



Activités anti-biofilm de Lactobacillus vis-à-vis de Klebsiella Pneumoniae

Rosyne Lagrafeuille

► To cite this version:

Rosyne Lagrafeuille. Activités anti-biofilm de Lactobacillus vis-à-vis de Klebsiella Pneumoniae. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1PP03 . tel-01661354v2

HAL Id: tel-01661354

<https://theses.hal.science/tel-01661354v2>

Submitted on 13 Dec 2017

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.

***ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***

THESE

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Microbiologie

Soutenue le 28 Septembre 2016

par

Rosyne LAGRAFEUILLE

**Activité anti-biofilm de *Lactobacillus* vis-à-vis
de *Klebsiella pneumoniae***

Membres : Pr Nicolas BARNICH, IUT, Université d'Auvergne
Dr Adrien NIVOLIEZ, BIOSE, Aurillac
Pr Christiane FORESTIER, UFR Pharmacie, Université d'Auvergne

Rapporteurs : Dr Muriel THOMAS, INRA, Jouy-en-Josas
Pr Marie-José BUTEL, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris
Dr Muriel MERCIER-BONIN, INRA, Toulouse

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement
UMR CNRS 6023
Faculté de Pharmacie, Université d'Auvergne
28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée grâce à un financement de la Région Auvergne, que je remercie grandement.

*Je remercie **Muriel Mercier-Bonin**, **Muriel Thomas** ainsi que **Marie-José Butel** de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail. Je remercie également **Nicolas Barnich** et **Adrien Nivoliez** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.*

*Au terme de ce doctorat, je tiens à remercier sincèrement **Christiane Forestier** de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir guidée dans la réalisation de cette thèse. Votre disponibilité, vos précieux conseils, mais aussi votre rire communicatif et vos qualités humaines font de ce laboratoire un environnement de travail et de partage chaleureux. Merci de votre confiance et de m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche à vos côtés.*

*Je remercie vivement **Sylvie Miquel** de m'avoir aidée dans l'accomplissement de cette thèse. Merci de m'avoir transmis toutes tes connaissances techniques et scientifiques et fait part de ton expérience. Tu as toujours su prendre le temps de m'épauler, de me conseiller et surtout de répondre à mes innombrables questions, parfois redondantes !!! Enfin, un immense merci pour ton soutien, plus particulièrement pour la bienveillance que tu as eue à mon égard dans les moments plus difficiles.*

*Un grand merci à **Marjolaine Vareille-Delarbre** pour sa gentillesse ainsi que pour sa contribution à ces travaux de recherche notamment au versant immunologique.*

*Je tiens à remercier **Annick Bernalier-Donadille** et **Elisabeth Billard** d'avoir lu et évalué mon travail en acceptant de faire partie de mes comités de thèse.*

*Je remercie également toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à ce travail, en particulier les partenaires industriels investis dans ce projet de thèse ; les sociétés **biose**, **BioFilm Control** et **Biovitis** pour ces nombreuses réunions qui m'ont aidé à compléter et valoriser mes travaux. Merci également à **Philippe Langella** et **Florian Chain** de m'avoir aimablement envoyé des surnageants de *Lactobacillus*. Merci à **Christelle Blavignac** pour son expertise en microscopie électronique à balayage ainsi qu'à **Emmanuelle Bille** et **Xavier Nassif** pour l'accueil au sein de leur laboratoire le temps d'une formation.*

J'exprime ma profonde gratitude envers mes collègues de laboratoire, tous ceux aux côtés de qui j'ai eu la chance de travailler et passer de très bonnes soirées extra-professionnelles. Je tiens à souligner vos aptitudes pâtissières et par conséquent toutes ces occasions non manquées de céder à la gourmandise... que dis-je, de perfectionner notre palais !

Un immense merci plus particulièrement à :

***Cyril Guilhen**, alias « **Guilhen** », pour tous les moments passés ensemble qui ne sont pas étrangers à cette complicité qu'est devenue amitié. Acolyte d'*open space* et de manips durant ces journées sans fin au labo, mais aussi de mots croisés et surtout de plaisanteries, on forme une sacrée équipe **LIMOUSINE !!!** Je te lègue le devoir qui m'incombe chaque matin, celui de prendre le journal, car je ne serai bientôt plus là pour mener cet impératif à bien !*

Nicolas Charbonnel, le plus gourmand des supporters de l'ASM ! Je te remercie pour tous ces conseils et astuces techniques scientifiques prodigués ainsi que ton expertise en « trouillotage », qui je dois bien le dire m'ont beaucoup aidée ! Merci également pour tous ces échanges « littéraires » ! Et ne t'en fais pas, on va le ramener à la maison ce bouclier de Brennus.. un jour !

Damien Balestrino, pour ses précieux conseils en biologie cellulaire et moléculaire. Je te remercie de m'avoir fait part de ton expérience.

Je souhaite remercier chaleureusement **Marie-Pierre Leoty** pour son aide précieuse au laboratoire mais également pour sa jovialité et sympathie quotidienne ainsi que son écoute. Nos bavardages et confidences vont me manquer.

Je remercie également **Louis Carles**, alias « Carlesss, le cordon bleu du sud-ouest », pour son soutien, sa gentillesse. Je me souviendrai longtemps de tes lasagnes au confit de canard !!!

Plus globalement, un grand merci à toutes les personnes du labo qui m'ont aidée chacune à leur façon, je pense à **Pascale Gueirard, Anne Pracros, Elisabeth Coupez, Laurence Nakusi, Valérie Lyonnet, Jérôme Ory, Claire Aumeran, Claire Marqués, Jean-Louis Bonnet**, ainsi qu'à nos confrères du campus des Cézeaux **Geneviève Bricheux et Philippe Bouchard**.

Je tiens à remercier chaleureusement **Aurélien Voissière**, pour sa bienveillance et son soutien inconditionnel. Merci pour ton humour sans faille et cette réelle amitié sur laquelle je peux compter. « Te remerche » mon petit Auré !

Une pensée particulière à l'ensemble de **mes amis**, universitaires ou de plus longue date, Limousins, « Volcaniques », plus généralement nationaux ou expatriés. De par votre soutien, vous n'êtes pas étrangers à la concrétisation de cette thèse.

Pour terminer, mes remerciements s'adressent à ceux qui ont veillé sur moi depuis toujours, qui avec tout l'amour que l'on puisse espérer, m'ont fait confiance et soutenue dans tous mes projets, merci à **mes parents** ainsi qu'à **mon frère**.

ABREVIATIONS

ADNe	Acide désoxyribonucléique extracellulaire
AHL	Acyl Homoserine Lactone
AI-2	Autoinducteur de type 2
AIEC	Adherent invasive <i>E. coli</i>
Bap	Biofilm-associated protein
c-di-GMP	Di-guanosine Monophosphate cyclique
CSP	Competence stimulating peptide
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DAAO	7-hydroxy-9H-1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one
DNase	Désoxyribonucléase
DSS	Dextran Sodium Sulfate
EFSA	European Food Safety Authority
EPS	Exopolysaccharide
FAO	Food and agriculture organization
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
GRAS	Generally recognised As Safe
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ISAPP	International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
LAB	Lactic Acid Bacteria
LCN2	Lipocaline 2
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MGM	Micro-organismes Génétiquement Modifiés
MOI	Multiplicité d'Infection
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
NDA	Dietetic Products, Nutrition and Allergies
NO	Oxyde nitrique
OGM	Organismes génétiquement modifiés

PAVM	Pneumopathies Acquises sous Ventilation Mécanique
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PMN	PolyMorphonucléaires Neutrophiles
PNAG	Poly- β -1,6-N-AcetylGlucosamine
QPS	Qualified Presumption of Safety
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
QS	Quorum-Sensing
RAISIN	Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales
SICE	Stress-Inducible Controlled Expression
STEC	Shiga Toxin-producing <i>E. coli</i>
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid solution
Treg	Lymphocyte T régulateur
UFC/CFU	Unité Formant Colonies / Colony-Forming Unit
VPS	<i>Vibrio</i> polysaccharides

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Avant propos	3
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
1 BIOFILMS.....	5
1.1 Historique	5
1.2 Définition	5
1.3 Structure et composition des biofilms.....	6
1.3.1 Architecture du biofilm	6
1.3.2 Composition de la matrice.....	7
1.4 Différentes étapes de formation du biofilm.....	8
1.4.1 Adhésion.....	8
1.4.2 Maturation	11
1.4.3 Dispersion.....	12
1.5 Avantages de la vie en biofilm	13
1.5.1 Avantages métaboliques	13
1.5.2 Protection et résistance face aux stress extérieurs.....	14
1.5.3 Adaptation à l'environnement.....	16
1.6 Conséquences néfastes liées aux biofilms	16
2 PROBIOTIQUES.....	18
2.1 Historique	18
2.2 Définition	18
2.3 Mise sur le marché de nouveaux micro-organismes probiotiques	20
2.3.1 Sélection des micro-organismes probiotiques.....	20
2.3.2 Aspects réglementaires.....	21
2.4 Les probiotiques du futur ?	22
2.4.1 Probiotiques de « deuxième génération »	22
2.4.2 Probiotiques de « troisième génération »	22

2.5 Applications thérapeutiques	24
2.5.1 Troubles physiologiques et métaboliques	24
2.5.2 Infections bactériennes	26
2.5.3 Réactions immunitaires délétères	27
2.6 Risques associés aux probiotiques.....	29
2.6.1 Infections systémiques	29
2.6.2 Activités métaboliques délétères et immunomodulation excessive	29
2.6.3 Transfert de gènes	30
2.6.4 Potentialisation de l'adhésion de bactéries pathogènes.....	30
2.7 Mécanismes d'action	31
2.7.1 Modulation du microbiote	31
2.7.2 Renforcement de la fonction barrière épithéliale	33
2.7.3 Immunomodulation	34
3 INTERACTIONS MICROBIENNES AU SEIN DES BIOFILMS.....	38
3.1 Interactions coopératives	38
3.2 Interactions compétitives	39
3.2.1 Exploitations compétitives	39
3.2.2 Interférences compétitives.....	40
3.2.3 Activité anti-biofilm des probiotiques.....	46
PARTIE EXPERIMENTALE	49
 Introduction	49
 Publication	51
 Données complémentaires	82
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100
ANNEXES	123
 Revue	123
 Communications scientifiques	138

FIGURES et TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Biofilms de la plaque dentaire	5
Figure 2 : Observation de biofilm mono-espèce en microscopie électronique à balayage	5
Figure 3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien	6
Figure 4 : Hétérogénéité métabolique au sein d'un biofilm bactérien	6
Figure 5 : Observation en microscopie électronique à balayage de biofilms	6
Figure 6 : Composants de la matrice extracellulaire de biofilm	7
Figure 7 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien	8
Figure 8 : Clichés de microscopie électronique à transmission des différentes structures de surface bactériennes	9
Figure 9 : Clichés de microscopie électronique à transmission des pili de type 3 chez <i>C. koseri</i> et <i>E. coli</i>	10
Figure 10 : Organisation des gènes codant les pili de type 3 chez <i>K. pneumoniae</i> et de leur mise en place à la surface des bactéries	10
Figure 11 : Infections liées aux biofilms chez l'Homme, dans les tissus ou par l'intermédiaire de dispositifs médicaux	17
Figure 12 : Genres microbiens fréquemment utilisés dans les produits probiotiques observés en microscopie électronique à balayage	18
Figure 13 : Publicité pour la Lactobacilline parue dans l'édition du 6 décembre 1919 dans <i>The British Medical Journal</i>	18
Figure 14 : Lignes directives pour l'évaluation des probiotiques destinés à l'usage humain .	20
Figure 15 : Mécanismes d'action des probiotiques	31
Figure 16 : Mécanismes d'action des bactériocines	31
Figure 17 : Schéma des effets immunomodulateurs induits par des bactéries probiotiques ...	35
Figure 18 : Biofilms de <i>Lactobacillus</i>	37
Figure 19 : Modèle de coopérations métaboliques au sein d'une communauté bactérienne ..	38

Figure 20 : Modèle de persistance d' <i>A. actinomycetemcomitans</i> en co-culture avec <i>S. gordonii</i>	38
Figure 21 : Modèle de résistance de colonisation déployé par la communauté O-mix vis-à-vis d' <i>E. coli</i>	40
Figure 22 : Illustration des interactions inter-espèces au sein de communautés microbiennes orales	40
Figure 23 : Représentation schématique des 3 voies de signalisation du quorum-sensing	41
Figure 24 : Modèle pour la détection, l'absorption et la signalisation des AI-2 via le système Lsr chez <i>E. coli</i>	41
Figure 25 : Observations au microscope optique du phénomène de dispersion de biofilms matures formés par <i>P. aeruginosa</i> par l'ajout de surnageant de culture de <i>P. aeruginosa</i> et d'acide cis-2-decanoïque	45
Figure 26 : Observations en microscopie confocale de biofilms formés par <i>Lactobacillus brevis</i> et <i>Prevotella melaninogenica</i>	46
Figure 27 : Classification of <i>Lactobacilli</i> supernatants according to their anti-biofilm activity against <i>K. pneumoniae</i> CH1034	55
Figure S1 : Classification of <i>Lactobacilli</i> supernatants according to their anti-biofilm activity against <i>S. epidermidis</i> ATCC35984.....	55
Figure 28 : Reduction in <i>K. pneumoniae</i> biofilm biomass after treatment with <i>Lactobacillus</i> cell-free supernatant	55
Figure S2 : Effect of <i>L. plantarum</i> CIRM653 cell-free supernatant on the capacity of several Gram-negative (dark bars) and Gram-positive (light bars) bacteria to form biofilm.....	56
Figure 29 : <i>L. plantarum</i> CIRM653 anti-biofilm activity against <i>K. pneumoniae</i> in continuous flow conditions	56
Figure S3 : Effect of <i>L. plantarum</i> CIRM653 on <i>K. pneumoniae</i> preformed biofilm	56
Figure 30 : Transcriptional and functional impact of <i>L. plantarum</i> CIRM653 supernatant on <i>K. pneumoniae</i>	57
Figure S4 : Transcriptional analysis of <i>K. pneumoniae</i> biofilm-related genes	57
Figure 31 : Intestinal colonization by <i>K. pneumoniae</i> of mice challenged with <i>Lactobacillus</i> strains	58
Figure 32 : Biomasse de biofilms à <i>K. pneumoniae</i> après traitements physico-chimiques et enzymatiques du surnageant de <i>L. plantarum</i> CIRM653	86

Figure 33 : Activité anti-biofilm du surnageant (Sn) de la souche <i>L. plantarum</i> CIRM653 vis-à-vis de <i>K. pneumoniae</i> LM21	87
Figure 34 : Système de culture cellulaire en flux : système ibidi®	88
Figure 35 : Schéma du niveau de prise de vue et observations en microscopie confocale de biofilms à <i>K. pneumoniae</i> constitués en flux continu sur surface biotique	89
Figure 36 : Effet de <i>L. plantarum</i> CIRM653 (Lp) sur la réponse inflammatoire des cellules épithéliales pulmonaires A549 induite par <i>K. pneumoniae</i> LM21 (Kp).	90
Figure 37 : Effet du surnageant de culture de bifidobactéries sur la formation de biofilm par <i>K. pneumoniae</i>	91
Figure 38 : Représentation schématique du mode d'action supposé de <i>L. plantarum</i> CIRM653.....	99

TABLEAUX

Tableau 1 : Habilité de différents traitements chimiques à disperser un biofilm formé par <i>Staphylococcus</i>	8
Tableau 2 : Allégations santé des produits laitiers ou de micro-organismes probiotiques délivrées à ce jour	21
Tableau 3 : Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques	31
Table S1 : Ranking position from the less effective to the most effective supernatant	55
Table 4 : <i>K. pneumoniae</i> CH1034 growth rates in BHI medium (control condition) and in <i>Lactobacilli</i> supernatant (Sn)	55
Table S2 : Bacterial strains used in this study.....	63
Table S3 : Primers used in this study	64
Tableau 5 : Souches de <i>Bifidobacterium</i> utilisées dans le criblage initial	83
Tableau 6 : Taux de sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les lignées cellulaires épithéliales pulmonaires (A549) et intestinales (Caco-2) après contact avec <i>K. pneumoniae</i> LM21 ou <i>L. plantarum</i> CIRM653	89

ANNEXES

Annexe 1 : Anti-biofilm Activity as a Health Issue (Revue)	123
Annexe 2 : Communications scientifiques	138

RESUME

Dans la nature, les micro-organismes sont organisés en communautés agrégées dénommées biofilms, particulièrement adaptées à la survie en milieu hostile. Les difficultés pour prévenir la formation ou éliminer des biofilms matures par des stratégies conventionnelles ont encouragé le développement de nouvelles approches inspirées des mécanismes de compétition entre différents micro-organismes au sein de biofilms naturels.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'effet anti-biofilm de bactéries bénéfiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Dans un premier temps, nous avons testé l'effet anti-biofilm de surnageants neutralisés vis-à-vis de deux pathogènes *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis* dans un modèle expérimental statique. Si les extraits des quelques souches de *Bifidobacterium* testées stimulaient la formation de biofilm par *K. pneumoniae* sur surface abiotique, la majorité de ceux des 140 souches de *Lactobacillus* exerçait un effet inhibiteur et nous avons retenu une des souches dont le surnageant de culture entraînait une inhibition majeure (70%), *Lactobacillus plantarum* CIRM653. Cet extrait s'est également avéré capable de disperser des biofilms préformés à *K. pneumoniae* sur surface abiotique mais aussi d'inhiber la formation de biofilms sur surface biotique, et ce indépendamment d'un effet bactéricide.

La formation de biofilms mixtes formés par *L. plantarum* et *K. pneumoniae* dans des modèles expérimentaux cinétiques a permis, comparativement à l'observation de biofilms mono-espèce à *K. pneumoniae*, de mettre en évidence des défauts de structuration du biofilm associés à une diminution de la biomasse de *K. pneumoniae* et une augmentation de celle de *L. plantarum*.

Grâce à une approche transcriptionnelle ciblée, nous avons montré que *L. plantarum* induisait, par le biais de son surnageant, des modifications de l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *K. pneumoniae*. Quatre gènes impliqués dans le quorum-sensing (opérons *lsr*) étaient sous-exprimés et trois gènes de structure du pilus de type 3 étaient sur-exprimés. L'augmentation de la production de pili de type 3 fonctionnels a été validée par Western-blot et des tests d'hémagglutination. Cette surexpression est probablement responsable du niveau élevé des capacités d'adhésion sur surface abiotique d'agrégats de *K. pneumoniae* issus de la dispersion induite par *L. plantarum*.

Le comportement des deux souches a également été testé *in vivo*, dans un modèle murin de colonisation intestinale par *K. pneumoniae* avec administration orale quotidienne de *L. plantarum*. Le dénombrement du pathogène dans les selles des animaux a montré qu'en présence de *L. plantarum*, *K. pneumoniae* maintient des niveaux de colonisation élevés, contrairement au contrôle (sans *Lactobacillus*) où une diminution graduelle est observée.

Enfin, nous avons initié le développement d'un modèle expérimental tripartite permettant d'associer les deux partenaires bactériens avec des cellules épithéliales dans un système en flux continu. La réponse spécifique des cellules eucaryotes a également été abordée : nous avons pu mettre en évidence que *L. plantarum* exerçait un effet inhibiteur vis-à-vis de la réponse inflammatoire épithéliale pulmonaire induite par *K. pneumoniae*.

En conclusion, la description d'une activité anti-biofilm *in vitro* ne serait pas synonyme d'une réduction *in vivo* de la colonisation de surfaces biotiques, mais à une plus grande capacité de dissémination. Ces observations démontrent l'importance d'une expertise précise de l'action des bactéries bénéfiques et de la maîtrise du ratio bénéfice-risque pour leur utilisation.

Mots-clés : Biofilm, *Lactobacillus*, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

In the natural environment microorganisms are organized in aggregated communities called biofilms, which are particularly adapted to the survival in harsh conditions. The difficulties to prevent the formation or elimination of mature biofilms by conventional strategies have encouraged the development of new approaches inspired by competition mechanisms occurring between microorganisms within natural biofilms.

In this work, we looked for anti-biofilm effects of beneficial bacteria belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus. We first tested the anti-biofilm effect of neutralized supernatants against both pathogens *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus epidermidis* in a static experimental model. The few *Bifidobacterium* extracts tested led to an increase in biofilm formation by *K. pneumoniae* on abiotic surface, whereas the majority of the 140 strains of *Lactobacillus* exerted an inhibitory effect. *Lactobacillus plantarum* CIRM653 was selected for further experiments because its culture supernatant displayed major inhibition (70%). This extract was also capable of dispersing preformed biofilms of *K. pneumoniae* on abiotic surface, but also able to inhibit biofilm formation on biotic surface, independently of a bactericidal effect.

The formation of mixed biofilm containing *L. plantarum* and *K. pneumoniae* in kinetic experimental models highlighted the biofilm structure defects associated with a decrease of *K. pneumoniae* biomass and an increase of that of *L. plantarum*, compared to a monospecies *K. pneumoniae* biofilm.

Targeted transcriptional approach was used to assess changes in the expression of genes involved in biofilm formation by *K. pneumoniae* after contact with *L. plantarum* supernatant. Four genes involved in quorum-sensing (operons *lsr*) were under-expressed and three type 3 pili structural genes were over-expressed. The increase of functional surface located type 3 pili was validated by Western blotting and hemagglutination tests. This overexpression was probably responsible for the observed high level of adhesion capacity to abiotic surfaces of *K. pneumoniae* aggregates recovered after dispersion induced by *L. plantarum*.

The behavior of the two strains was also tested *in vivo* in a *K. pneumoniae* murine intestinal colonization model with daily oral administration of *L. plantarum*. Viable cells counting of the pathogen in the animals' feces showed that *K. pneumoniae* maintained high levels of colonization in the presence of *L. plantarum*, unlike the control (without *Lactobacillus*) where a gradual decrease was observed.

Finally, we initiated the development of a tripartite experimental model allowing the combination of the two bacterial partners with epithelial cells in a continuous flow system. In parallel, the specific response of eukaryotic cells to these bacteria was addressed: *L. plantarum* exerted an inhibitory effect on the pulmonary epithelial inflammatory response induced by *K. pneumoniae*.

In conclusion, these results highlight the discrepancy between *in vitro* anti-biofilm activity of *L. plantarum* and its *in vivo* behavior leading to increased dissemination of the pathogen. Substantial expertise of beneficial bacteria is therefore necessary to fully assess their benefit-risk ratio.

Keywords : Biofilm, *Lactobacillus*, *Klebsiella pneumoniae*

AVANT PROPOS

Les biofilms sont définis comme des communautés polymicrobiennes engluées dans une matrice auto-produite et adhérant à une surface biotique ou abiotique. Ils représentent le mode de vie des micro-organismes le plus abondant dans la nature. Les bactéries qui les composent, dites sessiles, expriment fréquemment des phénotypes différents de leurs homologues planctoniques, avec de fortes capacités de colonisation de nouvelles surfaces et une grande tolérance aux stress exogènes tels les agents anti-infectieux. S'ils sont parfois considérés comme un atout, les biofilms sont la source de problèmes majeurs dans de nombreux domaines environnementaux, alimentaires mais également dans le domaine médical avec plus de 75% des infections microbiennes rencontrées chez l'Homme favorisées par la formation et la persistance des biofilms.

Les difficultés pour prévenir ou éliminer les biofilms par des stratégies conventionnelles ont encouragé la recherche de solutions alternatives. L'utilisation de bactéries ou de molécules dérivées de bactéries constitue ainsi une nouvelle approche inspirée de la découverte des mécanismes de compétition ayant lieu au sein de biofilms naturels entre les différents micro-organismes. Mais si les exemples d'activités anti-biofilm des pathogènes abondent dans la littérature récente, peu de données sont disponibles concernant l'inhibition de la formation de biofilm par des bactéries bénéfiques ou probiotiques. C'est à cet aspect que nous nous sommes intéressées.

Ce mémoire de thèse débute par une introduction bibliographique divisée en 3 chapitres. Dans un premier temps, nous abordons les généralités concernant les biofilms, leur composition, les différentes étapes de leur formation ainsi que les conséquences liées à ce mode de vie. Une seconde partie définit les probiotiques, de leur découverte à leur statut juridique, l'intérêt thérapeutique de leur utilisation dans diverses pathologies ainsi que leurs mécanismes d'action. Nous consacrons enfin un dernier chapitre à la présentation des diverses interactions microbiennes s'exerçant au sein des biofilms et les différents mécanismes anti-biofilm connus à ce jour.

La deuxième partie de ce manuscrit décrit la partie expérimentale de ce travail. Il débute par l'étude d'un large panel de souches dites bénéfiques afin d'isoler celles présentant une activité anti-biofilm vis-à-vis de micro-organismes pathogènes, un bacille à Gram-négatif, *Klebsiella pneumoniae* et un coque à Gram-positif, *Staphylococcus epidermidis*. Les souches les plus efficaces appartenant au genre *Lactobacillus* ont été sélectionnées pour une

caractérisation plus approfondie des mécanismes mis en jeu, via des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*.

Ces travaux ont donné lieu à une publication en cours de soumission qui est présentée en l'état dans le mémoire. Des expériences complémentaires n'ayant pas été incluses dans l'article sont également présentées dans la deuxième partie de la partie expérimentale. De plus, en annexe est présentée une revue de la littérature intitulée "Anti-biofilm Activity as a Health Issue" à laquelle j'ai participé et qui présente un regard nouveau et critique de l'utilisation d'approches anti-biofilm en clinique.

Pour terminer ce manuscrit, j'ai choisi de discuter mes résultats et d'exposer les perspectives à long terme de l'ensemble des travaux réalisés pendant ma thèse.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

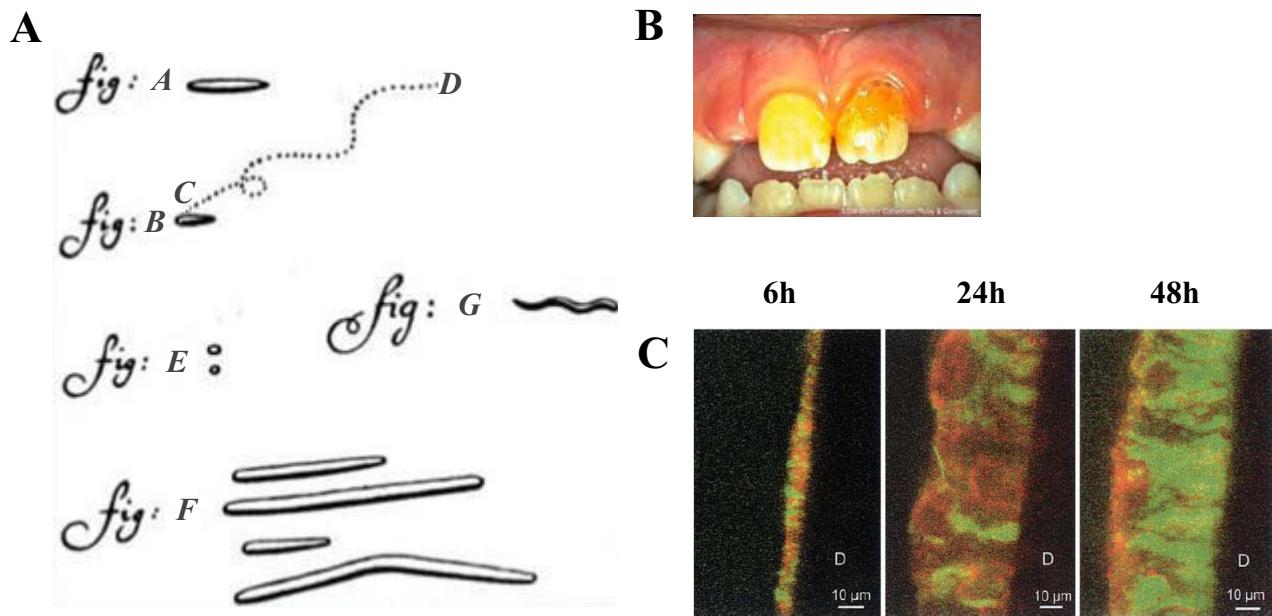


Figure 1 : Biofilms de la plaque dentaire.

A : Animalcules tels que décrits par Antonie van Leeuwenhoek, issus de sa lettre n°39, du 17 septembre 1683. A : *Bacillus* motile, B : *Selenomonas sputigena* ainsi que le trajet de son mouvement (C et D), E : microcoques, F : *Leptotrichia buccalis*, G : spirochètes. D'après Dobell, 1932. B : Illustration de la plaque dentaire (biofilm), C : Evolution de la structure de la plaque dentaire au cours du temps formée sur des disques (D) fixés sur un appareil dentaire, puis visualisée en microscopie confocale, coloration spécifique des bactéries viables (en vert) et des bactéries mortes (en rouge). D'après Zaura-Arite *et al.*, 2001.

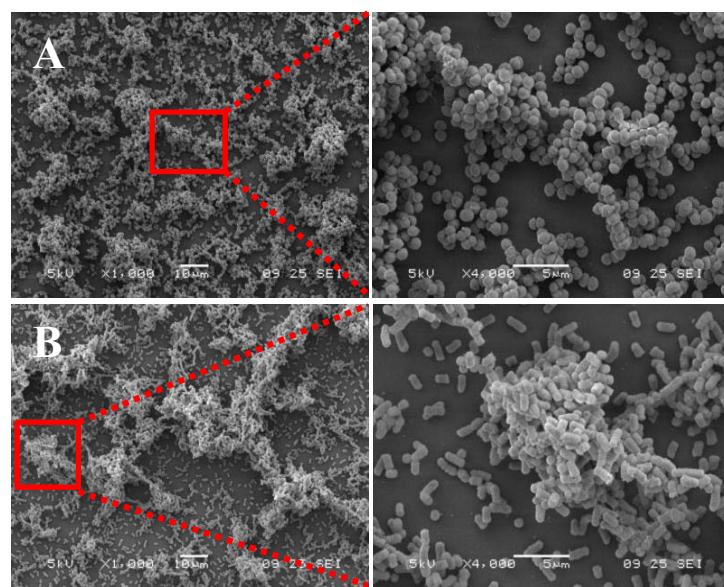


Figure 2 : Observation de biofilm mono-espèce en microscopie électronique à balayage.

Biofilms de 4h à *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (A) et à *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) (B) formés sur lamelle de Thermanox®, en conditions statiques. Données non publiées.

1 BIOFILMS

1.1 Historique

C'est au XVIIe siècle qu'Antonie van Leeuwenhoek découvrit les biofilms en observant la présence de micro-organismes (« animalcules ») dans des prélèvements effectués à la surface des dents (Figure 1). En 1933, lors d'études de la croissance des algues, Henrici observa des communautés microbiennes fixées sur des lames en verre. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries étaient capables de s'organiser sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (Henrici, 1933). Heukelekian et Heller (1940) mirent en évidence « l'effet bouteille », c'est-à-dire la capacité de bactéries fixées à un substrat solide d'exhiber des propriétés de croissance et des activités métaboliques plus importantes que celles des mêmes bactéries en suspension (Heukelekian & Heller, 1940). Claude E. Zobell (1904-1989), considéré comme le père de la microbiologie marine, démontra en 1943 que la quantité de bactéries fixées à un substrat était largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide adjacente (Zobell, 1943). Enfin, c'est seulement aux alentours des années 1970 que l'étude des biofilms connut un véritable essor grâce aux techniques de microscopie électronique à transmission et à balayage et l'utilisation de colorants spécifiques des polysaccharides (rouge de ruthénium) (Figure 2). Ainsi Jones *et al.* confirmèrent l'existence d'agrégats mono et polymicrobiens, mais aussi l'entité d'une matrice polyosidique (Jones *et al.*, 1969). En 1973, Characklis démontra que ces matrices d'exopolymères conféraient aux biofilms une certaine ténacité et résistance vis-à-vis des désinfectants (Characklis, 1973). Enfin, c'est en 1978 que fut menée la première étude des communautés microbiennes des cours d'eau ; Costerton et son équipe proposèrent pour la première fois le terme de « biofilms », considéré comme un mode de vie naturel utilisé par une grande majorité de micro-organismes (Costerton *et al.*, 1978).

1.2 Définition

Les biofilms sont définis comme des communautés microbiennes structurées, englobées dans une matrice polymérique produite par les bactéries elles-mêmes, et adhérentes à une surface inerte ou biotique (Costerton *et al.*, 1999). Il s'agit du principal mode de vie des micro-organismes dans la nature avec quatre-vingt pour cent de la biomasse microbienne terrestre à l'état de biofilm. Ces populations dites sessiles expriment fréquemment des phénotypes différents de leurs homologues non adhérents, avec une capacité particulière à

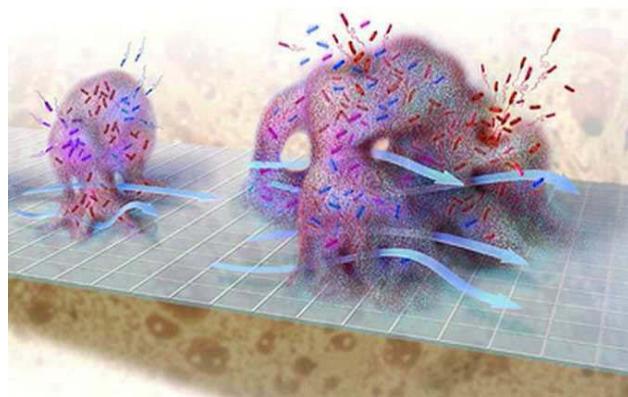


Figure 3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien.

Les flèches bleues indiquent le sens de la circulation du fluide à l'intérieur des canaux hydriques.
<http://www.labomoderne.com/gamme.bactosonic-special-sonification-des-explants.SXB1400.html>

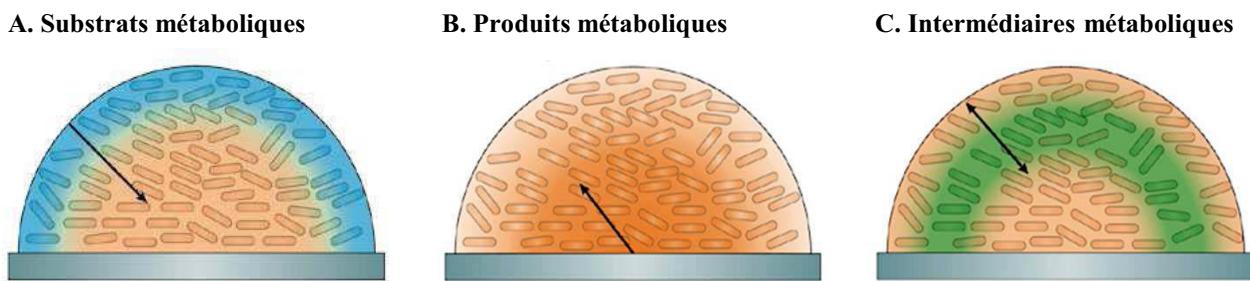


Figure 4 : Hétérogénéité métabolique au sein d'un biofilm bactérien.

Trois modèles distincts d'hétérogénéité chimique sont présents au sein des biofilms en raison de réaction-diffusion de substrats métaboliques (bleu, A), de produits métaboliques (orange, B) et d'intermédiaires métaboliques (vert, C). La concentration d'un substrat qui est consommé au sein du biofilm diminue dans la profondeur dans le biofilm (A). A l'inverse, un produit métabolique est plus concentrée à l'intérieur du biofilm (B). Un intermédiaire métabolique qui est à la fois consommé et produit à l'intérieur du biofilm peut présenter des profils de concentrations maximales localisées (C). D'après Stewart & Franklin, 2008.

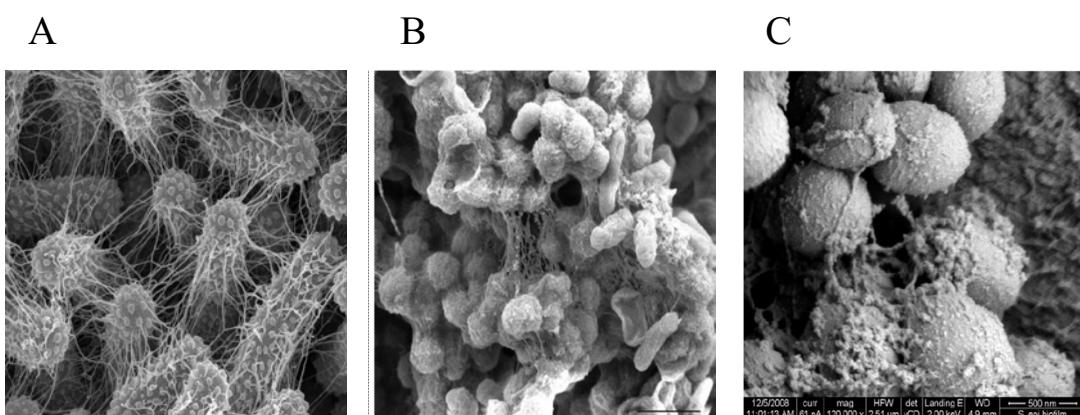


Figure 5 : Observation en microscopie électronique à balayage de biofilms.

A : Biofilm de 48h à *Klebsiella pneumoniae* formé sur lamelle de Thermanox®, en microfermenteur. D'après Balestrino *et al.*, 2008. B : Biofilm de 72h à *Salmonella enteritidis* formé à l'interface air-liquide. D'après Lasa, 2006. C : Biofilm de 48h à *Staphylococcus epidermidis* formé dans un système CDC biofilm reactor. D'après Williams et Bloebaum, 2010.

coloniser de nouvelles surfaces et une grande tolérance au stress exogène (Macfarlane & Dillon, 2007). Les biofilms sont ubiquistes, ils sont présents dans la plupart des niches écologiques et colonisent des surfaces très diverses, biotiques ou abiotiques, telles que les métaux, les sols, les plantes ou encore les muqueuses. De nombreuses activités humaines sont ainsi concernées par les biofilms, que ce soit le secteur industriel, environnemental, agro-alimentaire ou celui de la santé.

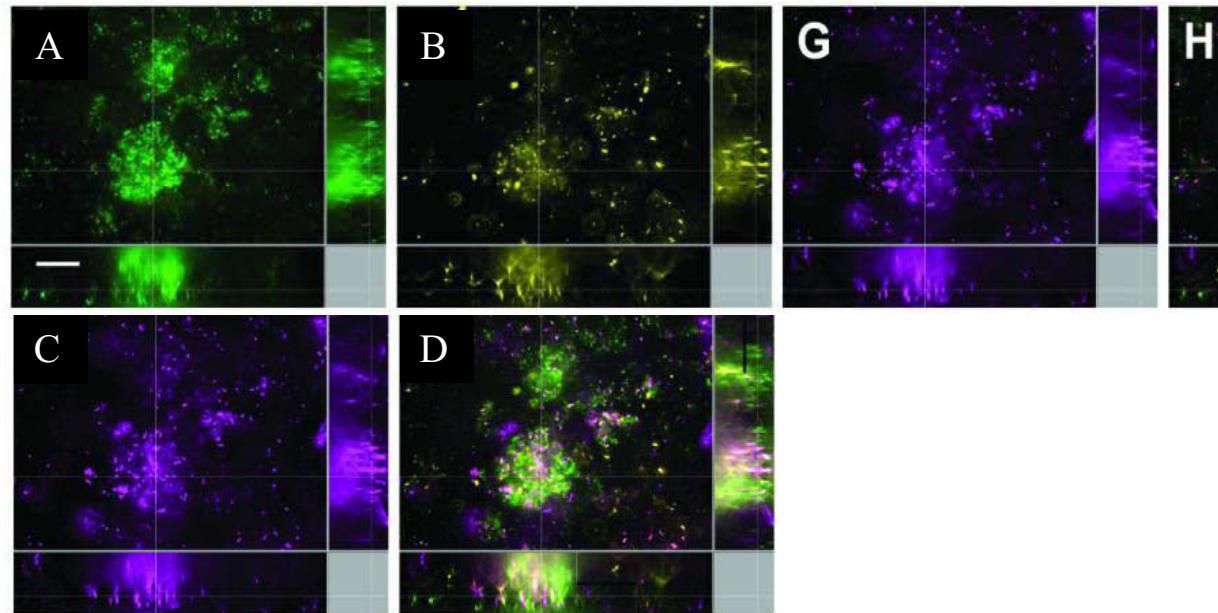
1.3 Structure et composition des biofilms

L'appellation biofilm provient du fait qu'il s'agisse de matériel vivant (« bio ») compris dans un fin revêtement (« film »). Les micro-organismes qui composent le biofilm représentent seulement 10% de la masse sèche, alors que la matrice hétérogène qui les englobe constitue 90% du biofilm.

1.3.1 Architecture du biofilm

Un biofilm possède une architecture complexe formée de structures tridimensionnelles hétérogènes, dans lesquelles les agrégats de micro-organismes sont entrecoupés par des canaux hydriques, ces derniers facilitant l'apport en nutriments et en oxygène à tous les niveaux du biofilm ainsi que l'évacuation des déchets (Donlan, 2002) (Figure 3). De ce fait, un biofilm possède une organisation stratifiée de par l'existence de gradients métaboliques entre les couches superficielles et les couches profondes du biofilm (Stewart & Franklin, 2008) (Figure 4). Cette hétérogénéité métabolique au sein même des biofilms génère une hétérogénéité physiologique des bactéries qui le composent. Ainsi, la présence d'un gradient d'oxygène explique la présence de bactéries évoluant en condition d'anaérobiose au sein d'un biofilm.

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97% d'eau. Sa composition varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de culture (Tremblay *et al.*, 2014). Les substances polymériques extracellulaires qui la composent, considérées comme des matériaux de construction, incluent des polysaccharides, des protéines et de l'ADN extracellulaire (ADNe) qui participent à la cohésion / fixation du biofilm à la surface (Wei & Ma, 2013) (Figure 5).



E

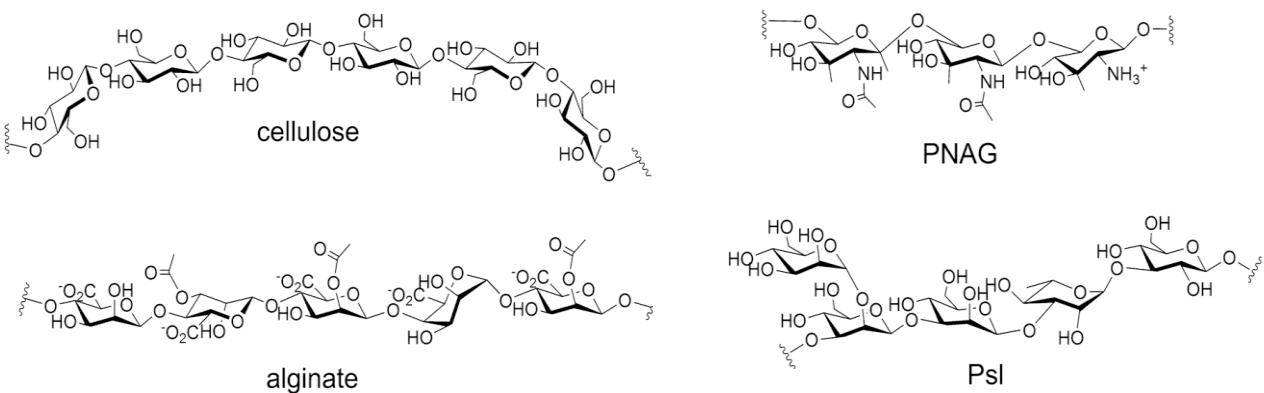


Figure 6 : Composants de la matrice extracellulaire de biofilm.

(A à D) Observation au microscope à fluorescence de l'ADN extracellulaire et des exopolysaccharides au sein du biofilm. Biofilm de 48h à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. A : Biomasse bactérienne exprimant le marqueur fluorescent GFP, B : ADN extracellulaire, C : Exopolysaccharides, D : superposition des trois. D'après Johnson *et al.*, 2013. **(E) Structure de la cellulose, de l'alginate, du polysaccharide Psl et du PNAG.** D'après Liang, 2015.

1.3.2 Composition de la matrice

La composition en **polysaccharides** de la matrice (Figure 6) varie en fonction des espèces bactériennes qui composent le biofilm. Ainsi, la matrice de *Pseudomonas aeruginosa* contient trois polysaccharides majeurs : l'alginate et les polymers Pel et Psl (Periasamy *et al.*, 2015). D'autres espèces bactériennes telles *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia* spp. ou encore *Bacillus subtilis* produisent le poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PNAG) (Choi *et al.*, 2009; O'Gara, 2007; Roux *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2004; Yakandawala *et al.*, 2011). La cellulose, le plus abondant des biopolymères retrouvé dans la nature, est un composant clé de la matrice de biofilms de divers genres bactériens tels *Salmonella* et *Escherichia* (Römling & Galperin, 2015; Zogaj *et al.*, 2001). Ces polysaccharides jouent un rôle primordial dans la cohésion du biofilm. En effet, le PNAG produit par *S. aureus* est capable d'interagir avec l'ADN présent, renforçant ainsi la structure de la matrice (Izano *et al.*, 2008). De plus, l'oxydation des chaînes de polysaccharides, reproductible au laboratoire avec un traitement au métapériodate de sodium, induit la dispersion de biofilms formés par différentes souches de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (O'Neill *et al.*, 2007). Cependant, de tels effets n'ont pas été retrouvés chez des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline, soulignant ainsi la spécificité de la composition de la matrice de chaque micro-organisme composant le biofilm.

La matrice des biofilms est également constituée de **protéines**. Il peut s'agir de protéines de type Bap (Biofilm-associated protein), de fimbriae ou de lectines. Les protéines de type Bap jouent un rôle de structuration lors de la maturation de biofilm chez plusieurs espèces bactériennes à Gram-positif et à Gram-négatif (Lasa & Penadés, 2006). Les fimbriae et les lectines sont considérés comme des éléments structuraux en interagissant avec d'autres composants de la matrice des biofilms. Par exemple, les pili de type IV de *P. aeruginosa* sont capables de lier l'ADN (Schaik *et al.*, 2005). Ainsi, les protéines de la matrice ont un rôle important dans l'intégrité du biofilm. En effet, un traitement à la protéinase K altère le développement du biofilm et induit sa dispersion chez *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* (Kumar Shukla & Rao, 2013; Nguyen & Burrows, 2014).

L'**ADN extracellulaire (ADNe)** est un composant majeur de la matrice des biofilms (Figure 6). Il joue un rôle essentiel dans la structuration du biofilm de nombreuses espèces telles que *P. aeruginosa* (Matsukawa & Greenberg, 2004), *Enterococcus faecalis* (Thomas *et al.*, 2008) ou encore *S. aureus* (Izano *et al.*, 2008). Chez *P. aeruginosa*, un traitement à la DNase inhibe la formation de biofilm et dissout un biofilm déjà formé, corroborant ainsi

Tableau 1 : Habilité de différents traitements chimiques à disperser un biofilm formé par *Staphylococcus*.

Les composants de la matrice du biofilm ont été estimés à partir du pourcentage de biofilm dispersé (+ = 30% ; ++ = 30-70% ; +++ = >70%). D'après Gutiérrez *et al.*, 2014.

Souche		Biofilm dispersé		
		Métapériodate de sodium	Protéinase K	DNase I
<i>S. aureus</i>	15981	+++	-	-
	ISP479r	++	++	+
	V329	-	+++	++
	132	+	+	+
	IPLA1	++	+	-
	IPLA16	++	++	-
<i>S. epidermidis</i>	B	+++	-	-
	YLIC17	+++	-	+
	DG2n	+++	-	+

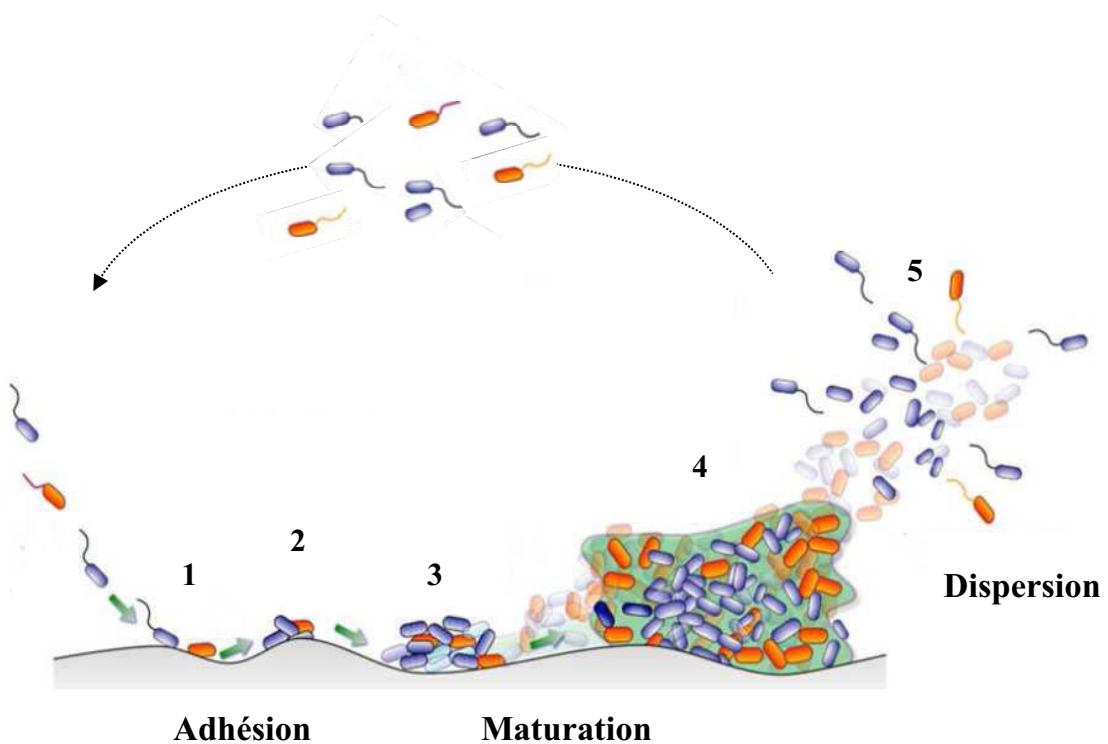


Figure 7 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien.

1 : Adhésion réversible, 2 : Adhésion irréversible, 3 et 4 : Formation de micro-colonies et maturation du biofilm, 5 : Dispersion des cellules bactériennes. Adapté de Rendueles & Ghigo, 2015.

l'importance de l'ADNe dans l'intégrité du biofilm (Nguyen & Burrows, 2014; Whitchurch *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été observés avec un biofilm à *Campylobacter jejuni* ou à *Streptococcus mutans* traité à la DNase (Brown *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Le relargage d'ADN génomique résultant de la lyse ou d'un phénomène actif d'une sous-population de bactéries apparaît être la source principale d'ADNe (Flemming & Wingender, 2010). Cependant, dans le cas d'infections pulmonaires associées à la mucoviscidose, il a été démontré que cet ADNe pouvait également provenir de cellules humaines lysées telles les neutrophiles (Walker *et al.*, 2005).

Comme souligné précédemment, la composition de la matrice varie en fonction des espèces bactériennes ou des souches impliquées dans le biofilm, engendrant ainsi une susceptibilité enzymatique spécifique. Tel est le constat fait par plusieurs auteurs, ayant mis en évidence que le détachement enzymatique de biofilms à *Staphylococcus* dépendait de la nature des composants de la matrice et variait en fonction des souches testées (Chaignon *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2014) (Tableau 1). De plus il faut souligner l'existence d'autres molécules dans la matrice comme des surfactants, de lipides, de glycolipides, de vésicules de membranes (contenant des enzymes) et d'ions (Karatan & Watnick, 2009).

1.4 Différentes étapes de formation du biofilm

La transition des bactéries d'un état planctonique vers une forme sessile résulte de modifications profondes de l'expression génique (Guilhen *et al.*, 2016; Rumbo-Feal *et al.*, 2013). Bien que les mécanismes mis en jeu varient en fonction des espèces et des conditions environnementales, les biofilms partagent tous les mêmes étapes de développement : (i) attachement à une surface (biotique ou abiotique), (ii) maturation du biofilm et émergence de structures tridimensionnelles et (iii) dispersion à partir des formes matures (Figure 7).

1.4.1 Adhésion

L'adhésion bactérienne initiale est schématisée classiquement selon deux étapes : un attachement réversible devenant par la suite irréversible. L'adhésion réversible est sous l'influence de différentes organelles de la surface bactérienne (flagelles, pili, curli), de forces d'interaction, de nombreux facteurs environnementaux (pH, osmolarité, température) mais également de caractéristiques de surface (topographie, nature chimique) (Tuson & Weibel, 2013). D'autre part, des modifications d'expression génique mais aussi la coordination de

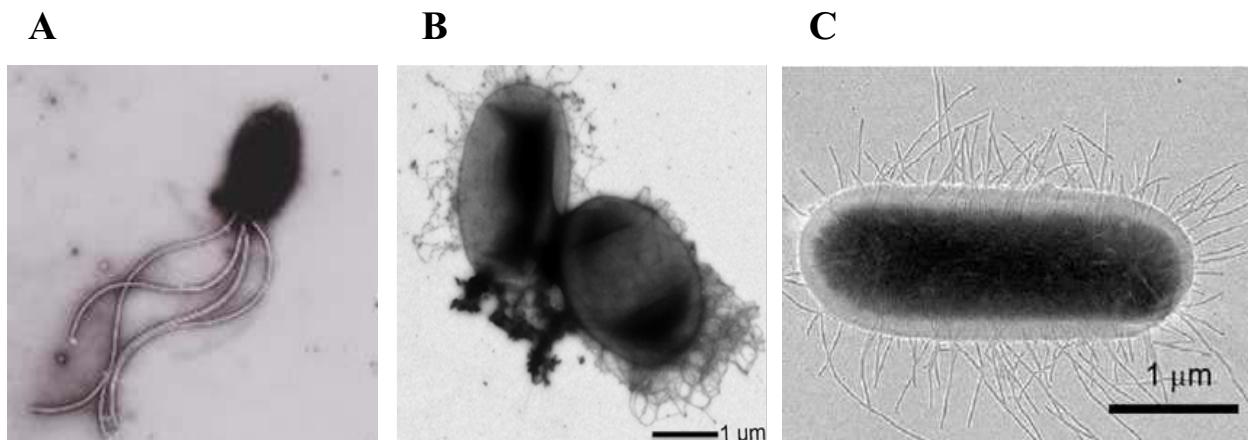


Figure 8 : Clichés de microscopie électronique à transmission des différentes structures de surface bactériennes.

A : Flagelles de *Vibrio fischeri*. D'après Chevance & Hughes, 2008. B et C : Curli et Pili de type 1 à la surface de *Escherichia coli*. D'après Lim *et al.*, 2012 et Capitani *et al.*, 2006.

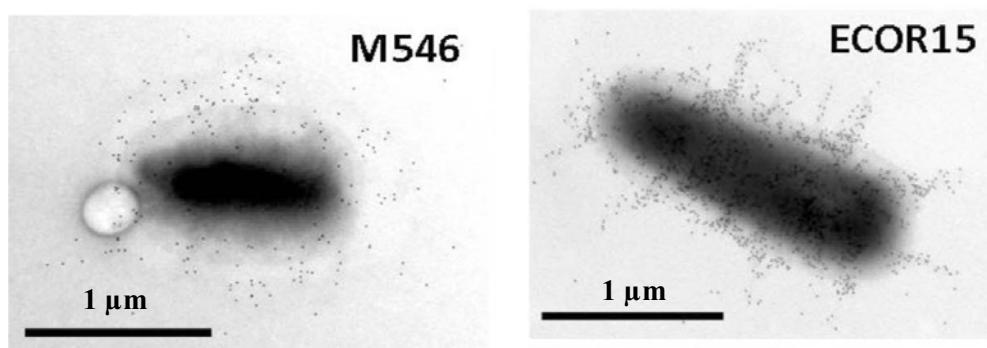


Figure 9 : Clichés de microscopie électronique à transmission des pili de type 3 chez *C. koseri* et *E. coli*.

L'expression des pili de type 3 à la surface de *Citrobacter koseri* M546 et d'*Escherichia coli* ECOR15 est représentée par un marquage aux particules d'or spécifiques. D'après Ong *et al.*, 2010.

voies moléculaires variées liées au c-di-GMP et au quorum-sensing participent également à la transition d'un état planctonique vers un mode de vie biofilm des bactéries.

- Adhésion réversible

Cette étape est sous le contrôle de structures de surfaces qui vont directement permettre les interactions entre la surface à coloniser et les bactéries. Tout d'abord, les flagelles (Figure 8A), structures semi-rigides ancrées à la surface membranaire et permettant la mobilité chez certaines bactéries, jouent un rôle important dans l'interaction initiale avec la surface à coloniser en donnant l'énergie nécessaire pour passer outre les forces de répulsion (Pratt & Kolter, 1998). Une absence de flagelle serait donc synonyme d'une plus grande difficulté pour les bactéries à coloniser les surfaces ; tel est le cas de mutants flagellaires chez *Vibrio* associés à un défaut d'attachement (Watnick *et al.*, 2001). De plus, en utilisant différents mutants de motilité, il a été démontré que l'habileté d'*E. coli* à former des biofilms était directement corrélée à sa capacité de déplacement (Wood *et al.*, 2006). Cependant le rôle du flagelle dans l'adhésion initiale ne serait pas essentiel chez toutes les espèces bactériennes puisque par exemple, *Klebsiella pneumoniae* n'en synthétise pas alors qu'elle est capable de former des biofilms. Ainsi d'autres structures jouent un rôle essentiel dans le processus de colonisation initiale de surfaces.

Les curli (Figure 8B), fibres extracellulaires de type protéique communément produites par les *Enterobacteriaceae* (Zogaj *et al.*, 2003), jouent un rôle dans la colonisation de surfaces inertes (acier, verre, polypropylène) et la formation de biofilm chez *E. coli* (Carter *et al.*, 2016; Vidal *et al.*, 1998). Récemment, l'analyse de mutants pour la production de curli a révélé leur importance dans le processus d'adhésion sur surfaces biotiques (cellules végétales ou de carcinomes urinaires) (Carter *et al.*, 2016; Cordeiro *et al.*, 2016).

Diverses structures fimbrillaires, ou pili, sont également impliquées dans les mécanismes d'adhésion bactérienne. Les pili de type 1 sont des organelles disposées à la surface des bactéries de façon péritricte (Figure 8C). Chez *E. coli*, ils sont responsables de l'attachement aux surfaces biotiques (Crépin *et al.*, 2012) mais aussi abiotiques (Beloin *et al.*, 2004). Les pili de type IV sont quant à eux des adhésines promouvant l'attachement initial de bactéries à Gram-négatif, dont *P. aeruginosa* (Burrows, 2012). Enfin, les pili de conjugaison décrits comme favorisant des interactions stables entre les bactéries, joueraient un rôle dans la stabilisation du biofilm (Beloin *et al.*, 2008; Ghigo, 2001).

Chez *K. pneumoniae* les pili de type 1 sont également impliqués dans la formation de biofilm, tout comme un autre type de fimbriae, les pili de type 3 (Khater *et al.*, 2015; Murphy

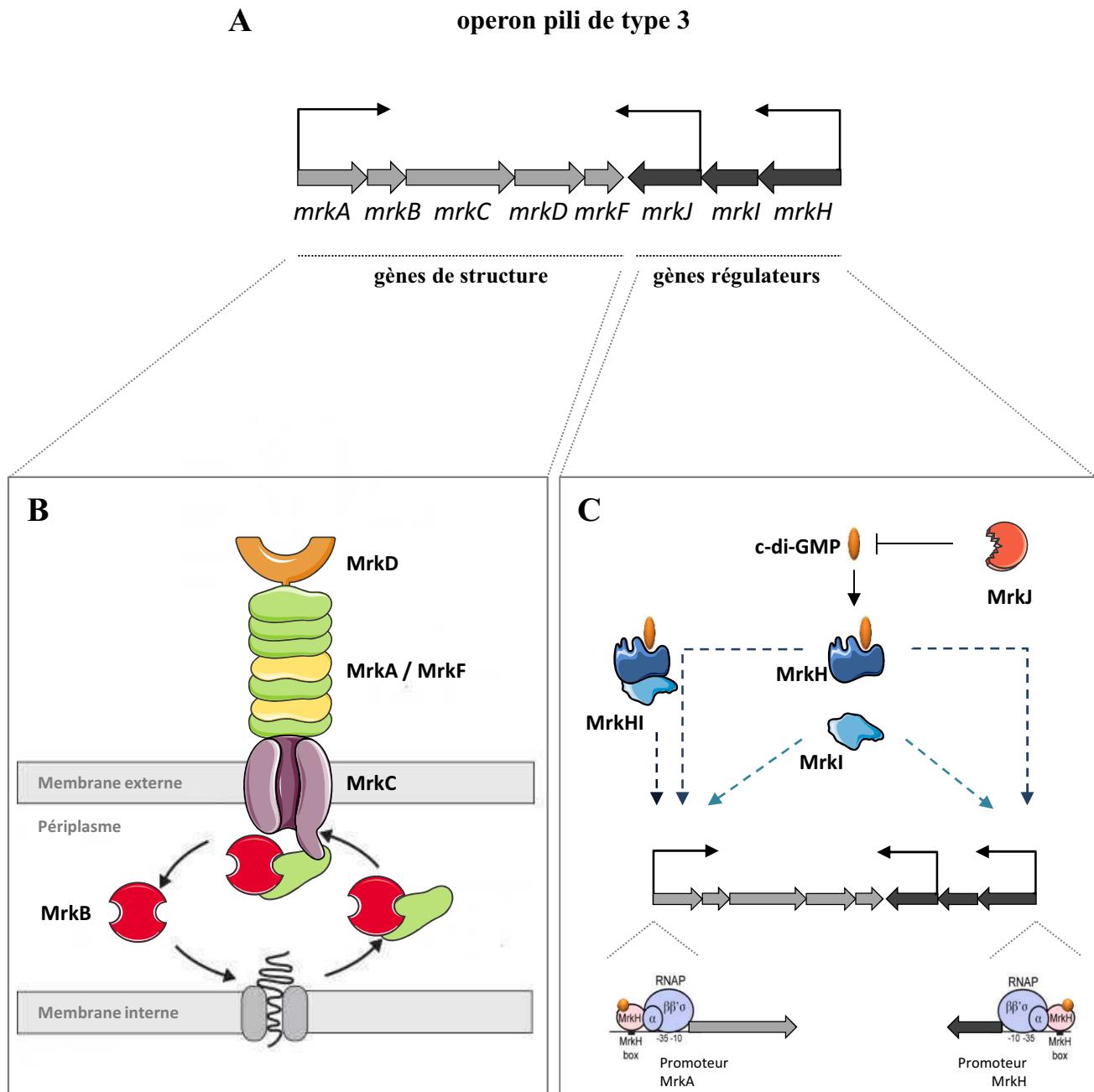


Figure 10 : Organisation des gènes codant les pili de type 3 chez *K. pneumoniae* et de leur mise en place à la surface des bactéries.

A : Opéron *mrk*, B : Modèle d'assemblage du pilus de type 3, C : Régulation de l'opéron *mrk* chez *K. pneumoniae*. D'après Murphy & Clegg, 2012; Johnson *et al.*, 2011; Johnson & Clegg, 2010; Wilksch *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2012 et Tan *et al.*, 2015.

et al., 2013; Stahlhut *et al.*, 2012). Les gènes impliqués dans la structure piliée de type 3 sont organisés en deux opérons appelés *mrk*, identifiés dans d'autres bactéries pathogènes, telles *Citrobacter* ou *Escherichia* responsables d'infections du tractus urinaire (Ong *et al.*, 2010) (Figure 9). La régulation de ces gènes ainsi que l'assemblage des protéines nécessaires à la formation de ces pili dans le modèle *K. pneumoniae* sont largement documentés dans la littérature (Figure 10). L'opéron (*mrkABCDF*) comprend 5 gènes codant les composants d'assemblage et structuraux du pilus de type 3. Ce dernier est assemblé grâce à la voie des chaperones/usher, au sein de laquelle les sous-unités fimbriales sont transportées dans le périplasme puis réceptionnées par une chaperonne (MrkB). Le complexe (sous-unités/chaperonne) est ensuite dirigé vers la protéine Usher (MrkC) ancrée dans la membrane externe. L'assemblage du fimbriae s'effectue par addition successive de sous-unités majeures (MrkA) et de sous unités mineures (MrkF) incorporées par intermittence. Enfin, MrkD, localisée à la pointe de l'appendice, confère des propriétés adhésives et détermine la spécificité de liaison du fimbriae (Murphy & Clegg, 2012). Trois autres gènes (*mrkJ*, *mrkI* et *mrkH*), adjacents aux gènes de structure, constituent un opéron impliqué dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant le pilus de type 3. Il a été établi que la production de pili de type 3 était sous le contrôle des variations de concentration en c-di-GMP intracellulaire puisque l'un de ces gènes code une phosphodiestérase (MrkJ) impliquée dans la dégradation de ce second messager et un autre code une protéine possédant un domaine de liaison au c-di-GMP (pilZ domain) (MrkH). La surexpression de *mrkJ*, induit une réduction significative de la concentration en c-di-GMP intracellulaire corrélée à une réduction de pili de type 3 à la surface de *K. pneumoniae* (Johnson & Clegg, 2010). MrkI est une protéine régulatrice activant l'expression des opérons (*mrkABCDF*) et (*mrkHI*) codant le pilus de type 3 (Wu *et al.*, 2012). En présence de c-di-GMP, MrkH active l'expression de l'opéron (*mrkABCDF*) en se liant au niveau de son promoteur (Wilksch *et al.*, 2011). Cependant il a également été démontré que MrkH et MrkI pouvaient former un complexe, qui en présence de c-di-GMP, est capable d'activer la transcription de *mrkA*, de manière plus importante que MrkH seul, et participe ainsi à la formation de biofilm par *K. pneumoniae* (Johnson *et al.*, 2011). Les mécanismes moléculaires mis en jeu ont récemment été mis en évidence. Suite à la liaison avec le c-di-GMP, MrkH lie spécifiquement une séquence palindromique (MrkH box), facilitant le recrutement de l'ARN polymérase (via l'interaction de MrkH avec la sous-unité α-CTD), au niveau des deux régions promotrices *mrkHI* et *mrkABCDF* (Tan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013). Le c-di-GMP est ainsi impliqué dans la régulation du changement d'état

planctonique des bactéries vers une forme d'existence sessile (Pultz *et al.*, 2012) et ce processus de régulation semble assez commun chez les bactéries. En effet, des études récentes ont démontré que ce second messager était aussi impliqué dans la formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* et *Salmonella enterica* par deux mécanismes : une répression transcriptionnelle ou fonctionnelle flagellaire, et une induction de la synthèse de polysaccharides extracellulaires (VPS : *Vibrio* polysaccharides et cellulose respectivement) (Srivastava *et al.*, 2013; Zorraquino *et al.*, 2013).

L'étape initiale de formation de biofilm est également contrôlée par le quorum-sensing, un mécanisme de régulation d'expression génique lié à la concentration bactérienne et capable d'entraîner une augmentation des charges négatives à la surface d'*E. coli*, facilitant ainsi son interaction avec des surfaces chargées positivement (Eboigbodin *et al.*, 2006).

- Adhésion irréversible

L'étape de fixation irréversible implique des structures d'adhésion variées selon le type de micro-organismes. Les structures de type pili, curli, la capsule ainsi que la production d'exopolymères sont utiles aux bactéries à Gram-négatif, alors que chez les bactéries à Gram-positif les acides teichoïques, les acides mycoliques, la capsule et les exopolymères sont impliqués. Ces molécules d'adhésion permettent de créer des contacts solides entre cellules et surfaces, mais également des interactions stables entre cellules au sein du biofilm (Lemon *et al.*, 2008).

1.4.2 Maturation

L'étape de maturation de biofilm consiste en la formation et le développement de micro-colonies. Leur structuration tridimensionnelle résulte soit de la multiplication des bactéries fixées, soit du recrutement de bactéries circulant dans le fluide (Costerton, 1995). Zhao et ses collaborateurs ont ainsi démontré que *P. aeruginosa* était capable de mener une exploration de surface tout en préparant le recrutement de bactéries à travers le dépôt d'un film d'exopolysaccharides (Psl) jouant le rôle de « glue » (Zhao *et al.*, 2013).

La maturation d'un biofilm est une phase marquée par d'importantes régulations de gènes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Il peut s'agir de « switch » de l'activation des gènes : par exemple, l'expression de gènes codant des flagelles peut être inhibée par le même régulateur transcriptionnel qui stimule celle de gènes impliqués dans la production de la matrice (Tuson & Weibel, 2013).

La caractéristique essentielle d'un biofilm mature est la synthèse d'une matrice polymérique qui constitue un « ciment » favorisant l'agrégation des bactéries entre elles ainsi que leur ancrage à la surface. La production de polysaccharides VPS (*Vibrio* polysaccharides) joue un rôle primordial dans la formation de colonies rugueuses et dans la constitution de biofilms matures tridimensionnels chez *V. cholerae* (Watnick & Kolter, 1999; Yildiz & Schoolnik, 1999). Chez *K. pneumoniae*, le lipopolysaccharide de surface (LPS) ainsi que la capsule jouent un rôle dans la maturation du biofilm. En effet, il a été démontré au laboratoire qu'un défaut de LPS et l'absence de capsule inhibaient la formation de biofilm dans les phases initiales mais au contraire augmentaient la biomasse des biofilms matures dépourvus de structure tridimensionnelle classique (Balestrino *et al.*, 2008). De plus, des observations en microscopie confocale de biofilms formés par *C. jejuni* ont permis d'observer que l'ADNe apparaissait subséquemment à l'étape initiale d'adhésion puis s'accumulait au cours du temps, jouant ainsi un rôle dans l'étape de maturation des micro-colonies en promouvant la formation de structures tridimensionnelles (Svensson *et al.*, 2014).

1.4.3 Dispersion

La dispersion d'un biofilm mature constitue une étape essentielle dans la dissémination bactérienne et la colonisation de nouvelles surfaces. Ce processus de détachement dépend de la mobilité des bactéries, de la taille des micro-colonies (Harmsen *et al.*, 2010), mais également des conditions environnementales (disponibilité en nutriments, en acides aminés) et internes (limitation en oxygène, carences métaboliques) du biofilm. A titre d'exemple, il a été établi que la présence d'oxyde nitrique (NO) ou d'acides aminés tels le tryptophane pouvait induire la dispersion de biofilm d'une grande variété de bactéries en augmentant leurs activités métaboliques ou en favorisant leur motilité (Brandenburg *et al.*, 2013; McDougald *et al.*, 2012).

Le détachement d'un biofilm peut s'effectuer selon deux modes : un processus passif (desquamation ou érosion du biofilm) et un processus actif (mobilité bactérienne, dégradation de la matrice ou communication cellulaire) (Kim & Lee, 2016). Plusieurs enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice (protéases, deoxirobinucléases et glycosidases) (Brown *et al.*, 2015; Kaplan, 2009; Sugimoto *et al.*, 2013) mais également la production de biosurfactants (Boles *et al.*, 2005) et de signaux de détachement (Barraud *et al.*, 2009a, b; Davies & Marques, 2009) ont été identifiés dans la dispersion de biofilm. S'agissant de stratégies anti-biofilm employées par diverses espèces bactériennes, l'implication de ces éléments dans le détachement de biofilm est discutée dans les sections 3.2.2 et 3.2.3.

Peu d'études se sont intéressées au pouvoir de colonisation et à l'expression des facteurs de virulence de cellules détachées de biofilms. Il semble cependant qu'ils soient distincts de ceux des bactéries planctoniques. En 2013, Liu *et al.* ont montré que les cellules dispersées de biofilm à *S. mutans* exhibaient des propriétés physiologiques différentes de celles de leurs homologues planctoniques ou sessiles (plus forte résistance à la chlorhexidine, augmentation de l'activité glycosyltransférase et de production de bactériocine) (Liu *et al.*, 2013). Plus récemment, une analyse des profils transcriptionnels de *K. pneumoniae*, menée au laboratoire, a permis de mettre en évidence que les cellules détachées de biofilm possédaient des profils d'expression géniques spécifiques, différents de ceux observés avec les cellules sessiles et planctoniques (Guilhen *et al.*, 2016). Par ailleurs une étude concernant *Candida albicans* a montré que les cellules dispersées étaient armées d'un arsenal de « facteurs de virulence » essentiel pour la colonisation et l'établissement de nouveaux sites d'infections. En effet ces cellules dispersées présentent des propriétés phénotypiques distinctes de leur homologues planctoniques, incluant des capacités d'adhésion et de formation de biofilm augmentées, mais surtout une pathogénicité plus importante dans un modèle murin (Uppuluri *et al.*, 2010). Les cellules détachées de biofilms semblent donc présenter une plus grande aptitude à coloniser de nouvelles surfaces que leurs homologues planctoniques.

1.5 Avantages de la vie en biofilm

L'organisation structurale d'un biofilm joue un rôle essentiel dans la stabilisation et la protection des consortia impliqués vis-à-vis d'un certain nombre de facteurs d'agression. Différents acteurs participent à la préservation de cette intégrité : la matrice exopolymérique auto-produite agissant comme un bouclier, associée aux mécanismes de défense développés par les micro-organismes eux-mêmes.

1.5.1 Avantages métaboliques

Le mode de vie en biofilm permet aux bactéries d'acquérir des avantages d'un point de vue métabolique. Les exopolysaccharides, principaux constituants de la matrice extracellulaire des biofilms, permettent le maintien d'un microenvironnement hydraté et l'accumulation de nutriments au sein du biofilm à travers la capture d'éléments vitaux (eau, composés organiques). Ces exopolysaccharides peuvent également être une source d'énergie pour la communauté du biofilm à travers leur dégradation (Flemming & Wingender, 2010).

Par ailleurs, la proximité des micro-organismes au sein des biofilms facilite la mise en place de symbioses métaboliques entre eux, conférant ainsi des avantages à la communauté (Ponomarova & Patil, 2015). Ces interactions peuvent être de l'ordre de la coopération pour dégrader des nutriments; tel est le cas pour *Acinetobacter* capable de produire du benzoate qui est ensuite métabolisé par *Pseudomonas putida* (Burmølle *et al.*, 2014).

1.5.2 Protection et résistance face aux stress extérieurs

- Protection vis-à-vis d'agents antimicrobiens

Les regroupements de micro-organismes sous forme de biofilms s'avèrent particulièrement résistants vis-à-vis de traitements antibactériens, que ce soient des molécules antiseptiques, désinfectantes ou antibiotiques (Fey, 2010). A titre d'exemple, il a été démontré récemment au laboratoire que la concentration minimale d'éradication de biofilm (CMEB) de *S. aureus* était 51 200 fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la même bactérie sous forme planctonique (Marquès *et al.*, 2015). Les mécanismes mis en jeu dans cette résistance accrue des bactéries sessiles sont multiples : (i) défaut de pénétration des molécules actives à l'intérieur des biofilms, (ii) adaptation des micro-organismes qui les composent, (iii) présence de cellules en état de dormance appelées « persisters » (Conlon *et al.*, 2015; Mah & O'Toole, 2001).

La résistance des biofilms bactériens aux antibiotiques a été initialement attribuée au seul défaut de pénétration des molécules au sein du biofilm (Pibalpakdee *et al.*, 2012). Les propriétés physicochimiques de la matrice lui permettent effectivement de réduire ou de retarder l'absorption de nombreux composés, notamment à travers la charge des polymères qui la composent (Stewart & William Costerton, 2001). Des travaux récents ont démontré que l'ADNe, présent en grande quantité au sein de certains biofilms, était capable de protéger ces derniers de l'action des peptides antimicrobiens ou encore des antibiotiques, en masquant les charges négatives de surface bactériennes (via des modifications de composition en acides aminés du LPS ou la production de spermidine), ou en se comportant comme un bouclier (liaison aux aminoglycosides) (Chiang *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2013; Wilton *et al.*, 2015).

Des adaptations métaboliques spécifiquement induites au sein des biofilms sont également mises en place lors de la formation et de la maturation des biofilms. Ainsi, il a été démontré une augmentation de l'expression de pompes à efflux chez *E. coli* et *P. aeruginosa* en condition de biofilms, permettant l'élimination des composés toxiques dont les antibiotiques (Kvist *et al.*, 2008).

Cette indifférence des bactéries sessiles vis-à-vis des antibiotiques peut également être associée à l'hétérogénéité des microenvironnements, ainsi qu'à la physiologie des bactéries qui composent le biofilm. Il existe en effet différents microenvironnements au sein des biofilms, en lien avec des gradients de nutriments, de pH ou d'oxygène, capables d'antagoniser les effets des antibiotiques. Walters *et al.*, ont ainsi démontré que les faibles concentrations en oxygène retrouvées au sein des couches profondes de biofilms à *P. aeruginosa* réduisaient les effets bactéricides des antibiotiques tobramycine et ciprofloxacine (Walters *et al.*, 2003). Dans ces conditions microenvironnementales hostiles, on observe des bactéries en état de dormance, appelées plus communément « persisters ». Différents mécanismes sont impliqués dans la sélection de cette sous-population de cellules tels que l'activation de la réponse stringante ou de la réponse SOS suite à une limitation en nutriments, un stress oxydatif ou au contact avec des antibiotiques (Lebeaux *et al.*, 2014). Une activité métabolique réduite et la diminution des mécanismes de transport chez ces bactéries dormantes pourraient expliquer leurs multi-résistances aux antibiotiques tels les β-lactamines, les fluoroquinolones, les cyclines ou les aminoglycosides (Fux *et al.*, 2004; Harmsen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015). Grâce à leur capacité à reconstruire ultérieurement une population, les persisters sont directement à l'origine d'infections bactériennes chroniques (Helaine & Kugelberg, 2014; Schmidt *et al.*, 2014).

- Protection vis-à-vis du système immunitaire

Des travaux récents supportent l'hypothèse que la réponse des cellules épithéliales ainsi que celle du système immunitaire vis-à-vis des pathogènes varient en fonction de l'état de ces derniers (planctonique versus biofilm) (Beaudoin *et al.*, 2013; Hernández-Jiménez *et al.*, 2013). En effet, les micro-organismes au sein des biofilms sont généralement plus résistants face à la réponse immunitaire. Des études *in vitro* réalisées majoritairement avec les genres *Pseudomonas* et *Staphylococcus* ont mis en évidence des mécanismes de résistance mis en place par les bactéries sous forme de biofilm pour échapper aux attaques du système immunitaire de l'hôte et notamment des polynucléaires neutrophiles (PMN) et des macrophages (Alhede *et al.*, 2014; Hanke & Kielian, 2012). Ainsi, il a été montré que la production de rhamnolipides et d'exopolysaccharides (matrice des biofilms) par *P. aeruginosa* protégeait les bactéries de la phagocytose par les macrophages et les PMN, en induisant une nécrose de ces cellules ou en limitant leur accès au sein du biofilm (Alhede *et al.*, 2014; Leid *et al.*, 2005). *S. aureus* est lui aussi capable de résister à la phagocytose des macrophages selon 2 mécanismes distincts ; soit en les reprogrammant vers un phénotype

anti-inflammatoire (phénotype M2, par opposition au phénotype pro-inflammatoire M1) (Thurlow *et al.*, 2011) soit à travers le rôle synergique de deux molécules sécrétées (l'alpha-toxine et la leukocidine) impliquées dans leur dysfonctionnement (Scherr *et al.*, 2015). Enfin, les formes sessiles de *Streptococcus pneumoniae* sont, quant à elles, capables d'éviter les deux voies du complément (voie classique et alternative) (Domenech *et al.*, 2013).

1.5.3 Adaptation à l'environnement

Selon leur environnement, les biofilms peuvent être exposés à un très large éventail de conditions hydrodynamiques qui affectent grandement leur matrice et leur structure (Stoodley *et al.*, 1998). Les contraintes de cisaillement auxquelles sont exposés les biofilms affectent également leur comportement dynamique. Ainsi, pour une même bactérie, les biofilms cultivés sous des forces de cisaillement élevées sont plus longuement et fortement ancrés au support et possèdent une matrice d'exopolysaccharides plus résistante que ceux cultivés sous des forces de cisaillement faibles (Lecuyer *et al.*, 2011; Stoodley *et al.*, 2002). De plus, la composition de la matrice peut varier en fonction des forces exercées sur le biofilm ; soumise à une faible pression, la matrice du biofilm à *S. enterica* est principalement composée de glucose, alors qu'en présence d'un flux, elle comprend une part plus importante en fucose (de 11 à 30% d'augmentation) (Mangalappalli-Illathu *et al.*, 2008).

1.6 Conséquences néfastes liées aux biofilms

Dans un contexte industriel, les biofilms s'avèrent utiles en bioremédiation, dans le traitement des eaux usées et des déchets ménagers, pour dépolluer des sites contaminés, et ils jouent un rôle écologique capital en participant au cycle du carbone (Roux & Ghigo, 2006). De plus, certains micro-organismes retrouvés dans le microbiote intestinal, reconnu comme biofilms (Vos, 2015), possèdent des rôles protecteurs et fonctionnels impliqués dans l'homéostasie de l'hôte comme par exemple *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Faecalibacterium prausnitzii* (Wrzosek *et al.*, 2013). Cependant, du fait de leur tolérance aux stress exogènes et de leur habileté à survivre dans diverses conditions environnementales, la forme biofilm peut aussi servir de niche protectrice pour des pathogènes et causer de nombreux problèmes tout aussi bien dans le domaine industriel, environnemental ou médical.

C'est le cas dans l'industrie agro-alimentaire, où les biofilms constitués d'organismes pathogènes (*S. enterica*, *L. monocytogenes*, *E. coli* et *S. aureus*) peuvent persister à la surface des outils de production et entraîner des problèmes sanitaires majeurs (Giaouris *et al.*, 2015).

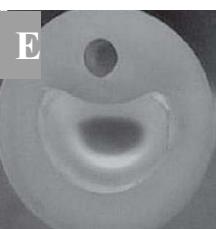
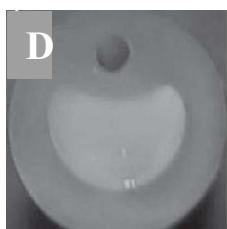
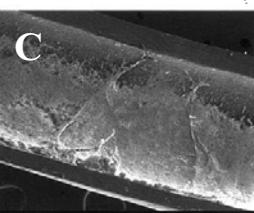
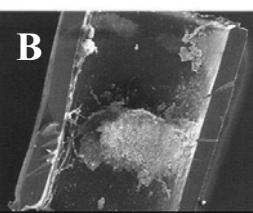
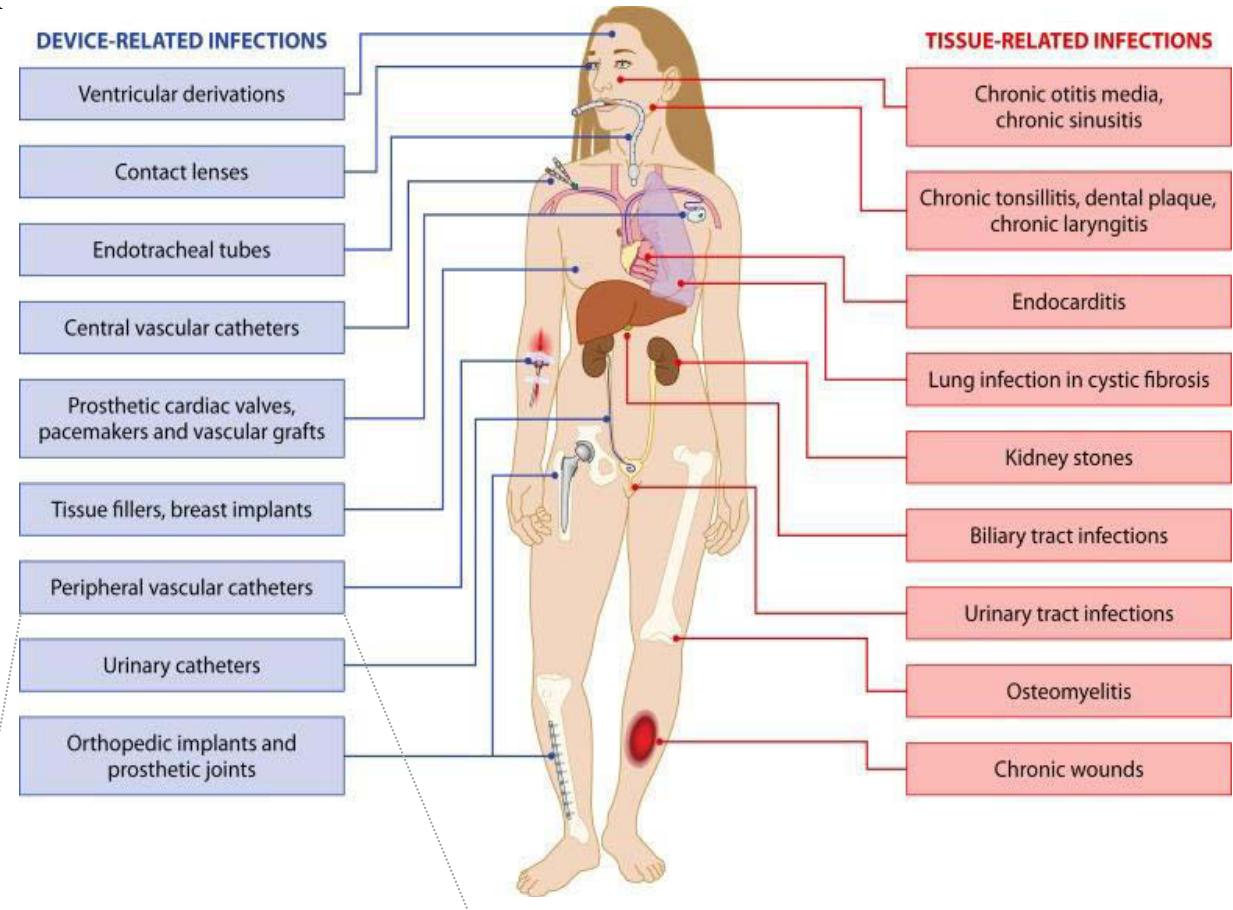
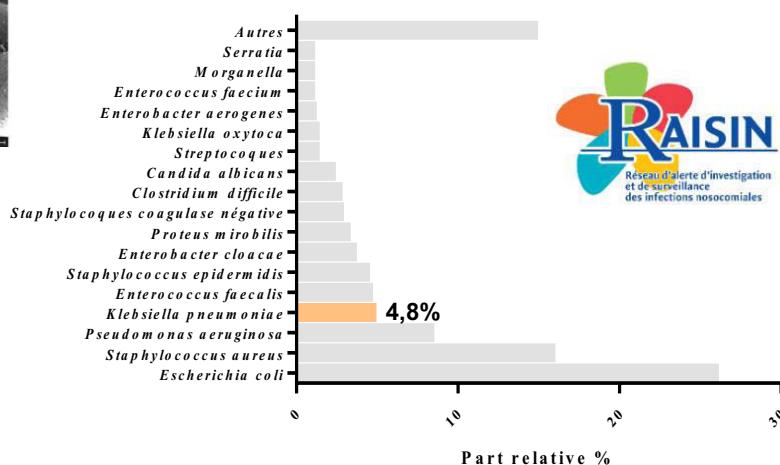
A**F**

Figure 11 : Infections liées aux biofilms chez l'Homme, dans les tissus ou par l'intermédiaire de dispositifs médicaux.

A : D'après Lebeaux *et al.*, 2014. B et C : Observation de biofilms mono-espèces à *Candida* formés sur des cathéters veineux après 24h d'incubation dans un modèle murin. B : Biofilm à *C. albicans* K1, C : Biofilm à *C. glabrata* 5376. D'après Nett *et al.* 2007. D et E : Biofilms à *P. aeruginosa* (D) et à *K. pneumoniae* (E) formés sur des cathéters siliconés après 4 jours d'incubation dans un modèle de vessie en laboratoire. D'après Stickler, 2008. F : Pourcentage relatif des micro-organismes les plus fréquemment associés aux infections nosocomiales en France. Adapté de RAISIN, 2012.

Les biofilms posent également des problèmes dans l'industrie pétrolière et les réseaux d'alimentation en eau potable à titre d'érosion et de réservoir de contaminants.

Dans **l'environnement**, la colonisation microbienne de surfaces entraîne des effets délétères macroscopiques et de nombreux problèmes économiques. Ainsi la présence de salissures sur les coques des navires ou « bio-fouling » conduit à une augmentation des forces de frictions et à une surconsommation de carburant (Dang & Lovell, 2016).

Dans le **domaine médical**, les biofilms sont le plus souvent associés à la constitution de réservoirs de micro-organismes potentiellement pathogènes sur les matériaux tels que les sondes et cathéters ou à la surface des muqueuses, qu'elles soient dentaire, intestinale ou vaginale (Figure 11). Selon l'institut américain de la santé (NIH, National Institutes of Health), plus de 75% des infections microbiennes chez l'homme sont liées à la formation et la persistance de biofilms. En 2012 une enquête menée par le Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) a révélé que les micro-organismes les plus fréquemment associés à ce type d'infections étaient *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* (RAISIN, 2012), tous étant capables de former des biofilms (Figure 11F).

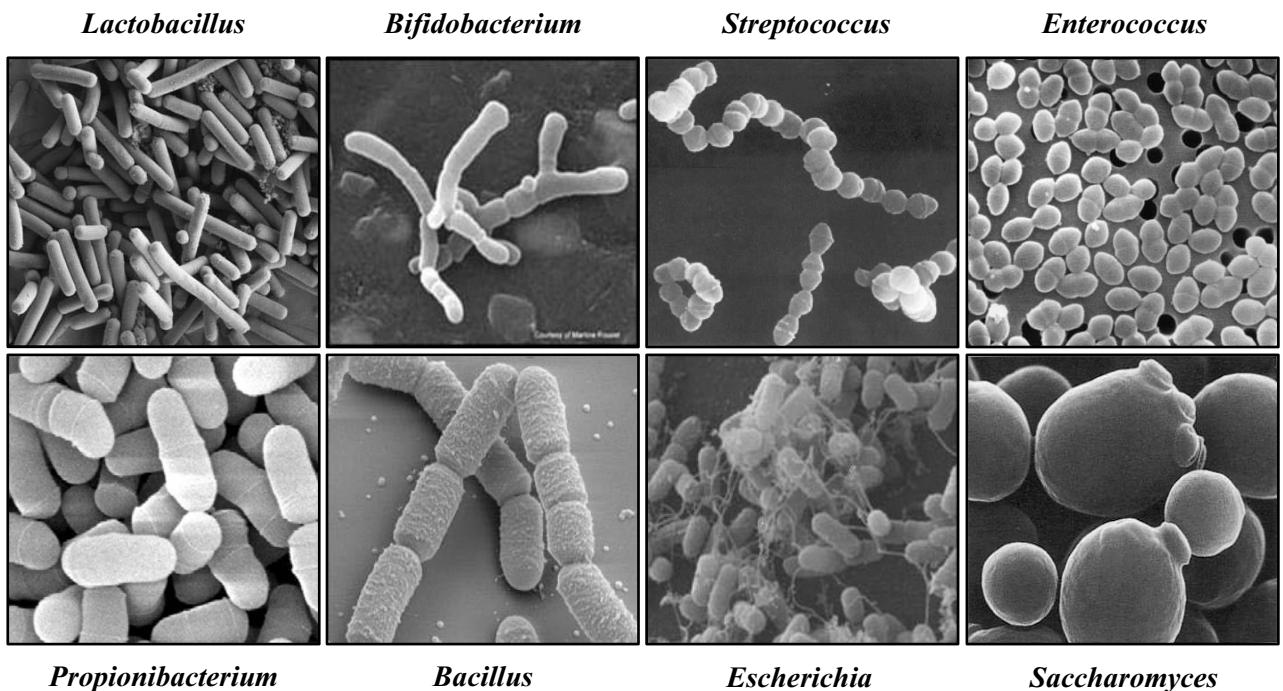


Figure 12 : Genres microbiens fréquemment utilisés dans les produits probiotiques observés en microscopie électronique à balayage.

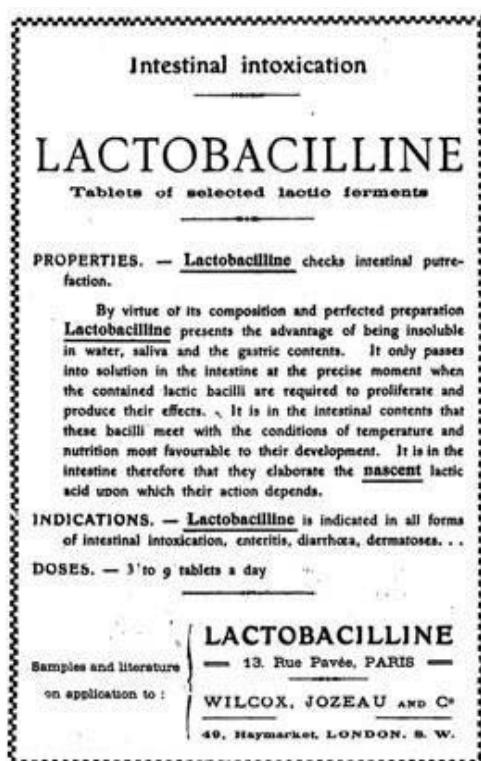


Figure 13 : Publicité pour la Lactobacilline parue dans l'édition du 6 décembre 1919 dans *The British Medical Journal*.

2 PROBIOTIQUES

2.1 Historique

Si la dénomination « probiotique » est d'usage relativement récent, le concept est issu de travaux réalisés au début du XX^{ème} siècle. Aujourd'hui, les probiotiques les plus utilisés sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, mais aussi *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* ou encore *Escherichia*. Des levures, telles *Saccharomyces boulardii*, sont également considérées comme des probiotiques (Figure 12).

Le concept de « probiotique » est attribué à Elie Metchnikoff, zoologiste et bactériologue russe. Il avait déduit que les bactéries synthétisant de l'acide lactique pouvaient être bénéfiques pour la santé et augmenter la durée de vie, après avoir observé que la longévité des paysans bulgares était liée à une grande consommation de lait fermenté (Metchnikoff, 1907). A la même époque, en 1906, Henry Tissier observait que les selles d'enfants souffrant de diarrhées contenaient un nombre de bifidobactéries moins important que celles des enfants bien portants (Tissier, 1906). Il préconisa alors l'administration de ces micro-organismes bénéfiques dans le traitement des diarrhées infantiles. Ainsi, Metchnikoff et Tissier furent les premiers scientifiques à préconiser l'administration de bactéries vivantes afin de palier un déséquilibre de l'écosystème intestinal. L'engouement pour les produits fermentés était né ; s'est ensuivit la commercialisation du premier ferment : la Lactobacilline (Figure 13). Par la suite, d'autres produits furent commercialisés tels que Sauerin, Fermenlactyl, Trilactine, Biolactyl et le Yakult.

D'autres micro-organismes non pathogènes n'appartenant pas aux bactéries lactiques ont été isolés et considérés comme probiotiques quelques dizaines d'années plus tard. Les souches d'*Escherichia coli* Nissle 1917 et la levure *Saccharomyces boulardii*, respectivement isolées par Alfred Nissle en 1917 et par Henri Boulard en 1923, sont encore largement utilisées.

2.2 Définition

Selon l'étymologie grecque du mot, « pro » signifiant « pour » et « bios » désignant « la vie », le mot probiotique signifie littéralement « en faveur de la vie ». Sa définition a cependant évolué dans le temps. En effet, le terme « probiotique » fut introduit dans la

littérature en 1954 par Ferdinand Vergin en opposition aux antibiotiques et avec la volonté de souligner l'importance des effets bénéfiques apportés par ces micro-organismes sur la flore intestinale (Vergin, 1954). En 1965, Lilly et Stillwell décrivirent les probiotiques comme des substances produites par des micro-organismes capables de stimuler la croissance d'autres micro-organismes (Lilly & Stillwell, 1965). Par la suite, en 1974, Parker proposa d'élargir la définition à des organismes ou substances contribuant à l'équilibre de la flore microbienne intestinale (Parker, 1974). En 1989, Fuller modifia la définition des probiotiques établie par Parker, en supprimant la notion de « substances » et en incluant la notion de viabilité et d'effets positifs exercés ; les probiotiques sont devenus des "compléments alimentaires microbiens vivants qui exercent une influence bénéfique sur l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal" (Fuller, 1989). Une définition officielle du terme « probiotique » a finalement été établie par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) en 2001, et rééditée en 2013 par l'Association Scientifique Internationale pour les Probiotiques et Prébiotiques (ISAPP) pour des raisons grammaticales comme « live microorganisms that, when administrated in adequate amounts, confer a health benefit on the host » (Hill *et al.*, 2014).

Le concept de « prébiotiques » a été introduit en 1995 par Gibson et Roberfroid. Il correspond à des ingrédients alimentaires non-digestibles qui stimulent de manière sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité d'espèces bactériennes - dont des probiotiques - au niveau du côlon, et de ce fait, sont capables d'améliorer la santé de l'hôte (Gibson & Roberfroid, 1995). Il s'agit généralement d'oligosides fermentescibles dont les plus connus sont les fructanes (polymères de fructose). Parmi les probiotiques dont la croissance est stimulée par ces éléments nutritifs, les bifidobactéries et les lactobacilles sont les genres microbiens de la flore intestinale les plus fréquemment concernés. Afin d'améliorer la survie des probiotiques et d'accroître leurs propriétés biologiques, l'idée de les combiner à des prébiotiques a conduit au concept de « synbiotiques ». Du fait que la définition des probiotiques soit restrictive à des micro-organismes viables, de nouveaux termes ont émergé récemment en vue des effets bénéfiques que procurent des molécules sécrétées ou des bactéries inactivées. Ainsi, Tsilingri et Rescigno considèrent comme « postbiotiques » les facteurs résultant de l'activité métabolique des probiotiques (Tsilingiri & Rescigno, 2013) et le terme de « parabiotiques » faisant référence aux cellules microbiennes inactivées ou fractions cellulaires (Taverniti & Guglielmetti, 2011).

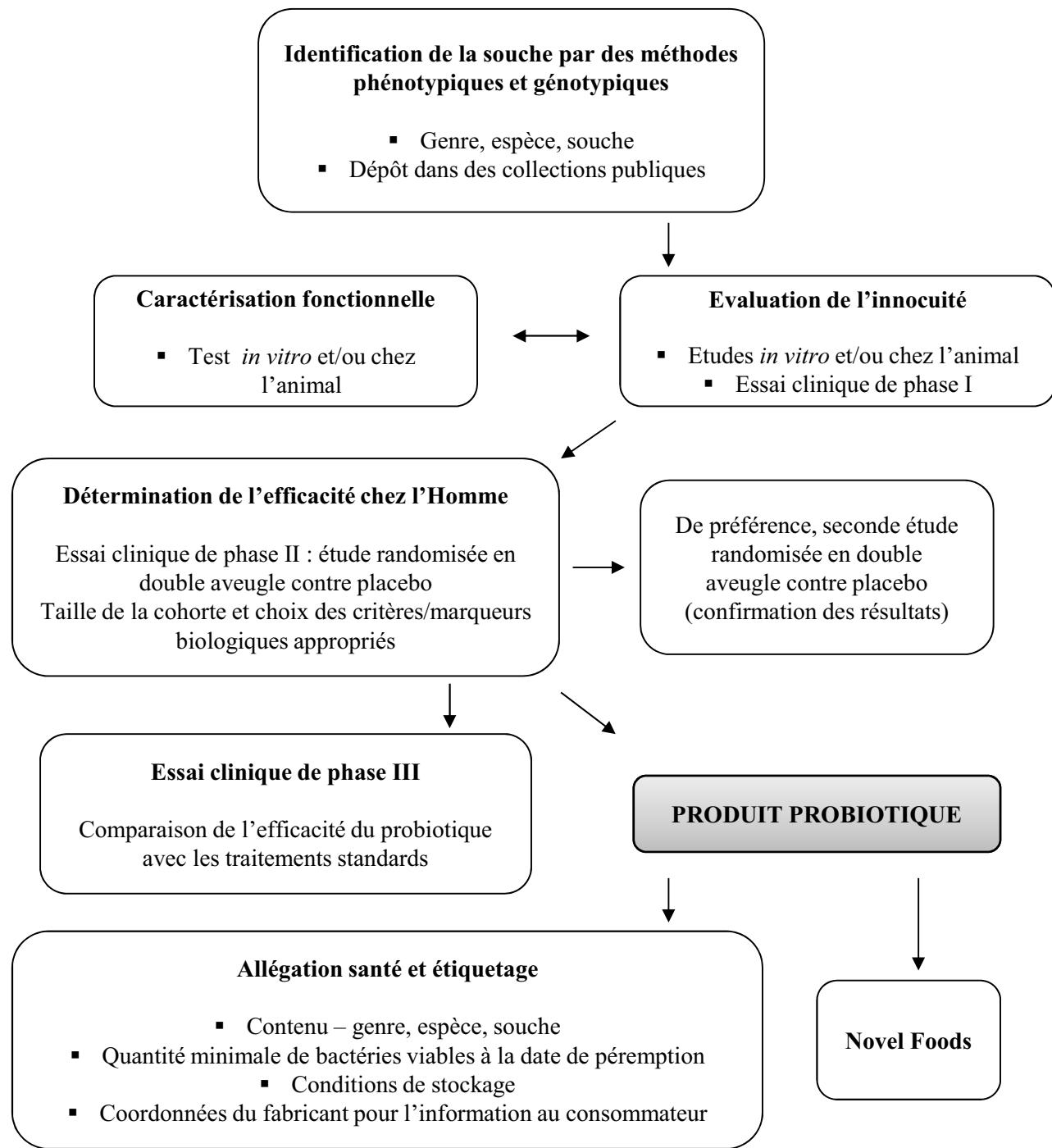


Figure 14 : Lignes directives pour l'évaluation des probiotiques destinés à l'usage humain.
D'après FAO-WHO 2002.

2.3 Mise sur le marché de nouveaux micro-organismes probiotiques

2.3.1 Sélection des micro-organismes probiotiques

De nombreux produits contenant des probiotiques ont été développés et mis sur le marché, notamment dans le secteur agro-alimentaire. Les formes commercialisées les plus habituelles sont les produits laitiers et les formes lyophilisées (comprimés, capsules et sachets). Elles sont constituées d'une seule ou d'un mélange de souches, appartenant majoritairement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Ces espèces, de par leur historique d'utilisation, bénéficient d'une présomption d'innocuité et possèdent le statut GRAS (« generally regarded as safe » - Etats-Unis) et/ou le statut QPS (« qualified presumption of safety » - Europe).

Face à l'intérêt grandissant suscité par les probiotiques, les autorités sanitaires ont mis en place un guide des bonnes pratiques de développement de ces bactéries bénéfiques pour la santé. Ainsi, en 2002, des lignes directives concernant l'évaluation des micro-organismes probiotiques destinés à l'usage humain ont été éditées (FAO-WHO, 2002) (Figure 14). Les effets attribués aux probiotiques sont propres à la souche considérée et ne peuvent être extrapolés à d'autres souches du même genre ou de la même espèce (Vuotto *et al.*, 2014b). Il est donc indispensable de caractériser de manière précise les souches ayant une activité probiotique, à travers des techniques phénotypiques et génotypiques. De plus, un micro-organisme probiotique destiné à une administration humaine doit être exempt de toute pathogénicité. Ainsi l'évaluation du profil de résistance aux antibiotiques et la recherche de gènes codant des facteurs de virulence doivent être effectuées de manière systématique. La mise en évidence des effets bénéfiques des probiotiques requiert la caractérisation fonctionnelle des souches candidates. La viabilité des probiotiques est ainsi un critère important ; ils doivent résister aux processus de production mais également survivre aux conditions rencontrées lors de leur administration, notamment résister à l'acidité et aux sels biliaires, des tests réalisables *in vitro*. D'autre part, les caractéristiques classiquement décrites chez les probiotiques (activité antimicrobienne vis-à-vis de pathogènes, capacité d'adhésion cellulaire ou immunomodulation) peuvent être évaluées. Les résultats obtenus *in vitro* doivent également être confirmés *in vivo* lors d'études sur modèle animal dans le but de s'assurer de l'efficacité et de l'innocuité des souches sélectionnées. Enfin, la conception d'un produit ou d'une formule probiotique à visée pharmaceutique nécessite également la réalisation d'essais

Tableau 2 : Allégations santé des produits laitiers ou de micro-organismes probiotiques délivrées à ce jour.

D'après l'EFSA 2011.

http://www.nutraingredients.com/Regulation-Policy/DuPont-wins-rare-European-probiotic-gut-health-claims?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright

<http://www.nutraingredients.com/Manufacturers/Activia-health-claim-Danone-win-in-Switzerland>

<http://www.nutraingredients.com/Regulation-Policy/Yakult-wins-Swiss-probiotic-health-claim>

Produit	Année	Autorités	Allégation santé
			Effets reconnus
Yaourt	2011	EFSA	"Digestion de lactose"
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	2013		"Activia contribue au confort digestif en réduisant le temps de transit et les ballonnements"
<i>Bifidobacterium</i> <i>animalis</i> CNCM-I 2495	2014	SFVO	"Favorise la digestion réduisant le temps de transit"
Yakult <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i>	2015		"Yakult contribue au fonctionnement normal de l'intestin en améliorant la consistance des selles et en réduisant le temps de transit"

EFSA (European Food Safety Authority) Autorités compétentes délivrant les allégations santé en Europe.
SFVO (Swiss Federal food safety and Veterinary Office) Autorités compétentes délivrant les allégations santé en Suisse.

cliniques chez l'Homme, permettant de définir le rapport bénéfice-risque du produit (FAO-WHO, 2002).

2.3.2 Aspects réglementaires

La mise sur le marché d'un nouveau probiotique est régulée par une législation européenne à deux niveaux : le premier obligatoire dans certains cas, implique le respect de la législation « novel foods » ; le second facultatif, concerne l'autorisation de la communication d'une allégation santé au consommateur (Figure 14).

- Législation « Novel Foods »

La législation « Novel Foods », définis dans le règlement européen CE n°258/97, s'applique à des aliments ou des ingrédients dont la consommation était négligeable voire inexistante dans les pays de l'Union Européenne avant le 15 mai 1997 (UE, 2007). Cette réglementation peut donc s'appliquer à de nouvelles souches de bactéries bénéfiques isolées ou créées (OGM). La preuve d'un effet bénéfique sur l'Homme n'est pas exigée. Tous les probiotiques aujourd'hui disponibles sur le marché ne nécessitent pas le label Novel Foods car la plupart d'entre eux sont contenus ou ont été isolés à partir de produits alloués à la consommation bien avant 1997.

- Allégation santé

Les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires dépendent de la réglementation européenne n°1924/2006 (UE, 2006) et ne sont délivrées qu'après une évaluation scientifique par le panel « produits diététiques, nutrition et allergies » (NDA) de l'EFSA (European Food Safety Authority). Actuellement, une allégation santé concernant le produit « yaourt » et sa capacité à améliorer la digestion du lactose a été acceptée en Europe (EFSA, 2011), mais aucune souche de micro-organisme probiotique ne bénéficie d'une telle allégation, principalement par manque de preuves cliniques, scientifiques ou une caractérisation incomplète des souches. Néanmoins, des allégations santé ont été approuvées récemment en Suisse concernant 3 souches de micro-organismes probiotiques (Tableau 2).

2.4 Les probiotiques du futur ?

2.4.1 Probiotiques de « deuxième génération »

Bien que les micro-organismes probiotiques les plus communs appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, d'autres micro-organismes de la flore résidente naturelle du microbiote intestinal ont récemment été identifiés pour leur « potentiel probiotique ». En effet, une réduction significative de l'abondance de certaines bactéries a été observée chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques notamment de l'intestin ou d'obésité (Andoh *et al.*, 2012; Karlsson *et al.*, 2012). Par exemple, *F. prausnitzii* est une des bactéries du microbiote intestinal humain sain dont l'abondance est très affectée dans de nombreuses pathologies intestinales humaines (Miquel *et al.*, 2013). Cette bactérie exerce de nombreux effets bénéfiques vis-à-vis de l'hôte en modèles murins : propriétés anti-inflammatoires (augmentation de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α) (Sokol *et al.*, 2008), synthèse de butyrate (essentiel dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale) (Wrzosek *et al.*, 2013) et actions anti-nociceptives (Miquel *et al.*, 2016). Un autre exemple concerne *Akkermansia muciniphila*, bactérie de la flore endogène d'un microbiote sain dont la concentration est aussi diminuée en contexte pathologique, chez des individus souffrant d'obésité ou de diabète de type 2. Des chercheurs ont récemment montré que l'administration d'*A. muciniphila* à des souris obèses et diabétiques permettait de restaurer la barrière de mucus au niveau de l'intestin, de diminuer les désordres métaboliques spécifiques de ces pathologies (via la diminution du stockage de graisses et une meilleure oxydation des graisses du tissu adipeux) tout en protégeant les animaux du diabète et de l'inflammation (Everard *et al.*, 2013).

Ces études démontrent l'importance des bactéries commensales dans l'homéostasie intestinale de leur hôte et supportent l'idée de leur utilisation au titre d'une prochaine génération de probiotiques dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires intestinales, de l'obésité et du diabète de type 2 (Varankovich *et al.*, 2015).

2.4.2 Probiotiques de « troisième génération »

Une autre alternative consiste à utiliser des bactéries lactiques génétiquement modifiées pour la production de protéines hétérologues apportant un bénéfice à l'hôte. Ainsi, différentes études se sont intéressées à l'utilisation de bactéries lactiques recombinantes pour

leur capacité à synthétiser et délivrer des molécules thérapeutiques anti-inflammatoires au niveau mucosal dans le but de traiter des pathologies avec une composante inflammatoire notamment au niveau intestinal. Plusieurs modèles de bactéries lactiques génétiquement modifiées (GM-LAB) ont ainsi été conçus puis testés dans la prévention ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique) (de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2015). Deux stratégies ont jusqu'à alors été largement étudiées : la production d'enzymes anti-oxydantes et celle de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) par les GM-LAB.

L'administration orale de la souche *Lactobacillus casei* BL23 modifiée génétiquement pour produire soit une superoxyde dismutase, soit une catalase, deux enzymes anti-oxydantes, réduit significativement les dommages inflammatoires induits chimiquement par du TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid solution) dans un modèle murin (LeBlanc *et al.*, 2011). Une autre étude expérimentale a démontré que l'administration de souches recombinantes de *Streptococcus thermophilus* CRL 807 capables de produire ces mêmes enzymes diminuait la sévérité de l'inflammation, et ce de manière plus importante que la souche sauvage, dans ce même modèle de colite. Il a également été observé que l'administration du mélange des deux streptocoques recombinants induisait de plus fortes activités anti-inflammatoires que celle de chacune des souches (del Carmen *et al.*, 2014). Ainsi dans le cas des GM-LAB aucune spécificité de souche n'intervient, l'important étant l'action de la molécule recombinante.

L'interleukine 10 (IL-10) est l'une des cytokines anti-inflammatoires majeures impliquée dans le maintien de l'homéostasie de la réponse immune intestinale. Martin *et al.* ont testé l'effet d'une souche recombinante de *Lactococcus lactis* secrétant de l'IL-10 sous la dépendance d'un promoteur inducible en conditions de stress (Stress-Inducible Controlled Expression - SICE) semblables aux conditions du tractus gastro-intestinal. La production locale d'IL-10 au niveau de l'intestin suite à l'administration orale de cette souche recombinante entraîne des effets protecteurs en terme de perméabilité membranaire et d'activation du système immunitaire dans un modèle murin d'inflammation induite chimiquement (Martín *et al.*, 2014).

L'utilisation de bactéries lactiques recombinantes pourrait également être envisagée afin de restaurer des propriétés déficientes de l'hôte. Par exemple, la muqueuse du côlon de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin présente des activités protéolytiques élevées du fait soit d'une augmentation de l'expression de protéases soit d'une diminution de l'efficacité d'inhibiteurs de protéases endogènes. Des souris transgéniques produisant de

l'Elafine, un inhibiteur de sérine protéase endogène retrouvé au niveau de l'intestin humain, sont capables de se protéger vis-à-vis de colites artificiellement induites (Motta *et al.*, 2011). A partir de ces observations, une souche de *L. lactis* recombinante exprimant l'Elafine a été développée ; elle est capable de prévenir l'inflammation, d'accélérer la guérison mucosale et de rétablir l'homéostasie du côlon dans un modèle murin d'inflammation intestinale induite au DSS (Dextran Sodium Sulfate) (Motta *et al.*, 2012). Une étude récente a comparé l'effet de différentes souches recombinantes dans le traitement de maladies inflammatoires intestinales. Il a ainsi été mis en évidence que la protection la plus efficace contre les colites était obtenue lors du traitement avec la souche de *L. lactis* produisant l'Elafine par rapport à celle produisant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 ou TGF- β) (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2015). Ces approches thérapeutiques restent cependant réservées à des situations spécifiques.

Pour conclure, les recherches actuelles encouragent l'identification et la caractérisation de bactéries commensales en tant que nouvelles souches probiotiques naturelles mais aussi l'ingénierie bactérienne pour la création de souches génétiquement modifiées utilisables dans le rétablissement de l'homéostasie humaine. Cependant, bien que prometteuse en terme de résultats en modèle murin, l'acceptation des bactéries nécessitant le statut Novel Foods et « MGM » (Micro-organismes Génétiquement Modifiés) par les autorités de santé et le grand public reste un point de débat important. De plus, les connaissances des mécanismes moléculaires et des composés actifs produits par les souches commensales ou probiotiques n'étant pas exhaustives, il est essentiel et primordial de mieux les caractériser afin de cerner leur impact sur l'homéostasie épithéliale et la réponse immunitaire.

2.5 Applications thérapeutiques

Malgré cette méconnaissance des mécanismes d'action, une augmentation de la consommation de produits contenant des probiotiques pour revenir à une médication plus naturelle est à noter. L'administration de probiotiques a été préconisée dans un nombre important de pathologies.

2.5.1 Troubles physiologiques et métaboliques

L'intolérance au lactose est une pathologie due à une déficience partielle ou totale de la production de lactase intestinale, responsable de ballonnements, de crampes d'estomac ou encore de diarrhées. Dans un grand nombre d'études cliniques, l'administration orale de *S.*

thermophilus et *Lactobacillus delbrueckii* réduit les symptômes associés à cette pathologie (EFSA, 2011). Les capacités métaboliques glycolytiques de *S. thermophilus*, favorisées au sein du tractus gastro-intestinal (Rul *et al.*, 2011), peuvent expliquer comment la consommation d'organismes viables peut aider à la digestion de carbohydrates. *S. thermophilus* est en effet capable de métaboliser un grand nombre de sucres tels le sucre, le glucose, le fructose et principalement le lactose dont le métabolisme est essentiel à la colonisation du tractus digestif de rats gnotobiotiques (Thomas *et al.*, 2011).

D'autres études ont également montré la capacité de certains probiotiques à dégrader le cholestérol *in vitro* ainsi que leurs effets hypocholestérolémiant chez l'animal (modèle murin) (Yu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014) et chez l'Homme. Une diminution significative des taux sériques de cholestérol total a ainsi été observée chez des sujets présentant une hypercholestérolémie après consommation quotidienne de yaourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium lactis* (Ataie-Jafari *et al.*, 2009). D'autres études cliniques randomisées menées en double aveugle avec une souche de *Lactobacillus reuteri* sous forme de capsule ou mélangée avec du yaourt ont présenté des résultats similaires, associés à une diminution des taux sériques du « mauvais » cholestérol nommé LDL (« low density lipoprotein ») (Jones *et al.*, 2012a, b).

Le syndrome de l'intestin irritable est un trouble fonctionnel qui se caractérise par des douleurs abdominales, des ballonnements ou encore des troubles du transit. L'ingestion de plusieurs souches probiotiques a montré des capacités à réduire ces symptômes : *L. acidophilus* ainsi que des bifidobactéries appartenant aux espèces *B. infantis*, *B. animalis* (Moayyedi *et al.*, 2010). Concernant les essais effectués avec des mélanges de souches bactériennes probiotiques, 2 supplémentations multi-espèces (composée pour l'une de 2 souches de *Lactobacillus rhamnosus*, 1 souche de *Bifidobacterium breve* et 1 souche de *Propionibacterium freudenreichi* et pour l'autre d'1 souche de *Bifidobacterium longum*, 1 souche de *L. acidophilus*, 1 souche de *L. lactis* et 1 souche de *S. thermophilus*) se sont avérées efficaces dans le soulagement des symptômes et la stabilisation du microbiote intestinal (Drouault-Holowacz *et al.*, 2008; Kajander *et al.*, 2008).

De plus, des essais cliniques ont montré qu'une supplémentation en probiotiques (lactobacilles et bifidobactéries) réduit le risque d'entérocolite nécrosante (Lin *et al.*, 2005; Bin-Nun *et al.*, 2005), une pathologie extrêmement grave qui touche principalement les prématurés et qui se manifeste par des lésions de type nécrosantes au niveau de l'iléon. Une méta-analyse de données provenant d'essais randomisés a confirmé un bénéfice significatif de

différents probiotiques dans la prévention de l'entérocolite nécrosante ainsi que dans la réduction de la mortalité des prématurés (AlFaleh & Anabrees, 2014).

Certains probiotiques ont également démontré leur efficacité dans la régulation du transit intestinal. Leur effet bénéfique est lié à une diminution du pH intra-luminal et à une stimulation de la motilité intestinale, entraînant ainsi une amélioration de la consistance des selles et de la fréquence de défécation. Ces effets ont été confirmés lors d'études cliniques, notamment lors de l'administration de *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 à des enfants souffrant de constipation chronique (Bu *et al.*, 2007). D'autre part, l'administration de certains probiotiques s'est avérée efficace dans le traitement de diarrhées associées aux antibiotiques chez l'enfant et l'adulte ; il s'agit principalement de *S. boulardii* et *L. rhamnosus* GG (Szajewska & Kołodziej, 2015a, b).

2.5.2 Infections bactériennes

Plusieurs études cliniques effectuées avec des adultes hospitalisés ont indiqué que l'administration orale d'une souche de *L. casei* ou d'un mélange constitué de *L. acidophilus* et *L. casei* prévenait la survenue de diarrhée associée aux antibiotiques mais également de diarrhée infectieuse due à *Clostridium difficile* (Gao *et al.*, 2010; Hickson *et al.*, 2007). L'administration de la levure *S. boulardii* s'est aussi avérée indéniablement efficace dans la prévention et le traitement des diarrhées infectieuses à *C. difficile* consécutives à une antibiothérapie (McFarland, 2006).

La littérature suggère également l'utilité de certains probiotiques comme thérapie adjuvante aux antibiotiques dans l'éradication d'infections à *Helicobacter pylori*, responsable d'ulcères gastriques et duodénaux. En effet, le taux d'éradication d'*H. pylori* est amélioré lorsque les probiotiques sont administrés en combinaison avec une trithérapie d'éradication de 7 jours (omeprazole, amoxicilline, clarithromycine) (Sýkora *et al.*, 2005) ; certains améliorant en plus l'efficacité et la tolérance des traitements médicamenteux, comme c'est le cas pour la souche *L. rhamnosus* GG ou la levure *S. boulardii* (Tong *et al.*, 2007b).

De plus, certaines études cliniques ont mis en évidence des effets bénéfiques de l'administration orale de probiotiques dans la prise en charge d'infections des voies respiratoires. Une méta-analyse de données effectuée par Hao *et al.* a révélé que la prise de probiotiques (seul ou combiné) chez des personnes saines diminuait le nombre d'épisodes infectieux des voies respiratoires supérieures par rapport au groupe ayant reçu un placebo. Cependant, aucune différence significative concernant la durée des épisodes infectieux n'a été observée entre les deux groupes (Hao *et al.*, 2011). Des modèles *in vitro* ont permis

d'identifier les mécanismes d'action des probiotiques mis en jeu dans l'antagonisme des pathogènes incriminés : ils sont capables de s'agréger, d'entrer en compétition avec les pathogènes vis-à-vis des ressources nutritives ou des sites d'adhésion ou d'induire des effets immunomodulateurs (Popova *et al.*, 2012). Les probiotiques exercent également une action prophylactique vis-à-vis des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM). Administrées quotidiennement par voie orale à des patients sous ventilation mécanique, *L. rhamnosus* réduit de manière significative le risque de PAVM (*L. rhamnosus* GG) (Morrow *et al.*, 2010) et augmente le délai de colonisation des poumons par *P. aeruginosa* (*L. casei rhamnosus* 35) (Forestier *et al.*, 2008). Plus récemment, une étude a démontré que *B. longum* était capable de contrôler une infection pulmonaire à *K. pneumoniae* à travers d'importants effets immunomodulateurs dans un modèle murin de pneumonie (Vieira *et al.*, 2016).

Ces dernières années, de nombreuses études cliniques ont été réalisées afin d'évaluer les effets de probiotiques avérés ou potentiels sur le tractus urogénital (Nader-Macías & Juárez Tomás, 2015). Qu'elles soient testées seules, en mélange ou supplémentées à un traitement antibiotique, ces souches sont efficaces dans la prévention ou le traitement d'infections vaginales (vaginites bactériennes, candidoses), quel que soit le mode d'administration, oral ou local (Sudha & Maurya, 2012; Vicariotto *et al.*, 2014). Le mélange *L. rhamnosus* GR-1 et *L. reuteri* RC-14, administré seul ou en complément d'un traitement anti-infectieux, s'avère également efficace dans le traitement des vaginites bactériennes et des candidoses, en restaurant la flore locale ou en améliorant l'efficacité des traitements antibiotiques ou antifongiques (Martinez *et al.*, 2009a, b; Vujic *et al.*, 2013). De plus, l'efficacité du traitement des vaginites par de la clindamycine est significativement augmentée si cette antibiothérapie est suivie par l'administration intra-vaginale de *L. rhamnosus* Lcr35 (Petricevic & Witt, 2008).

2.5.3 Réactions immunitaires délétères

Les probiotiques sont également utilisés dans la prévention des rechutes et le traitement des maladies inflammatoires intestinales : maladie de Crohn, rectocolites hémorragiques et pochites. Les effets bénéfiques des probiotiques sur ces pathologies sont vraisemblablement liés à une amélioration fonctionnelle de la barrière intestinale et à une modulation des réponses inflammatoires. Il a été montré dans un modèle de colique murin que certains probiotiques (*L. casei* et le mélange VSL#3 composé de 4 lactobacilles, 3 bifidobactéries et un streptocoque) augmentent la population de lymphocytes Treg immunomodulateurs sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) au niveau

des ganglions lymphatiques mésentériques ainsi que les taux de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) et diminuent les taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF- α) au niveau du côlon (Thakur *et al.*, 2016). Concernant la maladie de Crohn, l'administration orale de la souche *E. coli* Nissle 1917 en parallèle d'un traitement de rémission à base de mésalazine (dérivé salicylé anti-inflammatoire) a permis de diminuer les taux de rechute des patients à 30% de récidive pour le groupe probiotique contre 70% de récidive pour le groupe placebo (Malchow, 1997). Avec l'étude comparative de 2 traitements de maintien de rémission (soit mésalazine seule), soit mésalazine associée à *S. boulardii*, Guslandi *et al.* ont démontré que l'administration de la levure *S. boulardii* réduisait également de manière significative le risque de récidive (Guslandi *et al.*, 2000). De tels effets pourraient être dus à la modulation du microbiote comme cela a été démontré avec *Saccharomyces cerevisiae* qui réduit les taux d'adhésion d'une souche d'AIEC (adherent invasive *E. coli*) au niveau de cellules épithéliales intestinales ou d'entérocytes de patients (Sivignon *et al.*, 2015). Mais d'autres études, menées avec des souches de *Lactobacillus* différentes, n'ont démontré aucun effet prophylactique sur les rechutes de la maladie de Crohn (Lichtenstein *et al.*, 2016). Le mélange VSL#3 apporte quant à lui un bénéfice incontestable dans la prise en charge des rectocolites hémorragiques et des pochites, notamment dans le maintien des patients en rémission (Gionchetti *et al.*, 2007; Miele *et al.*, 2009; Tursi *et al.*, 2010).

De nombreux essais cliniques ont décrit les effets de l'utilisation de probiotiques dans le traitement de désordres allergiques, principalement dans la prévention de la dermatite atopique chez les enfants. Plusieurs d'entre elles menées par Kalliomäki ont démontré un effet préventif de l'administration de *L. rhamnosus* GG sur l'apparition d'eczéma atopique chez les enfants âgés de 2, 4 et 7 ans (Kalliomäki *et al.*, 2001, 2003, 2007). Cependant, aucun effet n'est observé vis-à-vis de l'asthme ou des rhinites allergiques chez des individus plus âgés (Kalliomäki *et al.*, 2007). De plus, l'administration de souches de *Lactobacillus* a également induit des effets favorables dans le traitement de la dermatite atopique avec une réduction de la sévérité et de l'étendue de l'eczéma (Rosenfeldt *et al.*, 2003; Weston *et al.*, 2005). Toutefois, aucune conclusion générale ne peut être déduite car d'autres essais cliniques ont démontré l'absence d'effet de l'administration de deux *L. rhamnosus* dans le traitement de dermatite chez l'enfant (Brouwer *et al.*, 2006). Quant aux allergies d'origine alimentaire, peu de données sur l'efficacité des probiotiques dans leur prévention sont disponibles.

Si les probiotiques s'avèrent utiles dans certaines indications cliniques, les résultats contradictoires entre différentes études sont nombreux, en lien vraisemblablement avec la variabilité des doses utilisées, du temps de traitement, du mode de délivrance mais principalement de la spécificité d'action de chacune des souches de probiotique utilisées.

2.6 Risques associés aux probiotiques

Les probiotiques, micro-organismes vivants, peuvent théoriquement entraîner des effets indésirables tels que des infections systémiques, des activités métaboliques délétères, une immunomodulation excessive. Ils peuvent également être à l'origine de transfert de gènes vers les autres bactéries des microbiotes (Marteau, 2001) ou encore favoriser l'adhésion bactérienne de souches pathogènes.

2.6.1 Infections systémiques

De rares infections systémiques dues au *L. rhamnosus* GG et à *S. boulardii* ont été rapportées. Des cas de fongémies à *S. boulardii* survenues chez des patients hospitalisés ont été décrits en lien avec la contamination de cathéters veineux centraux suite à la manipulation de probiotiques par le personnel soignant (Hennequin *et al.*, 2000). Certains cas de bactériémies à *Lactobacillus* ont été rapportés chez des patients souffrant de rectocolites hémorragiques, conséquence d'une translocation bactérienne dans le sang suite à l'altération de la muqueuse intestinale (Kulkarni & Khoury, 2014). Deux études récentes ont également décrit des bactériémies à *L. rhamnosus* GG, associées à la prise de probiotiques chez l'adulte mais également en pédiatrie, avec identification dans les hémocultures de la souche de *Lactobacillus* préalablement ingérée (Meini *et al.*, 2015; Vahabnezhad *et al.*, 2013).

2.6.2 Activités métaboliques délétères et immunomodulation excessive

Les probiotiques peuvent engendrer des effets néfastes chez l'hôte en lien avec des réactions métaboliques inappropriées. Il a été en effet rapporté que le D-Lactate produit par les bactéries lactiques était responsable d'acidose lactique, se traduisant cliniquement par des épisodes d'encéphalopathies et d'acidoses métaboliques, notamment chez des patients souffrant du syndrome du grêle court (Ku *et al.*, 2006; Mayeur *et al.*, 2013; Munakata *et al.*, 2010).

Plusieurs études ont démontré l'implication de probiotiques dans la modulation du système immunitaire, incluant des effets sur la sécrétion de cytokines et la fonction des

cellules immunitaires (section 2.7.5). Ainsi la question d'un potentiel effet immunomodulateur défavorable chez certains individus a été soulevée, mais jusqu'à présent de tels impacts n'ont été rapportés chez aucun sujet (Butel, 2014).

2.6.3 Transfert de gènes

Outre les effets délétères propres au développement des probiotiques, leur effet délétère potentiel peut être lié à la diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques. Les bactéries lactiques peuvent présenter de multiples résistances aux antibiotiques (Gueimonde *et al.*, 2013). Le risque de transfert de gènes est considéré comme faible pour les résistances intrinsèques ou acquises suite à une mutation chromosomique. Cependant les résistances à certaines molécules (tétracycline, érythromycine ou chloramphénicol) sont portées par des éléments mobiles (transposons ou plasmides) et donc susceptibles de diffuser. Ainsi une étude a démontré, dans un modèle gnotobiotique murin, le transfert de résistances plasmidiques (codant la résistance à la tétracycline et à l'érythromycine) de deux souches sauvages de *Lactobacillus plantarum* vers une souche d'*E. faecalis* (Jacobsen *et al.*, 2007). En dépit de cette possibilité de transfert latéral de gènes entre probiotiques et autres organismes (commensaux ou pathogènes), aucune preuve clinique de transfert de résistance antimicrobienne n'a été rapportée jusqu'à présent (Doron & Snydman, 2015). De plus, une grande diversité de phages ont été décrits chez les bactéries lactiques, notamment chez le genre *Lactobacillus* (Briggiler Marcó *et al.*, 2015; Mercanti *et al.*, 2015; Zago *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), mais aucune étude n'a mis en évidence le transfert d'ADN phagique provenant de ces bactéries.

2.6.4 Potentialisation de l'adhésion de bactéries pathogènes

Des résultats expérimentaux *in vitro* démontrent une stimulation de l'adhésion de *G. vaginalis* aux cellules épithéliales en présence de *Lactobacillus iners*, ce qui favoriserait *in fine* le développement de vaginoses bactériennes (Castro *et al.*, 2013). De plus, la présence d'exopolysaccharides produits par 3 souches de probiotiques (*L. rhamnosus* GG, *B. longum* NB667 et *B. animalis* IPLA-R1) favorise l'adhésion de différentes bactéries entéro-pathogènes sur une couche de mucus intestinal provenant d'échantillon de tissu du côlon humain (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006). Enfin, une étude menée par Miyazaki et ses collaborateurs a révélé que le surnageant de culture d'une souche de *L. casei* stimulait la formation de biofilm par une souche d'*E. coli* entéro-agrégative (Miyazaki *et al.*, 2010).

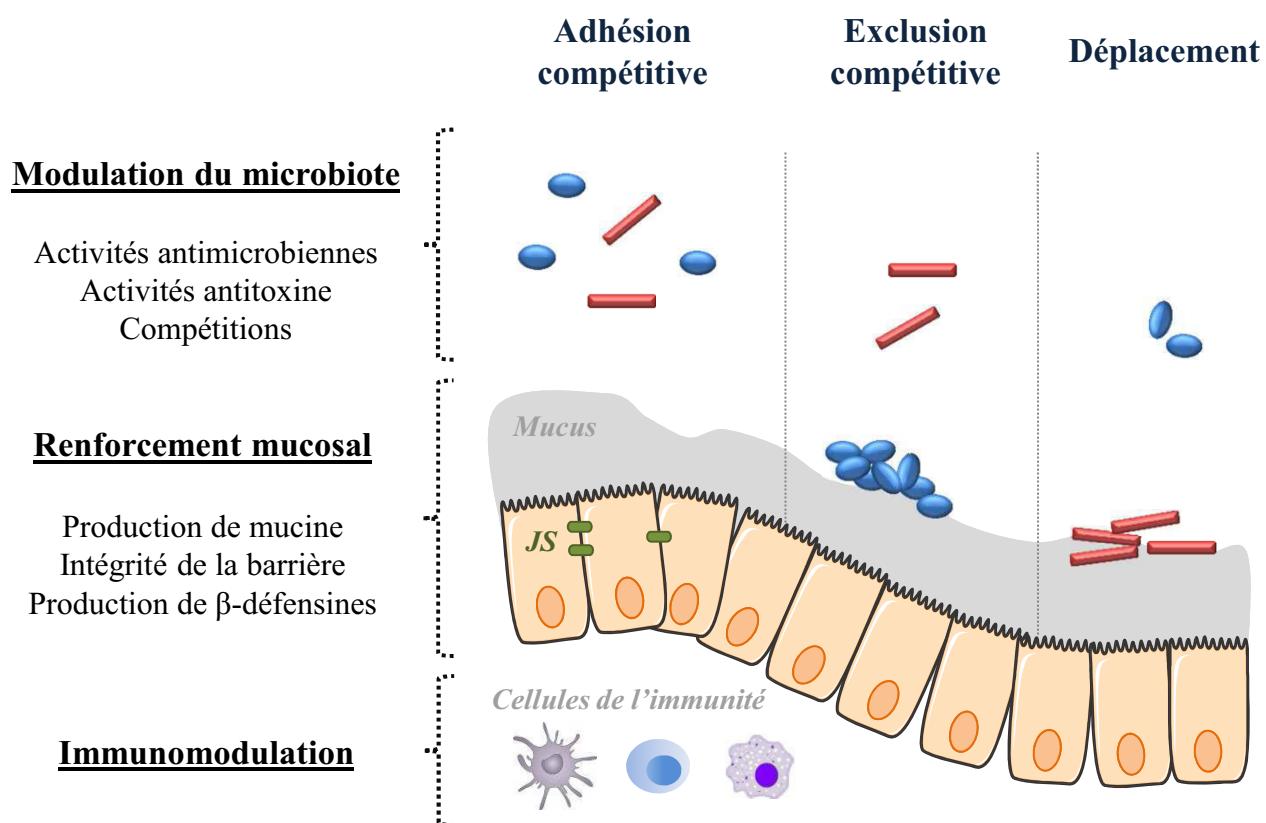


Figure 15 : Mécanismes d'action des probiotiques.

Les bactéries probiotiques sont représentées en bleu, les pathogènes en rouge ; JS (jonctions serrées). Schéma des 3 situations rencontrées au sein d'une communauté bactérienne : adhésion compétitive (les micro-organismes probiotiques et pathogènes sont tous deux sous forme planctonique) ; exclusion compétitive (pathogènes planctoniques sur un biofilm préformé par une souche probiotique) ; déplacement (probiotiques planctoniques sur un biofilm préformé par une souche pathogène).

Cependant, l'ensemble de ces risques est à mettre en perspective avec le très faible taux d'incidence des infections dues aux probiotiques au regard du nombre de consommateurs.

2.7 Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des probiotiques, procurant un bénéfice à l'hôte, sont nombreux et vraisemblablement synergiques. Parmi les propriétés antagonistes des probiotiques identifiées vis-à-vis de pathogènes, on retrouve la modulation du microbiote, le renforcement de la fonction barrière épithéliale, ainsi que des activités immunomodulatrices (Figure 15). Toutefois les effets bénéfiques engendrés par les probiotiques sont observés durant toute la durée de l'administration mais disparaissent progressivement dès l'arrêt du traitement.

2.7.1 Modulation du microbiote

- Activités antimicrobiennes

L'un des mécanismes impliqué dans la modification de la composition du microbiote par les probiotiques est la sécrétion de substances antibactériennes, notamment de bactériocines parmi lesquelles l'acidocine B produite par *L. acidophilus*, la plantaricine produite par *L. plantarum* et la nisine produite par *L. lactis* (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016) (Tableau 3). Certaines souches de *Lactobacillus* produisent plusieurs bactériocines (Messaoudi *et al.*, 2013). Ces toxines lysent les bactéries cibles à Gram-positif par perméabilisation de leur membrane via la lyse du peptidoglycane et/ou la formation de pores membranaires et inhibent la synthèse du peptidoglycane (Figure 16). Aucun effet de résistance bactérienne n'a été rapporté vis-à-vis de ces peptides, en lien vraisemblablement avec leur mécanisme d'action rapide (Perez *et al.*, 2014). Une étude *in vivo* réalisée par Corr *et al.* a démontré que l'administration orale de la souche *Lactobacillus salivarius* UCC118, produisant la bactériocine Abp118, était capable de protéger les souris d'une infection à *L. monocytogenes* au niveau du tractus intestinal (Corr *et al.*, 2007). Des bactériocines telles que la Bifidine I ou le Bifidocine B produites par des souches de bifidobactéries ont également été identifiées comme ayant des activités antimicrobiennes vis-à-vis d'un large panel de micro-organismes pathogènes à Gram-positif et à Gram-négatif appartenant aux genres

Tableau 3 : Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques.

D'après Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016

Classe	Poids moléculaire	Caractéristiques peptidiques	Exemple de bactériocines
Classe I	Inférieur à 5 kDa	Contient une lanthionine Hydrophobes Thermostables	Nisine Acidocine
Classe II	Inférieur à 10 kDa	Thermostables	Plantaricine Lactococcine Sakacine Abp118
Classe III	Supérieur à 30 kDa	Thermolabiles	Helveticine Enterolysine

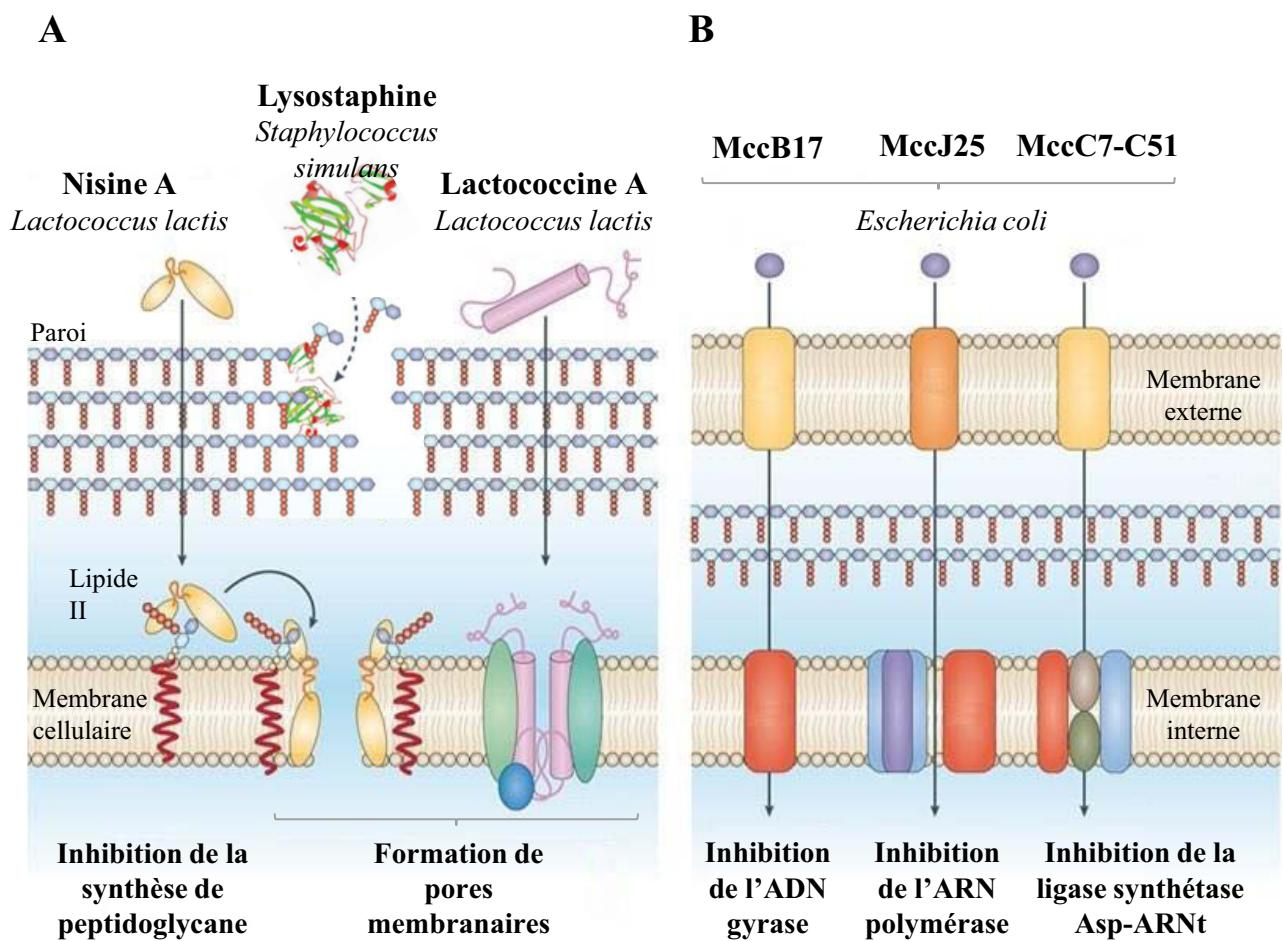


Figure 16 : Mécanismes d'action des bactériocines.

A : Les bactériocines agissant sur les bactéries à Gram-positif ciblent directement leur enveloppe cellulaire, soit en induisant la lyse de la couche de peptidoglycane, soit en inhibant la synthèse du peptidoglycane via une liaison avec les transporteurs de ses sous-unités (lipide II), soit en formant des pores au niveau de la membrane cytoplasmique, B : Les bactériocines inhibant les bactéries à Gram-négatif, interfèrent avec des enzymes essentielles aux mécanismes de réPLICATION, transcription et traduction. Adapté de Cotter *et al.*, 2013.

Staphylococcus, Bacillus, Streptococcus, Enterococcus, Listeria, Pediococcus, Salmonella, Shigella ou Escherichia (Martinez *et al.*, 2013).

Les bactériiocines ne sont pas les seules molécules antibactériennes produites par les bactéries. En effet, la plupart des probiotiques sont des producteurs d'acide lactique et induisent ainsi un abaissement local du pH, ce qui inhibe la croissance des bactéries sensibles à un environnement acide. C'est grâce à ce mécanisme que les souches *L. casei* Shirota, *L. casei* LC01, *L. plantarum* ST-III, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, et *L.rhamnosus* HN001 sont capables de réduire *in vitro* la croissance du pathogène *S. mutans* (Lin *et al.*, 2015).

- Activités « antitoxine »

Récemment, une équipe espagnole a identifié deux souches de bifidobactéries d'origine intestinale humaine capables de réduire *in vitro* les taux de toxine produits par *C. difficile*, permettant d'éviter ainsi les effets cytotoxiques sur les cellules épithéliales intestinales et de préserver les microstructures d'actine et les jonctions serrées (Valdés-Varela *et al.*, 2016). Cette protection résulte de la sécrétion d'une molécule dans le surnageant de culture, comme il avait été décrit avec une souche de *L. lactis* (Bolla *et al.*, 2013). La nature de ces molécules a pu être identifiée dans certains cas ; il s'agit d'acides organiques inhibant l'expression génique de la Shiga toxine chez *E. coli* ou de protéases capables de détruire la toxine A de *C. difficile* (Oelschlaeger, 2010).

Les bifidobactéries peuvent également favoriser les fonctions de défense des cellules épithéliales de l'hôte à travers la production d'acéate. Ce métabolite engendre des réponses anti-apoptique et anti-inflammatoire au niveau de l'épithélium du côlon murin, bloquant ainsi la translocation de la Shiga toxine produite par *E. coli* O157 dans le sang, protégeant *in fine* l'hôte d'une infection létale (Fukuda *et al.*, 2012).

- Phénomènes de compétitions

Compétition pour les ressources en nutriments : Les probiotiques sont capables d'exercer des compétitions nutritives vis-à-vis d'autres micro-organismes présents au sein du microbiote. Bien que le fer ne soit pas un élément essentiel à la croissance des lactobacilles, *L. acidophilus* et *L. delbrueckii* peuvent néanmoins lier les oxydes ferriques à leur surface, les rendant ainsi indisponibles pour les micro-organismes pathogènes (Elli *et al.*, 2000). Contrairement aux lactobacilles, le probiotique *E. coli* Nissle 1917 nécessite du fer dans son environnement et sécrète donc des systèmes de captation et de transport du fer. Cette souche possède au moins 7 systèmes d'assimilation du fer, cette propriété, bien que partagée avec des

bactéries pathogènes, lui permet d'être compétitif pour la ressource en fer (Große *et al.*, 2006; Grozdanov *et al.*, 2004).

Compétition de surface : La concurrence pour un même site d'adhésion, faisant intervenir des phénomènes de compétition vis-à-vis des sites récepteurs, d'exclusion ou de déplacement des bactéries, est un autre mode d'action exercé par les probiotiques sur les pathogènes (Figure 15). Tel est le cas de diverses souches de lactobacilles et bifidobactéries exerçant leurs effets vis-à-vis d'*E. coli*, *Shigella sonnei*, *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *Gardnerella vaginalis*, *C. difficile* ou encore *S. aureus*, par interférence avec leur site de liaison à la surface de cellules épithéliales (Abedi *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2013; Dhanani & Bagchi, 2013; Jankowska *et al.*, 2008; Prince *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) à la surface du mucus (Collado *et al.*, 2007) mais également à travers la production de glycoprotéines au niveau de leur paroi externe de surface (S-layer) (Golowczyc *et al.*, 2007; Horie *et al.*, 2002; Johnson-Henry *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été démontré que 2 souches d'origine humaine de *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus gasseri* réduisaient l'adhérence gastrique du pathogène *H. pylori*, via la production d'une molécule effectrice capable d'inhiber l'expression du gène codant l'adhésine SabA (Klerk *et al.*, 2016).

Enfin, les probiotiques sont capables de renforcer le microbiote en interagissant avec ce dernier (Rios-Covian *et al.*, 2015), influençant et stabilisant ainsi sa composition (Hemarajata & Versalovic, 2013; Scott *et al.*, 2015). L'ensemble de ces processus conduit à une modulation du microbiote résident par les probiotiques pouvant ainsi servir de première barrière aux bactéries pathogènes.

2.7.2 Renforcement de la fonction barrière épithéliale

Les probiotiques peuvent aussi agir indirectement vis-à-vis des pathogènes en interagissant avec les membranes épithéliales de l'hôte. Certaines souches sont ainsi capables de renforcer l'intégrité fonctionnelle de la barrière épithéliale conduisant à la réduction de l'adhésion bactérienne et donc à la protection de l'hôte. Divers mécanismes, assimilés à des modifications de surface biotique, sont décrits : stimulation de la production de mucine ou de β-défensines, préservation de l'intégrité de la barrière, ou activités immunomodulatrices.

- Stimulation de la production de mucine

La couche de mucus sur les surfaces épithéliales est la première ligne de protection vis-à-vis des micro-organismes pathogènes. Certains probiotiques peuvent promouvoir la

sécrétion de ce mucus par les cellules calciformes, améliorant ainsi la fonction barrière et donc l'exclusion de pathogènes. Par exemple, il a été décrit que *L. acidophilus* A4 augmentait *in vitro* l'expression des gènes de mucines dans la lignée cellulaire épithéliale intestinale humaine (HT-29), bloquant l'adhésion et l'invasion du pathogène *E. coli* O157:H7 (Kim *et al.*, 2008). D'autre part, la formule commerciale de probiotiques VSL#3 est capable d'induire une augmentation de l'expression des gènes codant les mucines et la sécrétion de mucus dans un modèle murin (Caballero-Franco *et al.*, 2007). Un autre mécanisme impliqué dans la préservation de l'intégrité de la barrière de mucus a récemment été décrit. Capable de se lier à la couche de mucus, *Lactobacillus farciminis* prévient des perturbations de cette barrière induite lors d'un stress, en influençant la O-glycosylation des mucines (Silva *et al.*, 2014).

- Préservation de l'intégrité de la barrière

Le renforcement de la fonction barrière de l'épithélium s'effectue également à travers le maintien des protéines structurales du cytosquelette et des jonctions serrées. Des études *in vitro* ont démontré que dans un contexte infectieux, les souches *E. coli* Nissle 1917 et *B. infantis* stimulaient la résistance trans-épithéliale de cellules humaines, associée à une augmentation de l'expression de protéines des jonctions serrées et une diminution de la perméabilité cellulaire (Ewaschuk *et al.*, 2008; Zyrek *et al.*, 2007). Un effet protecteur des bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*) a également été observé sur l'intégrité cellulaire inter-épithéliale intestinale (Jensen *et al.*, 2012; Klingberg *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2013; Tsata *et al.*, 2016). De plus, des résultats similaires ont été obtenus avec les souches *E. coli* Nissle 1917 ou *Lactobacillus johnsonii* dans des études menées sur un modèle de colite murin (Lee & Kim, 2011; Ukena *et al.*, 2007).

- Stimulation de la production de β-défensines

Les probiotiques agissent également sur la synthèse des β-défensines, peptides antimicrobiens synthétisés par les cellules épithéliales permettant de contrecarrer l'adhésion et l'invasion bactérienne. C'est par exemple le cas de souches de *Lactobacillus*, d'*E. coli* Nissle 1917, mais également du mélange VSL#3, qui favorisent l'expression et la sécrétion de β-défensines par des cellules épithéliales intestinales humaines (Schlee *et al.*, 2007, 2008).

2.7.3 Immunomodulation

L'immunomodulation représente une part importante du mécanisme d'action des probiotiques. Elle se traduit par une immunosuppression ou au contraire une

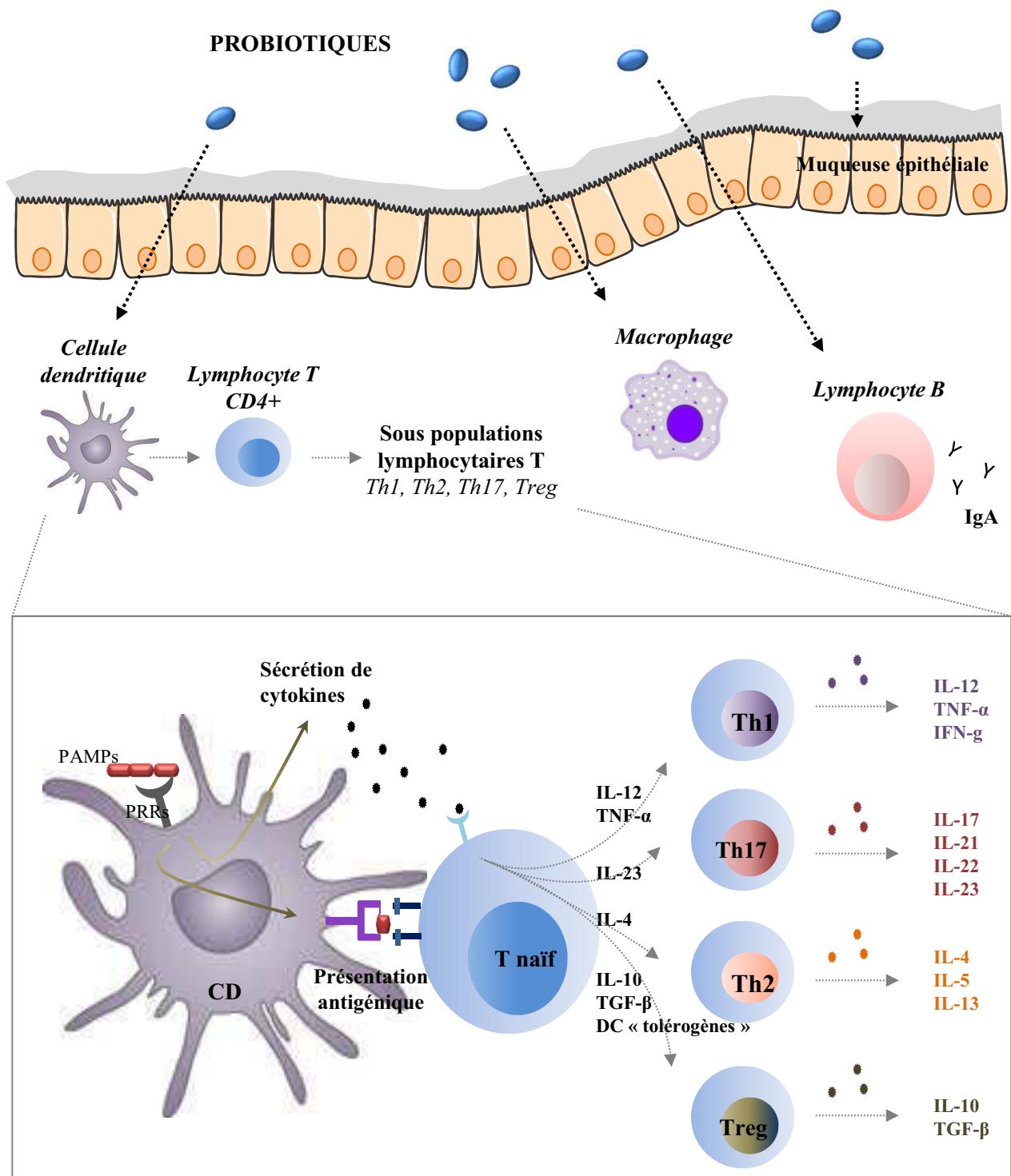


Figure 17 : Schéma des effets immunomodulateurs induits par des bactéries probiotiques.

immunostimulation souche spécifique, ce qui permet aujourd’hui d’envisager une utilisation ciblée des probiotiques dans de nombreuses pathologies (section 2.5).

Au niveau des muqueuses, les probiotiques sont capables d’interagir avec les cellules épithéliales mais peuvent également se retrouver en contact direct avec les cellules de la sous-muqueuse (cellules dendritiques et macrophages). Ces interactions permettent aux probiotiques de moduler la réponse inflammatoire en agissant sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (interleukine (IL)-8, IL-6, l’IL-1 β et TNF- α) et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) des cellules épithéliales et immunitaires, en modifiant la balance lymphocytaire T helper (Th1/Th2 ou en induisant des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Figure 17).

La reconnaissance des probiotiques par les cellules immunitaires s’effectue par l’intermédiaire de récepteurs de surface de type TLRs (Toll-Like Receptors) appartenant à la famille des PRRs (Pattern Recognition Receptors), capables d’identifier des motifs microbiens (peptidoglycane, acides teichoïques) présents à la surface des bactéries probiotiques. Ainsi, l’acide lipoteichoïque et la protéine de surface (SlpA) de lactobacilles sont capables de stimuler des macrophages via le TLR2, induisant la sécrétion de TNF- α (Chang *et al.*, 2010; Taverniti *et al.*, 2013).

- Effet des probiotiques sur la réponse immunitaire innée

Parmi les propriétés immunomulatrices des probiotiques, la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires par les cellules de l’immunité innée au contact des probiotiques a été étudiée dans de nombreux modèles infectieux où l’inflammation est le plus souvent exagérée et non contrôlée, entraînant des dommages tissulaires et la dissémination du pathogène. À travers la sécrétion de molécules, de nombreuses souches appartenant au genre *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*) ont la capacité d’inhiber la sécrétion d’IL-8 induite par un traitement au TNF- α ou lors d’une infection à *C. difficile* chez des cellules épithéliales intestinales *in vitro* (Boonma *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2013). Les composants de la paroi bactérienne tels que l’acide lipoteichoïque chez *L. plantarum* réduisent également la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) par des macrophages traités avec des extraits de peptidoglycane de *Shigella flexneri* (Kim *et al.*, 2011). D’autre part, en plus d’inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, certaines souches de probiotiques sont capables d’induire la production de cytokines anti-inflammatoires. Ainsi Corr *et al.* ont démontré que plusieurs souches de lactobacilles et de bifidobactéries étaient capables de réduire l’inflammation au niveau de cellules épithéliales

intestinales engendrée lors d'une infection à *L. monocytogenes* en diminuant les taux d'IL-8 produite et en augmentant les taux d'IL-10 sécrétée (Corr *et al.*, 2007).

La réponse du système immunitaire induite par les probiotiques reste cependant controversée. Bien que la majorité des études aient démontré une activité anti-inflammatoire des souches de probiotiques (en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires ou en induisant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires), d'autres ont montré *in vitro* que les lactobacilles étaient capables de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires ; tel est le cas des souches *Lactobacillus helveticus* et *L. rhamnosus* Lcr35 vis-à-vis de la sécrétion de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-12, d'IL-23 et d'IL-2 par les cellules dendritiques (Baba *et al.*, 2009; Evrard *et al.*, 2011; Guglielmetti *et al.*, 2010).

Enfin, l'effet des probiotiques sur la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires est strictement souche spécifique. En effet des souches d'une même espèce peuvent moduler différemment le profil cytokinique des cellules immunitaires. Ainsi, Drago et ses collaborateurs ont démontré que parmi 4 souches de *L. salivarius* d'origine humaine, deux étaient capables d'augmenter et deux autres de diminuer le ratio cytokines pro-/anti-inflammatoires (IFN- γ et IL-12 / IL-4 et IL-5) sécrétées par des macrophages humains (Drago *et al.*, 2010).

- Probiotiques et réponse immunitaire adaptative

Plusieurs études ont montré que les probiotiques peuvent orienter la polarisation des lymphocytes T CD4+ vers une sous population inflammatoire (Th1), anti-inflammatoire (Th2) ou régulatrice (Treg), et ceci de façon souche-dépendante. Ainsi, mis au contact *in vitro* avec des lymphocytes T CD4+ isolés à partir de monocytes sanguins, *Bifidobacterium bifidum* et *B. infantis* augmentent les taux d'IFN- γ intracellulaires et extracellulaires conduisant à une différenciation en sous population Th1 (Niers *et al.*, 2007). De façon similaire, la mise en contact de macrophages murins avec *L. plantarum* CJLP133 entraîne une augmentation de la production d'IL-12 (pro-Th1) et une diminution de la production d'IL-4 (pro-Th2), ce qui permet d'envisager un rôle bénéfique des probiotiques dans la prévention des allergies (Won *et al.*, 2011).

Les probiotiques peuvent également induire une réponse de type Treg impliquée dans l'induction de la tolérance périphérique et dans le contrôle de nombreuses pathologies dysimmunitaires. L'administration d'un mélange de 5 souches de probiotiques a démontré son efficacité dans le traitement d'inflammations (colite et dermatite atopique) induites

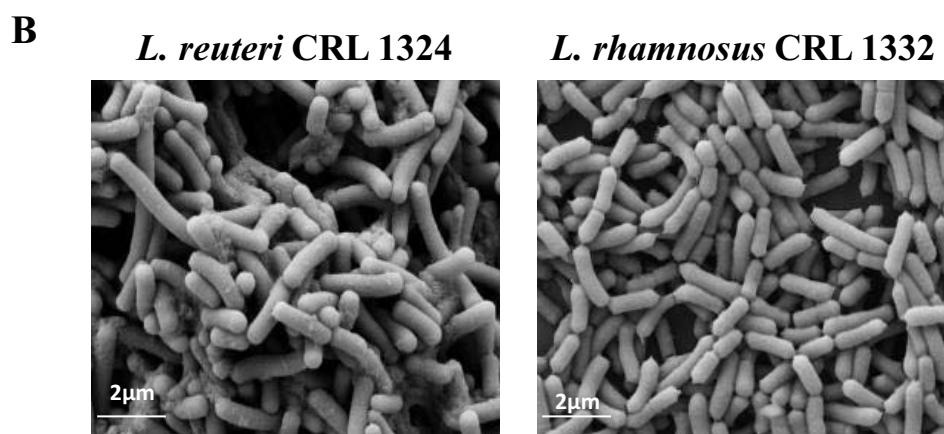
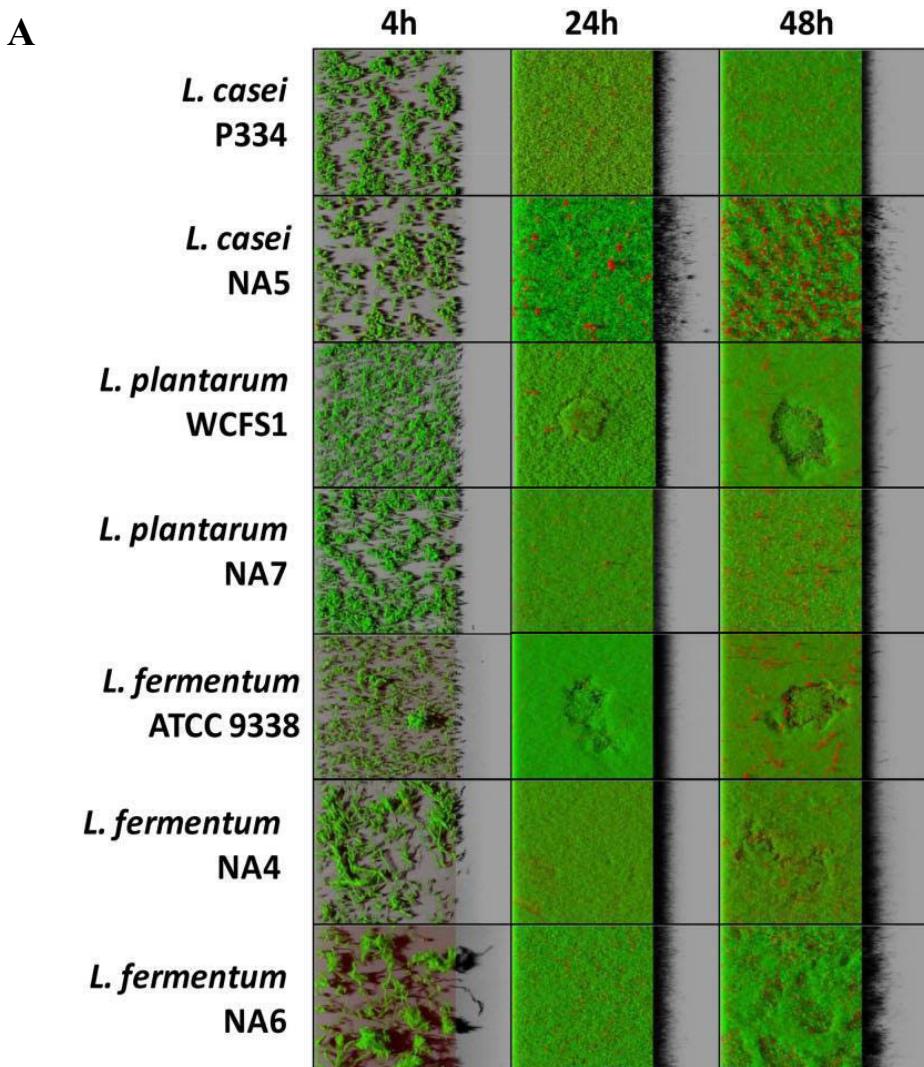


Figure 18 : Biofilms de *Lactobacillus*.

A : Organisation spatiale de biofilms de différentes souches de *Lactobacillus* au cours du temps. Un kit de coloration fluorescente a été utilisé afin de distinguer les bactéries vivantes (vertes - Syto 9) des bactéries mortes (rouges - iodure de propidium) au sein des biofilms. D'après Rieu *et al.*, 2014. B : Biofilms de 72h à *L. reuteri* CRL 1324 et *L. rhamnosus* CRL 1332 formés sur lamelle en verre, en conditions statiques. D'après Terraf *et al.*, 2016.

expérimentalement chez l'animal, en potentialisant la génération de lymphocytes Treg par les cellules dendritiques tolérogènes (Kwon *et al.*, 2010).

Enfin, certains probiotiques sont également capables d'induire la production d'anticorps par les lymphocytes B notamment des immunoglobulines A (IgA) qui protègent les épithéliums de la colonisation et/ou l'invasion de micro-organismes. Dans un modèle murin, l'administration orale et répétée d'une souche de *L. casei* augmente significativement le nombre de cellules sécrétant des IgA au niveau de la lumière intestinale (Galdeano & Perdigón, 2006). De même, l'administration orale de lactobacilles (*L. casei*) ou de bifidobactéries (*B. bifidum* + *B. infantis*, *B. lactis*), jointe à un stimulus infectieux (rotavirus, STEC, *E. coli*) conduit à une augmentation des taux d'IgA intestinaux spécifiques des pathogènes, quel que soit le modèle animal (Ogawa *et al.*, 2001; Qiao *et al.*, 2002; Shu & Gill, 2001).

Malgré ces quelques observations, les mécanismes d'immunomodulation exercés par les probiotiques, que ce soit au niveau de l'immunité innée ou adaptative, semblent être souche et dose-dépendants et restent pour la plupart à élucider.

- Propriétés spécifiques du mode de vie sessile

Bien que les données de la littérature soient encore modestes, le mode de vie sessile de souches de lactobacilles (Figure 18) semble potentialiser leurs activités immunomodulatrices. Il a ainsi été démontré qu'un surnageant de biofilm de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*) diminuait *in vitro* la réponse inflammatoire de monocytes THP-1 induite lors d'un traitement au LPS, en lien avec une sécrétion plus abondante de la protéine GroEL, par rapport à un surnageant planctonique de la même souche (Rieu *et al.*, 2014). Une étude récente a confirmé ces résultats, tout en démontrant une activité antimicrobienne spécifique des surnageants de biofilms vis-à-vis de différents pathogènes (*E. coli*, *S. enterica* et *L. monocytogenes*) (Aoudia *et al.*, 2016).

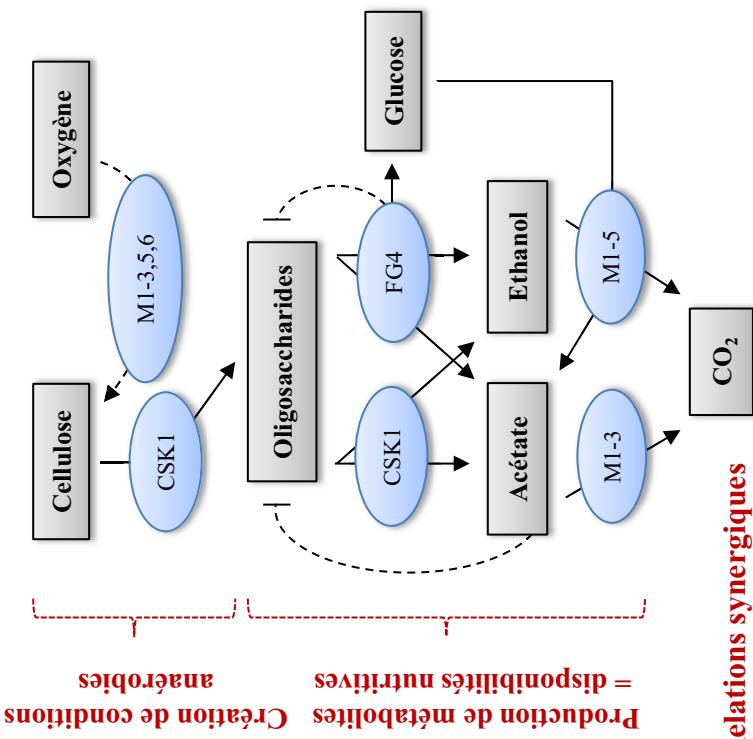


Figure 19 : Modèle de coopérations métaboliques au sein d'une communauté bactérienne.

Schéma des réseaux de flux de substrats et du rôle des différents membres d'une communauté bactérienne constituée de 5 souches différentes : *C. straminisolvans* CSK1, *Clostridium* sp. strain FG4, *Pseudoxanthomonas* sp. strain M1-3, *Brevibacillus* sp. strain M1-5, *Bordetella* sp. strain M1-6. Les souches M1-3,5 et 6 contribuent à la consommation de l'oxygène et à la neutralisation du pH environnant promouvant la croissance de CSK1, une bactérie anaérobique. À travers la consommation des oligosaccharides dérivés de la dégradation de la cellulose, les souches CSK1 et FG4 produisent une grande quantité de métabolites (acétate, éthanol et glucose) utiles en retour à la croissance des souches aérobies M1-3 et 5. D'après Kato *et al.*, 2005.

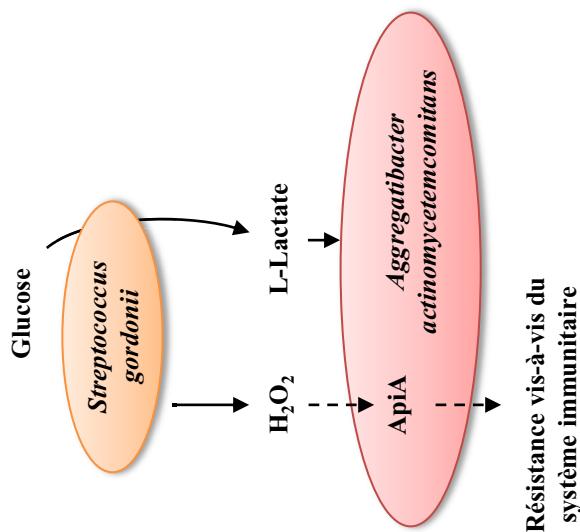


Figure 20 : Modèle de persistance d'*A. actinomycetemcomitans* en co-culture avec *S. gordonii*.

A. actinomycetemcomitans utilise le carbohydrate L-Lactate produit par *S. gordonii* comme source nutritive. Les taux d'H₂O₂ générés stimulent quant à eux la transcription du gène *apiA* qui inhibe la lyse médiee par le complément permettant ainsi à *A. actinomycetemcomitans* de résister vis-à-vis du système immunitaire. D'après Ramsey *et al.*, 2011.

3 INTERACTIONS MICROBIENNES AU SEIN DES BIOFILMS

La coexistence de multiples communautés microbiennes au sein des biofilms naturels engendre inéluctablement des interactions intra- et inter-espèces, et ce à travers des phénomènes de coopération mais également de compétition.

3.1 Interactions coopératives

Divers comportements mutualistes de type coopération métabolique ou à visée protectrice ont été décrits. Certaines espèces bactériennes sont capables de modifier leur microenvironnement local rendant ce dernier plus approprié pour la croissance d'autres organismes, par exemple en modulant le pH, la concentration en oxygène ou encore en produisant des métabolites pouvant servir de nutriments aux espèces voisines (section 1.5.1) (Nielsen *et al.*, 2000; Stewart & Franklin, 2008). Ainsi, la dynamique d'une communauté bactérienne constituée de 5 souches différentes (*Clostridium straminisolvans*, *Clostridium sp.*, *Pseudoxanthomonas sp.*, *Brevibacillus sp.* et *Bordetella*) est liée à la consommation d'oxygène et à la neutralisation du pH environnant par les souches aérobies, qui créent ainsi des conditions favorables au développement des organismes anaérobies qui, en retour, fournissent les métabolites (acétate et glucose) indispensables à la survie du consortium (Kato *et al.*, 2005) (Figure 19). De telles interactions inter-espèces contribuent également à l'augmentation de la virulence de micro-organismes lors d'infections polymicrobiennes ; une co-culture du commensal *Streptococcus gordonii* avec le pathogène opportuniste *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* favorise la virulence de ce dernier dans un modèle infectieux d'abcès murin. En effet, *S. gordonii* fournit au pathogène du L-lactate comme source de carbone à travers la fermentation du glucose et augmente sa résistance face au système immunitaire (Ramsey *et al.*, 2011) (Figure 20).

Les bactéries sessiles sont mieux protégées vis-à-vis des agressions que leurs homologues planctoniques et les interactions bactériennes inter-espèces au sein de biofilms sont en partie responsables de la résistance aux agents antimicrobiens (détérents, antibiotiques) (Burmølle *et al.*, 2006; Giaouris *et al.*, 2013; van der Veen & Abee, 2011). Bien que les mécanismes moléculaires mis en jeu ne soient pas définis, il est possible que l'augmentation de « fitness » de biofilms mixtes soit due à une augmentation de la viscosité de la matrice et à une réorganisation spatiale des bactéries. De plus, ces phénomènes de résistance ne sont pas liés à la sélection d'espèces résistantes mais plutôt à la coopération de ces dernières, capables de partager leurs mécanismes de défense individuels (sécrétion

d'enzyme ou production d'une matrice extracellulaire) avec tous les membres de la communauté (Lee *et al.*, 2014). Enfin, des études ont mis en évidence que les taux de transferts de gènes au sein des biofilms étaient plus importants que ceux s'effectuant à l'état planctonique (Madsen *et al.*, 2012), la densité de population favorisant la dispersion de plasmides par conjugaison (Molin & Tolker-Nielsen, 2003) et la libération d'ADN extracellulaire étant impliquée dans les phénomènes de transformation (Hendrickx *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001). Une équipe allemande a récemment démontré l'existence de transfert de gènes conférant des résistances aux antibiotiques (érythromycine et spectinomycine) entre des bactéries mono-résistantes au sein de biofilms à *Neisseria gonorrhoeae* (Kouzel *et al.*, 2015).

3.2 Interactions compétitives

Deux stratégies de compétition sont largement employées dans le monde microbien. La première appelée « exploitation compétitive » correspond à des interactions indirectes entre les micro-organismes pour l'utilisation de ressources présentes en quantités limitées. La seconde, qualifiée d' « interférence compétitive » implique des interactions antagonistes directes qui altèrent la survie et l'accès aux niches écologiques ainsi qu'aux ressources nutritives des compétiteurs.

3.2.1 Exploitations compétitives

La compétition pour une source de carbone est déterminante pour la survie ou le maintien des différentes espèces au sein d'un biofilm. Par exemple, la présence de sucres de type N-acetylglucosamine (GlcNAc) et glucosamine (GlcN) favorise l'émergence de streptocoques oraux commensaux tels que *S. gordonii* au sein de biofilms, au dépend de pathogènes responsables de la formation de caries tel que *S. mutans*, qui de plus, en présence de ces carbohydrates, développe une moindre biomasse (Zeng *et al.*, 2016).

La production de sidérophores par des membres de la communauté de biofilm est également à l'origine d'un phénomène d'exploitation. Ainsi, en présence de *C. albicans* au sein d'un biofilm mixte, *P. aeruginosa* augmente sa capacité de séquestration du fer à travers une production accrue de pyoverdine (Trejo-Hernández *et al.*, 2014). En effet, l'addition de fer dans le milieu de culture abolit cette production de pyoverdine, démontrant la spécificité de cette réponse (Puschke *et al.*, 2012).

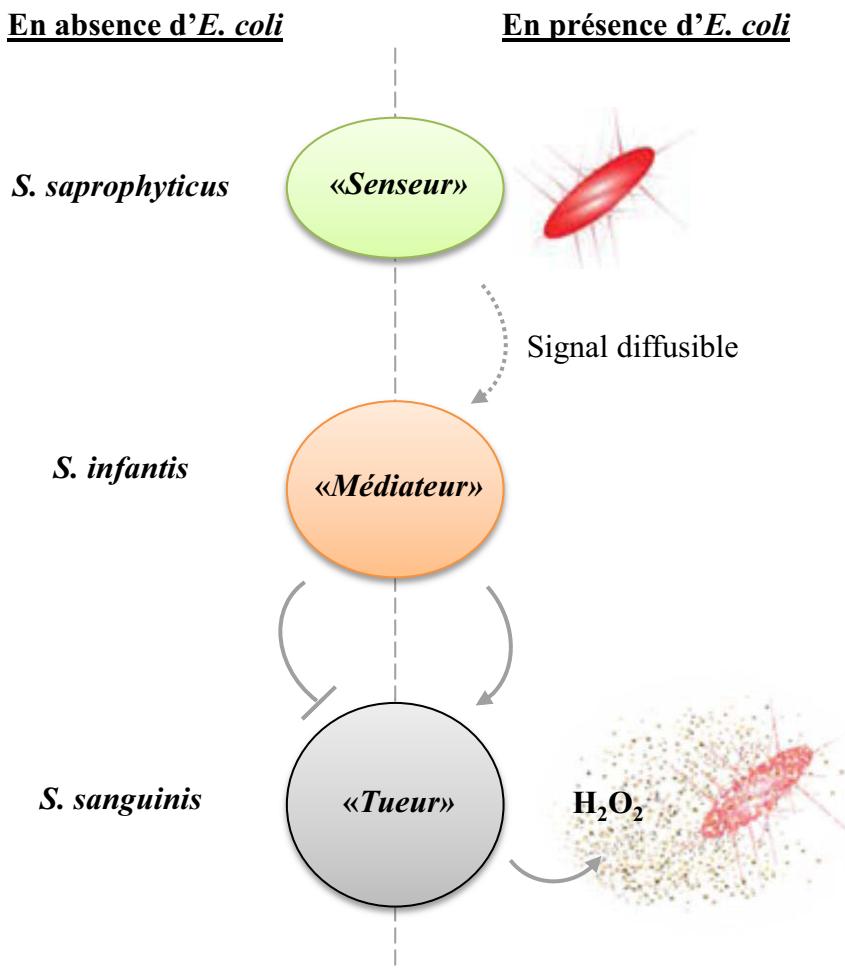


Figure 21 : Modèle de résistance de colonisation déployé par la communauté O-mix vis-à-vis d'*E. coli*.

Mécanisme faisant intervenir la collaboration de 3 espèces bactériennes : *S. saprophyticus* (le “Senseur”), *S. infantis* (le “Mediateur”) et *S. sanguinis* (le “tueur”). En absence d’envahisseur exogène, *S. infantis* inhibe la production d’ H_2O_2 par *S. sanguinis*. Après détection d’*E. coli* via ses lipopolysaccharides (LPS), *S. saprophyticus* produit des signaux diffusibles, reconnus par *S. infantis*. Ce dernier, non seulement lève sa répression sur la production d’ H_2O_2 par *S. sanguinis* mais stimule également sa capacité à en produire. Les taux d’ H_2O_2 élevés ainsi obtenus exercent un effet inhibiteur vis-à-vis d’*E. coli*. D’après He *et al.*, 2014.

3.2.2 Interférences compétitives

Les interférences bactériennes sont présentes à différents niveaux du développement du biofilm; elles peuvent affecter l'adhésion initiale et/ou la maturation via des phénomènes d'exclusion et de compétition, modifier la composition de la matrice ou favoriser la dispersion des bactéries.

- Inhibition de la croissance

Certaines espèces bactériennes peuvent inhiber la croissance de compétiteurs via la production de métabolites toxiques et ainsi réguler les niveaux respectifs des populations bactériennes au sein d'une niche écologique. A titre d'exemple, la communauté microbienne orale (O-mix) est capable *in vitro* de restreindre une colonisation ultérieure par des souches d'*E. coli* via une reconnaissance de leur lipopolysaccharide de surface (LPS) et une surproduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) aboutissant à la lyse de ces micro-organismes exogènes (He *et al.*, 2010). Les mécanismes sous-jacents ont récemment été identifiés : il s'agit d'un processus coordonné de 3 espèces bactériennes commensales (*Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus infantis* et *Streptococcus sanguinis*) agissant respectivement comme « senseur », « médiateur » et « tueur » (He *et al.*, 2014) (Figure 21).

Un autre exemple est celui de la communauté bactérienne complexe retrouvée au niveau de la plaque dentaire où un dialogue moléculaire s'établit entre différentes souches commensales et pathogènes de streptocoques. Par exemple, *S. sanguinis* et *S. gordonii* inhibent le pathogène *S. mutans* via la production de H_2O_2 (Kreth *et al.*, 2008). De plus, le commensal *Streptococcus oligofermentans* est capable de réduire l'incidence des caries causées par *S. mutans* via une stratégie de contre-offensive en utilisant l'acide lactique produit par *S. mutans* pour générer du peroxyde d'hydrogène, qui à son tour inhibe le développement de *S. mutans* (Tong *et al.*, 2007a) (Figure 22).

La grande majorité des bactéries sécrète également des substances antimicrobiennes ou bactériocines qui, en perméabilisant les membranes ou en interférant avec des enzymes essentielles (Figure 16), inhibent la croissance bactérienne ou entraîne la lyse cellulaire. Ainsi, la nisine A et la lacticine Q produites par *L. lactis*, la sonorensine produite par *Bacillus sonorensis* ou encore la colicine R spécifiquement sécrétée au sein de biofilm par *E. coli*, ont démontré leur très grande efficacité vis-à-vis des bactéries sessiles (Chopra *et al.*, 2015; Okuda *et al.*, 2013; Rendueles *et al.*, 2014). D'autres bactériocines ont été retrouvées uniquement au sein de biofilms, telles la mutacine I de *S. mutans* (Qi *et al.*, 2000) (Figure 22) ou la bacitracine produite par *Bacillus licheniformis* (Yan *et al.*, 2003) hypothétiquement en

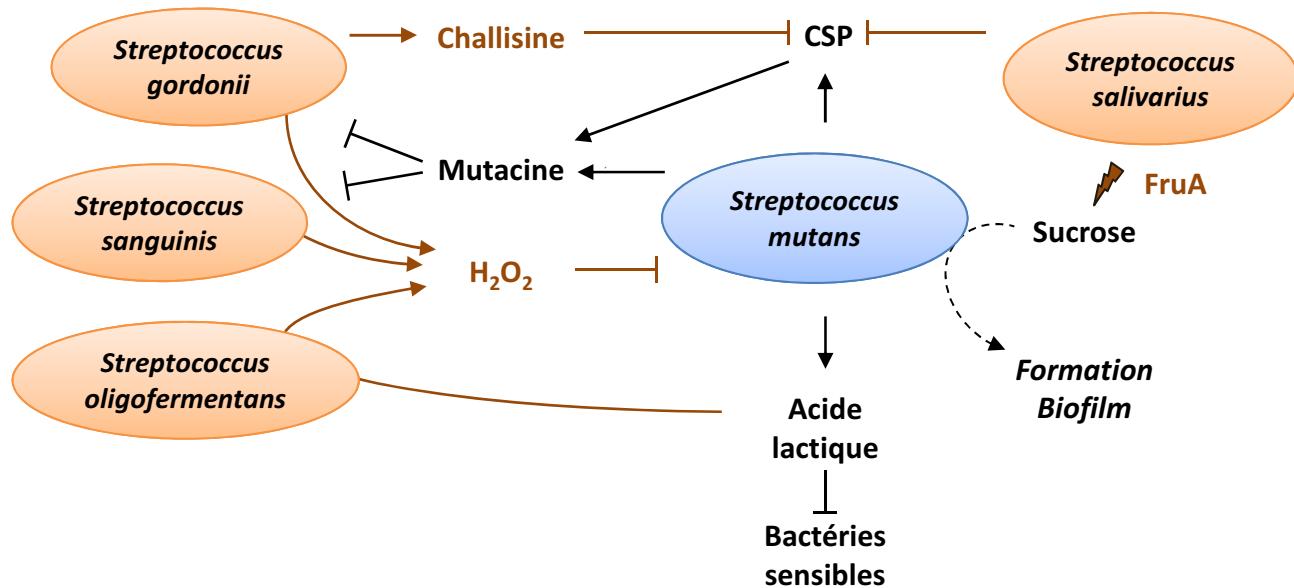


Figure 22 : Illustration des interactions inter-espèces au sein de communautés microbiennes orales.

Rôles des produits métaboliques ainsi que des bactériiocines dans les interactions de *S. mutans* avec *S. gordonii*, *S. sanguinis* et *S. oligofermentans* au sein d'un biofilm. La bactériocine (mutacine) produite par *S. mutans* inhibe la croissance des souches *S. sanguinis* et *S. gordonii*. L'acide lactique, capable d'inhiber la prolifération de diverses espèces anaérobies, a récemment été décrit comme substrat pour *S. oligofermentans* pour la production d' H_2O_2 . Ce composé, également produit par *S. sanguinis* et *S. gordonii*, inhibe la croissance de *S. mutans*. *S. gordonii* et *S. salivarius* inhibent la production de mutacine en réduisant les taux du facteur CSP (competence-stimulating peptide). *S. salivarius* produit une exo- β -D-fructosidase (FruA) qui dégrade le sucre, un substrat impliqué dans la formation de la matrice extracellulaire des biofilms chez *S. mutans*. Kreth *et al.*, 2005a,b, Tong *et al.*, 2007a, Kreth *et al.*, 2008, Tamura *et al.*, 2009, Ogawa *et al.*, 2011. Adapté de Kuramitsu *et al.*, 2007.

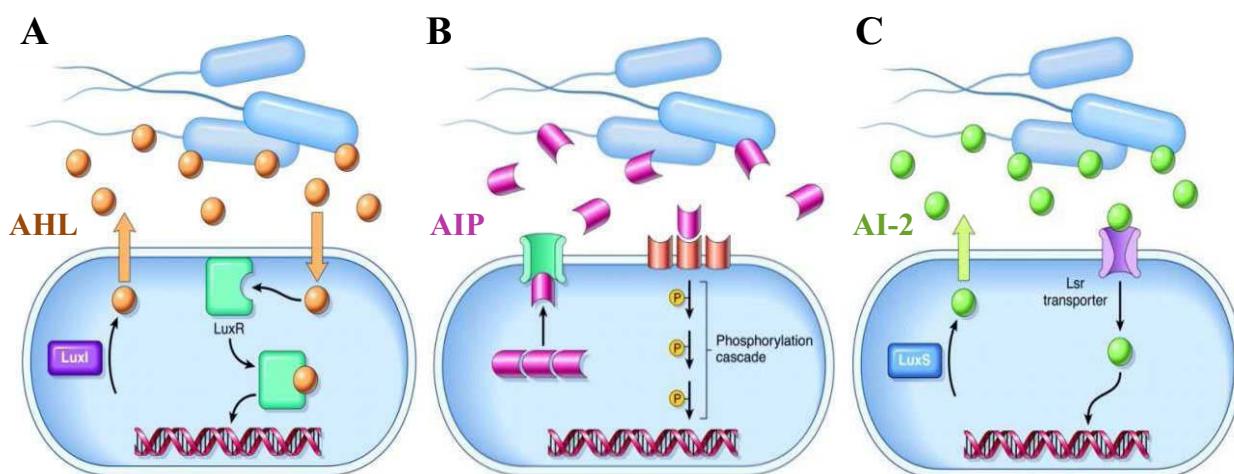


Figure 23 : Représentation schématique des 3 voies de signalisation du quorum-sensing.

A : le système LuxI/LuxR chez les bactéries à Gram-négatif (sphères; acylhomoséries lactones), B : le système AIP chez les bactéries à Gram-positif (formes liées; acides aminés ou petits peptides), C : le système LuxS/Lsr chez les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif (sphères; R-THMF (2R,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tétrahydroxytétrahydrofurane). D'après Raffa *et al.*, 2005.

lien avec l'accumulation de composés et la forte densité cellulaire retrouvées au sein de ces communautés.

- Inhibition de la communication cellulaire

Le quorum-sensing (QS) est un processus par lequel les bactéries produisent et détectent des molécules signal et coordonnent ainsi leur comportement en fonction de la densité cellulaire. Trois systèmes de QS ont été identifiés: le système des acylhomosérines lactones (AHL) chez les bactéries à Gram-négatif, le système de peptides autoinducteurs (autoinducer peptide, AIP) chez les bactéries à Gram-positif et le système universel d'autoinducteurs 2 (autoinducer-2, AI-2) (Figure 23). Après avoir traversé la membrane, les molécules signal AHL sont détectées dans le cytoplasme par une protéine LuxR, qui en présence de ligand agit comme un activateur transcriptionnel de gènes cibles (Fetzner, 2015). Le système de quorum-sensing des bactéries à Gram-positif consiste en la synthèse d'AIP (acides aminés ou petits peptides) tels que Agr ou ceux stimulant l'ARN polymérase III (RAP) chez *S. aureus* (Korem *et al.*, 2003). La liaison des AIP à un récepteur de surface couplé à une protéine kinase entraîne une cascade de phosphorylation de régulateurs de réponses, menant à l'activation de la transcription de gènes cibles. Le troisième système de quorum-sensing dépend de la synthèse d'AI-2 par l'enzyme LuxS. Bien que les gènes codant LuxS ainsi que les récepteurs d'AI-2 soient retrouvés dans divers génomes, notamment celui de *K. pneumoniae* (Pereira *et al.*, 2009; Rezzonico *et al.*, 2012), les récepteurs d'AI-2 et les systèmes de transduction de signal ont seulement été décrits chez *Vibrio* spp., *S. enterica* et *E. coli* (Pereira *et al.*, 2013). Alors que chez *Vibrio* spp la liaison des AI-2 (S-THMF : 3A-methyl-5,6-dihydro-furo(2,3-D)(1,3,2)dioxaborole-2,2,6, 6A-tetraol) à la protéine LuxP, un récepteur périplasmique homologue à LuxR, entraîne une transduction de signal similaire à celles des AIPs, chez *S. enterica* et *E. coli*, les AI-2 extracellulaires (R-THMF : (2R,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran) sont internalisés dans la cellule grâce au transporteur Lsr et modulent l'expression des opérons *lsr* (Vendeville *et al.*, 2005) (Figure 24).

La signalisation faisant intervenir les AI-2 joue un rôle important dans la formation de biofilm par diverses espèces bactériennes. Il a été démontré au laboratoire que la production d'AI-2 par *K. pneumoniae* influence la phase initiale de formation de son biofilm (Balestrino *et al.*, 2005). L'addition d'AI-2 dans le milieu de culture d'*E. coli* augmente les taux d'AI-2 phosphorylés par la kinase LsrK, ce qui stimule la formation de biofilm ainsi que la motilité bactérienne (González Barrios *et al.*, 2006). Parallèlement, l'inactivation du répresseur

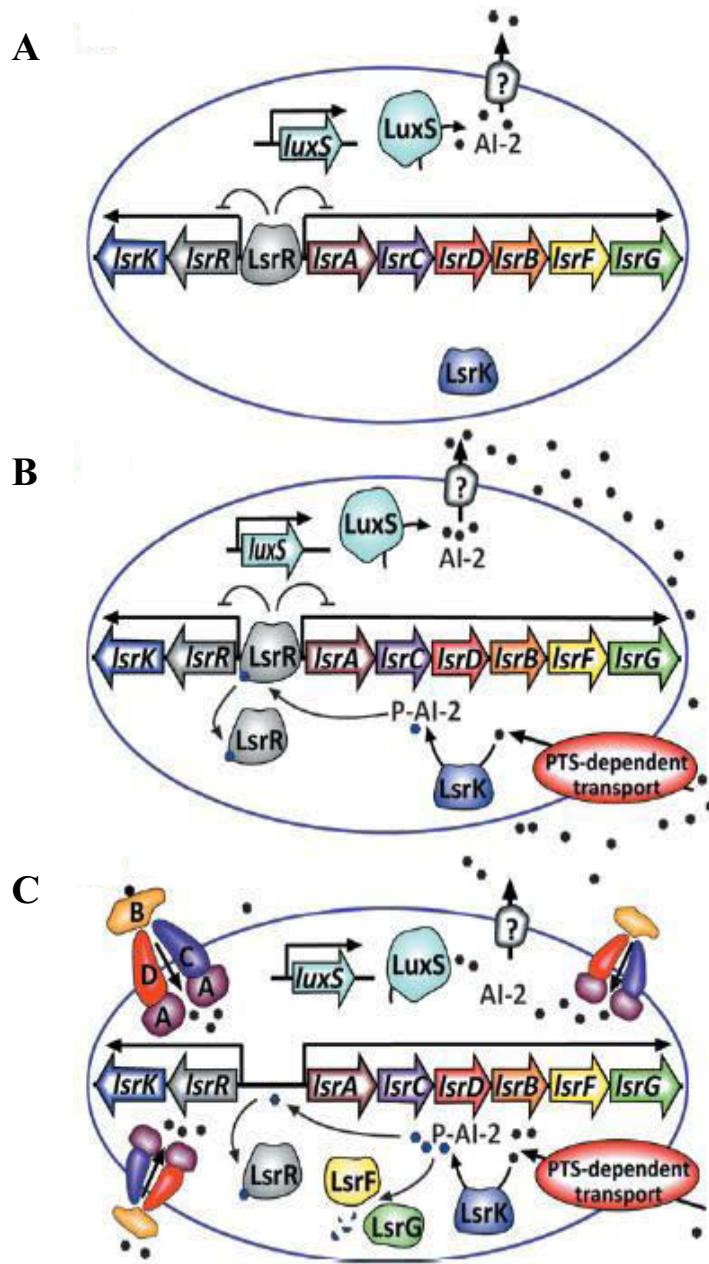


Figure 24 : Modèle pour la détection, l'absorption et la signalisation des AI-2 via le système Lsr chez *E. coli*.

A : Durant les phases précoce de croissance, les taux d'AI-2 extracellulaires sont faibles. La répression transcriptionnelle par LsrR est active, l'expression du système Lsr est inhibée. B : Lors de la phase exponentielle de croissance, les concentrations en AI-2 extracellulaires augmentent, l'absorption initiale s'effectue, les AI-2 importés sont phosphorylés (P-AI-2) par la kinase LsrK. La liaison des P-AI-2 à LsrR entraîne la dé-répression des 2 opérons *lsr*. C : En phase stationnaire de croissance, le mécanisme de transport des AI-2 dépendant du système Lsr est activé. Les AI-2 lient le récepteur périplasmique LsrB puis sont internalisés par le transporteur Lsr formé par 2 protéines transmembranaires (LsrC et LsrD) et la protéine liant l'ATP (LsrA). Un rétrocontrôle positif se met ainsi en place à travers l'augmentation de la production d'P-AI-2, ce qui en retour favorise l'expression du système Lsr . D'après Pereira *et al.*, 2013.

transcriptionnel de l'opéron *Lsr* (*LsrR*) entraîne une augmentation de la biomasse de biofilm à *E. coli* en lien avec une augmentation des AI-2 intracellulaires (Li *et al.*, 2007). De plus, le système LuxS est requis dans la formation de biofilms mixtes par *S. gordonii* et *Porphyromonas gingivalis* (McNab *et al.*, 2003). L'analyse phénotypique des mutants délétés de *luxS*, *lsrC* et *lsrD* (gènes codant les transporteur d'AI-2) et *lsrB* (gène codant le récepteur des AI-2) a permis de confirmer le rôle du système de quorum-sensing AI-2 dans la régulation de la formation de biofilm chez *Salmonella Typhimurium*, *K. pneumoniae* et *A. actinomycetemcomitans* (De Araujo *et al.*, 2010; Keersmaecker *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2007).

De nombreuses bactéries ont développé des mécanismes de dégradation ou de modification d'activité des molécules du quorum-sensing. Le système AHL est ainsi la cible d'enzymes (AHL lactonases, AHL acylases ou encore AHL oxydoréductase) synthétisées par diverses espèces bactériennes, qui en altérant ces messagers perturbent la formation du biofilm. C'est le cas de l'AHL lactonase (AiiA) produite par *Bacillus cereus* qui inhibe la formation de biofilm chez *V. cholerae* (Augustine *et al.*, 2010; Fetzner, 2015). Au sein de biofilms mixtes, la production d'indole par *E. coli* lui permet d'être compétitif vis-à-vis de *P. aeruginosa* en inhibant la signalisation AHL de ce dernier (Chu *et al.*, 2012). L'environnement buccal fournit plusieurs exemples d'enzymes sécrétées inhibant les signaux de communication au sein de communautés polymicrobiennes. Ainsi des streptocoques tels que *S. gordonii* et *S. salivarius* sont capables de sécréter des enzymes de dégradation qui inactivent le peptide signal CSP (competence-stimulating peptide) indispensable à la formation de biofilm chez *S. mutans* (Tamura *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) (Figure 22).

- Altération de l'adhésion initiale

Certains mécanismes interfèrent avec la première étape de formation de biofilm et impliquent différentes stratégies telles que la sécrétion de molécules modifiant les propriétés physico-chimiques de surface ou l'inhibition transcriptionnelle de facteurs d'adhésion bactériens.

Les molécules sécrétées sont de nature diverse : glycolipides, rhamnolipides, lipopeptides, polysaccharides, phospholipides ou encore acides gras (Sambanthamoorthy *et al.*, 2014) et elles agissent en tant que **biosurfactants** en conditionnant les surfaces des cellules microbiennes, les interfaces et les surfaces avec lesquelles les micro-organismes interagissent (Banat *et al.*, 2014). Ainsi, la production de surfactine par *B. subtilis* permet de

réduire la colonisation de surfaces en acier ou en polypropylène par des agents pathogènes alimentaires (*L. monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella enteritidis*) (Nitschke *et al.*, 2009). D'autres espèces telles que *Kingella kingae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus phocae* ou *B. licheniformis* présentent un large spectre de propriétés anti-biofilm à travers la sécrétion d'exopolysaccharides extracellulaires (Bendaoud *et al.*, 2011; Kanmani *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2009; Sayem *et al.*, 2011; Valle *et al.*, 2006). D'autre part, deux exopolysaccharides (Ec111p et Ec300p) composés de glucose, mannose, galactose et acide glucuronique, spécifiquement produits au sein de biofilm à *E. coli* ont été décrits comme inhibant la formation de biofilm par des bactéries à Gram-positif (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. faecalis*) mais pas ceux de bactéries à Gram-négatif (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* et *P. aeruginosa*) (Rendueles *et al.*, 2011). Deux études récentes ont mis en évidence le rôle de polysaccharides capsulaires produits par *Actinobacillus pleuropneumoniae* et par *K. pneumoniae* dans l'inhibition de la formation de biofilm d'un grand nombre d'espèces bactériennes (Karwacki *et al.*, 2013; Dos Santos Goncalves *et al.*, 2014). Certains polysaccharides agissent non seulement en inhibant la fixation initiale mais peuvent également induire la dispersion de biofilms formés ; c'est le cas de l'exopolysaccharide produit par la bactérie marine *Vibrio* vis-à-vis de biofilms formés par *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, qui agit en inhibant les interactions cellule-cellule et/ou cellule-surface (Jiang *et al.*, 2011).

A travers la sécrétion de composés dans le milieu extracellulaire, les bactéries sont également capables de **modifier l'expression de gènes** de leurs compétiteurs. Par exemple, le surnageant de culture de *P. aeruginosa* altère le développement d'un biofilm à *C. albicans*, en diminuant l'expression de gènes fongiques codant des structures de surface associées aux phénomènes d'adhésion et de formation de biofilm, mais aussi en augmentant l'expression d'une protéine (YWP1) de *Candida* qui joue un rôle inhibiteur dans la formation de son propre biofilm (Holcombe *et al.*, 2010). De plus, en agissant comme effecteur, l'arginine déiminase (ArcA) sécrétée par *Streptococcus* induit une signalisation menant à l'inhibition de l'expression de gènes codant les sous unités majeures de deux fimbriae (FimA et Mfa1) requis dans l'attachement et le développement de biofilm par *P. gingivalis* (Christopher *et al.*, 2010; Wu & Xie, 2010).

Enfin, l'inhibition du processus d'adhésion peut être médiée par la **dégénération de récepteurs**. Ainsi, la serine protéase Esp sécrétée par *S. epidermidis* dégrade des récepteurs

protéiques (e.g., fibronectine, fibrinogène et vitronectine) reconnus par *S. aureus* et impliqués dans les interactions hôte/pathogène et la colonisation de surfaces (Sugimoto *et al.*, 2013).

- Modulation de la qualité et de l'intégrité du biofilm

Modification de la matrice : Comme vu précédemment, la matrice extracellulaire est un élément important impliqué dans la cohésion et la structure des biofilms, agissant comme une barrière protectrice vis-à-vis d'agressions physiques ou chimiques (Flemming & Wingender, 2010). Certaines bactéries inhibent sa formation, telle *S. salivarius* qui, en produisant une exo- β -D-fructosidase (FruA) est capable de dégrader le sucrose - un substrat important pour la synthèse des exopolysaccharides de la matrice - et donc à terme inhibe le développement de biofilm par d'autres bactéries de la flore microbienne orale, notamment par *S. mutans* (Ogawa *et al.*, 2011) (Figure 22). Enfin, la protéine extracellulaire (BL-DZ1) produite par *B. licheniformis* est capable d'inhiber la formation de biofilms par *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *Bacillus pumilus* en réduisant la production de substances exopolymériques (EPS) (Dusane *et al.*, 2013).

D'autres bactéries produisent des enzymes capables de dégrader la matrice des biofilms en ciblant ses composants (exopolysaccharides, acides nucléiques ou protéines), menant *in fine* à une fragilisation du biofilm. La dispersine B produite par *A. actinomycetemcomitans* fut la première décrite ; elle est capable de disperser un biofilm préformé de *S. epidermidis* en hydrolysant son adhésine polysaccharidique intercellulaire (Poly- β -1,6-N-acetylglucosamine (PNAG)) (Kaplan *et al.*, 2004).

D'autre part, le rôle de nucléases (DNase) a également été décrit dans les phénomènes de dispersion de biofilms à travers la dégradation des acides nucléiques de la matrice extracellulaire. La bactérie marine *B. licheniformis* sécrète une DNase (NucB) dont l'action sur des biofilms de bactéries à Gram-négatif et Gram-positif induit une dispersion rapide d'agrégats cellulaires (Nijland *et al.*, 2010). Des effets similaires ont été observés avec la nucléase NUC1 de *S. aureus* vis-à-vis de biofilms constitués par *P. aeruginosa*, *A. pleuropneumoniae* ou *Haemophilus parasuis* (Tang *et al.*, 2011).

Les protéines de la matrice sont également des cibles privilégiées pour déstabiliser les biofilms. Ainsi, *S. epidermidis* inhibe la formation de biofilm mais agit également sur des biofilms préformés par *S. aureus* *in vitro*, via la production d'une sérine protéase (Esp) qui dégrade les composants protéiques de la matrice de *S. aureus* sans affecter sa croissance (Sugimoto *et al.*, 2013). Une étude clinique a démontré que l'inoculation d'extraits purifiés

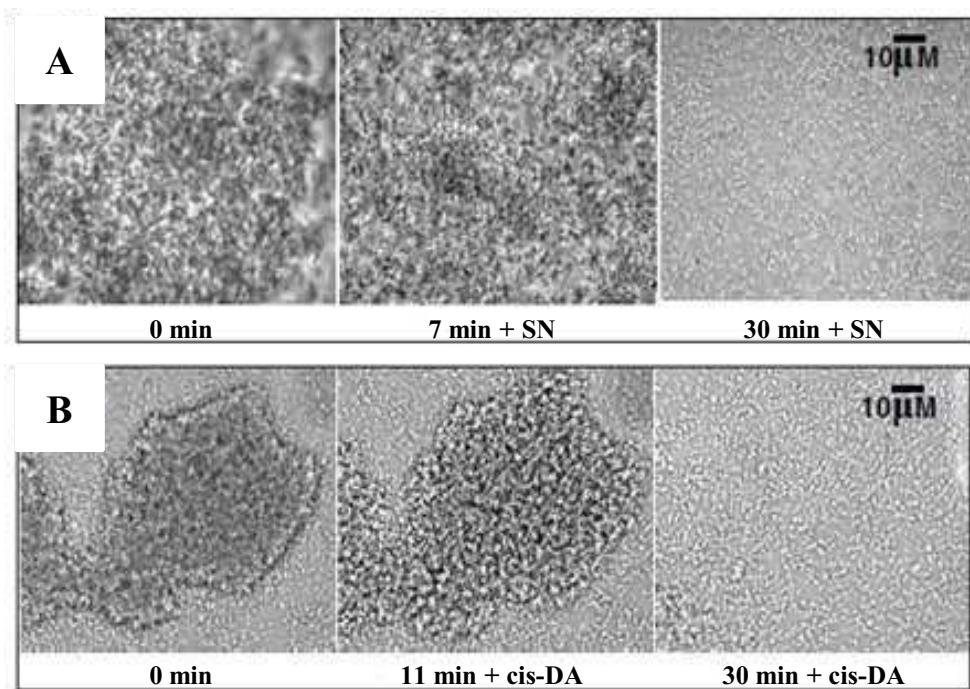


Figure 25 : Observations au microscope optique du phénomène de dispersion de biofilms matures formés par *P. aeruginosa* par l'ajout de surnageant de culture de *P. aeruginosa* et d'acide cis-2-decanoïque.

Biofilms de 6 jours formés dans un système expérimental en flux continu (flow-cell). A : l'addition de surnageant de culture (SN) de *P. aeruginosa* entraîne une désintégration du biofilm dès 7 minutes de traitement et une destruction totale après 30 minutes d'exposition. B : l'ajout d'acide cis-2-decanoïque synthétique (cis-DA) (10 μ M) entraîne une détérioration du biofilm après 11 minutes de traitement puis une dissolution totale après 30 minutes d'exposition. Davies & Marques, 2009.

d'Esp au niveau des cavités nasales de volontaires sains entraînait une diminution de colonisation par *S. aureus* de cette même muqueuse (Iwase *et al.*, 2010).

Induction de la dispersion : La dispersion, dernière étape dans le cycle d'un biofilm, résulte de la mort cellulaire, de l'induction de la mobilité cellulaire, de la production d'enzymes dégradant la matrice (comme vu précédemment) ou encore de la production de surfactants (Karatan & Watnick, 2009).

Plusieurs signaux diffusibles capables de déclencher la dispersion d'un biofilm chez différentes espèces bactériennes ont été décrits. L'implication de l'acide cis-2-decanoïque, messager produit par *P. aeruginosa*, a largement été documentée dans la dispersion de son propre biofilm mais également de ceux formés par diverses bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces naeslundii*, *L. casei* et *S. mutans*) (Davies & Marques, 2009; Marques *et al.*, 2015) (Figure 25). A travers la production de rhamnolipides, *P. aeruginosa* est également capable de médier le détachement de biofilms préformés par *Bordetella bronchiseptica*, *B. subtilis*, *S. aureus* et *Micrococcus luteus* (Irie *et al.*, 2005; Quinn *et al.*, 2013). Ces rhamnolipides sont également capables de disperser le propre biofilm de *P. aeruginosa* (Boles *et al.*, 2005). Récemment, il a été démontré que des rhamnolipides produits par *Burkholderia thailandensis* dispersaient des biofilms préformés par *B. subtilis* (De Rienzo & Martin, 2016).

Le monoxyde d'azote (NO), produit dans les couches profondes de biofilms en condition anaérobie, est un autre agent de dispersion décrit dans la littérature. En stimulant l'expression d'une phosphodiesterase qui dégrade le c-di-GMP intracellulaire, il permet le déclenchement *in fine* du mécanisme de dispersion de biofilms mono- et multi-espèces (Barraud *et al.*, 2009a, b).

De plus, les D-amino acides synthétisés par de nombreuses bactéries lors des phases de croissance tardive (phase stationnaire planctonique et biofilm) (Lam *et al.*, 2009) sont capables de disperser des biofilms bactériens (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010). Bien qu'il s'agisse probablement d'un processus d'auto-dispersion utilisé par *B. subtilis*, l'addition exogène de D-amino acides permet cependant de désintégrer des biofilms d'autres espèces bactériennes telles que *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2013).

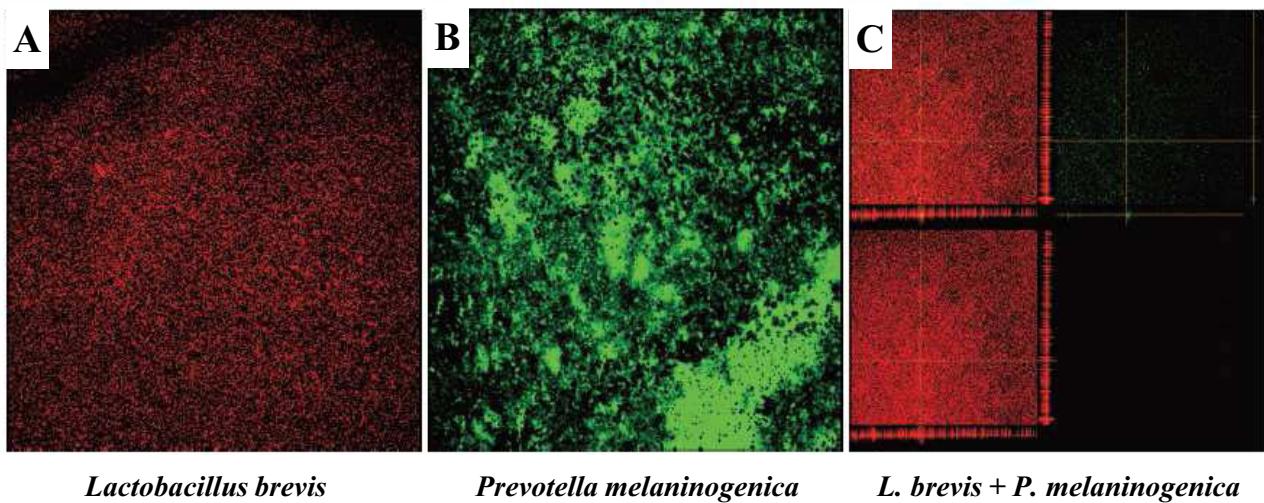


Figure 26 : Observations en microscopie confocale de biofilms formés par *Lactobacillus brevis* et *Prevotella melaninogenica*.

A et B : Biofilm mono-espèce. C : Biofilm mixte formé par les deux souches; en haut à gauche superposition des images de biofilm formé par *P. melaninogenica* (en haut à droite) et de biofilm formé par *L. brevis* (en bas à gauche). Les biofilms de 24h ont été marqués avec un kit (Live BacLightTM/Bacterial Gram Stain Kit) permettant de distinguer les bactéries à Gram-positif (en rouge - hexidium iodide) des bactéries à Gram-négatif (en vert - Syto9). D'après Vuotto *et al.*, 2014a.

3.2.3 Activité anti-biofilm des probiotiques

L'utilisation de probiotiques comme stratégie alternative pour le contrôle de la formation de biofilm a récemment émergé, en lien avec les difficultés d'éradication des biofilms par des stratégies thérapeutiques classiques et le regain d'intérêt pour les bactéries dites bénéfiques. Les mécanismes mis en jeu sont de plusieurs ordres : phénomènes de compétition, capacités de co-agrégation, production de molécules "anti-biofilm" ou modifications transcriptionnelles altérant *in fine* l'adhésion bactérienne initiale (grande majorité des études réalisées) et/ou favorisant la dispersion de biofilm. Comme toutes les autres caractéristiques des bactéries probiotiques, les activités anti-biofilm décrites à ce jour sont indépendantes de l'espèce mais souche spécifique (Vuotto *et al.*, 2014b).

- Phénomènes de compétition

Une étude récente a démontré que *L. paracasei* et *L. rhamnosus* pouvaient concurrencer *in vitro* le processus d'adhésion mais également provoquer la dispersion de biofilms formés par le pathogène *L. monocytogenes* (Woo & Ahn, 2013). De plus, les fortes capacités d'adhésion de *L. brevis* à des surfaces abiotiques lui permettent de dominer *Prevotella melaninogenica* au sein d'un biofilm mixte, conduisant à la disparition de ce dernier du biofilm (Vuotto *et al.*, 2014a) (Figure 26).

- Co-agrégation

Certains *Lactobacillus* sont capables d'interagir physiquement avec différentes bactéries à Gram-négatif ou Gram-positif incluant *E. coli*, *Streptococcus agalactiae*, *S. epidermidis*, *S. aureus* (Ekmeekci *et al.*, 2009; De Gregorio *et al.*, 2014; McGroarty & Reid, 1988), ce qui contribue vraisemblablement à la rétention et au rapprochement des espèces au sein des biofilms mixtes. Cette proximité permet aux probiotiques de créer un environnement hostile via la sécrétion de composés acides et antimicrobiens, ce qui entraîne une réduction de croissance ou de viabilité des pathogènes mais également une perturbation de l'intégrité et de l'architecture des biofilms (Comelli *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2011; Saunders *et al.*, 2007). Cette propriété de co-agrégation n'est pas limitée aux membres du genre *Lactobacillus*, puisque certaines souches de bifidobactéries (*B. adolescentis*) peuvent également exercer cet effet vis-à-vis de *Fusobacterium nucleatum*, pathogène opportuniste membre de la communauté bactérienne présent au niveau de la plaque dentaire (Nagaoka *et al.*, 2008).

- Production de biosurfactants

Bien que la nature chimique des biosurfactants produits par les bactéries bénéfiques soit rarement caractérisée, ils entraînent des modifications de surface conduisant à l'inhibition de la formation de biofilm. C'est le cas de celui produit par *S. thermophilus* qui provoque *in vitro* une réduction des taux de colonisation de matériel médical des pathogènes *Rothia dentocariosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. salivarius* (Rodrigues *et al.*, 2006). Une autre étude a démontré la capacité de biosurfactants sécrétés par *L. acidophilus* à inhiber le développement mais aussi à induire la dispersion de biofilm à *Staphylococcus* (Walencka *et al.*, 2008). Plus récemment, des molécules tensioactives à activité anti-biofilm (inhibant à la fois l'adhésion, la formation de biofilm et promouvant la dispersion de biofilms préformés) ont été identifiées chez *Lactobacillus jensenii* et *L. rhamnosus* ; elles sont capables d'exercer cette activité vis-à-vis de plusieurs pathogènes rencontrés en santé humaine : *A. baumannii*, *E. coli* et *S. aureus* (Sambanthamoorthy *et al.*, 2014). De plus, en lien avec la sécrétion de surfactant principalement composé de protéines, *L. acidophilus* est capable d'interférer avec l'adhésion et la formation de biofilm par plusieurs souches du pathogène opportuniste *Serratia marcescens* (Shokouhfard *et al.*, 2015).

Si les exopolysaccharides bactériens participent à la formation, à la cohésion et à la stabilisation de nombreux biofilms, ils peuvent également être impliqués dans des processus d'inhibition de leur formation. Tel est le cas d'un polysaccharide (non identifié) sécrété par *L. acidophilus* A4 vis-à-vis de biofilms à *E. coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* et *B. cereus* (Kim *et al.*, 2009). De manière similaire, des hétéropolymères composés de galactose, glucose, fructose et mannose purifiés à partir de surnageants de culture de *L. plantarum* et *L. helveticus*, sont capables *in vitro* d'inhiber l'adhésion de pathogènes appartenant aux genres *Escherichia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Salmonella* et *Pseudomonas* à des surfaces abiotiques, vraisemblablement en agissant en tant que biosurfactant (via le conditionnement des surfaces cellulaires microbiennes et des surfaces support) ou en régulant l'expression de gènes importants dans le développement d'un biofilm (Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015a).

- Modifications transcriptionnelles

Les effets anti-biofilm peuvent également être liés à des modifications d'expression de gènes codant des adhésines ou des enzymes impliquées dans la formation de biofilm. Kim *et al.* ont ainsi décrit un exopolysaccharide sécrété par *L. acidophilus* A4 capable de contrôler la formation de biofilm à *E. coli* 0157:H7 à travers l'inhibition de la production de curli par ce

pathogène (Kim *et al.*, 2009). De plus, les surnageants de culture de *L. rhamnosus* GR-1 et *L. reuteri* RC-14 altèrent la structure d'un biofilm à *Candida glabrata* en induisant une diminution d'expression des gènes *EPA6* et *YAK1*, codant respectivement une adhésine impliquée dans le développement de biofilm et son régulateur transcriptionnel (Chew *et al.*, 2015).

L'adhésion bactérienne de *S. mutans*, étape initiale dans la formation de biofilm à la surface des dents, implique des exopolysaccharides dont la synthèse nécessite l'intervention de différentes enzymes, glucosyltransférases et fructosyltransférases. Plusieurs auteurs ont démontré que la production de biosurfactants par des souches de *Lactobacillus* (*L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. acidophilus*) inhibe l'expression des gènes codant ces enzymes et limite donc la capacité de ces Streptocoques à former des biofilms (Salehi *et al.*, 2014; Savabi *et al.*, 2014; Tahmourespour *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015).

PARTIE

EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

Les difficultés rencontrées dans la prévention et l'élimination de biofilms microbiens par des stratégies anti-infectieuses conventionnelles ont encouragé le développement de nouvelles approches spécifiques, inspirées des interactions naturelles ayant lieu au sein de ces communautés. Dans cette optique, l'utilisation de bactéries bénéfiques pour lutter contre la formation de biofilms indésirables représente une stratégie thérapeutique innovante.

L'objectif général de ce travail de thèse avait pour but d'identifier des bactéries capables d'exercer des activités anti-biofilm ciblées contre des pathogènes opportunistes, notamment au sein du genre *Lactobacillus* représentant majeur des bactéries bénéfiques. La compréhension des mécanismes mis en jeu ainsi que le rôle de l'organisme hôte faisaient également partie de nos objectifs initiaux. Nous avons pour cela choisi comme cibles d'un effet anti-biofilm deux bactéries pathogènes opportunistes, *Klebsiella pneumoniae* (bacilles à Gram-négatif) et *Staphylococcus epidermidis* (coque à Gram-positif), responsables d'infections nosocomiales, et connues pour leur capacité à former des biofilms sur surfaces biotiques (peau, appareils respiratoire et urinaire) et abiotiques (dispositifs médicaux : sondes, cathéters, prothèses).

La première partie des travaux a consisté en l'identification d'une activité anti-biofilm à partir de surnageants de culture neutralisés de *Lactobacillus*. Au terme de cette première étape, une souche a été sélectionnée, *Lactobacillus plantarum* CIRM653, et c'est avec cette souche particulière que nous avons abordé la caractérisation des mécanismes mis en jeu via des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, en se focalisant sur le pathogène *K. pneumoniae*. Nous avons pour ceci utilisé différents modèles de formation de biofilm, en conditions statiques et dynamiques, sur surfaces abiotiques et biotiques, utilisant soit la bactérie *Lactobacillus* entière soit son surnageant de culture.

Peu de données sont disponibles concernant la nature chimique des métabolites produits et les mécanismes d'action anti-biofilm des lactobacilles, raison pour laquelle il nous a paru intéressant d'approfondir les mécanismes mis en jeu avec la souche *L. plantarum* CIRM653. Pour cela, nous avons choisi une approche moléculaire, en étudiant son influence sur l'expression de gènes de *K. pneumoniae* impliqués dans les processus d'adhésion et de colonisation.

Ces analyses *in vitro* ont été complétées par l'observation du comportement de ce *Lactobacillus* vis-à-vis de *K. pneumoniae* dans un modèle murin de colonisation intestinale car la colonisation du tube digestif par ce pathogène, un phénomène validé sur le plan expérimental et qui correspond à une réalité clinique, correspond vraisemblablement à son insertion au sein du microbiote sous forme de biofilm.

Enfin, dans une dernière étape, et parce que les interactions entre une bactérie bénéfique et un pathogène peuvent être modulées par l'organisme hôte, nous avons initié l'étude de la réponse de l'hôte et plus particulièrement la réponse cytokinique de cellules épithéliales intestinales et pulmonaires au contact de *L. plantarum* et *K. pneumoniae*.

Si au terme de ces travaux, nous n'avons pas répondu complètement aux questions initiales, à savoir quel est le mécanisme anti-biofilm de *Lactobacillus*, l'ensemble des données présentées contribue au développement d'une approche conceptuelle originale qui prend en compte les interactions microbiennes.

Publication

Two-sided effect of anti-biofilm activity of a *Lactobacillus* strain

Rosyne Lagrafeuille, Sylvie Miquel, Damien Balestrino, Marjolaine Vareille-Delarbre, Florian Chain, Philippe Langella et Christiane Forestier

Soumission en cours.

Two-sided effect of anti-biofilm activity of a *Lactobacillus* strain

Rosyne Lagrafeuille¹, Sylvie Miquel¹, Damien Balestrino¹, Marjolaine Vareille-Delarbre², Florian Chain³, Philippe Langella³, and Christiane Forestier¹

¹Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), UMR CNRS 6023, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France.

²Laboratoire d'immunologie, Equipe ECREIN « microEnvironnement CellulaiRE, Immunomodulation et Nutrition », UMR 1019 INRA, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France.

³Commensal and Probiotics-Host Interactions Laboratory, UMR 1319 Micalis, INRA, 78352 Jouy-en-Josas, France - AgroParisTech, UMR 1319 Micalis, 78352 Jouy-en-Josas, France.

Correspondence: Christiane Forestier, Laboratoire Microorganismes: Génome Environnement, UMR CNRS 6023, Université d'Auvergne, Clermont Ferrand, F-63001, France

E-mail: christiane.forestier@udamail.fr

Phone : +33 4 73 17 79 94

Fax : +33 4 73 17 83 70

Keywords: *Lactobacilli*, anti-biofilm, *K. pneumoniae*, intestinal colonization

Short title: *Lactobacillus*-mediated biofilm inhibition

Abstract

Biofilms confer advantages to microorganisms including a great ability to resist exogenous stress. Conventional strategies to prevent or remove biofilms are poorly effective and this field needs new approaches. In this study, the anti-biofilm activity of 140 neutralized *Lactobacillus* supernatants was assessed against *Klebsiella pneumoniae*. Among the 31 strains whose supernatant significantly impaired biofilm formation, *Lactobacillus plantarum* CIRM653 was selected because it was also able to impair *K. pneumoniae* preformed biofilm, independently of a bactericidal effect. Mixed biofilms had reduced tridimensional structures associated with a significant decrease in *K. pneumoniae* biomass. Incubation in *L. plantarum* CIRM653 supernatant induced transcriptional modifications of *K. pneumoniae* biofilm-related genes, including down-regulation of the quorum sensing-related *lsr* operons and over-expression of type 3 pili structure genes. Increased production of type 3 pili was validated by Western-blot, hemagglutination and adhesion assays. Since biofilm characteristics can be applied to microbiota, *L. plantarum* CIRM653 activity against *K. pneumoniae* was assessed in a murine intestinal colonization model: a constant fecal pathogen burden was observed, as against a gradual decrease in the control group. *In vitro* *Lactobacillus* anti-biofilm activity leading to dispersal of highly adherent aggregates of *K. pneumoniae* could *in vivo* increase the pathogen's capacity to colonize its environment.

Introduction

Biofilms are multiple-species communities enclosed in a self-synthesized polymeric matrix, attached to biotic or abiotic surfaces (Donlan and Costerton, 2002). They are considered to be the prevalent lifestyle for microorganisms in nature, and sessile cells frequently express different phenotypes from their non-adherent counterparts, with a high capacity to colonize different abiotic (Abdallah *et al.*, 2014) and biotic surfaces (Macfarlane and Dillon, 2007; Vos, 2015). Biofilm formation is therefore a major problem in many fields, ranging from marine biocorrosion and biofouling (Dang and Lovell, 2016) to clinical settings (Lebeaux *et al.*, 2014; Miquel *et al.*, 2016). In addition, sessile bacteria have a high tolerance to exogenous stress, due to impaired penetration of active molecules, the multiplicity and heterogeneity of microorganisms that make up the biofilm (Mah and O'Toole, 2001) and the presence of dormant persister cells (Lewis, 2012; Conlon *et al.*, 2015).

Natural biofilms are composed of polymicrobial communities in which members coexist and compete for limited space and nutrients (Rendueles and Ghigo, 2015). Better knowledge of these interactions would help develop a new and specific approach to eradicate biofilm, defined as “a natural or induced process, leading to reduction of bacterial biomass through the alteration of biofilm formation, integrity and/or quality” (Miquel *et al.*, 2016). Different bacterial strategies capable of influencing the dynamics of microbial communities have been implemented, such as the production of molecules impairing initial bacterial adhesion (Rendueles *et al.*, 2011) or the promotion of bacterial dispersion (Jiang *et al.*, 2011). The mechanisms of competition within biofilms have been mainly investigated with pathogenic bacteria but some recent studies have looked at interactions involving beneficial bacteria. For instance, different *Lactobacillus* strains, which have generally recognized as safe (GRAS) status, exert anti-biofilm activity against pathogens (Walencka *et al.*, 2008; Sikorska and Smoragiewicz, 2013; Alexandre *et al.*, 2014; Vuotto *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; James *et al.*, 2016; Matsubara *et al.*, 2016). Their anti-biofilm strategies have been linked to the production of bactericidal molecules, inhibition of pathogen initial adhesion by competitive exclusion and/or displacement from its binding sites against a wide range of Gram-positive and -negative bacteria (Prince *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Abedi *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2015). Such effects are mostly attributed to the release of components by *Lactobacilli*, mainly surfactants, able to impair the adhesion of pathogens (Li *et al.*, 2014; Sambanthamoorthy *et al.*, 2014; Shokouhfard *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015) and/or to

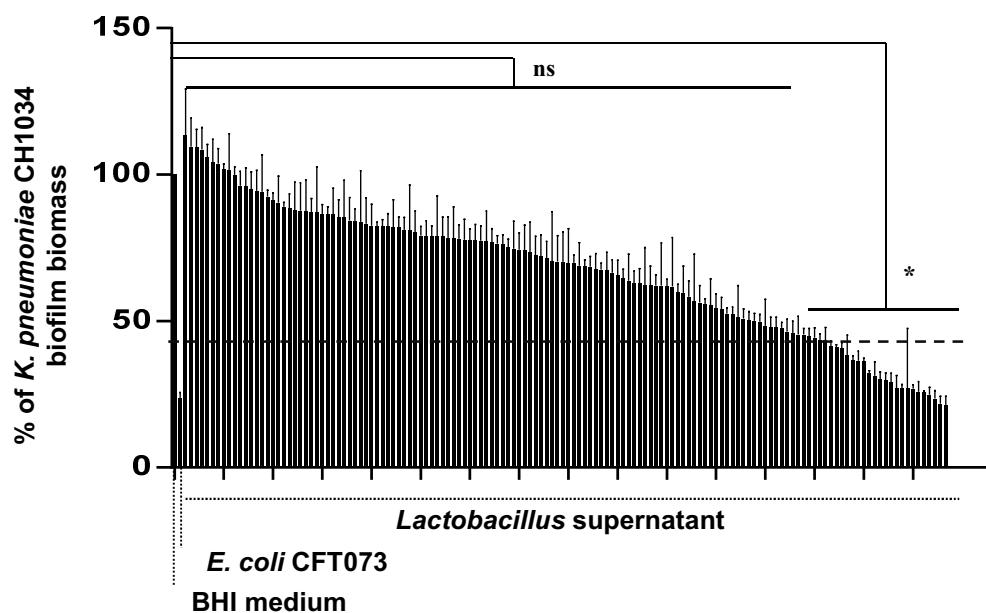


Figure 27 : Classification of *Lactobacilli* supernatants according to their anti-biofilm activity against *K. pneumoniae* CH1034.

Results are expressed as a percentage of biofilm biomass, \pm standard error of the mean (SEM) ($n=3$), after culture in *Lactobacillus* supernatants compared to BHI medium (100%); ns: no significant difference; * $P < 0.05$.

Table 4 : *K. pneumoniae* CH1034 growth rates in BHI medium (control condition) and in *Lactobacilli* supernatant (Sn).

μ_{max} corresponds to the maximum specific growth rate (h^{-1}), \pm standard error of the mean (SEM) ($n=3$).

	μ_{max}	SEM	P
BHI medium	3.172	+/-0.107	-
<i>L. zeae</i> CIRM524 Sn	2.653	+/-0.031	0.0035
<i>L. delbrueckii</i> CIRM267 Sn	3.256	+/-0.285	0.9246
<i>L. delbrueckii</i> CIRM268 Sn	3.124	+/-0.109	0.8070
<i>L. plantarum</i> CIRM653 Sn	3.091	+/-0.169	0.7426

disturb pathogen biofilm development at a transcriptional level (Chew *et al.*, 2015). However, these results are all strain-, species- and origin-specific. Owing to their diversity, the modulation of the microbial ecology of biofilms by *Lactobacillus* strains is therefore likely to represent a major source of innovative strategies.

In the present study, we looked for *Lactobacillus* strains with anti-biofilm activity by analyzing the capacity of a large panel of strains (140 strains, 44 different species) to inhibit, independently of any growth impairment, biofilm formation by *K. pneumoniae*. This ubiquist enterobacteria forms large biofilms and is also able to colonize the human intestinal tract as an opportunistic pathogen (Selden *et al.*, 1971). Of the few selected strains, *L. plantarum* CIRM653 had significant anti-biofilm activity by the mean of its culture supernatant or in mixed biofilms. Its ability to prevent the pathogen biofilm formation and to remove preformed biofilm was assessed by *in vitro* and *in vivo* intestinal colonization models.

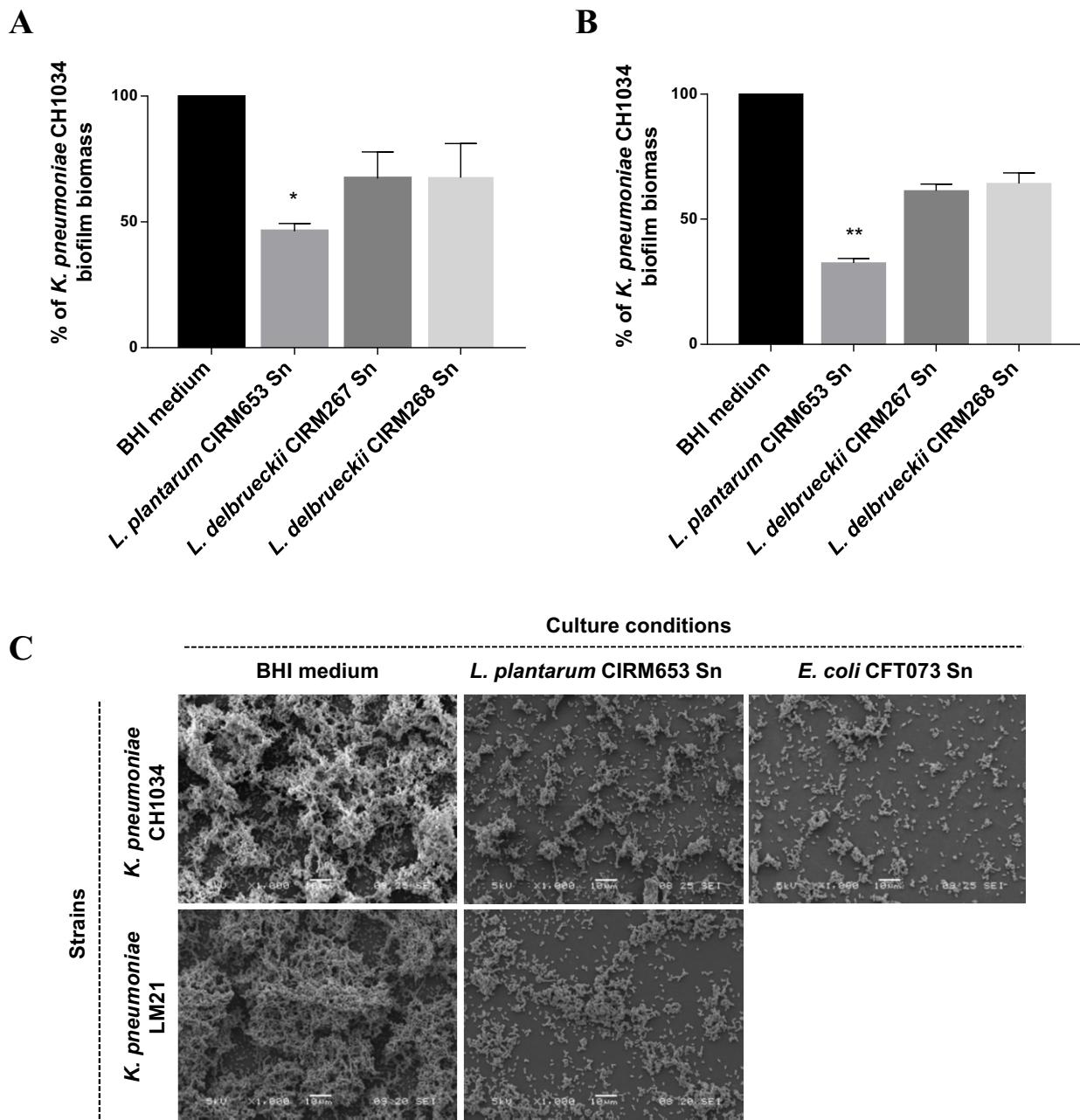


Figure 28 : Reduction in *K. pneumoniae* biofilm biomass after treatment with *Lactobacillus* cell-free supernatant.

A : Co-incubation experiment. *K. pneumoniae* CH1034 biofilm was formed in *Lactobacillus* supernatants for 4h in 24-well plates before CFU enumeration of biofilm biomass; * $P < 0.05$. B : Post-incubation experiment. *K. pneumoniae* CH1034 biofilm was formed for 2h in BHI medium in 24-well plates. *Lactobacillus* supernatants were then added for 4h before CFU enumeration of biofilm biomass. The results are expressed as percentage of biofilm biomass, \pm SEM (n=3), compared to BHI medium (100%); ** $P < 0.01$. C : Scanning electron microscopic images of monospecies biofilm of *K. pneumoniae* CH1034 and *K. pneumoniae* LM21 formed on Thermanox® slides for 4h at 37°C in BHI medium, *L. plantarum* CIRM653 supernatant or *E. coli* CFT073 supernatant. Starting from an inoculum of 10^7 UFC/mL. Supernatant: Sn

Results

Screening of *Lactobacilli* strains for anti-biofilm activity

A collection of 140 *Lactobacillus* strains represented by 44 different species of various origins (alimentary, human, animal) was assessed for anti-biofilm activity against the pathogen *K. pneumoniae* CH1034. To avoid selection of non-specific acid-related effects neutralized culture supernatants of all *Lactobacillus* stationary phase cultures were initially tested. Only nine supernatants of *Lactobacillus* strains increased the biofilm biomass of *K. pneumoniae* CH1034 (Figure 27). In contrast, most decreased the biofilm biomass of the pathogen, irrespective of the species. A threshold of significant biofilm inhibition was determined by statistical analysis (Kruskal-Wallis Dunn's post hoc test) and was set at 52% for *K. pneumoniae* CH1034 ($P < 0.05$). Thirty-one supernatants significantly decreased the bacterial biomass of the pathogen. A similar screening performed with another biofilm-related pathogen showed that 13 of the supernatants also impaired biofilm formation by *S. epidermidis* ATCC35984 (Figure S1 and Table S1). The four common *Lactobacillus* strains whose supernatants had the highest anti-biofilm activity against *K. pneumoniae* CH1034 ($P < 0.001$) were selected for further investigation: *Lactobacillus zae* CIRM524, *Lactobacillus delbrueckii* CIRM268, *Lactobacillus delbrueckii* CIRM267 and *Lactobacillus plantarum* CIRM653.

To distinguish any anti-biofilm property from potential effects of growth impairment, planktonic *K. pneumoniae* CH1034 growth rate was determined in the presence of neutralized supernatant extracts of the four selected *Lactobacillus* strains. As shown in Table 4, only one of the four tested supernatants (from *L. zae* CIRM524) impaired growth of *K. pneumoniae* CH1034. The anti-biofilm activity of the three other strains (*L. plantarum* CIRM653; *L. delbrueckii* CIRM267, *L. delbrueckii* CIRM268) was then assessed by measuring the effect of their supernatant on the viability of the *K. pneumoniae* CH1034 sessile cells. As detected by CFU determination, the number of *K. pneumoniae* CH1034 cells within biofilm was lower when formed in the presence of each of the three supernatants compared to the biomass obtained without any *Lactobacillus* supernatant, but only in a significant manner in the presence of *L. plantarum* CIRM653 supernatant (53.8% decrease ($P = 0.0186$)) (Figure 28A). The addition of each of the *Lactobacillus* supernatants to 2h-old *K. pneumoniae* CH1034

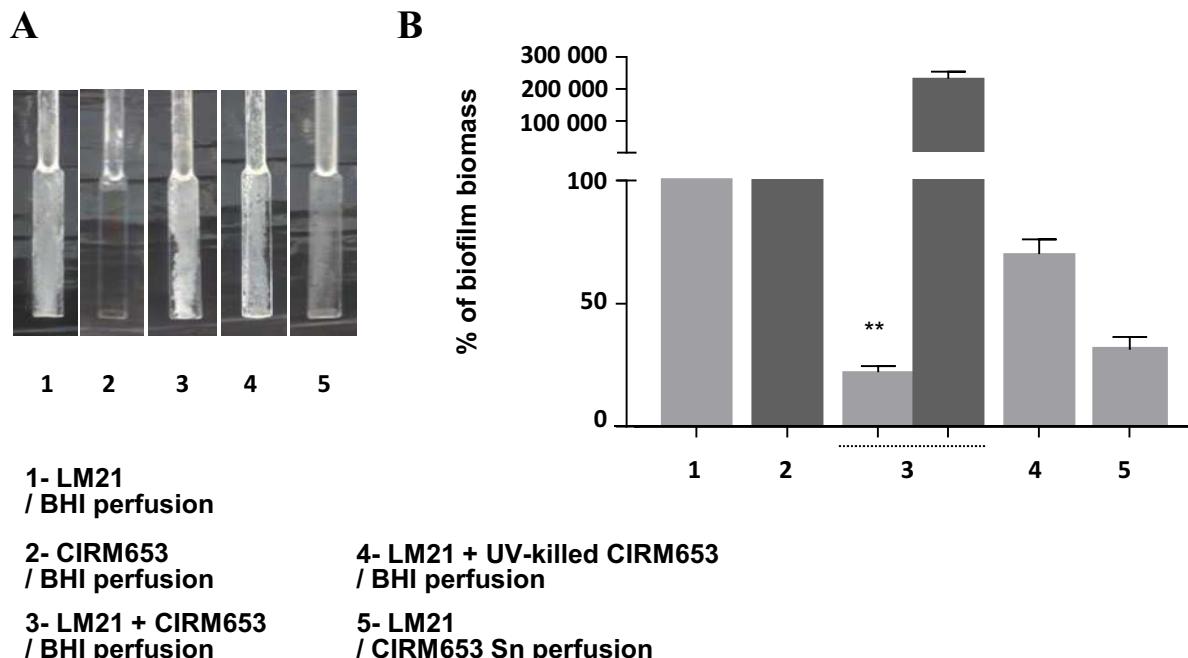


Figure 29 : *L. plantarum* CIRM653 anti-biofilm activity against *K. pneumoniae* in continuous flow conditions.

A : Macroscopic observations of 24h-old biofilm on microfermentor spatulas inoculated 10 min with 1.5×10^8 CFU of *K. pneumoniae* LM21 and/or *L. plantarum* CIRM653 (viable or UV-killed), perfused with BHI medium or *L. plantarum* CIRM653 supernatant (Sn). B : CFU enumeration of biofilm biomass of *K. pneumoniae* LM21 (light bars) and of *L. plantarum* CIRM653 (dark bars). The results are expressed as a percentage of biofilm biomass, \pm SEM ($n=3$), compared to BHI medium (100%); ** $P < 0.01$. C : Confocal observations of mixed biofilms under flow conditions after 8h of incubation. Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae* LM21) were labeled by green fluorescent SYTO® 9 stain and Gram-positive bacteria (*L. plantarum* CIRM653) were labeled by red fluorescent hexidium iodide stain.

biofilm reduced the biofilm biomass of the pathogen, although only statistically significantly with *L. plantarum* CIRM653 supernatant (67.4% decrease, $P = 0.006$) (Figure 28B).

The supernatant extract of *L. plantarum* CIRM653 was also able to strongly inhibit biofilm formation by other Gram-positive and Gram-negative bacteria, with the exception of *Pseudomonas aeruginosa* species and some *E. coli* strains (Figure S2).

SEM observations of biofilms formed in the presence of *L. plantarum* CIRM653 supernatant were made with *K. pneumoniae* CH1034 and the well characterized biofilm forming *K. pneumoniae* LM21. Representative pictures showed fewer bacteria and smaller microcolonies attached to the surface, in contrast to the dense aggregates observed with the controls (Figure 28C).

Anti-biofilm activity of *Lactobacillus plantarum* CIRM653 in mixed biofilm

The anti-biofilm effect of *L. plantarum* CIRM653 was further investigated by mixed biofilm experiments with the reference strain *K. pneumoniae* LM21. To avoid the accumulation of acid metabolites, the assays were performed in the microfermentor continuous flow experimental device and after 24h all spatulas inoculated with *K. pneumoniae* LM21 had a thick biofilm, except those incubated in the presence of *L. plantarum* CIRM653 supernatant or with viable *L. plantarum* CIRM653 (Figure 29A). CFU determination indicated a significant decrease in the number of *K. pneumoniae* LM21 cells in mixed biofilm formed with *L. plantarum* CIRM653 (7.1×10^7 CFU/mL) compared to the control, i.e. *K. pneumoniae* LM21 monospecies biofilm (3.8×10^8 CFU/mL) (77.8% decrease ($P = 0.0036$)) (Figure 29B). Parallel counts of *L. plantarum* CIRM653 cells showed a 2-log increase within mixed biofilm compared to *L. plantarum* CIRM653 monospecies biofilm (Figure 29B). No such effect was observed with UV-killed *L. plantarum* CIRM653 (Figure 29B). Microscopic observation of the output stream of an 8h-old *K. pneumoniae* LM21 biofilm challenged with *L. plantarum* CIRM653 showed the release of micro-aggregates, whereas in unchallenged *K. pneumoniae* biofilm individual cells were mainly observed (Figure S3).

Confocal microscopy observation of 8h-old *L. plantarum* CIRM653 - *K. pneumoniae* LM21 mixed biofilm showed that the pathogen *K. pneumoniae* LM21 was mostly present in the bottom layers of the biofilm whereas *L. plantarum* CIRM653 was embedded in the outer layers (Figure 29C). In addition, mixed biofilm had reduced tridimensional structures unlike the *Klebsiella* monospecies biofilm, which had typical mushroom-like structures (Figure 29C).

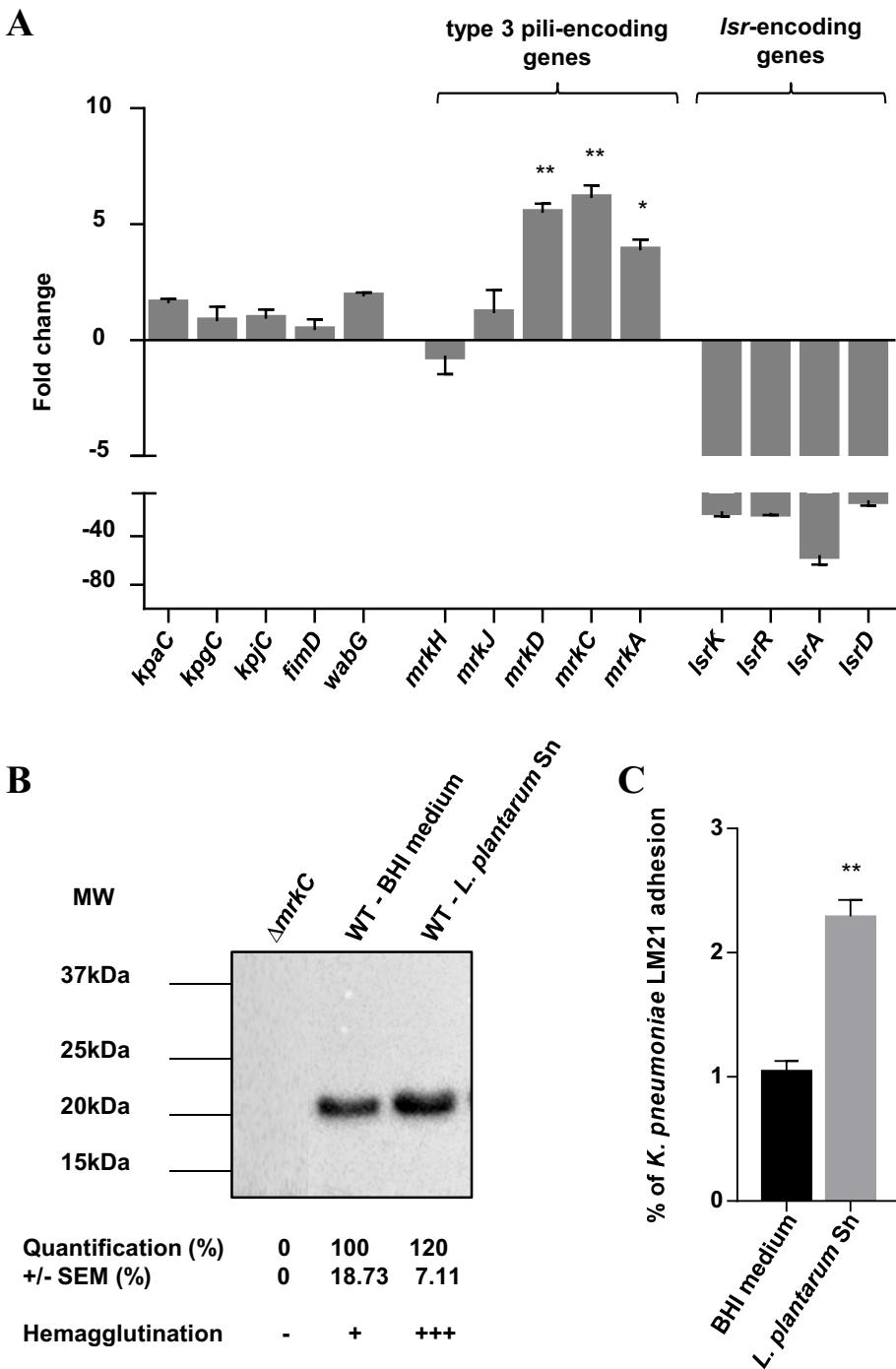


Figure 30 : Transcriptional and functional impact of *L. plantarum* CIRM653 supernatant on *K. pneumoniae*.

A : Transcriptional results are expressed as fold-change, \pm SEM (n=3), of biofilm-related gene expression of *K. pneumoniae* LM21 cultured 8h in *L. plantarum* CIRM653 supernatant compared to BHI medium; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. B : Representative Western blot of the major subunit of type 3 pili (MrkA) in *K. pneumoniae* LM21 total cell extracts conditioned 8h in BHI medium (control condition) or in *L. plantarum* CIRM653 supernatant (Sn). MW, molecular weight size marker. Protein band quantification is expressed as a percentage, \pm SEM (n=3), compared to BHI medium (100%). Hemagglutination capacities of *K. pneumoniae* LM21 with sheep tannic acid-treated red blood cells. C : Adhesion properties of *K. pneumoniae* LM21, conditioned 8h in BHI medium or in *L. plantarum* CIRM653 supernatant (Sn) in 24-well plates (inoculum 1×10^5 CFU/mL), after 30 min of incubation in saline at 37°C (inoculum 1×10^8 CFU/mL). Results are expressed as percentages of bacterial adhesion, \pm SEM (n=6); ** $P < 0.01$

Molecular analysis of biofilm-related *K. pneumoniae* functions in presence of *L. plantarum* CIRM653

Impairment of *K. pneumoniae* LM21 biofilm formation by *L. plantarum* CIRM653 was further investigated by looking at the expression of *K. pneumoniae* LM21 biofilm-related genes. Of the 14 genes tested, 7 were differentially expressed between *K. pneumoniae* LM21 biofilm formed in the presence of *L. plantarum* CIRM653 supernatant and *K. pneumoniae* LM21 biofilm formed without *L. plantarum* CIRM653 supernatant (Figure 30A). Among these genes, *lsrA*, part of the ABC transporter complex encoding genes involved in autoinducer 2 (AI-2) import, was strongly down-regulated ($|fold-change| > 55$). Likewise, other genes encompassed in the *lsr* operons (*lsrK*, *lsrR* and *lsrD*) were also down-modulated. In addition, the type 3 pili encoding structure genes (*mrkD*, *mrkA* and *mrkC*) were significantly over-expressed in presence of the *Lactobacillus* CIRM653 supernatant ($|fold-change| = 5.49 ; 3.86 ; 6.14$ and P value = 0.0028 ; 0.0210 ; 0.0017, respectively). In contrast, the expression of the type 3 pili transcriptional regulator genes cluster (*mrkH* and *mrkJ*) was not modified (Figure 30A). Measurement of the expression of these genes in mixed *K. pneumoniae* LM21 - *L. plantarum* CIRM653 biofilm showed similar variations, although not statistically significant (Figure S4).

Western blot analysis performed with whole cell extracts and MrkA specific antibody showed that the major subunit of type 3 pili was expressed 20% more in *K. pneumoniae* LM21 cultured in the presence of *L. plantarum* CIRM653 supernatant than in the control (Figure 30B). Measurements of the type 3 pili specific hemagglutination properties of *K. pneumoniae* LM21 cells grown in the presence of *L. plantarum* CIRM653 supernatant showed higher functional capacities of type 3 pili than in the control (Figure 30B). The primary adhesion capacity of *K. pneumoniae* LM21 on abiotic surfaces after being conditioned by *L. plantarum* CIRM653 supernatant was also significantly increased ($P = 0.0022$) (Figure 30C).

Influence of *L. plantarum* CIRM653 on intestinal colonization by *K. pneumoniae* in a murine model

The number of viable *K. pneumoniae* LM21 cells in the control animal feces (without *Lactobacillus* administration) was determined over 6 days and showed a strong colonization rate at day 1 post-infection (6.6×10^8 CFU per gram of feces) followed by a gradual and significant decrease in *K. pneumoniae* LM21 burden ($P = 0.0349$ at day 6 post-infection). In

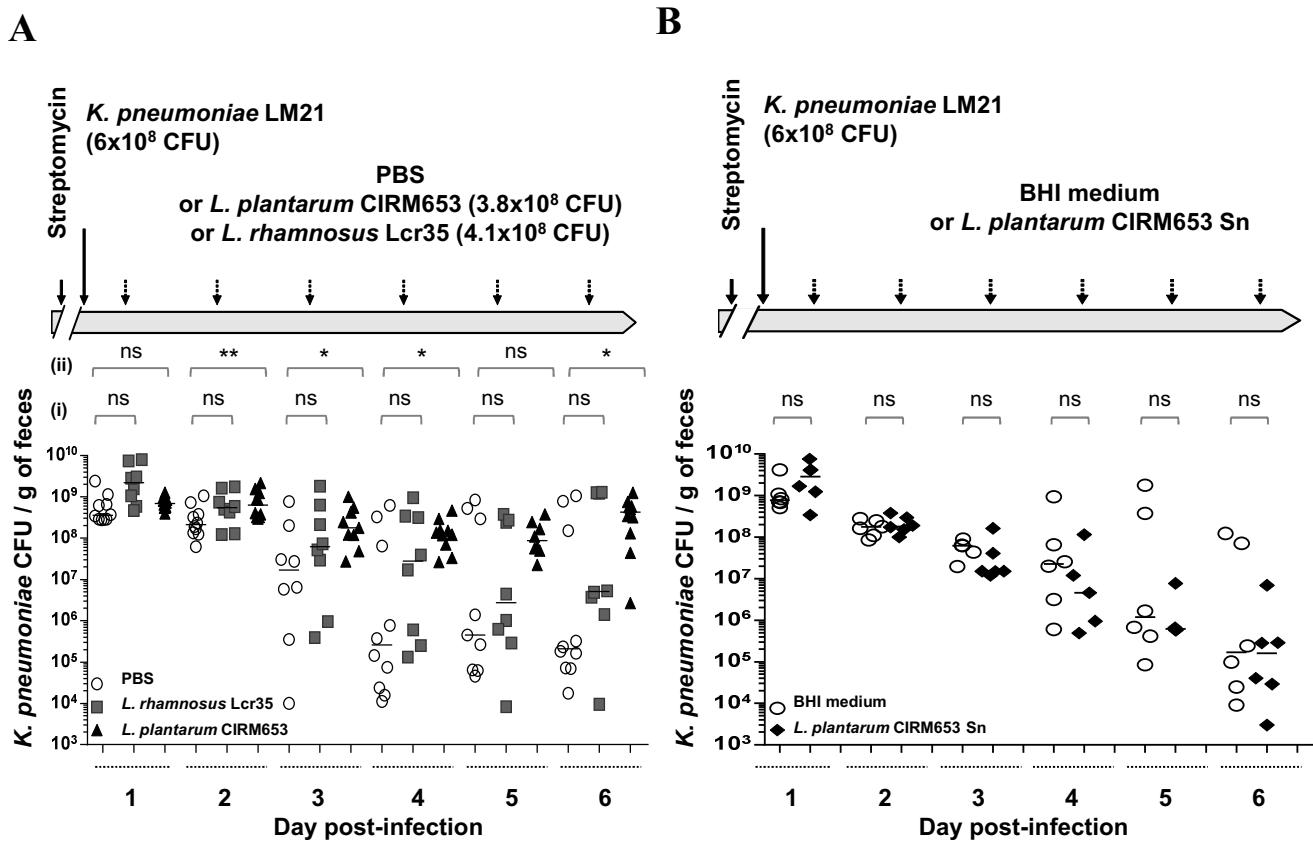


Figure 31 : Intestinal colonization by *K. pneumoniae* of mice challenged with *Lactobacillus* strains.

After 48h of streptomycin treatment (5 g/L in drinking water), mice were intragastrically inoculated with *K. pneumoniae* LM21 and then challenged with either (A) *L. plantarum* CIRM653 (black triangles) or *L. rhamnosus* Lcr35 strain (gray squares) or PBS (control, empty circles) and with (B) *L. plantarum* CIRM653 supernatant (Sn) (black diamonds) or BHI (control, empty circles). Results are expressed as *K. pneumoniae* LM21 CFU per gram of feces of mice (symbols and median bars) over 6 days; (i), *L. rhamnosus* Lcr35 group compared to control, (ii), *L. plantarum* CIRM653 group compared to control; ns: no significant difference; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

contrast, daily administration of *L. plantarum* CIRM653 after initial administration of *K. pneumoniae* LM21 was associated with a significant persistence of *K. pneumoniae* LM21 in the gut of mice from day 2 post-infection ($P = 0.0095$) to day 6 post-infection ($P = 0.0288$) (Figure 31A). However, when *L. plantarum* CIRM653 supernatant was orally given instead of live *L. plantarum* CIRM653, the number of *K. pneumoniae* LM21 cells in feces was unchanged compared to the number observed in the control group challenged with *K. pneumoniae* LM21 alone (Figure 31B). Similar experiments were performed with *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35, a *Lactobacillus* strain that did not show significant anti-biofilm activity against *K. pneumoniae* in the initial screening (Table S1), and the number of pathogens detected in the mice feces over 6 days was unchanged compared to that observed when the pathogen was given alone (Figure 31A). Finally, the number of colonic mucosa-associated *K. pneumoniae* LM21 was higher when mice were challenged with *L. plantarum* CIRM653 (2.15×10^6 CFU per gram of colon) than in the control (8.7×10^5 CFU per gram of colon).

Discussion

Probiotic bacteria, such as *Lactobacilli*, have beneficial effects on the maintenance of human health. Several complementary mechanisms have been proposed to explain their protective effects against infections, including antimicrobial activity (Wohlgemuth *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2015), positive effects on epithelial barrier function (Fang *et al.*, 2010) and immunomodulatory properties (Kechaou *et al.*, 2013). In addition, the use of probiotics as an alternative strategy for controlling biofilm formation by pathogens has recently emerged, owing to the widespread ability of pathogens to form biofilm and their intrinsic resistance to anti-infectious agents. In this study, we performed an anti-biofilm screening using a wide range of cell-free supernatants from 140 lactic acid bacteria strains against *K. pneumoniae* and *S. epidermidis*, two widespread bacterial species that could be of interest for health professionals and those in the environmental and food industry sectors. Twenty-two and 25 percent of the tested supernatants showed anti-biofilm activity against *K. pneumoniae* and *S. epidermidis*, respectively (Figures 27 and S1). To our knowledge, only a few studies involving such a large number of beneficial strains have been performed. Alexandre *et al.* tested the capacity of 67 *Lactobacilli* strains isolated from the oral cavities of healthy volunteers and showed that only 5 of them significantly reduced the formation of biofilm by *P. aeruginosa* (Alexandre *et al.*, 2014). Strains tested in the present work were of various origins (alimentary, human, animal) and this broad range could explain such differences in the strains' capacity to inhibit biofilm formation. In addition, the anti-biofilm activity was independent of the *Lactobacillus* species but strain-specific, a feature quite usual in probiotics as previously reported in *in vitro* studies and clinical trials (see (Vuotto *et al.*, 2014) for a recent review).

The anti-biofilm activity observed in our study could not be attributed to non-specific acid-related bactericidal effects, since we used neutralized culture supernatants. Closer investigation of the anti-biofilm activity against *K. pneumoniae* of the three most effective *Lactobacillus* strains showed that they were able to both prevent biofilm formation and remove preformed biofilm, with the extract from *L. plantarum* CIRM653 having the greatest effect (Figures 28A and B). It is tempting to speculate, therefore, that some components actively secreted by *Lactobacillus* are involved in the anti-biofilm phenomena, a hypothesis supported by the fact that UV-killed bacteria did not show any effect (Figure 29B). Studies have shown that exopolysaccharides produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus*

plantarum inhibit formation of biofilms by pathogens (Kim *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Although our study was not specifically designed to determine the mechanisms of action, we were able to show that treatment of the *L. plantarum* CIRM653 supernatant with sodium metaperiodate did not alter its anti-biofilm activity (data not shown), which suggests that molecules other than polysaccharides were involved. Very few of the so-far identified anti-biofilm exopolysaccharides are able to disrupt established biofilms in addition to exerting an anti-adhesion effect (Jiang *et al.*, 2011; James *et al.*, 2016). The phenotype observed with *L. plantarum* CIRM653 resembles that previously reported with surfactants of microbial origin that have both anti-adhesive and biofilm disruption abilities against a wide variety of pathogens (Walencka *et al.*, 2008; Dusane *et al.*, 2010; Banat *et al.*, 2014; Sambanthamoorthy *et al.*, 2014). Biosurfactants act as important molecules for interfacial processes, conditioning the microbial cell surface, interfaces and surfaces with which the microorganisms interact and are therefore able to prevent them from forming organized networks and to manipulate the structure and composition of the microbial biofilms, which they inhabit. In parallel, kinetic experimental models allowed us to use whole bacteria without the impediment of their acidic secreted metabolites, which are eliminated or at least partially diluted in the medium. When challenged with *L. plantarum* CIRM653, the *Klebsiella* biofilm appeared to be infiltrated with *Lactobacilli* and had a poorly developed architecture, compared with the control (Figure 29C). Similar observations were made with different *Lactobacillus* species (*L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. iners* and *L. paracasei*) that displaced and induced changes in structure and viability of biofilms formed by urogenital or food-borne pathogens (Saunders *et al.*, 2007; McMillan *et al.*, 2011; Woo and Ahn, 2013).

Competition for limited sites and resources within mixed biofilms could also be part of the strategy used by probiotics, notably the so-called “exploitative competition”, which refers to indirect interactions between organisms by which one organism prevents access to and/or limits the use of resources by another organism (Rendueles and Ghigo, 2015). Since in microfermentor experiments the presence of *K. pneumoniae* strongly enhanced the biomass of *L. plantarum* CIRM653 biofilm compared to a *Lactobacillus* monospecies biofilm (Figure 29B), we hypothesize that *L. plantarum* CIRM653 takes advantage of the metabolism of *K. pneumoniae* and then invades the surface. Such a growth advantage of probiotics in mixed biofilms with pathogens has been observed with *L. rhamnosus* when co-cultured with *Listeria monocytogenes* (Woo and Ahn, 2013), suggesting that probiotic strains can be used as an alternative way to effectively reduce biofilm formation by pathogenic bacteria.

Interferences with processes related to microbial adhesion are unlikely to be operative on mature biofilms. Alteration of the *K. pneumoniae* biofilm biomass after exposure to *L. plantarum* CIRM653, either via cell-free supernatant or by cell-cell contact, could be partly due to modulation of the gene expression involved in biofilm development and maintenance. An *in vitro* study of *L. plantarum* 299v and *L. rhamnosus* GG showed that these surfactant-producing probiotics can inhibit the adhesion of *E. coli* to intestinal epithelial cells by stimulating epithelial expression of mucins (Rodrigues *et al.*, 2006). These observations suggest that *Lactobacillus* supernatants contain signaling factors that interact with the host and/or bacterial cells. This was demonstrated by Valdéz *et al.*, who assessed the ability of the probiotic organism *L. plantarum* to inhibit the pathogenic activity of *P. aeruginosa* and observed that probiotic whole cultures and culture filtrates were able to inhibit *P. aeruginosa* elastase and biofilm *in vitro* by affecting the production of quorum sensing signal molecules (Valdéz *et al.*, 2005). More recently, it was demonstrated that *Lactobacilli* inhibit adherence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* by production of an effector molecule released into the medium that is able to inhibit the expression of the adhesin-encoding gene *sabA* (Klerk *et al.*, 2016). To determine if the anti-biofilm activity of *L. plantarum* CIRM653 was due to jamming of the genes involved in *K. pneumoniae* biofilm development, we investigated the influence of *L. plantarum* CIRM653 on the expression of *K. pneumoniae* biofilm-related genes. Interestingly, *lsr* quorum sensing-related operons were strongly down-regulated when *K. pneumoniae* was forming biofilm in the presence of *L. plantarum* CIRM653 supernatant whereas type 3 fimbriae encoding genes were over-expressed (Figure 30A). Recently, transcriptional profile analysis of *K. pneumoniae* in different modes of life carried out by Guilhen *et al.* showed that biofilm dispersed cells have a strong down-modulation of the *lsr* genes and a high up-regulation of type 3 fimbriae genes (Guilhen *et al.*, 2016). All these data suggest that *L. plantarum* CIRM653 supernatant induces transcriptional modifications in *K. pneumoniae*, leading to inhibition of biofilm formation and dispersal of aggregates with high colonization capacities. This hypothesis was reinforced by the significantly increased primary adhesion capacity of *K. pneumoniae* on abiotic surfaces after conditioning by *L. plantarum* CIRM653 supernatant (Figure 30C).

The anti-biofilm activities of *L. plantarum* CIRM653 were all observed with *in vitro* experimental devices on various abiotic substrates. Since biofilm characteristics can be applied to microbiota (Vos, 2015), we assessed if *L. plantarum* CIRM653 anti-biofilm activity also takes place *in vivo* with a murine *K. pneumoniae* intestinal colonization model.

The initial step in the pathophysiological process of hospital-acquired *K. pneumoniae* infection is the creation of a reservoir within the gut, followed by dissemination towards other organs (Selden *et al.*, 1971). Daily administration of *L. plantarum* CIRM653 after colonization of the intestine by *K. pneumoniae* achieved a constant bacterial burden of the pathogen in the feces of mice compared to the control group (Figure 31A). Such an effect was not observed when the *L. plantarum* CIRM653 supernatant was administered, suggesting that intact live bacteria are required in the gastro-intestinal tract to maintain colonization. In addition, this phenomenon is likely correlated with anti-biofilm activity since daily administration of the *L. rhamnosus* Lcr35 strain, which does not have significant anti-biofilm activity, did not modify the colonization kinetic rate of *K. pneumoniae*. *In vitro*, the non-biocidal anti-biofilm activity of *L. plantarum* CIRM653 led to the dispersal of biofilm cells with high adherence ability. This property could selectively destabilize intestinal microbiota *in vivo* and increase *K. pneumoniae* dispersal to other parts of the gut. However, this potential harmful effect has to be balanced with the fact that biofilm-dispersed cells are generally more susceptible to immune system exposure and anti-infectious agents (Venketaraman *et al.*, 2008; Reffuveille *et al.*, 2014). Inducing dispersal is a tempting approach to eradicate pathogens but, as previously noted (Lebeaux *et al.*, 2014), it should be used in association with anti-bacterial strategies to obtain synergic effects.

In conclusion, the present study identified an anti-biofilm activity of the *L. plantarum* CIRM653 strain, independently of any bactericidal effect, against an opportunistic pathogen, *K. pneumoniae*. Destabilization of the organization and architecture of pathogen biofilm is probably due to the production of exometabolites, which still remain to be characterized, but also involves modification of the expression of pathogen genes, which leads ultimately to the release of highly adherent aggregates of pathogens. Altogether, these observations show the importance of having a more accurate assessment of the action of probiotics and the benefit-risk ratio of their use.

Experimental procedures

Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this study are listed in Tables S1 and S2. *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* were grown overnight aerobically and *Lactobacillus* strains were grown for 24h anaerobically in brain-heart infusion (BHI) medium (Becton, Dickinson, USA) at 37°C. For transcriptional analysis, BHI medium was supplemented with KH₂PO₄ (4.96 g/L) and K₂HPO₄ (11.7 g/L) to avoid accumulation of acid metabolic products. *Klebsiella* and *Lactobacillus* cell counting was performed by plating bacteria onto Drigalski (BioRad, Hercules, USA) or LB (Becton, Dickinson, USA) and MRS-nalidixic acid (8 µg/mL) (Becton, Dickinson, USA) agar media, respectively.

Cell free supernatants from *Lactobacillus* and *E. coli* CFT073 strains were obtained by centrifuging spent cultures for 10 min at 8,000 g at 4°C. The pH of the supernatants was then adjusted to 6.8 by addition of NaOH 1M and the resulting solution was filtered at 0.2-µm before 4°C storage.

When screening for the anti-biofilm activity of *Lactobacillus* supernatants, 10⁶ CFU of the pathogen were incubated in 96-well flat-bottomed microplates with pure supernatant instead of BHI at 37°C for 4h. Supernatant of the uropathogenic strain *E. coli* CFT073 was used as a positive anti-biofilm control (Valle *et al.*, 2006).

Biofilm-related assays

Biofilms were formed in BHI medium with either static devices (6, 24 or 96-well plates, Falcon, Corning Incorporated - Life Sciences, Durham, USA) or flow culture devices: Ibidi channel chambers (biovalley, Marne-la-Vallée, France) or a microfermentor system containing a removable glass spatula (Ghigo, 2001) with a continuous flow of 1 mL/h and 1 mL/min of medium, respectively. Biofilm biomass was measured by **(i) crystal violet staining**. Non-adherent bacteria were removed, the biofilm was washed once with saline, and biofilm biomass was stained by adding 0.5% (w/v) crystal violet solution for 10 min. The plates were rinsed under tap water and air-dried. The crystal violet was resuspended in ethanol, and the OD₅₇₀ was determined. **(ii) Colony Forming Unit (CFU) enumeration**. After removal of non-adherent bacteria, the biofilm was washed with saline, suspended in 1 mL of saline and disrupted by scratching (biofilm formed in 24-well plates) or suspended in 10 mL of saline by three vortex and 5 min-long cycles of sonication (biofilm formed in

microfermentor). Resulting biofilm suspensions were serial diluted and plated onto selective agar media to determine the number of CFU. Non-adhering cells in the biofilm output stream in the microfermentor were also harvested and observed by optical microscopy.

RNA manipulations, real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from whole well content from 8h-old biomass formed in 6-well plates (with an inoculum of 1×10^5 CFU/mL) with Trizol reagent (Invitrogen), according to the method described by Toledo-Arana *et al.* (Toledo-Arana *et al.*, 2009) after lysis of the bacteria in the Precellys tissue homogenizer (Bertin Technologie). Reverse transcription was performed with the iScript cDNA synthesis kit (Biorad) using 500 ng of RNA in the T100 Thermal Cycler (Biorad). Quantification of cDNA levels was done with the SsoAdvanced Universal SYBR Green supermix (Biorad) on a C1000 Thermal Cycler-CFX96 (Biorad) with specific primers (Table S3). The gene expression levels were normalized relative to the *cpxR* housekeeping gene.

Type 3 fimbriae analysis

(i) **Western blot:** Whole well content from 8h-old biomass formed in 24-well plates (with an inoculum of 1×10^5 CFU/mL) was harvested and centrifuged for 1 min at 8,000 g. Pellet cells were suspended in 40 mM Tris-buffer, pH 8.0, boiled 10 min and then centrifuged for 1 min at 8,000 g to pellet unbroken cells. Supernatants were treated by protease inhibitors (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Protein quantification was performed with Bradford protein assay (Biorad) reagent according to the manufacturer's recommendations. Samples containing 1.8 µg of total protein were then analyzed by Western blotting according to the manual instructions of the TGX stain-free FastCast kit (Biorad) and with an anti-MrkA polyclonal antibody. Quantifications were performed with Image Lab software (Biorad).

(ii) **Sheep red blood cell hemagglutination:** Sheep erythrocytes (Labor Dr.Merk, Ochsenhausen, Germany) were stabilized by formaldehyde treatment according to the method of Hirata and Brandriss (Hirata and Brandriss, 1968). Stabilized red blood cells (SRBC, 5%) were then treated with 1/5000 tannic acid solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Hemagglutination assay was performed on white porcelain tile using 10 µL of whole well content from 8h-old biomass (24-well plate) and 10 µL of tanned SRBC and was observed visually for 5 minutes with continuous shaking.

Scanning Electron Microscopic Observation

Biofilms were formed in duplicate on Thermanox® slides (Nalgène) incubated in 24-well plates for 4h, with an inoculum of 1×10^7 CFU/mL. Coverslips were then treated as previously described by Goncalves *et al.* (Goncalves *et al.*, 2014).

Confocal observation of biofilms formed in laminar flow chamber

Laminar flow chamber assays were performed on disposable flow chambers composed of one flow channel (μ -slide I 0.8, surface area = 2.5 cm²). Bacteria were allowed to adhere for 1h without flow (inoculum 1×10^7 CFU/mL). At 1h post-infection, a continuous flow of BHI medium was applied for 7h at a constant flow rate of 1 mL/h with an IVAC P6000 Alaris pump (Alaris Medical, Saint Germain en Laye, France). After 8h, the μ -slide was washed once with saline and the biofilm biomass was fluorescently labeled with the LIVE BacLight Bacterial Gram Stain Kit (Life Technologies-Invitrogen, Monza, Italy) according to the manufacturer's recommendations. Observation and image acquisition were performed with a Leica SP5 confocal microscope and a x40 glycerol immersion objective lens. Three-dimensional biofilm structures were generated with IMARIS software.

Murine intestinal colonization

Intestinal *K. pneumoniae* colonization were performed with 6-week-old male OF1 mice (Charles River Swiss) (Favre-Bonté *et al.*, 1999), after approval by the ethics committee of Auvergne (Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne, C2EA-02), in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Directive 86/609/EEC). After 48h of streptomycin treatment (5 g/L in drinking water), the mice were intragastrically inoculated with 200 μ L of live *K. pneumoniae* suspension (3.0×10^9 CFU/mL). After 1 day and subsequently every day for 5 days they were intragastrically fed with *L. plantarum* CIRM653 (1.9×10^9 CFU/mL), *L. rhamnosus* Lcr35 (2.07×10^9 CFU/mL), *L. plantarum* CIRM653 supernatant, PBS or BHI (controls) in a total volume of 200 μ L. Feces were collected daily, homogenized in 1 mL of saline, and serial dilutions were plated onto selective media (streptomycin (50 mg/L)-spectinomycin (50 mg/L)-containing LB plates) to measure the total number of *K. pneumoniae* CFUs per gram of feces. For analysis of the bacterial mucosal burden, the mice were euthanized by cervical dislocation on day 6 and their colons homogenized in 1 mL of saline before plating.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad software (GraphPad Sofware, La Jolla, CA, USA). For analysis of the significance of differences, the non-parametric test Kruskal-wallis followed by a Dunn's Multiple Comparison test were used. Growth rates were analyzed by Student *t* test. Primary adhesion capacities were analyzed by the Mann Whitney test. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Acknowledgements

R. Lagrafeuille was supported by a fellowship from Région Auvergne. We thank S. Bonneau for his technical help. We are grateful to S. Clegg for generously giving the anti-MrkA polyclonal antibody and to the Biosse and BioFilm Control companies for kindly providing *Lactobacillus* strains. We are also grateful to the Centre Imagerie Cellulaire Santé (CICS) and the Imagerie Confocale de Clermont-Ferrand (ICCF) platform.

Conflict of interest

Authors declare they have no conflict of interest

References

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N.-E. (2014) Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* **196**: 453–472.
- Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V., and Jafarian-Dehkordi, A. (2013) *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Res. Pharm. Sci.* **8**: 260–268.
- Alexandre, Y., Le Berre, R., Barbier, G., and Le Blay, G. (2014) Screening of *Lactobacillus* spp. for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *BMC Microbiol.* **14**: 107.
- Banat, I.M., Rienzo, M.A.D.D., and Quinn, G.A. (2014) Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 9915–9929.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453–1462.
- Castro, J., Henriques, A., Machado, A., Henriques, M., Jefferson, K.K., and Cerca, N. (2013) Reciprocal interference between *Lactobacillus* spp. and *Gardnerella vaginalis* on initial adherence to epithelial cells. *Int. J. Med. Sci.* **10**: 1193–1198.
- Chew, S.Y., Cheah, Y.K., Seow, H.F., Sandai, D., and Than, L.T.L. (2015) *In vitro* modulation of probiotic bacteria on the biofilm of *Candida glabrata*. *Anaerobe* **34**: 132–138.
- Conlon, B.P., Rowe, S.E., and Lewis, K. (2015) Persister cells in biofilm associated infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* **831**: 1–9.
- Dang, H. and Lovell, C.R. (2016) Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**: 91–138.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 167–193.
- Dusane, D.H., Nancharaiah, Y.V., Zinjarde, S.S., and Venugopalan, V.P. (2010) Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **81**: 242–248.
- Fang, H.-W., Fang, S.-B., Chiang Chiau, J.-S., Yeung, C.-Y., Chan, W.-T., Jiang, C.-B., et al. (2010) Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* on *Salmonella* lipopolysaccharide-induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Microbiol.* **59**: 573–579.
- Favre-Bonté, S., Forestier, C., and Joly, B. (1998) Inhibitory effect of roxithromycin on adhesion of *Klebsiella pneumoniae* strains 3051, CF504 and LM21. *J. Antimicrob. Chemother.* **41 Suppl B**: 51–55.

Favre-Bonté, S., Licht, T.R., Forestier, C., and Krogfelt, K.A. (1999) *Klebsiella pneumoniae* Capsule Expression Is Necessary for Colonization of Large Intestines of Streptomycin-Treated Mice. *Infect. Immun.* **67**: 6152–6156.

Ghigo, J.-M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**: 442–445.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., et al. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849–852.

Goncalves, M.D.S., Delattre, C., Balestrino, D., Charbonnel, N., Elboutachfaiti, R., Wadouachi, A., et al. (2014) Anti-biofilm activity: a function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *PLoS ONE* **9**: e99995.

Guilhen, C., Charbonnel, N., Parisot, N., Gueguen, N., Iltis, A., Forestier, C., and Balestrino, D. (2016) Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* **17**:

Hirata, A.A. and Brandriss, M.W. (1968) Passive Hemagglutination Procedures for Protein and Polysaccharide Antigens Using Erythrocytes Stabilized by Aldehydes. *J. Immunol.* **100**: 641–646.

Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., et al. (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J. Bacteriol.* **191**: 347–354.

James, K.M., MacDonald, K.W., Chanyi, R.M., Cadieux, P.A., and Burton, J.P. (2016) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and modulation of gene expression by probiotic cells and supernatant. *J. Med. Microbiol.* **65**: 328–336.

Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., and Yu, W. (2011) Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from Marine Bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One* **6**:

Kechaou, N., Chain, F., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bertho, N., Chevalier, C., et al. (2013) Identification of one novel candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strain active against influenza virus infection in mice by a large-scale screening. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 1491–1499.

Khater, F., Balestrino, D., Charbonnel, N., Dufayard, J.F., Brisse, S., and Forestier, C. (2015) *In silico* analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS ONE* **10**: e0116215.

Kim, Y., Oh, S., and Kim, S.H. (2009) Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**: 324–329.

Klerk, N. de, Maudsdotter, L., Gebreegziabher, H., Saroj, S.D., Eriksson, B., Eriksson, O.S., et al. (2016) Lactobacilli Reduce *Helicobacter pylori* Attachment to Host Gastric Epithelial Cells by Inhibiting Adhesion Gene Expression. *Infect. Immun.* **84**: 1526–1535.

Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014) Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **78**: 510–543.

Lewis, K. (2012) Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handb. Exp. Pharmacol.* 121–133.

Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., et al. (2014) Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. *LWT - Food Sci. Technol.* **59**: 732–739.

Lin, X., Chen, X., Chen, Y., Jiang, W., and Chen, H. (2015) The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis.* **21**: e128–e134.

Macfarlane, S. and Dillon, J. f. (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 1187–1196.

Mah, T.F. and O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**: 34–39.

Matsubara, V.H., Wang, Y., Bandara, H.M.H.N., Mayer, M.P.A., and Samaranayake, L.P. (2016) Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–12.

McMillan, A., Dell, M., Zellar, M.P., Cribby, S., Martz, S., Hong, E., et al. (2011) Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **86**: 58–64.

Miquel, S., Lagraveille, R., Souweine, B., and Forestier, C. (2016) Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front. Microbiol.* **7**: 592.

Miquel, S., Peyretaillade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., et al. (2010) Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *E. coli* Strain LF82. *PLoS One* **5**:

Prince, T., McBain, A.J., and O'Neill, C.A. (2012) *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-Induced Cell Death by Competitive Exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5119–5126.

Reffuveille, F., Fuente-Núñez, C. de la, Mansour, S., and Hancock, R.E.W. (2014) A Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**: 5363–5371.

Rendueles, O. and Ghigo, J.-M. (2015) Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiol. Spectr.* **3**:

Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E., and Ghigo, J.-M. (2011) Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. *MBio* **2**: e00043–00011.

- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 609–618.
- Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S., and Paranaivana, C. (2014) Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol.* **14**: 197.
- Saunders, S., Bocking, A., Challis, J., and Reid, G. (2007) Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **55**: 138–142.
- Selden, R., Lee, S., Wang, W.L., Bennett, J.V., and Eickhoff, T.C. (1971) Nosocomial *klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. *Ann. Intern. Med.* **74**: 657–664.
- Shokouhfard, M., Kermanshahi, R.K., Shahandashti, R.V., Feizabadi, M.M., and Teimourian, S. (2015) The inhibitory effect of a *Lactobacillus acidophilus* derived biosurfactant on biofilm producer *Serratia marcescens*. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **18**: 1001–1007.
- Sikorska, H. and Smoragiewicz, W. (2013) Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **42**: 475–481.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959–964.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R. (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1677–1678.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., et al. (2009) The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**: 950–956.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., et al. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* **5**: e1000344.
- Valdéz, J.C., Peral, M.C., Rachid, M., Santana, M., and Perdigón, G. (2005) Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 472–479.
- Valle, J., Re, S.D., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., and Ghigo, J.-M. (2006) Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 12558–12563.
- Venketaraman, V., Lin, A.K., Le, A., Kachlany, S.C., Connell, N.D., and Kaplan, J.B. (2008) Both leukotoxin and poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide protect *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cells from macrophage killing. *Microb. Pathog.* **45**: 173–180.

- Vos, W.M. de (2015) Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *Npj Biofilms Microbiomes* **1**: 15005.
- Vuotto, C., Longo, F., and Donelli, G. (2014) Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int. J. Oral Sci.* **6**: 189–194.
- Walencka, E., Różalska, S., Sadowska, B., and Różalska, B. (2008) The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol. (Praha)* **53**: 61–66.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z. (2015) Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *Int. J. Biol. Macromol.* **74**: 119–126.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., et al. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 17020–17024.
- Wohlgemuth, S., Loh, G., and Blaut, M. (2010) Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **300**: 3–10.
- Woo, J. and Ahn, J. (2013) Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **56**: 307–313.
- Wu, C.-C., Lin, C.-T., Wu, C.-Y., Peng, W.-S., Lee, M.-J., and Tsai, Y.-C. (2015) Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol. Oral Microbiol.* **30**: 16–26.
- Zhang, Y.-C., Zhang, L.-W., Ma, W., Yi, H.-X., Yang, X., Du, M., et al. (2012) Screening of probiotic lactobacilli for inhibition of *Shigella sonnei* and the macromolecules involved in inhibition. *Anaerobe* **18**: 498–503.

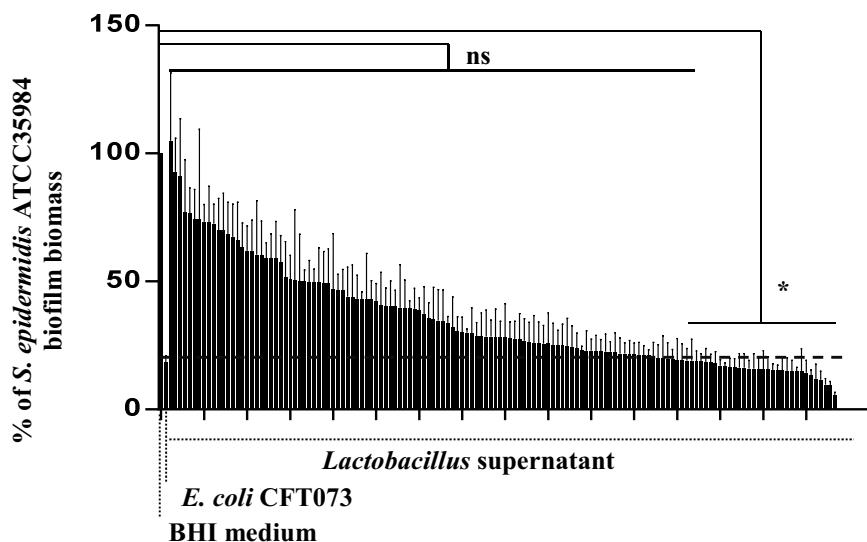


Figure S1 : Classification of *Lactobacilli* supernatants according to their anti-biofilm activity against *S. epidermidis* ATCC35984.

Results are expressed as a percentage of biofilm biomass, \pm standard error of the mean (SEM) ($n=3$), after culture in *Lactobacillus* supernatants compared to BHI medium (100%); ns: no significant difference; * $P < 0.05$.

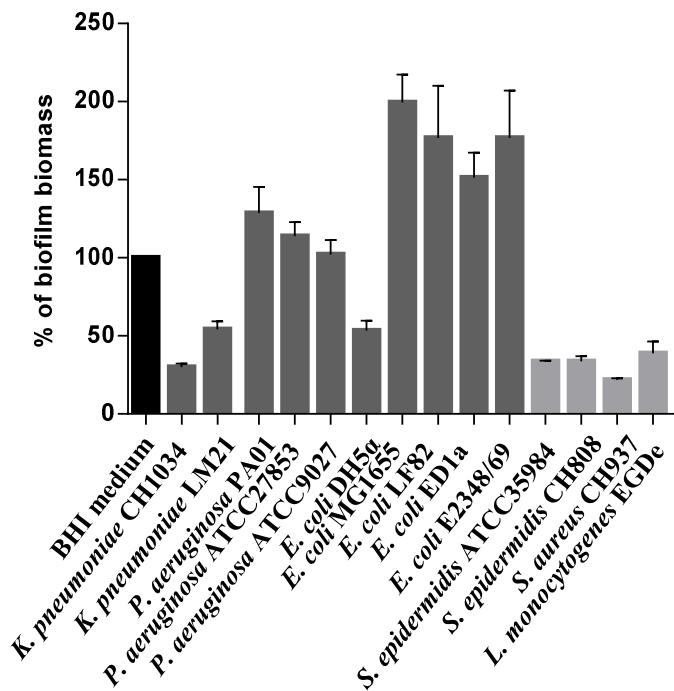


Figure S2 : Effect of *L. plantarum* CIRM653 cell-free supernatant on the capacity of several Gram-negative (dark bars) and Gram-positive (light bars) bacteria to form biofilm.

Results are expressed as a percentage of biofilm biomass, \pm (SEM) ($n=3$), after culture in *L. plantarum* CIRM653 supernatant compared to BHI medium (100%).

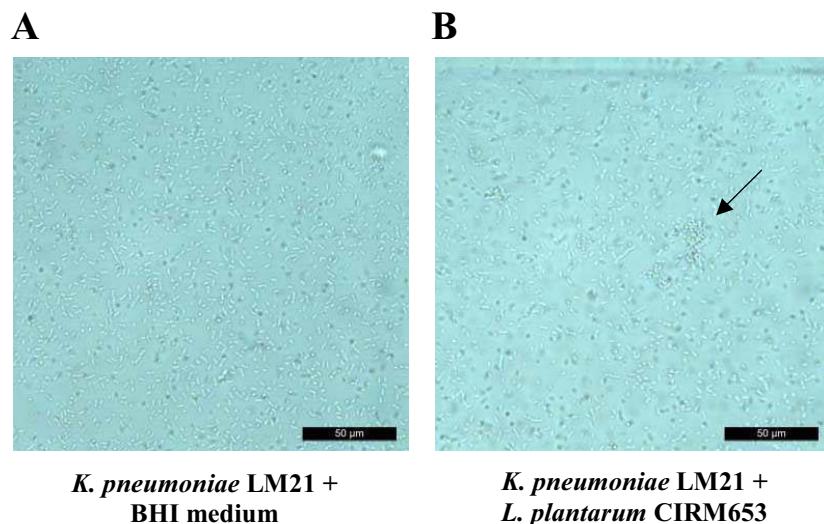


Figure S3 : Effect of *L. plantarum* CIRM653 on *K. pneumoniae* preformed biofilm.

8h-old *K. pneumoniae* LM21 biofilm formed in BHI medium on microfermentor spatulas inoculated 10 min with 1.5×10^8 CFU, challenged 10 min with (A) BHI medium or (B) 1.5×10^{10} CFU of *L. plantarum* CIRM653. Optical microscopic observations of the output stream 9h post-challenge.

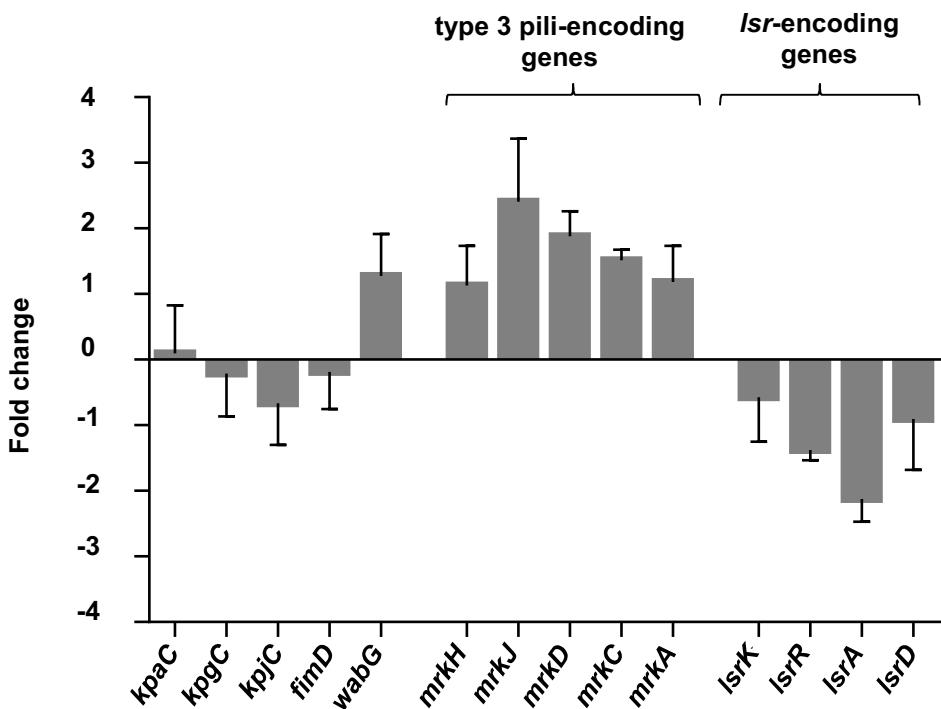


Figure S4 : Transcriptional analysis of *K. pneumoniae* biofilm-related genes.

Results are expressed as fold-change, \pm SEM (n=3), of biofilm-related genes expression of *K. pneumoniae* LM21 cultured 8h in *L. plantarum* CIRM653 compared to BHI medium.

Table S1 : Ranking position from the less effective to the most effective supernatant.
 Position numbers written in bold represent strains with significant anti-biofilm activity.

Organism	Strain	<i>K. pneumoniae</i> CH1034			<i>S. epidermidis</i> ATCC35984		
		Ranking position	biofilm biomass	SEM	Ranking position	biofilm biomass	SEM
<i>L. acidipiscis</i>	DSM 15836	53	77,69%	4,65%	101	21,03%	2,78%
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356	77	67,53%	2,80%	71	28,05%	16,28%
<i>L. acidophilus</i>	CH537	72	69,96%	3,26%	114	18,37%	3,97%
<i>L. acidophilus</i>	CH958	43	80,46%	8,78%	120	16,27%	6,73%
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 9224	4	108,62%	8,66%	79	25,73%	8,17%
<i>L. acidophilus</i>	DSM 20509	126	32,28%	0,88%	9	73,14%	17,14%
<i>L. agilis</i>	DSM 16634	62	74,39%	6,94%	69	28,30%	13,39%
<i>L. apodemi</i>	LBR01	38	82,45%	4,85%	97	21,50%	6,26%
<i>L. brevis</i>	ATCC 14869	28	86,50%	10,13%	26	50,87%	10,72%
<i>L. brevis</i>	DSM 6265	55	77,43%	6,28%	98	21,42%	5,57%
<i>L. brevisimilis</i>	DSM 20057	52	77,87%	8,56%	70	28,27%	7,53%
<i>L. buchneri</i>	DSMZ 20081	136	25,73%	0,56%	3	91,15%	27,45%
<i>L. bulgaricus</i>	LB340	123	36,51%	1,87%	115	17,94%	5,41%
<i>L. bulgaricus</i>	LB04	64	73,61%	11,78%	96	21,85%	4,92%
<i>L. bulgaricus</i>	ATCC 11842	3	109,27%	7,19%	134	14,35%	5,60%
<i>L. bulgaricus</i>	LB08	113	45,45%	7,25%	86	23,95%	6,74%
<i>L. bulgaricus</i>	LB13	66	72,16%	8,42%	89	22,94%	5,18%
<i>L. bulgaricus</i>	CH956	107	48,47%	10,99%	28	50,04%	22,48%
<i>L. casei</i>	LMG 9191 T	94	56,86%	19,57%	16	63,49%	11,45%
<i>L. casei</i>	5614	37	82,46%	2,60%	140	5,63%	1,20%
<i>L. casei</i>	shirota (yakult)	87	62,19%	4,22%	102	20,26%	6,81%
<i>L. casei</i>	CNRZ 1244	5	105,93%	5,04%	132	14,98%	1,69%
<i>L. casei</i>	CNRZ 1874	16	92,50%	2,57%	45	40,51%	15,14%
<i>L. casei</i>	BL23	112	45,95%	4,80%	116	17,09%	2,76%
<i>L. casei</i>	DN 114001	115	44,94%	3,09%	87	23,09%	1,83%
<i>L. casei</i> var <i>rhamnosus</i>	CH086	78	67,31%	7,60%	137	11,55%	4,17%

Publication

Résultats

<i>L. casei var rhamnosus</i>	CH960	82	63,85%	10,99%	34	49,16%	16,65%
<i>L. casei var rhamnosus</i>	CH495	110	47,64%	2,39%	20	60,23%	16,38%
<i>L. casei var rhamnosus</i>	CH526	97	55,39%	11,02%	35	47,09%	26,45%
<i>L. casei var rhamnosus</i>	CH528	92	59,75%	11,13%	85	24,36%	10,26%
<i>L. coryneformis</i>	DSM 20001	34	83,13%	10,89%	127	15,40%	2,99%
<i>L. coryneformis</i>	DSM 20004	42	80,89%	18,99%	66	28,65%	11,12%
<i>L. coryneformis</i>	ATCC 33820	8	101,90%	2,04%	59	33,81%	2,87%
<i>L. crispatus</i>	LCR07	1	113,44%	18,20%	14	67,46%	14,74%
<i>L. crispatus</i>	LS12	65	72,52%	7,36%	42	42,93%	20,84%
<i>L. crispatus</i>	BLL 2005	57	77,09%	5,50%	119	16,49%	4,07%
<i>L. curvatus</i>	CNRZ 1335	69	70,26%	10,28%	73	27,59%	7,93%
<i>L. curvatus</i>	CNRZ 1336	26	86,58%	3,80%	46	40,19%	8,37%
<i>L. curvatus</i>	CNRZ 1883	41	81,22%	4,81%	43	42,88%	8,65%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 208	131	27,17%	5,28%	36	46,61%	7,66%
<i>L. delbrueckii</i>	CIRM 1184	79	66,55%	5,04%	65	28,69%	6,06%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 448	44	79,15%	3,64%	44	42,31%	7,93%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 33	130	29,16%	3,48%	84	24,81%	12,40%
<i>L. delbrueckii</i>	CIRM 268	135	25,99%	4,04%	126	15,70%	5,61%
<i>L. delbrueckii</i>	CRL 1290	46	79,07%	3,92%	60	32,23%	13,45%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 396	89	61,96%	2,74%	13	68,50%	14,29%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 326	58	76,50%	3,05%	12	70,02%	16,64%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 333	61	74,70%	10,87%	17	61,94%	11,28%
<i>L. delbrueckii</i>	CIRM 267	127	31,37%	5,35%	138	9,66%	2,80%
<i>L. delbrueckii</i>	CRL 1333	36	82,47%	1,61%	10	72,56%	8,74%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 1055	9	101,54%	14,38%	33	49,33%	14,26%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 226	30	85,49%	14,59%	48	40,15%	7,41%
<i>L. delbrueckii</i>	CNRZ 449	50	78,30%	12,44%	4	76,88%	23,88%
<i>L. delbrueckii</i>	CH959	15	94,18%	15,36%	135	13,37%	2,47%
<i>L. delbrueckii indicus</i>	DSM 15996	40	82,04%	4,35%	68	28,40%	8,08%
<i>L. delbrueckii indicus</i>	DSM 14421	21	87,82%	11,84%	129	15,17%	6,49%
<i>L. diolivorans</i>	LF04	83	63,06%	4,66%	111	18,94%	4,44%
<i>L. fermentum</i>	CNRZ 64	59	76,34%	3,73%	117	16,95%	1,49%

<i>L. fermentum</i>	ME3	33	83,94%	20,02%	15,82%	4,90%
<i>L. fermentum</i>	CNRZ 209	22	87,71%	10,94%	9,49%	1,69%
<i>L. fuchuensis</i>	DSM 14340	14	94,44%	8,52%	60,40%	25,96%
<i>L. gasseri</i>	ATCC 33323	71	69,96%	14,16%	50,52%	33,79%
<i>L. gasseri</i>	LG11	84	62,91%	5,87%	15,31%	2,26%
<i>L. gasseri</i>	CNRZ 1943	10	99,88%	3,23%	43,19%	10,67%
<i>L. gasseri</i>	CNRZ 1944	2	109,54%	11,23%	59,06%	6,97%
<i>L. gasseri</i>	CRL 1252	19	89,05%	1,71%	25,63%	13,86%
<i>L. gasseri</i>	CRL 1311	29	85,55%	6,80%	11	14,18%
<i>L. gasseri</i>	DSM 20190	45	79,08%	6,30%	103	20,02%
<i>L. harbinensis</i>	DSM 16991	49	78,42%	8,94%	53	38,85%
<i>L. helotolerans</i>	CNRZ 240	63	74,16%	10,67%	56	35,36%
<i>L. helotolerans</i>	LH37	86	62,27%	7,58%	118	16,51%
<i>L. helveticus</i>	IL430	18	90,39%	10,65%	22	58,96%
<i>L. helveticus</i>	DSM 20571	140	21,42%	3,53%	7	74,24%
<i>L. helveticus</i>	DSM 15946	23	87,62%	12,89%	52	39,35%
<i>L. helveticus</i>	CNRZ 219	32	84,18%	4,76%	6	74,27%
<i>L. homohiochii</i>	CNRZ 1939	56	77,35%	11,78%	62	30,23%
<i>L. homohiochii</i>	CNRZ 1937	35	82,58%	8,44%	64	29,63%
<i>L. intestinalis</i>	CNRZ 1941	27	86,54%	2,85%	57	34,73%
<i>L. johnsonii</i>	CNRZ 218	109	47,81%	4,01%	95	21,86%
<i>L. johnsonii</i>	LCR11	98	54,40%	5,71%	83	24,90%
<i>L. johnsonii</i>	DSM 12361	52	77,87%	8,56%	91	22,63%
<i>L. johnsonii</i>	LL01	80	65,81%	5,79%	109	19,06%
<i>L. johnsonii</i>	LL10	81	64,69%	3,42%	37	46,45%
<i>L. kunkeei</i>	DSM 13345	134	26,89%	1,69%	1	104,91%
<i>L. lactis</i>	CNRZ 220	137	24,99%	3,06%	88	22,96%
<i>L. lactis</i>	DSM 15945	93	58,27%	6,71%	25	51,74%
<i>L. mucosae</i>	ATCC 3334 *	119	41,55%	1,96%	125	15,78%
<i>L. murinus</i>	CIRM 2243	17	91,32%	2,75%	51	39,41%
<i>L. murinus</i>	CIRM 1180	31	84,27%	9,11%	5	76,73%
<i>L. paracasei</i>	CNRZ 318	111	46,46%	4,93%	78	25,77%

Publication**Résultats**

<i>L. paracasei</i>	CNRZ 1328	122	45,95%	4,80%	27,37%	11,68%
<i>L. paracasei</i>	LPC41	75	68,57%	4,00%	22,64%	7,22%
<i>L. paracasei</i>	LPC42	118	43,42%	5,12%	19,04%	9,68%
<i>L. paracasei</i>	Lpc37	100	52,53%	2,30%	26,80%	9,95%
<i>L. paracasei ssp tolerans</i>	DSM 20258	39	82,14%	11,44%	22,51%	4,80%
<i>L. paralimentarius</i>	DSM 13238	60	75,26%	3,28%	21,34%	5,89%
<i>L. paraplanтарum</i>	CNRZ 1885	85	62,32%	15,73%	49,74%	10,37%
<i>L. pentosus</i>	LPP01	67	71,59%	6,40%	105	19,85%
<i>L. pentosus</i>	NCDO 363	73	68,88%	9,78%	67	28,50%
<i>L. pentosus</i>	CNRZ 1218	121	40,76%	2,27%	121	16,25%
<i>L. pentosus</i>	CNRZ 2268	47	79,06%	15,74%	47	40,18%
<i>L. plantarum</i>	ATCC BAA-793	99	54,16%	4,86%	8	73,30%
<i>L. plantarum</i>	ATCC 14917	125	36,30%	1,19%	23	58,95%
<i>L. plantarum</i>	DSM 20174	101	52,42%	2,89%	15	66,15%
<i>L. plantarum</i>	DSM 13273	124	36,45%	4,18%	29	50,04%
<i>L. plantarum</i>	CIRM 1997	24	87,25%	5,29%	31	49,72%
<i>L. plantarum</i>	CIRM 653	129	29,87%	2,80%	112	18,88%
<i>L. plantarum</i>	CIRM 2048	13	95,09%	6,73%	58	34,57%
<i>L. plantarum</i>	LP22	128	30,26%	2,87%	82	24,97%
<i>L. plantarum</i>	ATCC 14431	117	43,59%	2,37%	123	15,88%
<i>L. plantarum</i>	CNRZ 1571	95	56,35%	6,73%	130	15,07%
<i>L. plantarum</i>	CNRZ 73	20	88,53%	5,67%	54	37,35%
<i>L. plantarum</i>	DSM 16365	54	77,55%	6,80%	122	16,00%
<i>L. plantarum</i>	ATCC 23272	133	27,08%	25,06%	133	14,94%
<i>L. reuteri</i>	CH953	74	68,82%	2,63%	108	19,13%
<i>L. reuteri</i>	CIRM 251	12	96,01%	7,25%	61	30,39%
<i>L. rhamnosus</i>	Lcr35	116	44,37%	4,06%	18	61,89%
<i>L. rhamnosus</i>	CH962	120	41,17%	0,98%	2	92,82%
<i>L. rhamnosus</i>	DSMZ 20021	70	70,22%	12,45%	39	43,75%
<i>L. rhamnosus</i>	LRH04	114	45,45%	2,39%	94	22,42%
<i>L. rhamnosus</i>	CNRZ 317	108	47,88%	3,98%	107	19,31%
<i>L. rhamnosus GG</i>	ATCC53103	76	67,83%	6,36%	100	21,25%

Publication

Réultats

<i>L. sakei</i>	23k	91	59,79%	3,18%	63	29,96%	1,77%
<i>L. sakei</i>	LSK05	103	50,87%	3,77%	81	24,97%	10,14%
<i>L. sakei</i>	CNRZ 1332	7	103,83%	5,84%	24	57,42%	12,11%
<i>L. salivarius</i>	DSM 20492	25	87,23%	18,89%	72	27,64%	7,95%
<i>L. salivarius</i>	LS33	96	55,78%	2,25%	55	35,67%	7,01%
<i>L. salivarius</i>	CNRZ 228	68	70,45%	19,64%	50	39,57%	12,64%
<i>L. salivarius</i>	CNRZ 227	88	62,18%	16,80%	49	39,68%	19,51%
<i>L. salivarius</i>	LS11	11	96,13%	5,86%	76	26,13%	9,18%
<i>L. salivarius</i>	CNRZ 1858	6	104,26%	9,06%	32	49,62%	15,73%
<i>L. satsumensis</i>	DSM 16230	105	50,16%	3,10%	41	43,08%	3,52%
<i>L. vaccinostercus</i>	DSM 20605	48	78,89%	8,21%	92	22,62%	8,34%
<i>L. vaginalis</i>	LVG01	106	49,83%	2,88%	131	15,03%	4,74%
<i>L. viridescens</i>	DSM 20410	138	23,51%	3,36%	113	18,40%	6,64%
<i>L. xylosus (lactococcus lactis)</i>	DSM 20175	139	21,85%	3,00%	106	19,61%	4,69%
<i>L. zae</i>	CH957	102	51,50%	13,12%	77	25,85%	13,29%
<i>L. zae</i>	DSMZ 20011	90	61,81%	20,57%	38	44,01%	14,15%
<i>L. zae</i>	CNRZ 2269	132	27,17%	1,51%	136	11,91%	6,64%
<i>L. zae</i>	CNRZ 230	104	50,28%	3,48%	104	20,00%	10,18%

Table S2 : Bacterial strains used in this study

Strain	Source and/or reference
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
CH1034	Clinical isolate
LM21	(Favre-Bonté <i>et al.</i> 1998)
LM21 $\Delta mrkC$	(Khater <i>et al.</i> 2015)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
ATCC 35984	American Type Culture Collection
CH808	This work
<i>Staphylococcus aureus</i>	
CH937	This work
<i>Escherichia coli</i>	
CFT073	(Welch <i>et al.</i> 2002)
DH5 α	(Taylor <i>et al.</i> 1993)
MG1655	(Blattner <i>et al.</i> 1997)
LF82	(Miquel <i>et al.</i> 2010)
ED1a	(Touchon <i>et al.</i> 2009)
E2348/69	(Iguchi <i>et al.</i> 2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
PA01	(Stover <i>et al.</i> 2000)
ATCC 27853	American Type Culture Collection
ATCC 9027	American Type Culture Collection
<i>Listeria monocytogenes</i>	
EGDe	(Glaser <i>et al.</i> 2001)
<i>Lactobacillus</i>	
	see Table S1

Table S3 : Primers used in this study

Target gene	Primer's name	Function	Oligonucleotide sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
<i>kpaC</i>	Kpa_qPCR_Fw	Usher protein	GCTCCGACGATAAAGAAATATAAC	113
	Kpa_qPCR_Rv		CAGGTTGGTGTATTATCTTCC	
<i>kpgC</i>	Kpg_qPCR_Fw	Usher protein	GATGTCTGACGATGAAATGC	125
	Kpg_qPCR_Rv		CAAAGGTCTCGTAGATCACATAC	
<i>kpjC</i>	Kpc_qPCR_Fw	Usher protein	CTGATATCACGTTGTTGACG	121
	Kpc_qPCR_Rv		CGGGAATAAACTTCTCGATC	
<i>fimD</i>	fim_qPCR_Fw	Usher protein	GAAAAAACATGGGCTATTCG	115
	fim_qPCR_Rv		GGATTGTTATAGAGAAAACGC	
<i>mrkA</i>	RT-mrkA-Fw	Major type 3 fimbrial subunit	CTAACTGCCAGGCTGCTGAT	118
	RT-mrkA-Rv		CCTGTTGTTGCTGGTTGCG	
<i>mrkC</i>	RT-mrkC-Fw	Usher protein	GTCGATCTGTCGCGCTTTTC	95
	RT-mrkC-Rv		AAATCGTAGCGCCCTTCCA	
<i>mrkD</i>	RT-mrkD-Fw	Adhesin	AATGTCGATGTGGGTTCCAT	123
	RT-mrkD-Rv		GTTGGCATATCCCGTTTCAC	
<i>mrkH</i>	RT-mrkH-Fw	Transcriptional activator	CGCCATGAGCATGACTTTA	120
	RT-mrkH-Rv		TTTAAGATTGGCGTTTG	
<i>mrkJ</i>	RT-mrkJ-Fw	Phosphodiesterase	TTTCGAGGTAACCGAAAACG	122
	RT-mrkJ-Rv		TAGCGTTAATTCCCGCTAG	
<i>cpxR</i>	RT-cpxR-Fw	DNA-binding response regulator	AGTTGATGATGACCGGGAGC	201
	RT-cpxR-Rv		GGAGTCTGGTGTGTCTGACG	
<i>lsrA</i>	RT-lsrA-Fw	Transporter subunit	ATCCTTGATGAACCCACCGC	100
	RT-lsrA-Rv		TAAACACGATCCCCACGTCC	
<i>lsrR</i>	RT-lsrR-Fw	Transcriptional repressor	CGGTCGGCGACATTTAGGT	101
	RT-lsrR-Rv		TAGCTCATCAAGGGTCACGC	
<i>lsrD</i>	RT-lsrD-Fw	Transmembrane transporter	CTCGCGGGGCCAATATTAA	103
	RT-lsrD-Rv		TGCCGACCATCTGTAAACCC	
<i>lsrK</i>	RT-lsrK-Fw	Kinase	AGCTTCTTACCGGCCTGAC	104
	RT-lsrK-Rv		TCCAGCAGCGAATAGGCATC	
<i>wabG</i>	RT-wabG-Fw	Glycosyltransferase	GTAAATTCAAGGCTGGCTCTG	111
	RT-wabG-Rv		CGTTCAGTTGCAGATGACTG	

Données complémentaires non publiées

Des données supplémentaires obtenues au cours de ce travail de thèse, parfois très préliminaires, sont présentées et commentées dans les paragraphes ci-dessous. Ainsi, la caractérisation des éléments présents dans le surnageant de la souche de *Lactobacillus* démontrant une activité anti-biofilm a été initiée, mais surtout un modèle *in vitro* de formation de biofilm sur tapis cellulaire ainsi que la mise au point des conditions expérimentales permettant de tester l'action anti-biofilm de *Lactobacillus* dans un modèle tripartite ont été développés. De plus, nous avons participé à l'étude de la réponse immune de cellules épithéliales infectées par *K. pneumoniae* LM21 et mesuré l'influence de la présence de *L. plantarum* CIRM653 sur celle-ci. Enfin, nous rapportons les résultats complémentaires du criblage initial qui comportait également des bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium* ; ceux-ci n'ont pas été inclus dans la publication par souci d'homogénéité.

Tableau 5 : Souches de *Bifidobacterium* utilisées dans le criblage initial.

Organisme	Souche
<i>B. animalis</i>	CIP 105419 T
<i>B. catenulatum</i>	CIP 104175 T
<i>B. longum</i>	DSM 20219
<i>B. breve</i>	CIP 6469

Matériel et méthodes

Bactéries et conditions de croissance

Les souches de *Bifidobacterium* (Tableau 5), gracieusement fournies par Annick Bernalier (INRA Theix, France), ont été cultivées en anaérobiose durant 24h en milieu MRS (Becton, Dickinson, USA) à 37°C. Les surnageants de culture ont été traités selon le protocole décrit pour les souches de *Lactobacillus* dans l'article présenté ci-avant qui comprend également les détails concernant les souches de *K. pneumoniae* LM21 et *L. plantarum* CIRM653.

Traitements physico-chimiques et enzymatiques du surnageant de *L. plantarum*

Pour les traitements enzymatiques, le surnageant de *L. plantarum* CIRM653 a été incubé durant 1h à 37°C avec 100mg/L de DNase I, RNase A ou de protéinase K (Sigma-aldrich). Les contrôles ont consisté à traiter le milieu de culture BCC par chacune des enzymes indépendamment. Concernant le traitement au métapériodate de sodium, 0.1 vol d'une solution à 100mM a été ajouté dans le surnageant ou du milieu BCC (contrôle), puis le tout incubé à 37°C durant 1h. Après traitement, les échantillons ont été incubés à 100°C durant 10 min avant de déterminer leur activité anti-biofilm vis-à-vis de *K. pneumoniae* LM21. L'influence du traitement thermique a lui-même été évaluée en chauffant un extrait de surnageant et du milieu BCC à 100°C durant 10 min sans aucun autre traitement.

Conditions de culture et d'infection des cellules épithéliales

Les lignées cellulaires épithéliales humaines d'origine pulmonaire, A549 (ATCC® CCL-185™), intestinale, Caco-2 (ATCC® HTB-37™) et colique, HT-29 (ATCC® HTB-38™) ont été cultivées en milieu DMEM contenant 4,5g/L de glucose (Dominique Dutscher) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) décomplémenté (Dominique Dutscher) et 2mM d'HEPES (Dominique Dutscher), à 37°C sous 5% de CO₂. La lignée cellulaire embryonnaire Intestine 407 (Int-407) a été cultivée en milieu MEM (Dominique Dutscher) supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté (Dominique Dutscher), 1% d'acides aminés (Dominique Dutscher), 1mM de pyruvate de sodium (Dominique Dutscher) et 2mM d'HEPES (Dominique Dutscher).

Les infections ont été réalisées en plaques 24 puits. A confluence, les cellules épithéliales A549 et Caco-2 ont été infectées par *K. pneumoniae* LM21 et/ou *L. plantarum*

CIRM653 selon différentes multiplicités d'infection (1:1, 10:1 et 100:1) durant 3 heures, lavées au PBS puis incubées à nouveau 18 heures dans du milieu de culture DMEM contenant un cocktail d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine).

Dosage des cytokines pro- et anti-inflammatoires par ELISA

La production de cytokines pro-inflammatoires IL-8, IL-6, IL-1 β et IFN- γ et anti inflammatoire IL-10 par les cellules épithéliales a été mesurée à l'aide des kits BioLegend's ELISA MAX™. Brièvement les surnageants des cellules infectées ont été introduits dans des plaques de micro-titration préalablement recouvertes à saturation avec des anticorps monoclonaux spécifiques des cytokines à doser. Après 2h d'incubation à température ambiante, l'anticorps de détection biotinylé a été ajouté et l'ensemble mis à incuber pendant 1h. La détection a ensuite été effectuée par ajout d'avidine couplée à une peroxydase pendant 30 minutes puis de la solution substrat. Après 20 minutes d'incubation, la réaction a été arrêtée par l'ajout de solution stop (H_2SO_4) et l'absorbance lue à une longueur d'onde de 450nm.

Formation de biofilm sur surfaces biotiques

Les biofilms ont été formés soit en système statique (plaqué 24 trous - Falcon®) dans un milieu contenant 80% de BCC - 20% de milieu culture cellulaire, soit dans un dispositif de culture en flux : canaux ibidi® (biovalley, Marne-la-Vallée, France) en milieu de culture cellulaire. La biomasse des biofilms a été appréciée par **(i) dénombrement des bactéries associées aux cellules**. Les cellules ont été rincées au PBS, lysées dans 500 μ L de Triton 1X (EUROMEDEX, Souffelweyersheim, France) à 1% puis dénombrées par ensemencement sur gélose Luria-Bertani (LB). **(ii) Microscopie confocale** (voir paragraphe ci-dessous).

Observation confocale de biofilms formés dans le capillaire du dispositif ibidi®

Les expériences ont été menées dans un dispositif ibidi® composé d'un seul capillaire (μ -slide I 0.4 ou μ -slide I 0.8, surface de 2.5 cm²). Les bactéries ont été initialement mises en contact avec la monocouche de cellules épithéliales pendant 1 heure sans flux (inoculum 2.10⁶ CFU - MOI 1:1). Un flux continu de milieu de culture cellulaire a ensuite été appliqué pendant 3h avec un débit constant de 2 mL/h grâce à une pompe IVAC P6000 Alaris (Alaris Medical, Saint Germain en Laye, France). Après rinçage à l'eau physiologique, les cellules ont été fixées et marquées avec une solution (PFA 4% PBS) contenant du DAPI (5 μ g/mL), de

la phalloïdine (diluée au 1/2500) ou avec une solution de SYTO9 (LIVE BacLight Bacterial Gram Stain Kit - Life Technologies-Invitrogen). Les observations et l'acquisition d'images ont été réalisées avec un microscope confocal Leica SP5 (x40) de la plateforme d'Imagerie Confocale de Clermont-Ferrand (ICCF). La reconstitution tridimensionnelle du biofilm sur le tapis cellulaire a été générée avec le logiciel IMARIS.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel (GraphPad Sofware, La Jolla, CA, USA). Le test non-paramétrique Kruskal-wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn a été utilisé. Les *P* values inférieures à 0,05 ont été considérées significatives.

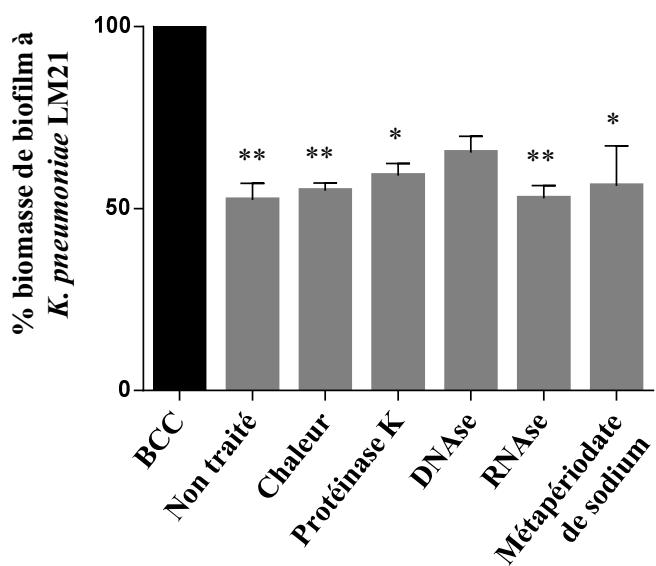


Figure 32 : Biomasse de biofilms à *K. pneumoniae* après traitements physico-chimiques et enzymatiques du surnageant de *L. plantarum* CIRM653.

Le surnageant de *L. plantarum* a été traité à la chaleur (100°C), Protéinase K, DNase, RNase ou au métapériodate de sodium, puis la biomasse du biofilm à *K. pneumoniae* LM21 a été mesurée par coloration au cristal violet. Les résultats sont exprimés en pourcentage de biomasse de biofilm formée en présence de surnageant traité ou non traité comparativement au milieu contrôle (BCC), \pm SEM (n=6); * $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$.

Résultats et commentaires

1. Analyse de l'effet anti-biofilm de bactéries bénéfiques sur surfaces abiotiques

Au cours de ce travail de thèse, nous avons décrit un effet anti-biofilm du surnageant de *L. plantarum* CIRM653 vis-à-vis de *K. pneumoniae* LM21 et l'implication de composants sécrétés par *L. plantarum*. Dans le but d'identifier la nature de la/les molécule(s) responsable(s) de cet effet, différents traitements physico-chimiques et enzymatiques du surnageant de culture de *L. plantarum* ont été réalisés (Figure 32). Les traitements à la chaleur (100°C), protéinase K, RNase et métapériodate de sodium n'ont pas eu d'effets majeurs sur les capacités anti-biofilm du surnageant de *L. plantarum*. Seul un traitement à la DNase se traduisait par une augmentation de biomasse du biofilm de *K. pneumoniae* (Figure 32). L'activité anti-biofilm observée vis-à-vis de *K. pneumoniae* pourrait donc être en partie due à la présence, voire au relargage s'il s'agit d'un phénomène actif, d'ADN extracellulaire de *L. plantarum*. Ces résultats nécessitent d'être confirmés mais il s'agirait d'une information originale car, si dans la littérature la grande majorité des molécules à activité anti-biofilm sécrétées par des lactobacilles reste de nature chimique inconnue (Sambanthamoorthy *et al.*, 2014; Shokouhfard *et al.*, 2015), les quelques-unes identifiées sont des polysaccharides (Kim *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014).

La présence d'ADNe dans la matrice des biofilms a initialement été décrite comme un élément contribuant à former ou stabiliser les biofilms (Nguyen & Burrows, 2014; Sahu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015b). Mais plus récemment, l'ADNe est apparu comme un facteur pouvant également contribuer à la déstabilisation de biofilms formés. Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont mis indirectement en évidence ce rôle déstabilisateur de l'ADNe dans les biofilms à *K. pneumoniae* : un traitement à la DNase I entraîne une plus grande stabilité du biofilm (Dos Santos Goncalves - données non publiées). Wang *et al.* ont également montré qu'en présence de DNase I, la biomasse de biofilms à *Salmonella* est plus importante et l'addition d'ADNe exerce un effet inhibiteur sur la formation de ce biofilm (Wang *et al.*, 2014). De plus, via une interaction avec des polysaccharides de surface bactérienne, l'ADNe empêche la fixation de nouvelles bactéries et favorise la dispersion de biofilm à *Caulobacter crescentus* (Berne *et al.*, 2010).

L'ADN issu de *Lactobacillus* pourrait ainsi, en se fixant aux polysaccharides de la matrice des biofilms de *K. pneumoniae*, contribuer à leur déstabilisation. Cependant d'autres

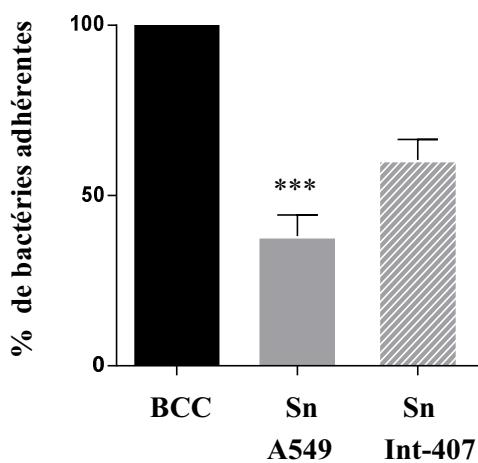


Figure 33 : Activité anti-biofilm du surnageant (Sn) de la souche *L. plantarum* CIRM653 vis-à-vis de *K. pneumoniae* LM21.

Numération de la biomasse de biofilms à *K. pneumoniae* LM21 (inoculum 1.10^6 CFU/mL ; MOI 1:1) formée durant 4 heures en présence de surnageant neutralisé de *L. plantarum* CIRM653 sur tapis cellulaire (A549 ou Int-407), expression en pourcentage de biomasse, \pm SEM (n=3); ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$.

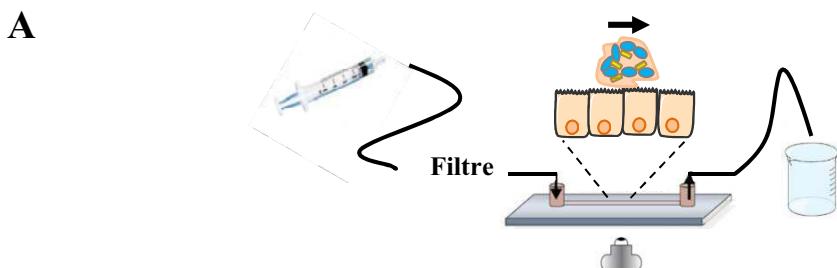
molécules peuvent être impliquées dans l'effet anti-biofilm observé. La nature chimique de la molécule active devra être confirmée à travers l'extraction d'ADN relargué par *L. plantarum* CIRM653. Son rôle dans l'inhibition de la formation de biofilm à *K. pneumoniae* sera également précisé dans des expériences permettant d'analyser son impact sur la matrice extracellulaire et la quantité de bactéries libérées des biofilms. Par exemple, l'utilisation combinée de marqueurs d'ADN (DAPI ou DDAO) (Nur *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014) et de lectines fluorescentes (Turonova *et al.*, 2016) permettrait d'observer une éventuelle co-localisation de ces molécules et d'apprécier la cohésion de la matrice extracellulaire de biofilms à *K. pneumoniae*, versus celle de biofilms mixtes avec *L. plantarum* CIRM653.

2. Analyse de l'effet anti-biofilm de *L. plantarum* CIRM653 sur surfaces biotiques

L'objectif de cette partie du travail était de reproduire l'effet anti-biofilm de *L. plantarum* CIRM653 dans des conditions proches de celle retrouvée en interaction avec un épithélium *in vivo*. Pour cela, nous avons procédé par étapes, en testant l'effet de surnageant de *L. plantarum* sur la formation de biofilm par *K. pneumoniae* sur des cellules épithéliales, en conditions statiques d'abord, puis en complexifiant le modèle expérimental avec un système de flux continu.

K. pneumoniae LM21 a d'abord été incubée pendant 4h sur un tapis de cellules épithéliales A549 et Int-407, en présence de surnageant neutralisé de *L. plantarum* CIRM653 ou de milieu contrôle BCC. Les niveaux d'adhésion de *K. pneumoniae* aux 2 types cellulaires (en absence de surnageant de *L. plantarum* CIRM653) étaient différents (plus élevés avec la lignée A549, confirmant ainsi le tropisme naturel de cette bactérie pour le tissu pulmonaire - données non présentées), mais la présence de surnageant de *L. plantarum* CIRM653 induisait dans les deux cas une réduction de biomasse des biofilms formés par *K. pneumoniae* à la surface des tapis cellulaires. Cependant, cette différence, calculée à partir de la détermination du nombre de bactéries viables de la biomasse des biofilms, était seulement significative pour les données d'adhésion au niveau des cellules épithéliales pulmonaires (62% de diminution ($P = 0.0003$) (Figure 33).

Dans la littérature, des observations similaires ont été rapportées avec *L. paracasei* IBB2588 : bien que dépourvu d'effet bactéricide, son surnageant de culture réduit significativement le nombre de *S. enterica* adhérentes aux cellules épithéliales intestinales Caco-2, en fonction de leur stade de différenciation (Jankowska *et al.*, 2008). De plus, *L.*



B

Lignée cellulaire épithéliale pulmonaire A549

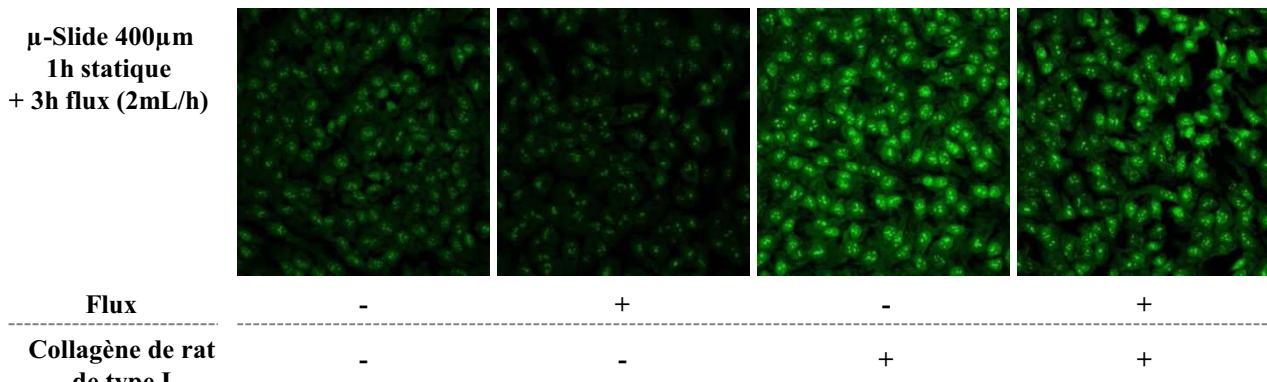


Figure 34 : Système de culture cellulaire en flux : système ibidi®.

A : Schéma du système expérimental ; B : Observation en microscopie confocale du tapis cellulaire (coloration SYTO9) formé par la lignée pulmonaire A549 au sein d'un capillaire de 400 μ m de hauteur en flux continu ou non et en présence ou non de collagène de rat de type I.

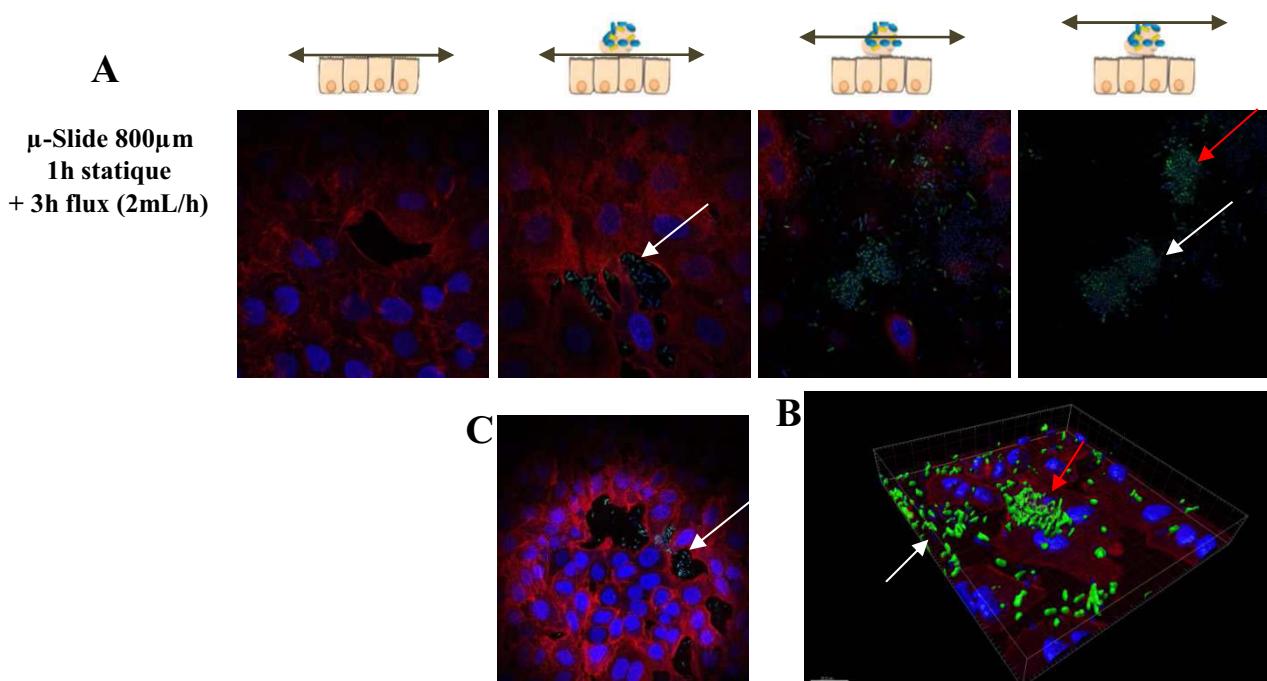


Figure 35 : Schéma du niveau de prise de vue et observations en microscopie confocale de biofilms à *K. pneumoniae* constitués en flux continu sur surface biotique.

A : *K. pneumoniae* (MOI 1:1) sur un tapis de cellules épithéliales pulmonaires A549 avec B : reconstitution tridimensionnelle et C : sur un tapis de cellules intestinale Int-407 formé dans un capillaire de 800 μ m de hauteur en flux continu. Coloration DAPI (bleu); phalloïdine (rouge) et GFP (vert). Flèches blanches : biofilm sur surface abiotique ; flèches rouges : biofilm sur surface biotique.

gasseri et *L. brevis* sont capables d'inhiber l'adhésion du pathogène *Helicobacter pylori* aux cellules gastriques via la production d'une molécule effectrice inhibant l'expression du gène codant l'adhésine *sabA* (Klerk *et al.*, 2016). Dans notre étude, nous avons observé l'effet du surnageant de *L. plantarum* sur l'expression de quelques adhésines de *K. pneumoniae* et montré qu'il n'influait pas sur l'expression de *FimD* (protéine usher) du pili de type 1, notoirement impliqué dans l'adhésion aux cellules épithéliales. Il serait cependant intéressant d'élargir cette démarche à l'ensemble des gènes de *K. pneumoniae* codant le pili de type 1, afin de déterminer si les modifications induites par la présence du surnageant de *L. plantarum* CIRM653 sont liées à des perturbations d'expression de facteurs d'adhésion de *K. pneumoniae*.

Le modèle statique précédemment utilisé convient à la détermination des effets de surnageants neutralisés, mais il ne permet pas de tester des bactéries entières, en raison de la production de métabolites acides qui rapidement altèrent la monocouche de cellules. Nous avons donc dans un deuxième temps adapté un système expérimental de culture cellulaire en flux ouvert (ibidi®) afin de constituer des biofilms sur des tapis de cellules avec renouvellement constant du milieu (Figure 34A). En évacuant au fur et à mesure les produits des métabolismes bactériens toxiques pour les cellules eucaryotes, cette technologie permet de réaliser des observations sur des périodes plus longues que les modèles expérimentaux statiques. En créant des forces de cisaillement, elle permet également de se rapprocher des conditions physiologiques naturelles.

Dans ce contexte, nous avons utilisé les mêmes lignées cellulaires pulmonaire A549 et intestinale Int-407. Des essais préliminaires ont permis de paramétriser les conditions d'infection des cellules par le pathogène sans induction de cytotoxicité cellulaire. Les cellules ont été préalablement cultivées au sein du capillaire en condition statique jusqu'à atteindre un état de confluence, puis infectées avec une multiplicité d'infection de 1:1 pour une durée maximale d'une heure. Un flux permanent de milieu de culture a ensuite été appliqué pendant 3h. Des difficultés expérimentales sont apparues très rapidement, dont une altération de confluence du tapis cellulaire A549 dès l'application du flux (Figure 34B). Ni le pré-conditionnement de la surface du capillaire avec du collagène de rat, ni la réduction de la vitesse du flux (à 1mL/h et à 0,4mL/h) n'ont permis de prévenir cette rétractation cellulaire. Néanmoins, en utilisant des capillaires disposant d'une chambre intérieure plus vaste en hauteur (800µm) - et donc en réduisant les forces de cisaillement internes - nous avons réussi

Tableau 6 : Taux de sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les lignées cellulaires épithéliales pulmonaires (A549) et intestinales (Caco-2) après contact avec *K. pneumoniae* LM21 ou *L. plantarum* CIRM653.

La production de chacune des cytokines a été mesurée dans les surnageants de culture des cellules par la technique ELISA. Les résultats présentés (exprimés en pg/mL) sont ceux obtenus lors d'une infection de 3 heures avec une MOI de 100, +/- SEM (n=3). Les taux de production de chacune des cytokines obtenus en condition basale ont été rapportés à zéro. ND : non détecté.

Cellules A549			Cellules Caco-2		
Cytokines	Avec <i>K. pneumoniae</i>	Avec <i>L. plantarum</i>	Cytokines	Avec <i>K. pneumoniae</i>	Avec <i>L. plantarum</i>
IL-8	1929,1 +/- 46,1	630,0 +/- 37,3	IL-8	422,6 +/- 73,3	209,9 +/- 86,5
IL-6	508,9 +/- 59,1	153,0 +/- 27,7	IL-6	ND	ND
IL-1β	ND	ND	IL-1β	ND	ND
TNF-α	ND	ND	TNF-α	ND	ND
IL-10	ND	ND	IL-10	ND	ND

à constituer des biofilms à *K. pneumoniae* sur les tapis cellulaires (A549 et Int-407), malgré la présence de zones non recouvertes par les cellules vis-à-vis desquelles *K. pneumoniae* montrait une grande affinité (Figure 35A-35B).

Les mêmes essais réalisés avec la lignée cellulaire HT-29 (isolées d'un adénocarcinome colique) n'ont pas permis d'obtenir de résultats concluants, car ces cellules présentaient un défaut d'adhésion important à la surface des capillaires dans ces conditions.

Le système ibidi® a été initialement développé pour l'étude des phénomènes biologiques s'exerçant au niveau des cellules endothéliales, tel le recrutement de neutrophiles (Ganguly *et al.*, 2012). Il a également été utilisé pour analyser les interactions entre ce type de cellules et des pathogènes (*Neisseria meningitidis*) (Mairey *et al.*, 2006) avec des contraintes de cisaillement qui miment le flux sanguin, ainsi que dans l'étude des interactions de mutants de ce même pathogène avec des lignées cellulaires épithéliales issues de carcinome humain du colon (T84) ou de carcinome oro-pharyngé (FaDu) (Jamet *et al.*, 2013). A priori, ce système permet le développement de différents types cellulaires, mais les résultats obtenus avec les cellules A549 et les Int-407 sont encore insatisfaisants d'un point de vue technique. D'autres essais seront nécessaires avant de conclure à l'inadaptation de ces lignées cellulaires à ce modèle ; dans ce cas, il serait judicieux soit de changer de lignée cellulaire, soit d'optimiser la formation d'une barrière épithéliale via un modèle de co-culture cellulaire en combinant des lignées épithéliales et endothéliales.

3. Effet immunomodulateur de la souche *L. plantarum* CIRM653

La mise en place du modèle tripartite décrit ci-dessus a conduit à nous intéresser à la réponse de la cellule eucaryote vis-à-vis du pathogène et de *L. plantarum* CIRM653. Les premiers essais ont été réalisés avec des bactéries sous forme planctonique. Nous avons ainsi quantifié la réponse inflammatoire des cellules épithéliales pulmonaires (A549) et intestinales (Caco-2) au contact de *K. pneumoniae* LM21 ou *L. plantarum* CIRM653 par dosage ELISA des taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α) et anti-inflammatoire (IL-10) dans les surnageants, après avoir vérifié l'absence de cytotoxicité (mesure de LDH) dans ces conditions (données non présentées). Une augmentation significative de production d'IL-8 et d'IL-6 a été observée par les cellules pulmonaires A549 infectées avec *K. pneumoniae* mais seulement avec la plus forte MOI (100) (respectivement 1929,15 pg/mL ($P = 0,0067$) et 508,93 pg/mL ($P = 0,0225$) (Tableau 6, panel de gauche). De manière

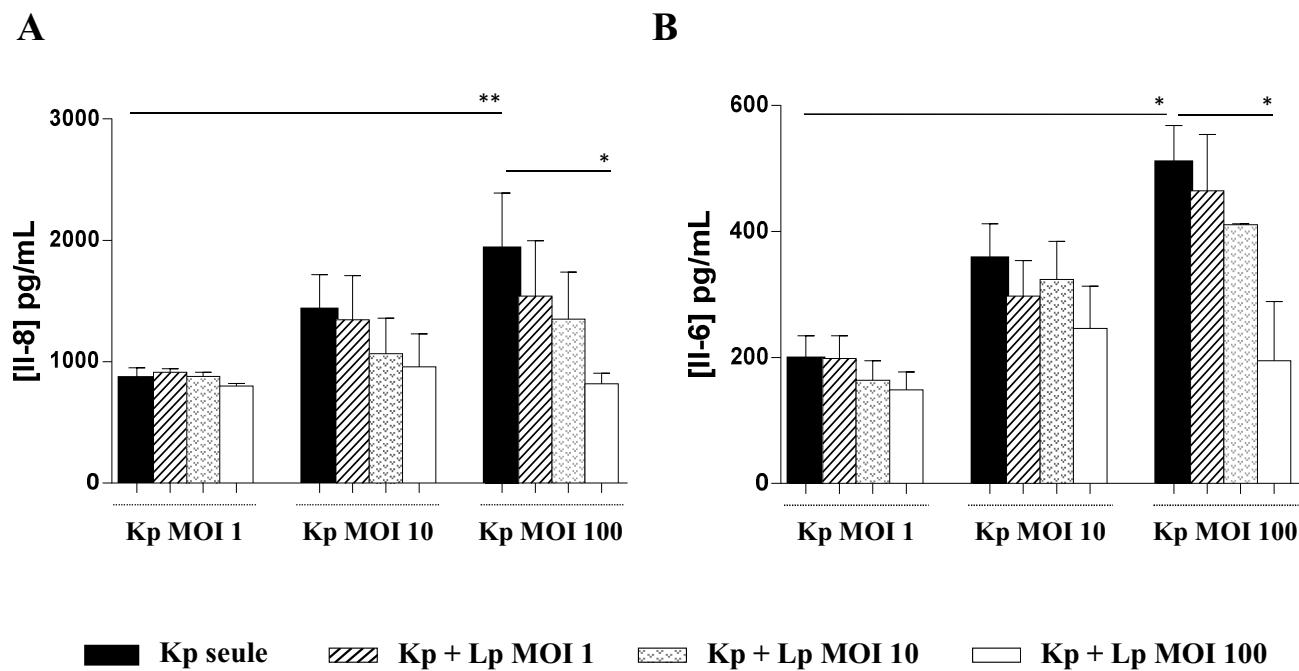


Figure 36 : Effet de *L. plantarum* CIRM653 (Lp) sur la réponse inflammatoire des cellules épithéliales pulmonaires A549 induite par *K. pneumoniae* LM21 (Kp).
 Dosage par la technique ELISA des cytokines pro-inflammatoires IL-8 (A) et IL-6 (B) dans le surnageant de culture des cellules infectées par *K. pneumoniae* et *L. plantarum* simultanément selon différentes multiplicités d'infections (MOI 1, 10 et 100) durant 3 heures, +/- SEM (n=3); * P < 0.05 et ** P < 0.01.

intéressante, *K. pneumoniae* à cette même MOI de 100 n'induit pas de manière significative la production d'IL-8 (422,58 pg/mL) et d'IL-6 (ND) par les cellules intestinales Caco-2 (Tableau 6, panel de droite). Concernant les cytokines IL-1 β , TNF- α et IL-10, aucune augmentation n'a été détectée quels que soient le micro-organisme et la lignée cellulaire utilisés (Tableau 6). Ainsi, *K. pneumoniae* LM21 induirait un phénomène inflammatoire au niveau du tissu pulmonaire mais pas au niveau intestinal. Cette absence de réponse au niveau intestinal permettrait sa persistance ; le tube digestif est en effet la niche privilégiée permettant à *K. pneumoniae* de constituer un réservoir local (Caballero *et al.*, 2015; Selden *et al.*, 1971).

Quant à *L. plantarum* CIRM653, il induit une production d'IL-8 dans les deux modèles cellulaires, ainsi que celle d'IL-6 par les cellules épithéliales pulmonaires A549. Cependant les niveaux sont beaucoup plus réduits par rapport à ceux observés avec *K. pneumoniae* (Tableau 6).

Après avoir caractérisé les réponses individuelles vis-à-vis de chacune des deux bactéries, nous avons voulu déterminer si la présence de *L. plantarum* CIRM653 pouvait influencer la réponse inflammatoire induite par *K. pneumoniae* LM21 au niveau des cellules épithéliales pulmonaires A549. Pour cela, nous avons reproduit les expériences précédentes en inoculant de manière simultanée les deux bactéries, *L. plantarum* et *K. pneumoniae* (Figure 36). La présence de *L. plantarum* réduit de manière dose dépendante la production d'IL-8 et d'IL-6 par les cellules épithéliales pulmonaires, comparativement aux taux observés en présence du pathogène seul (Figure 36A-36B). Ainsi, la présence combinée de *L. plantarum* (MOI 100) et *K. pneumoniae* (MOI 100) se traduit par une diminution significative des niveaux d'IL-8 et d'IL-6 (respectivement 818,18 pg/mL ($P = 0,0113$) et 194,7 pg/mL ($P = 0,05$)), comparativement à ceux observés avec les cellules infectées par *K. pneumoniae* seule à la même MOI (respectivement 1929,1 pg/mL et 503,93 pg/mL) (Figure 36A-36B). Par ailleurs, cette diminution n'est pas retrouvée lorsque l'on utilise des bactéries *L. plantarum* préalablement inactivées par les UV (résultats non présentés).

Ainsi, *L. plantarum* CIRM653 exercerait un effet inhibiteur vis-à-vis de la réponse inflammatoire épithéliale pulmonaire induite par *K. pneumoniae* LM21, via un phénomène nécessitant la présence de bactéries viables. Néanmoins, nous ne pouvons exclure que l'effet observé soit lié en partie à un effet bactéricide du *Lactobacillus* vis-à-vis de *K. pneumoniae* dû à l'accumulation de métabolites acides produits par *L. plantarum* qui détruirait

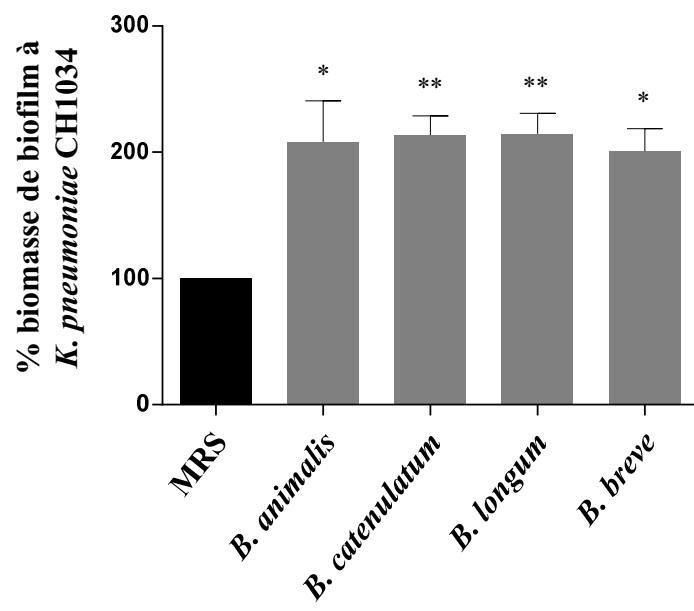


Figure 37 : Effet du surnageant de culture de bifidobactéries sur la formation de biofilm par *K. pneumoniae*.

La biomasse de biofilm à *K. pneumoniae* CH1034 formée durant 4h en présence de surnageant de bifidobactéries a été mesurée par spectrophotométrie après coloration au cristal violet. Les résultats sont exprimés en pourcentage de biomasse par rapport au contrôle (milieu de culture MRS seul), \pm SEM ($n=3$); * $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$.

partiellement la population de *K. pneumoniae*. Il a cependant été montré que la présence de lactobacilles (*L. plantarum* ou *L. crispatus*) prévient la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-17, l'IL-23 ou l'IL-8 induite par *Streptococcus pyogenes* ou *C. albicans* par des cellules épithéliales pulmonaires A549 et du col de l'utérus HeLa, en modulant négativement l'expression des TLR2 et TLR4 impliqués dans la reconnaissance du pathogène (Rizzo *et al.*, 2013a, b). Le caractère immunomodulateur de *L. plantarum* CIRM653 devra être confirmé ou invalidé, notamment par des analyses transcriptionnelles du profil cytokinique des cellules épithéliales infectées et de l'implication des récepteurs TLR2 et TLR4. L'étape suivante consistera à déterminer si les réponses sont identiques avec ces mêmes bactéries sous forme de biofilm, car les formes sessiles sont généralement plus résistantes face à la réponse immunitaire (Thurlow *et al.*, 2011). L'ensemble de ces expériences permettra de déterminer pleinement l'impact de *L. plantarum* CIRM653 sur la réponse immune mucosale induite par le pathogène.

4. Bifidobactéries et formation de biofilm par *K. pneumoniae*

Lors du criblage initial de souches bénéfiques avec activité anti-biofilm, 4 souches de *Bifidobacterium* ont été également testées, représentées par 4 espèces différentes d'origine variée (humaine et animale). Contrairement aux souches de *Lactobacillus* dont la grande majorité entraînait une diminution de la biomasse du biofilm de *K. pneumoniae*, la présence des surnageants des souches de *Bifidobacterium* augmentait significativement (d'un facteur 2) la formation de biofilm du pathogène, et ce indépendamment de l'espèce (Figure 37).

Les bifidobactéries sont capables de produire des molécules du quorum-sensing de type AI-2 impliquées dans la formation de leur propre biofilm (Sun *et al.*, 2014). Ces molécules sont relarguées dans le milieu extérieur ; leur présence dans le surnageant de culture pourrait ainsi favoriser la formation de biofilm par *K. pneumoniae*, une espèce bactérienne qui elle-même utilise ce système de communication (Pereira *et al.*, 2009; Rezzonico *et al.*, 2012), notamment pour la mise en place de l'architecture de son biofilm (De Araujo *et al.*, 2010; Balestrino *et al.*, 2005). Pour vérifier cette hypothèse, deux types d'expérimentation pourraient être menés. Dans un premier temps, l'effet de surnageants de souches recombinantes d'*E. coli* ne produisant pas d'AI-2 naturellement mais exprimant les gènes *luxS* des différentes souches de bifidobactéries pourrait être évalué lors de la formation de biofilm par *K. pneumoniae*. De plus, l'effet « pro-biofilm » du surnageant de culture d'une

souche de *Bifidobacterium* sur-exprimant les gènes codant des enzymes LuxS pourrait être mesuré et comparé à celui de la souche sauvage, comme cela a été réalisé avec *B. longum* NCC2705 (Sun *et al.*, 2014). Si ces hypothèses s'avéraient inexactes, alors la caractérisation de la nature chimique des composés des surnageants de culture constituerait une autre piste, plus complexe car tout comme les lactobacilles, la culture de bifidobactéries nécessite des milieux enrichis, limitant de ce fait l'approche analytique.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce criblage nous indique que les bactéries bénéfiques exercent des effets très variables vis-à-vis de la formation de biofilm par d'autres micro-organismes, avec des mécanismes d'action vraisemblablement très différents ; elles constituent donc une source inépuisable de connaissances en termes d'applications pro ou anti-biofilm.

**DISCUSSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Le principal objectif de ce travail était d'identifier au sein de bactéries dites bénéfiques des souches capables d'inhiber la formation de biofilm par des pathogènes opportunistes et de contribuer à la compréhension des mécanismes mis en jeu. Nous avons ainsi déterminé les propriétés anti-biofilm d'un large panel de souches bactériennes appartenant au genre *Lactobacillus* et, dans une moindre mesure au genre *Bifidobacterium*. Suite à l'identification d'une souche de *L. plantarum* avec une forte activité anti-biofilm vis-à-vis de *K. pneumoniae*, nous avons ensuite caractérisé cet effet en utilisant des modèles expérimentaux abiotiques et biotiques.

Dans un premier temps, nous avons testé les surnageants de 140 souches de *Lactobacillus* d'origines variées (alimentaire, animale ou humaine) pour leur activité anti-biofilm, indépendamment d'un effet pH, vis-à-vis de deux pathogènes opportunistes. A notre connaissance, les données concernant les activités anti-biofilm de bactéries bénéfiques sont encore peu nombreuses. La majorité des extraits des 140 souches testées entraînait une inhibition de la formation de biofilm à *K. pneumoniae* avec un effet significatif pour 22% d'entre eux. Seulement deux études ayant réalisé un criblage similaire, avec un nombre plus limité de souches de *Lactobacillus* (28 d'origine humaine pour l'une et 87 d'origine humaine et animale pour l'autre) ont démontré que 11% et 5,7% d'entre elles inhibait respectivement l'adhésion de *H. pylori* (Klerk *et al.*, 2016) ou la formation de biofilm à *P. aeruginosa* (Alexandre *et al.*, 2014). Les différences observées pourraient être dues aux techniques de criblage utilisées et/ou au choix des pathogènes cibles.

Nous avons ainsi pu sélectionner 3 souches de lactobacilles d'origine alimentaire (*L. delbrueckii* CIRM267, *L. delbrueckii* CIRM268 et *L. plantarum* CIRM653) capables à la fois de prévenir la formation de biofilm et de disperser un biofilm préformé à *K. pneumoniae*, indépendamment d'un effet bactéricide. La suite des investigations a été menée exclusivement avec *L. plantarum* CIRM653 qui montrait l'activité anti-biofilm la plus importante. L'analyse des autres souches de lactobacilles reste cependant une perspective intéressante, car la majorité d'entre elles exerçait un effet anti-biofilm plus ou moins prononcé et, étant donné le caractère individuel des souches de *Lactobacillus*, il est possible qu'elles agissent par des mécanismes différents, et de fait intéressants.

L'évaluation du spectre anti-biofilm du surnageant neutralisé de *L. plantarum* CIRM653 a également montré une inhibition de la formation de biofilm au-delà de l'espèce *K.*

pneumoniae, vis-à-vis de diverses bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif, sans englober toutefois toutes les souches de *E. coli* testées. Ces résultats, en conformité avec des données précédentes (Collado *et al.*, 2007), indiquent que la capacité à inhiber la formation de biofilm de pathogènes dépend à la fois de la souche probiotique et du pathogène testé, montrant encore une fois la spécificité d'action souche dépendante.

Cependant, il pourrait exister une singularité d'action au sein des genres bactériens. En effet, l'ensemble des résultats obtenus lors du criblage initial nous indique que toutes les bactéries bénéfiques n'exercent pas les mêmes effets et vraisemblablement n'utilisent pas les mêmes mécanismes d'action vis-à-vis de la formation de biofilm d'autres micro-organismes. En effet, les quelques souches de bifidobactéries incluses dans cette étude, contrairement aux isolats du genre *Lactobacillus*, favorisent la formation de biofilm à *K. pneumoniae*. Elles agiraient via le système de communication cellulaire de type AI-2, une hypothèse qui devra être vérifiée notamment par des expériences de surexpression des gènes codant les enzymes LuxS. Si les lactobacilles sont eux aussi capables de produire des molécules du quorum-sensing de type AI-2 (Altermann *et al.*, 2005; DeKeersmaecker & Vanderleyden, 2003; Kleerebezem *et al.*, 2003) impliquées dans la formation de leur propre biofilm (Lebeer *et al.*, 2007; Tannock *et al.*, 2005), ces facteurs de communication ne sont vraisemblablement pas reconnus et utilisés par *K. pneumoniae* pour former du biofilm. La mise en évidence de propriétés « pro-biofilms » de bifidobactéries reste cependant très intéressante car elles pourraient présenter un potentiel probiotique important si elles étaient applicables à d'autres bactéries, notamment aux bactéries commensales bénéfiques du tube digestif.

La production de métabolites acides par *Lactobacillus* peut constituer un frein à l'étude de ses autres caractéristiques, et s'en affranchir *in vitro* requiert un savoir-faire technologique particulier, indispensable pour mettre en évidence certaines priorités de la bactérie. En effet, le système de microfermenteur en flux continu nous a permis de tester, dans un second temps, l'activité anti-biofilm non plus d'extraits de surnageant mais de bactéries entières et vivantes. De par un renouvellement continu de milieu, ce système permet l'évacuation des bactéries planctoniques, évite l'accumulation de métabolites acides produits par *Lactobacillus* et permet d'exercer également des forces de cisaillement importantes. Nous avons ainsi formé des biofilms mixtes comprenant à la fois *K. pneumoniae* et *L. plantarum* et confirmé l'implication d'un composé activement sécrété par *Lactobacillus* de par le caractère rédhibitoire de son inactivation préalable par les UV.

Bien que disposant seulement de données préliminaires, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'ADNe de *L. plantarum* est en partie impliqué dans le phénomène anti-biofilm. L'extraction spécifique de l'ADN présent dans le surnageant de culture de *L. plantarum* CIRM653 et l'étude de son influence sur la formation de biofilm à *K. pneumoniae* s'avèrent indispensables pour confirmer son implication. Nous pourrions également tester cette hypothèse en mesurant la capacité de dispersion de biofilms formés de *K. pneumoniae* suite à un traitement à la DNase ou après ajout d'extraits d'ADNe, tel que cela a été réalisé avec *S. mutans* (Liao *et al.*, 2014). Cependant l'implication de l'ADNe ne semble pas le seul mécanisme d'action mis en jeu dans l'effet anti-biofilm. Afin d'identifier tous les exométabolites impliqués, l'approche la plus exhaustive serait une analyse protéomique et/ou métabolomique mais les conditions de culture de souches de lactobacilles (milieux très riches et complexes) constituent des verrous technologiques importants pour ces approches. Toutefois de telles molécules présenteraient un potentiel de valorisation très prometteur pour une utilisation médicale et/ou industrielle.

Au sein des biofilms mixtes, nous avons observé une augmentation importante de biomasse du *Lactobacillus* comparativement à un biofilm mono-espèce. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le *L. plantarum* bénéficie d'avantages métaboliques dus à la présence de *K. pneumoniae* qui lui permettraient de se multiplier au dépend de l'entérobactérie. De tels avantages de croissance des souches probiotiques au sein de biofilms mixtes ont déjà été observés avec *L. rhamnosus* - *L. monocytogenes*, sans que les mécanismes sous-jacents aient été mis en évidence (Woo & Ahn, 2013). L'étude de la croissance et de la formation de biofilm du *Lactobacillus* en présence de surnageant de culture de *K. pneumoniae* permettrait de vérifier si la production de métabolites par *K. pneumoniae* constitue véritablement une source de nutriments assimilables par *L. plantarum*.

Afin de mieux comprendre le processus de régulation du « mode de vie » biofilm, nous avons choisi d'étudier la réponse du pathogène vis-à-vis de la souche de lactobacille présentant des propriétés anti-biofilm. En ciblant quelques gènes préalablement décrits comme jouant un rôle dans la formation de biofilm chez *K. pneumoniae*, nous avons pu montrer que l'expression de certains d'entre eux était modifiée au contact du surnageant de *L. plantarum*. Il serait intéressant d'étendre cette analyse à l'ensemble du génome de *K. pneumoniae* pour connaître de manière exhaustive les modifications induites au niveau

transcritomique. Nous pourrions ainsi confirmer si la présence de *L. plantarum* induit un profil de " bactéries sessiles détachées " (Guilhen *et al.*, 2016), capables de coloniser plus efficacement une surface abiotique que leurs homologues planctoniques. Cet aspect est particulièrement intéressant car il pose la question du bienfait ou non d'une désorganisation de biofilms constitués. A terme, nous pourrions également réaliser une analyse transcriptionnelle chez *K. pneumoniae* cultivée en présence de la bactérie *L. plantarum*. La comparaison des profils transcriptionnels obtenus nous renseignerait sur les mécanismes moléculaires anti-biofilm exercés par la bactérie elle-même et permettrait de compléter les données obtenues avec le seul surnageant.

Des données récentes de la bibliographie suggèrent que les biofilms sont présents aussi bien sur surfaces abiotiques que biotiques, c'est à dire *in vivo* en contact étroit avec les épithéliums de l'organisme hôte (Vos, 2015). Lors des expérimentations *in vivo*, nous avons observé que l'administration journalière de *L. plantarum* vivant - capable d'inhiber la formation de biofilm à *K. pneumoniae* sur surface abiotique - entraînait une persistance du pathogène au sein du tractus intestinal murin. Cette capacité semble corrélée avec une activité anti-biofilm du *Lactobacillus* puisque l'administration dans les mêmes conditions de la souche Lcr35, dépourvue d'activité anti-biofilm, ne modifie pas les taux de colonisation de *K. pneumoniae*. Ces résultats surprenants pourraient toutefois être en lien avec le phénotype hyper-adhérent des bactéries détachées de biofilms suite au contact avec le surnageant de *Lactobacillus* tel que nous avons pu le montrer *in vitro*. En effet, des analyses transcriptionnelles ont permis d'identifier des agrégats de *K. pneumoniae* issus de biofilms exprimant plus fortement des pili de type 3 fonctionnels et affichant des capacités d'adhésion augmentées sur surface abiotique par rapport à celles des bactéries planctoniques.

L'étude de la colonisation de surface biotique (cellules épithéliales intestinales) par des agrégats issus du détachement de biofilm à *K. pneumoniae* s'avère indispensable afin d'élucider cette persistance de colonisation au sein du tractus intestinal des souris.

Un système expérimental (ibidi®) permettant de produire des biofilms mixtes en présence de cellules épithéliales a été mis au point, apportant un degré de complexité supplémentaire afin de mimer au mieux le contexte *in vivo*. Ce système offre de nombreux avantages (application de forces de cisaillement, évacuation des déchets métaboliques), mais nous avons dû faire face à des difficultés d'expérimentation. Les problèmes de confluence

cellulaire rencontrés pourraient nous orienter vers l'utilisation d'autres lignées cellulaires, telle la lignée T84 issue d'un carcinome humain colique et décrite comme capable de former un tapis cellulaire confluent dans le système ibidi® (Jamet *et al.*, 2013). Mais le modèle cellulaire pulmonaire (A549) reste intéressant car ces cellules présentent fidèlement les caractéristiques morphologiques et biochimiques des cellules pulmonaires humaines, cibles privilégiées du pathogène *K. pneumoniae*. Leur utilisation dans ce modèle expérimental nécessite au préalable d'améliorer la confluence de la monocouche épithéliale ; ce pourrait-être en réalisant une co-culture avec des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC) (Srinivasan *et al.*, 2015). En effet ce modèle présente de bien meilleures résistances électriques trans-épithéliales/trans-endothéliales que le modèle de mono-culture des cellules A549 (Hermanns *et al.*, 2004). Nous pourrions ainsi évaluer l'impact de *L. plantarum* dans des expériences d'exclusion, de compétition et de déplacement vis-à-vis de *K. pneumoniae*. En parallèle, une approche observationnelle en microscopie confocale, permettrait d'apprécier la répartition spatio-temporelle de chacune des bactéries et la cinétique de détachement du biofilm à *K. pneumoniae*.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivaient dans un projet de recherche plus vaste qui avait également pour but de connaître l'influence de bactéries bénéfiques sur la réponse immune de cellules épithéliales vis-à-vis de pathogènes, notamment sous la forme de biofilms. Nous avons initié cet aspect en réalisant des premiers essais avec des bactéries sous forme planctonique. Nous avons montré que *L. plantarum* CIRM653 modulait la réponse immunitaire des cellules pulmonaires infectées par *K. pneumoniae*. L'intensité de cette réponse est fortement dépendante de la quantité de *Lactobacillus* mise au contact des cellules *in vitro*. Ces données préliminaires doivent impérativement être confirmées par une étude transcriptionnelle du profil cytokinique des cellules pulmonaires A549 suite au contact avec les bactéries. De plus, Rizzo *et al.* ont montré que la présence de certaines souches de *Lactobacillus* (*L. plantarum* et *L. crispatus*) diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de cellules épithéliales dans un contexte infectieux à travers la diminution d'expression des Toll-like récepteurs TLR-2 et TLR-4 (Rizzo *et al.*, 2013a, b). Nous savons que l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules épithéliales pulmonaires A549 est augmentée suite à une infection à *K. pneumoniae* (Regueiro *et al.*, 2009). Dans ce contexte, il serait particulièrement intéressant d'évaluer le rôle de ces récepteurs (expériences de Western-blot, ARNi) dans les cellules A549 mises en contact avec *L. plantarum* et *K. pneumoniae* ou

avec le pathogène seul. Ces déterminations réalisées avec des bactéries planctoniques devraient être suivies de l'analyse des effets produits par des formes biofilms du pathogène, mais devraient également inclure la détermination de l'impact de la présence du *L. plantarum* au sein de biofilms mixtes, puisque le mode de vie sessile de souches de lactobacilles semble potentialiser leurs activités immunomodulatrices (Aoudia *et al.*, 2016; Rieu *et al.*, 2014).

A plus long terme, il serait intéressant d'étudier l'effet de *L. plantarum* CIRM653 sur la physiopathologie de *K. pneumoniae* dans le modèle murin de colonisation intestinale, à travers des analyses de l'intégrité épithéliale et de la réponse immunitaire des muqueuses. Plusieurs études renforcent l'idée d'une association directe entre les taux de colonisation de *K. pneumoniae* au sein du tractus gastro-intestinal et le développement de pathologies extra-intestinales (de Almeida *et al.*, 2005; Fung *et al.*, 2012). *K. pneumoniae* est en effet capable, dans un modèle murin de colite induite au TNBS, d'influencer la solidité des jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales en réduisant l'expression de certains de leurs composants (claudine-1, protéine ZO-1 et l'occludine). De manière intéressante, l'administration orale d'une souche de *L. johnsonii* atténue ce phénotype (Lee & Kim, 2011). Nous pourrions reconduire ce type d'expérimentation *in vivo* dans notre modèle murin. *L. plantarum* favorise le maintien de la colonisation intestinale par *K. pneumoniae* ; cependant à travers un effet antagoniste sur la modulation des jonctions serrées par le pathogène, sa présence pourrait diminuer le risque de translocation du pathogène et *in fine* de colonisation extra-intestinale. Enfin, ce même modèle murin nous permettrait de définir les mécanismes immunomodulateurs du *Lactobacillus* lors d'un contexte infectieux *in vivo*. Pour cela, les taux d'ARNm et protéiques de cytokines (pro- et anti-inflammatoires) pourraient être évalués au niveau du tissu intestinal, pulmonaire mais également sanguin. Le dosage des taux sériques de la lipocaline 2 (LCN2), mais également au sein des fèces ou des tissus épithéliaux, nous renseignerait également sur la réponse au niveau des muqueuses des souris puisqu'il s'agit d'une protéine antimicrobienne abondamment sécrétée par les cellules épithéliales durant une infection du tractus intestinal ou respiratoire par *S. Typhimurium* et *K. pneumoniae* (Diaz-Ochoa *et al.*, 2014). Nous serions alors en mesure de définir l'action de *L. plantarum* CIRM653 dans un contexte infectieux engendré par *K. pneumoniae* *in vivo*.

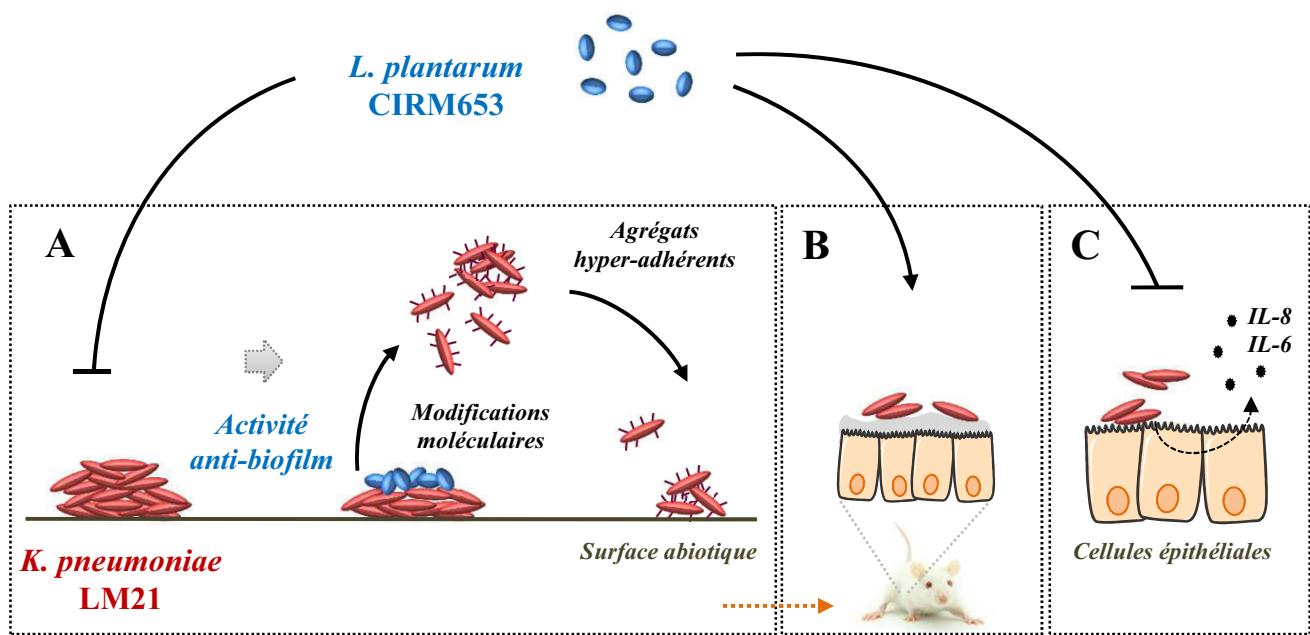


Figure 38 : Représentation schématique du mode d'action supposé de *L. plantarum* CIRM653.

A : Activité anti-biofilm de *L. plantarum* vis-à-vis de *K. pneumoniae* sur surface abiotique, B : Effet de *L. plantarum* sur la colonisation intestinale de *K. pneumoniae*, C : Activité immunomodulatrice de *L. plantarum* lors d'une infection à *K. pneumoniae*.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse (Figure 38) a permis d'identifier une souche de *Lactobacillus*, *L. plantarum* CIRM653 avec des activités anti-biofilm vis-à-vis de *K. pneumoniae* LM21 *in vitro*, via l'étude de son surnageant de culture ou au sein de biofilms mixtes et ce, indépendamment d'un effet bactéricide. De manière surprenante, dans un modèle murin de colonisation intestinale par *K. pneumoniae*, l'administration journalière de *L. plantarum* a favorisé la persistance du pathogène. L'effet anti-biofilm *in vitro* menant à la dispersion d'agrégats bactériens fortement adhérents pourrait ainsi *in vivo* favoriser la capacité de *K. pneumoniae* à essaimer et coloniser son environnement. L'ensemble de ces observations montre que le développement de stratégies anti-biofilm et anti-colonisation à base de bactéries bénéfiques pourrait suivre différentes approches ; par conséquent il est important de déterminer en amont de façon précise leurs mécanismes d'action et d'anticiper au mieux le rapport bénéfice - risque de leur utilisation.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V. & Jafarian-Dehkordi, A. (2013).** *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Res Pharm Sci* **8**, 260–268.
- Alexandre, Y., Le Berre, R., Barbier, G. & Le Blay, G. (2014).** Screening of *Lactobacillus* spp. for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *BMC Microbiol* **14**, 107.
- AlFaleh, K. & Anabrees, J. (2014).** Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evid-Based Child Heal Cochrane Rev J* **9**, 584–671.
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M. & Alhede, M. (2014).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv Appl Microbiol* **86**, 1–40.
- De Almeida, V. C., Pessoa-Silva, C. L., Sampaio, J. L. M., Gontijo Filho, P. P., Teixeira, L. M. & Moreira, B. M. (2005).** Genetic relatedness among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak isolates associated with colonization and invasive disease in a neonatal intensive care unit. *Microb Drug Resist Larchmt N* **11**, 21–25.
- Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T. & other authors. (2005).** Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3906–3912.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. & Kuipers, O. P. (2016).** Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 2939–2951.
- Andoh, A., Kuzuoka, H., Tsujikawa, T., Nakamura, S., Hirai, F., Suzuki, Y., Matsui, T., Fujiyama, Y. & Matsumoto, T. (2012).** Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol* **47**, 1298–1307.
- Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jego, G., Garrido, C. & Guzzo, J. (2016).** Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiol*, 19th Meeting of the Club des Bactéries Lactiques **53, Part A**, 51–59.
- De Araujo, C., Balestrino, D., Roth, L., Charbonnel, N. & Forestier, C. (2010).** Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Res Microbiol* **161**, 595–603.
- Ataie-Jafari, A., Larijani, B., Alavi Majd, H. & Tahbaz, F. (2009).** Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann Nutr Metab* **54**, 22–27.
- Augustine, N., Kumar, P. & Thomas, S. (2010).** Inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm by AiiA enzyme produced from *Bacillus* spp. *Arch Microbiol* **192**, 1019–1022.
- Baba, N., Samson, S., Bourdet-Sicard, R., Rubio, M. & Sarfati, M. (2009).** Selected commensal-related bacteria and Toll-like receptor 3 agonist combinatorial codes synergistically induce interleukin-12 production by dendritic cells to trigger a T helper type 1 polarizing programme. *Immunology* **128**, e523–e531.
- Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Rich, C. & Forestier, C. (2005).** Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *J Bacteriol* **187**, 2870–2880.
- Balestrino, D., Ghigo, J.-M., Charbonnel, N., Haagensen, J. A. J. & Forestier, C. (2008).** The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ Microbiol* **10**, 685–701.
- Banat, I. M., Rienzo, M. A. D. D. & Quinn, G. A. (2014).** Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 9915–9929.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2009a).** Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. *J Bacteriol* **191**, 7333–7342.

- Barraud, N., Storey, M. V., Moore, Z. P., Webb, J. S., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2009b).** Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb Biotechnol* **2**, 370–378.
- Beaudoin, T., LaFayette, S., Roussel, L., Bérubé, J., Desrosiers, M., Nguyen, D. & Rousseau, S. (2013).** The level of p38 α mitogen-activated protein kinase activation in airway epithelial cells determines the onset of innate immune responses to planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **207**, 1544–1555.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Molin, S., Prensier, G. & other authors. (2004).** Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* **51**, 659–674.
- Beloin, C., Roux, A. & Ghigo, J.-M. (2008).** Escherichia coli biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 249–289.
- Bendaoud, M., Vinogradov, E., Balashova, N. V., Kadouri, D. E., Kachlany, S. C. & Kaplan, J. B. (2011).** Broad-Spectrum Biofilm Inhibition by *Kingella kingae* Exopolysaccharide \triangleright . *J Bacteriol* **193**, 3879–3886.
- Bermúdez-Humarán, L. G., Motta, J.-P., Aubry, C., Kharrat, P., Rous-Martin, L., Sallenave, J.-M., Deraison, C., Vergnolle, N. & Langella, P. (2015).** Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- β anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb Cell Factories* **14**.
- Berne, C., Kysela, D. T. & Brun, Y. V. (2010).** A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Mol Microbiol* **77**, 815–829.
- Boles, B. R., Thoendel, M. & Singh, P. K. (2005).** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* **57**, 1210–1223.
- Bolla, P. A., Carasi, P., Serradell, M. de los A. & De Antoni, G. L. (2013).** Kefir-isolated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhibits the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* *in vitro*. *J Dairy Res* **80**, 96–102.
- Boonma, P., Spinler, J. K., Venable, S. F., Versalovic, J. & Tumwasorn, S. (2014).** *Lactobacillus rhamnosus* L34 and *Lactobacillus casei* L39 suppress *Clostridium difficile*-induced IL-8 production by colonic epithelial cells. *BMC Microbiol* **14**, 177.
- Brandenburg, K. S., Rodriguez, K. J., McAnulty, J. F., Murphy, C. J., Abbott, N. L., Schurr, M. J. & Czuprynski, C. J. (2013).** Tryptophan Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 1921–1925.
- Briggiler Marcó, M., Reinheimer, J. & Quibroni, A. (2015).** Phage adsorption and lytic propagation in *Lactobacillus plantarum*: Could host cell starvation affect them? *BMC Microbiol* **15**.
- Brouwer, M. L., Wolt-Plompen, S. a. A., Dubois, A. E. J., van der Heide, S., Jansen, D. F., Hoijer, M. A., Kauffman, H. F. & Duiverman, E. J. (2006).** No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* **36**, 899–906.
- Brown, H. L., Hanman, K., Reuter, M., Betts, R. P. & van Vliet, A. H. M. (2015).** *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Front Microbiol* **6**, 699.
- Bu, L.-N., Chang, M.-H., Ni, Y.-H., Chen, H.-L. & Cheng, C.-C. (2007).** *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in children with chronic constipation. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc* **49**, 485–490.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J. & Kjelleberg, S. (2006).** Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3916–3923.

- Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T. & Sørensen, S. J. (2014).** Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol* **22**, 84–91.
- Burrows, L. L. (2012).** *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu Rev Microbiol* **66**, 493–520.
- Butel, M.-J. (2014).** Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine Mal Infect* **44**, 1–8.
- Caballero, S., Carter, R., Ke, X., Sušac, B., Leiner, I. M., Kim, G. J., Miller, L., Ling, L., Manova, K. & Pamer, E. G. (2015).** Distinct but Spatially Overlapping Intestinal Niches for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Pathog* **11**.
- Caballero-Franco, C., Keller, K., Simone, C. D. & Chadee, K. (2007).** The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **292**, G315–G322.
- Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R. & Grütter, M. G. (2006).** Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes Infect* **8**, 2284–2290.
- Del Carmen, S., de Moreno de LeBlanc, A., Martin, R., Chain, F., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G. & LeBlanc, J. G. (2014).** Genetically Engineered Immunomodulatory *Streptococcus thermophilus* Strains Producing Antioxidant Enzymes Exhibit Enhanced Anti-Inflammatory Activities. *Appl Environ Microbiol* **80**, 869–877.
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W. & Brandl, M. T. (2016).** Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol* **57**, 81–89.
- Castro, J., Henriques, A., Machado, A., Henriques, M., Jefferson, K. K. & Cerca, N. (2013).** Reciprocal interference between *Lactobacillus* spp. and *Gardnerella vaginalis* on initial adherence to epithelial cells. *Int J Med Sci* **10**, 1193–1198.
- Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J. B. & Jabbouri, S. (2007).** Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 125–132.
- Chang, H.-C., Lin, K.-H., Tai, Y.-T., Chen, J.-T. & Chen, R.-M. (2010).** Lipoteichoic acid-induced TNF- α and IL-6 gene expressions and oxidative stress production in macrophages are suppressed by ketamine through downregulating Toll-like receptor 2-mediated activation of ERK1/2 and NF κ B. *Shock Augusta Ga* **33**, 485–492.
- Characklis, W. (1973).** Attached microbial growths—II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res.*
- Chevance, F. F. V. & Hughes, K. T. (2008).** Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**, 455–465.
- Chew, S. Y., Cheah, Y. K., Seow, H. F., Sandai, D. & Than, L. T. L. (2015).** In vitro modulation of probiotic bacteria on the biofilm of *Candida glabrata*. *Anaerobe* **34**, 132–138.
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P. Ø., Høiby, N., Nielsen, T. E., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2013).** Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 2352–2361.
- Choi, A. H. K., Slamti, L., Avci, F. Y., Pier, G. B. & Maira-Litrán, T. (2009).** The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* **191**, 5953–5963.
- Chopra, L., Singh, G., Kumar Jena, K. & Sahoo, D. K. (2015).** Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci Reports* **5**.
- Christopher, A. B., Arndt, A., Cugini, C. & Davey, M. E. (2010).** A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiol Read Engl* **156**, 3469–3477.
- Chu, W., Zere, T. R., Weber, M. M., Wood, T. K., Whiteley, M., Hidalgo-Romano, B., Valenzuela, E. & McLean, R. J. C. (2012).** Indole Production Promotes *Escherichia coli*

- Mixed-Culture Growth with *Pseudomonas aeruginosa* by Inhibiting Quorum Signaling. *Appl Environ Microbiol* **78**, 411–419.
- Collado, M. C., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2007).** *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res Int* **40**, 629–636.
- Comelli, E. M., Guggenheim, B., Stengele, F. & Neeser, J.-R. (2002).** Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci* **110**, 218–224.
- Conlon, B. P., Rowe, S. E. & Lewis, K. (2015).** Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol* **831**, 1–9.
- Cordeiro, M. A., Werle, C. H., Milanez, G. P. & Yano, T. (2016).** Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Braz J Microbiol* **47**, 414–416.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C. & Gahan, C. G. M. (2007).** Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7617–7621.
- Costerton, J. W. (1995).** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**, 137–140.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. & Cheng, K. J. (1978).** How bacteria stick. *Sci Am* **238**, 86–95.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322.
- Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. (2013).** Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* **11**, 95–105.
- Crépin, S., Houle, S., Charbonneau, M.-È., Mourez, M., Harel, J. & Dozois, C. M. (2012).** Decreased Expression of Type 1 Fimbriae by a *pst* Mutant of Uropathogenic *Escherichia coli* Reduces Urinary Tract Infection. *Infect Immun* **80**, 2802–2815.
- Dang, H. & Lovell, C. R. (2016).** Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **80**, 91–138.
- Davies, D. G. & Marques, C. N. H. (2009).** A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J Bacteriol* **191**, 1393–1403.
- DeKeersmaecker, S. C. J. & Vanderleyden, J. (2003).** Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology* **149**, 1953–1956.
- Dhanani, A. S. & Bagchi, T. (2013).** *Lactobacillus plantarum* CS24.2 prevents *Escherichia coli* adhesion to HT-29 cells and also down-regulates enteropathogen-induced tumor necrosis factor- α and interleukin-8 expression. *Microbiol Immunol* **57**, 309–315.
- Diaz-Ochoa, V. E., Jellbauer, S., Klaus, S. & Raffatellu, M. (2014).** Transition metal ions at the crossroads of mucosal immunity and microbial pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* **4**.
- Domenech, M., Ramos-Sevillano, E., García, E., Moscoso, M. & Yuste, J. (2013).** Biofilm Formation Avoids Complement Immunity and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **81**, 2606–2615.
- Donlan, R. M. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**, 881–890.
- Doron, S. & Snydman, D. R. (2015).** Risk and Safety of Probiotics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **60**, S129–S134.
- Drago, L., Nicola, L., Iemoli, E., Banfi, G. & De Vecchi, E. (2010).** Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an *in vitro* model. *BMC Res Notes* **3**, 44.
- Drouault-Holowacz, S., Bieuvelet, S., Burckel, A., Cazaubiel, M., Dray, X. & Marteau, P. (2008).** A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. *Gastroentérologie Clin Biol* **32**, 147–152.
- Dusane, D. H., Damare, S. R., Nanchariah, Y. V., Ramaiah, N., Venugopalan, V. P., Kumar, A. R. & Zinjarde, S. S. (2013).** Disruption of Microbial Biofilms by an Extracellular Protein Isolated from Epibiotic Tropical Marine Strain of *Bacillus licheniformis*. *PLoS One* **8**.

- Eboigbodin, K. E., Newton, J. R. A., Routh, A. F. & Biggs, C. A. (2006).** Bacterial quorum sensing and cell surface electrokinetic properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 669–675.
- EFSA. (2011).** *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.*
- Ekmekci, H., Aslim, B. & Ozturk, S. (2009).** Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **53**, 59–65.
- Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R. & Morelli, L. (2000).** Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J Appl Microbiol* **88**, 695–703.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G. & other authors. (2013).** Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9066–9071.
- Evraud, B., Coudeyras, S., Dosgilbert, A., Charbonnel, N., Alamé, J., Tridon, A. & Forestier, C. (2011).** Dose-Dependent Immunomodulation of Human Dendritic Cells by the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One* **6**.
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Langen, M. L. & Madsen, K. L. (2008).** Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **295**, G1025–G1034.
- FAO-WHO. (2002).** *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada.: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group.
- Fetzner, S. (2015).** Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol*, Molecular Biotechnology: from enzymes and metabolically engineered microbes to superior and sustainable products and processes **201**, 2–14.
- Fey, P. D. (2010).** Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? *Curr Opin Microbiol, Antimicrobials/Genomics* **13**, 610–615.
- Flemming, H.-C. & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**, 623–633.
- Forestier, C., Guelon, D., Cluytens, V., Gillart, T., Sirot, J. & De Champs, C. (2008).** Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. *Crit Care* **12**, R69.
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H. & Hattori, M. (2012).** Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes* **3**, 449–454.
- Fuller, R. (1989).** Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**, 365–378.
- Fung, C.-P., Lin, Y.-T., Lin, J.-C., Chen, T.-L., Yeh, K.-M., Chang, F.-Y., Chuang, H.-C., Wu, H.-S., Tseng, C.-P. & Siu, L. K. (2012).** *Klebsiella pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. *Emerg Infect Dis* **18**, 1322–1325.
- Fux, C. A., Wilson, S. & Stoodley, P. (2004).** Detachment Characteristics and Oxacillin Resistance of *Staphylococcus aureus* Biofilm Emboli in an *In Vitro* Catheter Infection Model. *J Bacteriol* **186**, 4486–4491.
- Galdeano, C. M. & Perdigón, G. (2006).** The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clin Vaccine Immunol* **13**, 219–226.
- Ganguly, A., Zhang, H., Sharma, R., Parsons, S. & Patel, K. D. (2012).** Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Their Use in the Study of Neutrophil Transmigration Under Flow Conditions. *J Vis Exp JoVE*.
- Gao, X. W., Mubasher, M., Fang, C. Y., Reifer, C. & Miller, L. E. (2010).** Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus*

- casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *Am J Gastroenterol* **105**, 1636–1641.
- Ghigo, J.-M. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442–445.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A. & Nychas, G.-J. (2013).** Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. *PLoS One* **8**.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrød, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M. & other authors. (2015).** Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol* **6**.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**, 1401–1412.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Morselli, C., Poggioli, G., Tambasco, R., Calabrese, C., Brigidi, P., Vitali, B., Straforini, G. & Campieri, M. (2007).** High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis. *Dis Colon Rectum* **50**, 2075–2082; discussion 2082–2084.
- Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A. G. & De Antoni, G. L. (2007).** Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Int J Food Microbiol* **118**, 264–273.
- González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E. & Wood, T. K. (2006).** Autoinducer 2 Controls Biofilm Formation in *Escherichia coli* through a Novel Motility Quorum-Sensing Regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* **188**, 305–316.
- De Gregorio, P. R., Tomás, M. S. J., Terraf, M. C. L. & Nader-Macías, M. E. F. (2014).** *In vitro* and *in vivo* effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *J Med Microbiol* **63**, 685–696.
- Große, C., Scherer, J., Koch, D., Otto, M., Taudte, N. & Grass, G. (2006).** A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 120–131.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J. & Dobrindt, U. (2004).** Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. *J Bacteriol* **186**, 5432–5441.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C. & Margolles, A. (2013).** Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol* **4**.
- Guglielmetti, S., Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Zanoni, I., Stuknyte, M., Granucci, F., Karp, M. & Mora, D. (2010).** A Dairy Bacterium Displays *In Vitro* Probiotic Properties for the Pharyngeal Mucosa by Antagonizing Group A Streptococci and Modulating the Immune Response. *Infect Immun* **78**, 4734–4743.
- Guilhen, C., Charbonnel, N., Parisot, N., Gueguen, N., Iltis, A., Forestier, C. & Balestrino, D. (2016).** Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* **17**.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M. & Testoni, P. A. (2000).** *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **45**, 1462–1464.
- Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A. & García, P. (2014).** Effective Removal of Staphylococcal Biofilms by the Endolysin LysH5. *PLoS One* **9**.
- Hanke, M. L. & Kielian, T. (2012).** Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 62.
- Hao, Q., Lu, Z., Dong, B. R., Huang, C. Q. & Wu, T. (2011).** Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* CD006895.
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J. & Tolker-Nielsen, T. (2010).** An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 253–268.

- He, X., Tian, Y., Guo, L., Lux, R., Zusman, D. R. & Shi, W. (2010).** Oral-Derived Bacterial Flora Defends Its Domain by Recognizing and Killing Intruders—A Molecular Analysis Using *Escherichia coli* as a Model Intestinal Bacterium. *Microb Ecol* **60**, 655–664.
- He, X., McLean, J. S., Guo, L., Lux, R. & Shi, W. (2014).** The social structure of microbial community involved in colonization resistance. *ISME J* **8**, 564–574.
- Helaine, S. & Kugelberg, E. (2014).** Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends Microbiol* **22**, 417–424.
- Hemarajata, P. & Versalovic, J. (2013).** Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Ther Adv Gastroenterol* **6**, 39–51.
- Hendrickx, L., Hausner, M. & Wuertz, S. (2003).** Natural Genetic Transformation in Monoculture *Acinetobacter* sp. Strain BD413 Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1721–1727.
- Hennequin, C., Kauffmann-Lacroix, C., Jobert, A., Viard, J. P., Ricour, C., Jacquemin, J. L. & Berche, P. (2000).** Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **19**, 16–20.
- Henrici, A. T. (1933).** Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J Bacteriol* **25**, 277–287.
- Hermanns, M. I., Unger, R. E., Kehe, K., Peters, K. & Kirkpatrick, C. J. (2004).** Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier *in vitro*. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* **84**, 736–752.
- Hernández-Jiménez, E., del Campo, R., Toledano, V., Vallejo-Cremades, M. T., Muñoz, A., Largo, C., Arnalich, F., García-Rio, F., Cubillos-Zapata, C. & López-Collazo, E. (2013).** Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer? *Biochem Biophys Res Commun* **441**, 947–952.
- Heukenkian, H. & Heller, A. (1940).** Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth1. *J Bacteriol* **40**, 547–558.
- Hickson, M., D'Souza, A. L., Muthu, N., Rogers, T. R., Want, S., Rajkumar, C. & Bulpitt, C. J. (2007).** Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* **335**, 80.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J. & other authors. (2014).** Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 506–514.
- Holcombe, L. J., McAlester, G., Munro, C. A., Enjalbert, B., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., Ding, C., Butler, G., O'Gara, F. & Morrissey, J. P. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. *Microbiology* **156**, 1476–1486.
- Horie, M., Ishiyama, A., Fujihira-Ueki, Y., Sillanpää, J., Korhonen, T. k. & Toba, T. (2002).** Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J Appl Microbiol* **92**, 396–403.
- Irie, Y., O'toole, G. A. & Yuk, M. H. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 237–243.
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T. & Mizunoe, Y. (2010).** *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* **465**, 346–349.
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B. & Kaplan, J. B. (2008).** Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**, 470–476.
- Jacobsen, L., Wilcks, A., Hammer, K., Huys, G., Gevers, D. & Andersen, S. R. (2007).** Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus*

- plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 158–166.
- Jamet, A., Euphrasie, D., Martin, P. & Nassif, X. (2013).** Identification of Genes Involved in *Neisseria meningitidis* Colonization. *Infect Immun* **81**, 3375–3381.
- Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevich, H., Zabielski, R. & Grzesiuk, E. (2008).** Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol* **2008**, 357964.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K. & Axelsson, L. (2012).** *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **153**, 216–222.
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y. & Yu, W. (2011).** Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from Marine Bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One* **6**.
- Johnson, J. G. & Clegg, S. (2010).** Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **192**, 3944–3950.
- Johnson, J. G., Murphy, C. N., Sippy, J., Johnson, T. J. & Clegg, S. (2011).** Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **193**, 3453–3460.
- Johnson, L., Horsman, S. R., Charron-Mazenod, L., Turnbull, A. L., Mulcahy, H., Surette, M. G. & Lewenza, S. (2013).** Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* **13**, 115.
- Johnson-Henry, K. C., Hagen, K. E., Gordonpour, M., Tompkins, T. A. & Sherman, P. M. (2007).** Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol* **9**, 356–367.
- Jones, H. C., Roth, I. L. & Sanders, W. M. (1969).** Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *J Bacteriol* **99**, 316–325.
- Jones, M. L., Martoni, C. J. & Prakash, S. (2012a).** Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* **66**, 1234–1241.
- Jones, M. L., Martoni, C. J., Parent, M. & Prakash, S. (2012b).** Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br J Nutr* **107**, 1505–1513.
- Kajander, K., Myllyluoma, E., Rajilić-Stojanović, M., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M., Järvenpää, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Vapaatalo, H. & Korpela, R. (2008).** Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 48–57.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. & Isolauri, E. (2001).** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* **357**, 1076–1079.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H. & Isolauri, E. (2003).** Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* **361**, 1869–1871.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T. & Isolauri, E. (2007).** Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 1019–1021.
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. & Arul, V. (2011).** Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*. *Bioresour Technol* **102**, 4827–4833.
- Kaplan, J. B. (2009).** Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs* **32**, 545–554.

- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H. & Ramasubbu, N. (2004).** Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2633–2636.
- Karatan, E. & Watnick, P. (2009).** Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 310–347.
- Karlsson, C. L. J., Onnerfält, J., Xu, J., Molin, G., Ahrné, S. & Thorngren-Jerneck, K. (2012).** The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obes Silver Spring Md* **20**, 2257–2261.
- Karwacki, M. T., Kadouri, D. E., Bendaoud, M., Izano, E. A., Sampathkumar, V., Inzana, T. J. & Kaplan, J. B. (2013).** Antibiofilm activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 capsular polysaccharide. *PLoS ONE* **8**, e63844.
- Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2005).** Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a Cellulose-Degrading Community. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7099–7106.
- Keersmaecker, S. C. J. D., Varszegi, C., Boxel, N. van, Habel, L. W., Metzger, K., Daniels, R., Marchal, K., Vos, D. D. & Vanderleyden, J. (2005).** Chemical Synthesis of (S)-4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione, a Bacterial Signal Molecule Precursor, and Validation of Its Activity in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **280**, 19563–19568.
- Khater, F., Balestrino, D., Charbonnel, N., Dufayard, J. F., Brisse, S. & Forestier, C. (2015).** In silico analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS ONE* **10**, e0116215.
- Kim, H. G., Lee, S. Y., Kim, N. R., Lee, H. Y., Ko, M. Y., Jung, B. J., Kim, C. M., Lee, J. M., Park, J. H. & other authors. (2011).** *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid down-regulated *Shigella flexneri* peptidoglycan-induced inflammation. *Mol Immunol* **48**, 382–391.
- Kim, S.-K. & Lee, J.-H. (2016).** Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Seoul Korea* **54**, 71–85.
- Kim, W., Conery, A. L., Rajamuthiah, R., Fuchs, B. B., Ausubel, F. M. & Mylonakis, E. (2015).** Identification of an Antimicrobial Agent Effective against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Persisters Using a Fluorescence-Based Screening Strategy. *PLoS One* **10**.
- Kim, Y., Kim, S.-H., Whang, K.-Y., Kim, Y.-J. & Oh, S. (2008).** Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* **18**, 1278–1285.
- Kim, Y., Oh, S. & Kim, S. H. (2009).** Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 324–329.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M. & other authors. (2003).** Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1990–1995.
- Klerk, N. de, Maudsdotter, L., Gebreegziabher, H., Saroj, S. D., Eriksson, B., Eriksson, O. S., Roos, S., Lindén, S., Sjölinder, H. & Jonsson, A.-B. (2016).** Lactobacilli Reduce *Helicobacter pylori* Attachment to Host Gastric Epithelial Cells by Inhibiting Adhesion Gene Expression. *Infect Immun* **84**, 1526–1535.
- Klingberg, T. D., Pedersen, M. H., Cencic, A. & Budde, B. B. (2005).** Application of Measurements of Transepithelial Electrical Resistance of Intestinal Epithelial Cell Monolayers To Evaluate Probiotic Activity. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7528–7530.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R. & Losick, R. (2010).** D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science* **328**, 627–629.
- Korem, M., Sheoran, A. S., Gov, Y., Tzipori, S., Borovok, I. & Balaban, N. (2003).** Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **223**, 167–175.

- Kouzel, N., Oldewurtel, E. R. & Maier, B. (2015).** Gene Transfer Efficiency in Gonococcal Biofilms: Role of Biofilm Age, Architecture, and Pilin Antigenic Variation. *J Bacteriol* **197**, 2422–2431.
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. & Qi, F. (2005a).** Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm. *J Bacteriol* **187**, 7193–7203.
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. & Qi, F. (2005b).** Coordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. *Mol Microbiol* **57**, 392–404.
- Kreth, J., Zhang, Y. & Herzberg, M. C. (2008).** Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **190**, 4632–4640.
- Ku, W., Lau, D. & Huen, K. (2006).** Probiotics Provoked D-lactic Acidosis in Short Bowel Syndrome: Case Report and Literature Review. *HK J Paediatr*.
- Kulkarni, H. S. & Khoury, C. C. (2014).** Sepsis associated with *Lactobacillus* bacteremia in a patient with ischemic colitis. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med* **18**, 606–608.
- Kumar Shukla, S. & Rao, T. S. (2013).** Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *J Antibiot (Tokyo)* **66**, 55–60.
- Kuramitsu, H. K., He, X., Lux, R., Anderson, M. H. & Shi, W. (2007).** Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **71**, 653–670.
- Kvist, M., Hancock, V. & Klemm, P. (2008).** Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7376–7382.
- Kwon, H.-K., Lee, C.-G., So, J.-S., Chae, C.-S., Hwang, J.-S., Sahoo, A., Nam, J. H., Rhee, J. H., Hwang, K.-C. & Im, S.-H. (2010).** Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2159–2164.
- Lam, H., Oh, D.-C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., de Pedro, M. A. & Waldor, M. K. (2009).** D-amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Re-Modeling in Bacteria. *Science* **325**, 1552–1555.
- Lasa, I. (2006).** Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* **9**, 21–28.
- Lasa, I. & Penadés, J. R. (2006).** Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**, 99–107.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. & Beloin, C. (2014).** Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **78**, 510–543.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Fadda, A. A., Marchal, K. & Vanderleyden, J. (2007).** Functional Analysis of luxS in the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG Reveals a Central Metabolic Role Important for Growth and Biofilm Formation. *J Bacteriol* **189**, 860–871.
- LeBlanc, J. G., del Carmen, S., Miyoshi, A., Azevedo, V., Sesma, F., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., Watterlot, L., Perdigon, G. & de Moreno de LeBlanc, A. (2011).** Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. *J Biotechnol* **151**, 287–293.
- Lecuyer, S., Rusconi, R., Shen, Y., Forsyth, A., Vlamakis, H., Kolter, R. & Stone, H. A. (2011).** Shear Stress Increases the Residence Time of Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J* **100**, 341–350.
- Lee, I.-A. & Kim, D.-H. (2011).** *Klebsiella pneumoniae* increases the risk of inflammation and colitis in a murine model of intestinal bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **46**, 684–693.

- Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S. & Rice, S. A. (2014).** Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J* **8**, 894–907.
- Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R. & Jeffers, A. K. (2005).** The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. *J Immunol* **175**, 7512–7518.
- Lemon, K. P., Earl, A. M., Vlamakis, H. C., Aguilar, C. & Kolter, R. (2008).** Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 1–16.
- Li, J., Attila, C., Wang, L., Wood, T. K., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2007).** Quorum Sensing in *Escherichia coli* Is Signaled by AI-2/LsrR: Effects on Small RNA and Biofilm Architecture. *J Bacteriol* **189**, 6011–6020.
- Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., Jiang, M. & Dong, M. (2014).** Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. *LWT - Food Sci Technol* **59**, 732–739.
- Li, Y.-H., Lau, P. C. Y., Lee, J. H., Ellen, R. P. & Cvitkovitch, D. G. (2001).** Natural Genetic Transformation of *Streptococcus mutans* Growing in Biofilms. *J Bacteriol* **183**, 897–908.
- Li, Y., Du, Y., Ye, J., Wang, B. & Liu, Y. (2016).** [Effect of extracellular DNA on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm under sucrose environment]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi Chin J Stomatol* **51**, 81–86.
- Liang, Z.-X. (2015).** The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Nat Prod Rep* **32**, 663–683.
- Liao, S., Klein, M. I., Heim, K. P., Fan, Y., Bitoun, J. P., Ahn, S.-J., Burne, R. A., Koo, H., Brady, L. J. & Wen, Z. T. (2014).** *Streptococcus mutans* Extracellular DNA Is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the Protein Secretion Machinery. *J Bacteriol* **196**, 2355–2366.
- Lichtenstein, L., Avni-Biron, I. & Ben-Bassat, O. (2016).** Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, Pre- and Probiotics in Gastroenterology Practice **30**, 81–88.
- Lilly, D. M. & Stillwell, R. H. (1965).** Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**, 747–748.
- Lin, H.-C., Su, B.-H., Chen, A.-C., Lin, T.-W., Tsai, C.-H., Yeh, T.-F. & Oh, W. (2005).** Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* **115**, 1–4.
- Lin, X., Chen, X., Chen, Y., Jiang, W. & Chen, H. (2015).** The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis* **21**, e128–e134.
- Liu, J., Ling, J.-Q., Zhang, K. & Wu, C. D. (2013).** Physiological properties of *Streptococcus mutans* UA159 biofilm-detached cells. *FEMS Microbiol Lett* **340**, 11–18.
- Macfarlane, S. & Dillon, J. f. (2007).** Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* **102**, 1187–1196.
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H. & Sørensen, S. J. (2012).** The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* **65**, 183–195.
- Mah, T. F. & O'Toole, G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34–39.
- Mairey, E., Genovesio, A., Donnadieu, E., Bernard, C., Jaubert, F., Pinard, E., Seylaz, J., Olivo-Marin, J.-C., Nassif, X. & Duménil, G. (2006).** Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood–brain barrier. *J Exp Med* **203**, 1939–1950.
- Malchow, H. A. (1997).** Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* **25**, 653–658.

- Mangalappalli-Illathu, A. K., Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W. & Korber, D. R. (2008).** Architectural adaptation and protein expression patterns of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* biofilms under laminar flow conditions. *Int J Food Microbiol* **123**, 109–120.
- Marquès, C., Tasse, J., Pracros, A., Collin, V., Franceschi, C., Laurent, F., Chatellier, S. & Forestier, C. (2015).** Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *J Med Microbiol* **64**, 1021–1026.
- Marques, C. N. H., Davies, D. G. & Sauer, K. (2015).** Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid. *Pharmaceuticals (Basel)* **8**, 816–835.
- Marteau, P. (2001).** Safety aspects of probiotic products. *Food Nutr Res* **45**, 22–24.
- Martín, R., Martín, R., Chain, F., Chain, F., Miquel, S., Miquel, S., Natividad, J. M., Natividad, J. M., Sokol, H. & other authors. (2014).** Effects in the use of a genetically engineered strain of *Lactococcus lactis* delivering in situ IL-10 as a therapy to treat low-grade colon inflammation. *Hum Vaccines Immunother* **10**, 1611–1621.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D. & de Souza Oliveira, R. P. (2013).** Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol Adv* **31**, 482–488.
- Martinez, R. C. R., Franceschini, S. A., Patta, M. C., Quintana, S. M., Candido, R. C., Ferreira, J. C., De Martinis, E. C. P. & Reid, G. (2009a).** Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Lett Appl Microbiol* **48**, 269–274.
- Martinez, R. C. R., Franceschini, S. A., Patta, M. C., Quintana, S. M., Gomes, B. C., De Martinis, E. C. P. & Reid, G. (2009b).** Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Microbiol* **55**, 133–138.
- Matsukawa, M. & Greenberg, E. P. (2004).** Putative Exopolysaccharide Synthesis Genes Influence *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J Bacteriol* **186**, 4449–4456.
- Mayeur, C., Gratadoux, J.-J., Bridonneau, C., Chegdani, F., Larroque, B., Kapel, N., Corcos, O., Thomas, M. & Joly, F. (2013).** Faecal D/L Lactate Ratio Is a Metabolic Signature of Microbiota Imbalance in Patients with Short Bowel Syndrome. *PLoS One* **8**.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. (2012).** Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* **10**, 39–50.
- McFarland, L. V. (2006).** Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* **101**, 812–822.
- McGroarty, J. A. & Reid, G. (1988).** Detection of a *Lactobacillus* substance that inhibits *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **34**, 974–978.
- McMillan, A., Dell, M., Zellar, M. P., Cribby, S., Martz, S., Hong, E., Fu, J., Abbas, A., Dang, T. & other authors. (2011).** Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids Surf B Biointerfaces* **86**, 58–64.
- McNab, R., Ford, S. K., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G. S. & Lamont, R. J. (2003).** LuxS-Based Signaling in *Streptococcus gordonii*: Autoinducer 2 Controls Carbohydrate Metabolism and Biofilm Formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **185**, 274–284.
- Meini, S., Laureano, R., Fani, L., Tascini, C., Galano, A., Antonelli, A. & Rossolini, G. M. (2015).** Breakthrough *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in an adult patient with severe active ulcerative colitis: case report and review of the literature. *Infection* **43**, 777–781.
- Mercanti, D. J., Rousseau, G. M., Capra, M. L., Quiberoni, A., Tremblay, D. M., Labrie, S. J. & Moineau, S. (2015).** Genomic Diversity of Phages Infecting Probiotic Strains of *Lactobacillus paracasei*. *Appl Environ Microbiol* **82**, 95–105.

- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.-M. & Dousset, X. (2013).** *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol* **36**, 296–304.
- Metchnikoff, I. I. (1907).** *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. Reprinted by Springer Publishing Company (2004).
- Miele, E., Pascarella, F., Giannetti, E., Quaglietta, L., Baldassano, R. N. & Staiano, A. (2009).** Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* **104**, 437–443.
- Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L., Chatel, J., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J. & Langella, P. (2013).** *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*, Ecology and industrial microbiology • Special Section: Innate immunity **16**, 255–261.
- Miquel, S., Martín, R., Lashermes, A., Gillet, M., Meleine, M., Gelot, A., Eschalier, A., Ardid, D., Bermúdez-Humarán, L. G. & other authors. (2016).** Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Reports* **6**.
- Miyazaki, Y., Kamiya, S., Hanawa, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Takahashi, H. & Yokota, H. (2010).** Effect of probiotic bacterial strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* on enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother* **16**, 10–18.
- Moayyedi, P., Ford, A. C., Talley, N. J., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A. E., Brandt, L. J. & Quigley, E. M. M. (2010).** The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* **59**, 325–332.
- Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003).** Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 255–261.
- De Moreno de LeBlanc, A., del Carmen, S., Chatel, J.-M., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Berm
 dez-Humará, N., L. G. & other authors. (2015).** Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models, Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterol Res Pr Gastroenterol Res Pr* **2015**, 2015, e146972.
- Morrow, L. E., Kollef, M. H. & Casale, T. B. (2010).** Probiotic Prophylaxis of Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 1058–1064.
- Motta, J.-P., Bermúdez-Humarán, L. G., Deraison, C., Martin, L., Rolland, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K. & other authors. (2012).** Food-Grade Bacteria Expressing Elafin Protect Against Inflammation and Restore Colon Homeostasis. *Sci Transl Med* **4**, 158ra144–158ra144.
- Motta, J., Magne, L., Descamps, D., Rolland, C., Squarzoni-Dale, C., Rousset, P., Martin, L., Cenac, N., Balloy, V. & other authors. (2011).** Modifying the Protease, Antiprotease Pattern by Elafin Overexpression Protects Mice From Colitis. *Gastroenterology* **140**, 1272–1282.
- Munakata, S., Arakawa, C., Kohira, R., Fujita, Y., Fuchigami, T. & Mugishima, H. (2010).** A case of D-lactic acid encephalopathy associated with use of probiotics. *Brain Dev* **32**, 691–694.
- Murphy, C. N. & Clegg, S. (2012).** *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol* **7**, 991–1002.
- Murphy, C. N., Mortensen, M. S., Krogfelt, K. A. & Clegg, S. (2013).** Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect Immun* **81**, 3009–3017.
- Nader-Macías, M. E. F. & Juárez Tomás, M. S. (2015).** Profiles and technological requirements of urogenital probiotics. *Adv Drug Deliv Rev, Vaginal Drug Delivery* **92**, 84–104.

- Nagaoka, S., Hojo, K., Murata, S., Mori, T., Ohshima, T. & Maeda, N. (2008).** Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: *in vitro* coaggregation and coadhesion assays. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 183–189.
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K. & Andes, D. (2007).** Beta -1,3 glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *J Infect Dis* **195**, 1705–1712.
- Nguyen, U. T. & Burrows, L. L. (2014).** DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int J Food Microbiol* **187**, 26–32.
- Nielsen, A. T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K. B. & Molin, S. (2000).** Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol* **2**, 59–68.
- Niers, L. E. M., Hoekstra, M. O., Timmerman, H. M., van Uden, N. O., de Graaf, P. M. A., Smits, H. H., Kimpen, J. L. L. & Rijkers, G. T. (2007).** Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **149**, 344–352.
- Nijland, R., Hall, M. J. & Burgess, J. G. (2010).** Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. *PLoS One* **5**.
- Nitschke, M., Araújo, L. V., Costa, S. G. V. a. O., Pires, R. C., Zeraik, A. E., Fernandes, A. C. L. B., Freire, D. M. G. & Contiero, J. (2009).** Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Lett Appl Microbiol* **49**, 241–247.
- Bin-Nun, A., Bromiker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M. & Hammerman, C. (2005).** Oral Probiotics Prevent Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Neonates. *J Pediatr* **147**, 192–196.
- Nur, A., Hirota, K., Yumoto, H., Hirao, K., Liu, D., Takahashi, K., Murakami, K., Matsuo, T., Shu, R. & Miyake, Y. (2013).** Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm. *J Appl Microbiol* **115**, 260–270.
- O'Gara, J. P. (2007).** ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **270**, 179–188.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D. A. & O'Gara, J. P. (2007).** Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infections. *J Clin Microbiol* **45**, 1379–1388.
- Oelschlaeger, T. A. (2010).** Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int J Med Microbiol*, Microbe-host interaction in chronic diseases **300**, 57–62.
- Ogawa, A., Furukawa, S., Fujita, S., Mitobe, J., Kawarai, T., Narisawa, N., Sekizuka, T., Kuroda, M., Ochiai, K. & other authors. (2011).** Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Formation by Streptococcus salivarius FruA. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1572–1580.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. & Takeda, Y. (2001).** Protective Effect of *Lactobacillus casei* Strain Shirota on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Infant Rabbits. *Infect Immun* **69**, 1101–1108.
- Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K. & Mizunoe, Y. (2013).** Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 5572–5579.
- Ong, C. Y., Beatson, S. A., Totsika, M., Forestier, C., McEwan, A. G. & Schembri, M. A. (2010).** Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiol* **10**, 183.
- Parker, R. . (1974).** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Heal*.
- Pereira, C. S., de Regt, A. K., Brito, P. H., Miller, S. T. & Xavier, K. B. (2009).** Identification of Functional LsrB-Like Autoinducer-2 Receptors. *J Bacteriol* **191**, 6975–6987.

- Pereira, C. S., Thompson, J. A. & Xavier, K. B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 156–181.
- Perez, R. H., Zendo, T. & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Factories* **13**, S3.
- Periasamy, S., Nair, H. A. S., Lee, K. W. K., Ong, J., Goh, J. Q. J., Kjelleberg, S. & Rice, S. A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exopolysaccharides are important for mixed species biofilm community development and stress tolerance. *Front Microbiol* **6**.
- Petricevic, L. & Witt, A. (2008). The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* **115**, 1369–1374.
- Pibalpakdee, P., Wongratanacheewin, S., Taweechaisupapong, S. & Niumsup, P. R. (2012). Diffusion and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **39**, 356–359.
- Ponomarova, O. & Patil, K. R. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: untangling the Gordian knot. *Curr Opin Microbiol, Antimicrobials • Microbial systems biology* **27**, 37–44.
- Popova, M., Molimard, P., Courau, S., Crociani, J., Dufour, C., Le Vacon, F. & Carton, T. (2012). Beneficial effects of probiotics in upper respiratory tract infections and their mechanical actions to antagonize pathogens. *J Appl Microbiol* **113**, 1305–1318.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285–293.
- Prince, T., McBain, A. J. & O'Neill, C. A. (2012). *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-Induced Cell Death by Competitive Exclusion. *Appl Environ Microbiol* **78**, 5119–5126.
- Pultz, I. S., Christen, M., Kulasekara, H. D., Kennard, A., Kulasekara, B. & Miller, S. I. (2012). The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* **86**, 1424–1440.
- Purschke, F. G., Hiller, E., Trick, I. & Rupp, S. (2012). Flexible Survival Strategies of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms Result in Increased Fitness Compared with *Candida albicans*. *Mol Cell Proteomics MCP* **11**, 1652–1669.
- Qi, F., Chen, P. & Caufield, P. W. (2000). Purification and Biochemical Characterization of Mutacin I from the Group I Strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and Genetic Analysis of Mutacin I Biosynthesis Genes. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3221–3229.
- Qiao, H., Duffy, L. C., Griffiths, E., Dryja, D., Leavens, A., Rossman, J., Rich, G., Riepenhoff-Talty, M. & Locniskar, M. (2002). Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatr Res* **51**, 750–755.
- Qin, Z., Yang, L., Qu, D., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **155**, 2148–2156.
- Quinn, G. A., Maloy, A. P., Banat, M. M. & Banat, I. M. (2013). A Comparison of Effects of Broad-Spectrum Antibiotics and Biosurfactants on Established Bacterial Biofilms. *Curr Microbiol* **67**, 614–623.
- Raffa, R. B., Iannuzzo, J. R., Levine, D. R., Saeid, K. K., Schwartz, R. C., Sucic, N. T., Terleckyj, O. D. & Young, J. M. (2005). Bacterial Communication ('Quorum Sensing') via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 417–423.
- RAISIN. (2012). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements d'hospitalisation à domicile (HAD), France, mai-juin 2012 / 2015 / Maladies infectieuses / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil.

- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F. & Jespersen, L. (2013).** Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol* **36**, 22–29.
- Ramsey, M. M., Rumbaugh, K. P. & Whiteley, M. (2011).** Metabolite Cross-Feeding Enhances Virulence in a Model Polymicrobial Infection. *PLoS Pathog* **7**.
- Regueiro, V., Moranta, D., Campos, M. A., Margareto, J., Garmendia, J. & Bengoechea, J. A. (2009).** *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect Immun* **77**, 714–724.
- Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Li, X., Tian, M., Du, S., Guo, H., Liu, C. & other authors. (2012).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe* **18**, 508–515.
- Ren, D.-Y., Li, C., Qin, Y.-Q., Yin, R.-L., Du, S.-W., Ye, F., Liu, H.-F., Wang, M.-P., Sun, Y. & other authors. (2013).** Lactobacilli reduce chemokine IL-8 production in response to TNF- α and *Salmonella* challenge of Caco-2 cells. *BioMed Res Int* **2013**, 925219.
- Rendueles, O. & Ghigo, J.-M. (2015).** Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiol Spectr* **3**.
- Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E. & Ghigo, J.-M. (2011).** Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. *MBio* **2**, e00043–00011.
- Rendueles, O., Beloin, C., Latour-Lambert, P. & Ghigo, J.-M. (2014).** A new biofilm-associated colicin with increased efficiency against biofilm bacteria. *ISME J* **8**, 1275–1288.
- Rezzonico, F., Smits, T. H. M. & Duffy, B. (2012).** Detection of AI-2 Receptors in Genomes of Enterobacteriaceae Suggests a Role of Type-2 Quorum Sensing in Closed Ecosystems. *Sensors* **12**, 6645–6665.
- De Rienzo, M. A. D. & Martin, P. J. (2016).** Effect of Mono and Di-rhamnolipids on Biofilms Performed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr Microbiol* **73**, 183–189.
- Rieu, A., Aoudia, N., Jegou, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandet, R., Deschamps, J., Gasquet, B., Monedero, V. & other authors. (2014).** The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell Microbiol* **16**, 1836–1853.
- Rios-Covian, D., Gueimonde, M., Duncan, S. H., Flint, H. J. & de los Reyes-Gavilan, C. G. (2015).** Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiol Lett* **362**.
- Rizzo, A., Losacco, A., Carratelli, C. R., Domenico, M. D. & Bevilacqua, N. (2013a).** *Lactobacillus plantarum* reduces *Streptococcus pyogenes* virulence by modulating the IL-17, IL-23 and Toll-like receptor 2/4 expressions in human epithelial cells. *Int Immunopharmacol* **17**, 453–461.
- Rizzo, A., Losacco, A. & Carratelli, C. R. (2013b).** *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human β -defensins 2 and 3. *Immunol Lett* **156**, 102–109.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J. & Oliveira, R. (2006).** Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* **57**, 609–618.
- Römling, U. & Galperin, M. Y. (2015).** Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol* **23**, 545–557.
- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S. D., Michaelsen, K. F., Jeppesen, D. L., Valerius, N. H. & Paerregaard, A. (2003).** Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 389–395.
- Roux, A. & Ghigo, J. M. (2006).** Bacterial biofilms.
- Roux, D., Cywes-Bentley, C., Zhang, Y.-F., Pons, S., Konkol, M., Kearns, D. B., Little, D. J., Howell, P. L., Skurnik, D. & Pier, G. B. (2015).** Identification of Poly-N-acetylglucosamine

- as a Major Polysaccharide Component of the *Bacillus subtilis* Biofilm Matrix. *J Biol Chem* **290**, 19261–19272.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G. & Salminen, S. (2006).** Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J Food Prot* **69**, 2011–2015.
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P. & Thomas, M. (2011).** Impact of the Metabolic Activity of *Streptococcus thermophilus* on the Colon Epithelium of Gnotobiotic Rats. *J Biol Chem* **286**, 10288–10296.
- Rumbo-Feal, S., Gómez, M. J., Gayoso, C., Álvarez-Fraga, L., Cabral, M. P., Aransay, A. M., Rodríguez-Ezpeleta, N., Fullaondo, A., Valle, J. & other authors. (2013).** Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. *PLoS One* **8**.
- Sahu, P. K., Iyer, P. S., Oak, A. M., Pardesi, K. R. & Chopade, B. A. (2012).** Characterization of eDNA from the Clinical Strain *Acinetobacter baumannii* AIIMS 7 and Its Role in Biofilm Formation. *Sci World J* **2012**.
- Salehi, R., Savabi, O., Kazemi, M., Kamali, S., Salehi, A. R., Eslami, G. & Tahmourespour, A. (2014).** Effects of *Lactobacillus reuteri*-derived biosurfactant on the gene expression profile of essential adhesion genes (*gtfB*, *gtfC* and *ftf*) of *Streptococcus mutans*. *Adv Biomed Res* **3**, 169.
- Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S. & Paranavitana, C. (2014).** Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol* **14**, 197.
- Sanchez, C. J., Prieto, E. M., Krueger, C. A., Zienkiewicz, K. J., Romano, D. R., Ward, C. L., Akers, K. S., Guelcher, S. A. & Wenke, J. C. (2013).** Effects of local delivery of D-amino acids from biofilm-dispersive scaffolds on infection in contaminated rat segmental defects. *Biomaterials* **34**, 7533–7543.
- Dos Santos Goncalves, M., Delattre, C., Balestrino, D., Charbonnel, N., Elboutachfaite, R., Wadouachi, A., Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P. & Forestier, C. (2014).** Anti-Biofilm Activity: A Function of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide. *PLoS One* **9**.
- Saunders, S., Bocking, A., Challis, J. & Reid, G. (2007).** Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces* **55**, 138–142.
- Savabi, O., Kazemi, M., Kamali, S., Salehi, A. R., Eslami, G., Tahmourespour, A. & Salehi, R. (2014).** Effects of biosurfactant produced by *Lactobacillus casei* on *gtfB*, *gtfC*, and *ftf* gene expression level in *S. mutans* by real-time RT-PCR. *Adv Biomed Res* **3**, 231.
- Sayem, S. A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., De Felice, M. & Varcamonti, M. (2011).** Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Factories* **10**, 74.
- Schaik, E. J. van, Giltner, C. L., Audette, G. F., Keizer, D. W., Bautista, D. L., Slupsky, C. M., Sykes, B. D. & Irvin, R. T. (2005).** DNA Binding: a Novel Function of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili. *J Bacteriol* **187**, 1455–1464.
- Scherr, T. D., Hanke, M. L., Huang, O., James, D. B. A., Horswill, A. R., Bayles, K. W., Fey, P. D., Torres, V. J. & Kielian, T. (2015).** *Staphylococcus aureus* Biofilms Induce Macrophage Dysfunction Through Leukocidin AB and Alpha-Toxin. *MBio* **6**.
- Schlee, M., Harder, J., Köten, B., Stange, E. F., Wehkamp, J. & Fellermann, K. (2008).** Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β-defensin 2. *Clin Exp Immunol* **151**, 528–535.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F. & Fellermann, K. (2007).** Induction of Human β-Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infect Immun* **75**, 2399–2407.
- Schmidt, N. W., Deshayes, S., Hawker, S., Blacker, A., Kasko, A. M. & Wong, G. C. L. (2014).** Engineering Persister-Specific Antibiotics with Synergistic Antimicrobial Functions. *ACS Nano* **8**, 8786–8793.

- Scott, K. P., Antoine, J.-M., Midtvedt, T. & van Hemert, S. (2015). Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microb Ecol Heal Dis* **26**.
- Selden, R., Lee, S., Wang, W. L., Bennett, J. V. & Eickhoff, T. C. (1971). Nosocomial *klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. *Ann Intern Med* **74**, 657–664.
- Shao, H., Lamont, R. J. & Demuth, D. R. (2007). Autoinducer 2 Is Required for Biofilm Growth of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **75**, 4211–4218.
- Shokouhfard, M., Kermanshahi, R. K., Shahandashti, R. V., Feizabadi, M. M. & Teimourian, S. (2015). The inhibitory effect of a *Lactobacillus acidophilus* derived biosurfactant on biofilm producer *Serratia marcescens*. *Iran J Basic Med Sci* **18**, 1001–1007.
- Shu, Q. & Gill, H. S. (2001). A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **189**, 147–152.
- Silva, S. D., Robbe-Masselot, C., Ait-Belgnaoui, A., Mancuso, A., Mercade-Loubière, M., Salvador-Cartier, C., Gillet, M., Ferrier, L., Loubière, P. & other authors. (2014). Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **307**, G420–G429.
- Sivignon, A., de Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P. & Darfeuille-Michaud, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **21**, 276–286.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P. & other authors. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16731–16736.
- Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L. & Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J Lab Autom* **20**, 107–126.
- Srivastava, D., Hsieh, M.-L., Khataokar, A., Neiditch, M. B. & Waters, C. M. (2013). Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. *Mol Microbiol* **90**, 1262–1276.
- Stahlhut, S. G., Struve, C., Krogfelt, K. A. & Reisner, A. (2012). Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* **65**, 350–359.
- Stewart, P. S. & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199–210.
- Stewart, P. S. & William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* **358**, 135–138.
- Stickler, D. J. (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol* **5**, 598–608.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. d. & Lappin-Scott, H. m. (1998). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol* **85**, 19S–28S.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S. & Klapper, I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**, 361–367.
- Sudha, M. R. & Maurya, A. K. (2012). Effect of oral supplementation of the probiotic capsule UB-01BV in the treatment of patients with bacterial vaginosis. *Benef Microbes* **3**, 151–155.
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K.-I., Tajima, A., Iwase, T. & Mizunoe, Y. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol* **195**, 1645–1655.
- Sun, Z., He, X., Brancaccio, V. F., Yuan, J. & Riedel, C. U. (2014). Bifidobacteria exhibit LuxS-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation. *PLoS ONE* **9**, e88260.

- Svensson, S. L., Pryjma, M. & Gaynor, E. C. (2014). Flagella-Mediated Adhesion and Extracellular DNA Release Contribute to Biofilm Formation and Stress Tolerance of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* **9**.
- Sýkora, J., Valecková, K., Amlerová, J., Siala, K., Dedek, P., Watkins, S., Varvarovská, J., Stozický, F., Pazdiora, P. & Schwarz, J. (2005). Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol* **39**, 692–698.
- Szajewska, H. & Kołodziej, M. (2015a). Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* **42**, 793–801.
- Szajewska, H. & Kołodziej, M. (2015b). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Aliment Pharmacol Ther* **42**, 1149–1157.
- Tahmourespour, A., Salehi, R. & Kasra Kermanshahi, R. (2011). *Lactobacillus Acidophilus*-Derived Biosurfactant Effect on GTFB and GTFC Expression Level in *Streptococcus Mutans* Biofilm Cells. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol* **42**, 330–339.
- Tamura, S., Yonezawa, H., Motegi, M., Nakao, R., Yoneda, S., Watanabe, H., Yamazaki, T. & Senpu, H. (2009). Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **24**, 152–161.
- Tan, J. W. H., Wilksch, J. J., Hocking, D. M., Wang, N., Srikhanta, Y. N., Tauschek, M., Lithgow, T., Robins-Browne, R. M., Yang, J. & Strugnell, R. A. (2015). Positive autoregulation of mrkHI by the cyclic di-GMP-dependent MrkH protein in the biofilm regulatory circuit of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **197**, 1659–1667.
- Tang, J., Kang, M., Chen, H., Shi, X., Zhou, R., Chen, J. & Du, Y. (2011). The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Sci China Life Sci* **54**, 863–869.
- Tannock, G. W., Ghazally, S., Walter, J., Loach, D., Brooks, H., Cook, G., Surette, M., Simmers, C., Bremer, P. & other authors. (2005). Ecological Behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 Is Affected by Mutation of the luxS Gene. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8419–8425.
- Taverniti, V. & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* **6**, 261–274.
- Taverniti, V., Stuknyte, M., Minuzzo, M., Arioli, S., De Noni, I., Scabiosi, C., Cordova, Z. M., Junntila, I., Hämäläinen, S. & other authors. (2013). S-Layer Protein Mediates the Stimulatory Effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on Innate Immunity. *Appl Environ Microbiol* **79**, 1221–1231.
- Terraf, M. C. L., Tomás, M. S. J., Rault, L., Loir, Y. L., Even, S. & Nader-Macías, M. E. F. (2016). Biofilms of vaginal *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1332: kinetics of formation and matrix characterization. *Arch Microbiol* **1–12**.
- Thakur, B. K., Saha, P., Banik, G., Saha, D. R., Grover, S., Batish, V. K. & Das, S. (2016). Live and heat-killed probiotic *Lactobacillus casei* Lbs2 protects from experimental colitis through Toll-like receptor 2-dependent induction of T-regulatory response. *Int Immunopharmacol* **36**, 39–50.
- Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M.-L., Gitton, C., Chevret, D., Langella, P., Mayeur, C., Cherbuy, C. & Rul, F. (2011). Carbohydrate Metabolism Is Essential for the Colonization of *Streptococcus thermophilus* in the Digestive Tract of Gnotobiotic Rats. *PLoS One* **6**.

- Thomas, V. C., Thurlow, L. R., Boyle, D. & Hancock, L. E. (2008).** Regulation of Autolysis-Dependent Extracellular DNA Release by *Enterococcus faecalis* Extracellular Proteases Influences Biofilm Development. *J Bacteriol* **190**, 5690–5698.
- Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., Engebretsen, I. L., Bayles, K. W., Horswill, A. R. & Kielian, T. (2011).** *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol Baltim Md 1950* **186**, 6585–6596.
- Tissier, H. (1906).** Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin. *Comptes Rendus Soc Biol.*
- Tong, H., Chen, W., Merritt, J., Qi, F., Shi, W. & Dong, X. (2007a).** *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H₂O₂: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Mol Microbiol* **63**, 872–880.
- Tong, J. L., Ran, Z. H., Shen, J., Zhang, C. X. & Xiao, S. D. (2007b).** Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* **25**, 155–168.
- Trejo-Hernández, A., Andrade-Domínguez, A., Hernández, M. & Encarnación, S. (2014).** Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans*–*Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. *ISME J* **8**, 1974–1988.
- Tremblay, Y. D. N., Hathrouri, S. & Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res* **78**, 110–116.
- Tsata, V., Velegaki, A., Ioannidis, A., Poulopoulou, C., Bagos, P., Magana, M. & Chatzipanagiotou, S. (2016).** Effects of Yeast and Bacterial Commensals and Pathogens of the Female Genital Tract on the Transepithelial Electrical Resistance of HeLa Cells. *Open Microbiol J* **10**, 90–96.
- Tsilingiri, K. & Rescigno, M. (2013).** Postbiotics: what else? *Benef Microbes* **4**, 101–107.
- Turonova, H., Neu, T. R., Ulbrich, P., Pazlarova, J. & Tresse, O. (2016).** The biofilm matrix of *Campylobacter jejuni* determined by fluorescence lectin-binding analysis. *Biofouling* **32**, 597–608.
- Tursi, A., Brandimarte, G., Papa, A., Giglio, A., Elisei, W., Giorgetti, G. M., Forti, G., Morini, S., Hassan, C. & other authors. (2010).** Treatment of Relapsing Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis With the Probiotic VSL#3 as Adjunctive to a Standard Pharmaceutical Treatment: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Am J Gastroenterol* **105**, 2218–2227.
- Tuson, H. H. & Weibel, D. B. (2013).** Bacteria-surface interactions. *Soft Matter* **9**, 4368–4380.
- UE. (2006).** *Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods.*
- UE. (2007).** *Réglementation concernant les nouveaux aliments 258/97.*
- Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A. & other authors. (2007).** Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity. *PLoS ONE* **2**.
- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., Kadosh, D. & Lopez-Ribot, J. L. (2010).** Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog* **6**, e1000828.
- Vahabnezhad, E., Mochon, A. B., Wozniak, L. J. & Ziring, D. A. (2013).** *Lactobacillus* bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* **47**, 437–439.
- Valdés-Varela, L., Alonso-Guervos, M., García-Suárez, O., Gueimonde, M. & Ruas-Madiedo, P. (2016).** Screening of Bifidobacteria and Lactobacilli Able to Antagonize the Cytotoxic Effect of *Clostridium difficile* upon Intestinal Epithelial HT29 Monolayer. *Front Microbiol* **7**.

- Valle, J., Re, S. D., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P. & Ghigo, J.-M. (2006).** Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 12558–12563.
- Varankovich, N. V., Nickerson, M. T. & Korber, D. R. (2015).** Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. *Front Microbiol* **6**.
- Van der Veen, S. & Abee, T. (2011).** Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *Int J Food Microbiol* **144**, 421–431.
- Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C. M. & Hardie, K. R. (2005).** Making ‘sense’ of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**, 383–396.
- Vergin, F. (1954).** [Antibiotics and probiotics]. *Hippocrates* **25**, 116–119.
- Vicariotto, F., Mogna, L. & Del Piano, M. (2014).** Effectiveness of the two microorganisms *Lactobacillus fermentum* LF15 and *Lactobacillus plantarum* LP01, formulated in slow-release vaginal tablets, in women affected by bacterial vaginosis: a pilot study. *J Clin Gastroenterol* **48 Suppl 1**, S106–112.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M. & Lejeune, P. (1998).** Isolation of an *Escherichia coli* K-12 Mutant Strain Able To Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New ompR Allele That Increases Curli Expression. *J Bacteriol* **180**, 2442–2449.
- Vieira, A. T., Rocha, V. M., Tavares, L., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., Oliveira, S. C., Cassali, G. D., Gamba, C., Martins, F. S. & Nicoli, J. R. (2016).** Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5(1A). *Microbes Infect Inst Pasteur* **18**, 180–189.
- Vos, W. M. de. (2015).** Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *Npj Biofilms Microbiomes* **1**, 15005.
- Vujic, G., Jajac Knez, A., Despot Stefanovic, V. & Kuzmic Vrbanovic, V. (2013).** Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **168**, 75–79.
- Vuotto, C., Barbanti, F., Mastrantonio, P. & Donelli, G. (2014a).** *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits *Prevotella melaninogenica* biofilm. *Oral Dis* **20**, 668–674.
- Vuotto, C., Longo, F. & Donelli, G. (2014b).** Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int J Oral Sci* **6**, 189–194.
- Walencka, E., Różalska, S., Sadowska, B. & Różalska, B. (2008).** The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha)* **53**, 61–66.
- Walker, T. S., Tomlin, K. L., Worthen, G. S., Poch, K. R., Lieber, J. G., Saavedra, M. T., Fessler, M. B., Malcolm, K. C., Vasil, M. L. & Nick, J. A. (2005).** Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development Mediated by Human Neutrophils. *Infect Immun* **73**, 3693–3701.
- Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. (2003).** Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 317–323.
- Wang, B.-Y., Deutch, A., Hong, J. & Kuramitsu, H. K. (2011).** Proteases of an Early Colonizer Can Hinder *Streptococcus mutans* Colonization *in vitro*. *J Dent Res* **90**, 501–505.
- Wang, H., Huang, Y., Wu, S., Li, Y., Ye, Y., Zheng, Y. & Huang, R. (2014).** Extracellular DNA inhibits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *S. enterica* Serovar Typhi biofilm development on abiotic surfaces. *Curr Microbiol* **68**, 262–268.

- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A. & Yang, Z. (2015a).** Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *Int J Biol Macromol* **74**, 119–126.
- Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhang, L., Guo, Y., Yu, S., Wozniak, D. J. & Ma, L. Z. (2015b).** The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Reports* **7**, 330–340.
- Wang, X., Preston, J. F. & Romeo, T. (2004).** The pgaABCD Locus of *Escherichia coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. *J Bacteriol* **186**, 2724–2734.
- Watnick, P. I. & Kolter, R. (1999).** Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* **34**, 586–595.
- Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L. & Kolter, R. (2001).** The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* **39**, 223–235.
- Wei, Q. & Ma, L. Z. (2013).** Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* **14**, 20983–21005.
- Weston, S., Halbert, A., Richmond, P. & Prescott, S. (2005).** Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* **90**, 892–897.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487.
- Wilksch, J. J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J. L., Short, K. R., Cao, H., Cavaliere, R., James, C. E., Whitchurch, C. B. & other authors. (2011).** MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog* **7**, e1002204.
- Williams, D. L. & Bloebaum, R. D. (2010).** Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grown using the CDC biofilm reactor. *Microsc Microanal Off J Microsc Soc Am Microbeam Anal Soc Microsc Soc Can* **16**, 143–152.
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R. & Lewenza, S. (2015).** Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 544–553.
- Won, T. J., Kim, B., Song, D. S., Lim, Y. T., Oh, E. S., Lee, D. I., Park, E. S., Min, H., Park, S.-Y. & Hwang, K. W. (2011).** Modulation of Th1/Th2 balance by *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi via stimulation of macrophage cell line J774A.1 *in vitro*. *J Food Sci* **76**, H55–61.
- Woo, J. & Ahn, J. (2013).** Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* **56**, 307–313.
- Wood, T. K., González Barrios, A. F., Herzberg, M. & Lee, J. (2006).** Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 361–367.
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Chevalier-Curt, M. J., Robert, V., Philippe, C., Bridonneau, C., Cherbuy, C. & other authors. (2013).** *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* **11**, 61.
- Wu, C.-C., Lin, C.-T., Wu, C.-Y., Peng, W.-S., Lee, M.-J. & Tsai, Y.-C. (2015).** Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol Oral Microbiol* **30**, 16–26.
- Wu, C.-C., Lin, C.-T., Cheng, W.-Y., Huang, C.-J., Wang, Z.-C. & Peng, H.-L. (2012).** Fur-dependent MrkHI regulation of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiol Read Engl* **158**, 1045–1056.
- Wu, J. & Xie, H. (2010).** Role of Arginine Deiminase of *Streptococcus cristatus* in *Porphyromonas gingivalis* Colonization. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4694–4698.

- Yakandawala, N., Gawande, P. V., LoVetri, K., Cardona, S. T., Romeo, T., Nitz, M. & Madhyastha, S. (2011).** Characterization of the Poly- β -1,6-N-Acetylglucosamine Polysaccharide Component of *Burkholderia* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **77**, 8303–8309.
- Yan, L., Boyd, K. G., Adams, D. R. & Burgess, J. G. (2003).** Biofilm-Specific Cross-Species Induction of Antimicrobial Compounds in *Bacilli*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3719–3727.
- Yang, J., Wilksch, J. J., Tan, J. W. H., Hocking, D. M., Webb, C. T., Lithgow, T., Robins-Browne, R. M. & Strugnell, R. A. (2013).** Transcriptional activation of the *mrkA* promoter of the *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial operon by the c-di-GMP-dependent MrkH protein. *PLoS ONE* **8**, e79038.
- Yildiz, F. H. & Schoolnik, G. K. (1999).** *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4028–4033.
- Yu, Z., Zhang, X., Li, S., Li, C., Li, D. & Yang, Z. (2013).** Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World J Microbiol Biotechnol* **29**, 489–498.
- Zago, M., Bonvini, B., Rossetti, L., Meucci, A., Giraffa, G. & Carminati, D. (2015).** Biodiversity of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages isolated from cheese whey starters. *J Dairy Res* **82**, 242–247.
- Zaura-Arite, E., van Marle, J. & ten Cate, J. M. (2001).** Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* **80**, 1436–1440.
- Zeng, L., Farivar, T. & Burne, R. A. (2016).** Amino Sugars Enhance the Competitiveness of Beneficial Commensals with *Streptococcus mutans* through Multiple Mechanisms. *Appl Environ Microbiol* **82**, 3671–3682.
- Zhang, J., Zhang, X., Zhang, L., Zhao, Y., Niu, C., Yang, Z. & Li, S. (2014).** Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Inner Mongolia ‘Hurood’ cheese. *J Microbiol Biotechnol* **24**, 225–235.
- Zhang, X., Lan, Y., Jiao, W., Li, Y., Tang, L., Jiang, Y., Cui, W. & Qiao, X. (2015).** Isolation and Characterization of a Novel Virulent Phage of *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Food Environ Virol* **7**, 333–341.
- Zhang, Y.-C., Zhang, L.-W., Ma, W., Yi, H.-X., Yang, X., Du, M., Shan, Y.-J., Han, X. & Zhang, L.-L. (2012).** Screening of probiotic *lactobacilli* for inhibition of *Shigella sonnei* and the macromolecules involved in inhibition. *Anaerobe* **18**, 498–503.
- Zhao, K., Tseng, B. S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M. L., Harrison, J. J., Luijten, E., Parsek, M. R. & Wong, G. C. L. (2013).** Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **497**, 388–391.
- Zobell, C. E. (1943).** The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity I. *J Bacteriol* **46**, 39–56.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Römling, U. (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**, 1452–1463.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M. & Römling, U. (2003).** Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family Enterobacteriaceae Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Infect Immun* **71**, 4151–4158.
- Zorraquino, V., García, B., Latasa, C., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Lasa, I. & Solano, C. (2013).** Coordinated Cyclic-Di-GMP Repression of *Salmonella* Motility through YcgR and Cellulose. *J Bacteriol* **195**, 417–428.
- Zyrek, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U. & Schmidt, M. A. (2007).** Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* **9**, 804–816.

ANNEXES

Annexe #1

Revue

Anti-biofilm Activity as a Health Issue

Sylvie Miquel, Rosyne Lagrafeuille, Bertrand Souweine and Christiane Forestier

Frontiers in Microbiology

2016



Anti-biofilm Activity as a Health Issue

Sylvie Miquel^{1*}, Rosyne Lagraveille¹, Bertrand Souweine^{1,2} and Christiane Forestier¹

¹ Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement – UMR, CNRS 6023, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, ² Service de Réanimation Médicale Polyvalente, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Clara G. De Los Reyes-Gavilan,
Instituto de Productos Lácteos
de Asturias – Consejo Superior
de Investigaciones Científicas, Spain

Reviewed by:

Manuel Simões,
Faculty of Engineering, University of
Porto, Portugal
Pilar García,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Spain

*Correspondence:

Sylvie Miquel
sylvie.miquel@udamail.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 31 December 2015

Accepted: 11 April 2016

Published: 26 April 2016

Citation:

Miquel S, Lagraveille R, Souweine B
and Forestier C (2016) Anti-biofilm
Activity as a Health Issue.
Front. Microbiol. 7:592.
doi: 10.3389/fmicb.2016.00592

The formation and persistence of surface-attached microbial communities, known as biofilms, are responsible for 75% of human microbial infections (National Institutes of Health). Biofilm lifestyle confers several advantages to the pathogens, notably during the colonization process of medical devices and/or patients' organs. In addition, sessile bacteria have a high tolerance to exogenous stress including anti-infectious agents. Biofilms are highly competitive communities and some microorganisms exhibit anti-biofilm capacities such as bacterial growth inhibition, exclusion or competition, which enable them to acquire advantages and become dominant. The deciphering and control of anti-biofilm properties represent future challenges in human infection control. The aim of this review is to compare and discuss the mechanisms of natural bacterial anti-biofilm strategies/mechanisms recently identified in pathogenic, commensal and probiotic bacteria and the main synthetic strategies used in clinical practice, particularly for catheter-related infections.

Keywords: anti-biofilm, biofilm, probiotics, pathogens, lock solution

INTRODUCTION

Biofilms are multimicrobial communities enclosed in self-synthesized polymeric matrices, attached to biotic or abiotic surfaces. Eighty percent of the world's microbial biomass are found in the biofilm state, and sessile cells are thus considered as the predominant mode of life for microorganisms in nature. These cells frequently express phenotypes different from their non-adherent planktonic counterparts, with a high capacity to colonize new surfaces and a high tolerance to exogenous stress (Donlan and Costerton, 2002; Macfarlane and Dillon, 2007). Depending on the microbial species and their localization (environmental/biomedical/industrial), biofilms can be either beneficial or detrimental for humans. According to the National Institutes of Health, more than 75% of microbial infections that occur in the human body are promoted by the formation and persistence of biofilms. Some bacterial biofilms, such as the intestinal microbiota, also play protective and functional roles. Intestinal commensal and beneficial bacteria–bacteria interactions are directly involved in host homeostasis (Wrzosek et al., 2013). In human health, an imbalance of microbiota, called dysbiosis, is associated with several diseases (Martín et al., 2014a). This correlation is in part due to bacterial interplay between members of bacterial communities such as group effect, cooperation, kin competition, genetic expression profiles, and phenotypic diversification (Rendueles and Ghigo, 2015) that could be encompassed by the adjective "anti-biofilm". Interference interactions have already inspired the design of alternatives to antibiotics in the fight against pathogenic microorganisms (Rasko and Sperandio, 2010). Recently, major challenges and opportunities in this field were addressed during the workshop "Biofilms, Medical Devices, and Anti-Biofilm Technology" (Phillips et al., 2015). Many medical device-associated and

persistent infections can be attributed to biofilm-associated microbes. To tackle the overarching public health issue of the contribution of biofilms to health care-associated infections it was suggested that clinicians and health care workers should be more closely involved in their detection and treatment. It was also suggested that the applied science of biofilm formation and prevention would provide greater knowledge of the contamination of medical devices. Some answers are to be found in the development of the anti-biofilm activities of beneficial microbes and/or the understanding and diversion of the anti-biofilm capacities of pathogenic bacteria. In this review, after establishing a definition of the term anti-biofilm, we will focus on bacterial anti-biofilm activities with examples of probiotic and pathogenic bacteria. With reference to clinical examples, we will then discuss the use, challenges and limitations of anti-biofilm strategies.

ANTI-BIOFILM ACTIVITY: WHAT DOES IT MEAN?

Biofilms were initially defined as structured communities of bacterial cells enclosed in self-produced polymeric matrices and adherent to inert or living surfaces (Costerton et al., 1999). Later, it became obvious that biofilms exhibit altered phenotypes compared with corresponding planktonic cells, especially with regard to gene transcription (Lindsay and von Holy, 2006). Biofilms are ubiquitous and nearly all species of microorganisms, bacteria, fungi, yeasts, algae, protozoa, and viruses are able to adhere to surfaces and/or to each other to form biofilms (Wingender and Flemming, 2011). Biofilms formed by pathogenic bacteria are the most extensively documented, such as *Klebsiella pneumoniae* biofilms seen in **Figure 1** on abiotic (1A) and biotic surfaces (epithelial cell monolayer; 1B). Biofilms are increasingly recognized by the public health community as an important source of pathogens (Donlan and Costerton, 2002; Wingender and Flemming, 2011). They are involved in specific infectious diseases such as osteomyelitis, otitis media, peridontitis, and dental caries (Costerton et al., 1999) and in chronic diseases such as pulmonary infections of

cystic fibrosis patients. They are also involved in nosocomial infections due to opportunistic pathogens, especially urinary tract, lower respiratory tract, and surgical site infections and bacteremia, and mostly when invasive medical device are being used. In 2012, a prevalence survey of 1,938 healthcare facilities and 300,330 patients carried out by the French association RAISIN “Réseau d’alerte, d’investigation et de surveillance des infections nosocomiales” showed that the most frequent microorganisms associated with nosocomial infections (RAISIN, 2015) were *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (38.1% resistant to methicillin, MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, and *K. pneumoniae*, all of which are high biofilm producers (**Figure 1C**).

Biofilms pose significant clinical problems because sessile bacterial cells are inherently recalcitrant to antimicrobial agents such as antibiotics (for review, Lebeaux et al., 2014). Several factors are responsible for the biofilm-associated resistance, including the density and the physiological state of the cells, but also the physical structure of the biofilm. Exopolysaccharides and extracellular DNA (eDNA) of the biofilm matrix can act as a barrier to diffusion and thus reduce penetration of antibiotics into biofilms. The effectiveness of this barrier varies between antibiotics; tetracyclines, rifamycins, fluoroquinolones, and daptomycin penetrate better than beta-lactams, aminoglycosides, and glycopeptides (Stewart et al., 2009; Singh et al., 2010; Cha et al., 2011; Doroshenko et al., 2014). The effects of antibiotics can also be affected by the particular microenvironment of biofilm, such as acidic pH and low level of oxygen encountered in the deep layers of the aggregates (Siala et al., 2014). The cells within biofilm are generally less metabolically active than planktonic cells and therefore significantly less sensitive to mechanism of action by many antimicrobials targeting synthesis of macromolecules or metabolic pathways such beta-lactams and quinolones (Xie et al., 2005; Mascio et al., 2007). In addition, a percentage of cells within biofilm may be persister cells, which are transiently antibiotic tolerant without harboring genetic changes seen in antimicrobial resistance. The presence of antibiotics can *per se* induce persistence (Dörr et al., 2010; Kwan et al., 2013) and/or enhance biofilm formation, particularly at sub-Minimal

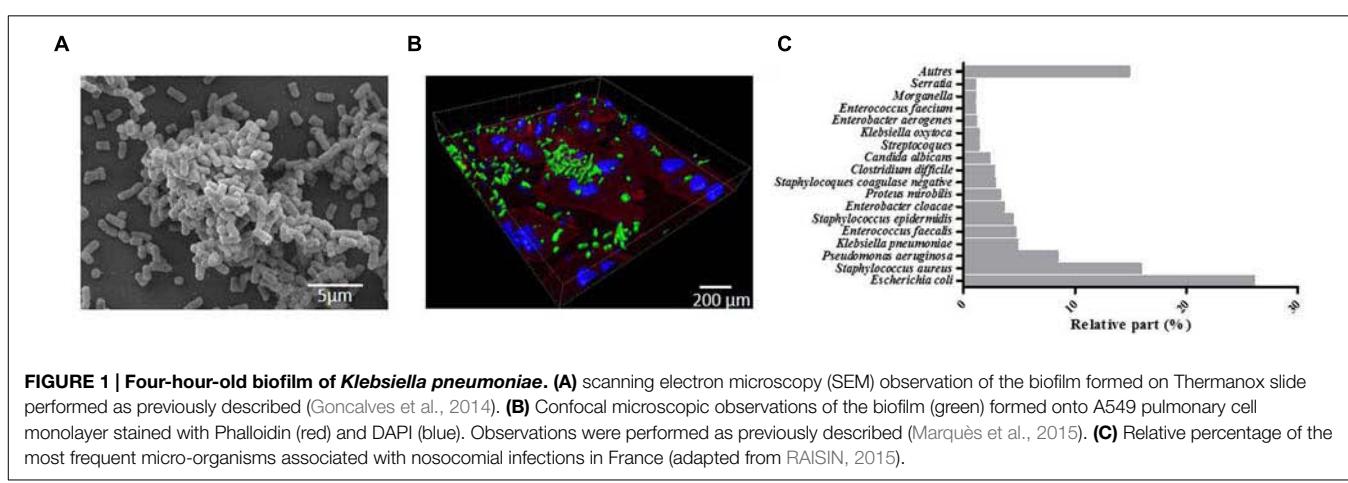


FIGURE 1 | Four-hour-old biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. **(A)** scanning electron microscopy (SEM) observation of the biofilm formed on Thermanox slide performed as previously described (Goncalves et al., 2014). **(B)** Confocal microscopic observations of the biofilm (green) formed onto A549 pulmonary cell monolayer stained with Phalloidin (red) and DAPI (blue). Observations were performed as previously described (Marquès et al., 2015). **(C)** Relative percentage of the most frequent micro-organisms associated with nosocomial infections in France (adapted from RAISIN, 2015).

Inhibitory concentrations (MIC) (Wang et al., 2010b; Kaplan et al., 2012; Ng et al., 2014; Lázaro-Díez et al., 2016) and thus lead to treatment failure. The *in vitro* determination of MICs is restricted to planktonic cells growing exponentially under conditions that are optimal for action of the drug but unlikely to be met in biofilm populations. *In vitro* and *in vivo* experiments demonstrated that the MIC and the minimum bactericidal concentration (MBC) for biofilm bacterial cells are usually much higher (approximately 10–10,000 times) than their counterpart planktonic cells (Hengzhuang et al., 2012; Marquès et al., 2015). The effective antibiotic MBC *in vivo* for biofilm eradication are therefore impossible to reach by conventional antibiotic administrations due to the toxicities and the side effects of antibiotics and the limitation of renal and hepatic functions. Combination of antibiotics with different killing mechanisms leading to synergism remains nowadays the best solution for the treatment of biofilm infections. Rifampicin and fosfomycin-based combinations have shown *in vitro* enhanced activities against biofilm embedded *Staphylococcus aureus* isolates (Tang et al., 2012, 2013) but their *in vivo* efficiencies still remain to be determined (**Table 1**).

In addition, biofilm phenotype provides resistance to host defenses, in particular, leukocyte phagocytosis. There are various possible mechanisms of action by which bacteria escape from the immune system including inhibition of inclusion of biofilm cells by phagocytes (Günther et al., 2009) and low immunogenicity of the biofilm matrix (Thurlow et al., 2011). These resistance properties and the genetic and phenotypic versatilities of cells within biofilm prompted workers to look for biofilm-specific therapies to eradicate this common cause of persistent infections. The term “anti-biofilm” appeared in the literature during the 1990s and is now widely used without, however, being fully defined. On the basis of current knowledge, this review proposes the use of the term anti-biofilm as “a natural or induced process,

leading to reduction of bacterial biomass through the alteration of biofilm formation, integrity and/or quality”.

Studies have shown that two different anti-biofilm mechanisms are able to modulate biofilm formation: inhibition of bacterial surface attachment and destabilization/disruption of mature biofilms irreversibly attached. Many of the existing anti-biofilm agents are non-biocidal, but some bactericidal molecules could be considered as anti-biofilm agents as they are still active against mature biofilms protected by their architecture. Bactericidal anti-biofilm agents should be very specifically targeted otherwise their use could impair the composition of established ecosystems and damage beneficial microbiota. Nevertheless, anti-biofilm strategies represent interesting approaches for medical biotechnology as attested by the large number of recent publications (Rumbaugh and Ahmad, 2014). Anti-biofilm agents fall into two large groups, synthetic and natural (**Table 2**). Synthetic biofilm inhibitors, in part listed below, are mostly derived from bactericidal technologies.

Non-thermal Plasma (NTP) Technology

Plasma is a unique state of matter that results from a rapid ionization of the gas obtained through subjecting gas to extremely high temperatures or passing gas through high-voltage electricity (Scholtz et al., 2015). The unspecific character of

TABLE 2 | The different classes of anti-biofilm agents.

Synthetic	Natural product
Non-thermal plasma	Antibiotics
Photodynamic substances	Protozoan grazing
Nanoparticles	Plant products
Surface topographic modifications	Bacteriophages
Other peptides and molecules	Microbial agents

TABLE 1 | Effects of different antibiotics family against *Staphylococcus* biofilms.

Antibiotic	Species	Assay	Effect on biofilm	Reference
Beta-lactams	Penicillins and most cephalosporins	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>in vitro</i>	Induction of biofilm formation at Sub-MICs
Rifampicin	Ceftaroline		Bactericidal anti-biofilm activity after prolonged exposure	Landini et al., 2015
	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i>	Anti-biofilm activity, synergistic with fusidic acid and tigecycline	Tang et al., 2013
	<i>S. epidermidis</i>		High anti-biofilm activity alone or in combination with vancomycin or daptomicin	Olson et al., 2010
Vancomycin	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i>	Promotion of biofilm formation through an autolysis-dependent mechanism	Hsu et al., 2011
	<i>S. epidermidis</i>		Induction of eDNA release at sub-MICs leading to increased biofilm formation	Doroshenko et al., 2014
Daptomicin	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i>	Induction of viable but non-cultivable cells in biofilm at low concentrations	Pasquarelli et al., 2014
			Anti-biofilm effect in monotherapy	LaPlante and Woodmansee, 2009
Fosfomycin	<i>S. aureus</i>	<i>in vivo</i>	Prevention of the emergence of rifampin resistance mutants	Cirioni et al., 2010
		<i>in vitro</i>	Anti-biofilm activity synergistic with linezolid or minocycline or vancomycin	Tang et al., 2012

eDNA, extracellular DNA; MIC, minimal inhibitory concentrations.

their anti-microbial activity, low toxicity for human tissues and absence of long-living toxic compounds make non-thermal plasmas (NTPs) a very promising tool for biofilm prevention and control in the decontamination of foods and biological materials (Ermolaeva et al., 2015).

Photodynamic Substances

To produce an antimicrobial photodynamic therapy (PDT), three major components are needed, light, oxygen, and a photosensitizer. The excitation of the photosensitizer by light generates reactive oxygen species (ROS), which leads to the oxidation of biomolecules of microorganisms and results in cell damage and death (Hamblin and Hasan, 2004). It was recently shown that the photosensitizer 5-aminolevulinic acid (5-ALA), once absorbed by proliferating bacteria, is converted into the natural photosensitizer Protoporphyrin IX (PpIX), which has synergic effects with the antibiotic gentamicin against the biofilm of several Gram-positive bacteria (Barra et al., 2015). For example, photoactive TiO₂ antibacterial coating was proposed to reduce pin tract infections and proved to have antibacterial effect against *Staphylococcus* strains (Villatte et al., 2015).

Nanotechnology

Two kinds of nanotechnologies can affect biofilm formation on a surface. First, nano-modifications of surface topography (roughness and nanostructure) limit primary bacterial adhesion without the use of any biocide molecules (Desrousseaux et al., 2013). However, results on their efficacy have been conflicting and inhibition of primary adhesion seems to be dependent mostly on the spatial organization of the nano features. Second, surfaces can be chemically modified by addition of nanoparticles made of iron, silver, zinc, or titanium (Neethirajan et al., 2014). Most of these nanoparticles exert antibacterial activity by interacting electrostatically with the bacterial membrane, which leads to membrane disruption (Beyth et al., 2015). In addition, the bioavailability of these nanoparticles due to their high surface-to-volume ratios allows them to penetrate a mature biofilm and thus to target bacterial cells not only at the surface but also within the deep layers of biofilm (Bakkiyaraj and Pandian, 2014).

Other molecules could be added to this list, in particular detergents and antiseptics and synthetic peptides (de la Fuente-Núñez et al., 2014). However, the increasing interest in promoting health by natural means has concentrated research trends on natural biofilm inhibitor products with less biocidal activity.

Protozoan Grazing

Protozoan grazing is believed to be the major trophic pathway whereby the biomass produced by bacteria, cyanobacteria and algae re-enters the food web. However, this type of microorganism's biomass control is hard to adapt to human health. *In vitro*, the ciliate *Colpoda maupasi* has been shown to reduce the thickness of mature biofilms of opportunistic pathogens formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Staphylococcus epidermidis* (Huws et al., 2005). In addition, the presence of protozoa in drinking water distribution systems can regulate the autochthonous and allochthonous

bacterial populations (Sibille et al., 1998), which suggests that this process could be used to decrease or limit nosocomial infections caused by environmental contamination.

Plant Products

Plants represent a huge resource of bioactive molecules. A recent study showed that some of them contain anti-biofilm compounds that inhibit growth, interrupt quorum sensing (QS) and/or prevent bacterial adhesion (Husain et al., 2015). Garlic acts as a QS-interfering compound in the treatment of bacterial infections, owing to the production of ajoene, a sulfur-rich molecule (Jakobsen et al., 2012). Cranberry is also an anti-adhesion agent (Allison et al., 2000; Cai et al., 2014) able to prevent urinary infections (Rafsanjany et al., 2015), dental caries (Girardot et al., 2014), and skin infections (Morán et al., 2014).

Bacteriophages

The most abundant category of microorganisms on earth, are viruses whose interactions with biofilm members are ecologically important in horizontal gene transfer between bacteria (transduction). Bacteriophages play other important roles in microbial communities such as the modulation of bacterial populations. They also produce a number of enzymes able to disrupt the protection afforded by the biofilm matrix, thereby modifying biofilm architecture and increasing its susceptibility to antibiotics (Abedon, 2015). However, there are several drawbacks to the use of phages: (i) phage lytic activity releases Gram-negative bacterial-membrane-endotoxins, (ii) phage-resistant bacteria can arise rapidly (Örmälä and Jalasvuori, 2013) and (iii) phages can spread bacterial virulence genes (Rossmann et al., 2015).

Bioinspired anti-biofilm molecules can be isolated from eukaryotes, such as the lactoferrin (Ammons and Copié, 2013), but most are derived from microbial phenomena occurring within the biofilms themselves. In fact, bacterial fitness within biofilm relies on the ability of a given strain not only to adhere, settle, and develop as a biofilm, but also to inhibit others from doing so (Rendueles and Ghigo, 2015).

BACTERIAL-DERIVED BIOFILM INHIBITORS

Intra- and interspecies interactions and competition between microorganisms within biofilm are governed by ecological and evolutionary parameters (Rendueles and Ghigo, 2015). Bacterial interferences are present at different levels of biofilm development; they can affect primary adhesion and/or maturation via exclusion/competition phenomena, modify matrix composition or enhance dispersal. Bacterial anti-biofilm activities govern microbe-surface interactions and microbe-microbe interactions and they are shared by commensal, pathogen, and probiotic bacteria (Figure 2). The increasing interest in promoting a natural approach to health has intensified research in the field of probiotics worldwide over the last two decades. Probiotics, recently redefined by an expert panel of the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

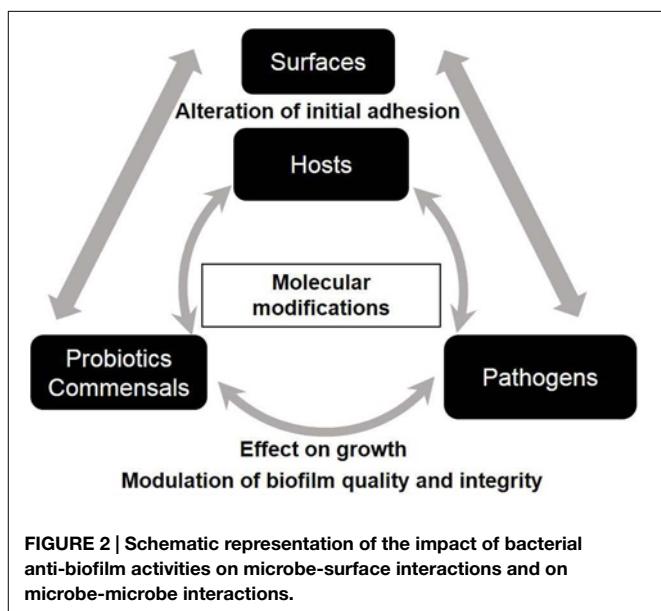


FIGURE 2 | Schematic representation of the impact of bacterial anti-biofilm activities on microbe-surface interactions and on microbe-microbe interactions.

(ISAPP) as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Hill et al., 2014), have gained increasing medical attention because of their antagonist effects against numerous pathogens. Probiotics with anti-biofilm properties, especially *Lactobacilli*, seem promising in the treatment of oral, wound and vaginal infections in both clinical trials and *in vitro* studies (Vuotto et al., 2014). For some probiotics, this beneficial activity is boosted when grown as biofilm (Rieu et al., 2014). Pathogens also exhibit anti-biofilm properties when competing with other bacteria to reach new ecological niches.

Effect on Growth

Most beneficial and pathogen bacteria are able to secrete antibacterial substances such as antimicrobial peptides (AMPs), lantibiotics, bacteriocins, microcins, lactic acid, and hydrogen peroxide. Using different mechanisms of action, such as membrane permeabilization and interference with essential enzymes, these molecules inhibit bacterial growth or cause bacterial death. Some of them are highly effective against sessile cells such as the bacteriocins, nisin A, lacticin Q, sonorensin, and colicin R (Okuda et al., 2013; Rendueles et al., 2014; Chopra et al., 2015). Interestingly, colicin R produced by the commensal *Escherichia coli* ROAR029 strain, preferentially targets sessile rather than planktonic bacteria (Rendueles et al., 2014). The enhanced sensitivity of sessile cells to colicin R has been attributed to a reduced growth rate caused by diminished turnover of outer membrane components or increased stress within the biofilm. Several bacteriocin-producing strains have filed patent application for food and biomedical applications (Benmechernene et al., 2013). Interestingly, the probiotic lactobacilli strains *Lactobacillus casei* Shirota and *L. rhamnosus* HN001 inhibited growth and biofilm formation of the pathogen *Streptococcus mutans* by producing an acid environment and bacteriocin-like polypeptides, suggesting the synergic properties

of these two mechanisms of action (Lin et al., 2015). Anti-biofilm agents impairing bacterial growth usually display narrow spectra. For instance, AMPs have shown a considerably stronger antimicrobial activity against biofilm formed by Gram-positive bacteria than by Gram-negative strains, justifying their potential use in the specific treatment of ocular infections, which are mostly due to Gram-positive bacteria (Dawgul et al., 2014).

Alteration of Initial Adhesion by Surface Modification

The most effective strategy to antagonize the first step of biofilm formation is the use of biosurfactants and bioemulsifiers able to modify the physicochemical cell surface properties and thus to impair microbial adhesion. This is illustrated notably by the production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids, which are able to disrupt the cohesiveness of biofilm formed by *Bordetella bronchiseptica* (Irie et al., 2005), *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, and *Micrococcus luteus* (Quinn et al., 2013). Another anti-biofilm biosurfactant is the surfactin produced by *Bacillus subtilis*, which is able to reduce colonization of surfaces by the food pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii*, and *Salmonella enteritidis* (Nitschke et al., 2009). Other pathogenic bacteria share such mechanisms: *K. pneumoniae* and the uropathogenic strain *E. coli* CFT073 exhibit a broad-spectrum anti-biofilm non-bactericidal activity by secreting extracellular polysaccharide (EPS) with anti-adhesion properties (Valle et al., 2006; Goncalves et al., 2014). EPS are the essential building blocks for the biofilm matrix of most microorganisms but they can also inhibit their neighbors’ biofilm structuration by interfering with initial adhesion, dispersion, cell-to-cell communication, and/or matrix formation (Rendueles and Ghigo, 2012). One example of this type of anti-biofilm mechanism of action is the interference of the capsular polysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 with cell-to-cell and cell-to-surface interactions of other bacteria, which prevents them from forming or maintaining biofilms (Karwacki et al., 2013). More examples are given in the review of Rendueles and Ghigo (2012), in which the authors advise that targeting surface colonization rather than overall bacterial fitness is a more promising approach.

Homeostatic relations between the hosts and their microbiota considered as biofilms at the surface of epithelial host cells are abundant. At the intestinal level, commensal and probiotic bacteria strengthen intestinal barrier function by enhancing mucin production and tight junction integrity, and by modulating the activity of the immune system. These properties are assimilated to biotic surface modifications involved in the reduction of pathogenic-associated biofilm and thus the protection of the host from infections. For instance, the probiotic mixture VSL#3 is able *in vivo* to induce mucin gene expression (Caballero-Franco et al., 2007) and commensal bacteria such as bifidobacteria or *Bacteroides thetaiotaomicron* promote defense functions of the host epithelial cells via the production of acetate (Fukuda et al., 2012; Wrzosek et al., 2013). In contrast to these adaptations of host capacities, bacteria can specifically target the degradation of host receptors and then inhibit the adhesion process. For instance, some *S. epidermidis* strains secrete a serine

protease named Esp, which degrades human receptor proteins (e.g., fibronectin, fibrinogen, and vitronectin) recognized by *S. aureus* and involved in host-pathogen interaction and tissue colonization (Sugimoto et al., 2013).

Modulation of Biofilm Quality and Integrity

Evidence has shown that anti-biofilm bacterial agents not only modify biotic and abiotic surfaces but also alter the physical properties of bacterial surfaces involved in cell-to-cell aggregation and surface attachment processes. For instance, EPS released by *L. acidophilus* A4 exert anti-biofilm activity against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria by affecting the expression of genes involved in curli production and chemotaxis, and thus modifying cell-to-cell (autoaggregation) and cell-to-host cell (adhesion) adherence (Kim et al., 2009). More recently, inhibition of *S. aureus* was shown to be due to the physicochemical properties of the *Lactobacillus* cells surface such as hydrophobicity, autoaggregation, and coaggregation abilities (Ren et al., 2012). These kinds of inhibition processes are likely induced by alteration of the expression of key surface structures that are required for surface colonization and govern the complex interactions between pathogenic and/or common environmental bacteria. For instance, *Streptococcus intermedius* down-regulates the expression of both short (*mfa1*) and long (*fimA*) fimbriae required for attachment and biofilm development by *Porphyromonas gingivalis* (Christopher et al., 2010). The anti-biofilm activity of the oral strain of *Streptococcus* does not affect growth rate and is mediated by the surface arginine deiminase ArcA. More recently, it was shown that *Lactobacilli* strains impair fungal biofilm formation structure by down-regulating the expression of *Candida glabrata* *EPA6* and *YAK1* genes, encoding, respectively, an adhesin involved in the yeast biofilm development and its transcriptional regulator (Chew et al., 2015).

Anti-biofilm activities are characterized by inter-species communications not only between different genera of prokaryotes but also between prokaryotic and eukaryotic cells. Bacterial anti-biofilm activities are therefore likely to naturally regulate bacterial populations in an ecological niche. For example, the Esp protease secreted by a subset of commensal *S. epidermidis* in the nasal microbiota inhibit biofilm formation by pathogenic *S. aureus* (Iwase et al., 2010). Ecological homeostasis of polymicrobial biofilms involves exclusion, competition and displacement phenomena between pathogenic, commensal and/or probiotic bacteria for adhesion/attachment sites and/or nutrient access. A new mechanism of invasion resistance deployed by oral-derived microbial community (O-mix) to defend their domains was recently reported. The O-mix is able to restrict the colonization of exogenous *E. coli* strains by sensing the *E. coli* lipopolysaccharides (LPS) and subsequently killing them with oxygen free radicals (He et al., 2010). The underlying molecular mechanisms were recently discovered and involve the coordinated role of three commensal bacterial species (*Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus infantis*, and *Streptococcus sanguinis*) acting as 'Sensor,' 'Mediator,' and

'Killer,' respectively (He et al., 2014). Numerous *in vitro* studies have shown that *Lactobacilli* can exert competitive exclusion of different pathogenic bacteria such as *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *E. coli*, and *Gardnerella vaginalis* by interfering with their binding sites on the epithelial cell surface (Jankowska et al., 2008; Prince et al., 2012; Zhang et al., 2012; Abedi et al., 2013; Castro et al., 2013).

Anti-biofilm activity can modulate biofilm bacterial diversity via interferences between species or between bacteria and the host surface. Different mechanisms of action can explain the chain reaction leading to the anti-biofilm process, the first of which is modification of cell-to-cell communication. The search for anti-biofilm compounds acting on QS and/or on signal molecule of targeted bacteria has already been undertaken (Leoni and Landini, 2014). For a recent review on QS inhibitors, see Brackman and Coenye (2015). It must, however, be noted that jeopardy of bacterial communication can lead to dispersion of a wide range of bacterial biofilms, and induction of biofilm dispersal by fatty acid signals may be a commonly used mechanism. For instance, the *cis*-2-decenoic acid produced by *P. aeruginosa* induces dispersion of *P. aeruginosa* PAO1 biofilm but also of those formed by a variety of Gram-negative and Gram-positive bacteria (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, and *Candida albicans*; Davies and Marques, 2009). Many bacterial enzymes involved in active biofilm dispersal have also been identified, in particular those involved in matrix degradation such as the serine protease Esp and the deoxyribonuclease I, DNase I. However, the most studied biofilm-matrix-degrading enzyme is dispersin B (Kaplan, 2009; Iwase et al., 2010; Brown et al., 2015). This glycoside hydrolase produced by the periodontopathogen *A. actinomycetemcomitans* completely inhibits biofilm formation and disperses preformed biofilm of several bacterial species: *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, and *Yersinia pestis* (Kaplan et al., 2004). As a consequence of the destruction of the physical integrity of the highly protective matrix barrier, sessile microbial cells are suddenly exposed to the external offensive of both antibiotics and innate host immune defenses (Kaplan, 2009). To avoid potential adverse effects due to the release of live bacteria from biofilms it seems essential to combine molecules with biofilm dispersing activity and anti-bacterial activity: *cis*-2-decenoic with antibiotics or disinfectants for eradication of catheter-associated biofilms (Rahmani-Badi et al., 2014; Sepehr et al., 2014) and dispersin B with KSL-W antimicrobial peptide for treatment of chronic wound infections (Gawande et al., 2014).

SUCCESSFUL USE OF ANTI-BIOFILM METHODS IN HUMAN HEALTH

Clinical trials performed with beneficial bacteria and particularly probiotics make use of exclusion and/or inhibition of growth of pathogens to protect the mucosa from the colonization of these undesirable microorganisms (Martín et al., 2014b). These strategies can be considered as anti-biofilm strategies, since aggregates formed on biotic surfaces, such as epithelia, have

molecular properties similar to those of biofilms formed on abiotic surfaces and are actually considered as such (Stacy et al., 2016). However, most molecular knowledge of the biofilm mode of life derives from studies performed on aggregates formed on abiotic surfaces, and a lot remains to be discovered about the specific biofilm host-immune response. Most anti-biofilm based randomized clinical trials have focused on infections associated with biofilm formation on abiotic surfaces: medical devices (especially ventilator-associated pneumonia and catheter-related infections) or dental surfaces. In these randomized clinical trials, the main strategy used to successfully control biofilm formation was the use of surface-coated (Berra et al., 2008; Kollef et al., 2008) or surface-treated catheters (Scannapieco et al., 2009; Quintas et al., 2015) and/or changes in surface composition of the device (Ghorbanzadeh et al., 2015). The last paragraph of this review will focus on these different strategies, with special emphasis on their advantages and limitations.

THE CASE OF CATHETER-RELATED INFECTIONS

Central venous catheters are essential in the management of patients and they are commonly used for the intravenous administration of fluids, blood products, complex drug treatments and total parenteral nutrition, for monitoring hemodynamics and for hemodialysis provision. The major concern with their use is colonization by microorganisms, which subsequently leads to infection, mostly catheter-related bloodstream infections (CRBSIs). CRBSIs are potentially devastating, entailing substantial morbidity, mortality and additional healthcare costs. It is estimated that a total of 250,000 cases of CRBSI occur yearly in the USA (Maki et al., 2006).

Catheter luminal colonization is the first step in catheter infection. In catheters with placement shorter than 21 days (short-term catheters), colonization originates mainly from the skin microbiota, with the microorganisms migrating distally along the external surface into the subcutaneous catheter tract. The microorganisms can also seed the intraluminal catheter surface from contaminated hubs, connectors and infusates. The intraluminal source of infection may be especially important in patients with long-term hemodialysis catheterization. Microbes colonizing catheter lumens constitute with host proteins a biofilm in which they proliferate and escape systemic antibiotics and immune host defenses. Ultimately, microorganisms can detach from biofilm and invade the bloodstream causing CRBSI and metastatic infections.

Multifaceted infection control interventions including maximal barrier precautions, line care bundle, development of educational programs, outcome surveillance and performance feedback of infection control practices have been implemented and succeeded in decreasing CRBSI rates. Several other preventive measures undertaken to further reduce the risk of CRBSI have been developed including coating catheter surfaces with antimicrobial agents and locking catheter lumens with antimicrobial solutions.

- (1) **Coating catheter with anti-infective agents** (antiseptics or antibiotics) aims at inhibiting bacterial adhesion to the catheter lumen surface and preventing biofilm growth and subsequent infection. Catheters can be bonded to the inner and/or outer surface or impregnated within the material itself. The most commonly used antimicrobial agents are chlorhexidine-silver sulphadiazine (CHSS) and minocycline-rifampicin (MR).

First-generation antiseptic catheters whose outer surface was impregnated with CHSS had a lower rate of CRBSI when inserted for a short duration (<8 days) in units with a high incidence of CRBSI (>3 per 1,000 catheter-days; Walder et al., 2002). Second-generation CHSS catheters were then developed, with a long half-life of impregnation at the internal and external surfaces. Their use decreased the rate of catheter colonization but failed to diminish the incidence of CRBSI in units with acceptable rates of CRBSIs (Timsit et al., 2011). The development of bacterial resistance in relation to the use of CHSS catheters has never been observed in a clinical setting, but resistance to chlorhexidine has been detected in experimental studies (Tattawasart et al., 1999). Physicians must be aware that in rare cases hypersensitivity reactions have been reported in patients who were inserted with these catheters (Trautner and Darouiche, 2004).

Catheters impregnated intraluminally and extraluminally with MR have been widely developed. MR concentrations on the surface of these catheters decrease with placement duration but still exert antimicrobial activity through 60 days of catheterization (Darouiche et al., 2005). Their use is associated with a decrease in the rates of colonization and infection compared with standard catheters and first-generation CHSS impregnated catheters (Hockenhull et al., 2009; Wang et al., 2010a). No prospective trial has compared second-generation CHSS and MR-impregnated catheters. In a recent published retrospective study, second-generation CHSS and MR-impregnated catheters, in comparison with standard catheters, decreased the risk of CRBSI to a similar extent (Lorente et al., 2015).

There are concerns regarding the potential of MR-impregnated catheters for altering the microbiologic profile of catheter colonization/infection and promoting bacterial resistances. Data indicate that they can enhance the risk of fungal catheter colonization (León et al., 2004; Picioreanu et al., 2004; Lardon et al., 2011). However, bacterial resistance induced by the prolonged use of MR-impregnated catheters has not been demonstrated in clinical studies (Ramos et al., 2011; Bonne et al., 2015).

Other catheter materials have been tested including oligon, silver, carbon, platinum, and antimetabolite. Several prospective, randomized studies comparing these catheters with un-coated catheters in the prevention of catheter colonization and infection have yielded conflicting results (Kalfon et al., 2007; Walz et al., 2010; Lai et al., 2013).

Current evidence suggests the magnitude of the effect of antimicrobial-impregnated catheters differs according to the type of patient population. For instance, their beneficial benefit was mainly observed in critically ill patients and only inconsistently in

cancer patients and in patients receiving total parenteral nutrition (Lai et al., 2013). The decision to use these catheters should be based on a risk benefit analysis taking into account the incidence of CRBSI observed in the institution for at-risk populations and balancing the attributable costs of CRBSI, the price over cost of impregnated catheters and concerns for the emergence of bacterial resistance.

Antimicrobial-impregnated catheters should be reserved for patients whose catheter placement is expected to be longer than 5 days, in units with unacceptable rates of infections (more than three CRBSIs per 1,000 catheter-days), despite adherence to a comprehensive preventive strategy (Bach et al., 1996).

(2) The antimicrobial lock (AML) strategy is designed to prevent or to treat endoluminal catheter infections. It is intended for catheters that are not used continuously and consists of instilling a selected AML solution into the catheter lumen while the catheter is idle. The AML solution is allowed to dwell or is “locked” for a certain period of time in the catheter lumen. Thereafter, the lock solution is aspirated and discarded or flushed through the catheter into the bloodstream. This strategy can achieve local antimicrobial concentrations 100–1,000 times higher than that obtained by parenteral treatment to overcome the adaptive bacterial resistance of sessile bacteria.

An ideal AML solution should possess several important properties including widespread bactericidal activity against the microorganisms commonly involved in CRBSIs, the potential to penetrate biofilm and kill sessile cells, prolonged chemical stability that does not impair catheter integrity, a low potential for promoting antimicrobial resistance, a low risk of toxicity and adverse events, and the ability to maintain catheter patency by preventing catheter occlusion and thrombosis. Thus, most AML solutions combine anticoagulant and anti-biofilm activities.

A wide variety of antibiotics have been used alone or in combination to lock catheter lumen, including penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, fluoroquinolones, folate antagonists, glycopeptides, lipopeptides, oxazolidinones, rifampicin, polymyxins, tetracyclines, glycylcyclines, and carbapenems. The antibiotic solution is currently mixed in unfractionated heparin (UFH) to obtain antimicrobial-anticoagulant solutions. However, there is a growing body of data supporting the use of alternative anticoagulants such as low molecular weight heparins, calcium chelators (citrate or ethylenediamine-tetra-acetic acid [EDTA]), and tissue plasminogen activator. The choice of antibiotics and their concentration is based on the expected susceptibility of biofilm to the antimicrobials and their ability to kill the biofilm cells. In addition, the decision to choose a mixture must take into account the results of studies conducted on the stability and compatibility of the solution, which depend on the type of agents combined, their respective concentration and the experimental conditions including temperature, exposure duration, and storage conditions. Experimental studies suggest that antibiotic UFH mixtures are compatible with a broad range of antibiotic concentrations when unfractionated heparin

concentration is higher than 3500 U/mL, while precipitation occurs when antibiotics are diluted with unfractionated heparin at concentrations lower than 1000 U/mL (Droste et al., 2003). Numerous data are now available to guide physicians in the choice of antibiotic lock solution components and their final concentrations (Mermel et al., 2009; Justo and Bookstaver, 2014).

The widespread use of the prophylactic antibiotic lock strategy raises concerns in clinical practice because of the risk for the development of antimicrobial-resistant organisms (Landry et al., 2010; Dixon et al., 2012). Emerging gentamicin resistant bacteria have been identified as causative agents of bacteremia in chronic hemodialysis patients when tunneled catheters were prophylactically locked with a solution of gentamicin (4 mg/mL) and unfractionated UFH (5000 U/mL; Landry et al., 2010). In addition, catheter locking may induce severe adverse events when a fraction of the lock solution spills from the catheter lumen into the bloodstream during and after instillation (Agharazii et al., 2005). Detectable gentamicin serum levels have been observed in chronic dialysis patients receiving preventive gentamicin-citrate lock (Dogra et al., 2002). Severe neurological disorders have been reported after prolonged exposure to aminoglycoside-based lock solution (Dogra et al., 2002; Saxena et al., 2002). The use of prophylactic antibiotic lock solution with antibiotics routinely used to treat systemic infections remains debatable, and in our opinion should therefore be discouraged.

One way to reduce the likelihood of antibiotic resistance is the use of catheter lock solutions that do not include an antibiotic component. The most commonly used non-antibiotic lock solutions are taurolidine, a high concentration of citrate or EDTA and ethanol.

- Taurolidine is an amino acid taurine derivative with a broad-spectrum activity against bacteria and fungi. It acts as a disinfectant by inducing irreparable microbial cell wall injury (Willatts et al., 1995). Several randomized control studies have compared taurolidine and UFH lock solutions in preventing CRBSI (Betjes and van Agteren, 2004; Bisseling et al., 2010; Solomon et al., 2010; Dümichen et al., 2012; Handrup et al., 2013) and yielded mixed results depending on the study population. In pediatric oncology patients and infants on home parenteral nutrition, taurolidine used at various concentrations (1.35 and 2%) with or without addition of 4% citrate decreased the rate of CRBSI as compared to low doses of unfractionated heparin (150 and 100 U/mL; Bisseling et al., 2010; Dümichen et al., 2012; Handrup et al., 2013). In contrast, in hemodialysis patients, the use of 1.35% taurolidine – 4% citrate solution failed to prevent CRBSI and exit site infections as compared to UFH lock solution (5,000 U/mL), but increased the need for premature catheter removal for poor flow (Liu et al., 2014; Zhao et al., 2014).
- Citrate and EDTA have anticoagulant activities similar to those of heparin by chelating ionized calcium, which results in a blockade of the coagulation pathways. In addition, they enhance the activity of antimicrobial drugs and therefore there is a growing interest in the use of cationic chelator-based lock solutions in the prevention of CRBSI. These lock solutions

have been widely studied and have been demonstrated to be highly effective in hemodialysis patients and pediatric cancer patients (Zacharioudakis et al., 2014; Zhao et al., 2014). In hemodialysis patients, the mixture of 7.0% sodium citrate, 0.15% methylene blue, 0.15% methylparaben, and 0.015% propylparaben reduced the risk of CRBSI in a randomized open label trial (Maki et al., 2011) but citrate alone was not more effective than UFH (Zhao et al., 2014). A similar result was observed with a lock solution of 4% EDTA (Kanaa et al., 2015). In addition, there have been concerns about the use of citrate at high concentrations owing to its potential toxicity, allergic reactions, arrhythmia and cardiac arrest (US Food and Drug Administration, 2000).

- Ethanol is an inexpensive antiseptic that acts by non-specific protein denaturation. It has drawn much interest as a lock solution for the prevention of CRBSI because it exerts bactericidal and fungicidal activity against a broad range of microorganisms and is unlikely to promote antimicrobial resistances. The time required by ethanol to eradicate experimental biofilm varies according to the microorganisms studied and is concentration-dependent. Ethanol has no antithrombotic properties and cannot be mixed with UFH because of potential precipitation. Randomized control studies on ethanol locks at concentrations higher than 70% v/v in the prevention of CRBSI have yielded conflicting results because of differences in study design, case mix population, and lock dwell time (Sanders et al., 2008; Slobbe et al., 2010; Broom et al., 2012; Pérez-Granda et al., 2014; Souweine et al., 2015). Either way, there are a number of concerns with the use of such high concentrations of ethanol in lock solutions for fear of catheter structural degradation, plasma protein precipitation and catheter occlusion (Mermel and Alang, 2014). However, ethanol solution at a 40% v/v concentration inhibits bacterial and fungi growth in established biofilms, does not induce catheter damage, and has satisfactory compatibility when mixed with low molecular weight heparin and heparinoids. When combined with low molecular weight heparin, 40% v/v ethanol may exert strong anticoagulant activity and has only a marginal impact on plasma protein precipitation. No clinical study has so far assessed the efficacy of such mixtures in preventing CRBSI.

FUTURE CHALLENGES AND LIMITATIONS OF ANTI-BIOFILM STRATEGIES

Conventional and current anti-biofilm therapies target one bacterial species without considering that most biofilm-related and chronic infections are due to the persistence of polymicrobial biofilms (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). Thus, there is no ideal solution to totally eradicate biofilm, but the key would be the simultaneous application of agents implementing mechanisms with synergic potential in order to both disturb the biofilm structure and kill bacteria (Khan et al., 2014). Multidisciplinary approaches are needed to decipher the generic networks underlying complex community interactions and to

place them in their ecological and evolutionary context. The use of computational tools to comprehensively understand anti-biofilm processes seems essential. Biofilm and multispecies biofilm modeling techniques are available and take into account heterotroph parameters (Picioreanu et al., 2004; Lardon et al., 2011). Three-dimensional computer models of biofilm dynamics have been developed as tools for investigating mechanisms of protection against antimicrobial agents in biofilms (Chambless et al., 2006). They could be used for the analysis of the effects of anti-biofilm agents, in particular to assess their efficacy and to consider how they could impact the emergence of new classes of resistant microbes (Phillips et al., 2015).

The Food and Drug Administration (FDA) has received several medical device submissions that contain anti-biofilm claims (Phillips et al., 2015). However, current *in vitro* and *in vivo* assays are unable to effectively predict biofilm outcomes in humans and it is therefore important to develop reliable alternatives to clinical studies for the evaluation of anti-biofilm claims with standardized anti-biofilm procedures and validation methods that can establish correlation with clinical outcomes. That goes hand in hand with the elucidation of the mechanisms of action of the numerous anti-biofilm and bactericidal agents described so far. As already proposed in the Nutrition and Health claims domain, considering bacterial anti-biofilm agents will be useful in the future to establish a framework to help academic and industrial communities to explore their potential in accordance with health and nutrition policy (Miquel et al., 2015). In part because of the administrative complexity of these approaches, other potential applications must be envisaged such as vaccine strategy. The vaccine against the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* that preferentially targets FomA, an outer membrane protein involved in bacterial co-aggregation, can be considered as a pioneer anti-biofilm vaccine (Liu et al., 2010). New and specific vaccines are needed but it is necessary first to more fully investigate the interactions between biofilm and the host immune system, a domain as yet unexplored (Bryers, 2008).

Finally, modification of gene expression of pathogens within biofilm by probiotic counterparts could represent an interesting anti-biofilm approach with a dual-purpose: to limit bacterial colonization and inhibit the expression of virulence factors. For instance, some *Lactobacilli* down-regulate the expression of the virulence genes of *S. mutans*, *S. aureus*, and *Salmonella enterica* (Das et al., 2013; Nouaille et al., 2014; Wu et al., 2015). In the literature, the biofilm mode of life is generally opposed to the virulence capacities of bacteria (Claret et al., 2007), suggesting that biofilm ensures that bacteria stay within a specific niche and that its destabilization induces adverse effects. Further studies are required to assess the *in vivo* benefit of anti-biofilm approaches that can guarantee to have therapeutic or prophylactic benefits and to be very specific, highly effective and environmentally safe. However, due consideration should be given to the comparative risks and benefits for the patient, in particular the potential side effects on beneficial bacteria of the host microbiota and the emergence of antimicrobial resistances (Phillips et al., 2015).

CONCLUSION

The objective of the review was to give a better definition of the anti-biofilm activities involved in microbial crosstalk. The prevalence of biofilm is not only a significant problem for human health, but also in food and the food industry, and in water and sewage treatment, and warrants expenditure for the development of effective anti-biofilm strategies. Coating catheter surfaces with antimicrobial agents and locking the catheter lumens with antimicrobial solutions are two different approaches that have produced encouraging results with regard to catheter-related infections. A major obstacle will be to translate the use of original anti-biofilm agents into commercial reality, in part because of the necessity to develop specific drug delivery applications. It still remains a real challenge for scientists in this innovative cross-cutting research domain.

REFERENCES

- Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V., and Jafarian-Dehkordi, A. (2013). In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Res. Pharm. Sci.* 8, 260–268.
- Abedon, S. T. (2015). Ecology of anti-biofilm agents ii: bacteriophage exploitation and biocontrol of Biofilm Bacteria. *Pharm. Basel Switz.* 8, 559–589. doi: 10.3390/ph8030559
- Aghazaii, M., Plamondon, I., Lebel, M., Douville, P., and Desmeules, S. (2005). Estimation of heparin leak into the systemic circulation after central venous catheter heparin lock. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc.* 20, 1238–1240. doi: 10.1093/ndt/gfh841
- Allison, D. G., Cronin, M. A., Hawker, J., and Freeman, S. (2000). Influence of cranberry juice on attachment of *Escherichia coli* to glass. *J. Basic Microbiol.* 40, 3–6. doi: 10.1002/(SICI)1521-4028(200002)40:1<3::AID-JOBM3>3.0.CO;2-L
- Ammons, M. C., and Copié, V. (2013). Mini-review: lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling* 29, 443–455. doi: 10.1080/08927014.2013.773317
- Bach, A., Darby, D., Böttiger, B., Böhrer, H., Motsch, J., and Martin, E. (1996). Retention of the antibiotic teicoplanin on a hydromer-coated central venous catheter to prevent bacterial colonization in postoperative surgical patients. *Intensive Care Med.* 22, 1066–1069. doi: 10.1007/BF01699229
- Bakkayaraj, D., and Pandian, S. K. (2014). “Biofilm inhibition by nanoparticles,” in *Antibiofilm Agents Springer Series on Biofilms*, eds K. P. Rumbaugh and I. Ahmad (Berlin: Springer), 385–406. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-53833-9_17 [accessed September 23, 2015].
- Barra, F., Rossetto, E., Soriano, A. A., Vollaro, A., Postiglione, I., Pierantoni, G. M., et al. (2015). Photodynamic and antibiotic therapy in combination to fight biofilms and resistant surface bacterial infections. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 20417–20430. doi: 10.3390/ijms160920417
- Benmehernene, Z., Fernandez-No, I., Kihal, M., Böhme, K., Calo-Mata, P., and Barros-Velazquez, J. (2013). Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 7, 66–73. doi: 10.2174/1872215611307010010
- Berra, L., Kolobow, T., Laquerriere, P., Pitts, B., Bramati, S., Pohlmann, J., et al. (2008). Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: a clinical trial. *Intensive Care Med.* 34, 1030–1037. doi: 10.1007/s00134-008-1100-1
- Betjes, M. G. H., and van Agteren, M. (2004). Prevention of dialysis catheter-related sepsis with a citrate-taurolidine-containing lock solution. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc.* 19, 1546–1551. doi: 10.1093/ndt/gfh014
- Beyth, N., Houria-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., Hazan, R., Beyth, N., et al. (2015). Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials, alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. evid.-based complement, altern. med. evid.-based complement. *Altern. Med.* 2015:e246012. doi: 10.1155/2015/246012
- Bisseling, T. M., Willemse, M. C., Versleijen, M. W., Hendriks, J. C., Vissers, R. K., and Wanten, G. J. (2010). Taurolidine lock is highly effective in preventing catheter-related bloodstream infections in patients on home parenteral nutrition: a heparin-controlled prospective trial. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 29, 464–468. doi: 10.1016/j.clnu.2009.12.005
- Bonne, S., Mazuski, J. E., Sona, C., Schallom, M., Boyle, W., Buchman, T. G., et al. (2015). Effectiveness of minocycline and rifampin vs chlorhexidine and silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters in preventing central line-associated bloodstream infection in a high-volume academic intensive care unit: a before and after trial. *J. Am. Coll. Surg.* 221, 739–747. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.05.013
- Brackman, G., and Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr. Pharm. Des.* 21, 5–11. doi: 10.2174/138161282066614090514627
- Broom, J. K., Krishnasamy, R., Hawley, C. M., Playford, E. G., and Johnson, D. W. (2012). A randomised controlled trial of *Heparin* versus *EthAnol Lock* THerapY for the prevention of catheter associated infection in haemodialysis patients—the HEALTHY-CATH trial. *BMC Nephrol.* 13:146. doi: 10.1186/1471-2369-13-146
- Brown, H. L., Hanman, K., Reuter, M., Betts, R. P., and van Vliet, A. H. M. (2015). *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Front. Microbiol.* 6:699. doi: 10.3389/fmicb.2015.00699
- Bryers, J. D. (2008). Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1–18. doi: 10.1002/bit.21838
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., and Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G315–G322. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2006
- Cai, T., Caola, I., Tessarolo, F., Piccoli, F., D'Elia, C., Caciagli, P., et al. (2014). Solidago, orthosiphon, birch and cranberry extracts can decrease microbial colonization and biofilm development in indwelling urinary catheter: a microbiologic and ultrastructural pilot study. *World J. Urol.* 32, 1007–1014. doi: 10.1007/s00345-013-1173-5
- Castro, J., Henriques, A., Machado, A., Henriques, M., Jefferson, K. K., and Cerca, N. (2013). Reciprocal interference between *Lactobacillus* spp. and *Gardnerella vaginalis* on initial adherence to epithelial cells. *Int. J. Med. Sci.* 10, 1193–1198. doi: 10.7150/ijms.6304
- Cha, J.-O., Park, Y.-K., Lee, Y. S., and Chung, G. T. (2011). In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 112–118. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.11.018
- Chambless, J. D., Hunt, S. M., and Stewart, P. S. (2006). A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2005–2013. doi: 10.1128/AEM.72.3.2005-2013.2006

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed, have made substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

RL received a salary from the Auvergne Région (Bourse Cluster, Institut de Recherche Pharmabiotique). The authors wish to acknowledge the contribution of the Confocal Microscopy Facility ICCF (Imagerie Confocale Clermont-Ferrand) at Université Clermont Auvergne. We would like to thank Christelle Blavignac, Centre Imagerie Cellulaire Santé – Université Clermont Auvergne, for their technical support and expertise in electron microscopy.

- Chew, S. Y., Cheah, Y. K., Seow, H. F., Sandai, D., and Than, L. T. L. (2015). In vitro modulation of probiotic bacteria on the biofilm of *Candida glabrata*. *Anaerobe* 34, 132–138. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.009
- Chopra, L., Singh, G., Kumar Jena, K., and Sahoo, D. K. (2015). Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci. Rep.* 5, 13412. doi: 10.1038/srep13412
- Christopher, A. B., Arndt, A., Cugini, C., and Davey, M. E. (2010). A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiol. Read. Engl.* 156, 3469–3477. doi: 10.1099/mic.0.042671-0
- Cirioni, O., Moccagiani, F., Ghiselli, R., Silvestri, C., Gabrielli, E., Marchionni, E., et al. (2010). Daptomycin and rifampin alone and in combination prevent vascular graft biofilm formation and emergence of antibiotic resistance in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 40, 817–822. doi: 10.1016/j.ejvs.2010.08.009
- Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 33275–33283. doi: 10.1074/jbc.M702800200
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318
- Darouiche, R. O., Berger, D. H., Khordori, N., Robertson, C. S., Wall, M. J., Metzler, M. H., et al. (2005). Comparison of antimicrobial impregnation with tunneling of long-term central venous catheters. *Ann. Surg.* 242, 193–200. doi: 10.1097/01.sla.0000171874.29934.61
- Das, J. K., Mishra, D., Ray, P., Tripathy, P., Beuria, T. K., Singh, N., et al. (2013). In vitro evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Gut Pathog.* 5:11. doi: 10.1186/1757-4749-5-11
- Davies, D. G., and Marques, C. N. H. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 191, 1393–1403. doi: 10.1128/JB.01214-08
- Dawgul, M., Maciejewska, M., Jaskiewicz, M., Karafova, A., and Kamysz, W. (2014). Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta Pol. Pharm.* 71, 39–47.
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Mansour, S., and Hancock, R. E. W. (2014). A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5363–5371. doi: 10.1128/AAC.03163-14
- Desrousseaux, C., Sautou, V., Descamps, S., and Traoré, O. (2013). Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *J. Hosp. Infect.* 85, 87–93. doi: 10.1016/j.jhin.2013.06.015
- Dixon, J. J., Steele, M., and Makanjuola, A. D. (2012). Anti-microbial locks increase the prevalence of *Staphylococcus aureus* and antibiotic-resistant *Enterobacter*: observational retrospective cohort study. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc.* 27, 3575–3581. doi: 10.1093/ndt/gfs081
- Dogra, G. K., Herson, H., Hutchison, B., Irish, A. B., Heath, C. H., Golledge, C., et al. (2002). Prevention of tunneled hemodialysis catheter-related infections using catheter-restricted filling with gentamicin and citrate: a randomized controlled study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2133–2139. doi: 10.1097/01.ASN.0000022890.29656.22
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Doroshenko, N., Tseng, B. S., Howlin, R. P., Deacon, J., Wharton, J. A., Thurner, P. J., et al. (2014). Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7273–7282. doi: 10.1128/AAC.03132-14
- Dörr, T., Vulic, M., and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the *TisB* toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 8:e1000317. doi: 10.1371/journal.pbio.1000317
- Droste, J. C., Jeraj, H. A., MacDonald, A., and Farrington, K. (2003). Stability and in vitro efficacy of antibiotic-heparin lock solutions potentially useful for treatment of central venous catheter-related sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 849–855. doi: 10.1093/jac/dkg179
- Dümichen, M. J., Seeger, K., Lode, H. N., Kühl, J. S., Eboll, W., Degenhardt, P., et al. (2012). Randomized controlled trial of taurolidine citrate versus heparin as catheter lock solution in paediatric patients with haematological malignancies. *J. Hosp. Infect.* 80, 304–309. doi: 10.1016/j.jhin.2012.01.003
- Ermolaeva, S. A., Sysolyatina, E. V., and Gintsburg, A. L. (2015). Atmospheric pressure nonthermal plasmas for bacterial biofilm prevention and eradication. *Biointerphases* 10, 029404. doi: 10.1116/1.4914382
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H., and Hattori, M. (2012). Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes* 3, 449–454. doi: 10.4161/gmic.21214
- Gawande, P. V., Leung, K. P., and Madhyastha, S. (2014). Antibiofilm and antimicrobial efficacy of dispersin^B-KSL-W peptide-based wound gel against chronic wound infection associated bacteria. *Curr. Microbiol.* 68, 635–641. doi: 10.1007/s00284-014-0519-6
- Ghorbanzadeh, R., Pourakbari, B., and Bahador, A. (2015). Effects of baseplates of orthodontic appliances with in situ generated silver nanoparticles on cariogenic bacteria: a randomized, double-blind cross-over clinical trial. *J. Contemp. Dent. Pract.* 16, 291–298. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1678
- Girardot, M., Guerneau, A., Boudesocque, L., Costa, D., Bazinet, L., Enguehard-Gueffier, C., et al. (2014). Promising results of cranberry in the prevention of oral *Candida* biofilms. *Pathog. Dis.* 70, 432–439. doi: 10.1111/2049-632X.12168
- Goncalves, M. D. S., Delattre, C., Balestrino, D., Charbonnel, N., Elboutachfaite, R., Wadouachi, A., et al. (2014). Anti-biofilm activity: a function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *PLoS ONE* 9:e99995. doi: 10.1371/journal.pone.0099995
- Günther, F., Wabnitz, G. H., Stroh, P., Prior, B., Obst, U., Samstag, Y., et al. (2009). Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol. Immunol.* 46, 1805–1813. doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.020
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1034–1043. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x
- Hamblin, M. R., and Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 3, 436–450. doi: 10.1039/b311900a
- Handrup, M. M., Möller, J. K., and Schröder, H. (2013). Central venous catheters and catheter locks in children with cancer: a prospective randomized trial of taurolidine versus heparin. *Pediatr. Blood Cancer* 60, 1292–1298. doi: 10.1002/pbc.24482
- He, X., McLean, J. S., Guo, L., Lux, R., and Shi, W. (2014). The social structure of microbial community involved in colonization resistance. *ISME J.* 8, 564–574. doi: 10.1038/ismej.2013.172
- He, X., Tian, Y., Guo, L., Lux, R., Zusman, D. R., and Shi, W. (2010). Oral-derived bacterial flora defends its domain by recognizing and killing intruders—a molecular analysis using *Escherichia coli* as a model intestinal bacterium. *Microb. Ecol.* 60, 655–664. doi: 10.1007/s00248-010-9708-4
- Hengzhuang, W., Wu, H., Ciofu, O., Song, Z., and Höiby, N. (2012). In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2683–2690. doi: 10.1128/AAC.06486-11
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
- Hockenhull, J. C., Dwan, K. M., Smith, G. W., Gamble, C. L., Boland, A., Walley, T. J., et al. (2009). The clinical effectiveness of central venous catheters treated with anti-infective agents in preventing catheter-related bloodstream infections: a systematic review. *Crit. Care Med.* 37, 702–712. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181958915
- Hsu, C.-Y., Lin, M.-H., Chen, C.-C., Chien, S.-C., Cheng, Y.-H., Su, I.-N., et al. (2011). Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63, 236–247. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00846.x
- Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., and Al-Shabib, N. A. (2015). Trigonella foenum-graecum (Seed) extract interferes with quorum sensing regulated traits and biofilm formation in the strains of *Pseudomonas aeruginosa* and

- Aeromonas hydrophila*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015, 879540. doi: 10.1155/2015/879540
- Huws, S. A., McBain, A. J., and Gilbert, P. (2005). Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J. Appl. Microbiol.* 98, 238–244. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02449.x
- Irie, Y., O'Toole, G. A., and Yuk, M. H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 237–243. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.012
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., et al. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465, 346–349. doi: 10.1038/nature09074
- Jakobsen, T. H., van Gennip, M., Phipps, R. K., Shanmugham, M. S., Christensen, L. D., Alhede, M., et al. (2012). Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2314–2325. doi: 10.1128/AAC.05919-11
- Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevich, H., Zabielski, R., and Grzesiuk, E. (2008). Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for Adhesion to Caco-2 Cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2008:357964. doi: 10.1155/2008/357964
- Justo, J. A., and Bookstaver, P. B. (2014). Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect. Drug Resist.* 7, 343–363. doi: 10.2147/IDR.S51388
- Kalfon, P., de Vaumas, C., Samba, D., Boulet, E., Lefrant, J.-Y., Eyrraud, D., et al. (2007). Comparison of silver-impregnated with standard multi-lumen central venous catheters in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 35, 1032–1039. doi: 10.1097/01.CCM.0000259378.53166.1B
- Kanaa, M., Wright, M. J., Akbani, H., Laboi, P., Bhandari, S., and Sandoe, J. A. T. (2015). Cathasept line lock and microbial colonization of tunneled hemodialysis catheters: a multicenter randomized controlled trial. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 66, 1015–1023. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.04.047
- Kaplan, J. B. (2009). Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int. J. Artif. Organs.* 32, 545–554.
- Kaplan, J. B., Izano, E. A., Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L., et al. (2012). Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 3:e198. doi: 10.1128/mBio.00198-12
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., and Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2633–2636. doi: 10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004
- Karwacki, M. T., Kadouri, D. E., Bendaoud, M., Izano, E. A., Sampathkumar, V., Inzana, T. J., et al. (2013). Antibiofilm activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 capsular polysaccharide. *PLoS ONE* 8:e63844. doi: 10.1371/journal.pone.0063844
- Khan, M. S. A., Ahmad, I., Sajid, M., and Cameotra, S. S. (2014). “Current and emergent control strategies for medical biofilms,” in *Antibiofilm Agents Springer Series on Biofilms*, eds K. P. Rumbaugh and I. Ahmad (Berlin: Springer), 117–159. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-53833-9_7 [accessed September 18, 2015].
- Kim, Y., Oh, S., and Kim, S. H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 324–329. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.053
- Kollef, M. H., Afessa, B., Anzueto, A., Veremakis, C., Kerr, K. M., Margolis, B. D., et al. (2008). Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial. *JAMA* 300, 805–813. doi: 10.1001/jama.300.7.805
- Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J., and Wood, T. K. (2013). Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1468–1473. doi: 10.1128/AAC.02135-12
- Lai, N. M., Chaiyakunapruk, N., Lai, N. A., O'Riordan, E., Pau, W. S. C., and Saint, S. (2013). Catheter impregnation, coating or bonding for reducing central venous catheter-related infections in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 6:CD007878. doi: 10.1002/14651858.CD007878.pub2
- Landini, G., Riccobono, E., Giani, T., Arena, F., Rossolini, G. M., and Pallecchi, L. (2015). Bactericidal activity of ceftaroline against mature *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 551–553. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.01.001
- Landry, D. L., Braden, G. L., Gobeille, S. L., Haessler, S. D., Vaidya, C. K., and Sweet, S. J. (2010). Emergence of gentamicin-resistant bacteremia in hemodialysis patients receiving gentamicin lock catheter prophylaxis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 1799–1804. doi: 10.2215/CJN.01270210
- 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3880–3886. doi: 10.1128/AAC.00134-09
- Lardon, L. A., Merkey, B. V., Martins, S., Dötsch, A., Picioreanu, C., Kreft, J.-U., et al. (2011). iDyMoMiCS: next-generation individual-based modelling of biofilms. *Environ. Microbiol.* 13, 2416–2434. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02414.x
- Lázaro-Díez, M., Remuzgo-Martínez, S., Rodríguez-Mirones, C., Acosta, F., Icardo, J. M., Martínez-Martínez, L., et al. (2016). Effects of subinhibitory concentrations of ceftaroline on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms. *PLoS ONE* 11:e0147569. doi: 10.1371/journal.pone.0147569
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543. doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- León, C., Ruiz-Santana, S., Rello, J., de la Torre, M. V., Vallés, J., Alvarez-Lerma, F., et al. (2004). Benefits of minocycline and rifampin-impregnated central venous catheters. A prospective, randomized, double-blind, controlled, multicenter trial. *Intensive Care Med.* 30, 1891–1899. doi: 10.1007/s00134-004-2378-2
- Leoni, L., and Landini, P. (2014). Microbiological methods for target-oriented screening of biofilm inhibitors. *Methods Mol. Biol.* 1147, 175–186. doi: 10.1007/978-1-4939-0467-9_12
- Lin, X., Chen, X., Chen, Y., Jiang, W., and Chen, H. (2015). The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral. Dis.* 21, e128–e134. doi: 10.1111/odi.12257
- Lindsay, D., and von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J. Hosp. Infect.* 64, 313–325. doi: 10.1016/j.jhin.2006.06.028
- Liu, H., Liu, H., Deng, J., Chen, L., Yuan, L., and Wu, Y. (2014). Preventing catheter-related bacteremia with taurolidine-citrate catheter locks: a systematic review and meta-analysis. *Blood Purif.* 37, 179–187. doi: 10.1159/000360271
- Liu, P.-F., Shi, W., Zhu, W., Smith, J. W., Hsieh, S.-L., Gallo, R. L., et al. (2010). Vaccination targeting surface FomA of *Fusobacterium nucleatum* against bacterial co-aggregation: implication for treatment of periodontal infection and halitosis. *Vaccine* 28, 3496–3505. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.047
- Lorente, L., Lecuona, M., Jiménez, A., Raja, L., Cabrera, J., Gonzalez, O., et al. (2015). Chlorhexidine-silver sulfadiazine- or rifampicin-miconazole-impregnated venous catheters decrease the risk of catheter-related bloodstream infection similarly. *Am. J. Infect. Control* 44, 50–53. doi: 10.1016/j.ajic.2015.08.014
- Macfarlane, S., and Dillon, J. F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1187–1196. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x
- Maki, D. G., Ash, S. R., Winger, R. K., Lavin, P., and Investigators. (2011). A novel antimicrobial and antithrombotic lock solution for hemodialysis catheters: a multi-center, controlled, randomized trial. *Crit. Care Med.* 39, 613–620. doi: 10.1097/CCM.0b013e318206b5a2
- Maki, D. G., Kluger, D. M., and Crnich, C. J. (2006). The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clin. Proc.* 81, 1159–1171. doi: 10.4065/81.9.1159
- Marquès, C., Laurent, F., Forestier, C., Pracros, A., Tasse, J., Collin, V., et al. (2015). Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *J. Med. Microbiol.* 64, 1021–1026. doi: 10.1099/jmm.0.000125
- Martín, R., Miquel, S., Langella, P., and Bermúdez-Humarán, L. G. (2014a). The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence* 5, 413–423. doi: 10.4161/viru.27864

- Martín, R., Miquel, S., Ulmer, J., Langella, P., and Bermúdez-Humarán, L. G. (2014b). Gut ecosystem: how microbes help us. *Benef. Microbes* 5, 219–233. doi: 10.3920/BM2013.0057
- Mascio, C. T. M., Alder, J. D., and Silverman, J. A. (2007). Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4255–4260. doi: 10.1128/AAC.00824-07
- Mermel, L. A., and Alang, N. (2014). Adverse effects associated with ethanol catheter lock solutions: a systematic review. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2611–2619. doi: 10.1093/jac/dku182
- Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O'Grady, N. P., et al. (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 49, 1–45. doi: 10.1086/599376
- Miquel, S., Beaumont, M., Martín, R., Langella, P., Braesco, V., and Thomas, M. (2015). A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. *Microb. Cell Factories* 14:48. doi: 10.1186/s12934-015-0229-1
- Morán, A., Gutiérrez, S., Martínez-Blanco, H., Ferrero, M. A., Monteagudo-Mera, A., and Rodríguez-Aparicio, L. B. (2014). Non-toxic plant metabolites regulate *Staphylococcus* viability and biofilm formation: a natural therapeutic strategy useful in the treatment and prevention of skin infections. *Biofouling* 30, 1175–1182. doi: 10.1080/08927014.2014.976207
- Neethirajan, S., Clond, M. A., and Vogt, A. (2014). Medical biofilms—nanotechnology approaches. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10, 2806–2827. doi: 10.1166/jbn.2014.1892
- Ng, M., Epstein, S. B., Callahan, M. T., Piotrowski, B. O., Simon, G. L., Roberts, A. D., et al. (2014). Induction of MRSA biofilm by low-dose β -lactam antibiotics: specificity, prevalence and dose-response effects. *Dose Res. Publ. Int. Hormesis Soc.* 12, 152–161. doi: 10.2203/dose-response.13-021.Kaplan
- Nitschke, M., Araújo, L. V., Costa, S. G., Pires, R. C., Zeraik, A. E., Fernandes, A. C. L. B., et al. (2009). Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 241–247. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02646.x
- Nouaille, S., Rault, L., Jeanson, S., Loupière, P., Le Loir, Y., and Even, S. (2014). Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the agr system. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7028–7035. doi: 10.1128/AEM.02287-14
- Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., et al. (2013). Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5572–5579. doi: 10.1128/AAC.00888-13
- Olson, M. E., Slater, S. R., Rupp, M. E., and Fey, P. D. (2010). Rifampicin enhances activity of daptomycin and vancomycin against both a polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-dependent and -independent *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2164–2171. doi: 10.1093/jac/dkq314
- Örmälä, A.-M., and Jalasvuori, M. (2013). Phage therapy. *Bacteriophage* 3:e24219. doi: 10.4161/bact.24219
- Pasquarelli, S., Citterio, B., Cesare, A. D., Amiri, M., Manti, A., Vuotto, C., et al. (2014). Role of daptomycin in the induction and persistence of the viable but non-culturable state of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathog. Basel Switz.* 3, 759–768. doi: 10.3390/pathogens303075
- Pérez-Granda, M. J., Barrio, J. M., Muñoz, P., Hortal, J., Rincón, C., Rabadán, P. M., et al. (2014). Ethanol lock therapy (E-Lock) in the prevention of catheter-related bloodstream infections (CR-BSI) after major heart surgery (MHS): a randomized clinical trial. *PLoS ONE* 9:e91838. doi: 10.1371/journal.pone.0091838
- Phillips, K. S., Patwardhan, D., and Jayan, G. (2015). Biofilms, medical devices, and antibiofilm technology: key messages from a recent public workshop. *Am. J. Infect. Control* 43, 2–3. doi: 10.1016/j.jaic.2014.09.019
- Picioreanu, C., Kreft, J.-U., and Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Particle-based multidimensional multispecies biofilm model. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3024–3040. doi: 10.1128/AEM.70.5.3024-3040.2004
- Prince, T., McBain, A. J., and O'Neill, C. A. (2012). *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5119–5126. doi: 10.1128/AEM.00595-12
- Quinn, G. A., Maloy, A. P., Banat, M. M., and Banat, I. M. (2013). A comparison of effects of broad-spectrum antibiotics and biosurfactants on established bacterial biofilms. *Curr. Microbiol.* 67, 614–623. doi: 10.1007/s00284-013-0412-8
- Quintas, V., Prada-López, I., Donos, N., Suárez-Quintanilla, D., and Tomás, I. (2015). Antiplaque effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an in situ model of oral biofilm growth: a randomised clinical trial. *PLoS ONE* 10:e0117177. doi: 10.1371/journal.pone.0117177
- Rafsanjany, N., Sendker, J., Brand, S., Doubrindt, U., and Hensel, A. (2015). In vivo consumption of cranberry exerts ex vivo antiadhesive activity against FimH-dominated uropathogenic *E. coli*: a combined in vivo, ex vivo, and in vitro study of an extract from *Vaccinium macrocarpon*. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8804–8818. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03030
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Mohammadi, P., Soudi, M. R., Babaie-Naeij, H., and Fallahi, H. (2014). A combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *J. Med. Microbiol.* 63, 1509–1516. doi: 10.1099/jmm.0.075374-0
- RAISIN (2015). Available at: http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/R_apports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2015/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-establissemens-d-hospitalisation-a-domicile-HAD-France-mai-juin-2012 [accessed December 21, 2015].
- Ramos, E. R., Reitzel, R., Jiang, Y., Hachem, R. Y., Chaffari, A. M., Chemaly, R. F., et al. (2011). Clinical effectiveness and risk of emerging resistance associated with prolonged use of antibiotic-impregnated catheters: more than 0.5 million catheter days and 7 years of clinical experience. *Crit. Care Med.* 39, 245–251. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181feb83e
- Rasko, D. A., and Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 117–128. doi: 10.1038/nrd3013
- Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Li, X., Tian, M., et al. (2012). Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe* 18, 508–515. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.08.001
- Rendueles, O., Beloin, C., Latour-Lambert, P., and Ghigo, J.-M. (2014). A new biofilm-associated colicin with increased efficiency against biofilm bacteria. *ISME J.* 8, 1275–1288. doi: 10.1038/ismej.2013.238
- Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 972–989. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x
- Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (2015). Mechanisms of competition in biofilm communities. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–18. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014
- Rieu, A., Aoudia, N., Jego, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandet, R., et al. (2014). The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of Lactobacillus. *Cell. Microbiol.* 16, 1836–1853. doi: 10.1111/cmi.12331
- Rossmann, F. S., Racek, T., Wobser, D., Puchalka, J., Rabener, E. M., Reiger, M., et al. (2015). Phage-mediated dispersal of biofilm and distribution of bacterial virulence genes is induced by quorum sensing. *PLoS Pathog.* 11:e1004653. doi: 10.1371/journal.ppat.1004653
- Rumbaugh, K. P., and Ahmad, I. (eds) (2014). *Antibiofilm Agents*. Berlin: Springer. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-53833-9> [accessed September 25, 2015].
- Sanders, J., Pithie, A., Ganly, P., Surgeon, L., Wilson, R., Merriman, E., et al. (2008). A prospective double-blind randomized trial comparing intraluminal ethanol with heparinized saline for the prevention of catheter-associated bloodstream infection in immunosuppressed haematology patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 809–815. doi: 10.1093/jac/dkn284
- Saxena, A. K., Panhotra, B. R., and Naguib, M. (2002). Sudden irreversible sensory-neural hearing loss in a patient with diabetes receiving amikacin as an antibiotic-heparin lock. *Pharmacotherapy* 22, 105–108. doi: 10.1592/phco.22.1.105.33507
- Scannapieco, F. A., Yu, J., Raghavendran, K., Vacanti, A., Owens, S. I., Wood, K., et al. (2009). A randomized trial of chlorhexidine gluconate on oral bacterial pathogens in mechanically ventilated patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 13:R117. doi: 10.1186/cc7967
- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., and Julak, J. (2015). Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.* 33, 1108–1119. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.002

- Sepehr, S., Rahmani-Badi, A., Babaie-Naeij, H., and Soudi, M. R. (2014). Unsaturated fatty acid, *cis*-2-decenoic acid, in combination with disinfectants or antibiotics removes pre-established biofilms formed by food-related bacteria. *PLoS ONE* 9:e101677. doi: 10.1371/journal.pone.0101677
- Siala, W., Mingeot-Leclercq, M.-P., Tulkens, P. M., Hallin, M., Denis, O., and Van Bambeke, F. (2014). Comparison of the antibiotic activities of daptomycin, vancomycin, and the investigational fluoroquinolone delafloxacin against biofilms from *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6385–6397. doi: 10.1128/AAC.03482-14
- Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L., and Block, J. C. (1998). Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 197–202.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., and Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1955–1958. doi: 10.1093/jac/dkq257
- Slobbe, L., Doorduijn, J. K., Lugtenburg, P. J., El Barzouhi, A., Boersma, E., van Leeuwen, W. B., et al. (2010). Prevention of catheter-related bacteremia with a daily ethanol lock in patients with tunneled catheters: a randomized, bo-controlled trial. *PLoS ONE* 5:e10840. doi: 10.1371/journal.pone.0010840
- Solomon, L. R., Cheesbrough, J. S., Ebah, L., Al-Sayed, T., Heap, M., Millband, N., et al. (2010). A randomized double-blind controlled trial of taurolidine-citrate catheter locks for the prevention of bacteremia in patients treated with hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 55, 1060–1068. doi: 10.1053/j.ajkd.2009.11.025
- Souweine, B., Lautrette, A., Gruson, D., Canet, E., Klouche, K., Argaud, L., et al. (2015). Ethanol lock and risk of hemodialysis catheter infection in critically ill patients. A randomized controlled trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1024–1032. doi: 10.1164/rccm.201408-1431OC
- Stacy, A., McNally, L., Darch, S. E., Brown, S. P., and Whiteley, M. (2016). The biogeography of polymicrobial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 93–105. doi: 10.1038/nrmicro.2015.8
- Stewart, P. S., Davison, W. M., and Steenbergen, J. N. (2009). Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3505–3507. doi: 10.1128/AAC.01728-08
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K.-I., Tajima, A., Iwase, T., et al. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* 195, 1645–1655. doi: 10.1128/JB.01672-12
- Tang, H.-J., Chen, C.-C., Cheng, K.-C., Toh, H.-S., Su, B.-A., Chiang, S.-R., et al. (2012). In vitro efficacy of fosfomycin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 944–950. doi: 10.1093/jac/dkr535
- Tang, H.-J., Chen, C.-C., Cheng, K.-C., Wu, K.-Y., Lin, Y.-C., Zhang, C.-C., et al. (2013). In vitro efficacies and resistance profiles of rifampin-based combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5717–5720. doi: 10.1128/AAC.01236-13
- Tattawasart, U., Maillard, J. Y., Furr, J. R., and Russell, A. D. (1999). Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J. Hosp. Infect.* 42, 219–229. doi: 10.1053/jhin.1999.0591
- Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J. Immunol.* 195, 6585–6596. doi: 10.4049/jimmunol.1002794
- Timsit, J.-F., Dubois, Y., Minet, C., Bonadonna, A., Lugosi, M., Ara-Somohano, C., et al. (2011). New challenges in the diagnosis, management, and prevention of central venous catheter-related infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32, 139–150. doi: 10.1055/s-0031-1275526
- Trautner, B. W., and Darouiche, R. O. (2004). Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Arch. Intern. Med.* 164, 842–850. doi: 10.1001/archinte.164.8.842
- US Food and Drug Administration (2000). *Warning on Tricitrasol Dialysis Catheter Anticoagulant FDATP 4, 2000*. Available at: <http://www.hdcn.com/00/004fdci.htm> [accessed December 30, 2015].
- Valle, J., Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., et al. (2006). Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12558–12563. doi: 10.1073/pnas.0605399103
- Villatte, G., Massard, C., Descamps, S., Sibaud, Y., Forestier, C., and Awitor, K.-O. (2015). Photoactive TiO₂ antibacterial coating on surgical external fixation pins for clinical application. *Int. J. Nanomed.* 10, 3367–3375. doi: 10.2147/IJN.S81518
- Vuotto, C., Longo, F., and Donelli, G. (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int. J. Oral Sci.* 6, 189–194. doi: 10.1038/ijos.2014.52
- Walder, B., Pittet, D., and Tramèr, M. R. (2002). Prevention of bloodstream infections with central venous catheters treated with anti-infective agents depends on catheter type and insertion time: evidence from a meta-analysis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23, 748–756. doi: 10.1086/502005
- Walz, J. M., Avelar, R. L., Longtime, K. J., Carter, K. L., Mermel, L. A., Heard, S. O., et al. (2010). Anti-infective external coating of central venous catheters: a randomized, noninferiority trial comparing 5-fluorouracil with chlorhexidine/silver sulfadiazine in preventing catheter colonization. *Crit. Care Med.* 38, 2095–2102. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181f265ba
- Wang, H., Huang, T., Jing, J., Jin, J., Wang, P., Yang, M., et al. (2010a). Effectiveness of different central venous catheters for catheter-related infections: a network meta-analysis. *J. Hosp. Infect.* 76, 1–11. doi: 10.1016/j.jhin.2010.04.025
- Wang, Q., Sun, F.-J., Liu, Y., Xiong, L.-R., Xie, L.-L., and Xia, P.-Y. (2010b). Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2707–2711. doi: 10.1128/AAC.01565-09
- Willatts, S. M., Radford, S., and Leitermann, M. (1995). Effect of the antiedotoxin agent, taurolidine, in the treatment of sepsis syndrome: a bo-controlled, double-blind trial. *Crit. Care Med.* 23, 1033–1039. doi: 10.1097/00003246-199506000-00007
- Wingender, J., and Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 417–423. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.05.009
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Jonquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., et al. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* 11:61. doi: 10.1186/1741-7007-11-61
- Wu, C.-C., Lin, C.-T., Wu, C.-Y., Peng, W.-S., Lee, M.-J., and Tsai, Y.-C. (2015). Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol. Oral Microbiol.* 30, 16–26. doi: 10.1111/omi.12063
- Xie, Z., Siddiqi, N., and Rubin, E. J. (2005). Differential antibiotic susceptibilities of starved *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4778–4780. doi: 10.1128/AAC.49.11.4778-4780.2005
- Zacharioudakis, I. M., Zervou, F. N., Arvanitis, M., Ziakas, P. D., Mermel, L. A., and Mylonakis, E. (2014). Antimicrobial lock solutions as a method to prevent central line-associated bloodstream infections: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 59, 1741–1749. doi: 10.1093/cid/ciu671
- Zhang, Y.-C., Zhang, L.-W., Ma, W., Yi, H.-X., Yang, X., Du, M., et al. (2012). Screening of probiotic lactobacilli for inhibition of *Shigella sonnei* and the macromolecules involved in inhibition. *Anaerobe* 18, 498–503. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.08.007
- Zhao, Y., Li, Z., Zhang, L., Yang, J., Yang, Y., Tang, Y., et al. (2014). Citrate versus heparin lock for hemodialysis catheters: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 63, 479–490. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.08.016

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

Copyright © 2016 Miquel, Lagraveille, Souweine and Forestier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe #2

Communications scientifiques

Publications

Lagrafeuille, R., Miquel, S., Balestrino, D., Vareille-Delarbre, M., Chain, F., Langella, P., Forestier, C. *Two-sided effect of anti-biofilm activity of a Lactobacillus strain*. En cours de soumission.

Miquel, S., **Lagrafeuille, R.**, Souweine, B., Forestier, C. (2016). *Anti-biofilm Activity as a Health Issue*. Front. Microbiol. 7, 592.

Communications orales

Lagrafeuille, R., Miquel, S., Chain, F., Langella, P., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Anti-biofilm activity of Lactobacillus*. Biofilms 7, PORTO, Portugal, 26-28 juin 2016.

Lagrafeuille, R., Miquel, S., Chain, F., Langella, P., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Anti-biofilm activity of Lactobacillus*. Filière Biofilm, CLERMONT-FERRAND, France, 12 juillet 2016.

Lagrafeuille, R., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Activités anti-biofilm de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes opportunistes*. Journées Des Doctorants, Laboratoire Micro-organismes : Génome et Environnement, CLERMONT-FERRAND, France, 7 mars 2016.

Lagrafeuille, R., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Activités anti-biofilm et immunomodulatrices de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes*. Journées Des Doctorants, Laboratoire Micro-organismes : Génome et Environnement, CLERMONT-FERRAND, France, 21 février 2014.

Communications affichées

Lagrafeuille, R., Miquel, S., Chain, F., Langella, P., Forestier, C. *Assessing anti-biofilm activities of Lactobacillus strains in various experimental models*. Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, CLERMONT-FERRAND, France, 02-03 juin 2016.

Lagrafeuille, R., Miquel, S., Chain, F., Langella, P., Forestier, C. *Assessing anti-biofilm activities of Lactobacillus strains in various experimental models*. INRA - ROWETT, CLERMONT-FERRAND, France, 20-23 juin 2016.

Lagrafeuille, R., Miquel, S., Chain, F., Langella, P., Nivoliez, A., Bernardi, T., Badel, S., Rios, L., Balestrino, D., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Activités anti-biofilm de Lactobacillus*. 20^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL), LILLE, France, 17-19 juin 2015.

Lagrafeuille, R., Dubois, J-Y., Nivoliez, A., Bernardi, T., Badel, S., Rios, L., Balestrino, D., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Activités anti-biofilm de bactéries probiotiques vis-à-vis de bactéries pathogènes*. 10^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie (SFM), PARIS, France, 31 mars-01 avril 2014.

Articles de vulgarisation scientifique

Lagrafeuille, R., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Activités anti-biofilm de Lactobacillus vis-à-vis du pathogène K. pneumoniae*. www.auvergnesciences.com, 2016.

Lagrafeuille, R., Vareille-Delarbre, M., Forestier, C. *Activités anti-biofilm de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes opportunistes*. www.auvergnesciences.com, 2015.

