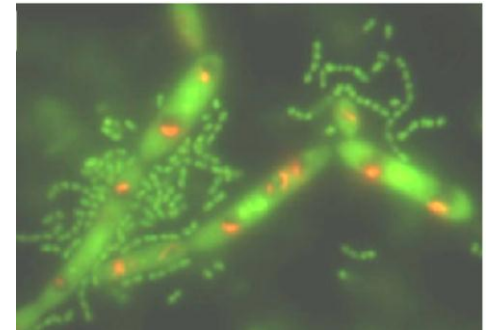
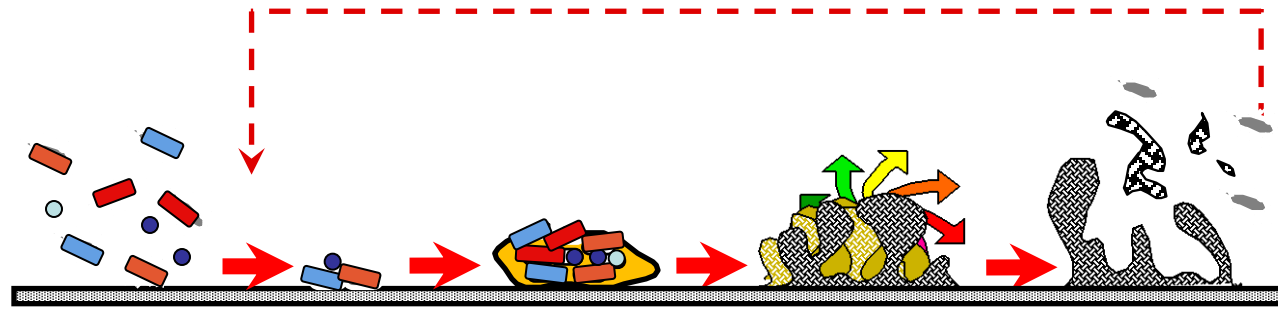




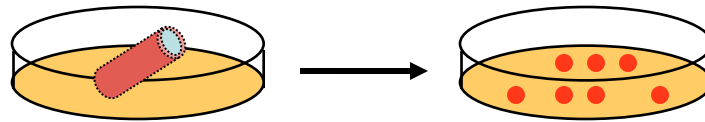
Co-biofilms: interactions entre pathogènes

Christiane Forestier

Université d'Auvergne Clermont Ferrand

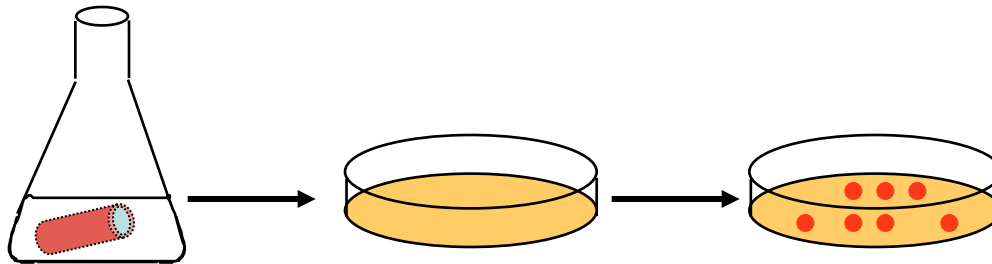
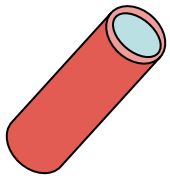
Détection des microorganismes présents à la surface de matériel invasif (biofilms)

Culture classique sur géloses nutritives



Seuil : 15 UFC/gélose

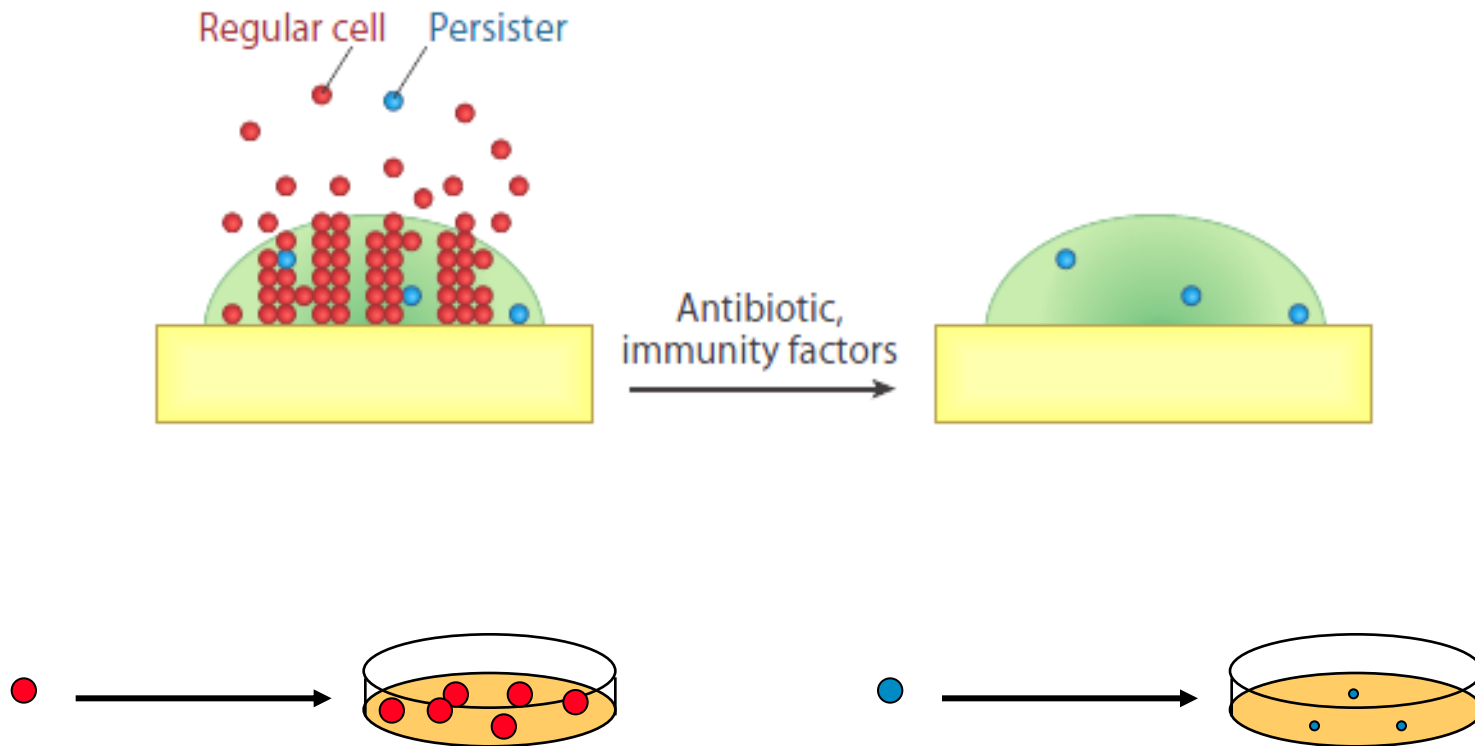
➔ Méthode semi quantitative (Maki)



Seuil : 10^3 UFC/ml

➔ Méthode quantitative (Brun-Buisson / Sherertz)

- ✓ Seule détection des microorganismes dominants
- ✓ Peu ou pas de détection des formes dormantes (persisters)



Cultures exhaustives de sondes urinaires

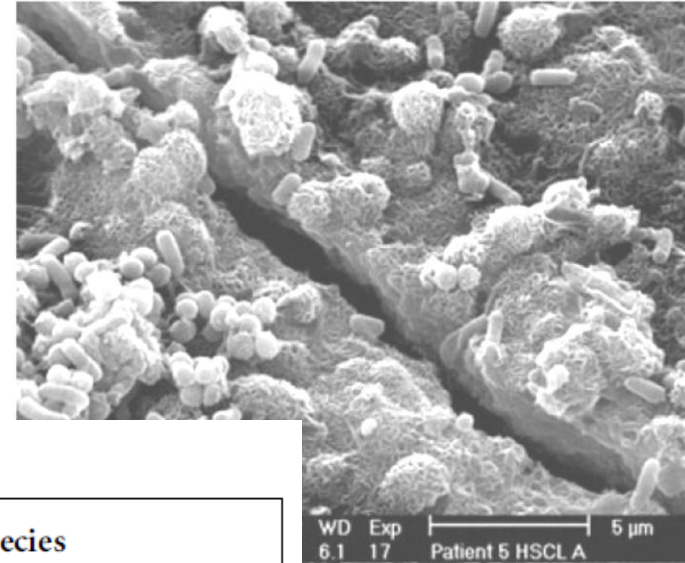
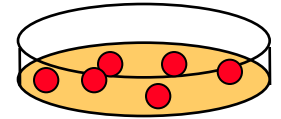


Table 1. Incidence of bacterial species isolated from 106 catheter biofilms

Species	No. (%) of catheters colonized by each species		
	All catheter biofilms*	Mixed-species biofilms†	Single-species biofilms‡
<i>Ps. aeruginosa</i>	38 (35.9)	31 (40.8)	7 (23.3)
<i>Ent. faecalis</i>	36 (34.0)	34 (44.7)	2 (6.7)
<i>E. coli</i>	33 (31.1)	31 (40.8)	2 (6.7)
<i>P. mirabilis</i>	32 (30.2)	26 (34.2)	6 (20.0)
<i>K. pneumoniae</i>	19 (17.9)	18 (23.7)	1 (3.3)
<i>M. morganii</i>	14 (13.2)	11 (14.5)	3 (10.0)
<i>Prov. stuartii</i>	11 (10.4)	9 (11.8)	2 (6.7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (10.4)	10 (13.2)	1 (3.3)
<i>Ent. cloacae</i>	9 (8.5)	7 (9.2)	2 (6.7)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9 (8.5)	8 (10.5)	1 (3.3)
Other <i>Providencia</i> spp.	5 (4.7)	4 (5.3)	1 (3.3)
Coagulase-negative staphylococci	5 (4.7)	4 (5.3)	1 (3.3)
<i>Citrobacter</i> spp.	4 (3.8)	4 (5.3)	0 (0.0)
<i>Proteus vulgaris</i>	3 (2.8)	2 (2.6)	1 (3.3)

**Au-delà des techniques de culture classique,
détection des microorganismes par des
techniques moléculaires**

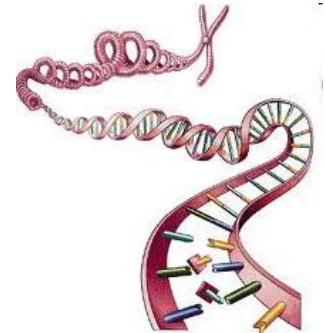


⇒ Extraction d'ADN total à partir des biofilms

⇒ Amplification ADNr (16S)

⇒ Séquençage et comparaison / banques de données

➔ “Operational Taxonomic Units, OTUs”



➡ sondes urinaires

Table 2. Sampling coverage and richness estimates for 97% OTUs.

Specimen	N ¹	Sobs ²	Good ³	Schao1 ⁴	LCI95 ⁵	UCI95 ⁵	Antibiotic
Cat01	156	3	99%	3	3	3	—
Cat03	104	33	83%	55	40	101	—
Cat04	236	47	92%	68	54	112	—
Cat05	278	7	100%	7	7	7	—
Cat06	276	10	99%	11	10	18	—
Cat07	265	8	99%	9	8	22	—
Cat08	276	6	100%	6	6	6	—
Cat13	172	1	100%	1	1	1	+

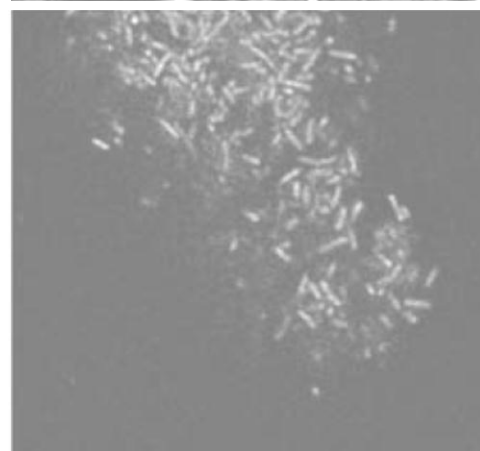
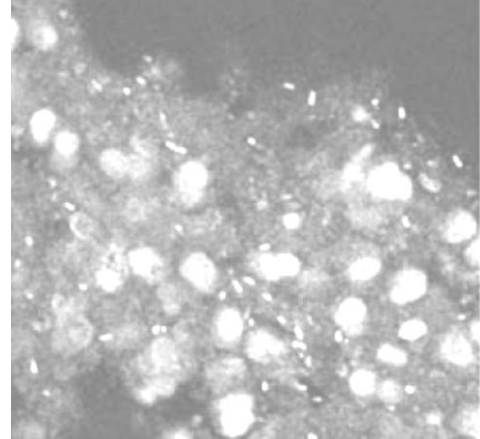
¹Sequences analyzed.

²Observed OTUs in all samples from catheter.

³Good's coverage estimate.

⁴Bias-corrected Chao1 estimate of OTU richness.

⁵LCI: lower 95% confidence interval. UCI: upper 95% confidence interval.



➡ sondes urinaires

Table 2. Sampling coverage and richness OTUs.

Specimen	N ¹	Sobs ²	Good ³	Schao1 ⁴	LCI9
Cat01	156	3	99%	3	3
Cat03	104	33	83%	55	40
Cat04	236	47	92%	68	54
Cat05	278	7	100%	7	7
Cat06	276	10	99%	11	10
Cat07	265	8	99%	9	8
Cat08	276	6	100%	6	6
Cat13	172	1	100%	1	1

¹Sequences analyzed.

²Observed OTUs in all samples from catheter.

³Good's coverage estimate.

⁴Bias-corrected Chao1 estimate of OTU richness.

⁵LCI: lower 95% confidence interval. UCI: upper 95%

Proteobacteria

Pseudomonas aeruginosa

Klebsiella pneumoniae

Escherichia coli

Delftia tsuruhatensis

Acinetobacter lwoffii

Enterobacter hormaechei

Sphingomonas sp.

Klebsiella sp. HF2

Oxalobacteraceae sp.

Achromobacter xylosoxidans

Burkholderia fungorum

Firmicutes

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus pneumoniae

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis

Anaerococcus vaginalis

Peptoniphilus asaccharolyticus

Finnegoldia magna

Bacteroidetes

Porphyromonas somerae

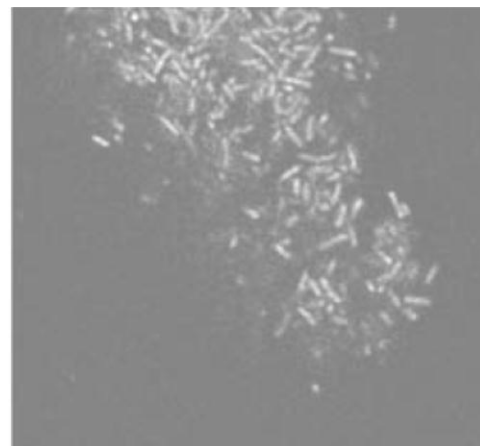
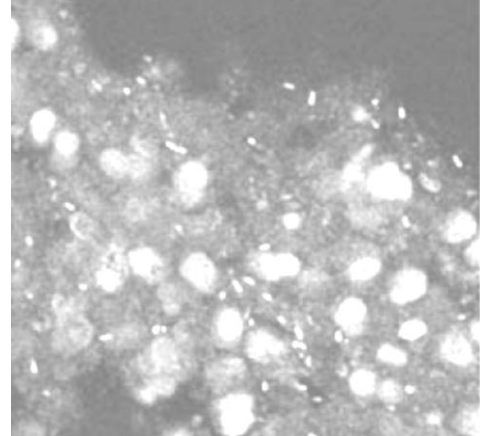
Flavobacterium sp.

Nitrospira

Nitrospira marina

Actinobacteria

Mycobacterium intracellulare



➔ Cathéters artériels

AC group (based on Maki's results)	Catheter numbers	Maki result	No. of clones	No. of OTUs
Uncolonised ACs	1	No-growth	31	18
	11	No-growth	24	19
	16	No-growth	27	15
	17	No-growth	48	20
	19	No-growth	48	20
	Total		178	44
Colonised ACs	3	mixed coagulase-negative <i>Staphylococci</i>	30	19
	7	<i>S. epidermidis</i> >100 cfu	47	22
	12	mixed coagulase-negative <i>Staphylococci</i>	90	39
	13	<i>S. epidermidis</i> >100 cfu	24	16
	14	<i>P. aeruginosa</i> >100 cfu	48	19
	Total		239	51

➡ Cathéters artériels

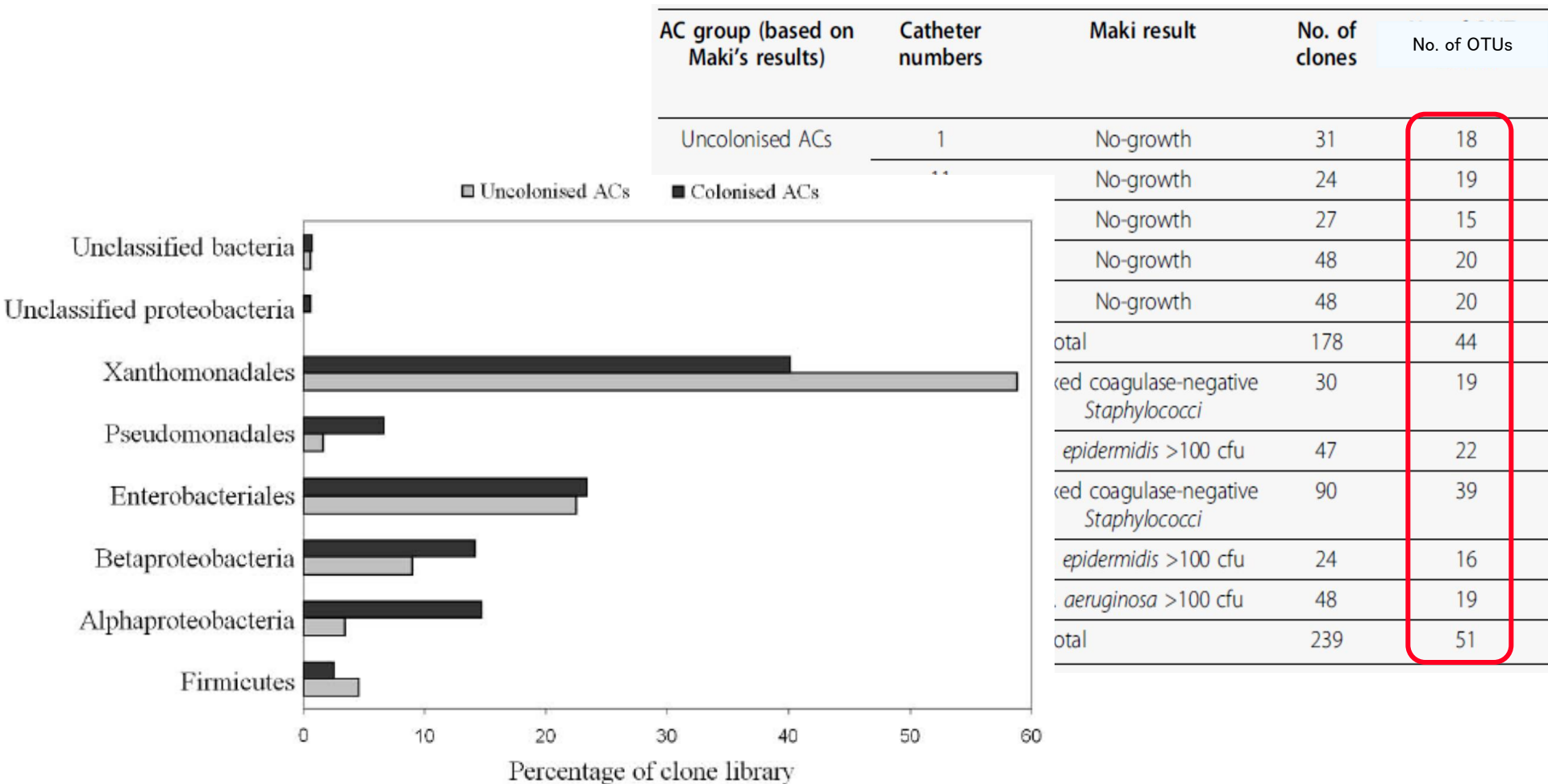


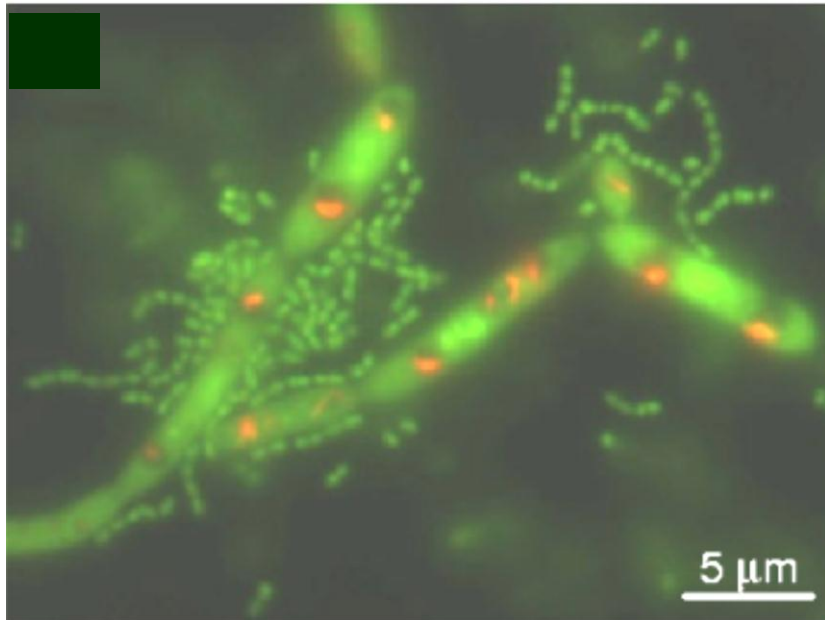
Figure 1. Division level distribution of 16S rRNA gene clone sequences in uncolonised and colonised ACs.

➡ Sondes endotracheales

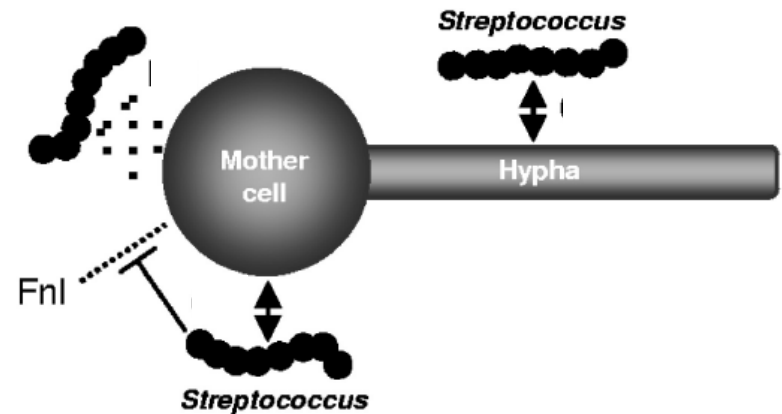
Patient number	Hours intubated	DGGE	PCR detection				Culture
		Number of bands	<i>S. mutans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1	33	5					
2	108	16	+				+
2	94	4					
3	60	17					+
4	95	14			+		
5	43	22					+
6	41	9		+		+	
7	289	8					
8	173	15	+		+	+	+
9	198	10				+	
10	56	6		+			
11	137	5					
12	12	3					
12	20	5					+
12	96	6	+				+
13	224	4					
14	49	5		+		+	
15	29	3					
16	67	7	+			+	
17	20	5			+		
17	143	5			+		
18	76	4		+		+	
19	32	9	+	+			
20	125	3					

Biofilms mixtes: un mélange d'alliés ou d'ennemis

Candida albicans et *Streptococcus gordonii* : un développement synergique



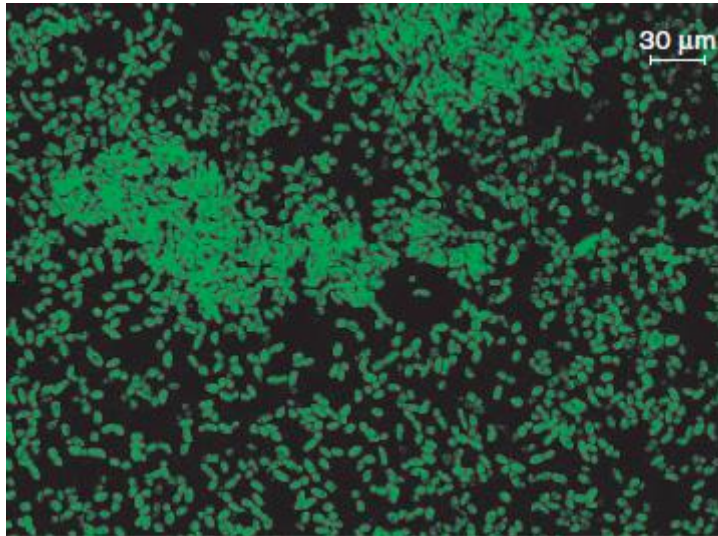
Interactions directes et via des molécules du quorum sensing



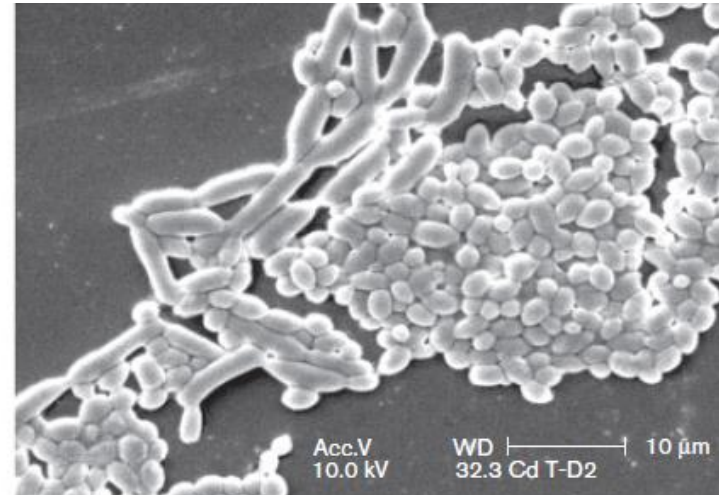
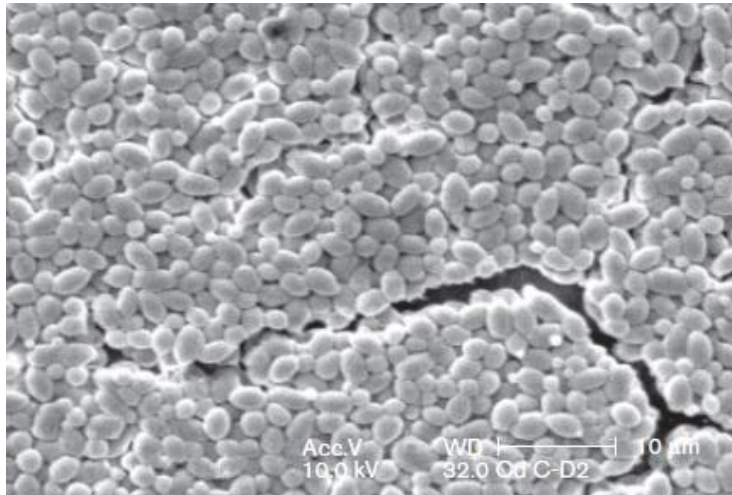
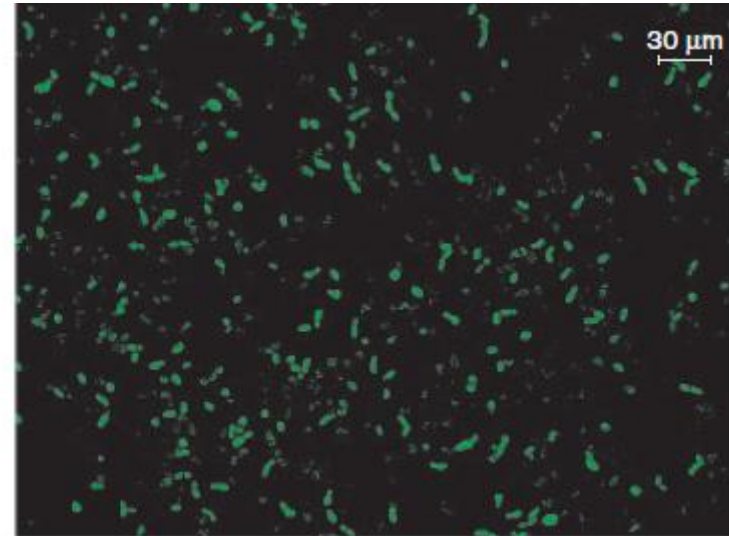
Fnl : farnesol, inhibiteur de la formation d'hyphes, impliqués dans le développement des formes biofilm de *C.albicans*

Candida krusei et LPS (*Salmonella* et *Pseudomonas*): un effet inhibiteur

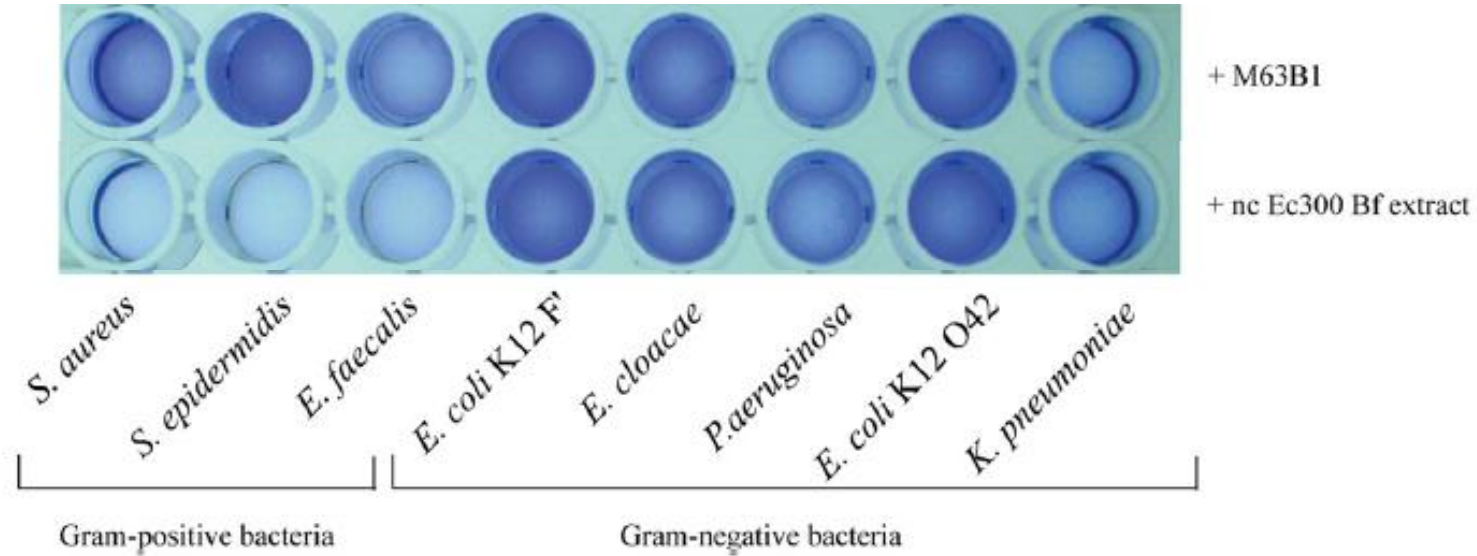
Sans LPS



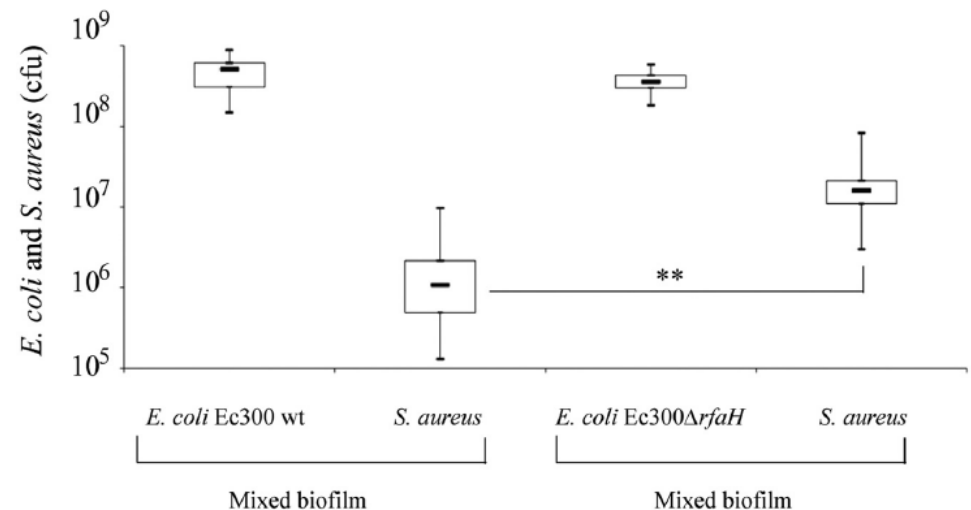
Avec LPS



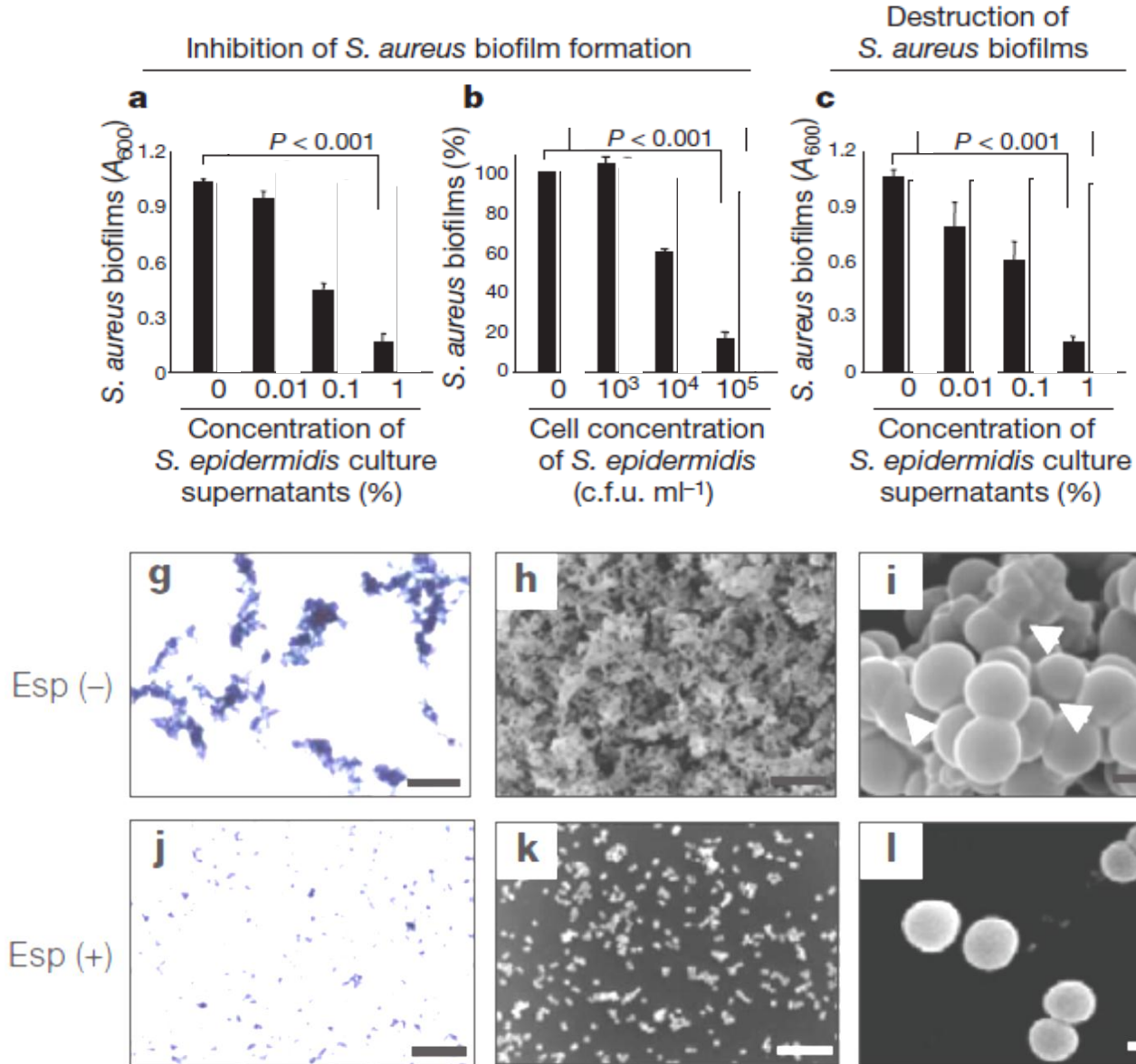
***Escherichia coli* : production d'exopolysaccharides sans activité biocide mais anti-biofilm / Gram positif**



Dans un modèle de biofilms mixtes avec numération sélective des 2 partenaires (*S. aureus* et *E. coli* producteur ou non d'exopol.)



Staphylococcus epidermidis* sécrète une serine protéase (Esp) capable d'inhiber et de désintégrer des biofilms formés par *S. aureus

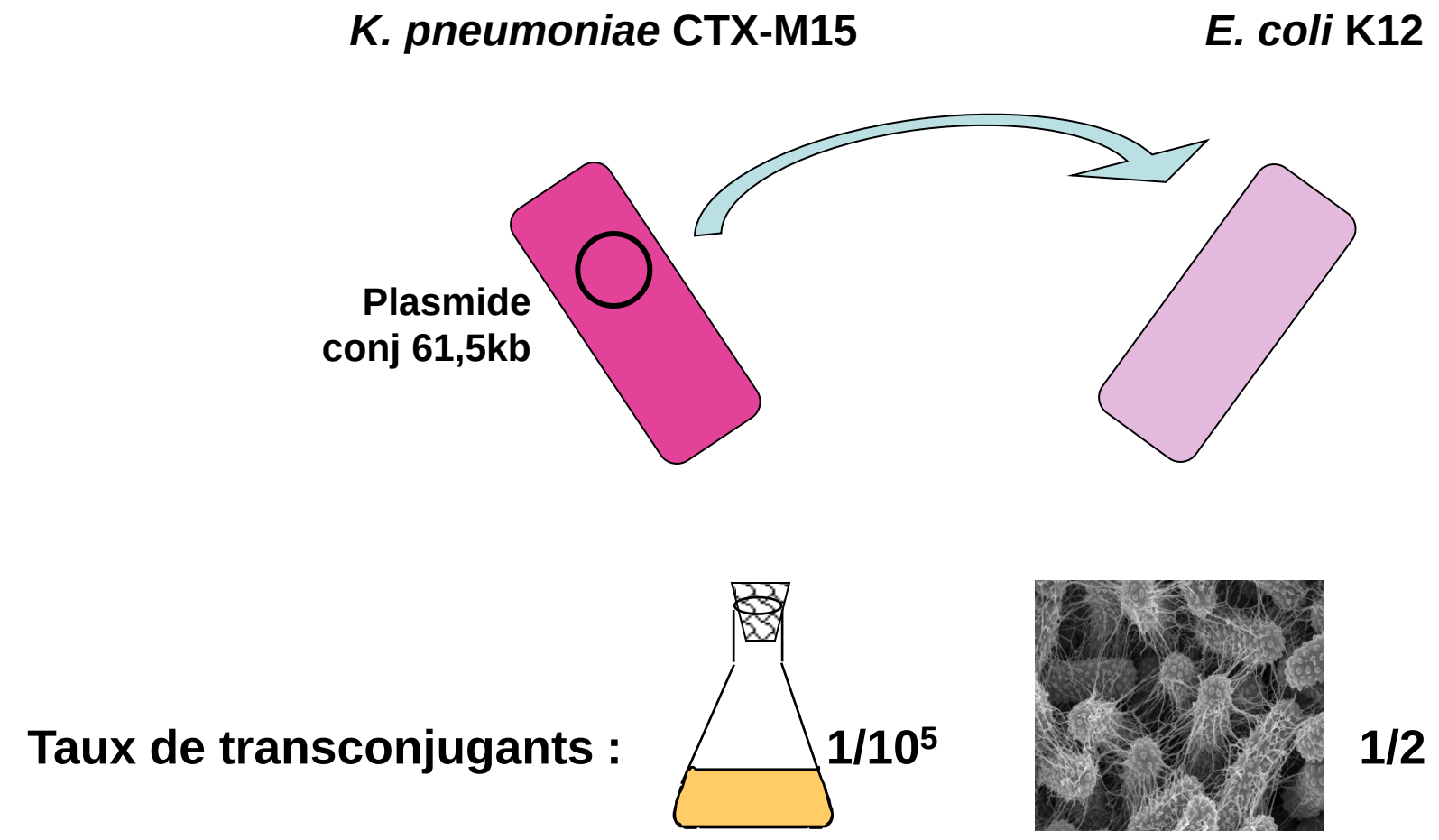


En conclusion :

- ⇒ Contamination pluri-microbienne du matériel invasif, avec des interférences variables, fonction des partenaires et (?) de la cinétique d'implantation**
- ⇒ Relation composition écosystème – capacité infectieuse ?**
- ⇒ Impact sur la réponse aux agents anti-microbiens (via composition de la matrice extracellulaire)**

Antifungal agent (MICx30)	Percentage of <i>C. albicans</i> vs control	
	<i>Candida albicans</i> +	
	<i>S. epidermidis</i> RP62A	<i>S. epidermidis</i> M7
Amphotericin B (24h)	99.8±1.7	71.8±3.8
Fluconazole (24h)	102.4±0.7	67.2±4.6

⇒ Avec un impact sur la transmission horizontale de matériel génétique ?



Laboratoire Microorganismes : Génétique et environnement (LMGE) UMR CNRS 6023 Clermont-Ferrand

Communautés microbiennes: écotoxicologie – santé

Claire Aumeran

Damien Balestrino

Nicolas Charbonnel

Marina Dos Santos

Christiane Forestier

Claire Hennequin

Olivier Lesens

Bertrand Souweine

Ousmane Traoré

