976.
- [70] Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2006) Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Hosp Infect* 62, 120-122.
- [71] Foster, T.J. (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3, 948-958.
- [72] Foster, T.J. and Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology* 6, 484-488.

- [73] Fowler, V.G., Jr., Fey, P.D., Reller, L.B., Chamis, A.L., Corey, G.R. and Rupp, M.E. (2001) The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Medical microbiology and immunology* 189, 127-131.
- [74] Foxman, B., Goldberg, D., Murdock, C., Xi, C. and Gilsdorf, J.R. (2008) Conceptualizing human microbiota: from multicelled organ to ecological community. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008, 613979.
- [75] Francolini, I. and Donelli, G. (2010) Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS immunology and medical microbiology* 59, 227-238.
- [76] Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Stoodley, P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology* 13, 34-40.
- [77] Fux, C.A., Stoodley, P., Shirtliff, M. and Costerton, J.W. (2009) The Functional Resistance of Bacterial Biofilms. *Antimicrobial Drug Resistance* Chapter 11, 121-131.
- [78] Fux, C.A., Wilson, S. and Stoodley, P. (2004) Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model.
- [79] Gilbert, P. and Brown, M.R. (1998) Biofilms and beta-lactam activity. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 41, 571-572.
- [80] Gilbert, Y., Deghorain, M., Wang, L., Xu, B., Pollheimer, P.D., Gruber, H.J., Errington, J., Hallet, B., Haulot, X., Verbelen, C., Hols, P. and Dufrene, Y.F. (2007) Single-molecule force spectroscopy and imaging of the vancomycin/D-Ala-D-Ala interaction. *Nano letters* 7, 796-801.
- [81] Goerke, C., Gressinger, M., Endler, K., Breitkopf, C., Wardecki, K., Stern, M., Wolz, C. and Kahl, B.C. (2007) High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ Microbiol* 9, 3134-3142.
- [82] Goerke, C. and Wolz, C. (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung.
- [83] Götz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular microbiology* 43, 1367-1378.
- [84] Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. and Foster, T.J. (1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Molecular microbiology* 17, 1143-1152.
- [85] Gross M. (2011) Revived interest in bacteriophages. *Curr Biol.* Apr 26;21(8):R267-70.
- [86] Haagensen, J.A., Regenber, B. and Sternberg, C. (2011) Advanced microscopy of microbial cells. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 124, 21-54.
- [87] Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11, 1034-1043.
- [88] Harraghy, N., Hussain, M., Hagg, A., Chavakis, T., Sinha, B., Herrmann, M. and Flock, J.I. (2003) The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology (Reading, England)* 149, 2701-2707.

- [89] Hassett, D.J., Sutton, M.D., Schurr, M.J., Herr, A.B., Caldwell, C.C. and Matu, J.O. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends in microbiology* 17, 130-138.
- [90] Hausteil, E. and Schwille, P. (2007) Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 36, 151-169.
- [91] Heilmann, C., Thumm, G., Chhatwal, G.S., Hartleib, J., Uekotter, A. and Peters, G. (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading, England)* 149, 2769-2778.
- [92] Henrici, A.T. (1933) Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *Journal of bacteriology* 25, 277-287.
- [93] Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Høiby N, Kjelleberg S, Givskov M. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. Jan;148(Pt 1):87-102.
- [94] Hidayat, L.K., Hsu, D.I., Quist, R., Shriner, K.A. and Wong-Beringer, A. (2006) High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. *Archives of internal medicine* 166, 2138-2144.
- [95] Hiramatsu, K. (2001) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *The Lancet infectious diseases* 1, 147-155.
- [96] Hoffman, L.R., Deziel, E., D'Argenio, D.A., Lepine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R.L., Ramsey, B.W. and Miller, S.I. (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19890-19895.
- [97] Hoiby, N. (2011) Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC medicine* 9, 32.
- [98] Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G. and Herrmann, M. (2001) Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *Journal of bacteriology* 183, 6778-6786.
- [99] Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B. and Kaplan, J.B. (2008) Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and environmental microbiology* 74, 470-476.
- [100] James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W. and Stewart, P.S. (2008) Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 16, 37-44.
- [101] Jayaraman, R. (2009) Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *CURRENT SCIENCE* 96, 1475-1484.

- [102] Jefferson, K.K., Goldmann, D.A. and Pier, G.B. (2005) Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 2467-2473.
- [103] Jefferson, K.K., Pier, D.B., Goldmann, D.A. and Pier, G.B. (2004) The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 186, 2449-2456.
- [104] Kaplan, J.B., Ragonath, C., Ramasubbu, N. and Fine, D.H. (2003) Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *Journal of bacteriology* 185, 4693-4698.
- [105] Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B. and Biggs, C.A. (2011). "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1869-1881.
- [106] Keel, R.A., Sutherland, C.A., Aslanzadeh, J., Nicolau, D.P. and Kutti, J.L. (2010) Correlation between vancomycin and daptomycin MIC values for methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by 3 testing methodologies. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 68, 326-329.
- [107] Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. and Lewis, K. (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230, 13-18.
- [108] Kjelleberg, S., Marshall, K.C. and Givskov, M. (2007) The biofilm mode of life. In: Kjelleberg, S, Mashall, K C, Givskov, M (eds) *The biofilm mode of life, mechanisms and adaptations* Horizon Bioscience, Wymondham.
- [109] Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A., Rohde, H. and Mack, D. (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical microbiology and immunology* 191, 101-106.
- [110] Kohanski, M.A., Dwyer, D.J. and Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8, 423-435.
- [111] Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. and Collins, J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797-810.
- [112] Kostenko, V., Ceri, H. and Martinuzzi, R.J. (2007) Increased tolerance of *Staphylococcus aureus* to vancomycin in viscous media. *FEMS immunology and medical microbiology* 51, 277-288.
- [113] Kranich, J., Maslowski, K.M. and Mackay, C.R. (2011). Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. *Semin Immunol* 23, 139-145.
- [114] Lacroix-Gueu, P. (2007) Imagerie de la dynamique de fluorescence (FLIM, FCS) par excitation à deux photons pour des études en milieu cellulaire et au sein de biofilms monomicrobiens. Thèse en sciences de l'université Paris Sud.
- [115] Lacroix-Gueu, P., Briandet, R., Leveque-Fort, S., Bellon-Fontaine, M.N. and Fontaine-Aupart, M.P. (2005) In situ measurements of viral particles diffusion inside mucoid biofilms. *Comptes rendus biologies* 328, 1065-1072.
- [116] Lakins, M.A., Marrison, J.L., O'Toole, P.J. and van der Woude, M.W. (2009) Exploiting advances in imaging technology to study biofilms by applying multiphoton

- laser scanning microscopy as an imaging and manipulation tool. *Journal of microscopy* 235, 128-137.
- [117] Lambert, R.J. and Pearson, J. (2000) Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology* 88, 784-790.
- [118] LaPlante, K.L. and Woodmansee, S. (2009) Activities of daptomycin and vancomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an experimental model of endocarditis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 3880-3886.
- [119] Lauderdale, K.J., Boles, B.R., Cheung, A.L. and Horswill, A.R. (2009) Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun* 77, 1623-1635.
- [120] Lauderdale, K.J., Malone, C.L., Boles, B.R., Morcuende, J. and Horswill, A.R. (2010). Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthop Res* 28, 55-61.
- [121] Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W. and Caldwell, D.E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology* 173, 6558-6567.
- [122] Lawrence, J.R., Wolfaardt, G.M. and Korber, D.R. (1994) Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy. *Applied and environmental microbiology* 60, 1166-1173.
- [123] Lawrence, J.R., Swerhone, G.D., Leppard, G.G., Araki, T., Zhang, X., West, M.M. and Hitchcock, A.P. (2003) Scanning transmission X-ray, laser scanning, and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Applied and environmental microbiology* 69, 5543-5554.
- [124] Leid, J.G., Shirtliff, M.E., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 70, 6339-6345.
- [125] Le Loir, Y. and Gautier, M. (2010) *Staphylococcus aureus*. *Lavoisier*.
- [126] Lepargneur, J.P. and Rousseau, V. (2002) [Protective role of the Doderlein flora]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 31, 485-494.
- [127] Lewis, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5, 48-56.
- [128] Lewis, K. (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology* 322, 107-131.
- [129] Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T. and Lee, C.Y. (2004) Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 186, 722-729.
- [130] Lowy, F.D. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111, 1265-1273.
- [131] Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339, 520-532.

- [132] Lu, T.K. and Collins, J.J. (2007) Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11197-11202.
- [133] Lyczak, J.B., Cannon, C.L. and Pier, G.B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 194-222.
- [134] Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K. and Wozniak, D.J. (2009) Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens* 5, e1000354.
- [135] Magde, D., Elson, E. and Webb, W.W. (1972) Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys Rev Lett* 29, 705-708.
- [136] Manefield M, Welch M, Givskov M, Salmond GP, Kjelleberg S. (2001) Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol Lett*. Nov 27;205(1):131-8.
- [137] Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R. and Bayles, K.W. (2009) Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* 4, e5822.
- [138] Marti, M., Trotonda, M.P., Tormo-Mas, M.A., Vergara-Irigaray, M., Cheung, A.L., Lasa, I. and Penades, J.R. (2011). Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 12, 55-64.
- [139] Martinez, J.L. and Rojo, F. (2011) Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35, 768-789.
- [140] Mascio, C.T., Alder, J.D. and Silverman, J.A. (2007) Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 4255-4260.
- [141] Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., Fatma, T. and Rattan, A. (2005) Adverse effect of staphylococci slime on *in vitro* activity of glycopeptides. *Japanese journal of infectious diseases* 58, 353-357.
- [142] Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J. and Flemming, H.C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol* 26, 3-16.
- [143] Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lopez, J.A., Foster, T.J., Penades, J.R. and Lasa, I. (2009) Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 191, 832-843.
- [144] Minsky, M. (1961) Microscopy apparatus. *US patent* N° 3,013 467.
- [145] Morfeldt, E., Taylor, D., von Gabain, A. and Arvidson, S. (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII. *Embo J* 14, 4569-4577.

- [146] Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S. (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* 4, e1000213.
- [147] Mustoe, T.A., O'Shaughnessy, K. and Kloeters, O. (2006) Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 117, 35S-41S.
- [148] Neu, T.R., Manz, B., Volke, F., Dynes, J.J., Hitchcock, A.P. and Lawrence, J.R. (2010) Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS microbiology ecology* 72, 1-21.
- [149] Neut, D., Kluin, O.S., Crielaard, B.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. and Grijpma, D.W. (2009) A biodegradable antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate) for the treatment of osteomyelitis. *Acta orthopaedica* 80, 514-519.
- [150] Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P. and Walmsley, H.L. (1988) Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32, 518-523.
- [151] Nichols, W.W., Evans, M.J., Slack, M.P. and Walmsley, H.L. (1989) The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 135, 1291-1303.
- [152] Niederfuhr, A., Kirsche, H., Deutschle, T., Poppert, S., Riechelmann, H. and Wellinghausen, N. (2008) *Staphylococcus aureus* in nasal lavage and biopsy of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy* 63, 1359-1367.
- [153] Normark, B.H. and Normark, S. (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252, 91-106.
- [154] Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular microbiology* 48, 1429-1449.
- [155] Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J* 12, 3967-3975.
- [156] O'Connor, D.V. and Phillips, D. (1984) Time-Correlated Single Photon Counting. *Academic Press, London*.
- [157] O'Gara, J.P. (2007) *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 270, 179-188.
- [158] O'Neill, E., Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2009) Carriage of both the *fnbA* and *fnbB* genes and growth at 37 degrees C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of medical microbiology* 58, 399-402.
- [159] O'Neill, A.J., McLaws, F., Kahlmeter, G., Henriksen, A.S. and Chopra, I. (2007b) Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1737-1740.
- [160] O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A. and O'Gara, J.P. (2007a) Association between methicillin susceptibility and biofilm

- regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 45, 1379-1388.
- [161] Oscarsson, J., Kanth, A., Tegmark-Wisell, K. and Arvidson, S. (2006) SarA is a repressor of hla (alpha-hemolysin) transcription in *Staphylococcus aureus*: its apparent role as an activator of hla in the prototype strain NCTC 8325 depends on reduced expression of sarS. *Journal of bacteriology* 188, 8526-8533.
- [162] Otto, M. (2004) Quorum-sensing control in *Staphylococci* -- a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett* 241, 135-141.
- [163] Otto, M. (2008) *Staphylococcal biofilms*. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 207-228.
- [164] Pamp, S.J., Gjermansen, M., Johansen, H.K. and Tolker-Nielsen, T. (2008) Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Molecular microbiology* 68, 223-240.
- [165] Parsek, M.R. and Singh, P.K. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology* 57, 677-701.
- [166] Pastagia M, Euler C, Chahales P, Fuentes-Duculan J, Krueger JG, Fischetti VA. (2011) A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. Feb;55(2):738-44.
- [167] Percival, S.L., Hill, K.E., Malic, S., Thomas, D.W. and Williams, D.W. (2011). Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen* 19, 1-9.
- [168] Periasamy, A. and Diaspro, A. (2003) Multiphoton microscopy. *Journal of biomedical optics* 8, 327-328.
- [169] Peters, R., Peters, J., Tews, K.H. and Bahr, W. (1974) A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. *Biochimica et biophysica acta* 367, 282-294.
- [170] Plouin-Gaudon, I., Clement, S., Huggler, E., Chaponnier, C., Francois, P., Lew, D., Schrenzel, J., Vaudaux, P. and Lacroix, J.S. (2006) Intracellular residency is frequently associated with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *Rhinology* 44, 249-254.
- [171] Proctor, R.A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J.N. and Arbeit, R.D. (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20, 95-102.
- [172] Qazi, S., Middleton, B., Muharram, S.H., Cockayne, A., Hill, P., O'Shea, P., Chhabra, S.R., Camara, M. and Williams, P. (2006) N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74, 910-919.
- [173] Raad, I., Hanna, H., Jiang, Y., Dvorak, T., Reitzel, R., Chaiban, G., Sherertz, R. and Hachem, R. (2007) Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1656-1660.

- [174] Rani, S.A., Pitts, B. and Stewart, P.S. (2005) Rapid diffusion of fluorescent tracers into *Staphylococcus epidermidis* biofilms visualized by time lapse microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 728-732.
- [175] Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M., Buckingham-Meyer, K. and Stewart, P.S. (2007) Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *Journal of bacteriology* 189, 4223-4233.
- [176] Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M. (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*. Dec;146 Pt 12:3237-44.
- [177] Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S. and Bayles, K.W. (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8113-8118.
- [178] Rolauuffs, B., Bernhardt, T.M., von Eiff, C., Hart, M.L. and Bettin, D. (2002) Osteopetrosis, femoral fracture, and chronic osteomyelitis caused by *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCV) treated by girdlestone resection--6-year follow-up. *Arch Orthop Trauma Surg* 122, 547-550.
- [179] Rose, W.E. and Poppens, P.T. (2009) Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 63, 485-488.
- [180] Rosenthal, M., Goldberg, D., Aiello, A., Larson, E. and Foxman, B. (2011). Skin microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol* 11, 839-848.
- [181] Sampath, L.A., Tambe, S.M. and Modak, S.M. (2001) In vitro and in vivo efficacy of catheters impregnated with antiseptics or antibiotics: evaluation of the risk of bacterial resistance to the antimicrobials in the catheters. *Infect Control Hosp Epidemiol* 22, 640-646.
- [182] Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology* 184, 1140-1154.
- [183] Schuurmans, J.M., Nuri Hayali, A.S., Koenders, B.B. and ter Kuile, B.H. (2009) Variations in MIC value caused by differences in experimental protocol. *Journal of microbiological methods* 79, 44-47.
- [184] Schwille, P. and Haustein, E. (2004) Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications. <http://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/schwillepdf>, 1-33.
- [185] Sendi, P. and Proctor, R.A. (2008) *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends in microbiology*.
- [186] Sendi, P., Rohrbach, M., Graber, P., Frei, R., Ochsner, P.E. and Zimmerli, W. (2006) *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis* 43, 961-967.

- [187] Shanks, R.M., Donegan, N.P., Graber, M.L., Buckingham, S.E., Zegans, M.E., Cheung, A.L. and O'Toole, G.A. (2005) Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect Immun* 73, 4596-4606.
- [188] Shanks, R.M., Sargent, J.L., Martinez, R.M., Graber, M.L. and O'Toole, G.A. (2006) Catheter lock solutions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic surfaces. *Nephrol Dial Transplant* 21, 2247-2255.
- [189] Shenkman, B., Rubinstein, E., Cheung, A.L., Brill, G.E., Dardik, R., Tamarin, I., Savion, N. and Varon, D. (2001) Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: roles of *agr* and *sar* loci, platelets, and plasma ligands. *Infect Immun* 69, 4473-4478.
- [190] Showsh, S.A., De Boever, E.H. and Clewell, D.B. (2001) Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 2177-2178.
- [191] Singh, R., Paul, D. and Jain, R.K. (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in microbiology* 14, 389-397.
- [192] Singh, R., Ray, P., Das, A. and Sharma, M. (2009) Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Journal of medical microbiology* 58, 1067-1073.
- [193] Sixou, M., Diouf, A. and Alvares, D. (2007) Biofilm buccale et pathologies buccodentaires. *Antibiotiques* 9, 181-188.
- [194] Sousa, C., Henriques, M. and Oliveira, R. (2011). Mini-review: Antimicrobial central venous catheters - recent advances and strategies. *Biofouling* 27, 609-620.
- [195] Stevens, V., Dumyati, G., Fine, L.S., Fisher, S.G. and van Wijngaarden, E. (2011). Cumulative Antibiotic Exposures Over Time and the Risk of *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 53, 42-48.
- [196] Stewart, P.S. (1996) Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40, 2517-2522.
- [197] Stewart, P.S. (1998) A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnology and bioengineering* 59, 261-272.
- [198] Stewart, P.S. (2003) Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology* 185, 1485-1491.
- [199] Stewart, P.S. and Costerton, J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-138.
- [200] Stewart, P.S., Davison, W.M. and Steenbergen, J.N. (2009) Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 3505-3507.
- [201] Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews* 6, 199-210.
- [202] Stone, G., Wood, P., Dixon, L., Keyhan, M. and Matin, A. (2002) Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 2458-2461.

- [203] Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology* 9, 222-227.
- [204] Tang, H.J., Chen, C.C., Ko, W.C., Yu, W.L., Chiang, S.R. and Chuang, Y.C. (2011) In vitro efficacy of antimicrobial agents against high-inoculum or biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with vancomycin minimal inhibitory concentrations equal to 2 µg/mL (VA2-MRSA). *International journal of antimicrobial agents* 38, 46-51.
- [205] Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossmann, P., Bartova, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovska, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P. and Kokesova, A. (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 93, 97-108.
- [206] Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Debarbouille, M., Penades, J.R. and Lasa, I. (2005) *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *Journal of bacteriology* 187, 5318-5329.
- [207] Tsuji, B.T., Harigaya, Y., Lesse, A.J., Sakoulas, G. and Mylotte, J.M. (2009) Loss of vancomycin bactericidal activity against accessory gene regulator (*agr*) dysfunctional *Staphylococcus aureus* under conditions of high bacterial density. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 64, 220-224.
- [208] Tupin, A., Gualtieri, M., Roquet-Baneres, F., Morichaud, Z., Brodolin, K. and Leonetti, J.P. (2010) Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *International journal of antimicrobial agents* 35, 519-523.
- [209] Tu Quoc, P.H., Genevaux, P., Pajunen, M., Savilahti, H., Georgopoulos, C., Schrenzel, J. and Kelley, W.L. (2007) Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 75, 1079-1088.
- [210] Valeur, B. (2002) Molecular fluorescence: Principles and Applications. *Wiley-VCH*.
- [211] Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.M., Amorena, B., Penades, J.R. and Lasa, I. (2003) SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 48, 1075-1087.
- [212] Vaudaux, P.E., Francois, P., Proctor, R.A., McDevitt, D., Foster, T.J., Albrecht, R.M., Lew, D.P., Wabers, H. and Cooper, S.L. (1995) Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect Immun* 63, 585-590.
- [213] Vincenot, F., Saleh, M. and Prévost, G. (2008) Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires* 407, 61-69.
- [214] Vijan, L.E. (2009) THE INTERACTION OF VANCOMYCIN WITH DNA. *Revue Roumaine de Chimie* 54, 807-813.
- [215] Voggu, L., Schlag, S., Biswas, R., Rosenstein, R., Rausch, C. and Gotz, F. (2006) Microevolution of cytochrome bd oxidase in *Staphylococci* and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *Journal of bacteriology* 188, 8079-8086.

- [216] von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. and Peters, G. (2001b) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344, 11-16.
- [217] von Eiff, C., Peters, G. and Heilmann, C. (2002) Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2, 677-685.
- [218] von Eiff, C., Peters, G. and Becker, K. (2006) The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* 37 Suppl 2, S26-33.
- [219] von Eiff, C., Proctor, R.A. and Peters, G. (2001a) Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. *Postgrad Med* 110, 63-64, 69-70, 73-66.
- [220] Vuong, C., Saenz, H.L., Gotz, F. and Otto, M. (2000) Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 182, 1688-1693.
- [221] Waharte, F., Steenkeste, K., Briandet, R. and Fontaine-Aupart, M.P. (2010) Diffusion measurements inside biofilms by image-based fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis with a commercial confocal laser scanning microscope. *Applied and environmental microbiology* 76, 5860-5869.
- [222] Walters, M.C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J. and Stewart, P.S. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 317-323.
- [223] Weber, S.D., Ludwig, W., Schleifer, K.H. and Fried, J. (2007) Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. *Applied and environmental microbiology* 73, 6233-6240.
- [224] Wenger, J. and Rigneault, H. (2010) Photonic methods to enhance fluorescence correlation spectroscopy and single molecule fluorescence detection. *International journal of molecular sciences* 11, 206-221.
- [225] Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A. and Nouwen, J.L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5, 751-762.
- [226] Wimpenny, J., Manz, W. and Szewzyk, U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol*
- [227] Woods, G.L. and Yam, P. (1988) Evaluation of MicroScan MIC panels for detection of oxacillin-resistant staphylococci. *Journal of clinical microbiology* 26, 816-820.
- [228] Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A. and Parsek, M.R. (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7907-7912.
- [229] Wright, C.J., Shah, M.K., Powell, L.C. and Armstrong, I. (2010) Application of AFM from microbial cell to biofilm. *Scanning* 32, 134-149.
- [230] Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M. and Greenberg, E.P. (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of bacteriology* 186, 1838-1850.

- [231] Zeller, V. and Desplaces, N. (2006) Antibiothérapie des infections ostéoarticulaires à pyogènes chez l'adultes : principes et modalités. *Revue de Rhumatisme* 73, 183-190.
- [232] Zheng, Z. and Stewart, P.S. (2004) Growth limitation of *Staphylococcus epidermidis* in biofilms contributes to rifampicin tolerance *Biofilms* 1, 31-35.
- [233] Zimmerli, W., Frei, R., Widmer, A.F. and Rajacic, Z. (1994) Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 33, 959-967.
- [234] Zobell, C.E. (1943) The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of bacteriology* 45, 555-564

ANNEXE : Valorisation scientifique

Communications orales

- [1] **S. DADDI OUBEKKA**, R. BRIANDET, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS), une technique performante pour l'étude de la diffusion-réaction d'antibiotiques au sein des biofilms. Colloque « Biofilms et Santé », 4^{ème} journée thématique Réseau National Biofilms, 11-12 janvier 2010, Poitiers.
- [2] **S. DADDI OUBEKKA**, R. BRIANDET, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. Diffusion-réaction d'antibiotiques au sein des biofilms de *S. aureus* par dynamique de fluorescence (FLIM, FCS). Journées Scientifiques Internationales sur les Biofilms (JSIB), 31 mai-02 juin 2010, Annaba, Algérie.
- [3] **S. DADDI OUBEKKA**, R. BRIANDET, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. Study of antibiotics diffusion-reaction in biofilms by dynamical fluorescence techniques (FLIM, FCS). Biofilm 4 international conference, 1-3 September 2010, Winchester, UK.
- [4] **S. DADDI OUBEKKA**, R. BRIANDET, F. WAHARTE, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. Image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to dissect vancomycin diffusion-reaction processes in *Staphylococcus aureus* biofilms. European Conferences on Biomedical Optics (ECBO), 22-26 May 2011, Munich, Germany.
- [5] **S. DADDI OUBEKKA**, R. BRIANDET, F. WAHARTE, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. La microscopie de fluorescence multimodale résolue en temps pour la compréhension des mécanismes de tolérance à la vancomycine des biofilms de *S. aureus*. Journée Thématique Junior Bioadhésion, 15 juin 2011, Paris.

Posters

- [6] **S. DADDI OUBEKKA**, E. TISHCHENKO, K. STEENKESTE, F. WAHARTE, R. BRIANDET, M.-P. FONTAINE-AUPART. Fluorescence microscopy approaches to study antimicrobial molecules diffusion-reaction inside biofilms. Eurobiofilm, 1-6 September 2009, Roma, Italy.
- [7] **S. DADDI OUBEKKA**, A. BRIDIER, R. BRIANDET, K. STEENKESTE, M.-P. FONTAINE-AUPART. Correlative dynamic optical microscopy (TL, FRAP, FCS, FLIM) to decipher medical biofilm reactivity. 8th European Biophysics Congress, 23-27 August 2011, Budapest, Hungary.

Publications scientifiques

- [8] A. BRIDIER, E. TISHCHENKO, F. DUBOIS-BRISSONNET, J.-M. HERRY, V. THOMAS, **S. DADDI OUBEKKA**, F. WAHARTE, K. STEENKESTE, M.-P. FONTAINE-AUPART, R. BRIANDET. Deciphering Biofilm Structure and Reactivity by Multiscale Time-Resolved Fluorescence Analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 715: 333-49 (2011).
- [9] **S. DADDI OUBEKKA**, R. BRIANDET, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. Correlative time resolved fluorescence microscopy (TL, FRAP, FCS, FLIM) to assess antibiotic diffusion-reaction inside biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2012), Accepted for publication.

- [10] **S. DADDI OUBEKKA**, R. BRIANDET, F. WAHARTE, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. Image-based Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to dissect vancomycin diffusion-reaction processes in *Staphylococcus aureus* biofilms. SPIE Proceeding- Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II (2011)-Vol. 8087 1I.
- [11] **S. DADDI OUBEKKA**, G. PAUL, R. BRIANDET, M.-P. FONTAINE-AUPART, K. STEENKESTE. Spatial visualization of the action of rifampicin and vancomycin alone or in association in *Staphylococcus aureus* biofilms. (en cours de preparation)

Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de Staphylococcus aureus Apport de la microscopie de fluorescence multimodale

Résumé :

Les bactéries forment des communautés spatiales adhérentes à des surfaces, appelées biofilms. Ces organisations bactériennes sont omniprésentes dans les milieux naturel, industriel et médical et peuvent porter atteinte à notre santé lorsqu'elles hébergent des agents pathogènes, parmi lesquels le médiateur *Staphylococcus aureus* sur lequel a porté l'ensemble de ce travail de thèse. Cette bactérie est l'une des principales causes d'infections chroniques, mais également d'infections nosocomiales, impliquant le plus souvent des biofilms. Il est aujourd'hui reconnu qu'une telle biostructure est un véritable bouclier à l'action des antimicrobiens et à celle du système immunitaire. Outre les résistances génétiques des bactéries pathogènes aux antibiotiques, l'hétérogénéité chimique et biologique de la structure tridimensionnelle des biofilms pourrait être à l'origine de ces phénomènes de tolérance et de chronicité d'infections. C'est à cette problématique que se rattache ce travail de thèse concernant l'action de la vancomycine sur des biofilms de *S. aureus*.

Alors que les connaissances sur la réactivité de cet antibiotique clef avec *S. aureus* proviennent essentiellement d'études réalisées sur des cellules planctoniques, l'originalité de notre approche a été d'étudier la diffusion-réaction de la vancomycine *in situ* dans l'épaisseur des biofilms en utilisant en particulier des outils avancés de microscopie de fluorescence (Time-Lapse, FLIM, FRAP, et FCS). Nous avons ainsi évalué sa biodisponibilité dans la matrice d'exopolymères, ainsi que l'impact de la physiologie spécifique des bactéries incluses en biofilms sur l'activité de cet antibiotique, utilisé seul ou en association avec la rifampicine. Cette approche multidisciplinaire a permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la singulière tolérance de ces biostructures à l'action des antibiotiques, et de souligner l'urgence de développer des approches préventives telles que le diagnostic précoce des infections impliquant des biofilms.

Mots clés : Biofilm, tolérance aux antibiotiques, microscopie de fluorescence, Time-lapse, FRAP, FCS, FLIM.

Dynamic reactivity of antibiotics inside Staphylococcus aureus biofilms Contribution of multimodal fluorescence microscopy

Abstract:

Bacteria form architecturally complex communities adherent to surfaces, known as biofilms. These structured living cells are ubiquitous and found in natural, industrial and medical environments. They can affect our health when they host pathogens as the well known *Staphylococcus aureus* species which constitute the main purpose of this thesis. This bacteria is one of the major causes of chronic and nosocomial infections, most often involving biofilms. It is now recognized that such biostructure is a true shield against the action of antimicrobial agents and the host immune system. In addition to the genetic resistance of pathogenic bacteria to antibiotics, the chemical and biological heterogeneity of biofilms could be the cause of these phenomena of tolerance and apparition of chronic infections. This work aimed at studying of the action of vancomycin on *S. aureus* biofilms.

While the knowledge on the reactivity of this key antibiotic with *S. aureus* bacteria comes mainly from studies of planktonic cells, the originality of our approach was to study the diffusion-reaction processes of vancomycin *in situ* in the thickness of biofilms using particularly advanced fluorescence imaging tools (Time-Lapse, FLIM, FRAP and FCS). We thus assess its bioavailability in the exopolymeric matrix, and the impact of the cell physiology of bacteria included in biofilms on the activity of this antibiotic when used alone or in combination with rifampicin. This multidisciplinary approach has allowed a better understanding of the mechanisms involved in the particular tolerance of these biostructures to the action of antibiotics, and underlines the emergency to develop preventive approaches such as early diagnosis of infections involving biofilms.

Keywords: Biofilm, antibiotics tolerance, fluorescence microscopy, Time-Lapse, FRAP, FCS, FLIM.