



Vue en microscopie électronique à balayage d'un biofilm bactérien composé de *S. aureus* et *E. coli*, développé à la surface d'un cathéter vasculaire implanté chez un rat.

Des adversaires intraitables...?

Si les biofilms jouent de nombreux rôles positifs dans la plupart des écosystèmes, leur formation est également associée à de multiples complications médicales. La généralisation du recours à des matériaux implantés expose de plus en plus de patients aux infections liées aux biofilms. La prévention et le traitement de ces infections constituent désormais un enjeu majeur sur les plans médical, scientifique et économique.

© B. ARBEILLE & C. LEBOS/LBCM, FACULTÉ DE MÉDECINE DE TOURS

les auteurs

David Lebeaux et
Jean-Marc Ghigo
Institut Pasteur,
Unité de Génétique des biofilms,
Département de microbiologie,
Paris

DES COMPLICATIONS MEDICALES MULTIPLES

En santé humaine, des communautés microbiennes peuvent jouer des rôles bénéfiques en assurant une protection face aux microbes pathogènes ou en participant au métabolisme (encadré p. 36). À l'inverse, la formation des biofilms bactériens ou fongiques est à l'origine de nombreuses infections chez l'homme (1). Ces infections sont de deux types, en fonction du type de surface colonisée. D'une part, les biofilms peuvent se développer à la surface d'un matériel implanté dans le corps du patient (cathéter de perfusion, prothèse orthopédique, etc.) et induire alors des infections liées aux soins ou nosocomiales. D'autre part, les biofilms peuvent être responsables d'infections chroniques à la surface d'une muqueuse humaine, indépendamment d'un corps étranger. Le point commun de ces infections est d'être difficiles à traiter du fait de la capacité des biofilms à survivre à toutes sortes d'agressions, en particulier à la présence de fortes concentrations d'antibiotiques (2).

Après ablation du *pacemaker*, l'analyse par microscopie électronique a permis d'identifier, pour la première fois, la présence d'un biofilm bactérien à la surface des électrodes du dispositif (4). Le concept d'infection associée à un biofilm était né.

Les bactéries d'un biofilm cohabitent avec les bactéries libérées par celui-ci dans la circulation sanguine ou dans les tissus environnants. Ces bactéries dites planctoniques stimulent le système immunitaire, à travers la production d'anticorps et la mobilisation de cellules immunitaires au site de l'infection. Cette réaction permet généralement une destruction efficace des bactéries planctoniques mais ne suffit pas à détruire le biofilm, même chez un individu dont le système immunitaire est fonctionnel (1,5). L'administration d'antibiotiques réduit alors transitoirement les symptômes en éradiquant les bactéries planctoniques mais celles du biofilm survivent souvent et sont à l'origine de rechutes ou d'infections chroniques. L'ablation du matériel étranger ou l'excision chirurgicale

d'un tissu nécrosé sont parfois les seuls moyens d'éliminer définitivement une infection associée aux biofilms (1,5).

Deux grandes catégories d'infections associées aux biofilms peuvent être distinguées, en fonction de leur survenue à la surface d'un matériel implanté ou non (figure ci-dessous).

Les infections associées à un matériel implanté

Depuis la description de 1982, des infections associées à un biofilm ont été décrites pour tous les types de matériaux implantés. Cathéters vasculaires et urinaires, prothèses orthopédiques, sondes d'intubation oro-trachéales, stimulateurs cardiaques et valves cardiaques prothétiques sont tous concernés par le risque de colonisation par des bactéries formant des biofilms (figure ci-dessous) (6).

La contamination de la surface d'un matériel par une bactérie ou

un champignon peut se faire lors de sa pose au bloc opératoire ou pendant son utilisation ou dans les mois qui suivent. Le site anatomique du dispositif explique en grande partie l'origine de l'infection. Ainsi, dans le cas des perfusions, les bactéries présentes sur la peau peuvent migrer à la surface du cathéter, s'y multiplier et former un biofilm.

Lors de l'insertion d'un matériel étranger, on considère que le risque de contamination bactérienne du dispositif lié au geste chirurgical est majeur lors des six premières heures. S'engage alors une course de vitesse entre l'intégration de l'implant par les tissus, donc l'intervention du système immunitaire, et sa contamination éventuelle consécutive à l'adhésion de bactéries à sa surface (7). Le risque de formation d'un biofilm n'est ensuite jamais nul, du fait de contaminations potentielles par le système sanguin (voie

hématogène) ou par contact avec l'environnement pour les dispositifs à émergence cutanée (sondes urinaires ou cathéters vasculaires). Les caractéristiques bactériennes jouent évidemment un rôle majeur dans ces phénomènes. Par exemple, au début du processus de contamination, la capacité des bactéries à adhérer à une surface et à se multiplier est cruciale pour la formation du biofilm (8). Ensuite, certaines bactéries ont des caractéristiques conduisant à la consolidation du biofilm, qui devient plus difficile à éradiquer. Par exemple, certaines entérobactéries, comme *Escherichia coli* ou *Proteus mirabilis*, adhèrent à la surface des sondes urinaires, élèvent localement le pH et favorisent ainsi la précipitation du calcium, induisant la formation d'un biofilm plus robuste (9).

Ces infections sont difficiles à traiter et l'ablation du matériel est souvent nécessaire. Le chan-

Principales infections associées aux biofilms
ORL : oto-rhino-laryngologie.
D'après (6)



INFECTIONS ASSOCIÉES À UN MATÉRIEL IMPLANTÉ

Systèmes de dérivation du liquide céphalo-rachidien

Sondes d'intubation oro-trachéales pour assistance respiratoire

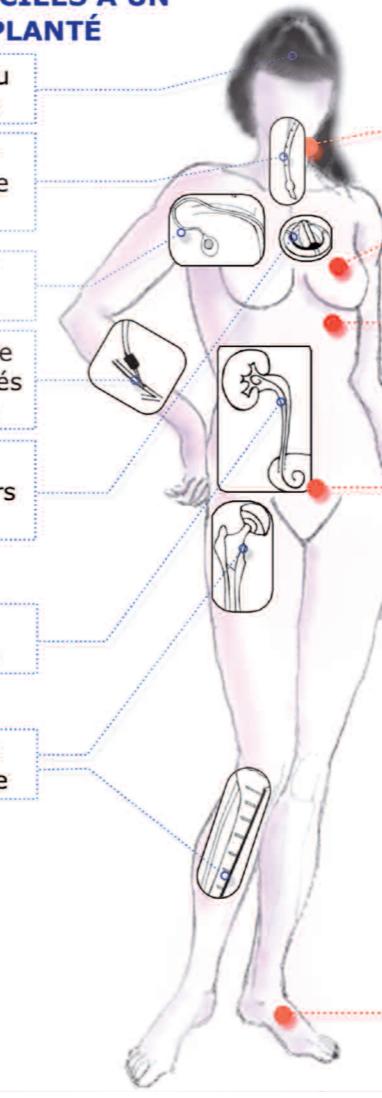
Cathéters centraux pour perfusion vasculaire

Cathéters périphériques de perfusion vasculaire (insérés dans des petites veines)

Valves cardiaques mécaniques et stimulateurs cardiaques

Sondes urinaires (urétrales et urétrales)

Prothèses articulaires et matériaux d'ostéosynthèse



INFECTIONS INDÉPENDANTES D'UN MATÉRIEL

Pathologies bucco-dentaires et ORL (caries, stomatite, otite chronique)

Infections des valves cardiaques (endocardites infectieuses)

Infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose

Infections urinaires récidivantes

Infections associées aux plaies chroniques

© DR

gement du dispositif peut être dououreux, comporte des risques pour le patient et engendre des coûts importants du fait du nouveau matériel et d'une hospitalisation prolongée. Avec le vieillissement de la population dans les pays les plus développés, le nombre de patients concernés par le recours aux matériels implantables augmente régulièrement. Aux États-Unis, 2,6 millions d'implants orthopédiques – dont environ 4,3 % sont responsables d'infections [10] – et plus de 500 000 cathéters de longue durée – 5 à 20 % conduisent à une infection [11,12] – sont posés annuellement.

Les infections chroniques

Il est désormais admis que le biofilm joue aussi un rôle majeur en médecine humaine dans le cadre de nombreuses infections chroniques se développant sur les muqueuses de l'hôte (figure p. 35) [6]. Deux situations pathologiques illustrent les caractéristiques principales de ce type d'infections : les difficultés thérapeutiques et le risque d'infections récidivantes.

L'Endocardite infectieuse correspond à une infection localisée au niveau des valves cardiaques. Elle

est favorisée par l'existence d'anomalies préexistantes des valves qui permettent à certaines bactéries d'y adhérer [13]. Les bactéries s'y multiplient et produisent de la matrice extracellulaire qui se mélange avec la fibrine, présente dans le sang du patient, et des plaquettes, constituant ainsi un biofilm protégé du système immunitaire de l'hôte où le métabolisme bactérien est ralenti (végétations). À partir de ce foyer infectieux, les bactéries peuvent passer dans la circulation sanguine (bactériémie) et disséminer dans d'autres organes. Le traitement de ces infections est difficile : les antibiotiques doivent être administrés longtemps, à forte dose et un recours chirurgical est fréquemment indiqué. Si le traitement est insuffisant, les symptômes peuvent réapparaître, les bactéries au sein du biofilm n'ayant pas été éliminées.

Maladie autosomique récessive, la mucoviscidose touche environ 35 000 enfants et jeunes adultes en Europe. L'atteinte pulmonaire est liée à l'épaississement du mucus et à une diminution de la capacité des cellules bronchiques à éliminer les bactéries (clairance mucociliaire réduite), caractéristiques qui favorisent la colo-

nisation bactérienne et l'altération de la fonction respiratoire [14]. Au cours de l'évolution de la mucoviscidose, le risque que le patient soit colonisé par la bactérie *P. aeruginosa* augmente et devient maximal entre l'adolescence et l'âge adulte. Les souches de *P. aeruginosa* responsables de ces infections produisent de plus en plus de mucus au fur et à mesure de l'évolution de la maladie (souches mucoïdes). De nombreuses analyses microscopiques indiquent que le développement de *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire se fait sous forme de biofilm. Les difficultés thérapeutiques rencontrées dans cette situation clinique et l'impossibilité d'éradiquer *P. aeruginosa* chez ces patients sont typiques de ce mode de vie bactérien [14].

Une fois la colonisation établie, le traitement antibiotique vise à contrôler les symptômes et à éviter la dégradation de la fonction respiratoire mais ne permet pas de faire disparaître définitivement *P. aeruginosa*.

DES INFECTIONS DIFFICILES À TRAITER

Les biofilms ont la capacité de résister à des conditions physico-

chimiques et aux agressions extérieures les plus extrêmes, telles que l'exposition aux ultraviolets, aux métaux lourds, aux acides et aux changements d'hydratation et de salinité [2]. Les bactéries d'un biofilm sont également capables de survivre à de très fortes concentrations d'antibiotiques (figure p. 38) [5]. Cette tolérance est réversible et non héritable comme le serait une classique mutation conduisant à une résistance. Après remise en suspension du biofilm, en effet, les bactéries planctoniques retrouvent, *in vitro*, une sensibilité normale aux antibiotiques [5]. On parle alors de « tolérance » du biofilm plutôt que de résistance.

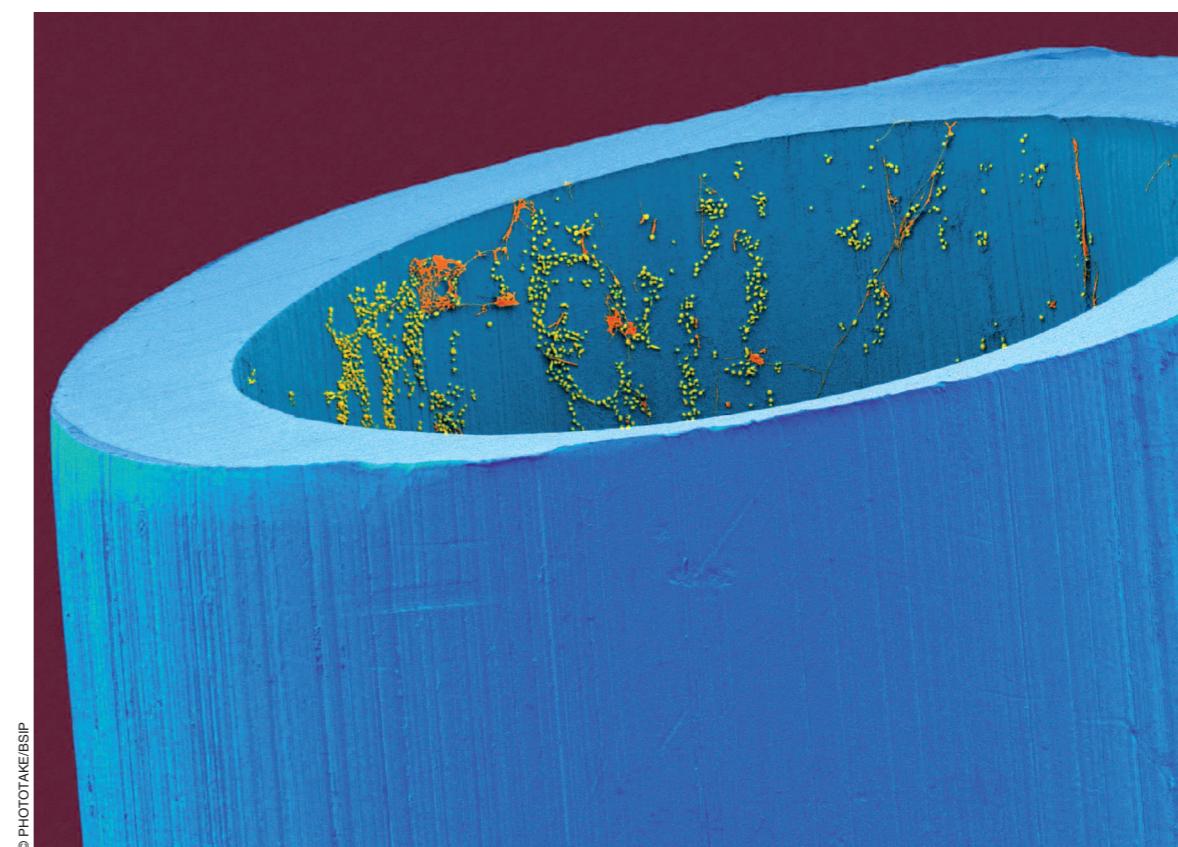
Cette tolérance des biofilms est problématique en médecine humaine et peut s'expliquer en partie par la coexistence de plusieurs mécanismes (figure p. 39). Tout d'abord, la matrice qui entoure les bactéries est une barrière de diffusion qui peut ralentir la pénétration de certains antibiotiques. Cette explication « intuitive » ne rend cependant pas compte de la tolérance des biofilms à certains antibiotiques capables de très bien diffuser à travers la matrice, comme les fluoroquinolones [15]. Il a également été mis en évidence que certaines bactéries du biofilm peuvent être en état de carence nutritionnelle : alors que le milieu extérieur, le sang du patient par exemple, est souvent riche en nutriments et en oxygène, ces éléments arrivent en quantité réduite dans les zones profondes du biofilm, la matrice extracellulaire jouant un rôle de barrière de diffusion. Les bactéries situées en profondeur présentent donc un métabolisme ralenti qui les rend insensibles à certains antibiotiques actifs uniquement contre les bactéries en multiplication.

© PHOTOTAKE/BIP

Il a également été mis en évidence que certaines bactéries du biofilm peuvent être en état de carence nutritionnelle : alors que le milieu extérieur, le sang du patient par exemple, est souvent riche en nutriments et en oxygène, ces éléments arrivent en quantité réduite dans les zones profondes du biofilm, la matrice extracellulaire jouant un rôle de barrière de diffusion. Les bactéries situées en profondeur présentent donc un métabolisme ralenti qui les rend insensibles à certains antibiotiques actifs uniquement contre les bactéries en multiplication.

Bien qu'également présentes en conditions planctoniques, ces bactéries sont surtout problématiques lors des infections associées aux biofilms, la matrice extracellulaire les protégeant du système immunitaire. À l'arrêt des antibiotiques, les bactéries persistantes sortent de leur dormance, reprennent leur multiplication, repeuplent le biofilm et sont responsables des récidives de l'infection [5].

Tous ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs, faisant de la tolérance des biofilms aux antibiotiques un phénomène multi-



La paroi interne de ce cathéter retiré d'un patient est tapisée d'un biofilm.

Invisibles alliés ?

Le tube digestif humain est colonisé par plusieurs milliards de milliards de bactéries appartenant à plusieurs centaines d'espèces différentes. Dans la zone la plus densément peuplée en bactéries, le côlon, on dénombre jusqu'à 10¹¹ bactéries/g de selles [28]. Bien que le sujet soit encore débattu, de nombreux arguments suggèrent que ce microbiote possède la structure d'un biofilm, son analyse en microscopie révélant, en effet, la présence d'agrégats bactériens entourés de matrice extra-

cellulaire [29]. Cette communauté bactérienne est connue pour exercer de nombreux effets positifs sur la santé humaine, parmi lesquels :

- la protection face à la colonisation par des bactéries pathogènes.
- la participation au métabolisme. Le microbiote assure certaines étapes de la digestion et permet la synthèse de vitamines essentielles. La fermentation bactérienne permet également la production de certains acides gras [28].
- la modulation et la maturation du système immunitaire. Le microbiote permet une régula-

tion immunitaire qui réduirait le risque allergique et influerait sur le risque de maladies inflammatoires du tube digestif [28].

• la participation au métabolisme. Le microbiote assure certaines étapes de la digestion et permet la synthèse de vitamines essentielles. La fermentation bactérienne permet également la production de certains acides gras [28].

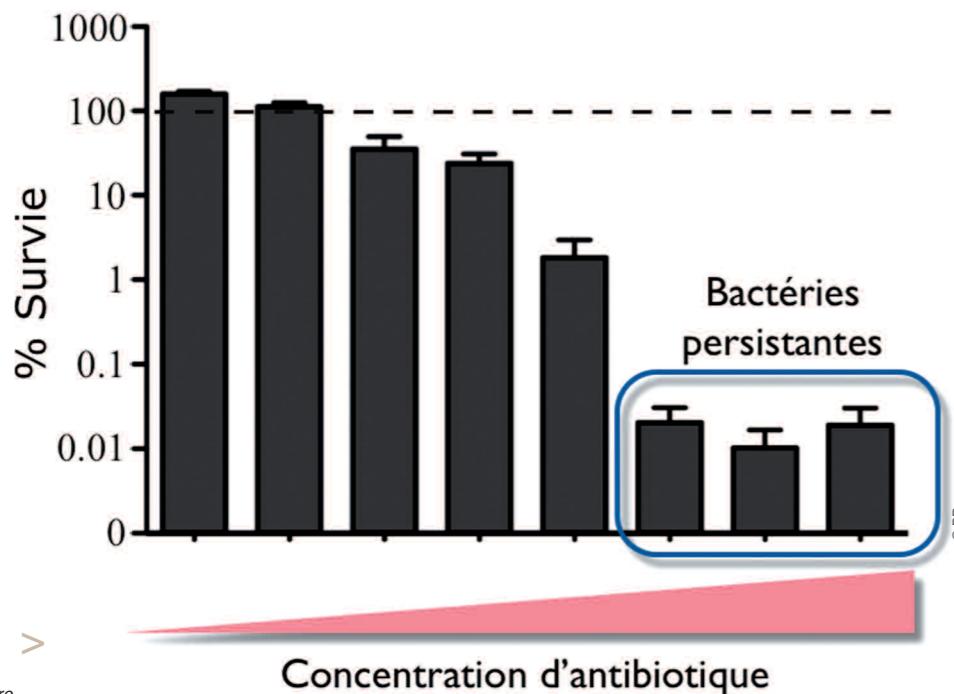
Les facteurs qui altèrent cette flore, les antibiotiques par exemple, peuvent interférer avec ces fonctions [30].

physiologiques bénéfiques. Des bactéries telles que *Clostridium difficile* peuvent causer des infections digestives potentiellement graves en cas de prise préalable d'antibiotiques, du fait de la perte de l'effet barrière du microbiote intestinal.

Des situations similaires ont été décrites au niveau de la flore vaginale et de la plaque dentaire où, sous la forme de biofilms, des communautés bactériennes jouent là aussi un rôle protecteur, en réduisant le risque de colonisation ou d'infection par des agents pathogènes [30].

TRAITEMENTS ACTUELS...

Une fois établies, les infections associées aux biofilms sont donc difficiles à traiter. C'est la raison pour laquelle l'axe thérapeutique privilégié est celui de la prévention. Lors d'un geste chirurgical ou de la pose d'un cathéter, des mesures d'asepsie strictes sont indispensables afin d'éviter qu'une bactérie ne se dépose à la surface du matériel. Ensuite, lors des manipulations, l'entretien d'une sonde urinaire par exemple, des protocoles permettent de réduire le risque de contaminer le circuit, donc d'éviter le développement d'un biofilm. Certains matériaux peuvent être recouverts d'antibiotiques afin d'éviter la fixation d'une bactérie. Malheureusement, l'efficacité de cette stratégie est de courte durée car des composants du sang de l'hôte (protéines, cellules) se déposent progressivement sur la surface du matériau qui, ainsi recouvert, n'est plus protégé



Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Ci-dessus : un biofilm *in vitro* formé avec une bactérie sensible est traité durant 24 heures avec des concentrations croissantes d'antibiotique bactéricide. À partir d'une certaine concentration, le nombre de bactéries survivantes ne diminue plus. Il s'agit des bactéries tolérantes du biofilm. À droite : hypothèses expliquant le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques. D'après (6).

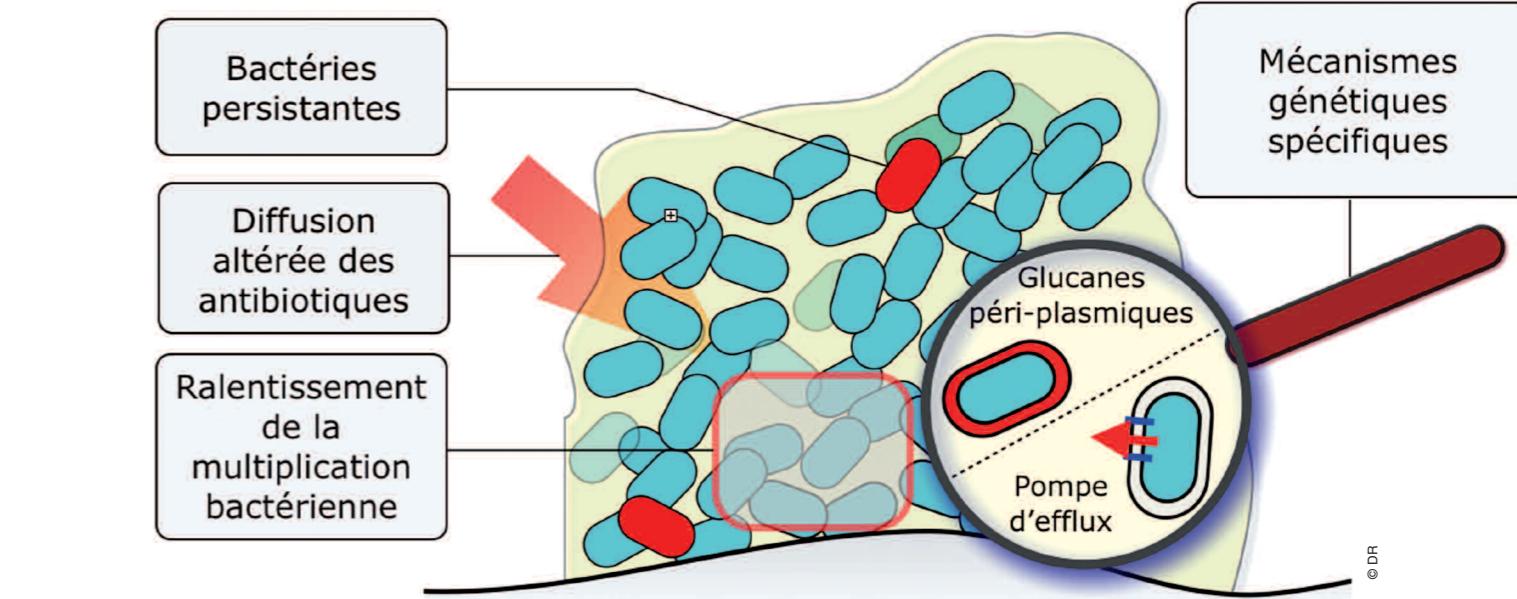
par l'action des antibiotiques. D'autres chercheurs ont proposé d'utiliser des antibiotiques injectés à l'intérieur des cathéters afin d'empêcher la contamination. Mais le danger est alors de favoriser la sélection de bactéries résistantes (18).

Une fois l'infection établie, il est souvent recommandé de retirer le matériel colonisé par le biofilm. Cette mesure est simple si le dispositif est superficiel, comme un cathéter de perfusion dans une veine périphérique, mais la situation est plus complexe s'il s'agit d'un stimulateur cardiaque ou d'une prothèse orthopédique. La procédure de remplacement du matériel peut, en effet, être dangereuse si le patient a besoin du matériel pour assurer, par exemple, un fonctionnement cardiaque correct. Parfois, le danger est surtout fonctionnel, le changement d'une prothèse orthopédique colonisée pouvant conduire à une immobilisation prolongée et retarder le début de la rééducation. Enfin, cette mesure augmente le coût de la prise en charge des patients puisqu'il faut un nouveau dispositif, organiser sa pose et prolonger l'hospitalisation du patient. Ce raisonnement explique le double impact, médical et économique, des infections associées aux biofilms.

Dans certaines situations, un traitement chirurgical partiel peut permettre d'éradiquer une infection associée à un biofilm sans

retirer tout le dispositif. Par exemple, en cas d'infection au niveau d'un matériel de chirurgie orthopédique comme une prothèse articulaire, un traitement conservateur peut être tenté dans certaines situations bien spécifiques. En cas d'infection limitée et prise en charge précocement, il est ainsi possible de procéder à un nettoyage chirurgical complet, de changer la portion amoebique de la prothèse et d'administrer une antibiothérapie prolongée – au moins 12 semaines – avec un taux de succès compris entre 80 et 90 % (19). De même, lorsque l'infection provient d'un cathéter de perfusion, il est possible d'éradiquer l'infection en utilisant de fortes doses d'antibiotiques injectées à l'intérieur du cathéter. Si les indications de ce traitement sont bien sélectionnées, le taux de succès atteint les mêmes proportions (18). Dans ces conditions, le choix de l'antibiotique et des doses utilisées est crucial. Dans certaines situations, comme les infections osseuses ou l'endocardite sur prothèse cardiaque, l'adjonction d'un antibiotique actif sur les bactéries ne se multipliant pas et pénétrant bien dans la matrice extracellulaire augmente les chances de succès du traitement (6).

Quoiqu'il en soit, ces mesures reposent principalement sur l'usage des antibiotiques et sont associées à des risques d'échec variables, en fonction du site de l'infection, du



terrain du patient et de la bactérie responsable. Le développement d'une recherche spécifique menée sur les caractéristiques des bactéries du biofilm a permis de dégager des axes de traitement utilisables en médecine afin de prévenir ou d'éradiquer les infections associées aux biofilms.

... ET À VENIR

La compréhension des étapes conduisant à la formation d'un biofilm ainsi que des mécanismes impliqués dans la tolérance aux antibiotiques a permis de proposer plusieurs axes thérapeutiques.

Inhiber l'adhésion initiale

Le but de cette approche est d'empêcher la bactérie de se fixer à la surface du matériel implanté, donc d'y fonder un biofilm. La connaissance des structures (adhésines) impliquées dans ce phénomène d'adhésion initiale a permis d'élaborer des stratégies empêchant la reconnaissance entre la bactérie et la surface du matériel (8). Il est ainsi possible d'inhiber la production d'adhésine par la bactérie ou l'interaction entre l'adhésine et son substrat grâce à des molécules recouvrant la surface du matériel. D'autres chercheurs proposent de modifier la surface des matériaux implantés en utilisant des surfactants qui en changent les propriétés physico-chimiques (7). Cette approche évite le recours aux

antibiotiques, dont l'efficacité est limitée aux seules bactéries sensibles. Certaines équipes essayent également de mettre au point des vaccins qui permettraient aux patients de produire des anticorps contre ces adhésines. Cette stratégie est en cours d'évaluation après chirurgie cardiaque, par exemple (20).

Brouiller les communications, limiter la maturation

Les bactéries d'un biofilm émettent des signaux pour se tenir informées de la densité de la population bactérienne ou de la quantité de nutriments dans l'environnement. Ce « quorum sensing » contribue à la maturation du biofilm. Des études ont montré que des molécules inhibant ou perturbant ces signaux permettent de lutter contre un biofilm. Chez les patients atteints de mucoviscidose, par exemple, un antibiotique, l'azithromycine, inhibe certains signaux de *quorum sensing* de *P. aeruginosa* et réduit le risque d'infection respiratoire (21).

Favoriser la dispersion

L'objectif de cette approche est de libérer les bactéries du biofilm afin de les rendre planctoniques et qu'elles redévient ainsi sensibles aux antibiotiques et au système immunitaire. Des enzymes, comme la dispersive B ou la DNase I, ont la capacité de favoriser la dispersion des biofilms en dégradant des composants majeurs de la matrice

extracellulaire, comme l'ADN extracellulaire ou certains polysaccharides (22). De plus, l'analyse des signaux émis naturellement par les bactéries du biofilm a permis d'identifier des composés induisant la dispersion, dont certains acides aminés, la nor-spermidine ou le monoxyde d'azote (23-25). La limite de cette approche est qu'elle favorise la libération de bactéries dans la circulation sanguine. Elle ne peut donc s'envisager qu'en association avec des antibiotiques, afin de prévenir la dissémination de l'infection.

Diminuer la tolérance du biofilm

Une fois le biofilm établi, une façon de l'éradiquer sans risquer de libérer des bactéries est de mettre au point un traitement plus efficace contre les bactéries persistantes. Une équipe de l'Université de Boston a ainsi montré qu'en associant une source de carbone – le fructose ou le manitol – et un antibiotique, il est possible de tuer une grande partie des bactéries persistantes d'un biofilm (26). Au cours de ce travail, les chercheurs ont montré que le sucre utilisé stimule des voies métaboliques qui augmentent l'entrée de l'antibiotique dans les bactéries persistantes, conduisant à leur mort. Une autre approche prometteuse, s'appuyant sur l'association d'un antibiotique et d'un chélateur de métaux,

(1) Costerton JW et al. (1978) *Sci Am* 238, 86-95
 (2) Hall-Stoodley L et al. (2004) *Nat Rev Microbiol* 2, 95-108

(3) Hoiby N (1977) *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 1-96

(4) Marrie TJ et al. (1982) *Circulation* 66, 1339-41

(5) Lewis K (2007) *Nat Rev Microbiol* 5, 48-56

(6) Lebeaux D, Ghigo JM (2012) *Med Sci (Paris)* 28, 727-39

(7) Rodrigues LR (2011) *Adv Exp Med Biol* 715, 351-67

(8) Korea CG et al. (2011) *Bioessays* 33, 300-11

(9) Stickler DJ, Morgan SD (2006) *J Med Microbiol* 55, 489-94

(10) Darouiche RO (2004) *N Engl J Med* 350, 1422-9

(11) Maki DG et al. (2006) *Mayo Clin Proc* 81, 1159-67

(12) Sotir MJ et al. (1999) *Infect Control Hosp Epidemiol* 20, 187-91

(13) Habib G et al. (2009) *Eur Heart J* 30, 2369-413

(14) Hoiby N (2011) *BMC Med* 9, 32

(15) Anderl JN et al. (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818-24

(16) Mah TF et al. (2003) *Nature* 426, 306-10

(17) Lewis K (2001) *Antimicrob Agents Chemother* 45, 999-1007

(18) Lebeaux D et al. (2010) *Rev Med Interne* 31, 819-27

(19) Zimmerli W, Moser C (2010) *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 158-68

(20) Pfleum M (2011) *Nat Med* 17, 650-3

(21) Saiman L et al. (2003) *J Am Med Assoc* 290, 1749-56

(22) Fey PD (2010) *Curr Opin Microbiol* 13, 610-5

(23) Barraud N et al. (2009) *J Bacteriol* 191, 7333-40

(24) Kolodkin-Gal I et al. (2012) *Cell* 149, 684-92

(25) Kolodkin-Gal I et al. (2010) *Science* 328, 627-9

(26) Allison KR et al. (2011) *Nature* 473, 216-20

(27) Chauhan A et al. (2012) *Antimicrob Agents Chemother* 56, 5310-8

(28) Guarner F (2006) *Digestion* 73 Suppl 1, 5-12

(29) Palestro D et al. (2004) *Ultrastruct Pathol* 28, 23-7

(30) Jakubovics NS (2010) *Mol Oral Microbiol* 25, 4-14