



HAL
open science

Contribution à l'étude du biofilm staphylococcique : approche chimique

Irina Sadovskaya

► **To cite this version:**

Irina Sadovskaya. Contribution à l'étude du biofilm staphylococcique : approche chimique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Littoral - Côte d'Opale, 2007. tel-04523332

HAL Id: tel-04523332

<https://ulco.hal.science/tel-04523332>

Submitted on 27 Jun 2024

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.

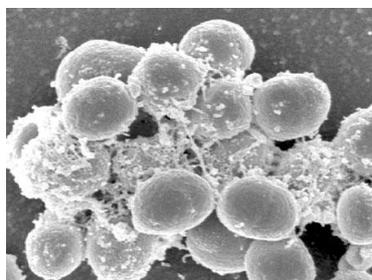
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Public Domain

Université du Littoral-Côte d'Opale
Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et Biotechnologies LR2B
Equipe « BIOFILM »
2007



Contribution à l'étude du biofilm staphylococcique : approche chimique



Habilitation à Diriger des Recherches

Par Irina Sadovskaya

Jury :

M. J-C.Michalski	Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille	Président
Mme M. Caroff	Directrice de Recherche au CNRS, Université de Paris XI	Rapporteur
M. A. Filloux	Professeur à l'Université de la Méditerranée	Rapporteur
M. A. Peschel	Professeur, Université de Tübingen, Allemagne	Rapporteur
M. J. P. O'Gara	Senior Lecturer, University College Dublin, Irlande	Examineur
M. S. Jabbouri	Professeur à l'Université du Littoral-Côte d'Opale	Examineur
M. P.Hardouin	Professeur à l'Université du Littoral-Côte d'Opale	Examineur

Volume 1
Version française

TABLE DES MATIERES

Liste des publications	5
Liste des communications	7
Encadrement des étudiants et de jeunes chercheurs	9
Accueil des chercheurs invités	9
Collaborations initiés	10
SYNTESE DES TRAVAUX DE RECHERCHES	11
Remerciements	12
Abbreviations	13
I. INTRODUCTION	14
1. Infections liées aux implants médicaux	14
2. Formation de biofilm	14
3. Composition du biofilm des staphylocoques	16
4. Objectifs du travail.....	20
1. Caractérisation des poly- <i>N</i> -acetylglucosamines à partir des souches modèles.....	21
1.1. Mise au point du protocole de production et purification du PIA	21
1.2. « PIA » et « PS/A » : deux polysaccharides différents ?	21
2. Etude structurale des PNAG des souches cliniques.....	22
3. Composition du biofilm de la souche modèle <i>S. epidermidis</i> RP62A : rôle de l'AT EC	24
Article 1	26
4. Composition du biofilm des souches cliniques.....	27
4.1. Analyses chimiques des biofilms	27
4.2. Sensibilité des biofilms aux traitements enzymatiques et chimiques	28
Article 2	30
Article 3	31
5. Caractérisation structurale des AT des souches modèle <i>S. epidermidis</i> RP62A et <i>S. aureus</i> MN8m.	32
5.1. Structures des AT de la souche modèle <i>S. epidermidis</i> RP62A.	33
Article 4	36
5.2. Structure des AT de la souche modèle <i>S. aureus</i> MN8m.	37
5.2.1. Etude structurale des AT par la spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse.	37
5.2.2. Analyse comparative des préparations de l'acide teichoïque et de l'acide lipo-teichoïque.	38
Article 5	40
6. Dégénération enzymatique des biofilms staphylococciques	41
Article 6.....	43
7. Caractérisation des PGA de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> et <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	44
7.1 Introduction.....	44
7.2. Résultats	45
Article 7.....	46
Article 8.....	48
8. Conclusion et perspectives.....	49
8.1. Composition des biofilms staphylococciques	49
8.2. Structure des AT des souches cliniques	51
8.3. Composés de la paroi et du biofilm purifiés : potentiels d'utilisation	52
IV. TRAVAUX EN COURS	53
1. Contribution à l'élaboration d'un outil diagnostique des infections liées au biofilm.....	53
1.1. Introduction.....	53
1.2. Résultats	55

2. Identification des constituants des biofilms dans les extraits bruts.	56
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.	56
ANNEXE Etude structurale des LPS des souches non-type de <i>P. frisingensis</i>.	60
1. Introduction.....	60
1.1. Bactéries du genre <i>Pectinatus</i>	60
1.2. Les lipopolysaccharides (LPS).....	60
1. 3. Les LPS de <i>Pectinatus</i> spp.....	62
2. Résultats.....	63
Article 8.....	65
Article 9.....	66
Article 10.....	67
REFERENCES.....	69

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Deux étapes de formation du biofilm (Ziehr <i>et al.</i> , 2006).....	14
Figure 2. Structure chimique du PIA (Mack <i>et al.</i> , 1996)	18
Figure 3. Modèle de la biosynthèse du PIA (Vuong <i>et al.</i> , 2004)	18
Figure 4. Structure schématique de l'AT et ALT de <i>S. aureus</i> et de l'AT de <i>S. epidermidis</i>	33
Figure 5. Structure de l'AT de la paroi et de l'AT EC de <i>S. epidermidis</i> RP62A	34
Figure 6. Structure de l'AT de la paroi et de l'AT EC de <i>S. aureus</i> MN8m	38
Figure 7. La topographie de l'AT de la paroi et de l'ALT au sein de la paroi d'une bactérie Gram positif (Neuhaus & Baddiley, 2003)	49
Figure 8. Représentation schématique du peptidoglycane des bactéries Gram positif.....	50
Figure 9. Paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif	60
Figure 10. Architecture générale des LPS	61
Figure 11. Structure schématique des LPS du type S, R et SR.....	62
Figure 12. Profil DOC-PAGE des LPS isolés des souches de <i>Pectinatus</i>	62
Figure 13. Structure de la partie glucidique des LPS des souches <i>P. frisingensis</i>	64

Liste des publications

- [1] **Usov, A. I. & Dobkina, I. M. (1985).** Identification of different cleavage products of galactans from red algae in the form of their piridilamino derivatives. *Bioorg Khim* **11**, 1110-1118.
- [2] **Korshunova, G. A., Dobkina, I. M., Sumbatian, N. V. & Shvatchkine, Y. P. (1986).** Enzymatic synthesis of nucleopeptides. *Khim Prirodn Soedin* **2**, 253-255.
- [3] **Korshunova, G. A., Dobkina, I. M., Riabtseva, O. N. & Shvatchkine, Y. P. (1987).** Nucleoaminoacids and nucleopeptides 12. Synthesis and properties of Leu-5-enkephaline analogs, containing adenilylalanine. *J Obsch Khim* **57**, 1647-1656.
- [4] **Usov, A. I. & Dobkina, I. M. (1989).** Polysaccharides of algae 38. Polysaccharide composition of the red seaweed *Liagora* sp. and the structure of sulfated xylomannan. *Bioorg Khim* **14**, 642-651.
- [5] **Usov, A. I. & Dobkina, I. M. (1991).** Polysaccharides of algae 43. A neutral xylan and sulfated xylomannan from the red alga *Liagora valida*. *Bioorg Khim* **17**, 1051-1058.
- [6] **Dasgupta, T., de Kievit, T. R., Masoud, H., Altman, E., Richards, J. C., Sadovskaya, I., Speert, D. P. & Lam, J. S. (1994).** Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. *Infect Immun* **62**, 809-817.
- [7] **Masoud, H., Sadovskaya, I., de Kievit, T., Altman, E., Richards, J. C. & Lam, J. S. (1995).** Structural elucidation of the lipopolysaccharide core region of the O-chain-deficient mutant strain A28 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6 (International Antigenic Typing Scheme). *J Bacteriol* **177**, 6718-6726.
- [8] **Sadovskaya, I., Brisson, J. R., Altman, E. & Mutharia, L. M. (1996).** Structural studies of the lipopolysaccharide O-antigen and capsular polysaccharide of *Vibrio anguillarum* serotype O:2. *Carbohydr Res* **283**, 111-127.
- [9] **Auriola, S., Thibault, P., Sadovskaya, I. & Altman, E. (1998).** Enhancement of sample loadings for the analysis of oligosaccharides isolated from *Pseudomonas aeruginosa* using transient isotachopheresis and capillary zone electrophoresis - electrospray - mass spectrometry. *Electrophoresis* **19**, 2665-2676.
- [10] **Sadovskaya, I., Brisson, J. R., Khieu, N. H., Mutharia, L. M. & Altman, E. (1998).** Structural characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and capsular polysaccharide of *Vibrio ordalii* serotype O:2. *Eur J Biochem* **253**, 319-327.
- [11] **Sadovskaya, I., Brisson, J. R., Lam, J. S., Richards, J. C. & Altman, E. (1998).** Structural elucidation of the lipopolysaccharide core regions of the wild-type strain PAO1 and O-chain-deficient mutant strains AK1401 and AK1012 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Eur J Biochem* **255**, 673-684.

- [12] **Sadovskaya, I., Brisson, J. R., Thibault, P., Richards, J. C., Lam, J. S. & Altman, E. (2000).** Structural characterization of the outer core and the O-chain linkage region of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Eur J Biochem* **267**, 1640-1650.
- [13] **Vinogradov, E., Petersen, B. O., Sadovskaya, I., Jabbouri, S., Duus, J. O. & Helander, I. M. (2003).** Structure of the exceptionally large nonrepetitive carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-82164. *Eur J Biochem* **270**, 3036-3046.
- [14] **Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004).** Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus*-- lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 543-552.
- [15] **Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J. & Jabbouri, S. (2004).** Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr Res* **339**, 1467-1473.
- [16] **Vinogradov, E., Li, J., Sadovskaya, I., Jabbouri, S. & Helander, I. M. (2004).** The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-79104. *Carbohydr Res* **339**, 1637-1642.
- [17] **Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G. & Jabbouri, S. (2005).** Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* **73**, 3007-3017.
- [18] **Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. & Jabbouri, S. (2006).** Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 11-16.
- [19] **Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Li, J. & Jabbouri, S. (2006).** Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr Res*.
- [20] **Izano, E. A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E. & other authors (2007).** Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **43**, 1-9.
- [21] **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.
- [22] **Sadovskaya, I., Faure, S., Watier, D., Leterme, D., Chokr, A., Migaud, H. & Jabbouri, S. (2007).** Poly-N-acetyl-b-(1,6)-glucosamine is not an appropriate antigen in the detection of staphylococcal orthopedic prosthesis-related infections. *Clin Vaccine Immun* **submitted**.
- [23] **Izano, E. A., Sadovskaya, I., Wang, H., Vinogradov, E., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Jabbouri, S., Perry, M. B. & Kaplan, J. B. (2007).** Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* **submitted**.

Liste des communications

Posters présentés aux congrès internationaux

Stevens N, Sadovskaya I, Jabbouri S, O’Gara JP, Greene CM, Humphreys The *Staphylococcus epidermidis* biofilm adhesin, Polysaccharide Intercellular Adhesin, potentially activates pro-inflammatory mediators in human astrocytes, 107-th ASM General Meeting, Toronto, Canada, 21-25 May 2007

Sadovskaya I, Chokr A, Vinogradov E, Kogan G, Li J, Jabbouri S Chemical composition of the extracellular matrix of biofilm-forming staphylococci, *12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections*, Maastricht, The Netherlands, 3-6 September 2006

Sadovskaya I, Kogan G, Chokr A., Chagnon P, Vinogradov E, Jabbouri S. Carbohydrate-containing components produced *in vitro* by some staphylococcal strains, associated with orthopaedic prostheses. *13-th European Carbohydrate Symposium*, Bratislava, Slovakia, Aug. 21-26, 2005

Sadovskaya I, Vinogradov E, Li J, Jabbouri S Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of a reference biofilm-positive strain *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *The Carbohydrate Workshop*, Research Center Borstel, Borstel, Allemagne. 17-20 mars 2004

Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain *Staphylococcus epidermidis* RP62A *Glucstructures in Biological Systems XIII*, Université d’Hamburg, Hamburg, Allemagne. 1-3 Dec 2004

Flahaut S, Igguy R, Sadovskaya I, Jeanfils J, Jabbouri S Growth of *Staphylococcus epidermidis* on staphylococcal extracellular polymeric substances. Xth international congress of bacteriology and applied microbiology of IUMS, Paris. 27 juil-1^{er} août 2002

Petersen BO, Vinogradov E, Sadovskaya, I., Jabbouri S., Duus, JO. Structure of a 23 residue oligosaccharide from *Pectinatus* 43rd Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 2002 Asilomar, California

Sadovskaya I, Flahaut S, Vinogradov E, Jeanfils J, Jabbouri S Polysaccharide composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilms, In 10th Bratislava Symposium on Saccharides, September 1-6, 2002, Smolenice, Slovakia

Conférences invités

Sadovskaya I. Staphylococcal polysaccharides and biofilm : where do we stand ? Seminar of SFB 267, Research Center Borstel, Borstel, Allemagne. 5 December 2003 (invitation du Prof. U. Zaehring)

Posters présentés aux congrès nationaux

Stevens N, Sadovskaya I., Jabbouri S, O’Gara JP, Greene CM, Humphreys The *Staphylococcus epidermidis* biofilm adhesin, Polysaccharide Intercellular Adhesin, potentially activates pro-inflammatory mediators in human astrocytes., Shepards Prize Meeting 20 February 2007 and Royal College of Surgeons Research Day, 11 April 2007 ; Royal College of Surgeons, Dublin, Ireland

Wagstaph JL, Sadovskaya I, Vinogradov E, Jabbouri S, Howard MJ Identification of key *S. epidermidis* biofilm components by NMR spectroscopy, Departemental Graduate Symposium, 14 June 2006, Department of Biosciences, University of Kent, Canterbury, UK

Chaignon Ph, Sadovskaya I, Watier D, Jabbouri S. Traitement enzymatique des biofilms des Staphylococci
Réseau National Biofilm, 1^{ières} Journées Thématiques, 27-28 octobre 2005, Lorient, France

Encadrement des étudiants et de jeunes chercheurs

- S. Faure, *Master 2*, Université de Rennes 1, sur le sujet « Etude de l'utilisation d'un composant antigénique des biofilms des staphylocoques dans le diagnostic précoce des infections associées aux implants orthopédiques » (2004-2005)
- Aurélie Fontaine, BTS au lycée Valentine Labbé. Stage de 6 semaines en 2006 et 2007
- R. Herro (stage DEA en 2002-2003, co-encadrement)
- R. Igguy (stage DEA en 2001-2002, co-encadrement)
- Dr. Ph. Chaignon (CDD post-doctoral ANVAR) Dégradation enzymatique des biofilms des staphylocoques (2003-2005, co-encadrement)

Vacataire en TP, Masters 1 « Environnement Naturel », ULCO. Etudes des molécules impliquées dans la symbiose chez *Rhizobium* à l'aide de l'électrophorèse sur gel (4 heures, mars 2006 et mars 2007)

Accueil des chercheurs invités

- Dr. G. Kogan (Bratislava, Slovaquie), Bourse de la Région du Nord-Pas-de Calais de 11 mois, 2003-2004. Etude de la composition des biofilms des souches cliniques.
- Dr. E. Vinogradov, Professeur invité à ULCO, mai 2006 ;
- Dr. X. Châtellier, Géosciences Rennes, UMR 6118 CNRS, Université de Rennes 1 (2006, une semaine à sa demande). Etude préliminaire des glucides de surface d'une cyanobactérie.

Collaborations initiés

- Dr. E. Vinogradov (Conseil National de Recherche du Canada, Ottawa). Cette collaboration étroite depuis 2000 nous a permis d'appliquer les techniques d'analyse par RMN aux différents composants glucidiques du biofilm staphylococcique, ainsi qu'étudier la structure des LPS des souches non-type de *Pectinatus frisingensis*
- Dr. I. Helander, VTT Biotechnology et Université de Helsinki. Etude de la structure des LPS des souches non-type de *Pectinatus frisingensis* (2000-2003)
- Dr. M. Howard, Université de Kent à Canterbury, Department of Biosciences. Utilisation des techniques des excitations sélectives de RMN pour l'analyse des extraits bruts des biofilms de staphylocoques (initié en 2004)
- Dr. J. B. Kaplan, (New Jersey Dental School, Newark, NJ). Etude des poly-N-acetylglucosamines (PGA) à partir des biofilms des bactéries Gram négatifs : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pathogène porcin, et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pathogène dentaire humain (initié en 2004)
- Dr. C. Greene, Prof. G. O'Gara, N. Stevens (Royal College of Surgeons in Ireland et University College Dublin. Effet des composés purifiés du biofilm staphylococcique en tant que médiateurs pro-inflammatoires des astrocytes humains (initié en 2006)

Autres **contacts scientifiques** (voir aussi II.8.3):

- Prof. G. Pier, Dr. T. Maira-Litràn, Harvard Medical School, Boston, MA
- Dr. W. Ziebuhr, Institut für Molekulare Infektionbiologie, Würzburg, Allemagne
- Dr. H. Rohde, Institut für Infektionsmedizin Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Allemagne
- Dr. U. Zaehring, Centre de Recherche Borstel, Allemagne

**SYNTESE DES TRAVAUX DE RECHERCHES
POST-DOCTORALES**

Remerciements

Les résultats présentés portent sur mes travaux de recherche dans l'équipe « Biofilm » du LR2B en 2001-2007. Je tiens à remercier M. le Professeur Saïd Jabbouri, Responsable de l'équipe, pour m'avoir proposé ce sujet passionnant et pour son support. Je remercie M. le Professeur Pierre Hardouin, Directeur du LR2B, pour ses encouragements. Je remercie Dr. Philippe Chaignon pour m'avoir aidé dans la rédaction de ce manuscrit, et à mes collègues au LR2B pour leur support.

Mes remerciements à Dr. E. Vinogradov (National Research Council, Ottawa, Canada). Ce travail a pu aboutir grâce à ses compétences extraordinaires dans le domaine de l'analyse des molécules glucidiques.

Je tien également à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui m'ont formé, mes professeur à la Faculté de Chimie de L'Université Lomonosov de Moscou, les collègues qui m'ont encadré et qui m'ont aidé à l'Institut de chimie Organique à Moscou (1983-1990) et à IBS, Conseil National de Recherche du Canada – Canadian Bacterial Diseases Network (1991-1997). Grâce à eux, j'ai acquis non seulement des connaissances scientifiques et techniques, mais aussi une ouverture d'esprits, capacités d'écoute, respect et sensibilité aux demandes des collègues travaillant dans les disciplines voisines. Cela m'a permis de pouvoir développer des projets multidisciplinaires et en collaboration, présentés ci-dessus.

Des molécules glucidiques jouant un rôle important dans plusieurs domaines de biologie, j'espère de pouvoir appliquer le savoir-faire que j'ai acquis pendant plusieurs années et pas sans efforts, dans mon futur travail

Je suis très reconnaissante à Dmitriï pour tout son aide et ses conseils au cours de ce travail et la préparation du manuscrit.

Abbreviations

Aap	Accumulation associated protein
ALT	Acide Lipoteichoique
APG	Acide poly- γ -DL-glutamique
AT	Acide Teichoique
AT EC	Acide Teichoique Extracellulaire
BHI	Brain Heart Infusion
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CE-MS	Capillary electrophoresis – Mass Spectrometry
CoNS	Coagulase Negative Staphylococci
CPG	Chromatographie Phase Gazeuse
D-Ala	D-alanine
DOC	Deoxycolate
DspB	Dispersine B
EFS	Etablissement Français du Sang
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
Gro	Glycérol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
LPS	Lipopolysaccharide
MSCRAMM	Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MS	Mass Spectrometry
MS-MS	Tandem Mass Spectrometry
NOE	Nuclear Overhauser Effect
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PGA	Poly- <i>N</i> -acetyl-glucosamine
PNAG	Poly- <i>N</i> -acetyl-glucosamine
PM	Poids moléculaire
PS/A	Polysaccharide/Adhesin
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAA	Slime-associated Antigen
SAE	<i>S. aureus</i> exopolysaccharide
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TCA	Trichloroacetic acid

I. INTRODUCTION

1. Infections liées aux implants médicaux

La réparation osseuse requiert souvent la pose d'implant à base de biomatériaux. Si leur utilisation est de plus en plus fréquente dans le domaine médical et permet d'obtenir de très bons résultats fonctionnels, l'utilisation des biomatériaux n'est pas dénuée de complications. La plus redoutée est certainement l'infection nosocomiale. La majorité de ces infections sont causées par les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus*.

Le genre bactérien *Staphylococcus* appartient à la famille des Micrococaceae. Les caractères de différenciation *in vitro* des staphylocoques sont définis par la production d'une coagulase. On distingue ainsi les *Staphylococcus* à coagulase-positive, majoritairement représenté par l'espèce *S. aureus* (germe connu pour sa virulence), et les *Staphylococcus* à coagulase-négative (Coagulase Negative Staphylococci, CoNS) dont l'espèce prédominante est *S. epidermidis*. Bien qu'elle soit décrite à l'origine comme une bactérie non pathogène, appartenant à la flore bactérienne commensale naturellement présente sur la peau et les muqueuses, *S. epidermidis* s'est révélée l'une des causes majeures des infections nosocomiales. Elle constitue le germe le plus fréquemment isolé des infections chez les patients immuno-déficients ou portant des implants médicaux : cathéters de dialyse intra vasculaire et péritonéal, prothèses cardiaques, lentilles intra oculaires... (Kloos & Bannerman, 1994).

Les implants médicaux constituent un support sur lequel l'infection se développe sous la forme d'un biofilm. Les cellules bactériennes dans le biofilm, appelées aussi bactéries sessiles, sont enrobées dans une matrice polymérique extracellulaire. Cette matrice lie les cellules entre elles et les attache à une surface solide (Sutherland, 2001). La capacité de former un biofilm est considérée comme un principal facteur de virulence de *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 2001)

2. Formation de biofilm

Lors d'une infection causée par l'introduction d'un corps étranger, la formation du biofilm se distingue par deux étapes différentes. La première consiste à l'attachement de la bactérie au support ; la seconde est caractérisée par l'accumulation des bactéries sur le support (Fig.1).

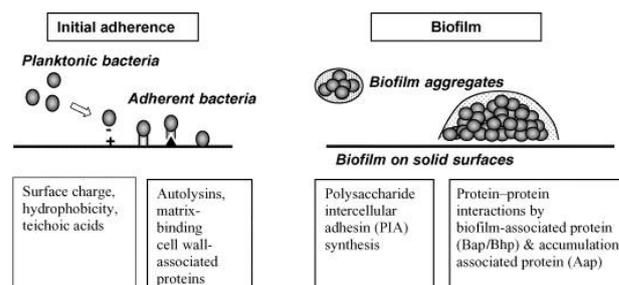


Figure 1. Deux étapes de formation du biofilm (Ziehr *et al.*, 2006)

La première étape d'adhérence primaire de la bactérie au matériau est dépendante des caractéristiques de la surface bactérienne et de la nature du support. Cette interaction initiale implique des forces physicochimiques non-spécifiques telles que les forces de Van Der Waal's, les interactions hydrophobes et ioniques. Une fois ces interactions réversibles avec le support établies les interactions spécifiques entre la bactérie et le matériau se mettent en jeu, et l'adhésion devient rapidement irréversible (Donlan & Costerton, 2002).

In vivo, lorsqu'un matériau exogène est implanté, il est immédiatement recouvert d'un film de conditionnement constitué principalement de protéines de la matrice extracellulaire des cellules eucaryotes telles que le fibrinogène, la fibrine, la fibronectine, la laminine et certains collagènes. Ces facteurs de l'hôte qui recouvrent le matériau implanté peuvent servir de récepteurs spécifiques pour les bactéries colonisantes (Herrmann *et al.*, 1988) et favorisent ainsi l'adhésion irréversible avec la matrice extracellulaire de l'hôte.

La surface de *S. aureus* présente des adhésines spécifiques à ces protéines, appartenant à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), qui reconnaissent spécifiquement les composants de la matrice extracellulaire de l'hôte. Dans la plupart des cas, les MSCRAMM sont ancrées de manière covalente au peptidoglycane de la paroi, (Foster & Hook, 1998).

Chez *S. epidermidis* et les autres CoNS, de nombreuses adhésines spécifiques aux protéines extracellulaires des cellules de l'hôte ont également été caractérisées : les protéines qui se lient au fibrinogène et fibronectine (codé par de gènes *fbe* et *embp*, (Nilsson *et al.*, 1998), (Pei & Flock, 2001)) ainsi que des les autolysines : AltE de *S. epidermidis* ou AltC de *S. caprae* capables de se lier à la fibronectine (Heilmann *et al.*, 1997), (Allignet *et al.*, 2002). Une autolysine Aae, également capable de se lier à la vitronectine, a été récemment décrite (Heilmann *et al.*, 2003).

La seconde étape de formation du biofilm, appelée étape d'accumulation ou de colonisation, se caractérise par la croissance des bactéries et la formation d'amas multicouches de cellules liées entre elles. Au fur et à mesure de la synthèse de ses constituants et de la croissance des bactéries, le biofilm évolue vers une forme mature et structurée : des régions de forte densité en bactéries appelées microcolonies dans une matrice dense sont séparées par des régions moins denses en matrice. Ces dernières forment des canaux de circulation pour l'eau et les nutriments, et laissent passer les molécules pouvant atteindre 2 000 kDa (Costerton *et al.*, 1994).

La matrice extracellulaire va procurer des conditions optimales de survie aux bactéries enfouies qui se trouvent ainsi dans un état physiologique particulier (von Eiff *et al.*, 2002). Au sein du biofilm les bactéries échangent des signaux leur permettant d'adapter de façon synchrone leur

comportement en fonction du milieu extérieur (Webb *et al.*, 2003). De plus, ce mode de vie confère aux bactéries une résistance accrue aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte, indépendamment de toute modification génétique. Il constitue un réservoir infectieux difficile à éradiquer. Ce type d'infections est devenu un problème majeur de santé publique (Reid, 1998).

La connaissance des structures des matrices extracellulaires des biofilms pourrait servir à plusieurs niveaux pour des thérapies contre ce genre de maladie nosocomiale. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à une caractérisation approfondie de la composition chimique des substances polymériques extracellulaires des biofilms staphylococciques.

3. Composition du biofilm des staphylocoques

La terminologie généralement adoptée dans la littérature pour définir le biofilm est variable. Nous allons utiliser la définition évoquée par Hussain *et al.* (Hussain *et al.*, 1993) décrivant le biofilm comme une biomasse de bactéries et de matériel extracellulaire accumulé sur une surface solide. Le terme plus ambigu « slime » est défini comme une substance extracellulaire mucoïde renfermant une communauté de cellules bactériennes agrégés.

Les marqueurs extracellulaires staphylococciques, liés au biofilm (slime) ont été beaucoup étudiés dans les dix dernières années. Selon les auteurs, les constituants les plus importants au niveau quantitatif ne sont pas les mêmes. Les différentes équipes ont surtout étudié deux souches modèles capables de former le biofilm : *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) et *S. aureus* MN8m, ainsi que des souches d'origine clinique.

➤ Approche de Karamanos *et al.*

Selon l'équipe de Karamanos *et al.*, le biofilm de plusieurs souches de *S. epidermidis* dont la souche RP62A est majoritairement constitué des macromolécules suivantes : un « polysaccharide acide sulfaté de 20 kDa », un « peptidoglycane de 80 kDa » et une substance acide « teichoic acid-like » (Karamanos *et al.*, 1995; Karamanos *et al.*, 1997). La structure chimique de ces molécules n'a pas été étudiée. Cependant, le « 20-kDa polysaccharide » a été proposé comme antigène pour des tests immunologiques pour le diagnostic des infections staphylococciques généralisés (Karamanos *et al.*, 1997), (Georgakopoulos *et al.*, 2002), (Lamari *et al.*, 2004). Ces résultats pourtant n'ont pas abouti à une application pratique.

➤ Rôle de l'acide teichoïque (AT)

D'après Hussain *et al.*, le « slime » de *S. epidermidis* RP62A, cultivée sur un milieu chimiquement défini, est constitué à 80% de l'acide teichoïque (AT) et à 20% de protéines (Hussain *et al.*, 1993). La composition de la substance extracellulaire de cette souche a été étudiée et comparée à celle de l'acide teichoïque de la paroi. Les deux polymères sont composés de Glc, GlcNAc, phosphate, glycérol et D-alanine (D-Ala). La structure chimique de ces composés glucidiques n'a pas été établie.

L'AT joue un rôle important dans l'adhérence des staphylocoques à la fibronectine (Hussain *et al.*, 2001). De plus, la substitution de l'AT par la D-Ala, qui modifie la charge totale de la molécule, semble intervenir dans la sensibilité de *S. aureus* à certains antibiotiques et à son adhésion aux surfaces plastiques (Peschel *et al.*, 1999), (Peschel *et al.*, 2000), (Gross *et al.*, 2001).

La connaissance de la structure chimique des AT des staphylocoques est donc d'une grande importance pour une meilleure compréhension des mécanismes de leur virulence et pour la conception de nouveaux outils thérapeutiques. Cependant, cette structure est relativement peu étudiée (voir chapitre II.5)

➤ Les poly-*N*-acétylglucosamines

Jusqu'à présent, le composé le mieux caractérisé des biofilms staphylococciques reste un polysaccharide, poly-GlcNAc, de haut poids moléculaire. Depuis sa découverte en 1988 par les chercheurs de l'équipe de G. Pier (Harvard Medical School, Boston, MA) (Tojo *et al.*, 1988), ce polymère attire l'attention de plusieurs équipes. L'utilisation de différentes souches, ainsi que des différences dans les conditions de culture et les méthodes de purifications et caractérisations des composés semblent avoir causées un désaccord entre différentes équipes (Tab. 1). Le polysaccharide riche en GlcNAc, isolé par Tojo *et al.* (équipe de G. Pier) en 1988 à partir de la souche *S. epidermidis* RP62A et appelé PS/A (Polysaccharide/Adhesin), a été caractérisé comme un composé de la « couche extracellulaire bactérienne » et du biofilm de cette souche. Il semble intervenir dans l'attachement aux biomatériaux et dans la protection des bactéries contre les défenses immunitaires de l'hôte. Isolé à partir de la même souche, le SAA (Slime-Associated Antigen) présente le même rôle dans l'attachement mais serait plus riche en glucose que le PS/A (Christensen *et al.*, 1990), (Baldassarri *et al.*, 1996). Des chercheurs allemands (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) ont décrit un polysaccharide contenant du GlcNAc et jouant un rôle important dans la phase d'accumulation du biofilm (Mack *et al.*, 1994). Ce polysaccharide a été appelé PIA, Polysaccharide Intercellular Adhesin. Sa structure a été analysée par des méthodes analytiques et spectroscopie RMN. Il s'agit d'un poly- β -(1→6)-glucosaminoglucane linéaire avec une longueur moyenne de 130 résidus du GlcNAc, partiellement dé-*N*-acétylé, partiellement *O*-succinylé et apparemment phosphorylé (Fig. 2).

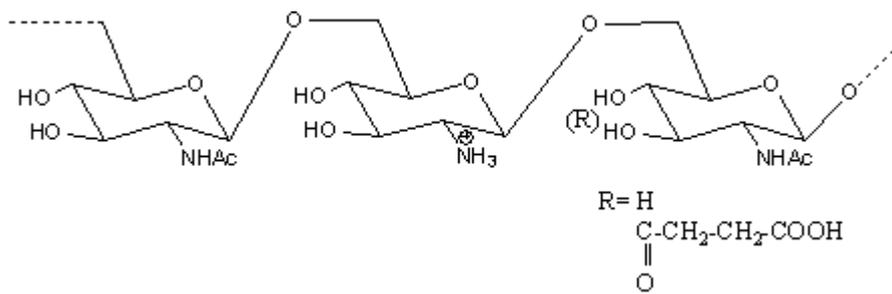


Figure 2. Structure chimique du PIA (Mack *et al.*, 1996)

La biosynthèse du PIA est codée par un opéron de quatre gènes, nommé *icaADBC* (Gerke *et al.*, 1998), (Heilmann *et al.*, 1996). Le produit du gène *icaA* est une glycosyltransferase transmembranaire, responsable de la synthèse de la chaîne polymérique de GlcNAc. Une co-expression de *icaA* et de *icaD* présente une activité catalytique maximale (Gerke *et al.*, 1998). IcaB est une protéine fixée sur la face externe de la paroi, responsable de la dé-*N*-acétylation partielle des poly-*N*-acétylglucosamines. Les fonctions NH₂ libres ainsi introduites (Fig. 3), semblent être essentielles pour la fixation du PNAG sur la surface bactérienne et les activités biologiques du PNAG : adhésion aux cellules épithéliales, formation de biofilm et virulence dans un modèle *in vivo* (Vuong *et al.*, 2004).

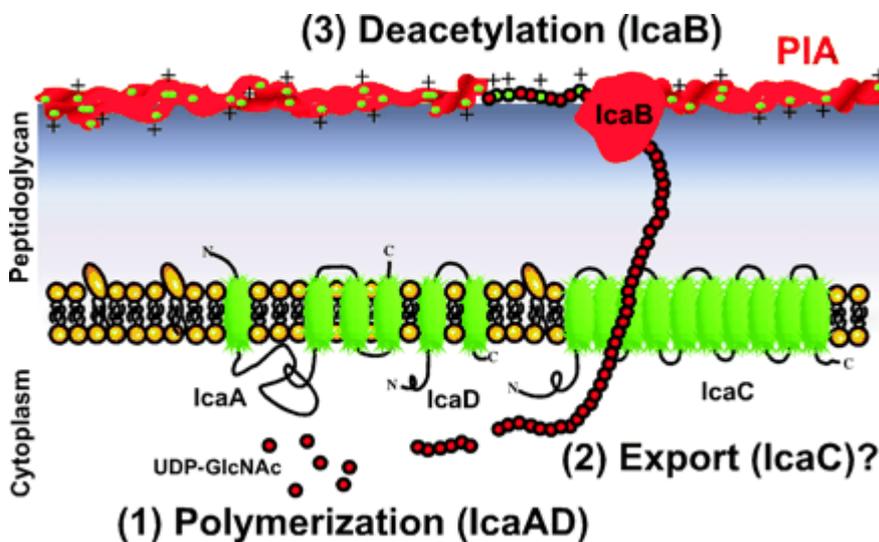


Figure 3. Modèle de la biosynthèse du PIA (Vuong *et al.*, 2004)

Trois étapes de la biosynthèse du PIA. (1) IcaA et IcaD synthétisent un polymère de β -(1,6)-*N*-acétylglucosamine à partir d'UDP-GlcNAc. (2) IcaC pourrait être impliqué dans l'export du polymère. (3) La macromolécule du PIA est deacétylée par IcaB. Ainsi, la charge positive, cruciale pour ses fonctions biologiques, est introduite.

Le locus *ica* a été retrouvé chez de nombreuses souches de *S. aureus*, et sa présence est liée à la capacité des bactéries à former un biofilm *in vitro* (Cramton *et al.*, 1999). Avec le plasmide pCN27, dans lequel le locus *icaABCD* a été cloné, la souche biofilm-négative *S. carnosus* TM300 recombinante a acquis les capacités d'adhérer au verre et à former un biofilm. Un polysaccharide *N*-succinylé (poly-*N*-succinyl-glucosamine, PNSG) a été isolé à partir de cette souche mutante. Le PNSG, retrouvé sur la surface des isolats cliniques de *S. aureus* des patients atteint de la mucoviscidose, (McKenney *et al.*, 1999), a été proposé en tant que candidat de vaccin contre les infections staphylococciques (McKenney *et al.*, 2000). Toutefois, les études ultérieures de la même équipe ont démontré que la *N*-succinylation était un artefact analytique (Joyce *et al.*, 2003). Pour l'étude des propriétés immunologiques du PS/A, les chercheurs de l'équipe de G. Pier ont utilisé une souche « surproductrice du PS/A », *S. aureus* MN8m. Les propriétés chimiques (composition, poids moléculaire, degré de de-*N*-acétylation) de ce polysaccharide, identifié en tant que PNAG (poly-*N*-acetylglucosamine), ont été étudiées (Maira-Litran *et al.*, 2002). Grâce à une étude structurale détaillée à l'aide de nombreuses techniques RMN complémentées par des modifications chimiques du polymère, le spectre RMN du polysaccharide SAE (*S. aureus* exopolysaccharide), isolée de cette même souche *S. aureus* MN8m, a été complètement attribué (Joyce *et al.*, 2003). La masse moléculaire de SAE a été estimée supérieure à 300 000 Da. Selon ces auteurs, la différence principale entre le SAE et le PIA serait : la phosphorylation (absence de phosphorylation dans le polysaccharide de *S. aureus*) et la masse moléculaire (>300 kDa pour le SAE et ~ 30 kDa pour le PIA (Mack *et al.*, 1996)).

Polysaccharide	Souche	Artefacts analytiques	Référence
PS/A Polysaccharide/ <u>A</u> dhésin	<i>S. epidermidis</i> RP62A		(Tojo <i>et al.</i> , 1988)
SAA <u>S</u> lime <u>A</u> ssociated <u>A</u> ntigen	<i>S. epidermidis</i> RP62A <i>S. epidermidis</i> isolats cliniques	Présence de glucose	(Christensen <i>et al.</i> , 1990) (Baldassarri <i>et al.</i> , 1996)
PIA Polysaccharide <u>I</u> ntercellular <u>A</u> dhésin	<i>S. epidermidis</i> RP62A <i>S. epidermidis</i> 1457	Phosphate ?	(Mack <i>et al.</i> , 1996)
PS/A, PNSG Poly- <i>N</i> -succinyl-glucosamine	<i>S. carnosus</i> (pCN27) <i>S. aureus</i> MN8m	substitution <i>N</i> -succinyl	(McKenney <i>et al.</i> , 1998)
SAE <i>S. aureus</i> exopolysaccharide	<i>S. aureus</i> MN8m		(Joyce <i>et al.</i> , 2003)
PS/A, PNAG Poly- <i>N</i> -acetylglucosamine	<i>S. aureus</i> MN8m		(Maira-Litran <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 1. Les poly-*N*-acétylglucosamines des staphylocoques (données de littérature)

Des fonctions biologiques différentes sont jusqu'à présent attribuées à PS/A et PIA : le PS/A serait responsable de l'adhésion primaire des staphylocoques, alors que le PIA serait une adhésine

inter-cellulaire, impliquée surtout dans la phase d'accumulation du biofilm (ex. une revue de von Eiff *et al.* (von Eiff *et al.*, 2002)). Cependant, une analyse récente a démontré que ces conclusions reposaient sur des résultats d'études d'adhésion de la souche *S. carnosus* recombinante dans des plaques 96-puits en polystyrène traités pour la culture cellulaire ; et cette distinction entre le PS/A et le PIA n'est due qu'à des différences de procédé de fabrication des plaques entre l'Europe et les Etats-Unis (Maira-Litran *et al.*, 2004).

Une comparaison directe de PIA et de PS/A (PNAG, SAE) reste donc toujours d'actualité. Il reste également des ambiguïtés dans les problèmes liés à la composition du biofilm staphylococcique. Le PIA a été longtemps considéré comme l'élément majeur et indispensable des biofilms staphylococciques. Selon la revue récente de Götz (Götz, 2002), « dans la majorité des cas le « slime » serait vraisemblablement le PIA ». Ce postulat serait en contradiction avec les conclusions de Hussain *et al.*, qui donnent la priorité à l'acide teichoïque, ou les données de Karamanos *et al.* D'autres études récentes indiquent l'existence de mécanismes de formation de biofilm indépendants de la présence du PIA : tels qu'un mécanisme impliquant un produit de protéolyse du Aap (accumulation-associated protein) chez *S. epidermidis* (Rohde *et al.*, 2005)), ou un mécanisme *icaADBC*- indépendant dans des isolats cliniques de *S. aureus* (Fitzpatrick *et al.*, 2005). De nombreuses souches de CoNS du souchier de notre laboratoire, ne possédant pas le locus *icaABCD* ou étant incapable de produire le PIA *in vitro*, sont néanmoins capables de former un biofilm (Chokr *et al.*, 2006).

4. Objectifs du travail

Dans ce travail, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- a) clarifier les ambiguïtés concernant les différences du PIA et le PS/A ;
- b) étudier la composition du biofilm, produit *in vitro* par une souche modèle productrice du biofilm, *S. epidermidis* RP62A ;
- c) étudier la composition du biofilm des souches cliniques de *S. aureus* et CoNS de notre collection, contenant les souches isolées à partir des prothèses orthopédiques infectées (Chokr *et al.*, 2006) ;
- d) éclaircir le rôle de l'AT dans les biofilms staphylococciques ; étudier la structure chimique des AT des souches modèles- productrices de biofilm.

II. RESULTATS PUBLIES

1. Caractérisation des poly-*N*-acetylglucosamines à partir des souches modèles

Présenté dans l'article 1 (Sadovskaya *et al.*, 2005) :

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G. & Jabbouri, S. (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* **73**, 3007-3017.

1.1. Mise au point du protocole de production et purification du PIA

Nous avons mis au point un protocole d'une culture bactérienne dans des conditions de formation du biofilm sur une grande échelle. Cela nous a permis de purifier les molécules constituant le biofilm en quantité suffisante pour leur caractérisation chimique et leur analyse par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse.

Nous avons mis au point une méthode d'extraction qui libère de manière efficace les éléments de la matrice extracellulaire et minimise la lyse cellulaire (en collaboration avec Dr. S. Flahaut). Les conditions de purification utilisées sont moins drastiques que celles proposées dans la littérature. Par conséquent, les substituants labiles (tels que le *O*-succinate) sont préservés au sein de la macromolécule. D'autre part, nous avons évité l'utilisation des tampons qui pourraient engendrer des contaminations des produits finaux. Dans l'ensemble, le protocole développé nous a permis de purifier le poly-*N*-acetylglucosamine à partir d'un biofilm en évitant toute modification ou contamination. Par ailleurs, des contaminants potentiels de nature glucidique (tels que les polysaccharides du milieu de culture) ont été étudiés en parallèle afin d'en prendre compte durant les analyses.

1.2. « PIA » et « PS/A » : deux polysaccharides différents ?

Les deux polysaccharides auxquelles des fonctions différentes ont été attribuées, le « PS/A » et le « PIA » (voir chapitre I.3, Tab. 1) ont été initialement isolés à partir de la même souche, *S. epidermidis* RP62A, par deux équipes: une équipe américaine (Tojo *et al.*, 1988) et une équipe allemande (Mack *et al.*, 1994), (Mack *et al.*, 1996). Par la suite, l'équipe américaine a travaillé avec une autre souche modèle « surproductrice du PS/A », *S. aureus* MN8m (il s'agissait dans ce cas du PNAG et du SAE). Selon l'analyse la plus récente ((Joyce *et al.*, 2003), chapitre I.3.), la différence majeure entre le PIA et l'exopolysaccharide de la souche *S. aureus* MN8m serait : la phosphorylation (absence de phosphorylation dans le polysaccharide de *S. aureus*) et la masse moléculaire (>300 kDa pour le SAE et ~ 30 kDa pour le PIA (Mack *et al.*, 1996)). Pour essayer de résoudre cette ambiguïté, nous avons effectué une étude comparative des polysaccharides en provenance de deux souches modèles, *S. epidermidis* RP62A et *S. aureus* MN8m, dans des conditions de croissance en biofilm et en

utilisant les mêmes techniques d'extraction et de purification. Nous avons alors comparé les profils des extraits bruts des biofilms de ces deux souches et les spectres ¹H-RMN des deux fractions PNAG.

Nous avons ainsi démontré que

- 1) le poly-*N*-acetylglucosamine de *S. epidermidis* RP62A ne contenait pas de substitution phosphate ; la présence du phosphate constatée par Mack *et al.* (Mack *et al.*, 1996) a vraisemblablement été le résultat de contamination par le tampon phosphate utilisé par ces auteurs;
- 2) les poids moléculaires de deux polysaccharides étaient proches ; le PM moins élevé du PIA estimé par Mack *et al.* était probablement due à un artefact (utilisation de la méthode de méthylation en milieu alcalin causant une dégradation partielle de la macromolécule)
- 3) la structure chimique de deux polysaccharides est identique, à l'exception du degré de charge due à la déacetylation et la substitution *O*-succinyl.

Ces résultats, en cohérence avec les résultats de la littérature concernant les différences d'adhésion de la souche *S. carnosus* recombinante aux plaques 96-puits en polystyrène fabriquées en Europe et les Etats-Unis (Maira-Litran *et al.*, 2004), (chapitre I.3), permettent d'affirmer que le PS/A, PIA ou SAE représentent en effet une molécule avec la même structure chimique que le PNAG (poly-β-(1→6)-*N*-acetylglucosamine). Nos résultats ont contribué à atteindre un consensus concernant l'ambiguïté « PS/A vs PIA » (Prof. G. Pier, communication personnelle : « ...as it was once said, **Best biology is chemistry** »). Ce polysaccharide pourrait exercer deux fonctions : l'adhésion primaire des bactéries, durant la première étape de formation du biofilm, et l'adhésion intercellulaire dans la deuxième phase de formation du biofilm, son accumulation.

2. Etude structurale des PNAG des souches cliniques.

Présenté dans l'article 2 (Sadovskaya *et al.*, 2006) :

Sadovskaya, I., Chaignon, P., Kogan, G., Chokr, A., Vinogradov, E. & Jabbouri, S. (2006).

Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**, 75-82.

Nous avons décrit, dans le chapitre II.1, notre contribution à l'étude structurale comparative des PNAG de deux souches modèles : *S. epidermidis* RP62A et *S. aureus* MN8m. Notons que, jusqu'à présent, seul le PNAG de ces deux souches et le PGA d'une souche recombinante d' *E. coli* (voir chapitre III.3.1) avait été étudié en détails. A ce jour, il n'existe aucune étude structurale systématique des souches cliniques de *Staphylococcus*.

Dans notre laboratoire, 66 souches de CoNS isolées à partir de prothèses orthopédiques infectées explantés à l'Hôpital Mignot, le Chesnay, ont récemment été caractérisés (Chokr *et al.*, 2006). Un criblage de ces souches a été effectué selon trois critères : leur capacité à former un biofilm *in vitro*, la présence du gène *icaADBC* et leur aptitude à produire du PIA. Cette dernière propriété a été déterminée par immuno dot-blot en utilisant l'antisérum polyclonal anti-PIA (Prof. D. Mack, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Nous nous sommes intéressés à la composition de la matrice extracellulaire de ces souches cliniques et notamment, à la structure du PNAG constituant leur biofilm. Nous avons inclus dans l'étude plusieurs souches de *S. epidermidis* ainsi que d'autres représentants du genre *Staphylococcus* : *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*. *S. lugdunensis* est un CoNS qui a été récemment décrit comme causant des infections plus aiguës que la plupart des CoNS. A cause de ces manifestations cliniques et certaines caractéristiques microbiologiques, il est souvent confondu avec *S. aureus* (Ebright *et al.*, 2004).

Les souches cliniques ont été cultivées dans un milieu TSB sans agitation et dans des conditions optimales pour la formation du biofilm et la production du PNAG. Les polymères extracellulaires ont été extraits et fractionnés en utilisant la méthode mise au point pour la souche modèle *S. epidermidis* RP62A. Cette méthode de purification nous a permis d'obtenir les PNAG des souches cliniques en évitant toute modification ou contamination, dans un état proche de leur forme naturelle, les groupements chargés étant conservés grâce à l'absence des traitements drastiques et des étapes de purification par des chromatographies échangeuses d'ions (Sadovskaya *et al.*, 2005) (voir chapitre II.1.1).

Les fractions correspondantes aux PNAG des souches cliniques ont été recueillies, lyophilisées et analysés par spectroscopie ¹H-RMN et par des méthodes chimiques. Le degré de dé-N-acétylation a été mesuré à l'aide de deux méthodes de dosage colorimétrique : Elson-Morgan (Enghofer & Kress, 1979) pour l'estimation du glucosamine total et Smith et Gilkerson (Smith & Gilkerson, 1979) sans hydrolyse préalable pour l'estimation de la quantité des NH₂ libres de glucosamine. Le PNAG de six souches cliniques a ainsi été analysé : *S. epidermidis* 5, 341, 444, 521a ; *S. aureus* 343 et *S. lugdunensis* 18a. Les spectres ¹H-RMN de toutes les souches analysées sont similaires à ceux des souches modèles *S. epidermidis* RP62A et *S. aureus* MN8m, mais avec des différences au niveau des groupements NH₂ libres de glucosamine et les substituants *O*-succinyl. Les PNAG de *S. epidermidis* 444 et *S. aureus* 343 sont peu chargés (5±1 et 2±1% de GlcNH₂ libres, par rapport à ~20% dans le PNAG de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A). Le spectre de *S. epidermidis* 5 est plus hétérogène et ressemble celui de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A, ce qui est confirmé par les résultats d'analyse chimique (17±1% de GlcNH₂ libre). Le spectre ¹H RMN de *S. lugdunensis* 18a ressemble à celui de la souche modèle *S. aureus* MN8m, ayant près de 40% de glucosamine dé-N-acétylé. Les

substituants *O*-succinyls sont également présents dans les PNAG de *S. epidermidis* 5, 44 et de *S. lugdunensis* 18a.

Pour résumer, nous avons montré que les PNAG de six souches cliniques de notre collection ont une structure quasiment identique à celle des souches modèles. La différence entre les PNAG issus des différentes souches est le degré de la dé-*N*-acétylation et de *O*-succinylation.

3. Composition du biofilm de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A : rôle de l'AT EC

Présenté dans l'article 1 (Sadovskaya *et al.*, 2005) :

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G. & Jabbouri, S. (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* **73**, 3007-3017,

Nous avons mis au point des conditions de culture en biofilm sur une grande échelle et un protocole d'extraction des polymères extracellulaires du biofilm en minimisant la lyse cellulaire (voir chapitre II.1.1). En premier lieu, cela nous a permis d'obtenir un extrait de la totalité des polymères extracellulaires en minimisant les contaminations par les macromolécules du milieu et les polymères cellulaires. Ainsi, l'analyse de l'extrait brut du biofilm de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A par filtration sur gel Sephacryl S-300 nous a permis d'isoler, en plus du PNAG, une quantité importante de protéines et un autre polymère glucidique du PM moins élevé. Ce polymère contient des sucres neutres et des sucres aminés. Après élimination des protéines par extraction avec du phénol et du phénol-chloroforme et re-purification du polymère glucidique, nous avons identifié ce polymère comme l'acide teichoïque extracellulaire (AT EC). Son analyse structurale par spectroscopie de masse et RMN a montré qu'il s'agissait d'un poly (glycérol phosphate) substitué par D-Ala, α -Glc, α -GlcNAc et α -Glc6OAla. La structure de l'AT EC est identique à celle de l'AT de la paroi de cette souche (Sadovskaya *et al.*, 2004) ; chapitre II.5.1.). Bien que la présence de l'AT parmi les polymères extracellulaires de quelques CoNS cultivées dans un milieu chimiquement défini a été décrite (Hussain *et al.*, 1991), c'est la première fois que nous démontrons que l'AT EC est un constituant de biofilm staphylococcique.

Un autre problème que nous avons abordé concerne la composition du biofilm (ou de la matrice extracellulaire) en fonction des conditions de croissance de la bactérie. Cela nous a paru intéressant de comprendre pour une souche de Staphylocoque donnée, si la composition du biofilm variait en fonction des conditions de croissance. Par la suite, cette étude pourrait permettre de mieux comprendre le comportement des staphylocoques dans leurs habitats naturels. En utilisant la méthode d'extraction et de fractionnement développée, nous avons étudié les profils chromatographiques des extraits bruts

extracellulaires de *S. epidermidis* RP62A cultivée dans différents milieux de culture (TSB ou BHI) et dans différentes conditions d'aérogénéation. Une méthode analytique de dosage de la quantité relative d'EC TA par CPG a également été mise au point (Sadovskaya *et al.*, 2005).

Nous avons trouvé que la proportion de PNAG et de l'AT EC variait considérablement en fonction des conditions de croissance : dans un milieu TSB sans agitation, conditions optimales pour la production du PNAG, des quantités peu importantes d'AT EC sont produites (<50 µg équivalent glycérol par litre de culture). Dans les mêmes conditions d'aérogénéation en milieu BHI, la quantité de biofilm était aussi importante qu'en milieu TSB, mais avec peu de PNAG et beaucoup plus d'AT EC (~300 µg équivalent glycérol par litre de culture) et de protéines. Les conditions d'agitation dans les deux milieux favorisent la production de l'AT EC et des protéines, mais défavorisent la production du PNAG.

Ces résultats montrent que la composition du biofilm de la même souche est variable selon les milieux de culture et l'aérogénéation. Le même phénomène devrait avoir lieu dans des milieux naturels de ces bactéries.

Article 1

Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G & Jabbouri S (2005)

Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* **73**: 3007-3017.

4. Composition du biofilm des souches cliniques

Présenté dans les articles 2 (Kogan *et al.*, 2006) et 3 (Sadovskaya *et al.*, 2006) :

Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. & Jabbouri, S. (2006). Biofilms of clinical strains of Staphylococcus that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 11-16 ;

Sadovskaya, I., Chaignon, P., Kogan, G., Chokr, A., Vinogradov, E. & Jabbouri, S. (2006). Carbohydrate-containing components of biofilms produced *in vitro* by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**, 75-82.

4.1. Analyses chimiques des biofilms

Après avoir étudié la composition du biofilm de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A (voir chapitres II.1. et II.3.), nous nous sommes intéressés à la composition du biofilm des souches cliniques de notre collection, produits *in vitro* dans les mêmes conditions optimisées pour la formation du biofilm et du PNAG. Quinze souches productrices de biofilm ont été choisies : des CoNS comme *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri* (Chokr *et al.*, 2006) et une souche de *S. aureus* (Eleaume & Jabbouri, 2004). Parmi celles-ci, certaines ne possèdent pas la capacité à produire du PIA (détection par immuno dot-blot avec un antisérum polyclonal anti-PIA du lapin, fournis par Prof. D. Mack). La question se posait alors de savoir quels étaient les autres composés impliqués dans la formation des biofilms de ces souches.

Toutes les souches ont été cultivées dans des mêmes conditions, dans le milieu TSB et sans agitation. Les extraits bruts de leur biofilm ont été préparés et fractionnés sur une colonne S-300 après déprotéinisation partielle. Tous les extraits contiennent des quantités différentes des protéines. Les profils chromatographiques ainsi obtenus ont été comparés avec celui de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A. Les fractions correspondant aux haut PM ont été recueillies, lyophilisées et analysées par ¹H RMN. Ainsi, la structure des PNAG a été étudiée (chapitre II.4), mais dans certains cas, nous avons constaté une absence de PNAG. Nous avons observé trois types de profils chromatographiques:

- a) profils similaires à celui de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A, avec des quantités importantes de PNAG (*S. epidermidis* 5, 444 et *S. aureus* CoN 343). La souche *S. epidermidis* 5 produit plus de PNAG que la souche modèle *S. epidermidis* RP62A, et pourrait donc être considérée comme une souche surproductrice du PNAG. L'aspect du biofilm de ces souches se distingue par une forte adhérence aux parois des récipients en verre et la formation d'amas de cellules fortement associées;

- b) profils correspondants à des quantités de PNAG largement inférieures à la souche modèle *S. epidermidis* RP62A (*S. epidermidis* 341 et *S. lugdunensis* 18a¹) ;
- c) profils correspondant à une absence de PNAG. Ce groupe comprend la majorité des souches étudiées.

Dans les trois cas, le pic correspondant à l'AT EC est toujours présent. Afin de s'assurer que ce pic correspond effectivement à l'AT EC et qu'il fait donc partie intégrante du biofilm, nous avons vérifié la composition de ces AT EC et les avons comparés à celles des AT de la paroi de chacune des souches. Les AT ont été préparés en utilisant les protocoles mis au point dans le cadre du travail réalisé pour la souche modèle *S. epidermidis* RP62A (Sadovskaya *et al.*, 2004). Pour chaque souche étudiée, la composition de l'AT EC est proche de celle de l'AT de la paroi. De 8 souches étudiés, l'AT de *S. epidermidis* 5 et *S. lugdunensis* 47 a une composition semblable à celle de l'AT de *S. epidermidis* RP62A et contient du glycérol, Glc et GlcNAc (Sadovskaya *et al.*, 2004). L'analyse des AT d'autres souches a également montré la présence de ribitol et de 1,5-anhydro-ribitol. Ainsi, la composition des AT de *S. epidermidis* 392, 495, *S. warneri* 446, *S. aureus* 383 ressemble à celle de la souche modèle *S. aureus* MN8m (Vinogradov *et al.*, 2006), chapitre II.5.2.

Nous avons ainsi montré que le biofilm des staphylocoques *in vitro* contient des protéines et l'AT EC. Il peut également contenir ou ne pas contenir du PNAG ; les quantités de ce dernier peuvent être variables.

4.2. Sensibilité des biofilms aux traitements enzymatiques et chimiques

Il a été montré que les biofilms d' *E. coli*, dont l'intégrité est maintenue grâce au PNAG, sont dégradés par le méthaperiodate (NaIO₄ ou HIO₄), un agent qui modifie la molécule du PNAG. Ces biofilms ne sont pas sensibles au traitement par une protéase, par exemple la protéinase K (Wang *et al.*, 2004). Au contraire, le biofilm d'une souche *ica*⁻ *S. epidermidis* 1572-R, dont le mécanisme de formation du biofilm n'implique pas le PNAG mais plutôt l'Aap (Accumulation-associated protein), est complètement désagrégé par la protéinase K (Rohde *et al.*, 2005). En tenant compte de ces phénomènes publiés, nous avons essayé de savoir si il existait une corrélation entre la composition chimique des biofilms staphylococciques de notre collection et leur sensibilité à des agents pouvant dégrader spécifiquement les différents composants de ces biofilms. Nous avons étudié la susceptibilité des biofilms staphylococciques à la dispersine B, enzyme capable de dégrader le PNAG (Kaplan *et al.*, 2003), (Kaplan *et al.*, 2004b), (Itoh *et al.*, 2005), au metaperiodate et à la protéinase K. Nous avons utilisé deux groupes de souches : les souches- productrices du PNAG (*S. epidermidis* 5, 444 et *S.*

¹ Résultats non reproductibles pour la souche *S. lugdunensis* 18a

aureus 343) et les souches formant un biofilm sans PNAG (*S. aureus* 383, *S. epidermidis* 455a, 28, *S. lugdunensis* 18a ; chapitre II.4.1). Le biofilm de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A nous a servi comme référence. Ces travaux de dégradation des biofilms ont été effectués par le Dr. Ph. Chaignon. Nous avons trouvé que la susceptibilité des biofilms staphylococciques aux traitements enzymatiques était en bonne corrélation avec leur composition. Les biofilms qui contiennent des quantités importantes de PNAG se décrochent sous l'action de la dispersine B, alors que les biofilms ne contenant pas de PNAG ne sont pas sensibles à ce traitement. La protéinase K, au contraire, ne décroche pas les biofilms des souches productrices de PNAG. Elle est relativement efficace (élimination de 30 à 80% du biofilm en 2 heures) vis-à-vis des souches dont le biofilm ne contenant pas de PNAG. Cela semble indiquer que le biofilm de ce groupe de souches est stabilisé par des molécules de nature protéique.

Article 2

Sadovskaya I, Chaignon P, Kogan G, Chokr A, Vinogradov E & Jabbouri S (2006) Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**: 75-82

Article 3

Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr A & Jabbouri S (2006)

Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin.

FEMS Microbiol Lett **255**: 11-16.

5. Caractérisation structurale des AT des souches modèle *S. epidermidis* RP62A et *S. aureus* MN8m.

Nous avons montré (chapitres II.3 et II.4) que l'AT EC fait partie du biofilm de toutes les souches staphylococciques étudiées. De plus, l'AT de la paroi semble jouer un rôle important durant les premières étapes de formation du biofilm. Cependant, la structure des AT des staphylocoques, et surtout leur substitution par la D-alanine (D-Ala) – détail important dans la pathogénéicité de ces microorganismes – reste peu étudiés.

La structure chimique des acides teichoïques de la paroi de *S. aureus* et *S. epidermidis* est connue grâce aux travaux pionnier de Baddiley *et al.*, dans les années 60 et 70, qui ont démontré que l'AT de *S. aureus* est un poly (ribitol phosphate) lié en (1,5) et substitué en position 4 du ribitol par un β -GlcNAc (Fig. 4 a) (Baddiley *et al.*, 1961), (Baddiley *et al.*, 1962b), (Baddiley *et al.*, 1962a).

L'acide lipo-teichoïque (ALT) de *S. aureus* est un (1,3) poly (glycerol phosphate) attaché à une ancre lipidique de diacylglycerol via une unité diglucosyl (gentobiosyl) (Fig. 4,b) (Duckworth *et al.*, 1975). L'AT de la paroi de *S. epidermidis* I2 est également un poly(glycerol phosphate), lié en (1, 3) et contenant des résidus de β -Glc et D-Ala (Fig. 4, c) (Archibald *et al.*, 1968).

Plus tard, Endl *et al.* (Endl *et al.*, 1983) ont étudié la composition des AT de plusieurs souches de *S. aureus* et de CoNS ; la substitution par la D-Ala n'a pas fait partie de ces études.

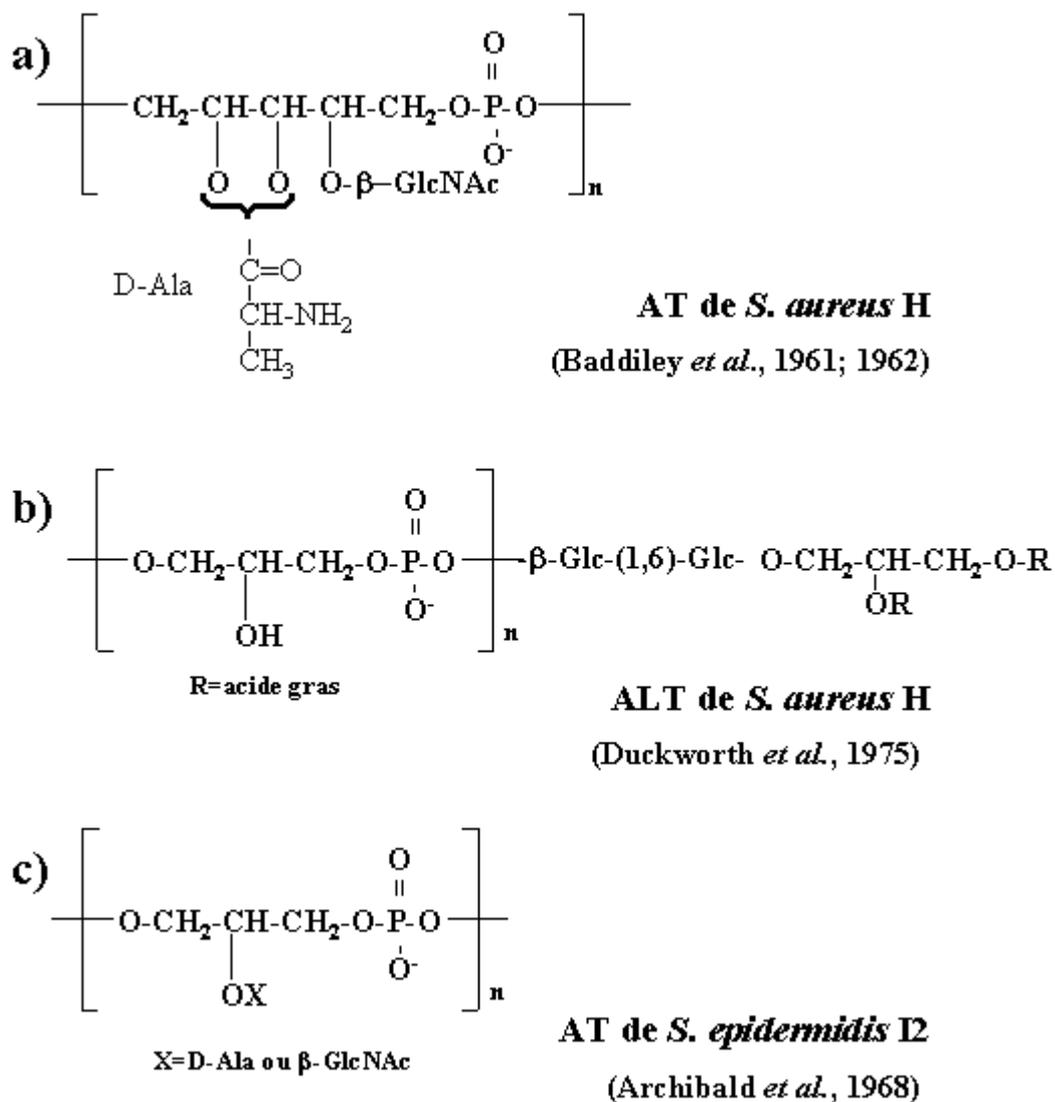


Figure 4. Structure schématique de l'AT et ALT de *S. aureus* et de l'AT de *S. epidermidis*.

5.1. Structures des AT de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A.

Présenté dans l'article 4 (Sadovskaya *et al.*, 2004) :

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J. & Jabbouri, S. (2004). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr Res* **339**, 1467-1473.

Nous nous sommes efforcés, dans un premier temps, à caractériser la structure chimique de l'AT EC et l'AT de la paroi de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A. Hussain *et al.* avait étudié la composition de l'AT de la paroi et de la « substance extracellulaire » à partir de cette souche, et avait

trouvé qu'ils contenaient du glycerol, du phosphate, du Glc, du GlcNAc et du D-Ala. (Hussain *et al.*, 1992). La structure chimique de ces AT n'a pas été établie.

Pour préparer l'AT de la paroi, nous avons utilisé la méthode décrite par Signoretto *et al* pour l'extraction de l'AT de la paroi d'*Enterococcus faecalis* (Signoretto *et al.*, 2000) avec quelques modifications. Avant extraction, toute substance lipidique, y compris l'acide lipoteichoïque (ALT), est éliminé par traitement avec le SDS à 4% à 100°C. L'AT de la paroi est ensuite extrait par l'acide trichloroacétique (trichloroacetic acid, TCA) à 5%.

Les analyses chimiques ont permis d'établir la composition suivante de l'AT de la paroi : glycérol (Gro), phosphate, D-Ala ; puis D-Glc et D-GlcNAc en proportion 5 :1. La structure détaillée de l'AT a été établie par la spectroscopie RMN.

Les spectres ¹H et ¹³C-RMN ont été attribués par des techniques 2D homo- et hétéronucléaires. Les résidus du glycérol, α-Glc, α-GlcNAc, D-Ala, glycérol et glycérol acétylé ont été identifiés dans l'ensemble des spectres.

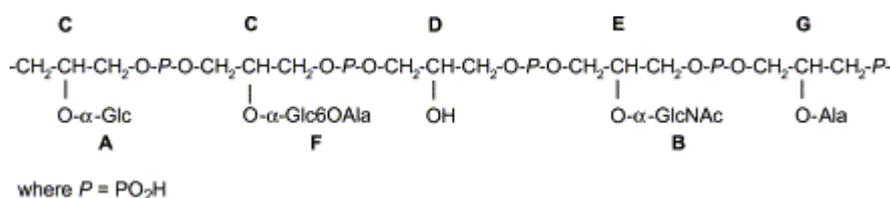


Figure 5. Structure de l'AT de la paroi et de l'AT EC de *S. epidermidis* RP62A

La structure de l'AT est décrite sur la Fig. 5. Il s'agit d'un poly (glycérol phosphate) lié en 1,3 et substitué en position 2 du glycérol par des résidus de α-Glc, α-GlcNAc, α-Glc6Ala et D-Ala. La particularité de cette structure est une estérification partielle du α-Glc par la D-Ala en position 6. Ce site de substitution a été déterminé par corrélation HMBC entre le C1 de D-Ala et le H6 de Glc, ainsi que par les déplacements chimiques caractéristiques des C5 et C6 du Glc acétylé. La substitution du sucre, et pas du polyol, par la D-Ala est une propriété assez unique. La substitution du sucre par la D-Ala a été décrite pour les AT de deux souches *Streptococcus* group D (Wicken & Baddiley, 1963). Cette attribution est cependant incertaine et le site de substitution n'a pas été établi. Très récemment, le Glc6Ala a été identifié dans l'ALT d'*Enterococcus* (G. Pier, communication personnelle).

Nous avons ensuite utilisé l'électrophorèse capillaire, couplé à la spectrométrie de masse (capillary electrophoresis – mass spectrometry, CI MS) pour confirmer le site de substitution par la D-Ala et voir si α-Glc, α-GlcNAc et α-Glc6Ala faisaient partie de la même chaîne polymérique ou s'il s'agissait d'un mélange des polymères, chacun ayant un type de substituant. Les analyses effectuées

par CE - MS et MS - MS de fragments caractéristiques a confirmé que les résidus de Gro, substitués par Glc, Glc6Ala et GlcNAc faisaient partie de la même chaîne polymérique.

L'AT EC a été purifiée à partir de la matrice extracellulaire de *S. epidermidis* RP62A après filtration sur gel Sephacryl S-300, déprotéinisation par extraction au phénol, phénol-chloroforme, filtration sur gel Sephadex G-50, suivie par une chromatographie échangeuse d'ions.

Ce protocole de purification a été mis au point dans le cadre de ce travail. La matrice extracellulaire a été préparée par sonication dans des conditions qui minimisent la lyse cellulaire. L'intégrité des cellules bactériennes a été vérifiée par dénombrement avant et après sonication ; et l'ADN était absent dans l'extrait. Ainsi, l'AT EC n'est pas contaminée par l'AT de la paroi, ce qui est important pour une étude comparative. Les protéines sont éliminées par précipitation avec de l'acide trichloracétique et une extraction au phénol et phénol-chloroforme. Cette méthode douce de déprotéinisation, largement utilisée pour la purification des acides nucléiques, est efficace pour la purification de l'AT EC de *S. epidermidis* RP62A et d'autres souches staphylococciques (chapitre II.4.1). Au cours des extractions, nous avons évité l'utilisation des tampons ayant un pH supérieur à 7, afin de minimiser l'hydrolyse des liaisons esters en *O*. La présence de la D-Ala été vérifiée à l'aide de la chromatographie sur couche mince (CCM) après une *O*-déacétylation (NH₄OH à 10%). La structure de l'AT EC a été étudiée par RMN. Elle est identique à celle de l'AT de la paroi, avec une légère différence au niveau de la distribution de la D-Ala.

Article 4

Sadovskaya I, Vinogradov E, Li J & Jabbouri S (2004) Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr Res* **339**: 1467-1473.

5.2. Structure des AT de la souche modèle *S. aureus* MN8m.

Présenté dans l'article 5 (Vinogradov *et al.*, 2006) :

Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Li, J. & Jabbouri, S. (2006). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr Res* **341**, 738-743.

Le biofilm de la souche modèle *S. aureus* MN8m (souche surproductrice du PNAG) contient de l'AT EC. L'AT EC purifié et l'AT de la paroi de cette souche ont été préparés en utilisant les méthodes mis au point pour la souche modèle *S. epidermidis* RP62A (chapitre II.5.1). Ces AT sont composés de

- ribitol
- glycerol
- phosphate
- GlcNAc.

Cependant, l'AT de *S. aureus* est décrit comme un poly (ribitol phosphate) (Navarre & Schneewind, 1999). La chaîne de poly (glycérol phosphate) est plutôt caractéristique des AT de *S. epidermidis* (Archibald *et al.*, 1968), (Endl *et al.*, 1983) et de l'acide lipo-teichoïque (ALT) de *S. aureus* (Duckworth *et al.*, 1975). Cette composition inhabituelle contenant du glycérol et du ribitol est caractéristique pour les AT de nombreuses souches cliniques de notre collection (chapitre II.4.1), d'où l'intérêt d'une étude structurale détaillée. Nous avons donc procédé à l'étude de la structure chimique des AT de la souche modèle *S. aureus* MN8m.

5.2.1. Etude structurale des AT par la spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse.

Les spectres ¹H et ¹³C-RMN de l'AT de la paroi ont été attribués par des techniques 2D homo- et hétéronucléaires. Les résidus du ribitol, β-GlcNAc, D-Ala, glycérol et glycérol acétylé ont été identifiés dans l'ensemble des spectres. Une interaction NOE entre le H1 du GlcNAc et le H4 du ribitol et la corrélation HMBC entre H1 du GlcNAc et le C4 du ribitol démontrent que le GlcNAc est lié au ribitol en position 4. La quasi totalité du ribitol est ainsi substitué par le β-GlcNAc. Cette structure du poly(ribitol phosphate) correspond à celle décrite dans la littérature pour *S. aureus* H (Baddiley *et al.*, 1961).

Les résidus de glycérol sont liés en (1,3). La majorité de ces résidus ne sont pas substitués, mais une partie (environ 20%) du glycérol est acylé par des résidus d'alanine en position 2.

L'analyse RMN ne permettait pas d'affirmer avec certitude que les résidus du glycérol et du ribitol font partie de la même molécule ou se présentent comme deux chaînes polymériques séparés. Ce

problème a été résolu par spectrométrie de masse CE MS avec utilisation d'une technique de fragmentation dans la source (Li *et al.*, 2005). Aucun fragment contenant du ribitol et du glycérol n'a été observé, ce qui indique qu'ils font partie de deux chaînes polymériques différentes. De plus, les groupes d'ions en provenance des chaînes de poly (glycérol phosphate) sont observés à un voltage orifice («decluster potential») plus bas que les ions en provenance des chaînes de poly (ribitol phosphate). Ainsi, les deux types de chaînes polymériques, le poly (glycérol phosphate) et le poly (ribitol phosphate) ne sont pas liées entre elles (Fig. 6).

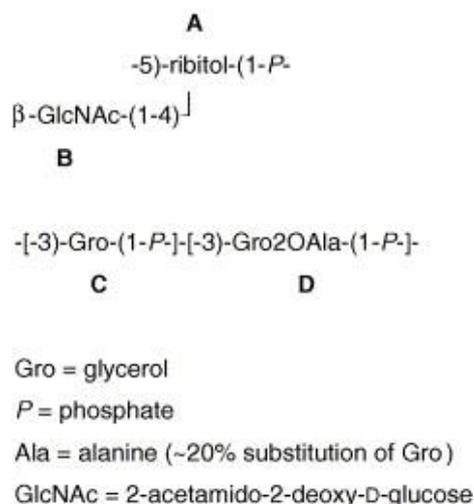


Figure 6. Structure de l'AT de la paroi et de l'AT EC de *S. aureus* MN8m

5.2.2. Analyse comparative des préparations de l'acide teichoïque et de l'acide lipo-teichoïque.

Nous avons montré que les AT de *S. aureus* MN8m contient un mélange de deux polymères :

- un poly (ribitol phosphate) lié en (1,5) et substitué en quasi totalité avec du β -GlcNAc, structure habituelle pour les AT de *S. aureus* ;
- un poly (glycerol phosphate), assez inhabituel pour *S. aureus* et plutôt caractéristique des AT de *S. epidermidis* (Archibald *et al.*, 1968), (Endl *et al.*, 1983).

Par ailleurs, l'acide lipo-teichoïque (ALT) de *S. aureus* a été décrit comme une chaîne de poly (glycérol phosphate) de 28-30 unités, liée à un diacylglycerol par l'intermédiaire d'une unité disaccharidique de glucose (gentobiosyl) (Duckworth *et al.*, 1975). Afin de nous assurer que nos préparations contiennent effectivement des AT et non pas un mélange de l'AT et de l'ALT, nous avons fractionné la préparation de l'AT sur une colonne de chromatographie hydrophobe (Octyl-Sepharose). L'ALT est retenue sur ce type de colonne grâce à la présence d'une partie lipidique. Cette méthode est largement utilisée pour la purification des ALT (Iwasaki *et al.*, 1986). Aucune substance phosphorylée n'a été retenue sur la colonne. La composition de l'AT avant et après la chromatographie est identique. Afin de confirmer l'efficacité de la chromatographie hydrophobe

pour la séparation de l'AT et l'ALT de *S. aureus* MN8m, nous avons préparé l'ALT de cette souche par une méthode conventionnelle avec du phénol chaud (Iwasaki *et al.*, 1986) . L' ALT a ensuite été purifiée sur la colonne d'Octyl-Sepharose dans les mêmes conditions que l'échantillon de l'AT. L'ALT se retrouve dans la fraction retenue sur la colonne, et sa composition (glycérol et Glc en proportion 10 :1) correspond bien à la structure publiée (Duckworth *et al.*, 1975). Nous pouvons donc conclure que les chaînes poly (glycérol phosphate) font effectivement partie de l'AT de *S. aureus* MN8m.

Article 5

Vinogradov E, Sadovskaya I, Li J & Jabbouri S (2006) Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain.

Carbohydr Res **341**: 738-743.

6. Dégradation enzymatique des biofilms staphylococciques

La connaissance des constituants des biofilms de souches cliniques permet également **de mieux cibler les hydrolases capables de dégrader ces biofilms.**

L'intérêt de la communauté scientifique pour la dégradation enzymatique des biofilms de différentes origines est relativement élevé. En effet, les biofilms sont à l'origine de nombreux problèmes rencontrés dans différents domaines : environnemental, industriel et médical. De nombreuses enzymes ou préparations enzymatiques ont été proposées pour l'élimination des biofilms (ex. (Johansen *et al.*, 1997); (Marion *et al.*, 2005), mais dans la plupart des cas, sans tenir compte de la composition chimique des biofilms.

Dans le cas des infections staphylococciques associées aux implants orthopédiques, les bactéries du biofilm sont enfouies dans une matrice extracellulaire qui les protège de l'action des antibiotiques (chapitre I). Pour éliminer les bactéries sessiles, il est parfois nécessaire d'utiliser une concentration d'antibiotique 1000 fois plus importante que pour les bactéries planctoniques (Cerca *et al.*, 2005). Le biofilm constitue un réservoir infectieux difficile à éradiquer. Le traitement de ce genre d'infection nécessite souvent une exérèse de la prothèse, procédure très lourde et dangereuse pour la santé. Cependant, dans certains cas, un lavage du site infectieux par des solutions contenant des détergents et des antibiotiques est pratiqué pour éliminer l'infection. En cas de succès, la prothèse peut être maintenue. L'utilisation d'une préparation enzymatique qui pourrait désagréger le biofilm bactérien, libérer les bactéries planctoniques dans l'environnement et les rendre ainsi sensibles aux antibiotiques pourrait améliorer de manière significative l'efficacité de ce traitement. Nous avons testés différentes préparations enzymatiques en relation avec leur capacité à dégrader un biofilm staphylococcique formé par les souches de notre collection. La composition des biofilms de ces souches avait été étudiée antérieurement (Kogan *et al.*, 2006), (Sadovskaya *et al.*, 2006). Contrairement à la plupart des études précédents, nous avons cherché à **cibler spécifiquement les molécules constituants le biofilm.** Nous nous sommes donc intéressés à l'activité des différents enzymes ou préparations enzymatiques vis-à-vis de la dégradation des constituants des biofilms des staphylocoques : le PNAG, les acides teichoïques et les protéines.

L'étude de la dégradation enzymatique des biofilms a été menée par le Dr. Ph Chaignon (CDD postdoctoral en 2004-2005, contrat ANVAR, responsable Prof. S. Jabbouri). J'ai participé à beaucoup d'aspects de ce travail.

Les résultats sont présentés dans l'article 6 (Chaignon *et al.*, 2006) :

Chagnon, Ph., Sadovskaya, I., Kaplan, J. B., Ragunah, C., Ramasubbu N. & Jabbouri, S. (2006).

Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition, *Appl Microbiol Biotechnol*, in press

Nous avons testé l'activité de différentes enzymes : la DspB, différentes protéases (protéinase K, trypsine), la pancréatine et une préparation Pectinex Ultra SP (PUS, Novozyme) sur des biofilms formés par différentes souches staphylococciques de notre collection (Chokr *et al.*, 2006). La capacité de ces préparations à dégrader un biofilm est différente en fonction des souches. Bien que tous les biofilms contiennent des protéines, les trois protéases testées hydrolysent efficacement que les biofilms ne contenant pas de PNAG. Pour les souches contenant majoritairement du PNAG, la DspB désagrège leurs biofilms en hydrolysant le PNAG qu'ils contiennent. Ces préparations enzymatiques ont également été testées pour leur potentiel à dégrader les composé purifiés des biofilms staphylococciques : le PNAG, les acides teichoïques et les protéines (Chaignon *et al.*, 2006) Nos résultats indiquent qu'un traitement par la DspB et par une protéase pourrait être une solution efficace pour éliminer un biofilm staphylococcique d'une souche inconnue.

Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition

P. Chaignon · I. Sadovskaya · Ch. Ragunah ·
N. Ramasubbu · J. B. Kaplan · S. Jabbouri

Received: 11 October 2006 / Revised: 1 December 2006 / Accepted: 1 December 2006
© Springer-Verlag 2007

Abstract Bacterial infections are serious complications after orthopaedic implant surgery. Staphylococci, with *Staphylococcus epidermidis* as a leading species, are the prevalent and most important species involved in orthopaedic implant-related infections. The biofilm mode of growth of these bacteria on an implant surface protects the organisms from the host's immune system and from antibiotic therapy. Therapeutic agents that disintegrate the biofilm matrix would release planktonic cells into the environment and therefore allow antibiotics to eliminate the bacteria. An addition of a biofilm-degrading agent to a solution used for washing–draining procedures of infected orthopaedic implants would greatly improve the efficiency of the procedure and thus help to avoid the removal of the implant. We have previously shown that the extracellular staphylococcal matrix consists of a poly-*N*-acetylglucosamine (PNAG), extracellular teichoic acids (TAs) and protein components. In this study, we assessed the sensitivity of pre-formed biofilms of five clinical staphylococcal strains associated with orthopaedic prosthesis infections and with known compositions of the biofilm matrix to periodate, Pectinex Ultra SP, proteinase K, trypsin, pancre-

atin and dispersin B, an enzyme with a PNAG-hydrolysing activity. We also tested the effect of these agents on the purified carbohydrate components of staphylococcal biofilms, PNAG and TA. We found that the enzymatic detachment of staphylococcal biofilms depends on the nature of their constituents and varies between the clinical isolates. We suggest that a treatment with dispersin B followed by a protease (proteinase K or trypsin) could be capable to eradicate biofilms of a variety of staphylococcal strains on inert surfaces.

Keywords *Staphylococcus* · Biofilm detachment · Enzymatic treatment

Introduction

Staphylococci are responsible for more than 1 million serious hospital-acquired infections per year (Projan and Novick 1997). *Staphylococcus epidermidis*, an important member of human skin and mucous membrane microflora, as well as other coagulase-negative staphylococci (CoNS) are the major cause of infections of various indwelling medical devices, including prosthetic cardiac valves, intraocular lenses, catheters and orthopaedic prostheses (Götz 2002). Bacterial infections represent one of the most serious and devastating complications after orthopaedic implant surgery. Treatment for chronic infection usually requires removal of the prosthesis, cleaning the bone interface and new arthroplasty (Lortat-Jacob et al. 2002). It often results in long periods of hospitalisation, morbidity, severe functional impairment and increased mortality.

The pathogenesis of foreign-body-associated infections of CoNS and particularly of *S. epidermidis* is related to their ability to grow as an adherent biofilm (Mack et al.

P. Chaignon · I. Sadovskaya · S. Jabbouri (✉)
Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et les
Biotechnologies, Université du Littoral-Côte d'Opale,
Bassin Napoléon, BP 120,
62327 Boulogne-sur-Mer Cedex, France
e-mail: jabbouri@univ-littoral.fr

P. Chaignon
Institut de Chimie, Université Louis Pasteur/CNRS,
4 rue Blaise Pascal,
67070 Strasbourg, France

C. Ragunah · N. Ramasubbu · J. B. Kaplan
Department of Oral Biology, New Jersey Dental School,
Newark, NJ 07103, USA

7. Caractérisation des PGA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

7.1 Introduction

Nous avons vu dans les chapitres précédents que le PNAG est un polymère qui joue un rôle important dans la formation du biofilm des staphylocoques. Pourtant, des études récentes démontrent que les fonctions de ce polymère sont beaucoup plus universelles.

Un locus génétique nommé *pgaABCD* responsable de l'attachement des bactéries au support, de l'adhésion intercellulaire et de la formation du biofilm chez *E. coli* a été récemment identifié. Des expériences génétiques et biochimiques ont démontré que ce locus est responsable de la biosynthèse d'un polymère proche du PNAG staphylococcique : un poly- β -(1,6)-GlcNAc (PGA). Bien que les produits finaux de la biosynthèse paraissent très proches, les gènes et les enzymes impliqués dans la biosynthèse du PGA et du PNAG ont peu d'homologie de séquence. PgaC a une homologie de 35% avec IcaA ; on suppose que cette enzyme est également une acétyl-transférase. Une petite protéine PgaD pourrait avoir des fonctions similaires à celles de IcaD. Certaines homologues entre IcaB et PgaB et la présence d'une séquence signal de 20 acides aminés laissent penser que PgaB serait une déacetylase (Wang *et al.*, 2004).

Des locus homologues à *pga* sont présents dans de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatifs, tels que *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia pestis* etc. Ces pathogènes pourraient synthétiser des poly-glucosamine qui contribueraient aux maladies infectieuses liées aux biofilms (Wang *et al.*, 2004), (Kaplan *et al.*, 2004b).

Une glycosyl hydrolase, capable d'hydrolyser le PNAG de *S. epidermidis*, a été récemment identifiée par le Prof. J. Kaplan et ses collaborateurs (New Jersey Dental School, Newark, NJ) (Kaplan *et al.*, 2004a). Cette enzyme, nommée dispersine B (DspB), est produite par une bactérie buccale : *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (Kaplan *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2004b), et également par une bactérie apparentée *Actinobacillus pleuropneumoniae*, causant une pleuropneumonie chez des porcs. Il a été établi que la dispersine B hydrolyse les liaisons du poly- β -(1,6)-GlcNAc de manière endolytique (Itoh *et al.*, 2005). Cette enzyme est capable de dégrader rapidement les biofilms produits par quatre souches cliniques de *S. epidermidis*, isolées à la surface de cathéters infectés (Kaplan *et al.*, 2004a).

Le Dr. Kaplan et ses collaborateurs ont montré que les biofilms des bactéries productrices de la DspB, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Actinobacillus pleuropneumoniae*, contenaient un

polysaccharide riche en sucres aminées, codé par le locus *pga* homologue à celui de *E. coli* (Kaplan *et al.*, 2003),(Kaplan *et al.*, 2004b). Ces polysaccharides n'ont cependant pas été caractérisés.

7.2. Résultats

Une étude de la structure et des fonctions du PGA de *A. pleuropneumoniae* et *A. actinomycetemcomitans* a fait objet d'une collaboration avec l'équipe de Dr. Kaplan. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article 7 (Izano *et al.*, 2007) :

IzanoEA, Sadovskaya I, Vinogradov E, Mulks MH, Velliyagounder K, Rangunath Ch, Kher WB, Ramasubbu N, Jabbouri S, Perry MB & Kaplan JB (2007)

Poly-*N*-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Microb Pathogen 43: 1-9

Les polysaccharides ont été purifiés à partir du biofilm de deux souches cliniques de *A. pleuropneumoniae* (IA1 -- serotype 1 et IA5—serotype 5). Ces polysaccharides ont été analysés par des méthodes chimiques et par spectroscopie RMN 1- et 2 D (Dr. E. Vinogradov). Nous avons trouvé que les polysaccharides issus de ces deux souches sont des polymères du GlcNAc liés en β -(1,6). En fonction des préparations, une partie des résidus GlcNAc est dé-*N*-acétylé (à 1-15%). Cette structure est quasi identique à celle du PNAG des staphylocoques, en tenant compte de l'absence de substitution O-succinyl dans le PGA.

Nous étions les premiers à purifier le PGA directement à partir du biofilm de la bactérie à Gram négative, et de présenter des preuves de la de-*N*-acétylation de PGA dans une bactérie Gram -. Chez *A. pleuropneumoniae*, le PGA semble être l'adhésine principale des biofilms qui assure leur intégrité.



Poly-*N*-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Era A. Izano^a, Irina Sadovskaya^b, Evgeny Vinogradov^c, Martha H. Mulks^d,
Kabilan Velliyagounder^a, Chandran Rangunath^a, William B. Kher^a, Narayanan Ramasubbu^a,
Saïd Jabbouri^b, Malcolm B. Perry^c, Jeffrey B. Kaplan^{a,*}

^aDepartment of Oral Biology, New Jersey Dental School, Newark, NJ 07103, USA

^bLaboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et les Biotechnologies INSERM ERI 002, Université du Littoral-Côte d'Opale, Boulogne-sur-mer 62327, France

^cInstitute for Biological Sciences, National Research Council, Ottawa, Ont., Canada K1A 0R6

^dDepartment of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

Received 20 December 2006; received in revised form 7 February 2007; accepted 9 February 2007
Available online 4 March 2007

Abstract

Most field isolates of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* form tenacious biofilms on abiotic surfaces in vitro. We purified matrix polysaccharides from biofilms produced by *A. pleuropneumoniae* field isolates IA1 and IA5 (serotypes 1 and 5, respectively), and determined their chemical structures by using NMR spectroscopy. Both strains produced matrix polysaccharides consisting of linear chains of *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) residues in $\beta(1,6)$ linkage (poly- β -1,6-GlcNAc or PGA). A small percentage of the GlcNAc residues in each polysaccharide were *N*-deacetylated. These structures were nearly identical to those of biofilm matrix polysaccharides produced by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. PCR analyses indicated that a gene encoding the PGA-specific glycoside transferase enzyme PgaC was present on the chromosome of 15 out of 15 *A. pleuropneumoniae* reference strains (serotypes 1–12) and 76 out of 77 *A. pleuropneumoniae* field isolates (serotypes 1, 5 and 7). A *pgaC* mutant of strain IA5 failed to form biofilms in vitro, as did wild-type strains IA1 and IA5 when grown in broth supplemented with the PGA-hydrolyzing enzyme dispersin B. Treatment of IA5 biofilms with dispersin B rendered them more sensitive to killing by ampicillin. Our findings suggest that PGA functions as a major biofilm adhesin in *A. pleuropneumoniae*. Biofilm formation may have relevance to the colonization and pathogenesis of *A. pleuropneumoniae* in pigs.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Crystal violet; Dispersin B; *dspB*; *pgaABCD*

1. Introduction

Surface-associated colonies of bacteria known as biofilms play a role in the pathogenesis of many chronic infections [1]. Bacterial cells in a biofilm are encased in a

self-synthesized, extracellular hydrogel matrix that holds the cells together in a mass and firmly attaches the bacterial mass to the underlying surface [2]. This matrix, also referred to as the slime layer, glycocalyx, or extracellular polymeric substance (EPS) matrix, can comprise up to 90% of the biofilm biomass [3]. In addition to its structural role, the EPS matrix provides biofilm cells with a protected microenvironment containing dissolved nutrients, secreted enzymes, DNA, and bacteriophages. The EPS matrix also contributes to the increased resistance to antibiotics and host defenses exhibited by biofilm cells [4]. Polysaccharide is a major component of the EPS matrix in most bacterial biofilms [2].

Abbreviations: BHI, brain heart infusion; EPS, extracellular polymeric substance; GlcNAc, *N*-acetyl-*D*-glucosamine; GlcNH₂, glucosamine; MHB, Mueller–Hinton broth; PGA, poly- β -1, 6-*N*-acetyl-*D*-glucosamine; PBS, phosphate buffered saline; TSA, Tryptic Soy agar

*Corresponding author. Medical Science Building, Room C-636, 185 S. Orange Ave., Newark, NJ 07103, USA. Tel.: +1973 972 9508; fax: +1973 972 0045.

E-mail address: kaplanjb@umdnj.edu (J.B. Kaplan).

Le PGA de *A. actinomycetemcomitans* (JK1044, serotype e), bactérie buccale productrice de la dispersine B, a été également étudié. Contrairement à *A. pleuropneumoniae*, le PGA d' *A. actinomycetemcomitans* ne semble pas être un polymère extracellulaire. En effet, ce polymère est étroitement lié à la membrane bactérienne, formant même un « complexe » avec le lipopolysaccharide de sa membrane externe. Des molécules de nature protéiques (plus probablement des protéines fibrillaires Flp (Kachlany *et al.*, 2001)) semblent jouer un rôle primordial dans l'adhésion et colonisation, et le PGA pourrait jouer un rôle d'une adhésine secondaire. Cette observation est intéressante pour la compréhension des mécanismes de colonisation de la cavité buccale par *A. actinomycetemcomitans* : cette bactérie – productrice de la DspB – serait capable de dégrader le biofilm d'autres bactéries pathogènes dans son habitat en ayant dans son propre arsenal des possibilités alternatives de formation de biofilm. Des études complémentaires de ces voies de colonisation peuvent être envisagées.

Les résultats de ce travail font partie d'une publication qui en cours de préparation pour Microbial Pathogenesis (Article 8)

1 Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in
2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

3
4 Era A. Izano^a, Irina Sadovskaya^b, Hailin Wang^a, Evgeny Vinogradov^c, Chandran Raganath^a,
5 Narayanan Ramasubbu^a, Said Jabbouri^b, Malcolm B. Perry^c, Jeffrey B. Kaplan^{a*}

6
7 ^a Department of Oral Biology, New Jersey Dental School, Newark, NJ 07103, USA

8 ^b Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et les Biotechnologies INSERM ERI 002,
9 Université du Littoral-Côte d'Opale, Boulogne-sur-mer 62327, France

10 ^c Institute for Biological Sciences, National Research Council, Ottawa, K1A 0R6 Ontario,
11 Canada

12
13 * Corresponding author. Address: Medical Science Building, Room C-636, 185 S. Orange Ave.,
14 Newark, NJ 07103, USA. Tel.: +1 973 972 9508; fax: +1 973 972 0045.

15 E-mail address: kaplanjb@umdnj.edu (J.B. Kaplan).

16
17 Abbreviations: CPC, cetylpyridinium chloride; eDNA, extracellular DNA; GlcNAc, N-acetyl-D-
18 glucosamine; PGA, poly-β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine; PBS, phosphate buffered saline; SDS,
19 sodium dodecyl sulfate; TSA, Tryptic Soy agar; TSB, Tryptic Soy broth.

20

21 Keywords: Congo red, Crystal violet, DspB

22 Abstract

23

24 Clinical isolates of the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
25 form matrix-encased biofilms on abiotic surfaces *in vitro*. A major component of the *A.*
26 *actinomycetemcomitans* biofilm matrix is PGA, a hexosamine-containing polysaccharide that
27 mediates intercellular adhesion. In this report we describe studies on the purification, structure,
28 genetics and function of *A. actinomycetemcomitans* PGA. We found that PGA was very tightly
29 attached to *A. actinomycetemcomitans* biofilm cells and could be efficiently separated from the
30 cells only by phenol extraction. *A. actinomycetemcomitans* PGA copurified with LPS on a gel
31 filtration column. ¹H-NMR spectra of purified *A. actinomycetemcomitans* PGA were consistent
32 with a structure containing a linear chain of N-acetyl-D-glucosamine residues in β(1,6) linkage.
33 Genetic analyses indicated that all four genes of the *pgaABCD* locus were required for PGA
34 production in *A. actinomycetemcomitans*. PGA mutant strains still formed biofilms *in vitro*.
35 Unlike wild-type biofilms, however, PGA mutant biofilms were sensitive to detachment by
36 DNase I and proteinase K. Treatment of *A. actinomycetemcomitans* biofilms with the PGA-
37 hydrolyzing enzyme dispersin B made them 3 log units more sensitive to killing by the cationic
38 detergent cetylpyridinium chloride. Our findings suggest that PGA, extracellular DNA and
39 proteinaceous adhesins all contribute to the structural integrity of the *A. actinomycetemcomitans*
40 biofilm matrix.

La découverte de la DspB par J. K. Kaplan *et al* a ouvert de nouvelles perspectives dans la lutte contre les biofilms staphylococciques. Cette enzyme a un potentiel important dans le traitement et dans la prévention des infections staphylococciques associées aux implants orthopédiques. Pour cette raison, notre collaboration avec Dr. Kaplan et son équipe, initiée en décembre 2003, est d'une importance prioritaire au niveau international.

8. Conclusion et perspectives

8.1. Composition des biofilms staphylococciques

La connaissance des constituants de biofilm staphylococcique est indispensable pour la recherche de nouvelles cibles moléculaires et pour le développement d'outils thérapeutiques contre les infections staphylococciques liés aux implants. Nous avons montré, de manière générale, que le biofilm des staphylocoques a une composition qui varie selon les souches. Les trois classes de composés qui constituent la matrice extracellulaire des biofilms staphylococciques sont :

- un constituant polysaccharidique, PNAG ;
- un poly (polyol phosphate) contenant des glucides, l'acide teichoïque (AT) ;
- les protéines.

Le PNAG peut être présent ou absent dans le biofilm, et sa quantité peut varier en fonction des souches et des conditions de culture. La fraction protéique des biofilms staphylococciques n'a pas fait partie de notre étude. Un AT fait partie du biofilm dans tous les cas étudiés. Pour toutes les souches étudiées, la composition chimique des AT de la paroi et l'AT EC sont identiques. Cela laisse supposer que, au fur et à mesure de la biosynthèse de la paroi cellulaire, les molécules de l'AT peuvent être relâchées de la surface de la cellule et deviennent ainsi une partie de la matrice extracellulaire.

Ainsi, une question peut se poser : serait-il possible que d'autres composants de la paroi, tels que l'acide lipoteichoïque (ALT) et le peptidoglycane (Fig. 7), fassent également partie du biofilm staphylococcique ?

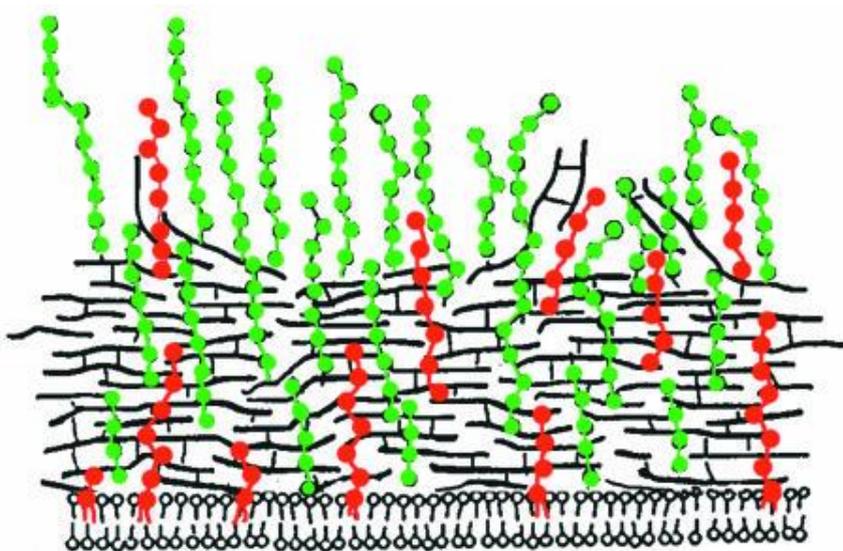


Figure 7. La topographie de l'AT de la paroi et de l'ALT au sein de la paroi d'une bactérie Gram positif (Neuhaus & Baddiley, 2003)

Les symboles rouges représentent l'AT de la paroi et les symboles verts—l'ALT. Le peptidoglycane et les phospholipides sont représentés par des lignes noires.

En effet, des résultats récents montrent que la voie de biosynthèse du peptidoglycane est surexprimée dans *S. aureus* en état sessile par rapport à son état planctonique (Resch *et al.*, 2005; Resch *et al.*, 2006). La lysostaphine, une glycyl-glycine endopeptidase qui hydrolyse spécifiquement les ponts de penta-glycine du peptidoglycane staphylococcique (Fig. 8), est capable de dégrader la matrice extracellulaire des biofilms de *S. aureus*, ce qui a été démontré par la microscopie électronique à balayage (Wu *et al.*, 2003). Ces études démontrent que la présence du peptidoglycane dans les biofilms est possible, mais ce composé n'a jamais été directement détecté dans le biofilm des staphylocoques.

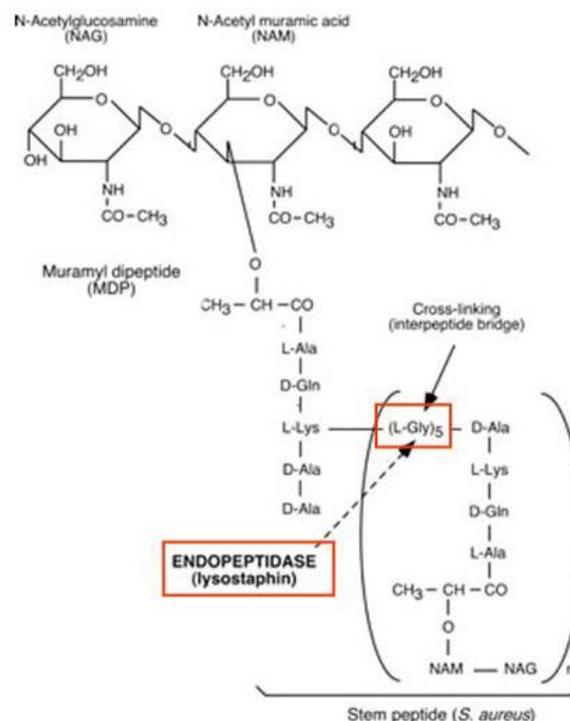


Figure 8. Représentation schématique du peptidoglycane des bactéries Gram positif (adapté à partir de Navarre & Schneewind, 1999)

Un autre composé extracellulaire peu étudié est l'acide poly- γ -DL-glutamique (APG), identifié récemment en tant qu'un polymère attaché à la paroi de *S. epidermidis* 1457 (Kocianova *et al.*, 2005). Ce polymère acide constitue la capsule de *Bacillus anthracis* (Hanby & Rydon, 1946). L'APG joue un rôle important dans la protection de *S. epidermidis* contre le système immunitaire de l'hôte et les concentrations élevées en sel. Le gène *cap*, codant pour l'APG est présent dans les isolats cliniques et commensales de *S. epidermidis* et d'autres CoNS, mais il est absent dans le génome de *S. aureus* (Kocianova *et al.*, 2005). Le problème d'implication de l'APG dans la formation des biofilms de CoNS reste inexploré.

Parmi les protéines qui font partie des biofilms des staphylocoques, seul le Aap (Rohde *et al.*, 2005) semble jouer un rôle structural dans la matrice extracellulaire de certaines souches. Les protéines de la

famille Bap (biofilm-associated protein) (Cucarella *et al.*, 2002), (Pernadés, 2006) et une protéine Ipa (intercellular protein adhesin) décrite très récemment (Christner *et al.*, 2006), sont également impliquées dans la formation de biofilm. Nos résultats d'analyses des extraits bruts des biofilms de plusieurs souches cliniques montrent la présence de quantités importantes des protéines (résultats non publiés). L'identification de ces protéines et glycoprotéines est une perspective intéressante de notre travail. Notamment, une protéine spécifique aux souches staphylococciques invasives - formatrices de biofilm pourrait servir d'antigène pour un test immunologique de dépistage précoce des infections associés aux implants. A présent, aucun moyen de dépistage précoce de ce genre d'infection n'a été commercialisé (chapitre II.1).

8.2. Structure des AT des souches cliniques

La structure des AT des staphylocoques a été largement étudiée dans les années 60-70. Ces données structurales font maintenant partie des manuels de microbiologie. La structure adoptée pour l'AT de *S. aureus* reste celle établie par Baddiley *et al.* (Baddiley *et al.*, 1961; Baddiley *et al.*, 1962a; Baddiley *et al.*, 1962b) ; et pour l'AT de *S. epidermidis* – celle établie par Archibald *et al.* (Archibald *et al.*, 1968) pour la souche *S. epidermidis* I2. Cependant, la position de D-Ala dans l'AT de *S. epidermidis* I2 a été attribuée avec incertitude (Archibald *et al.*, 1968). Jusqu'à présent, l'étude de Endl *et al.* (Endl *et al.*, 1983) reste une référence pour les structures des AT du genre *Staphylococcus*. La substitution par la D-alanine, facteur important pour la virulence des Staphylocoques, ne fait pas partie de cette étude. Nous avons montré, pour la première fois, à l'aide d'une analyse structurale par RMN et par spectrométrie de masse, que l'AT de *S. epidermidis* RP62A contient deux sites de liaison pour la D-Ala : une en position 2 du glycérol, et une en position C6 du glucose.

Nous avons trouvé que l'AT de *S. aureus* MN8m est un mélange de deux polymères, un poly-(ribitol phosphate), structure habituelle de l'AT de *S. aureus*, et un poly- (glycérol phosphate). Ces résultats assez inhabituels semblent être importants puisque les AT de plusieurs souches cliniques de notre collection ont une composition similaire à celle de l'AT de *S. aureus* MN8m. La présence de ces deux types de polymères n'est donc pas une exception.

Le PNAG et l'AT sont deux composés glucidiques du biofilm staphylococcique. Ce sont des polymères chargés avec des charges modulables. Pour le PNAG, la charge peut varier selon les degrés de dé-*N*-acétylation (charge positive) et de *O*-succinylation (charge négative). Les AT sont des polymères avec une forte charge négative, qui diminue selon le degré de substitution par la D-Ala. Chez *S. aureus*, la substitution de l'AT par la D-Ala est nécessaire pour l'adhésion initiale aux surfaces plastiques, la formation du biofilm (Gross *et al.*, 2001) et augmente la résistance à certains

antibiotiques (Peschel *et al.*, 1999; Peschel *et al.*, 2000). L'estérification des AT par la D-Ala chez les Entérocoques a un effet similaire (Fabretti *et al.*, 2006).

Les esters D-Ala, chargés positivement sont impliqués dans des interactions avec des charges négatives des molécules des AT, du peptidoglycane et des protéines (Neuhaus & Baddiley, 2003). Au sein du biofilm staphylococcique, les interactions spécifiques entre le PNAG, les AT et les protéines n'ont pas encore été étudiées. Dans ce contexte, et en tenant compte de l'importance des AT dans la virulence des staphylocoques – cause majeure des maladies nosocomiales – nous proposons d'effectuer une étude plus approfondie de la structure des AT des souches cliniques en utilisant des méthodes modernes d'analyse structurale, tels que la RMN et la spectrométrie de masse.

8.3. Composés de la paroi et du biofilm purifiés : potentiels d'utilisation

Dans le cadre de ce travail, nous avons mis au point un protocole simple et efficace de purification du PNAG. Nous pouvons également préparer le PNAG dé-N-acétylé (dPNAG) à l'aide d'une modification chimique. Le savoir faire dans la préparation des solutions du PNAG et dPNAG, polymères peu solubles dans l'eau et des tampons physiologiques, s'est avéré important pour la mise au point des méthodes des études de leurs effets biologiques.

Nous avons montré que l'AT EC est identique à l'AT de la paroi, et le protocole de préparation de l'AT de la paroi mis au point dans le cadre de ce travail nous a permis de préparer des AT de différentes souches staphylococciques dans des quantités importantes.

La disponibilité du PNAG et des AT purifiés a éveillé l'intérêt de chercheurs travaillant dans le domaine des biofilms des staphylocoques, ainsi que dans d'autres domaines.

- Le PNAG a servi pour la préparation de l'antisérum anti-PNAG du lapin (**Dr. W. Ziebuhr**, *Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität de Würzburg, Allemagne*). Dr. Ziebuhr, et son équipe ont aussi utilisé notre préparation de l'AT de *S. epidermidis* RP62A pour des études microscopiques du biofilm.
- Nous avons purifié et caractérisés les AT des souches *S. epidermidis* 1572 et *S. epidermidis* 1572-R à la demande de **Dr. H. Rohde** (*Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Allemagne*), dans le cadre de l'étude des mécanismes de formation du biofilm par l'intermédiaire du Aap.
- **Prof. G. Pier** et **Dr. T. Maira-Litran** (*Channing Laboratory, Harvard Medical School, Boston MA*) ont utilisé nos préparations des AT de *S. aureus* MN8m et son mutant *S. aureus* MN Δ ica, pour les études des réactions croisés avec l'anticorps monoclonal anti-PNAG. La préparation des

AT de la souche mutante *S. aureus* MNAica était un des sujets du stage de BTS de Mlle A. Fontaine, lycée Valentine Labbé, la Madeleine, 2006)

- Récemment, nous avons été contactés par des chercheurs irlandais impliqués dans un projet important collaboratif portant sur les études de formation du biofilm par *S. epidermidis* dans le système nerveux central chez les patients portant des implants médicaux (*Dr. James P. O’Gara, University College, Dublin ; Dr. Catherine Greene, Prof. Hillary Humphreys, Niall Stevens, Royal College of Surgeons in Ireland*). Nos préparations de PNAG et dPNAG vont servir pour évaluer la capacité de ces polysaccharides de stimuler l’expression de nombreux cytokines par des cellules immunitaires, et étudier les mécanismes de cette stimulation. Dans les premières expériences, les cellules d’une lignée de glioblastome astrocytome humains ont été stimulés par des différentes concentrations de PNAG, et le IL-8 a été dosé dans le surnageant de culture par ELISA (Niall Stevens, travaux de thèse). Les résultats de ces expériences ont montré que le PNAG induisait la synthèse de IL-8 aussi bien que d’autres agonistes des récepteurs TL. Des études des mécanismes d’actions du PNAG sont en cours. Le dPNAG et des AT de quelques souches staphylococciques seront également testés.

Ces contacts pris avec plusieurs groupes de chercheurs pourraient servir aux futurs projets collaboratifs.

IV. TRAVAUX EN COURS

1. Contribution à l’élaboration d’un outil diagnostique des infections liées au biofilm

1.1. Introduction

L’élaboration d’un outil simple permettant de diagnostiquer rapidement une infection staphylococcique associé à un implant se révèle être un défi particulièrement important. En effet, lors d’une infection liée à un implant médical la quantité des bactéries reste très faible dans le système sanguin du malade. La détection directe des bactéries dans le sang est impossible. Les diagnostics aujourd’hui utilisés sont des examens bactériologiques à partir de prélèvement direct du site infecté (aspiration et biopsie). Souvent quand les cultures après ponction au niveau du site infecté deviennent positives, l’infection se trouve dans un stade très avancé. La seule issue dans ce cas est le retrait de l’implant pour augmenter l’efficacité de l’antibiothérapie. Il est nécessaire d’élaborer des tests de diagnostic microbiologique efficace et rapide permettrait de mieux gérer ce problème et aider à une meilleure prise de décision médicale.

Une méthode sérologique basée sur la détection d'un niveau élevée d'anticorps contre des antigènes des biofilms des staphylocoques offrirait une détection rapide et non-invasive des infections sur implants. Toutefois, l'identification d'un antigène immuno-dominant spécifique des infections staphylococciques reste non résolu.

Le problème posé dans le diagnostic des infections de *S. epidermidis* est la présence de ce germe dans la flore commensale. L'utilisation du peptidoglycane, de l'acide teichoïque ou d'autres composés de la surface cellulaire communs aux souches causant des infections et aux souches commensales ne peut pas être utilisés.

La caractéristique des infections causées par des CoNS et associées aux implants médicaux est la formation du biofilm (chapitre I). Un test de diagnostic immunologique devrait donc être basé sur la détection des antigènes spécifiques au biofilm des CoNS, et de *S. epidermidis* en particulier.

Plusieurs préparations antigéniques de polymères extracellulaires ont été proposées par différents auteurs en tant que candidats pour des tests immunologiques : un extrait brut extracellulaire des souches cliniques de *S. epidermidis* (Staphylococcal Slime Polysaccharide Antigen SSPA, (Selan *et al.*, 2002)), un « polysaccharide sulfaté de 20-kDa », un « peptidoglycane de 80 kDa (Karamanos *et al.*, 1997), (Kolonitsiou *et al.*, 2001), (Georgakopoulos *et al.*, 2002; Lamari *et al.*, 2004). Dans tout ces cas, la structure chimique de l'antigène en question n'était pas déterminée. Un « lipide S » extracellulaire de *S. epidermidis*, molécule proche de l'acide lipoteichoïque de *S. aureus*, a également été proposé comme candidat pour un sérodiagnostic (Lambert *et al.*, 2000). Cependant, à ce jour, aucune application de diagnostic n'a été publiée.

Nous avons choisi, en tant que candidat pour un sérodiagnostic des infections staphylococciques associés aux implants, le constituant caractéristique des biofilms de staphylocoques : le PNAG, polysaccharide possédant une structure chimique bien définie. Afin d'évaluer l'importance des différents épitopes au sein de la molécule du PNAG, nous avons également testé le PNAG dé-*N*-acétylé, la déacétylation du GlcNAc ayant été démontrée comme un facteur important de virulence (Vuong *et al.*, 2004). De plus, une réponse immunitaire au PNAG partiellement dé-*N*-acétylé (dPNAG) est plus importante que celle au PNAG intact chez les patients atteints de mucoviscidose (Kelly-Quintos *et al.*, 2005). L'immunisation des animaux avec un vaccin conjugué du dPNAG est plus efficace qu'un vaccin basé sur le PNAG, en terme de protection contre les infections de *S. aureus* (Kropec *et al.*, 2005).

Cependant, la composition du biofilm des staphylocoques est variable et certaines souches produisent des biofilms sans PNAG (chapitre II.4.). Dans la première étape de notre étude, nous nous sommes intéressés aux cas des infections chroniques causées par des souches **productrices de PNAG**.

Ce problème a pu être abordé grâce à un modèle animal mis au point au sein de notre équipe. Une partie du travail a été effectuée dans le cadre du stage de Mlle Stéphanie Faure (Master 2 à l'Université de Rennes 1 ; Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée, 2004-2005).

Afin de mieux comprendre le rôle du biofilm sur des infections associées aux implants, notre équipe (Drs. A. Chokr, D. Leterme, D. Watier) a mis au point un modèle *in vivo*. Ainsi, notre modèle animal permet de mimer une infection chronique associée à un implant chirurgical. L'implant (cylindre en téflon perforé) est introduit en sous-cutané sur chaque flanc d'un cobaye. Le cobaye est infecté de manière contrôlée par des souches préalablement caractérisées *in vitro*. La capacité des souches à provoquer des infections persistantes est ensuite évaluée. Ainsi, certaines souches formant un biofilm contenant du PNAG *in vitro*, sont capables d'engendrer des infections chroniques chez les cobayes.

Nous avons également dosé les anticorps anti-PNAG et dPNAG (les IgG et les IgM) dans les sérum des patients souffrant d'une infection staphylococciques liée aux implants. Le sang était prélevé au moment de l'intervention chirurgicale de l'exérèse de l'implant infecté (CHU de Lille et Institut Calot, Berck-sur-mer). Les échantillons du sérum des individus sains (EFS Nord de France) ont servi de contrôle. La spécificité des anticorps chez le cobaye et chez l'humain a été vérifiée par des tests « compétition ELISA » .

1.2. Résultats

Nous avons trouvé que dans le modèle animal choisi, les niveaux des anticorps anti-PNAG chez les cobayes infectés par la souche *S. epidermidis* RP62A étaient significativement plus élevés que chez les animaux non-infectés ($P < 0.05$). De plus, le niveau de ces anticorps augmentait suite à l'infection chez des cobayes suivis individuellement.

La situation était plus compliquée chez les malades. En effet, nous avons trouvés un niveau assez élevé des IgG anti-PNAG dans le sang des individus sains. Les titres d'IgG dans les sérums de malades sont très variables et en moyenne plus élevés que ceux des individus sains, mais la différence est peu significative ($P > 0.05$). Les niveaux des IgM sont assez bas dans deux groupes, sauf un niveau élevé chez un patient. Des travaux ultérieurs montrent que ce patient est infecté par une souche productrice du PNAG.

Pour conclure, nos résultats démontrent que les souches productrices du PNAG semblent provoquer une augmentation des IgG anti-PNAG dans un modèle d'infections staphylococciques liées à l'implant chez le cobaye. Par ailleurs, le PNAG ne semble pas être un bon antigène pour des tests ELISA pour discriminer des individus sains et des malades souffrant d'une infections associées aux implants médicaux. Cela peut être expliqué, d'une part, par une quantité variable et parfois élevée des

IgG anti-PNAG dans des sérums des individus sains¹ et d'autre part, une proportion importante des isolats cliniques de CoNS ne produisant pas de PNAG. Cependant, il pourrait être utile conjointement avec d'autres tests, pour des suivies des patients individuels. Pour les tests ELISA de diagnostic, d'autres antigènes pourraient être explorés.

Les résultats de cette étude sont en cours de préparation pour une publication :

Irina Sadovskaya, Stéphanie Faure , Denis Watier, Damien Leterme, Ali Chokr, H. Migaud and Saïd Jabbouri

Poly-*N*-acetyl- β -(1,6)-glucosamine is not an appropriate antigen for diagnosis of staphylococcal orthopedic prosthesis related infections

2. Identification des constituants des biofilms dans les extraits bruts.

La purification des constituants polymériques des biofilms des différents groupes de souches cliniques nécessite la mise en œuvre de méthodes extractives et séparatives laborieuses. Grâce à des travaux de collaboration initiés avec le Dr Mark J. Howard (Department of Biosciences, University of Kent, Canterbury), une méthode originale basée sur des techniques RMN TOCSY sélectives (Gradwell *et al.*, 1997), a été mise au point. Cette méthode permet d'avoir des informations très précises sur le PNAG, l'AT et les protéines en utilisant directement un extrait brut de biofilm. Pour la mise au point de la méthode, nous avons utilisé des constituants de biofilm purifiés, ainsi que des extraits extracellulaires d'une souche clinique productrice de PNAG de notre collection, *S. epidermidis* 5. Notre objectif est d'employer cette technique comme outil de caractérisation rapide de la nature des constituants des biofilms. Il serait aussi envisageable de déterminer par cette technique les interactions entre les différents constituants à l'intérieur du biofilm.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

Le biofilm est considéré comme un facteur de virulence principal chez les staphylocoques à coagulase négative (CoNS), cause majeure des infections liées aux implants orthopédiques. *L'étude des biofilms staphylococciques en vue de rechercher des outils thérapeutiques de dépistage ou de traitement de ces infections nécessite une caractérisation approfondie de la composition chimique des substances polymériques extracellulaires des biofilms.*

¹ Ce fait pourrait être expliqué par plusieurs paramètres : présence de *S. aureus* dans les muqueuses du nez, des infections ultérieures et des vaccins contre des pathogène pouvant produire des PNAG (ex. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bordetella pertussis*, *Yersinia pestis* - voir chapitre II.7)

Dans le cadre de ce travail, nous avons développé une approche originale multidisciplinaire adaptée à cette problématique en impliquant des techniques de microbiologie ainsi que des méthodes biochimiques et physico-chimiques. Notamment :

- une approche analytique directe et une analyse approfondie de la littérature nous ont permis de lever l'ambiguïté en concluant que le PIA et le PS/A (appelé aussi SAA, PNSG et SAE) ont la même structure chimique - poly- β -(1,6)-*N*-acétylglucosamine (PNAG), et ne diffèrent que par le degré de charge positive et négative des substituants ;
- pour la première fois, le PNAG de plusieurs souches cliniques, associés aux infections sur implants orthopédiques a été purifié et analysé par spectroscopie RMN ainsi que par des méthodes chimiques. Notre étude a porté sur les biofilms de *S. epidermidis* et des autres espèces staphylococciques présentes dans les infections associées aux prothèses, tels que *S. aureus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*. Nous avons également isolé et caractérisé un polysaccharide codé par le locus *pga* un poly- β -(1,6)-*N*-acétylglucosamine (PGA) à partir des biofilms des bactéries Gram moins, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ;
- l'étude de la composition chimique de la matrice extracellulaire de la souche modèle *S. epidermidis* RP62A, nous a montré que cette matrice est composée, en plus du PNAG, de l'acide téichoïque extracellulaire (AT EC), et de protéines. La proportion de ces polymères varie considérablement en fonction des conditions de croissance. Nous avons établi pour la première fois, que l'AT EC est un constituant du biofilm de cette souche ;
- l'étude des constituants des biofilms de souches cliniques associées aux infections des implants orthopédiques de notre collection, nous a indiqué qu'un pourcentage significatif des isolats est capable de former des biofilms sans PNAG, et avec comme constituant glucidique principal l'AT EC. Les autres souches cliniques forment des biofilms avec des quantités variables du PNAG. Nous avons également étudié la sensibilité de ces souches aux traitements chimiques et enzymatiques. Contrairement à la plupart des études précédents, nous avons cherché à cibler spécifiquement les molécules constituant le biofilm ;
- nous avons établi la structure chimique des AT de la paroi et des AT extracellulaires deux souches modèles-formatrices du biofilm, *S. epidermidis* RP62A et *S. aureus* MN8m. Nous avons trouvé des originalités dans les structures des AT de deux souches. L'AT de *S. epidermidis*

RP62A comporte en plus d'une D-Ala au niveau du glycérol en position 2, une D-Ala qui se situe au niveau du C6 du glucose. Les AT de *S. aureus* MN8m sont constitué d'un mélange de deux polymères, un poly-(ribitol phosphate), structure habituelle de l'AT de *S. aureus*, et un poly-(glycerol phosphate). Ces résultats assez inhabituels semblent être importants puisque les AT de plusieurs souches cliniques de notre collection ont une composition similaire à celle de l'AT de *S. aureus* MN8m.

Ces résultats ont fait objet de sept publications (Sadovskaya *et al.*, 2004; Sadovskaya *et al.*, 2005; Sadovskaya *et al.*, 2006), (Kogan *et al.*, 2006), (Vinogradov *et al.*, 2006), (Chaignon *et al.*, 2007) (Izano *et al.*, 2007) et constituent une contribution importante dans le domaine. Nos travaux sont cités dans des revues récentes sur le sujet (Ziebuhr *et al.*, 2006) ; (Mack *et al.*, 2006) ; (Harraghy *et al.*, 2006) ; (Vadyvaloo & Otto, 2005) ; (Lasa, 2006) ; (Stewart, 2006:01)

Une croissance constante des cas des maladies nosocomiales liés aux biofilms fait en sorte l'intérêt à pour cette problématique est toujours grand et c'est un domaine où de nombreuses équipes de chercheurs sont impliqués dans le monde entier. Un avancement dans la résolution des problèmes peut bénéficier considérablement des compétences réunies de spécialistes dans différentes disciplines. Des collaborations initiées en cours de travail et celles qui pourraient être envisagées, peuvent en servir d'exemple.

La méthode originale d'analyse des extraits bruts des biofilms basée sur des techniques RMN TOCSY sélectives a été mise au point par Dr Mark J. Howard (chapitre III. 2) en collaboration avec nous. Cette méthode permet, entre autre, de détecter le PNAG dans des extraits bruts extracellulaires. De plus, certains détails structurels du PNAG, tels que la dé-*N*-acétylation, peuvent être observés.

D'autre part, la caractérisation complète du PGA de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, bactérie productrice de la dispersine B (chapitre III.3), reste un défi. Dans le cas de cette bactérie Gram négatif, le PGA ne fait pas partie de la matrice extracellulaire, il semble plutôt être étroitement lié à la paroi cellulaire. La purification du PGA de *A. actinomycetemcomitans* est difficile, parce que ce dernier co-purifie avec le LPS de la membrane externe avec lequel il semble former un complexe (résultats non-publiés). La caractérisation de ce PGA, par la méthode NMR-TOCSY sélective, directement dans le mélange, faciliterait énormément la tâche.

Cette technique de RMN pourrait également permettre de résoudre un autre problème. L'équipe de Dr. Kaplan mène actuellement l'étude portant sur la biosynthèse du PGA de *A. pleuropneumoniae* et *A. actinomycetemcomitans*, et notamment la caractérisation de l'activité enzymatique de la dé-*N*-

acétylase, PgaB. Pour vérifier l'activité de l'enzyme, c'est à dire pouvoir facilement détecter la dé-*N*-acétylation du PGA, la méthode NMR-TOCSY sélective développée par Dr. Howard, serait extrêmement utile.

Cette méthode RMN non- destructive et efficace pourrait aussi servir pour la recherche de nouveaux constituants possibles des biofilms staphylococciques, tels que les fragments du peptidoglycane ou de l'APG (chapitre II.4.3)

Nous envisageons, à partir de l'année Universitaire 2007-2008, initier un projet de recherche en collaboration avec Dr. F. Roussel, Laboratoire de Thermophysique de la Matière Condensée (LTPMC), équipe ULCO de l'UMR CNRS 8024. Ce projet portera sur l'utilisation de microscopie à force atomique (MFA) pour l'étude de formation du biofilm.

La MFA permet notamment de mesurer directement des interactions physicochimiques réversibles et des interactions spécifiques entre la bactérie et différents substrats (Hanna *et al.*, 2003) pendant l'adhésion initiale des bactéries au matériau, première étape de formation du biofilm (chapitre I.2). Cette méthode offre la possibilité de distinguer des interactions hydrophobes, ioniques et spécifiques entre les cellules et entre les cellules et les biomatériaux. Elle peut être utilisée pour analyser l'adhésion bactérienne avec une résolution très élevée (Razatos *et al.*, 1998).

La MFA a été utilisée pour des études du rôle des différents composants de la paroi, tels que les LPS et un polysaccharide extracellulaire, l'acide colanique, dans l'adhésion de *E. coli*, cause des infections urinaires (Emerson & Camesano, 2004) ; (Hanna *et al.*, 2003). Cette méthode a été également utilisée récemment pour l'étude des biofilms de *S. epidermidis* (Chaw *et al.*, 2005).

Le PS/A (PNAG) extracellulaire des staphylocoques serait responsable de l'adhésion initiale des bactéries aux matériaux, ainsi que dans l'accumulation du biofilm (chapitres I et II.1.2). En utilisant le PNAG purifié, nous pourrions étudier en détails son rôle dans l'adhésion des bactéries à l'aide de la MFA.

* * *

A l'heure actuelle, le biofilm est considéré comme le mode de vie prédominant des bactéries dans de nombreux écosystèmes (Costerton *et al.*, 1995). Dans des secteurs très variés tels que la santé publique, l'agroalimentaire, le traitement des eaux ou l'industrie pétrolière, les biofilms posent d'importants problèmes. Nous espérons pouvoir contribuer, dans le futur, à leur solution.

ANNEXE Etude structurale des LPS des souches non-type de *P. frisingensis*.

1. Introduction

1.1. Bactéries du genre *Pectinatus*.

Les bactéries du genre *Pectinatus* ont été identifiées comme des contaminants de la bière dans les années soixante dix. Le genre *Pectinatus* comprend deux espèces de bactéries : *Pectinatus cerevisiiphilus* et *Pectinatus frisingensis*, qui sont anaérobies strictes et dont l'attribution Gram positif (classe Clostridia, ordre Clostridiales, famille des Acidaminococcaceae) a été faite génétiquement. Cependant, les parois de ces deux espèces se colorent comme des bactéries à Gram négatif, et possèdent une membrane externe qui contient des lipopolysaccharides (LPS), typiques aux bactéries à Gram négatif (Fig. 9).

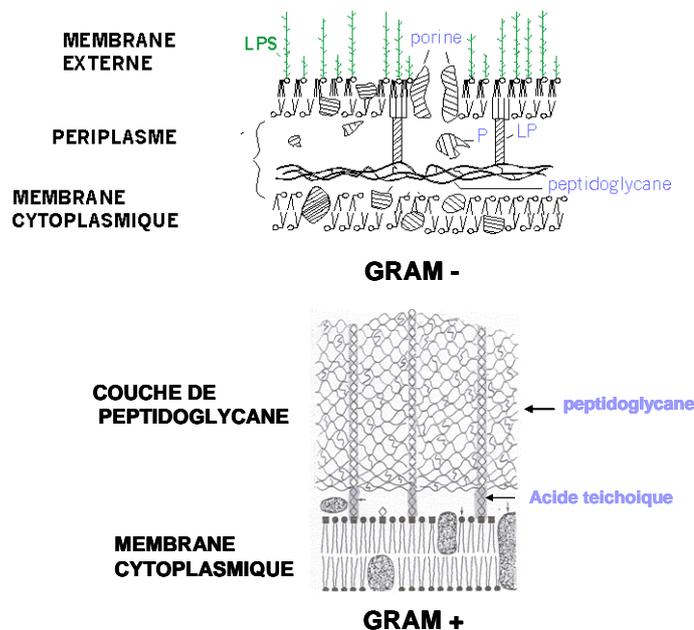


Figure 9. Paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

L'architecture de la paroi de *Pectinatus* ressemble à celle des bactéries à Gram positif, ayant une couche épaisse de peptidoglycane et des invaginations de la membrane cytoplasmique (résumé par (Helander *et al.*, 2004)). La présence des LPS est considérée comme un marqueur des bactéries à Gram négatif. Les microorganismes à Gram positif sont dépourvus de LPS. Les LPS de *Pectinatus* constituent ainsi une exception, ce qui suscite un grand intérêt à l'étude de leur structure.

1.2. Les lipopolysaccharides (LPS).

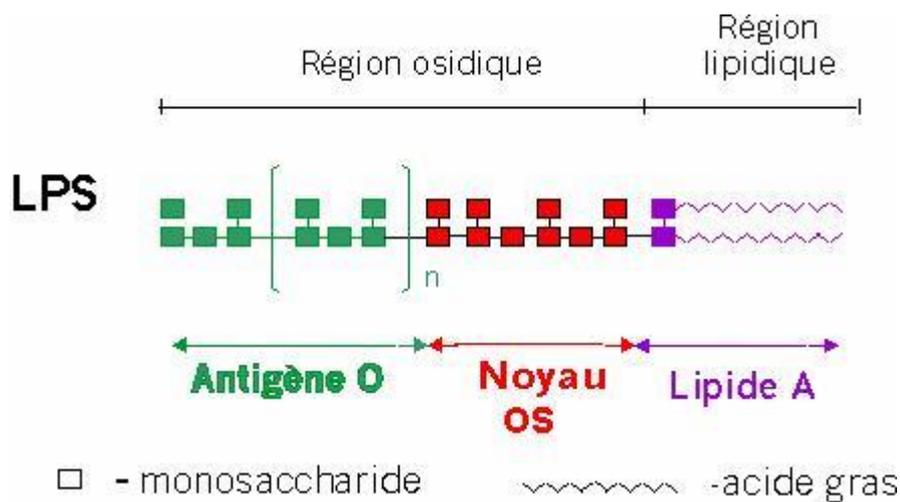


Figure 10. Architecture générale des LPS

Comme le suggère leur nom, les LPS sont composés d'un polysaccharide et d'un lipide liés par une liaison covalente. Ils sont généralement constitués de trois parties (Fig. 10) : le lipide A, le noyau (« core oligosaccharide ») et la chaîne O-spécifique (antigène O).

La partie lipidique du LPS, appelée le lipide A, est ancrée dans la membrane externe de la paroi cellulaire par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes avec les phospholipides (Fig. 9).

Le lipide A est lié à un hétéropolysaccharide – le noyau oligosaccharide – par l'intermédiaire d'un sucre original, l'acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octulosonique (Kdo). Le noyau est habituellement composé d'une dizaine de monosaccharides. Il est constitué d'une partie liée directement au lipide A, appelée noyau interne, et d'une partie proche de la chaîne O-spécifique, appelée noyau externe. Le noyau interne est caractérisé par la présence du Kdo et des heptoses, qui peuvent être substitués par des résidus chargés : phosphate, pyrophosphate, éthanolamine (Holst *et al.*, 1998) ou de 4-amino-4-désoxy-arabionose dans le cas du lipide A de *Pectinatus* spp. (Helander *et al.*, 1994). La structure du noyau interne est généralement commune à toutes les espèces bactériennes d'un même genre. Dans plusieurs bactéries, le noyau est lié à la chaîne O-spécifique, qui à son tour est composée des unités répétitives des oligosaccharides (« repeating units »). Les molécules des LPS qui contiennent les antigènes O sont nommées « lisses » (S, « smooth ») ; celles pour lesquelles il manque l'antigène O sont nommées « rugueuses » (R, « rough »). La morphologie des colonies bactériennes est à l'origine de ces dénominations (Hitchcock *et al.*, 1986). Les LPS de type « semi-rough » (SR) possèdent un noyau lié à une seule unité répétitive de la chaîne O-spécifique (Fig. 11).

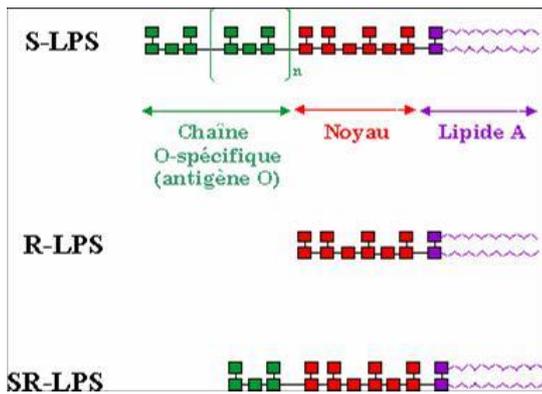


Figure 11. Structure schématique des LPS du type S, R et SR

Puisque le degré de polymérisation de l'antigène O est variable, les LPS du type S sont typiquement constitués d'une famille de molécules ayant des longueurs de chaînes différentes.

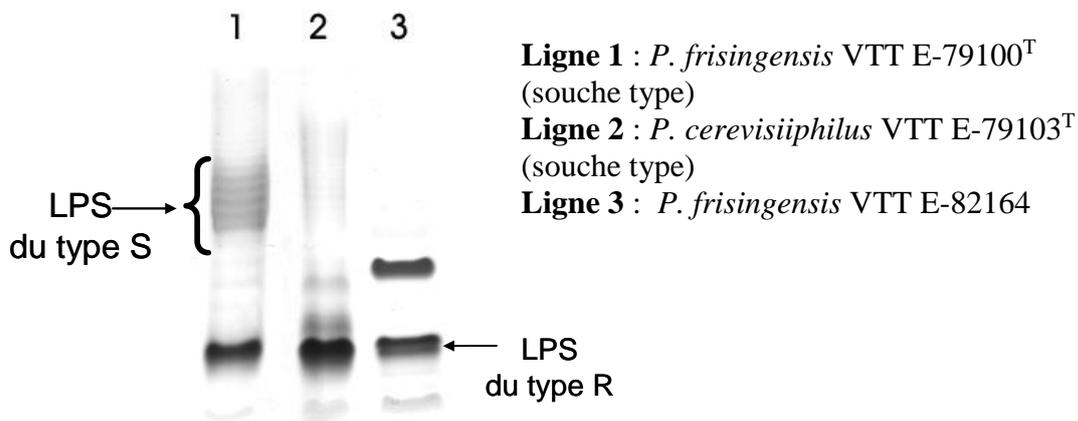


Figure 12. Profil DOC-PAGE des LPS isolés des souches de *Pectinatus*

Cette différence de taille peut être mise en évidence par l'analyse des LPS par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE ou DOC-PAGE).

Les populations des S-LPS avec différents degrés de polymérisation de l'antigène O se présentent comme une multitude de bandes (« ladder-like pattern », ex. Fig. 12, lignes 1 et 2). Les populations des LPS du type R se présentent comme des bandes plus importantes en bas du gel (Fig. 12, ligne 3).

1. 3. Les LPS de *Pectinatus* spp.

En 1998-2001, l'étude du stress chez *Pectinatus* était le sujet principal de l'équipe Microbiologie (plus tard – équipe Biofilm) du LR2B. Après être entré dans l'équipe en 2000, je me suis impliquée dans l'étude des bactéries du genre *Pectinatus* et notamment dans l'élucidation de la structure des molécules fonctionnelles de leur membrane externe—les LPS.

Les LPS jouent un rôle important dans la perméabilité de la membrane externe. La connaissance de leur structure est importante pour la compréhension de la survie de ces bactéries dans la bière. En effet, la bière constitue un milieu hostile aux bactéries en raison de nombreux facteurs de stress : des concentrations élevées en alcool et dioxyde de carbone, des valeurs de températures faibles et de pH acide, la présence de substances bactériostatiques de l'houblon.

Les études de la structure des LPS de *Pectinatus* ont été effectués sur deux souches type : *P. cerevisiiphilus* ATCC 29359^T (VTT E-79103^T) et *P. frisingensis* ATCC 33332^T (VTT E-79100^T). Les deux souches possèdent des LPS du type S, et la structure des unités répétitives de leur antigène O a été élucidé (Senchenkova *et al.*, 1995). La structure de la partie lipide A a été également étudiée (Helander *et al.*, 1994), alors que peu de données bibliographiques étaient disponibles sur la structure du noyau.



La collection des cultures VTT (Espoo, Finlande) possède 32 souches de *Pectinatus* isolées à partir de la bière contaminée provenant de Belgique, Finlande, Allemagne, les Pays-Bas et les Etats-Unis, dont 24 de *P. frisingensis* et 8 de *P. cerevisiiphilus*. Le criblage de plusieurs souches, différentes des souches type, a démontré que la majorité des souches ne présentent que deux bandes distinctes sur gel SDS-PAGE, et sont donc dénués des antigènes O (I.M. Helander, résultats non publiés). Cela indiquerait la présence de deux molécules de LPS distinctes pour chacune des souches.

Sur proposition du Dr. I. M. Helander (Université de Helsinki, Finlande), spécialiste reconnu des LPS de *Pectinatus* spp. et en collaboration avec Dr. E. Vinogradov (Institut des Sciences Biologiques, National Research Council, Ottawa, Canada) et Drs. B. O. Petersen, J.Ø. Duus (Carlsberg Laboratory, Copenhague, Danemark), nous avons entrepris l'étude structurale de la partie glucidique des LPS de deux souches « non-type » de *P. frisingensis* de la collection VTT : VTT E-82164 et VTT E-79104. La structure du noyau de la souche type, *P. frisingensis* VTT E-79100^T a été également étudiée. En plus de la compréhension de l'architecture inhabituelle de ces LPS « non-type » (qui sont en effet les plus répandus dans des isolats de bière, voir ci-dessus), c'était la première étude concernant le noyau des LPS de *Pectinatus* spp.

2. Résultats

Les résultats sont présentés dans les articles suivants :

Vinogradov, E., Petersen, B. O., Sadovskaya, I., Jabbouri, S., Duus, J. O. & Helander, I. M. (2003). Structure of the exceptionally large nonrepetitive carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-82164. *Eur J Biochem* **270**, 3036-3046;

Vinogradov, E., Li, J., Sadovskaya, I., Jabbouri, S. & Helander, I. M. (2004). The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-79104. *Carbohydr Res* **339**, 1637-1642 ;

Et dans la revue :

Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004). Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus*--lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 543-552.

Nous avons montré que le LPS de la souche *P. frisingensis* E-82164 présente deux populations : une contenant une structure glucidique non-répétitive exceptionnellement large, composée de 24 monosaccharides, et une seconde plus courte, composée de 14 monosaccharides. La structure du noyau de la souche type *P. frisingensis* E-79100^T a également été étudiée. Elle est identique à la structure de 14 monosaccharides à l'exception d'une liaison (Vinogradov *et al.*, 2003), Fig. 13

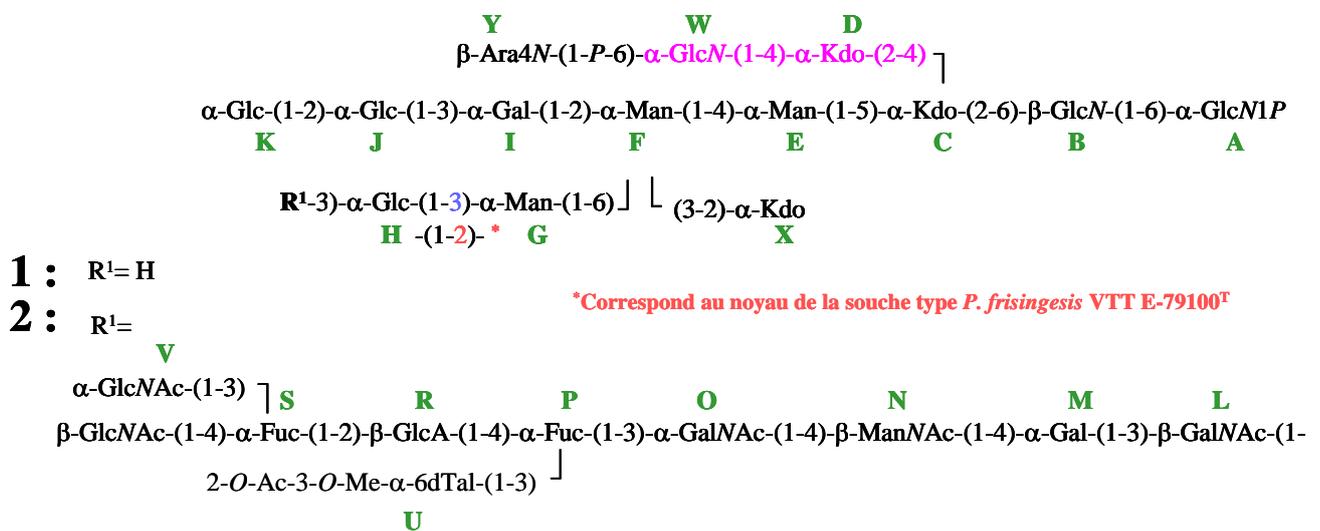


Figure 13. Structure de la partie glucidique des LPS des souches *P. frisingensis*

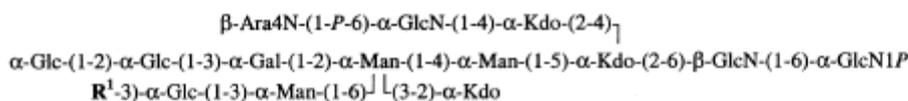
Le LPS de la souche *P. frisingensis* E-79104, a une architecture similaire à la souche *P. frisingensis* VTT E-82164 (« dual core type », « core + distal oligosaccharide »), avec des parties glucidiques de 20 et 12 unités monosaccharides (Vinogradov *et al.*, 2004).

Structure of the exceptionally large nonrepetitive carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-82164

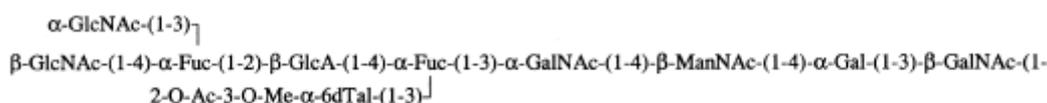
Evgeny Vinogradov¹, Bent O. Petersen², Irina Sadovskaya³, Said Jabbouri³, Jens Ø. Duus² and Ilkka M. Helander⁴

¹Institute for Biological Sciences, National Research Council, Ottawa, ON, Canada; ²Department of Chemistry, Carlsberg Laboratory, Copenhagen, Denmark; ³Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et Biotechnologies, Université de Littoral-Côte d'Opale, Bassin Napoléon BP 120, Boulogne-sur-mer, France; ⁴Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology, University of Helsinki, Finland

The structures of the oligosaccharides obtained after acetic acid hydrolysis and alkaline deacylation of the rough-type lipopolysaccharide (LPS) from *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-82164 were analysed using NMR spectroscopy, MS and chemical methods. The LPS contains two major structural variants, differing by a decasaccharide fragment, and some minor variants lacking the terminal glucose residue. The largest structure of the carbohydrate backbone of the LPS that could be deduced from experimental results consists of 25 monosaccharides (including the previously found Ara4NP residue in lipid A) arranged in a well-defined non-repetitive structure:



where R^1 is H or



We presume that the shorter variant with $\text{R}^1 = \text{H}$ represents the core-lipid A part of the LPS, and the additional fragment is present instead of the O-specific polysaccharide. Structures of this type have not been previously described. Analysis of the deacylation products obtained from the LPS of the smooth strain, VTT E-79100^T, showed that it contains a very similar core but with one different glycosidic linkage.

Keywords: core; lipid A; lipopolysaccharide; *Pectinatus frisingensis*.

Strictly anaerobic Gram-negative rod-shaped bacteria causing turbidity and off flavours in bottled beer were initially isolated in 1978 and described as *Pectinatus cerevisiiphilus*

[1]. Another species, *Pectinatus frisingensis*, which differed from *P. cerevisiiphilus* in a number of biochemical characteristics was later described [2]. To date, the VTT culture collection (Espoo, Finland) has 32 *Pectinatus* isolates from spoiled beer originating from Belgium, Finland, Germany, the Netherlands and the USA; 24 have been identified as *P. frisingensis* and eight as *P. cerevisiiphilus* by conventional tests, ribotyping and partial 16S rDNA sequence analysis [3].

The lipopolysaccharides (LPS) of type strains of *P. cerevisiiphilus* and *P. frisingensis* possess a number of remarkable properties, including the predominance of odd-numbered fatty acids in lipid A [4] and the presence of furanosidic 6-deoxysugars in the O-specific chains [5]. The lipid A was shown to be quantitatively substituted at the 4'-phosphate and partially at the glycosidic phosphate by 4-amino-4-deoxy- β -L-arabinose [6]. There are no structural data on

Correspondence to E. Vinogradov, Institute for Biological Sciences, National Research Council, 100 Sussex Dr., K1A 0R6 Ottawa ON, Canada.

Fax: +1 613 952 90 92, Tel.: +1 613 990 03 97,

E-mail: evgenii.vinogradov@nrc-cmrc.gc.ca

Abbreviations: LPS, lipopolysaccharide; Kdo, 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid; Ara4N, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose; HPAEC, high-performance anion-exchange chromatography; ESI MS, electrospray ionization mass spectrometry.

(Received 5 April 2003, revised 14 May 2003, accepted 22 May 2003)



The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-79104

Evgeny Vinogradov,^{a,*} Jianjun Li,^a Irina Sadovskaya,^b
Said Jabbouri^b and Ilkka M. Helander^c

^aInstitute for Biological Sciences, National Research Council, 100 Sussex Dr., Ottawa ON, Canada K1A 0R6

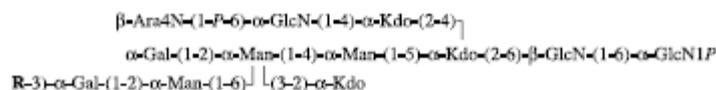
^bLaboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et Biotechnologies, Université du Littoral-Côte d'Opale,
Bassin Napoléon BP 120, F-62327, Boulogne-sur-mer, France

^cDepartment of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology, University of Helsinki, FIN-00014, Helsinki, Finland

Received 7 October 2003; accepted 21 April 2004

Available online 18 May 2004

Abstract—The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-79104 was analyzed using chemical degradations, NMR spectroscopy, mass spectrometry, and chemical methods. The LPS contains two major structural variants, differing in the presence or absence of an octasaccharide fragment. The largest structure of the carbohydrate backbone of the LPS, that could be deduced from experimental results, consists of 20 monosaccharides arranged in a nonrepetitive sequence:



where R is H or 4-O-Me- α -L-Fuc(1-2)-4-O-Me- β -Hep(1-3)- α -GlcNAc(1-2)- β -Man(1-3)- β -ManNAc(1-4)- α -Gal(1-4)- β -Hep(1-3)- β -GalNAc(1- where Hep is a residue of *D*-glycero-*D*-galacto-heptose; all monosaccharides have the *D*-configuration except for 4-O-Me-L-Fuc and L-Ara4N. This structure is architecturally similar to the oligosaccharide system reported previously in *P. frisingensis* VTT E-82164 LPS, but differs from the latter in composition and also in the size of the outer region.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Pectinatus frisingensis*; Lipopolysaccharide; Core; Lipid A

1. Introduction

Pectinatus cerevisiophilus and *P. frisingensis* are strictly anaerobic bacteria spoiling bottled beer.^{1–3} These bacteria, although being Gram-negative in Gram staining,

are currently assigned to the *Sporomusa* sub-branch of the *Clostridium* subphylum of Gram-positive bacteria.² Furthermore, the cell envelope of *Pectinatus* bacteria exhibits characteristics of both Gram-negative and Gram-positive organisms, making it specially interesting to see what kind of LPS structures are present in such bacteria of intermediary character. Whereas type strains of *P. cerevisiophilus* and *P. frisingensis* contain LPS with polymeric O-specific chains,⁴ other strains exist whose LPS lack O chains and exhibit in gel electrophoresis two distinct bands. A strain of the latter type, *P. frisingensis* VTT E-82164 was recently shown to contain a large nonrepetitive oligosaccharide structure involving an

Abbreviations: LPS, lipopolysaccharide; Kdo, 3-deoxy-*D*-manno-octulosonic acid; Hep, *D*-glycero-*D*-galacto-heptose; Ara4N, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, P, phosphate; HPAEC, high-performance anion-exchange chromatography; ESIMS, electrospray ionization mass spectrometry.

* Corresponding author. Tel.: +1-613-990-03-97; fax: +1-613-952-90-92; e-mail: evgenii.vinogradov@nrc-cnrc.gc.ca



Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – lipopolysaccharides of a Gram-positive genus

Ilkka M. Helander ^{a,*}, Auli Haikara ^b, Irina Sadovskaya ^c, Evgeny Vinogradov ^d,
 Mirja S. Salkinoja-Salonen ^a

^a Division of Microbiology, Department of Applied Chemistry and Microbiology, FIN-00014 University of Helsinki, Finland

^b VTT Biotechnology, P.O. Box 1500, FIN-02044 VTT, Espoo, Finland

^c Laboratoire de Recherche sur les Biomatériaux et Biotechnologies, Université de Littoral-Côte d'Opale, Bassin Napoleon BP 120, Boulogne-sur-mer, France

^d Institute for Biological Sciences, National Research Council, Ottawa, ON, Canada

Received 15 January 2004; received in revised form 7 April 2004; accepted 11 May 2004

First published online 26 May 2004

Abstract

Bacteria of the genus *Pectinatus* emerged during the seventies as contaminants and spoilage organisms in packaged beer. This genus comprises two species, *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*; both are strict anaerobes. On the basis of genomic properties the genus is placed among low GC Gram-positive bacteria (phylum *Firmicutes*, class *Clostridia*, order *Clostridiales*, family *Acidaminococcaceae*). Despite this assignment, *Pectinatus* bacteria possess an outer membrane and lipopolysaccharide (LPS) typical of Gram-negative bacteria. The present review compiles the structural and compositional studies performed on *Pectinatus* LPS. These lipopolysaccharides exhibit extensive heterogeneity, i.e. several macromolecularly and structurally distinct LPS molecules are produced by each strain. Whereas heterogeneity is a common property in lipopolysaccharides, *Pectinatus* LPS have been shown to contain exceptional carbohydrate structures, consisting of a fairly conserved core region that carries a large non-repetitive saccharide that probably replaces the O-specific chain. Such structures represent a novel architectural principle of the LPS molecule.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Pectinatus*; Lipopolysaccharide; Gram-positive; Beer spoilage

Contents

1. Introduction	544
2. Phylogeny of <i>Pectinatus</i>	544
3. Architecture of bacterial cell walls – importance of lipopolysaccharide	544
4. Lipopolysaccharides of <i>Pectinatus</i> species	545
4.1. General	545
4.2. Lipid A	546
4.3. Core oligosaccharide and distal oligosaccharide	548
4.4. The O-specific chains	549
5. General discussion and future prospects	549

* Corresponding author. Tel.: +358-19-514-619; fax: +358-19-514-619.

E-mail address: ilkka.helander@kolumbus.fi (I.M. Helander).

3. Perspectives

La structure inhabituelle de molécule de LPS (« dual oligosaccharide type ») n'a pas été décrite auparavant et constitue une propriété unique de *Pectinatus*, microorganisme intermédiaire entre les types Gram-positifs et Gram-négatifs. Il serait intéressant de savoir si un tel arrangement de la partie glucidique des LPS est aussi caractéristique d'autres genres attribués à la famille de *Acidaminococcaceae*, ordre *Clostridiales* des bactéries Gram-positifs (*Selenomonas*, *Megasphaera*, *Sporomusa*, *Veillonella* et *Zymophilus*), parmi lesquelles des bactéries anaérobies contaminants de la bière, ou causant des maladies de la cavité buccale.

Jusqu'à présent, aucune étude systématique n'a été réalisée sur les LPS de ces espèces. En ce qui concerne les LPS de *P. frisingensis* VTT E-79104 et VTT E-82164 et leur architecture inhabituelle, la voie de biosynthèse de ce genre de LPS présente également un intérêt important.

Malgré le fait que les LPS de deux souches type de *P. cerevisiophilus* et *P. frisingensis* soient de type S, la majorité des isolats étudiés ne possèdent pas de chaînes O-spécifiques et ont des parties glucidiques non-répétitives, comme celles trouvées chez *P. frisingensis* VTT E-82164 et VTT E-79104. Ces données montrent que les chaînes O-spécifiques ne sont pas essentielles pour la survie de ces bactéries dans la bière et dans l'environnement des brasseries.

REFERENCES

- Allignet J, England P, Old I & El Solh N (2002)** Several regions of the repeat domain of the *Staphylococcus caprae* autolysin, AtlC, are involved in fibronectin binding. *FEMS Microbiol Lett* **213**: 193-197.
- Archibald AR, Baddiley J & Shaukat GA (1968)** The glycerol teichoic acid from walls of *Staphylococcus epidermidis* 12. *Biochem J* **110**: 583-588.
- Baddiley J, Buchanan JG, Hardy FE, Martin RO, Rajbhandary UL & Sanderson AR (1961)** The structure of the ribitol teichoic acid of *Staphylococcus aureus* H. *Biochim Biophys Acta* **52**: 406-407.
- Baddiley J, Buchanan JG, Martin RO & Rajbhandary UL (1962a)** Teichoic acid from the walls of *Staphylococcus aureus* H. 2. Location of phosphate and alanine residues. *Biochem J* **85**: 49-56.
- Baddiley J, Buchanan JG, Rajbhandary UL & Sanderson AR (1962b)** Teichoic acids from the walls of *Staphylococcus aureus* H. 1. Structure of the N-acetylglucosaminylribitol residues. *Biochem J* **82**: 439-448.
- Baldassarri L, Donnelly G, Gelosia A, Voglino MC, Simpson AW & Christensen GD (1996)** Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect Immun* **64**: 3410-3415.
- Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R & Azeredo J (2005)** Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J Antimicrob Chemother* **56**: 331-336.
- Chaignon P, Sadovskaya I, Kaplan JB, Ragunah C, Ramasubbu N & Jabbouri S (2006)** Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* **in press**.
- Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB & Jabbouri S (2007)** Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* **E-pub ahead of print**.
- Chaw KC, Manimaran M & Tay FE (2005)** Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4853-4859.
- Chokr A, Watier D, Eleaume E, Pangon B, Ghnassia J-C, Mack D & Jabbouri S (2006)** Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int J Med Microbiol* **in press**.
- Christensen GD, Barker LP, Mawhinney TP, Baddour LM & Simpson WA (1990)** Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **58**: 2906-2911.

- Christner M, Pehle P, Burdelski C, Franke GC, Mack D & Rohde H (2006).** Identification of a multifunctional cell surface associated protein involved in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. In *12-th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections*. Maastricht, The Netherlands.
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D & James G (1994)** Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**: 2137-2142.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin-Scott HM (1995)** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW & Götz F (1999)** The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**: 5427-5433.
- Cucarella C, Tormo MA, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ & Penades JR (2002)** Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun* **70**: 3180-3186.
- Donlan RM & Costerton JW (2002)** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
- Duckworth M, Archibald AR & Baddiley J (1975)** Lipoteichoic acid and lipoteichoic acid carrier in *Staphylococcus aureus* H. *FEBS Lett* **53**: 176-179.
- Ebright JR, Penugonda N & Brown W (2004)** Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **48**: 17-21.
- Eleaume H & Jabbouri S (2004)** Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during *in vitro* growth. *J Microbiol Methods* **59**: 363-370.
- Emerson RJt & Camesano TA (2004)** Nanoscale investigation of pathogenic microbial adhesion to a biomaterial. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6012-6022.
- Endl J, Seidl HP, Fiedler F & Schleifer KH (1983)** Chemical composition and structure of cell wall teichoic acids of staphylococci. *Arch Microbiol* **135**: 215-223.
- Enghofer E & Kress H (1979)** An evaluation of the Morgan-Elson assay for 2-amino-2-deoxy sugars. *Carbohydr Res* **76**: 233-238.
- Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O & Huebner J (2006)** Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **74**: 4164-4171.
- Fitzpatrick F, Humphreys H & O'Gara JP (2005)** Evidence for *ica*A_{DBC}-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **43**: 1973-1976.

Foster TJ & Hook M (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**: 484-488.

Georgakopoulos CD, Exarchou A, Koliopoulos JX, Gartaganis SP, Anastassiou ED, Kolonitsiou F, Lamari F, Karamanos NK & Dimitracopoulos G (2002) Levels of specific antibodies towards the major antigenic determinant of slime-producing *Staphylococcus epidermidis* determined by an enzyme immunoassay and their protective effect in experimental keratitis. *J Pharm Biomed Anal* **29**: 255-262.

Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O & Götz F (1998) Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.

Götz F (2002) Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.

Gradwell MJ, Kogelberg H & Frenkiel TA (1997) Applying excitation sculpting to construct singly and doubly selective 1D NMR experiments. *J Magn Reson* **124**: 267-270.

Gross M, Cramton SE, Götz F & Peschel A (2001) Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* **69**: 3423-3426.

Hanby WE & Rydon HN (1946) The capsular substance of *Bacillus anthracis*: With an appendix by P. Bruce White. *Biochem J* **40**: 297-309.

Hanna A, Berg M, Stout V & Razatos A (2003) Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4474-4481.

Harraghy N, Seiler S, Jacobs K, Hannig M, Menger MD & Herrmann M (2006) Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *Int J Artif Organs* **29**: 368-378.

Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D & Götz F (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.

Heilmann C, Hussain M, Peters G & Gotz F (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.

Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekotter A & Peters G (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**: 2769-2778.

Helander IM, Kilpelainen I, Vaara M, Moran AP, Lindner B & Seydel U (1994) Chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides of the genus *Pectinatus*. *Eur J Biochem* **224**: 63-70.

Helander IM, Haikara A, Sadovskaya I, Vinogradov E & Salkinoja-Salonen MS (2004) Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus*--lipopolysaccharides of a Gram-positive genus. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 543-552.

Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, Peters G & Waldvogel FA (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* **158**: 693-701.

Hitchcock PJ, Leive L, Makela PH, Rietschel ET, Strittmatter W & Morrison DC (1986) Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol* **166**: 699-705.

Holst O, Susskind M, Grimmecke D, Brade L & Brade H (1998) Core structures of enterobacterial lipopolysaccharides. *Prog Clin Biol Res* **397**: 23-35.

Hussain M, Hastings JGM & White PJ (1991) Isolation and composition of the extracellular slime made by coagulase-negative staphylococci in chemically defined medium. *J Infect Dis* **163**: 534-541.

Hussain M, Hastings JG & White PJ (1992) Comparison of cell-wall teichoic acid with high-molecular-weight extracellular slime material from *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* **37**: 368-375.

Hussain M, Wilcox MH & White PJ (1993) The slime of coagulase-negative staphylococci : biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* **10**: 191-207.

Hussain M, Heilmann C, Peters G & Herrmann M (2001) Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog* **31**: 261-270.

Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF, 3rd & Romeo T (2005) Depolymerization of β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol* **187**: 382-387.

Iwasaki H, Shimada A & Ito E (1986) Comparative studies of lipoteichoic acids from several *Bacillus* strains. *J Bacteriol* **167**: 508-516.

Izano EA, Sadovskaya I, Vinogradov E et al (2007) Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **in press**.

Johansen C, Falholt P & Gram L (1997) Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3724-3728.

Joyce JG, Abeygunawardana C, Xu Q et al (2003) Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Res* **338**: 903-922.

Kachlany SC, Planet PJ, Desalle R, Fine DH, Figurski DH & Kaplan JB (2001) flp-1, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* **40**: 542-554.

Kaplan JB, Rangunath C, Ramasubbu N & Fine DH (2003) Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol* **185**: 4693-4698.

Kaplan JB, Rangunath C, Velliyagounder K, Fine DH & Ramasubbu N (2004a) Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2633-2636.

Kaplan JB, Veliyagounder K, Rangunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK & Ramasubbu N (2004b) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 8213-8220.

Karamanos NK, Panagiotopoulou HS, Syrokou A, Frangides C, Hjerpe A, Dimitracopoulos G & Anastassiou ED (1995) Identity of macromolecules present in the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. *Biochimie* **77**: 217-224.

Karamanos NK, Syrokou A, Panagiotopoulou HS, Anastassiou ED & Dimitracopoulos G (1997) The major 20-kDa polysaccharide of *Staphylococcus epidermidis* extracellular slime and its antibodies as powerful agents for detecting antibodies in blood serum and differentiating among slime-positive and -negative *S. epidermidis* and other staphylococci species. *Arch Biochem Biophys* **342**: 389-395.

Kelly-Quintos C, Kropec A, Briggs S, Ordonez CL, Goldmann DA & Pier GB (2005) The role of epitope specificity in the human opsonic antibody response to the staphylococcal surface polysaccharide poly N-acetyl glucosamine. *J Infect Dis* **192**: 2012-2019.

Kloos WE & Bannerman TE (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.

Kocianova S, Vuong C, Yao Y, Voyich JM, Fischer ER, DeLeo FR & Otto M (2005) Key role of poly- γ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest* **115**: 688-694.

Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr A & Jabbouri S (2006) Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 11-16.

Kolonitsiou F, Syrokou A, Karamanos NK, Anastassiou ED & Dimitracopoulos G (2001) Immunoreactivity of 80-kDa peptidoglycan and teichoic acid-like substance of slime producing *S. epidermidis* and specificity of their antibodies studied by an enzyme immunoassay. *J Pharm Biomed Anal* **24**: 429-436.

Kropec A, Maira-Litran T, Jefferson KK, Grout M, Cramton SE, Gotz F, Goldmann DA & Pier GB (2005) Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect Immun* **73**: 6868-6876.

Lamari FN, Anastassiou ED, Kolonitsiou F, Dimitracopoulos G & Karamanos NK (2004) Potential use of solid phase immunoassays in the diagnosis of coagulase-negative staphylococcal infections. *J Pharm Biomed Anal* **34**: 803-810.

Lambert PA, Worthington T, Tebbs SE & Elliott TS (2000) Lipid S, a novel *Staphylococcus epidermidis* exocellular antigen with potential for the serodiagnosis of infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**: 195-202.

Lasa I (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol* **9**: 21-28.

Li J, Wang Z & Altman E (2005) In-source fragmentation and analysis of polysaccharides by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**: 1305-1314.

- Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J & Laufs R (1994)** Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H & Laufs R (1996)** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.
- Mack D, Bartscht K, Fischer C, Rohde H, de Grahl C, Dobinsky S, Horstkotte MA, Kiel K & Knobloch JK (2001)** Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol* **336**: 215-239.
- Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA & Knobloch JK (2006)** Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**: 343-359.
- Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, 3rd. MG, Goldmann DA & Pier GB (2002)** Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* **70**: 4433-4440.
- Maira-Litran T, Kropec A, Goldmann D & Pier GB (2004)** Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. *Vaccine* **22**: 872-879.
- Marion K, Pasmore M, Freney J, Delawari E, Renaud F, Costerton JW & Traeger J (2005)** A new procedure allowing the complete removal and prevention of hemodialysis biofilms. *Blood Purif* **23**: 339-348.
- McKenney D, Hubner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA & Pier GB (1998)** The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* **66**: 4711-4720.
- McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee JC, Goldmann DA & Pier GB (1999)** Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* **284**: 1523-1527.
- McKenney D, Pouliot K, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA & Pier GB (2000)** Vaccine potential of poly-1-6 β -D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Biotechnol* **83**: 37-44.
- Navarre WW & Schneewind O (1999)** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 174-229.
- Neuhaus FC & Baddiley J (2003)** A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 686-723.
- Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M & Guss B (1998)** A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 2666-2673.

- Pei L & Flock JI (2001)** Lack of *fbe*, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. *Microb Pathog* **31**: 185-193.
- Pernadés JR (2006).Protein-mediated biofilm formation in bacteria: the Bap model. In *12-th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections*. Maastricht, The Neurtherlands.
- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G & Götz F (1999)** Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405-8410.
- Peschel A, Vuong C, Otto M & Götz F (2000)** The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2845-2847.
- Razatos A, Ong YL, Sharma MM & Georgiou G (1998)** Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11059-11164.
- Reid G (1998)** Bacterial colonization of prosthetic devices and measures to prevent infection. *New Horiz* **6**: S58-63.
- Resch A, Rosenstein R, Nerz C & Gotz F (2005)** Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2663-2676.
- Resch A, Leicht S, Saric M, Pasztor L, Jakob A, Gotz F & Nordheim A (2006)** Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* **6**: 1867-1877.
- Rohde H, Burdelski C, Bartscht K et al (2005)** Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**: 1883-1895.
- Sadovskaya I, Vinogradov E, Li J & Jabbouri S (2004)** Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr Res* **339**: 1467-1473.
- Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G & Jabbouri S (2005)** Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* **73**: 3007-3017.
- Sadovskaya I, Chaignon P, Kogan G, Chokr A, Vinogradov E & Jabbouri S (2006)** Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**: 75-82.
- Selan L, Passariello C, Rizzo L, Varesi P, Speziale F, Renzini G, Thaller MC, Fiorani P & Rossolini GM (2002)** Diagnosis of vascular graft infections with antibodies against staphylococcal slime antigens. *Lancet* **359**: 2166-2168.

- Senchenkova SN, Shashkov AS, Moran AP, Helander IM & Knirel YA (1995)** Structures of the O-specific polysaccharide chains of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis* lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* **232**: 552-557.
- Signoretto C, del Mar Lleo M, Tafi MC & Canepari P (2000)** Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1953-1959.
- Smith RL & Gilkerson E (1979)** Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal Biochem* **98**: 478-480.
- Stewart PS (2006:01)** Matrix mysteries hold keys to controlling biofilms. *Biofilm Perspectives BiofilmsOnline.com*.
- Sutherland IW (2001)** Biofilm exopolysaccharides : a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3-9.
- Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA & Pier GB (1988)** Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **157**: 713-722.
- Vadyvaloo V & Otto M (2005)** Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *Int J Artif Organs* **28**: 1069-1078.
- Vinogradov E, Petersen BO, Sadovskaya I, Jabbouri S, Duus JO & Helander IM (2003)** Structure of the exceptionally large nonrepetitive carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-82164. *Eur J Biochem* **270**: 3036-3046.
- Vinogradov E, Li J, Sadovskaya I, Jabbouri S & Helander IM (2004)** The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Pectinatus frisingensis* strain VTT E-79104. *Carbohydr Res* **339**: 1637-1642.
- Vinogradov E, Sadovskaya I, Li J & Jabbouri S (2006)** Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr Res* **341**: 738-743.
- von Eiff C, Peters G & Heilmann C (2002)** Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* **2**: 677-685.
- Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR & Otto M (2004)** A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.
- Wang X, Preston JF, 3rd & 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.
- Webb JS, Givskov M & Kjelleberg S (2003)** Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr Opin Microbiol* **6**: 578-585.
- Wicken AJ & Baddiley J (1963)** Structure of intracellular teichoic acids from group D streptococci. *Biochem J* **87**: 54-62.

Wu JA, Kusuma C, Mond JJ & Kokai-Kun JF (2003) Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3407-3414.

Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C & Kozitskaya S (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* **28 Suppl 1**: 14-20.