



HAL
open science

Staphylococcus aureus résistant à la métiline et formation de biofilm au cours de la mucoviscidose. Importance, influence des conditions environnementales et stratégies anti-biofilm

Pauline Sorlin

► **To cite this version:**

Pauline Sorlin. Staphylococcus aureus résistant à la métiline et formation de biofilm au cours de la mucoviscidose. Importance, influence des conditions environnementales et stratégies anti-biofilm. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-04417028

HAL Id: dumas-04417028

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04417028v1>

Submitted on 25 Jan 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

MEMOIRE
En vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

THESE

pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenus le 14 octobre 2022

Par

Pauline SORLIN

Interne en Pharmacie de l'INTERREGION SUD

TITRE DU MEMOIRE :

***Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et formation de biofilm
au cours de la mucoviscidose**
Importance, influence des conditions environnementales et stratégies anti-biofilm

JURY :

Présidente et Directrice de thèse :

Pr Hélène MARCHANDIN, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Université de Montpellier

Membres du jury :

Pr Christine ROQUES, Professeur des Universités émérite – Ancien Praticien Hospitalier,
Université de Toulouse

Dr Catherine DUNYACH-REMY, Praticien Hospitalier, CHU de Nîmes

Dr Raphaël CHIRON, Praticien Hospitalier, CHU de Montpellier

Dr Quentin MENETREY, Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche, Université de Lille

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Madame le Professeur Hélène Marchandin pour son soutien, son implication, sa bienveillance et son accompagnement tout au long de ce cursus d'internat. Vos qualités humaines et professionnelles sont pour moi un exemple à suivre et un objectif à atteindre. J'ai appris beaucoup à vos côtés et les mots me manquent pour vous exprimer toute ma gratitude. Vos précieux conseils m'ont permis de grandir, progresser et devenir au fil des ans un meilleur professionnel de santé.

Je remercie Madame le Professeur Estelle Jumas-Bilak pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses conseils avisés et sa gentillesse.

Je souhaite également remercier vivement et exprimer ma sincère reconnaissance aux membres du jury.

Au Professeur Christine Roque, je vous adresse mes profonds remerciements pour avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de votre présence en tant que membre du jury.

Au Docteur Catherine Remy je tiens à exprimer ma gratitude. Merci pour ton soutien, ton écoute, ta bienveillance et ton implication tout au long de ce projet.

Au Docteur Quentin Menetrey, merci pour tous tes conseils, ta gentillesse et ce périple à Rotterdam. Travailler à tes côtés a été un réel plaisir et une chance. J'ai beaucoup appris à tes côtés.

Au Docteur Raphaël Chiron, je vous remercie pour cette collaboration, votre gentillesse et de me faire l'honneur de votre présence en tant que membre du jury.

Merci à Monsieur le Professeur Pierre-Antoine Bonnet pour son engagement au sein de la filière IPR et son suivi tout au long de ces années.

Un grand merci au Dr Cassandra Pouget. Merci pour ta collaboration dans ce projet, de m'avoir intégré dans cette nouvelle équipe, d'avoir répondu avec bienveillance à mes questions et merci pour nos discussions très enrichissantes.

Merci au Docteur Agathe Boudet pour notre partenariat et ton soutien dans cette période difficile troublée par la COVID.

Un grand merci au Docteur Alix Pantel. Merci pour ta bonne humeur, ton moral toujours positif et ton écoute. Je tiens à exprimer mon profond respect et ma grande gratitude au Docteur O'Callaghan, directeur du laboratoire U1047. Thank you sincerely for allowing me to be a part of your team. I learned a lot and I really felt integrated. I even took the lab's sense of humor. Thank you for your kindness and especially for not making fun on my great Franglais accent.

Je remercie le Docteur Anne Keriél et le Docteur Annette Vergunst. A big thank you for your listening and your wise advices, especially during the presentations we made in the laboratory.

Merci à Alex, Koko, Théo, Johan et Benjamin vous êtes extraordinaires. Vous avez été mon rayon de soleil nîmois. J'ai adoré nos conversations et nos échanges animés concernant tous les sujets allant des sciences à

la philosophie.

Merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire de la faculté de Pharmacie qui ont toujours été présents pour m'aider dans une bonne ambiance de travail.

Je remercie Mylène, Fabien, Stefaniya, Sara, Chloé, Patricia, Isabelle et Agnes pour leur soutien et leur partage de connaissances.

Je tiens aussi à remercier mes chers parents de m'avoir toujours soutenue malgré les épreuves de la vie et ce depuis ma naissance. Votre soutien et votre amour m'ont permis d'affronter tous les obstacles.

Merci également à mon âme sœur de partager ma vie, de me supporter au quotidien surtout après les gardes et d'être à mes côtés pour le meilleur et pour le pire. Je suis la personne la plus chanceuse du monde de t'avoir rencontré. Tu es la force qui me pousse dans les moments difficiles et qui me permet de tenir toujours contre vents et marées.

Je remercie mes chers amis. Amis d'enfance, amis de toujours. Rencontre d'un jour, rencontre d'une vie. Vous avez forgé la personne que je suis aujourd'hui. Je remercie particulièrement Morgan, pour ta bonne humeur, ces moments partagés dans le groupe D, dans les parcs et lors de nos voyages. J'ai hâte de partir avec toi pour de nouvelles aventures intrépides. Mon extraordinaire nonome Killian, avec qui j'ai traversé ces années de pharmacie, merci pour tout et pour être toujours drôle et présent même dans les moments difficiles. Ces années de pharmacie n'auraient pas été pareilles sans toi. Merci à George pour toutes ces années, ton soutien et pour notre complicité. Nous avons affronté notre PACES ensemble et tu as toujours été là pour moi. Merci pour tout. Merci à Charline ma super colocataire et amie. Tu as su rendre ces mois de confinement ludiques et fun. Je n'oublie pas nos entraînements de sport. Promis je m'y remets après la thèse. Un énorme merci à Cyrielle la meilleure nonome du monde, merci pour ton soutien, ton aide, ta gentillesse, tu es géniale. Je suis vraiment fière et heureuse de te compter parmi mes amies. Je remercie également ma chère stagiaire et amie Emilie Brivet.

Enfin je conclue ces remerciements avec une pensée pour mes co-internes. Que dire de nos longues parties de babyfoot à Saint Eloi. C'est un vrai plaisir de travailler avec vous et de gagner avec vous Floriane, Antoine, Maëlyss et Guilhem. Merci pour votre bonne humeur au quotidien.

Un grand merci également aux deux meilleurs et vaillants techniciens Nicolas et Théo. Je me remémore nos aventures insolites et toutes nos soirées. Merci pour ces fous rires et ces joies, surtout ne changez pas.

Table des matières

Table des matières	5
Liste des abréviations	7
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux	12
Introduction	13
1 Partie I Etude bibliographique.....	15
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> , SARM et mucoviscidose (CF)	15
1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM)	17
1.1.3 Mucoviscidose et SARM.....	19
1.2 Production de biofilm	23
1.2.1 Présentation générale du biofilm bactérien	23
1.2.2 Production de biofilm en contexte CF et adaptation à l'environnement	28
1.2.3 Détection du biofilm.....	29
1.3 Approche antibiofilm	33
2 Partie II Etude expérimentale.....	38
2.1 Présentation de l'étude	38
2.1.1 Objectif de l'étude	38
2.1.2 Présentation de l'étude.....	39
2.1.3 Patients, souches et milieux de culture	41
2.1.4 Présentation des antibiotiques testés.....	42
2.2 Méthodes utilisées au cours de l'étude	44
2.2.1 Technique de génotypage	44
2.2.1.1 Multi Locus Sequence Typing	44
2.2.1.2 Séquençage génomique complet ou Whole genome sequencing (WGS).....	45
2.2.2 Utilisation de méthodes innovantes d'étude de la formation de biofilm.....	47

2.2.2.1	Détermination de l'adhésion précoce bactérienne par Biofilm Ring Test® (BRT®)	47
2.2.2.2	Observation de l'efficacité anti biofilm des antibiotiques par la technique de l'antibiofilmogramme® et sa mise en œuvre	48
2.2.2.3	Evaluation de la production dynamique de biofilm par le BioFlux™ 200.....	49
2.3	Principaux résultats obtenus	51
2.3.1	Diversité génétique des souches de SARM.....	51
2.3.2	Validation du milieu ASM filtré pour son utilisation avec le BRT®.....	53
2.3.3	Évaluation des phases précoces de la formation de biofilm à l'aide du BRT®	56
2.3.4	Influence des antibiotiques sur la formation de biofilm des SARM	58
2.3.4.1	Effet des antibiotiques sur la production de biofilm des SARM par la technique de l'ATB	58
2.3.4.2	Etude longitudinale des SARM issus de 4 patients atteints de mucoviscidose	59
2.3.4.3	Dynamique de formation de biofilm sous flux en présence et absence d'antibiotiques.....	61
2.4	Discussion.....	63
2.4.1	Le biofilm, un élément de persistance fréquent chez les souches de SARM isolées de patients CF	63
2.4.2	Caractéristiques moléculaire et génomique des souches de SARM isolées de patients CF.....	64
2.4.3	Le milieu ASM : caractéristiques et intérêts	64
2.4.4	L'Antibiofilmogramme, un outil prometteur.....	66
2.4.5	Colonisation persistante et adaptation des souches de SARM à leur environnement au cours d'infections chroniques en contexte CF	67
2.5	Article publié sur le sujet de thèse	69
3	Conclusion et perspectives	88
4	Bibliographie.....	89
5	Annexe	105
5.1	Poster présenté lors du congrès de l'ECFS 2021	105
5.2	Composition du milieu ASM.....	106

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	Acide désoxyribonucléique extracellulaire
ADNr 16S	ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S
Agr	Accessory gene regulator
AIP	Auto Inducer Peptide
ARN	Acide ribonucléique
ATBF	Antibiofilmogramme®
B4k	Benzylaniline 4K
<i>Bap</i>	Biofilm associated protein
Bbp	Bone sialo binding protein
<i>Bc</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BFI	Index de Formation de Biofilm
BHI	Bouillon Brain Heart Infusion (Bouillon Coeur-Cervelle)
BRT ®	Biofilm Ring Test®
CC	Complexe Clonal
CCpA	Carbon catabolite protéine A
CF	Cystic Fibrosis (Mucoviscidose)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CifA, CifB	Clumping Factor A et B
CMib	Concentration Minimale Inhibitrice au sein d'un biofilm
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Cna	Collagen adhesin
CRCM	Centre de Ressource et de Compétence de la Mucoviscidose
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Extracellular Polymeric Substance
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FnbpA,B	Fibronectin-Binding Proteins A et B
GTS	Gélose Trypticase Soja
IAS	Infections Associées aux Soins
Ica	Intracellular adhesin

JH	Journée d'Hospitalisation
JP	Polysaccharide du Jujubier
<i>La</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LB	Milieu Luria-Bertani
LBA	Liquide de Lavage Broncho-Alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
LPV	Leucocidine de Panton Valentine
LPVS	Large Pale Variants
<i>Ma</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>
MLST	Multilocus Sequence Typing
MSCRAMM	Microbial Surface Component Reconizing Adhesive Matrix Molecules
NCF	Non cystic fibrosis : Non atteint de mucoviscidose
NR	Non Renseigné
<i>Pa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PLP	Protéine Liant les Pénicillines
<i>Pp</i>	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
PSM	Phenols Solubles Modulins
QS	Quorum Sensing
ROS	Reactive Oxygen Species : espèce réactive de l'oxygène
<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sar	Staphylococcal accessory regulator
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Méthicilline
SCV	Small Colony Variant
Sdr C, D, E	Serine-aspartate repeat-containing protein C, D, E
SigB	Sigma alternatif B
<i>Sm</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Spa	Staphylococcal Protein A : Protéine A de <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>SrrAB</i>	<i>Staphylococcal respiratory response regulator</i>

ST	Sequence Type
TS	Milieu Trypticase Soja
TSG	Milieu Trypticase Soja Glucosé
TSGN	Milieu Trypticase Soja additionné de Glucose et de Sodium
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
WGS	Whole Genome Sequence
WV	White Variant

Liste des figures

Figure 1 : Principaux facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> (Lowy et al., 1998).....	16
Figure 2 : Densité d'incidence globale française de souches de SARM pour 1000 journées d'hospitalisation (JH) entre 2002 et 2018, (source modifiée d'après BMR-Raisin 2018, analyse Spares)	18
Figure 3 : Répartition des souches de SARM isolées dans 411 établissements français en 2018 par type d'échantillon (Etude BMR-Raisin 2018, analyse Spares)	18
Figure 4 : Epithélium pulmonaire de patients non atteints de mucoviscidose (A) et de patients atteints de mucoviscidose (B et C) (selon Sonneville et al., 2015).....	20
Figure 5 : Evolution du pourcentage de patients atteints de mucoviscidose colonisés par des SARM durant une période de 10 ans en France (données modifiées issues du registre français de la mucoviscidose de 2021).....	21
Figure 6 : SARM isolés des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose par classe d'âge (d'après le registre français de la mucoviscidose 2021).....	22
Figure 7 : Biofilm de SARM sur un support en titane par microscopie électronique à balayage (Boyle et al., 2018).....	23
Figure 8 : Etapes de formation et de dispersion d'un biofilm bactérien (d'après Pouget et al., 2020)	24
Figure 9 : Étapes de formation de biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> sur cathéter, visualisées par microscopie électronique à balayage. (Rebiahi et al., 2014).....	24
Figure 10 : Régulation de la formation de biofilm.	26
Figure 11 : Schéma du dispositif de réacteur à biofilm (d'après Goeres et al., 2009)	32
Figure 12 : Schéma du dispositif de réacteur suspendu (Azeredo et al., 2017).....	32
Figure 13 : Représentation des approches antibiofilm de <i>Sa</i>	36
Figure 14 : Présentation des étapes de l'étude en lien avec le plan de thèse.....	39
Figure 15 : Différents milieux de cultures utilisés en fonction des manipulations réalisées.....	42
Figure 16 : Différentes étapes du séquençage total du génome bactérien.....	46
Figure 17 : Technologie du Biofilm Ring Test® Source http ://www.biofilmcontrol.com/fr/la-technique/ ..	48
Figure 18 : Dispositif microfluidique BioFlux™ 200 permettant d'observer la formation dynamique de biofilm (source modifiée Pouget et al., 2021).	50
Figure 19 : Répartition des Sequences Types (ST) des 63 souches étudiées	52
Figure 20 : Nombre de SNP entre des paires de souches de SARM isolées chez 4 patients colonisés chroniquement. I.I : intervalle d'isollements pour chaque couple de souches	53
Figure 21 : Comparaison de la croissance bactérienne de la souche de SARM CF 5.3 dans le milieu BHI, l'ASM et l'ASM filtré à 0,22 µm durant une période de croissance de 24 heures	54

Figure 22 : Comparaison de la croissance bactérienne de la souche 6.4 de SARM CF dans le milieu BHI, l'ASM et l'ASM filtré à 0,22 µm durant une période de croissance de 24 heures	54
Figure 23 : Comparaison de la croissance bactérienne de la souche 17.6 de SARM CF dans le milieu BHI, l'ASM et l'ASM filtré à 0,22 µm durant une période de croissance de 24 heures	55
Figure 24 : Comparaison des index de formation de biofilm (BFI) des témoins négatifs en fonction du milieu de culture et du temps	55
Figure 25 : Comparaison du BFI déterminé par le BRT® selon le milieu de culture pour 2 souches de SARM CF après une incubation de 4h à 37 °C.	56
Figure 26 : Distribution des 63 souches de SARM CF au sein de 3 groupes.....	57
Figure 27 : Sensibilité des souches selon la valeur de la CMI et de la CMib	59
Figure 28 : Chronologie de colonisation des patients CF 5,6, 17 et 18 par les souches de SARM étudiées ..	60
Figure 29 : Poster commenté lors du 44 ème congrès de l'European Cystic Fibrosis Society (ECFS).	105

Liste des tableaux

Tableau 1 : Descriptif des techniques de détection du biofilm (d'après Azeredo et al., 2017)	29
Tableau 2 : Amorces utilisées pour l'amplification des 7 gènes de ménage du schéma MLST de S. aureus (Enright et al., 2000).....	44
Tableau 3 : Concentration des gammes de dilution d'antibiotiques utilisées.....	49
Tableau 4 : Valeur des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) critiques définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) pour les antibiotiques suivants : linézolide, rifampicine, triméthoprime, ceftaroline et ceftobiprole.	58
Tableau 5 : Composition de l'Artificial Sputum medium (Sriramulu et al., 2005)	106

Introduction

La mucoviscidose (Cystic Fibrosis CF) est une maladie génétique à transmission autosomique récessive touchant en 2021, 7513 patients en France (Registre français de la mucoviscidose 2021). Il s'agit de la maladie génétique encore mortelle la plus fréquente dans les populations caucasiennes. Elle résulte de la mutation du gène codant pour le canal transmembranaire CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Une variété importante de mutations de ce gène a été identifiée, parmi lesquelles la principale en France est la mutation $\Delta F508$ identifiée pour 83,1% des patients (Registre français de la mucoviscidose 2021).

La protéine CFTR permet le passage d'ions chlorures à travers les membranes cellulaires. Lorsque le gène codant cette protéine est muté, le passage des ions à travers la membrane cellulaire est altéré, entraînant un déséquilibre ionique entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. Différents organes sont alors impactés notamment les poumons au niveau desquels un épaissement du mucus pulmonaire et une modification de la clairance mucociliaire favorisant la stase bactérienne sont observés (Rumpf et al., 2021). Ces altérations associées à la réduction des défenses immunitaires locales sont propices aux infections respiratoires actuellement considérées comme polymicrobiennes au cours de la mucoviscidose (Rogers et al., 2004).

Les espèces colonisant les patients diffèrent selon l'âge mais de manière générale, le microbiote pulmonaire est dynamique et une diminution de diversité corrélée à une augmentation des exacerbations pulmonaires en fonction du temps sont observées chez les patients CF (Caverly et LiPuma., 2018, Lamoureux et al., 2019).

Staphylococcus aureus (*Sa*) est l'espèce bactérienne majoritairement isolée jusqu'à l'âge de 20 ans (Registre français de la mucoviscidose, 2021). La prévalence de cette bactérie en Europe chez les patients CF est de 34,34% chez les enfants et 37,12% chez les adultes, (Van Rens et al., 2020). Elle peut être la cause d'exacerbation pulmonaire et persister provoquant des infections chroniques (Lamoureux et al., 2019). Au cours d'une infection chronique, *Sa* s'adapte à son environnement et interagit avec les autres microorganismes présents au sein du mucus plus visqueux présent au cours de la CF.

Parmi les souches de *Sa*, la prévalence des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) est particulièrement hétérogène selon les pays du monde. En effet, en France, la proportion de patients CF colonisés par un SARM est de 4,7% (Registre français de la mucoviscidose- Bilan des données 2021) alors qu'aux Etats-Unis, il est estimé, en 2019, que 25% des patients CF ont eu au moins une colonisation à SARM au cours de l'année (Rumpf et al., 2021). La persistance de ces souches chez certains patients va définir une infection chronique et la colonisation par une souche de SARM est associée à un déclin important de la fonction respiratoire des patients CF (Rumpf et al., 2021). Ces souches sont très difficiles à éradiquer de par

leur capacité d'adaptation à l'hôte, leur multirésistance aux antibiotiques (Vanderhelst et al., 2012) mais également par leur capacité à former du biofilm (Hirschhausen et al., 2013). Le biofilm bactérien agit comme une barrière protectrice limitant l'action des antibiotiques et favorisant la persistance des SARM dans le tractus respiratoire des patients CF.

De manière plus générale, la capacité de *Sa* à former du biofilm est une préoccupation majeure lors de diverses infections, notamment les infections liées aux cathéters mais aussi les infections osseuses faisant suite à des chirurgies (Miquel et al., 2016, Turner et al., 2020). Identifier des stratégies anti-biofilm qui pourraient faire partie des approches thérapeutiques, préventives ou curatives, de ces infections est devenu une priorité et de nombreuses techniques ont été développées dans le but d'évaluer l'activité de diverses molécules (naturelles ou synthétiques) sur la formation de biofilm mais aussi sur du biofilm déjà formé. Evaluer l'action anti-biofilm des antibiotiques fait partie intégrante de cette démarche.

Dans ce contexte, les travaux présentés visent à synthétiser (partie 1) et à compléter (partie 2) les connaissances acquises à ce jour sur la formation de biofilm par les souches de SARM en contexte de mucoviscidose.

Dans une première partie, seront tout d'abord présentées des données générales sur *S. aureus*, SARM et leur implication au cours de la mucoviscidose, la formation de biofilm et les stratégies anti-biofilm.

Dans une seconde partie sera présentée une étude expérimentale conduite sur des isolats de SARM de patients atteints de CF. Dans cette étude, nous avons évalué la proportion de souches capables de former du biofilm précoce puis l'effet de cinq antibiotiques sur cette formation de biofilm. Nous avons utilisé des approches standardisées comme le BioFilm Ring test® (Chavant et al., 2007, Ren et al., 2007) et le système microfluidique BioFlux™ 200 (Benoit et al., 2010) qui ont été adaptées pour être utilisées avec l'Artificial Sputum Medium (ASM), un milieu de croissance synthétique contenant de la mucine (Sriramulu et al., 2005, Dinesh., 2010). Enfin, la capacité à former du biofilm en présence ou en l'absence d'antibiotiques a été étudiée pour des souches isolées successivement chez plusieurs patients CF chroniquement colonisés. La comparaison des résultats obtenus pour des souches isolées à plusieurs années d'intervalle nous a permis d'appréhender les modifications pouvant survenir au cours de l'adaptation des souches au poumon CF lors d'une colonisation persistante.

1 Partie I Etude bibliographique

1.1 *Staphylococcus aureus*, SARM et mucoviscidose (CF)

1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*Sa*), connu également sous le nom de staphylocoque doré, est un coque à Gram positif, le plus souvent disposé en amas. Il s'agit d'une bactérie non exigeante qui pousse sur des milieux de culture non sélectifs. Cette bactérie est ubiquitaire grâce à son type respiratoire aéro-anaérobie facultatif qui lui permet d'être présente dans le microbiote cutanéomuqueux en aérobiose (Roberts et al., 2005) mais également au sein des tissus mal oxygénés comme ceux de plaies profondes (Turner et al., 2020).

Elle est portée par 20% de la population générale au niveau des voies respiratoires (fosses nasales majoritairement).

Sa peut également être un pathogène opportuniste, responsable d'infections diverses (infections suppuratives, toxi-infections) (Tong et al., 2015, Turner et al., 2020). Ces infections sont liées à la production de facteurs de virulence tels que des toxines ou des molécules d'adhésion.

En effet, *Sa* est notamment capable de sécréter des exoenzymes avec une activité de protéase, hyaluronidase, collagénase, lipase, élastase ou encore de nucléase. Ces exoenzymes participent à la destruction des tissus de l'hôte ce qui favorise l'extension de l'infection et l'extraction de nutriments utiles pour la bactérie.

Sa produit également une coagulase qui favorise la formation d'un thrombus septique et la dissémination hématogène de l'infection. De nombreuses hémolysines sont sécrétées comme les hémolysines α , β , et δ . Celles-ci ont la propriété de lyser les érythrocytes. Les hémolysines α et δ entraînent la formation de pores alors que l'hémolysine β est une sphingomyélinase c'est-à-dire qu'elle clive les sphingomyélines en phosphocholine et céramide (Dinge et al., 2000).

D'autre part, *Sa* est également capable de sécréter des leucocidines comme la leucocidine de Pantone Valentine (LPV) qui se structure en deux composants peptidiques que sont les composants S et F respectivement codés par les gènes luk-S-PV et Luk-F-PV. La LPV appartient à la famille des «pore forming toxins». La principale cible de la LPV est le polynucléaire neutrophile (PNN). Avant la lyse du PNN, la LPV l'active. Cette activation a pour conséquence la libération de molécules chimiotactiques comme l'interleukine 8 et le leucotriène B4. Ceci est responsable d'une nécrose tissulaire et de la formation d'abcès à l'origine d'infections invasives sévères (Aktas et al., 2013).

D'autres toxines peuvent également être sécrétées par *Sa* comme les exfoliatines. Les exfoliatines (ETS) A et B ont pour cible la desmogléine 1 (Ladhani et al., 2003). Cette glycoprotéine du desmosome est impliquée dans l'adhésion intercellulaire au sein du derme superficiel. Le clivage de la desmogléine-1 par les ETS interrompt les ponts intercellulaires provoquant des érythrodermies bulleuses comme le syndrome de Ritter (Grama et al., 2016).

Parmi les autres types de toxines sécrétées par *Sa*, deux ont des propriétés superantigéniques. Ce sont les entérotoxines (SE) et la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) (Figure 1). Les SE majoritairement à l'origine de symptômes gastro-intestinaux sont les SEA, SEB et SEC.

Les SE et la TSST-1 provoquent un relargage massif de cytokine de type TH-1 (Defres et al., 2009).

D'autres facteurs de virulence sont liés à la paroi bactérienne comme la protéine A (Peng et al., 1988), (Figure 1). Cette protéine est exprimée très précocement pendant la phase exponentielle de croissance bactérienne alors que les exoprotéines sécrétées comme les toxines et les enzymes sont synthétisées pendant la phase post exponentielle (Figure 1). Cette expression diphasique des exoprotéines est sous la dépendance d'un locus régulateur nommé *agr* (accessory gene regulator) (Peng et al., 1988).

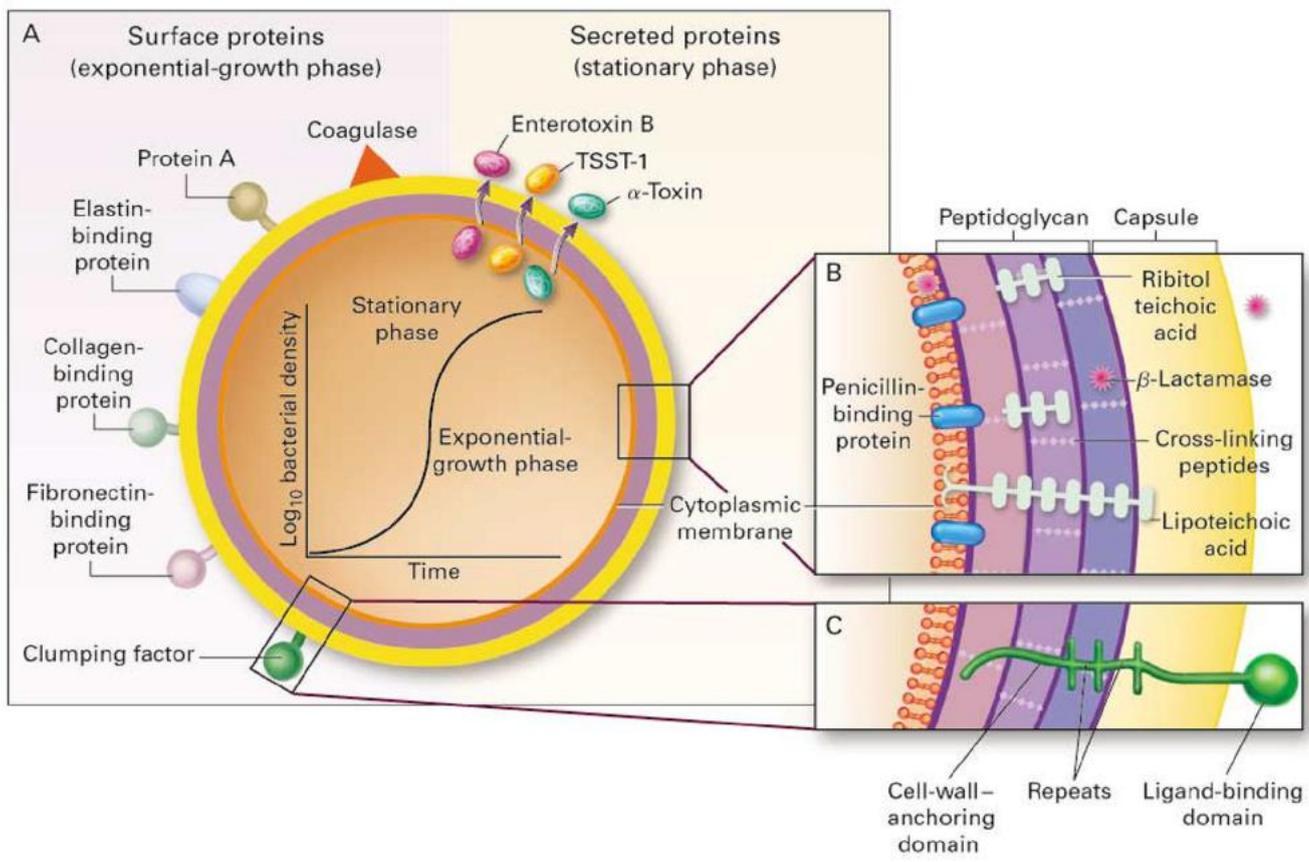


Figure 1 : Principaux facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Lowy et al., 1998)

Outre ces facteurs de virulence, des facteurs de persistance vont contribuer à l'établissement de colonisations chroniques chez les patients CF. La production de biofilm que nous aborderons en paragraphe 1.2.1 et

l'acquisition de gènes de résistances aux antibiotiques sont notamment des facteurs de persistance majeurs. Parmi l'important nombre des résistances pouvant être acquises par *Sa*, nous retrouvons la résistance à la méthicilline, une β -lactamine. Cette résistance donne son nom à un staphylocoque doré le plus souvent multirésistant aux antibiotiques : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou SARM.

1.1.2 *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)

De manière naturelle les *Sa* possèdent des Protéines liant les pénicillines (PLP). Ces PLP sont la cible de la méthicilline et plus généralement des β -lactamines. La résistance à la méthicilline est développée suite à l'acquisition du gène *mecA* ou du gène *mecC* présent au sein d'une cassette appelée « staphylococcal cassette chromosome *mec* » (SCC*mec*), (Deurenberg et al., 2007, Turlej et al., 2011). Ces gènes codent respectivement pour la PLP2a et la PLP2c qui sont des PLP additionnelles servant de leurre puisqu'elles ne se lient pas à la méthicilline. L'antibiotique ne peut alors plus se lier à sa cible, l'affinité est diminuée et il y a une perte d'efficacité de l'antibiotique.

La résistance à la méthicilline est recherchée par l'utilisation d'une céphalosporine de 2^{ème} génération : la céfoxitine lors de la réalisation de l'antibiogramme. La souche de *Sa* est dite résistante à la méthicilline si la concentration minimale inhibitrice de la céfoxitine est supérieure à 4 mg/L ou si le diamètre d'inhibition autour d'un disque de céfoxitine (30 μ g) est inférieur à 22 mm (CA-SFM 2022). La détection de ce mécanisme de résistance est très importante puisque « les souches de *Sa* résistantes à la céfoxitine ou possédant un gène *mec* additionnel (*mecA*, *mecC*) ou exprimant une PLP2 additionnelle (PLP2a, PLP2c) après induction par une β -lactamine, doivent être interprétées résistantes à toutes les β -lactamines (pénicillines associées ou non à un inhibiteur de β -lactamase, céphalosporines et carbapénèmes), sauf à la ceftaroline et au ceftobiprole qui possèdent une activité sur les SARM, mais leur activité doit être testée séparément » (CA-SFM, 2022).

La dissémination des SARM est un problème de santé publique et un enjeu majeur avec des incidences supérieures à 20% dans 85 états parmi 193 états membres (44%) selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Álvarez et al., 2019).

Le réseau européen *European Antimicrobial Resistance Surveillance-Network* (EARS) rapporte une prévalence de SARM en Europe (pour tout type d'infection) égale à 16,7% en 2020 (moyenne pondérée par la population des pays participants) (données EARS-Net, 2020). D'autre part, en France, la prévalence des SARM (12,1%) se situe sous la moyenne européenne et poursuit la diminution observée depuis 2001 (Données 2018, réseau BMR Raisin). De même, l'incidence globale des SARM en France au sein des hôpitaux diminue (Figure 2) (Données 2018, réseau BMR Raisin).

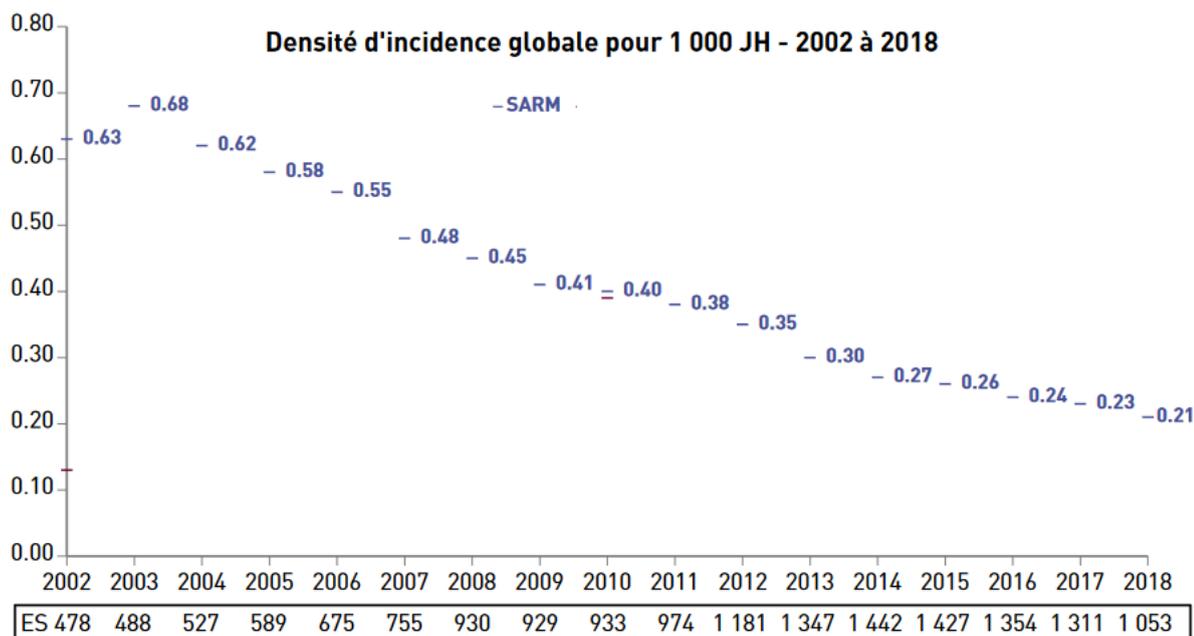


Figure 2 : Densité d'incidence globale française de souches de SARM pour 1000 journées d'hospitalisation (JH) entre 2002 et 2018 (478 établissements participant à l'étude en 2002 versus 1053 en 2018), (source modifiée d'après BMR-Raisin 2018, analyse Spares)

Les SARM sont isolés principalement à l'hôpital dans différents types d'échantillons. En 2018, parmi les SARM isolés dans 411 établissements hospitaliers, 20,4% provenaient d'échantillons respiratoires dont 14,8% d'échantillons respiratoires non protégés (crachats) et 5,6% d'échantillons respiratoires protégés (Liquide de lavage Broncho Alvéolaire, LBA) (Figure 3).

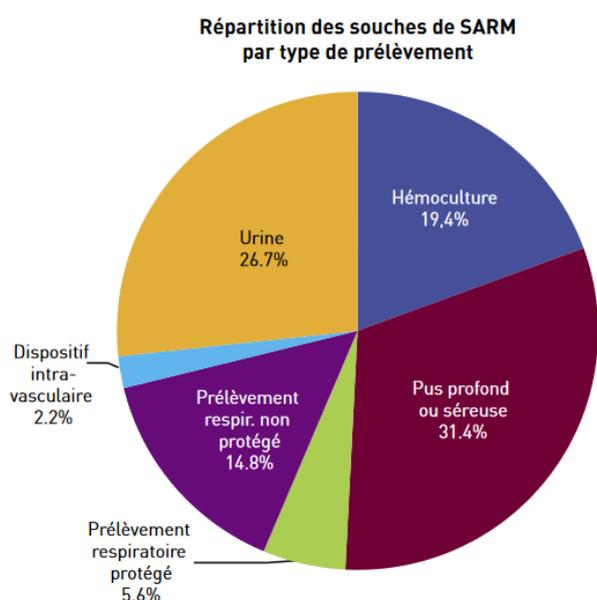


Figure 3 : Répartition des souches de SARM isolées dans 411 établissements français en 2018 par type d'échantillon (Etude BMR-Raisin 2018, analyse Spares)

La composante respiratoire de cette répartition est donc importante et les infections par SARM peuvent être la résultante d'infections pulmonaires chroniques (par exemple la maladie pulmonaire obstructive chronique) ou la résultante de pneumonies.

La pneumonie à SARM peut être primaire lorsque l'infection est localisée au sein des poumons, mais elle peut également être dite secondaire lorsqu'elle est liée à une propagation hématogène vers les poumons à partir d'un autre foyer infectieux comme une endocardite ou une infection articulaire. Qu'elles soient primaires ou secondaires, les pneumonies à SARM sont particulièrement virulentes (Defres et al., 2009). La pathogénicité de ces souches s'avère décuplée lorsqu'elles colonisent des patients immunodéprimés et les patients atteints de mucoviscidose (Akil et Muhlebach., 2018).

1.1.3 *Mucoviscidose et SARM*

La mucoviscidose est définie par la mutation du gène *cftr*. Ce gène code pour la protéine CFTR qui est un canal transmembranaire faisant partie des transporteurs ABC. Cette protéine présente au niveau apical des cellules épithéliales du poumon mais aussi d'autres organes comme le foie, l'intestin grêle, les appareils reproducteurs et la peau, est responsable du transport des ions chlorures à travers la membrane plasmique des cellules épithéliales (Fuller et al., 1992). Cette protéine joue également un rôle dans le transport des ions bicarbonates (Childers et al., 2007). Ceux-ci sont nécessaires à la réticulation des mucines permettant une clairance mucociliaire fonctionnelle (Saint-Criq et Gray., 2017). Une mutation du gène *cftr* entraîne une altération de cette clairance induisant une stase du mucus propice aux colonisations bactériennes pouvant être sporadiques mais aussi chroniques (Sonneville et al., 2015), (Figure 4). La chronicité est définie par « l'obtention de plus de 50% de prélèvements positifs lors des douze derniers mois comprenant quatre prélèvements pendant cette période » (Registre français de la mucoviscidose, Données 2021).

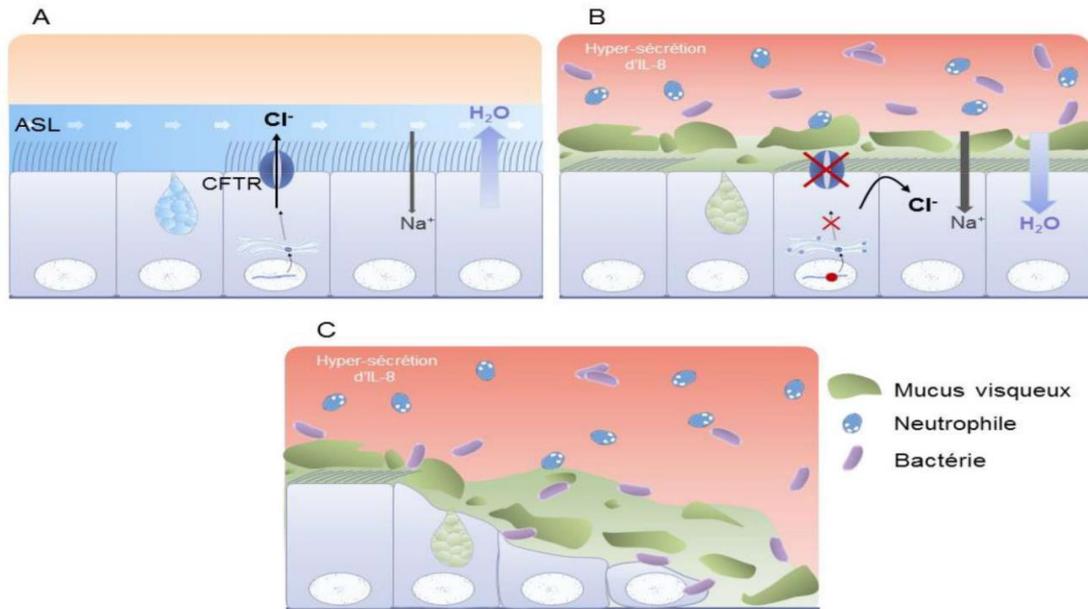


Figure 4 : Epithélium pulmonaire de patients non atteints de mucoviscidose (A) et de patients atteints de mucoviscidose (B et C). ASL : liquide de surface des voies aériennes. Selon Sonneville et al., 2015

En France, en 2021, 4,7% des patients atteints de mucoviscidose étaient porteurs de SARM au niveau pulmonaire et 2,7% des patients étaient colonisés par un SARM de manière chronique (Registre français de la mucoviscidose, 2021).

En comparaison, aux Etats-Unis en 2018, 27% des patients CF étaient porteurs de SARM (Akil et al., 2018). La souche la plus fréquemment impliquée est une souche clonale appelée USA300 (Goss et al., 2011, Akil et al., 2018). En revanche, en France et en Europe, les souches de SARM infectant les patients CF restent peu caractérisées au plan génétique (Molina et al., 2008).

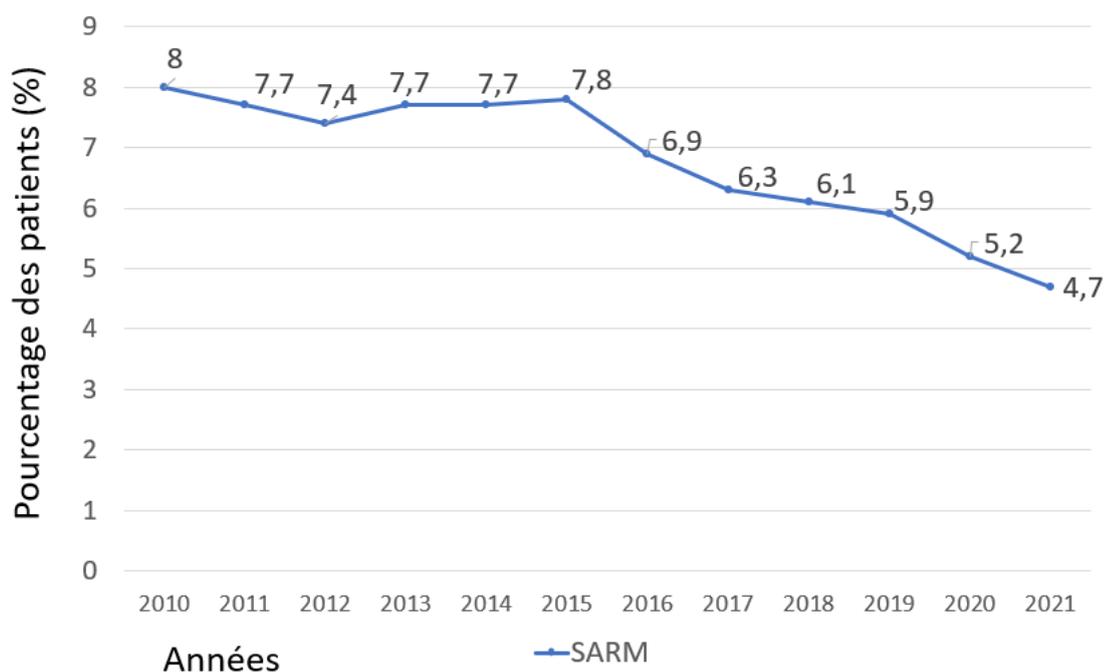


Figure 5 : Evolution du pourcentage de patients atteints de mucoviscidose colonisés par des SARM durant une période de 10 ans en France (données modifiées issues du registre français de la mucoviscidose de 2021)

Nous pouvons toutefois observer en figure 5, une diminution progressive de la prévalence des patients CF colonisés par SARM en France en onze ans. Cette prévalence est estimée en 2021 à 4,7% (8% en 2010) (Figure 5). Cependant, cette prévalence est différente selon l'âge du patient. En effet, la prévalence de SARM est faible durant l'enfance (de 1,6% à 2,46%) puis augmente à partir de 15 ans (6,19%) (Figure 6).

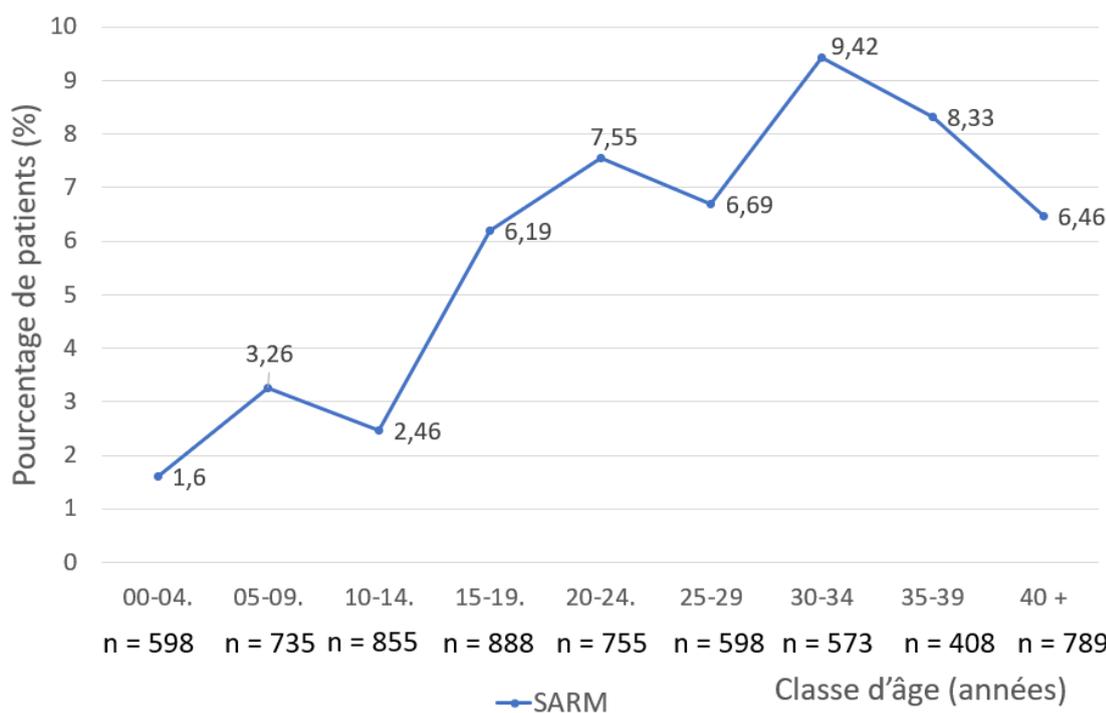


Figure 6 : SARM isolés des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose par classe d'âge (d'après le registre français de la mucoviscidose 2021)

L'infection par SARM se produit précocement dans la vie de ces patients. L'acquisition du SARM en milieu hospitalier est favorisée par la pression de sélection antibiotique. En effet, de nombreux antibiotiques sont prescrits aux patients CF du fait de leurs nombreuses infections bactériennes. Le mucus des patients CF agit comme une barrière protectrice pour les souches de SARM limitant ainsi l'action des antibiotiques qui malgré des posologies élevées et des durées d'exposition longues n'arrivent pas à franchir le mucus colonisé par les bactéries. La résultante est une dose faible d'antibiotique au niveau du site actif favorisant l'acquisition de résistance bactérienne et donc la persistance au sein de l'hôte.

D'un point de vue immunologique, la persistance de SARM au niveau pulmonaire est facilitée par la non-efficacité des macrophages dans le cadre de la mucoviscidose. En effet, le déficit en CFTR entraîne une diminution de production de cytokines inflammatoires, ainsi qu'une augmentation du pH cytoplasmique et un moindre fonctionnement lysosomal (Zhang et al., 2010, Porto et al., 2011). Les bactéries internalisées par les macrophages vont ainsi persister dans leur cytoplasme, ce qui les protège du système immunitaire et des antibiotiques. Ces macrophages n'étant pas aptes à éliminer les pathogènes, ils permettent une persistance bactérienne en jouant le rôle de réservoir pour les bactéries dont les SARM, faisant le lit d'infections chroniques (Li et al., 2017).

Afin d'évaluer la persistance d'une souche d'origine clonale colonisant chroniquement des patients CF, il est important de réaliser un génotypage, par exemple basé sur le séquençage total des génomes bactériens ou sur l'étude d'un ensemble de gènes caractérisant l'espèce *Sa* par une approche de Multi Locus Sequence Typing (MLST). Le résultat du MLST donne accès au Sequence type (ST) (Saunders et al., 2007). Cette technique est détaillée dans le paragraphe 2.2.1.1. Les ST5 et 8 sont les ST les plus décrits pour les souches de SARM CF (Gabryszewski et al., 2019, Tan et al., 2019, Liu et al., 2021). Plusieurs études confirment ainsi la persistance de souches de SARM de même ST chez des patients (Molina et al., 2008, Vu-Thien et al., 2010, López-Collazo et al., 2015, Azarian et al., 2019). L'étude d'Azarian et al., publiée en 2019 montre notamment la persistance d'une souche de SARM de même ST (ST72) durant 4,8 ans.

La formation de biofilm détaillée dans le paragraphe suivant est également un mécanisme important permettant aux SARM de persister au sein d'un hôte.

1.2 Production de biofilm

1.2.1 Présentation générale du biofilm bactérien

Le biofilm bactérien se définit comme une communauté de micro-organismes adhérant à un support et produisant une matrice polysaccharidique extracellulaire (Costerton et al., 1997) (Figure 7).

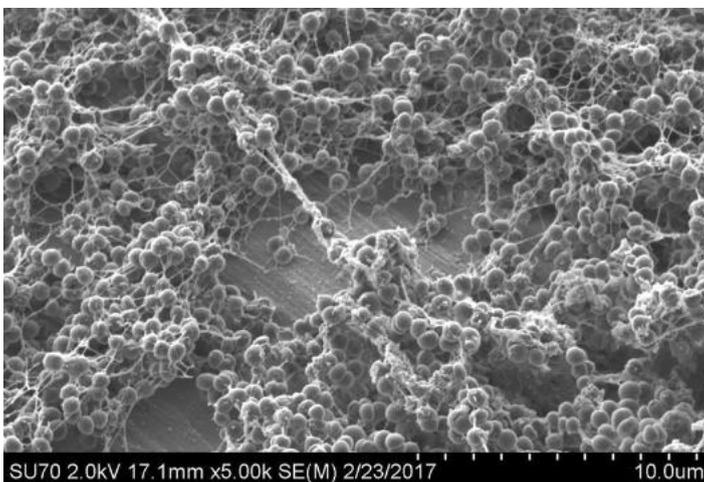


Figure 7 : Biofilm de SARM sur un support en titane par microscopie électronique à balayage (Boyle et al., 2018)

La formation de biofilm est constituée des étapes d'adhérence, de maturation et de dispersion comme décrit dans les figures 8 et 9 (Costerton et al., 1999, Hall-Stoodley et al., 2004).

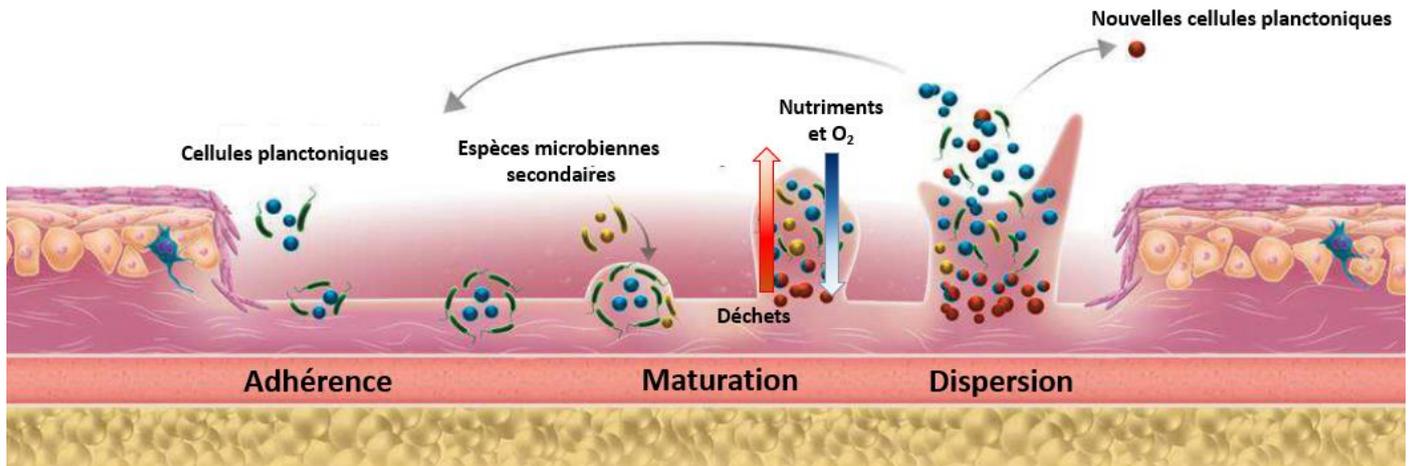


Figure 8 : Etapes de formation et de dispersion d'un biofilm bactérien (d'après Pouget et al., 2020)

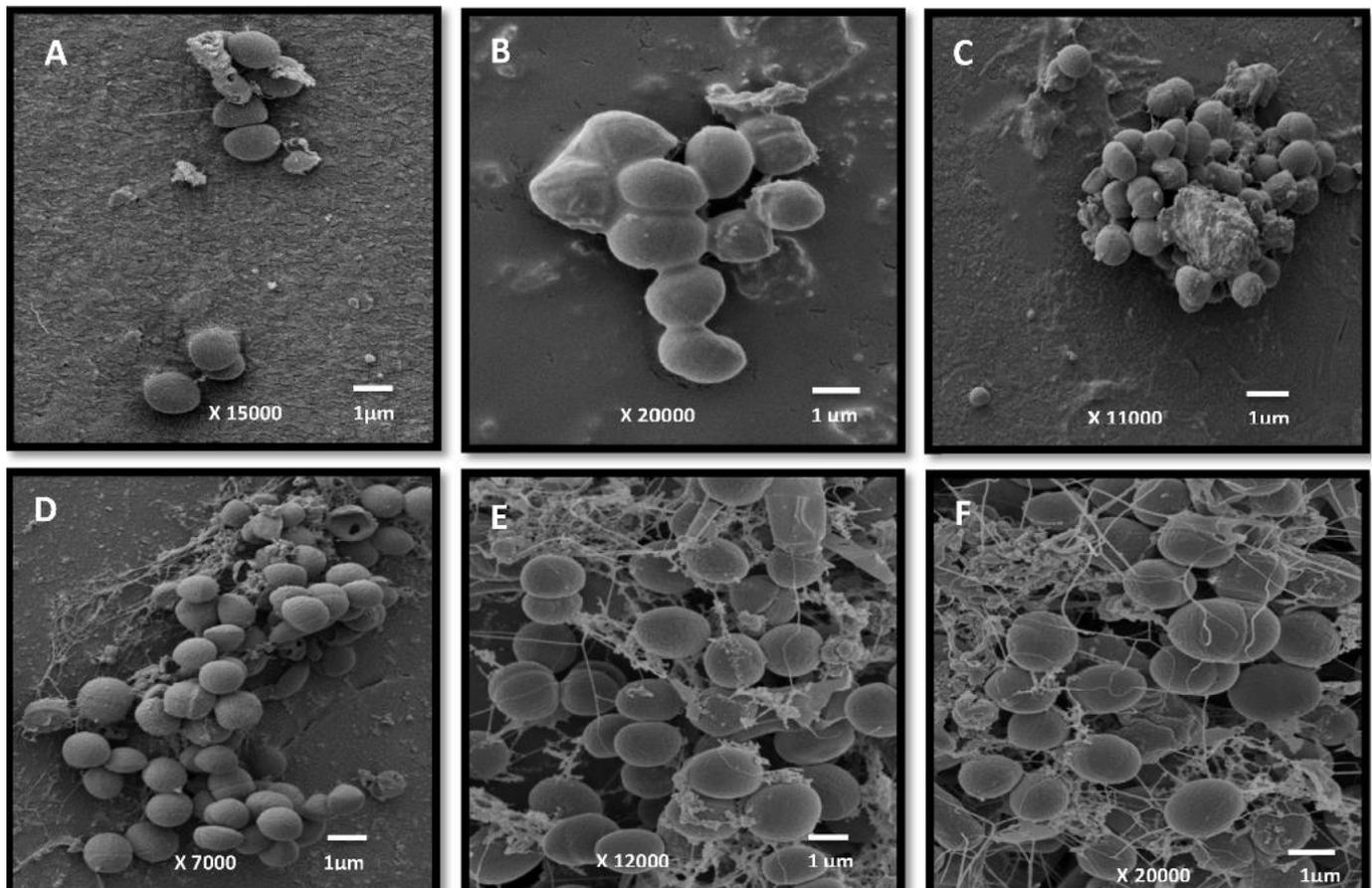


Figure 9 : Étapes de formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* sur cathéter, visualisées par microscopie électronique à balayage. A : adhésion des cellules. B : regroupement des cellules en structure tridimensionnelle. C : synthèse visible de la matière polysaccharidique. D : réticulation entre les différentes cellules par la matière polysaccharidique. E et F : maturation du biofilm (Rebiahi et al., 2014)

La première étape de la formation du biofilm est une étape d'adhérence réversible. Les bactéries adhèrent à une surface biotique (muqueuse) ou abiotique (cathéter, sonde, lentille de contact). L'adhésion dépend de la vitesse ainsi que de la force d'attachement qui sont liées aux propriétés intrinsèques de la membrane bactérienne et du support. L'interaction entre la bactérie et le support se produit via les forces de Van der Waals et les liaisons faibles comme les liaisons hydrogènes (Rijnaarts et al., 1995). Des liaisons ioniques viennent renforcer cette adhésion notamment par les charges négatives apportées par les acides teichoïques et les polymères (Gross et al., 2001). A l'instar de l'acide teichoïque, l'ADN extracellulaire (ADNe) est impliqué dans l'adhésion bactérienne à un support (Whitchurch et al., 2002).

D'autre part, à la surface des dispositifs médicaux implantés, des protéines bactériennes (protéines ancrées à la membrane) du groupe Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) sont capables de se lier à la matrice extracellulaire et permettent de recouvrir ces dispositifs médicaux (Patti et al., 1994). Appartiennent à ce groupe protéique :

- les clumping factors (ClfA, ClfB) et les « serine - aspartate repeat-containing proteins » (Sdr C, Sdr D, Sdr E) adhérant au fibrinogène
- les protéines de liaison au collagène (Collagen adhesin : Cna),
- les protéines de liaison à la fibronectine, nommées « fibronectin-binding proteins » A et B (FnbpA, FnbpB)
- la « Bone sialo binding protein » (Bbp) capable d'adhérer à la matrice osseuse
- la protéine A adhérant au facteur de Willebrand au niveau des endothéliums lésés.

Certains gènes comme le gène *nuc* et le gène *geh* codant respectivement pour une thermonucléase et une lipase permettent la synthèse d'adhésines dont l'action est prédominante pendant la phase d'adhésion.

L'adhésion des bactéries entre elles provoque des modifications physiologiques induisant une adhésion irréversible à la surface, une agglutination ainsi que la formation de microcolonies (Carniello et al., 2018).

A l'étape de maturation du biofilm, les bactéries sont toutes devenues sessiles. Elles synthétisent en masse la matrice protectrice nommée « extracellular polymeric substance » (EPS) composée majoritairement de polysaccharides (Pande et al., 2015). Parmi ces polysaccharides figure la « polysaccharide intercellular adhesin » (PIA) modulée positivement par le facteur de transcription *SarA* via l'opéron *ica* et l'expression du gène *ica* (Nguyen et al., 2020).

La formation de microcolonies aboutit à l'élaboration d'une structure du biofilm en 3 dimensions. Un gradient de concentration en nutriments et en oxygène s'établit par l'intermédiaire d'un réseau canalaire au sein de

ce biofilm. Les nutriments et l'oxygène sont en forte concentration à la surface du biofilm alors que leur concentration diminue vers la base du biofilm au niveau de laquelle s'accumulent les déchets métaboliques (Figure 8).

Lors de cette étape, de maturation, de nombreux mécanismes entrent en jeu impliquant des protéines de l'hôte comme la prothrombine détournée via une coagulase pour former un complexe transformant le fibrinogène en fibrine nécessaire à la formation de la matrice bactérienne (Vanassche et al., 2013).

La présence de fibres amyloïdes est aussi observée dans le biofilm mature de *Sa*. Ces fibres sont le résultat de l'assemblage des phénols solubles modulines (PSM), de petits peptides amphiphiles renforçant le biofilm (Marinelli et al., 2016).

La maturation du biofilm de *Sa* est donc régie par différents mécanismes dépendant des conditions environnementales (Figure 10).

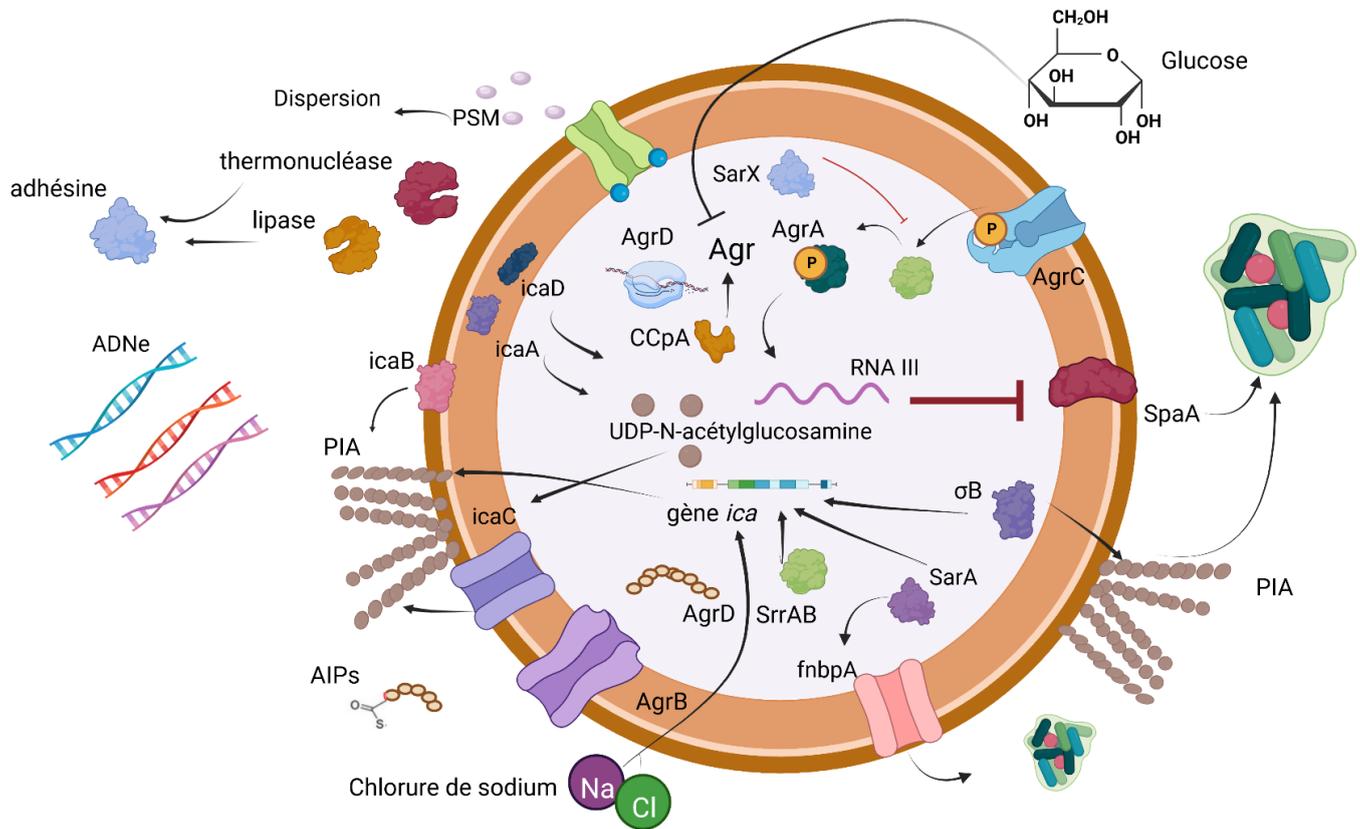


Figure 10 : Régulation de la formation de biofilm. ADNe : désoxyribonucléique extracellulaire, Agr : accessory gene regulator, AIP : Auto Inducer Peptide, ARN : Acide ribonucléique, CCpA : Carbon catabolite protéine A, FnBP : Fibronectin-Binding Proteins regulator, Ica : intracellular adhesin, PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin, PSM : Phenols Solubles Modulins, Sar : Staphylococcal accessory regulator, Spa : Staphylococcal Protein A, SrrAB : . staphylococcal respiratory response regulator

Il est possible de retrouver au sein de ce biofilm mature, des cellules dites « persistantes ». Il s'agit de cellules induites par des conditions de stress (ROS, antibiotiques, système immunitaire). Ces cellules sont définies comme des variants phénotypiques temporaires capables de persister en étant dans un état de dormance. Ces cellules sont ainsi capables de résister à des doses létales d'antibiotiques (Levin et al., 2014). Ces bactéries persistantes sont très rares (1% de la population bactérienne) et leur génome ne diffère pas des bactéries présentes dans la même population bactérienne. Ces bactéries ne se divisent pas mais sont capables de sortir de cet état quiescent et de retrouver un fitness et une division normale de manière aléatoire. Le mécanisme qui régit ce phénomène reste peu connu (Lewis et al., 2007).

L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes (Tremblay et al., 2014). Cette étape est la résultante de deux phénomènes : l'érosion et la desquamation. L'érosion est un mécanisme passif résultant de la libération quotidienne de bactéries sous l'effet de la force de cisaillement de l'environnement (par exemple du flux sanguin) et en cas de biomasse importante du biofilm mature (Kaplan et al., 2010).

D'autres mécanismes peuvent expliquer la désagrégation du biofilm mature comme la dégradation enzymatique de la matrice par le système immunitaire ou encore l'effet de tensioactifs tels que les rhamnolipides. La desquamation est un mécanisme actif permettant aux bactéries jusqu'ici sessiles de modifier leur métabolisme ainsi que leur motilité afin de redevenir des bactéries planctoniques. Le quorum sensing (QS) joue un rôle capital dans l'étape de détachement. Ce QS implique un ensemble de molécules sécrétées par les bactéries à des fins de communications. Ces molécules se fixent sur des récepteurs activant des régulateurs. Lorsque le seuil de molécule signal diffusible est dépassé, ces molécules entraînent une réponse phénotypique.

Elles permettent ainsi une régulation à la baisse des protéines responsables de l'adhérence et une augmentation de la production des protéines responsables du détachement (Kong et al., 2006). Le QS de *Sa* est lié à l'action du système accessory gene regulator (*agr*). Il régule négativement les molécules d'adhésion du groupe MSCRAMM ainsi que la PIA et régule positivement des molécules de détachement comme le PSM par la fixation au promoteur de l'opéron *psm* par d'AgrA (O'Gara et al., 2007). De plus, le système *agr* induit notamment l'expression de peptides (de type détergents) favorisant le détachement du biofilm et réprime l'expression des adhésines (Queck et al., 2008).

Les bactéries détachées du biofilm ont ainsi la capacité de coloniser de nouveaux sites, d'adhérer à de nouvelles structures et de répéter ce cycle de vie du biofilm.

Ce détachement joue donc un rôle majeur dans l'extension des infections bactériennes notamment par la migration d'une partie du biofilm désagrégé et la colonisation de nouvelles localisations. De plus, certains biofilms notamment ceux issus de supports abiotiques comme les cathéters peuvent ainsi relarguer des bactéries à l'origine de la propagation de l'infection par la colonisation de nouveaux supports biotiques tels que des organes et muqueuses après passage dans la circulation sanguine des patients (Archer et al., 2011).

Cette formation de biofilm est observée chez les souches de *Sa* issues de patients CF et issues de patients non atteints de mucoviscidose (Non Cystic Fibrosis NCF) (Aktas et al., 2013, Silva et al., 2021). Cependant, le mucus des patients CF est un environnement singulier au sein duquel les souches de *Sa* produisent du biofilm de manière accrue. Il est d'ailleurs observé dans l'étude de Aktas et al., 2013 une production de biofilm significativement plus importante par des souches issues de patients CF comparativement aux souches issues de patients NCF (Aktas et al., 2013).

1.2.2 Production de biofilm en contexte CF et adaptation à l'environnement

L'épaississement du mucus et l'obstruction bronchique conduisent à l'hypoxie de certains tissus formant des niches anaérobies (Gilpin et al., 2021). Ces gradients de concentration en oxygène mais aussi l'existence de zones où les ressources nutritives sont distinctes sont propices au développement de bactéries qui doivent s'adapter à des conditions environnementales différentes selon leur localisation (Goerke et al., 2010). De plus, de faibles concentrations d'oxygène induisent l'activation de régulateurs comme le régulateur de la réponse respiratoire staphylococcique (staphylococcal respiratory response regulator *SrrAB*) qui augmente la transcription du gène *ica* augmentant la formation de biofilm (Ulrich et al., 2007).

D'autre part, les patients CF reçoivent de nombreuses antibiothérapies constituant autant de pressions de sélection. Ces conditions vont être propices à l'adaptation de *Sa* à son environnement (Savage et al., 2013, Akil et al., 2018).

Certaines études comme les études de López-Collazo et al., datant de 2015, Gabryszewski et al., publiée en 2019 et Tan et al., parue en 2019 décrivent une forte production de biofilm par des SARM issues de patients CF et une augmentation de cette production au cours de la colonisation du patient. La clonalité de ces souches a été prouvée en séquençant leur génome par la technique du Whole Genome Sequencing (WGS) détaillée dans le paragraphe 2.2.1.2. (López-Collazo et al., 2015, Gabryszewski et al., 2019, Tan et al., 2019).

Des souches clonales isolées de trois patients colonisés de manière chronique (neuf ans entre 2003 et 2017) ont été utilisées dans l'étude de Tan et al. Il a été décrit que les souches de SARM isolées de manière récente (2017) produisaient significativement plus de biofilm comparativement aux souches isolées en début de colonisation (2003). Cette différence est liée à la mutation du gène *agr* pour les souches isolées de manière récente (Tan et al., 2019). La mutation de ce gène le rend déficient (Goerke et al., 2010) et provoque une augmentation de la production de biofilm par les mécanismes précédemment décrits.

L'étude de López-Collazo et al. a comparé des souches de SARM de même ST issues d'un patient colonisé pendant 13 ans (1996-2009). Ces souches présentaient des modifications intra-clonales de type changement du gène *spa* codant pour la protéine A. Ces modifications ont entraîné une réduction de facteurs de virulence et une augmentation de la capacité à produire du biofilm (López-Collazo et al., 2015).

1.2.3 Détection du biofilm

Les outils d'évaluation de la formation du biofilm peuvent être divisés en deux grandes catégories : les systèmes statiques et les systèmes dynamiques (McBain et al., 2009). La revue de la littérature d'Azeredo et al., publiée en 2017, fournit un récapitulatif de ces techniques. Nous avons fait le choix dans ce travail de présenter les techniques de détection majoritairement utilisées. Toutefois, une description des techniques détaillées dans cette revue est présentée dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1 : Descriptif des techniques de détection du biofilm (d'après Azeredo et al., 2017)

Technique	Principe	Avantages	Limites
Marquage au Crystal Violet	Système statique Méthode indirecte de mesure du biofilm Quantification de la formation de biofilm en microplaque Marquage au Crystal Violet Lavages successifs à l'eau et à l'éthanol pour éliminer les cellules non liées à la microplaque Dosage des cellules vivantes et mortes au sein de la matrice du biofilm	Peu coûteuse L'équipement est standardisé et facile à utiliser Cette technique peut être couplée à un système d'imagerie	Les lavages successifs peuvent entraîner un détachement partiel des bactéries sessiles de par leur stringence pouvant biaiser le résultat Pas de renouvellement des nutriments Les résultats obtenus sont opérateurs dépendants ou laboratoires dépendants Cette technique n'est pas adaptée pour évaluer les étapes d'adhésion et de maturation du biofilm
Technique de Calgary	Système statique Quantification de la formation de biofilm en microplaque Utilisation d'un couvercle comprenant des piquets sur lesquels se déposent le biofilm Etape de sonification afin de détacher les cellules non adhérentes	Technique peu sensible à la sédimentation L'équipement est facile à utiliser et composé de peu d'éléments Compatible avec un système d'imagerie	Les lavages successifs peuvent diminuer la quantité de biofilm mesuré Risque de contamination lors de la manipulation des piquets Chaque changement de support nécessite que les piquets traversent l'interface liquide-air Cette technique n'est pas adaptée à l'observation des phases d'adhésion et de maturation du biofilm Technique coûteuse

Biofilm Ring Test ®	<p>Système statique</p> <p>Utilisation d'une plaque de microtitration</p> <p>Utilisation de microbilles magnétique et d'un aimant afin d'évaluer la formation de biofilm</p> <p>Les microbilles sont immobilisées dans le biofilm lors de sa production et ne subissent plus l'influence de l'aimant</p> <p>Génération d'un index de formation de biofilm (BFI)</p>	<p>Permet l'observation des phases d'adhésion du biofilm</p> <p>Méthode facile à utiliser</p> <p>Pas d'étapes de lavage</p> <p>Hautement reproductible</p> <p>Non personne-dépendant ou laboratoire dépendant</p>	<p>Nécessite un appareil spécifique</p> <p>Cette technique ne permet pas d'évaluer les phases de maturation et de dispersion du biofilm</p> <p>Ne permet pas d'utiliser des milieux de culture liquides opaques</p> <p>Non compatible avec un système d'imagerie autre que celui spécifique du test</p>
Appareil Robbins et modifié	<p>Système dynamique</p> <p>Le milieu de culture et la suspension bactérienne circulent via des tubes et traversent un disque situé dans un des puits du dispositif</p> <p>Le biofilm se dépose sur le disque</p> <p>Les puits sont fermés par un système de chevilles</p> <p>La mise en place du flux continu est réalisée par une pompe</p>	<p>Convient à l'évaluation de la formation du biofilm à chaque étape (adhésion, maturation, dispersion)</p> <p>Peut fonctionner pendant de très longues périodes sans intervention</p> <p>Un apport de nutriments en continu est possible</p> <p>Compatible avec un système d'imagerie</p>	<p>Débit faible à moyen</p> <p>Technique coûteuse</p>
Réacteur à biofilm goutte à goutte	<p>Système dynamique</p> <p>Dispositif à quatre chambres parallèles avec un couvercle ventilé</p> <p>Chaque chambre contient un support (par exemple une lame de microscope standard) sur lequel le biofilm peut se former.</p> <p>La suspension cellulaire et le milieu de culture pénètrent dans chaque chambre via une aiguille de jauge insérée à travers le septum du couvercle.</p>	<p>Convient à l'évaluation de la formation du biofilm à chaque étape (adhésion, maturation, dispersion)</p> <p>Différents matériaux utilisables pour les supports</p> <p>Compatible avec un système d'imagerie</p>	<p>Hétérogénéité du développement du biofilm sur les supports</p>
Dispositifs rotatifs	<p>Système dynamique</p> <p>Dispositif avec huit supports suspendus</p> <p>Chaque chambre contient un support où le biofilm peut se former.</p> <p>Le cisaillement est généré par un agitateur magnétique</p>	<p>Convient à l'évaluation de la formation du biofilm à chaque étape (adhésion, maturation, dispersion)</p> <p>Les supports peuvent être constitués de différents matériaux</p> <p>Compatible avec un système d'imagerie</p>	<p>Hétérogénéité du développement du biofilm sur les supports</p> <p>Variabilité des résultats en fonction de la nature du matériau constituant le coupon (verre, PVC)</p> <p>La géométrie du support est fixée et déterminée par la conception du réacteur</p>
Chambre d'écoulement	<p>Système dynamique</p> <p>Passage du milieu de culture et de la suspension bactérienne à travers une chambre d'écoulement de fluides à plaques parallèles</p> <p>Système composé d'un distributeur en polycarbonate, d'un joint en silicone et d'une lamelle en verre.</p> <p>Système comprenant un orifice d'entrée, un orifice de sortie et une fente à vide.</p> <p>Une pompe péristaltique permet la mise en place d'un flux continu</p>	<p>Permet une observation non destructive</p> <p>Convient à l'évaluation de la formation du biofilm à chaque étape (adhésion, maturation, dispersion)</p> <p>Les chambres d'écoulement peuvent être réalisées avec divers matériaux : verre, PVC, ...</p> <p>Compatible avec un système d'imagerie</p>	<p>Faible débit</p> <p>Nécessite un équipement spécifique (pompes péristaltiques)</p>
Système microfluidique	<p>Système dynamique</p> <p>Modèle composé d'une plaque de 48 puits avec une connexion microcanaulaire entre 24 paires de deux types de puits (puits d'entrée et puits de sortie)</p> <p>Les suspensions traversent les canaux microfluidiques entre les puits d'entrée et de sortie</p>	<p>Technique polyvalente</p> <p>Convient à l'évaluation de la formation du biofilm à chaque étape (adhésion, maturation, dispersion)</p> <p>Possibilité d'une adaptation du système pour répondre à des besoins spécifiques</p> <p>Précision et forte reproductibilité</p> <p>Compatible avec un système d'imagerie</p>	<p>Nécessite un équipement spécial</p> <p>Technique coûteuse</p> <p>Nécessite la formation de l'opérateur afin de maîtriser la technique</p>

Les méthodes classiques font pour la majorité partie des modèles statiques. Parmi celles-ci, la méthode utilisant le Crystal Violet est particulièrement employée. Cette méthode, réalisée en microplaques permet de

quantifier la biomasse du biofilm par mesure de la densité optique (Christensen et al., 1985, Pitts et al., 2003). Cette technique a l'avantage d'être facile à utiliser, peu coûteuse et rapide. Cependant ses principaux inconvénients sont l'absence de relation entre la biomasse et la viabilité du biofilm étant donné que le Crystal Violet colore les cellules mortes et les cellules viables (Stepanovic et al., 2007).

La technique de Calgary fait également partie des méthodes statiques. Cette technique utilise une microplaque de 96 puits dans lesquels sont positionnés des piquets amovibles (Ceri et al., 1999, Malchau et al., 2021). Après une inoculation bactérienne dans les puits avec les bouillons de culture, les plaques sont incubées avec ou sans agitation. Le biofilm se forme autour des piquets tandis que les bactéries planctoniques restent dans le bouillon de culture. Cette technique est, elle aussi, peu coûteuse et facile à utiliser. Cependant, son principal inconvénient est le risque de contamination lorsque les piquets sont retirés afin d'être analysés (Azeredo et al., 2017).

De plus les modèles statiques ne permettent pas de contrôler des paramètres comme les débits de cisaillement ni l'apport de nutriments et sont peu reproductibles.

Les modèles dynamiques permettent la maîtrise de ces paramètres. Ils comprennent des techniques plus récentes permettant de se rapprocher dans un modèle *in vitro* d'un modèle *in vivo*. Ces techniques permettent l'étude dynamique de la formation du biofilm en l'absence de cellules planctoniques qui sont éliminées par le débit.

Le système de Flow cell fait partie de ces méthodes et est composé d'une pompe péristaltique à multicanaux dans lesquels passe un bouillon de culture stérile (Teodósio et al., 2013). Les bactéries sont directement inoculées dans les cellules d'écoulement par injection à travers des tubes de silicone. Cette technique permet la mise en place d'un flux continu. En comparaison avec le dispositif de biofilm de Calgary, le biofilm formé avec le système de Flow cell est plus épais. Cependant, ce processus est long, difficile à mettre en œuvre (Nielsen et al., 2011).

D'autre part il existe la technique du réacteur à biofilm (Goeres et al., 2009, Agostinho et al., 2011) et du réacteur à substrat suspendu (Kornegay et Andrews., 1968, Pavarina et al., 2011). Ces deux techniques sont des systèmes dynamiques compatibles avec un système de microscopie.

Le réacteur à biofilm est un dispositif composé de quatre chambres contenant des coupons. Les coupons (ou supports) sont des lamelles sur lesquels le biofilm se dépose. Le réacteur couplé à une pompe péristaltique permet la formation d'un flux continu. Le milieu de culture ainsi que la suspension bactérienne sont injectés dans le dispositif au travers du couvercle d'une aiguille (Figure 11).

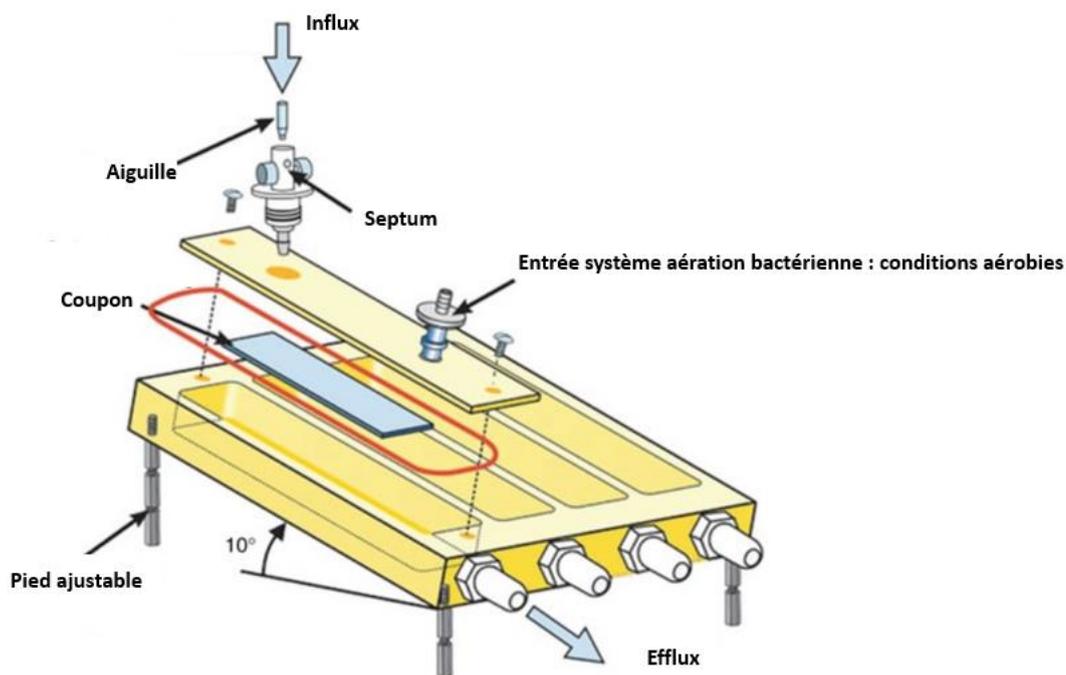


Figure 11 : Schéma du dispositif de réacteur à biofilm (d'après Goeres et al., 2009)

Le réacteur à substrat suspendu est quant à lui un dispositif comportant un flacon de culture stérile, huit coupons et portes-coupons. Les bactéries sont inoculées dans le réacteur et le biofilm est formé sur les coupons tandis que le bouillon est mélangé avec une pale d'agitation par rotation magnétique. L'action de la pale permet au biofilm de se développer dans des conditions de cisaillement (Figure 12).



Figure 12 : Schéma du dispositif de réacteur suspendu (Azeredo et al., 2017)

Dans le système de réacteur à biofilm et de réacteur à biofilm suspendu, il est possible de contrôler la vitesse d'écoulement, la température et le temps de séjour. Les coupons peuvent également être fabriqués à partir de différents matériaux comme le polycarbonate, l'acier, le PVC, ou encore le verre. Cependant cette technique est source de variation dans les résultats de la formation du biofilm de par l'hétérogénéité des biofilms obtenus à la surface des coupons (Azeredo et al., 2017).

Les techniques décrites précédemment sont faiblement reproductibles et manquent de standardisation. De nouvelles techniques permettent d'évaluer la production du biofilm de manière dynamique. Dans notre étude, nous avons sélectionné la technique du BioFlux™ 200 nous permettant d'évaluer la formation du biofilm pendant soixante-douze heures en contrôlant le débit (Benoit et al., 2010). Elle permet une évaluation de la formation de biofilm dans le temps, hautement précise et très reproductible. (Azeredo et al., 2017).

Les phases d'adhésions précoces des bactéries restant déterminantes pour l'élaboration d'un biofilm mature, nous avons également évalué ces phases précoces par la technique du Biofilm Ring Test ® (Chavant et al., 2007, Ren et al., 2007). La technique du Biofilm Ring Test ® a pour avantage d'être une méthode rapide et hautement reproductible. Le principe de ces techniques est détaillé dans le paragraphe 2.2.2.1.

1.3 Approche antibiofilm

Les infections chroniques par SARM chez les patients CF sont intimement liées à la production de biofilm. Le développement de nouvelles stratégies pour combattre les infections liées aux biofilms se révèle être un véritable défi pour les scientifiques et les cliniciens. Ces stratégies restent malheureusement très peu évaluées sur des souches de SARM isolées de patients CF et le sont majoritairement sur des souches de référence. Les publications ayant spécifiquement étudié l'action antibiofilm de diverses substances sur des souches cliniques issues de patients atteints de mucoviscidose sont présentées ci-dessous et les substances testées ont été présentées de manière récapitulative en Figure 13 selon l'étape de la formation du biofilm qui était impacté.

L'étude de Yuan et al., publiée en 2019, a étudié l'effet antibiofilm d'un peptide sur deux souches de SARM isolées de patients CF (B038 V1S1A et B042 V2E1A). Ce peptide est la Japonicine-2LF isolée des sécrétions cutanées de la grenouille à grande tête du Fujian (*Limnonectes fujianensis*).

La japonicine-2LF a montré une puissante activité antimicrobienne contre les SARM par une action mécanique induisant une perméabilité de la paroi bactérienne. De plus, la japonicine-2LF est capable d'inhiber

et d'éradiquer les biofilms des souches de SARM, en particulier en détruisant la matrice du biofilm ainsi qu'en tuant les bactéries sessiles.

L'étude de Pompilio et al parue en 2016 a quant à elle étudié l'effet de l'acide usnique (USN) sur une souche clinique de SARM issue d'un prélèvement respiratoire d'un patient CF colonisé de manière chronique (*Sa 3*). Cette étude révèle que l'USN possède un effet antibiofilm contre la souche de SARM de par la réduction de la synthèse du peptidoglycane (Pompilio et al., 2016).

Cette étude a par ailleurs montré que l'activité antibiofilm de l'USN était principalement liée à l'altération des protéines de liaison comme les adhésines lors de la phase d'adhésion du biofilm. Il a notamment été constaté une diminution de l'expression de la thermonucléase et de la lipase par inhibition de leurs gènes respectifs *nuc* et *geh*. Toutefois, un effet variable sur l'expression d'*agrA* et dépendant de la concentration en USN a été observé. Une concentration en USN comprise entre 1/64 ème de la CMI et 1/128 ème de la CMI était capable de réprimer l'expression d'*agrA* avec une augmentation de la production de PIA et du biofilm tandis qu'une concentration plus faible (1/256 ème de la CMI) induisait l'augmentation de l'expression du gène *agrA* avec une diminution de la production de PIA et de biofilm. La concentration en USN influe donc sur la production de biofilm de la souche SARM *Sa 3* mais de manière dépendante de sa concentration (Pompilio et al., 2016).

Certaines interactions microbiennes modifient également la production de biofilm par les SARM. La bactérie prédatrice *Bdellovibrio bacteriovorus* de la classe des *Oligoflexia* est capable de réprimer fortement la production de biofilm de *Sa* (Lebba et al., 2014). Dans l'étude de Lebba et al., parue en 2014, le biofilm préformé (24h) d'une souche de *Sa* issue d'un patient CF colonisé de manière chronique a été réduit de 74% sous l'action de la souche de référence *B. bacteriovorus* DSM 50701 encore nommée HD100. Cette réduction du biofilm de *Sa* serait liée selon les auteurs, à l'excrétion par HD100 d'enzymes lytiques de la paroi de *Sa*. La diminution du biofilm est une conséquence indirecte de la perte de l'intégrité de la paroi bactérienne et de la fuite du contenu intracytoplasmique de *Sa* (Lebba et al., 2014).

Des substances naturelles ont également une action antibiofilm comme les huiles essentielles. Celles-ci du fait de leurs multiples composants ont une action multicible. L'étude de Papa et al. rapporte la diminution de la production de biofilm de souches cliniques de SARM isolées de patients CF (FSA32, FSA31, FSA11, FSA13) sous l'effet de diverses huiles essentielles. En particulier, les huiles essentielles de *Piper nigrum* (poivre noir), (EO45) et de *Mentha Suaveolens* (menthe douce), (EO58) ont réduit le biofilm bactérien à 40% de sa valeur initiale. L'EO 45 et l'EO58 possédaient des compositions qualitatives (le composant

majoritairement retrouvé dans l'EO45 était le bêta caryophyllène alors que pour l'EO58 il s'agissait du pulegone) et quantitatives différentes suggérant différents mécanismes impactant le biofilm (Papa et al., 2020).

Les différentes étapes du biofilm peuvent également être la cible de médicaments. Certains d'entre eux ciblent notamment les cellules persistantes du biofilm. Ces cellules décrivent sous l'influence d'un environnement non favorable (stress oxydatif, antibiotiques, système immunitaire), des variations phénotypiques comme une diminution et un ralentissement de leur activité métabolique.

Ces cellules persistantes sont particulièrement difficiles à éradiquer au sein d'un biofilm bactérien. Ces variations sont toutefois temporaires et ces cellules persistantes peuvent de manière aléatoire recouvrer des capacités métaboliques et un fitness identique aux bactéries du biofilm.

Dans leur étude, Kwan et al., exposent l'élimination des cellules persistantes de souches de SARM CF du biofilm par la mytomycine C, un anticancéreux en altérant l'ADN bactérien (Kwan et al., 2015). Toutefois, malgré ces tests *in vitro* prometteurs, la toxicité de cette molécule ne permet pas d'envisager actuellement son utilisation chez les patients CF pour son activité anti-biofilm.

Enfin, de nouvelles molécules se développent comme les phénazines modulées par des substituants halogénés. L'étude de Huigens et al., incluant des souches de SARM issues de patients CF, décrit l'élimination des cellules persistantes de ces SARM par certaines phénazines halogénées contenant des substituants chlorés et bromés et iodés. Le mécanisme d'action de cette molécule n'est pas encore entièrement élucidé mais elle agirait en modulant le QS des SARM. (Huigens et al., 2019).

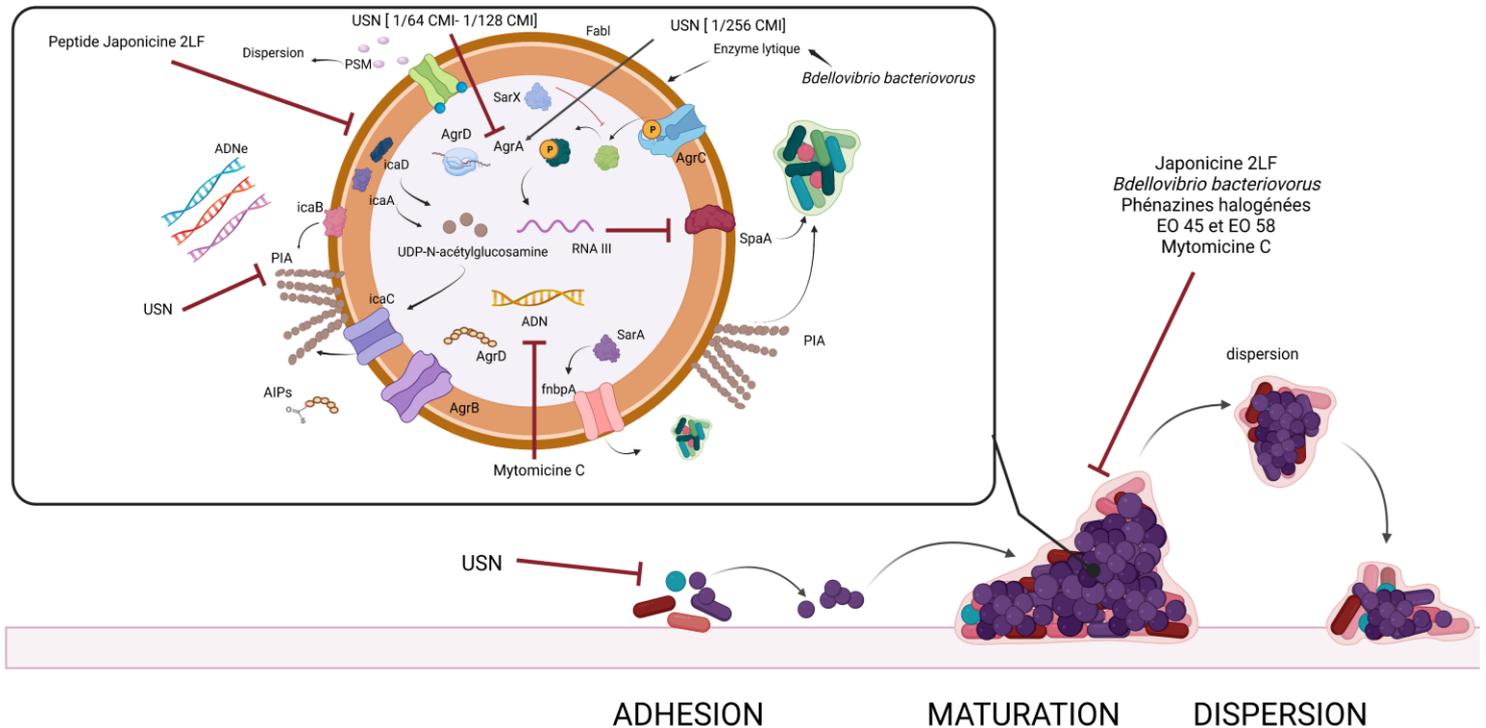


Figure 13 : Représentation des approches antibiofilm de *Sa*. ADN : Acide désoxyribonucléique, ADNe : ADN extracellulaire, Agr : accessory gene regulator, AIP : Auto Inducer Peptide, ARN : Acide ribonucléique, FnBP : Fibronectin-Binding Proteins regulator, Ica : intracellular adhesin, NO : oxyde nitrique, PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin, PSM : Phenols Solubles Modulins, ROS : Reactive Oxygen Species, Sar : Staphylococcal accessory regulator, Spa : Staphylococcal Protein A.

Les études publiées relatives à l'effet antibiofilm des antibiotiques utilisent dans la quasi-totalité des cas des souches de référence.

Toutefois, malgré le recours à ce type de souches, certaines études utilisent le milieu ASM dans le but de se rapprocher des conditions singulières de l'environnement pulmonaire des patients CF.

L'étude de Diaz Iglesias et al., a par exemple comparé la viabilité, l'activité métabolique et la capacité à produire du biofilm pour deux souches de références (une souche de SARM : ATCC 25923 et une souche de SARM : ATCC 33591) en absence et en présence de sept antibiotiques dans deux milieux de culture : le milieu ASM et le milieu trypticase soja additionné de glucose et de sodium (TSGN). L'évaluation du biofilm a été réalisée par la technique du Crystal Violet. Les sept antibiotiques utilisés étaient le méropénème et la vancomycine qui sont lentement bactéricides, l'azithromycine et le linézolide qui sont bactériostatiques ; la rifampicine, la ciprofloxacine et la tobramycine qui sont rapidement bactéricides. L'effet antibiofilm a été évalué après 24h de contact du biofilm avec l'antibiotique à différentes concentrations. La comparaison de

ces deux milieux de culture a notamment montré une cinétique de biofilm plus lente et une activité métabolique diminuée dans le milieu ASM par rapport au milieu TSGN. Toutefois, l'effet antibiofilm des sept antibiotiques était réduit en milieu ASM comparé au milieu TSGN. La souche SARM ATCC 33591 s'est révélée en milieu ASM résistante aux sept antibiotiques. L'activité de la tobramycine en ASM a néanmoins été observée sur la souche SASM ATCC 25923 en réduisant la viabilité de cette souche et en diminuant son activité métabolique (Diaz Iglesias et al., 2019).

Cependant, cet antibiotique est décrit dans cette étude pour induire la sélection et le développement de variant à petite colonie (Small Colony Variant SCV) (Diaz Iglesias et al., 2019). Ces SCV sont connus pour être de petites bactéries non pigmentées comportant des mutations dans leur génome leur conférant notamment une augmentation de la capacité à produire du biofilm, une croissance plus lente ainsi qu'une résistance accrue aux antibiotiques (Melter et al., 2011, Guo et al., 2022). De plus ces bactéries peuvent développer des formes intracellulaires au sein de cellules comme les cellules endothéliales, les cellules bronchiques ou encore des monocytes leur permettant de persister chez les patients CF en échappant au système immunitaire (Nguyen et al., 2009, Esposito et al., 2019).

D'autres antibiotiques et en particulier des associations comme la Vancomycine associée à la Fosfomycine ont montré un effet antibiofilm sur des souches de référence, notamment par la réduction de la synthèse d'ADNe et de la PIA (Shi et al., 2014, Chopra et al., 2015, Valliammai et al., 2019). Déterminer l'effet de ces antibiotiques sur des souches cliniques issues de patients CF serait donc à envisager.

Les différentes substances ou molécules décrites précédemment ont donc des mécanismes d'actions multiples et des cibles variées (peptidoglycane, QS,...). Ces approches anti-biofilm sont prometteuses mais ne sont pas encore utilisées directement chez le patient CF. De plus des études concernant la toxicité humaine de ces différentes molécules sont à effectuer.

2 Partie II Etude expérimentale

2.1 Présentation de l'étude

2.1.1 Objectif de l'étude

Il est observé en France en 2021, une colonisation de 4,7% des patients CF par des souches de SARM (Registre français de la mucoviscidose 2021). Cette colonisation est corrélée à une dégradation progressive de la fonction respiratoire associée à des exacerbations pulmonaires et une diminution du Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) (Sawicki et al., 2009, Vanderhelst et al., 2012, Hector et al., 2016).

Par ailleurs, de nombreuses études mettent en évidence une augmentation des résistances des SARM face aux traitements antibiotiques classiques. L'étude de Rouard et al., publiée en 2018 observe notamment une augmentation des CMI du linézolide pour treize souches de SARM isolées entre 2002 et 2007 et issues d'un patient CF. Cette augmentation de la CMI du linézolide fait suite à trois cures thérapeutiques de quinze jours sur quatre mois avec une prise de 600 mg de linézolide deux fois par jour (Rouard et al., 2018).

De plus, il a été décrit une forte capacité à produire du biofilm par les souches de SARM (Gabryszewski et al., 2019, Tan et al., 2019, Kodori et al., 2021, Gilpin et al., 2021) ce qui limite l'efficacité des antibiotiques et expose les bactéries sessiles à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques, elles mêmes pourvoyeuses d'émergence de résistance. Ces caractéristiques font des SARM un problème majeur de santé publique.

Le constat actuel est que la majorité des études évaluant l'activité anti-biofilm de *Sa* de différentes molécules inclut uniquement des souches de référence. Les données demeurent donc insuffisantes pour les souches cliniques des patients CF malgré un contexte tout à fait singulier affectant les caractéristiques bactériennes.

L'objectif de notre étude était d'évaluer la capacité des SARM à former du biofilm en présence ou en l'absence d'antibiotiques chez des patients CF présentant divers types de colonisation.

Nous avons utilisé cinq antibiotiques dont trois étaient des antibiotiques connus pour leur action anti SARM (le linézolide, le triméthoprime, la rifampicine). Nous avons également utilisé deux céphalosporines à large spectre (une céphalosporine de troisième génération, la ceftaroline et une céphalosporine de cinquième génération, le ceftobiprole) dont l'action anti-SARM est décrite (Escolà-Vergé et al., 2020). Nous avons inclus dans notre étude des souches issues de patients colonisés de manière chronique afin de caractériser le

comportement et l'adaptation de ces souches au sein des patients CF en termes d'activité anti-biofilm des antibiotiques étudiés.

Cette étude a fait l'objet :

- d'un Poster (présenté en Annexe) commenté lors du congrès international suivant :

44th European Cystic Fibrosis Society (ECFS), 9-12 Juin 2021 (digital) : Agathe Boudet, Pauline Sorlin, Cassandra Pouget, Raphaël Chiron, Jean-Philippe Lavigne, Catherine Dunyach-Remy, Hélène Marchandin. Biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Cystic Fibrosis patients is strain-dependent and differentially influenced by antibiotics (référence EPS3.09).

- d'une publication dans le journal Frontiers in microbiology co-signée en premier auteur et présentée en fin de Partie 2 :

Boudet A*, Sorlin P*, Pouget C, Chiron R, Lavigne J-P, Dunyach-Remy C, et al.,. Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Cystic Fibrosis Patients Is Strain-Dependent and Differentially Influenced by Antibiotics. Front Microbiol. 2021;12:750489.

* These two authors contributed equally to the work.

2.1.2 Présentation de l'étude

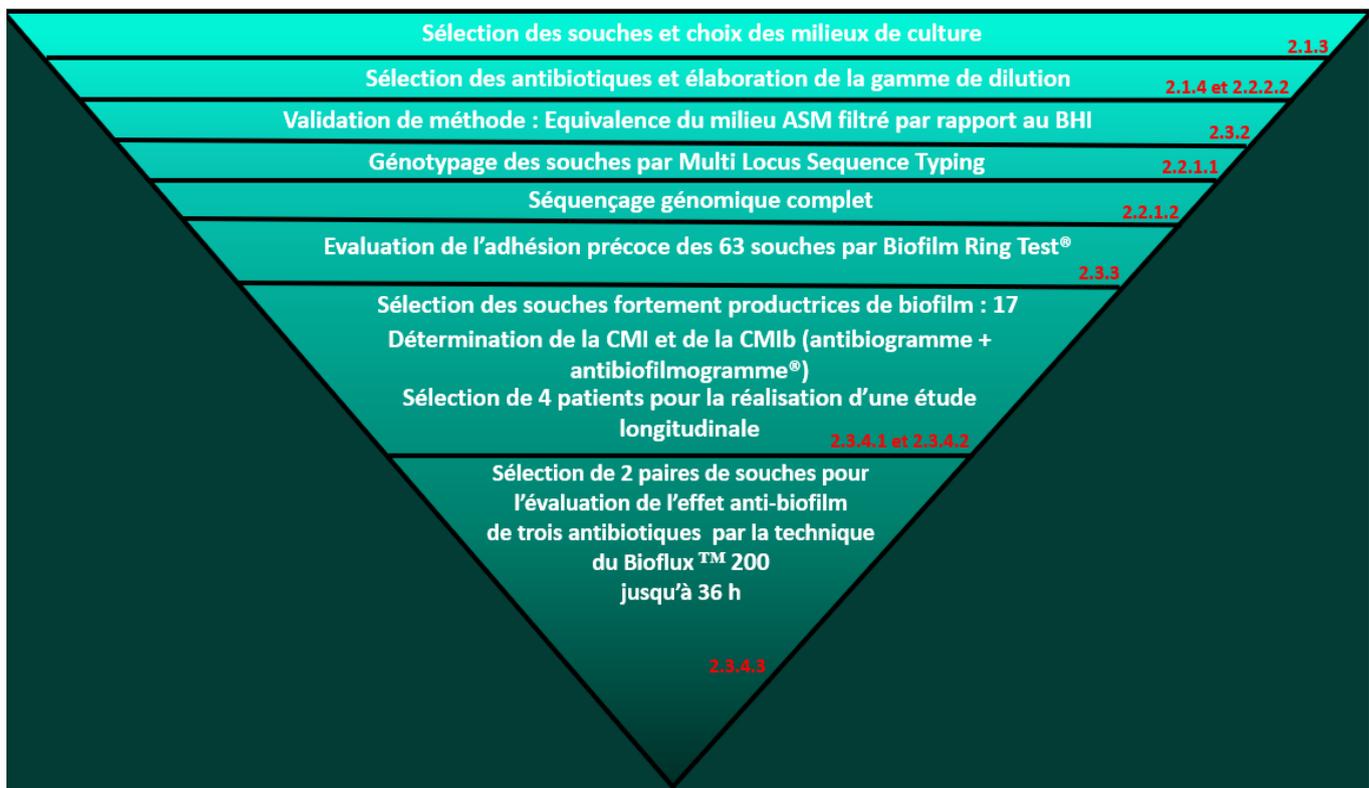


Figure 14 : Présentation des étapes de l'étude en lien avec le plan de thèse

Nous avons premièrement sélectionné 63 souches isolées entre 2007 et 2016 issues d'expectorations de 35 patients CF. Ces patients sont suivis au Centre de Ressource et de Compétence de la Mucoviscidose (CRCM) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier (Figure 14).

En vue de caractériser l'impact du milieu de culture sur la production de biofilm des souches de SARM, nous avons sélectionné deux milieux de culture : le milieu Brain Heart Infusion (BHI) et l'Artificial Sputum Medium (ASM) mimant le mucus des patients atteints de mucoviscidose.

Nous avons dans un second temps réalisé la sélection de cinq antibiotiques connus pour leur action anti SARM : le linézolide, la rifampicine, le triméthoprime, la ceftaroline et le ceftobiprole.

Nous avons déterminé les valeurs de CMI de ces cinq antibiotiques dans le but de les comparer par la suite avec les Concentrations Minimales d'Inhibition en Biofilm (CMib) obtenues dans le milieu de culture ASM filtré.

Le BRT® n'est pas adapté à l'utilisation de milieux opaques comme le milieu ASM. Il est nécessaire d'utiliser des milieux de culture translucides pour l'obtention de résultats conformes. Nous avons donc filtré l'ASM avec un filtre de 0,22 µm et nous avons comparé les courbes de croissance des souches de SARM en milieu BHI et en milieu ASM filtré afin de déterminer l'impact de cette filtration sur la croissance bactérienne et de valider l'utilisation de l'ASM filtré à 0,22 µm avec le BRT®.

Nous avons de plus, réalisé une étude génétique des 63 souches de l'étude par MLST et, pour certaines d'entre elles (n=11 souches /4 patients), un séquençage total du génome a été réalisé dans le but d'une part de déterminer la diversité génétique des souches de SARM et d'autre part de définir le nombre de SNP présents au sein des souches clonales en fonction du temps.

Puis nous avons évalué la capacité des souches de SARM à former du biofilm par la technique du BRT®. Nous avons sélectionné 17 souches qui étaient les souches les plus fortement adhérentes.

Suite à cette sélection, nous avons évalué l'efficacité des antibiotiques contre la formation de biofilm en utilisant la méthode de l'Antibiofilmogramme® (ATBF) et en déterminant les CMib des 17 souches fortement adhérentes.

Onze souches ont alors été sélectionnées afin d'effectuer une étude longitudinale au cours de laquelle nous avons analysé l'évolution de l'efficacité de trois antibiotiques (le linézolide, la ceftaroline et le ceftobiprole) sur la formation de biofilm au cours du temps chez les patients chroniquement colonisés (sélection de souches clonales successivement isolées chez quatre patients, 5 souches dites « précoces » et 6 souches isolées de

manière plus tardive).

Enfin nous avons sélectionné deux souches (patient 17, souches 17.2 et 17.6) d'origine clonale successivement isolées à 3 ans d'intervalle (2013-2016) chez un patient colonisé pour évaluer la formation de biofilm dans un modèle dynamique sous un flux continu pendant 36 h en présence ou en l'absence d'antibiotique.

2.1.3 Patients, souches et milieux de culture

Les données décrites ci-dessous sont issues du tableau « Patients and characteristics of the MRSA collection » inclus dans les données supplémentaires de l'article. Ce tableau est visible dans le paragraphe 2.5.

Lors de la réalisation de notre étude, nous avons sélectionnés 35 patients CF suivis au CRCM de Montpellier. Parmi ces 35 patients, il y avait 16 hommes (45,7% 16/35) et 19 femmes (54,3% 19/35) soit un sexe - ratio de 0,84 (16/19).

La moyenne d'âge était de 31 ans avec une médiane de 32 ans, un âge minimum de 8 ans et un âge maximum de 58 ans. Seize patients (45,7%) étaient colonisés par des souches de SARM de manière chronique et dix-neuf patients (54,3%) étaient colonisés de manière sporadique.

Différents milieux de culture ont été utilisés selon les tests réalisés.

Afin de ré-isoler les 63 souches qui étaient congelées à -80°C, des géloses Trypticase Soja (GTS) (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) ont été utilisées.

Concernant les mesures des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des cinq antibiotiques, le bouillon Mueller-Hinton (MH), milieu de référence, a été utilisé (Figure 15).

Nous avons eu recours à l'utilisation de deux milieux de culture pour l'évaluation de la formation du biofilm et la réalisation d'ATBF : le bouillon cœur-cerveau ou Brain Heart Infusion (BHI) et l'ASM (Sriramulu et al., 2005, Dinesh, 2010), ASM qui a été filtré (0,22 µm) pour une utilisation avec le BRT®.

L'évaluation de la production de biofilm a été réalisée pour les 63 souches.

Parmi elles, 17 souches fortement adhérentes ont été utilisées pour la réalisation des ATBF.

Le BHI est un milieu de culture enrichi standard. L'ASM, quant à lui, de par sa composition riche en mucine est un milieu mimant les expectorations des patients CF. La mucine permet une augmentation de la viscosité et de la densité du milieu ASM à l'instar du mucus des patient CF.

L'étude de la capacité à former du biofilm et les ATBF ont été réalisés par le BRT® et la technique du BioFlux™ 200 (Figure 15). La technique du BRT® ne permettant pas l'utilisation de milieux denses et opaques, nous avons utilisé le milieu ASM filtré à 0,22µm. La validation de l'utilisation du milieu ASM filtré est détaillée dans le paragraphe 2.3.2.

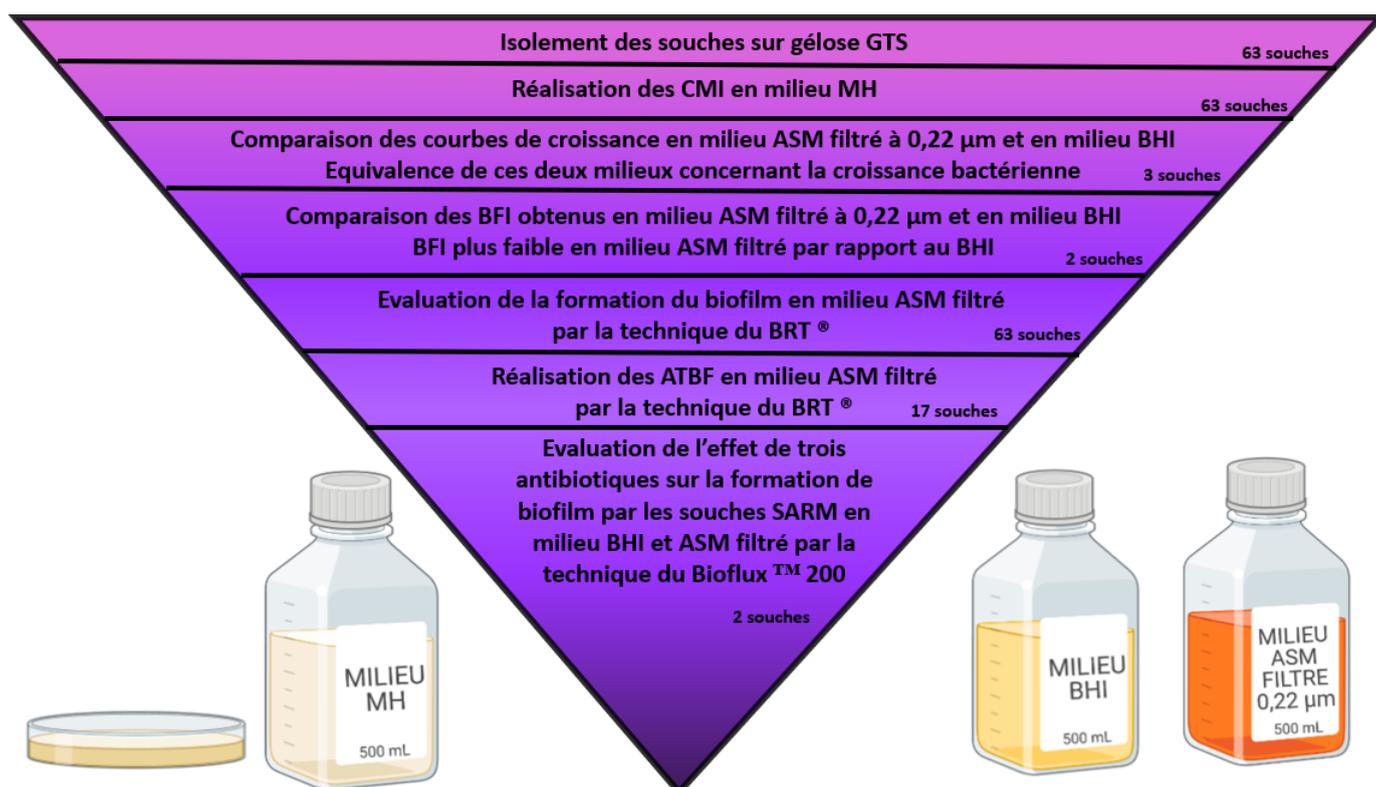


Figure 15 : Différents milieux de cultures utilisés en fonction des manipulations réalisées ASM : Artificial Sputum Medium, ATBF : Antibiofilmogramme® BFI : Index de Formation de Biofilm, BHI : Brain Heart Infusion, BRT®: Biofilm Ring Test®, CMI : Concentration Minimale inhibitrice, MH : Muller Hinton, GTS : gélose Trypticase Soja

2.1.4 Présentation des antibiotiques testés

Nous avons utilisé dans cette étude le linézolide, la rifampicine, le triméthoprime, la ceftaroline et le ceftobiprole. Le linézolide, la rifampicine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole font partie des antibiotiques les plus utilisés chez les patients CF colonisés/infectés par SARM (Epps et al., 2021). La ceftaroline et le ceftobiprole sont, quant à eux, des antibiotiques innovants réservés à des infections graves en milieu hospitalier et utilisés en dernière intention afin de prévenir les résistances (Castagnola et al., 2021).

- Le linézolide est un antibiotique de la famille des oxazolidinones dont l'action repose sur la fixation sur la partie 23S de la sous-unité 50S du ribosome bactérien. Cet antibiotique empêche ainsi la formation d'un complexe fonctionnel 70S qui est un élément majeur du processus de réplication de l'ADN bactérien (Jacqueline et al., 2003). Il possède une action bactériostatique majoritairement sur les bactéries aérobies à Gram positif (SASM, SARM, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) (Pacanowski et al., 2010).

- La rifampicine fait partie de la famille des rifamycines. Son mécanisme d'action consiste en la formation d'un complexe stable avec l'ARN polymérase des bactéries. Il s'agit d'une molécule bactéricide active sur des bactéries aérobies à Gram positif (SARM, SASM, *Streptococcus pneumoniae*) mais aussi sur des bactéries aérobies à Gram négatif comme *Haemophilus influenzae* ou encore des bactéries ne prenant pas la coloration de Gram comme *Mycobacterium tuberculosis* (Hartmann et al., 1985).

- Concernant le triméthoprime, il fait partie de la famille des diaminopyridines. Son action est bactériostatique, il est utilisé en association avec le sulfaméthoxazole de la famille des sulfamides afin d'obtenir une action synergique. En effet, le sulfaméthoxazole aura une action inhibitrice précoce sur la dihydroptéroate synthétase alors que le triméthoprime inhibera la dihydrofolate réductase empêchant ainsi la synthèse des bases puriques et pyrimidiques nécessaires à la réplication bactérienne. Cette association possède un large spectre, à la fois pour les bactéries à Gram positif (SARM, *Streptococcus pneumoniae*) et pour les bactéries à Gram négatif (*Escherichia. coli*, *Klebsiella*, *Morganella*) (Zimmermann et al., 2007).

- La ceftaroline et le ceftobiprole sont respectivement des céphalosporines de troisième et de cinquième génération. La ceftaroline est obtenue par la modification de la structure chimique du céfzoprane (Zhan et al., 2009). D'autre part, le ceftobiprole est une molécule semi-synthétique obtenue par modification du noyau céphème en C3 et C7. Il s'agit de deux molécules bactéricides à large spectre, actives à la fois sur des bactéries à Gram positif aérobies comme les SARM, SASM, mais aussi sur des bactéries à Gram négatif comme des entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*) ou *Pseudomonas aeruginosa* (Charles et al., 2017). Leur mécanisme d'action consiste en l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane bactérien par la liaison aux protéines liant les pénicillines (PLP) (Lemaoui et al., 2017). Ceci aboutit à l'inhibition de l'activité des transpeptidases et transglycosylases impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne (Lemaoui et al., 2017). Pour ces deux molécules, le cycle thiazole détermine l'efficacité contre les SARM par une forte affinité pour la PLP2a (Charles et al., 2017). De plus, elles sont capables d'induire une modification de la structure de la PLP2a en exposant le site de liaison allostérique et en formant un intermédiaire acyl-enzyme stable qui bloque les transferts d'acyle (Llarrull et al., 2010).

2.2 Méthodes utilisées au cours de l'étude

2.2.1 Technique de génotypage

2.2.1.1 Multi Locus Sequence Typing

Le Multilocus Sequence Typing (MLST) est l'une des techniques de typage les plus utilisées pour l'étude de la diversité génétique des souches et la structuration des populations bactériennes (Maiden et al., 1998). Cette méthode évalue la variation génétique au sein d'une population en ciblant des gènes stables et essentiels au métabolisme et au développement bactérien (Enright et al., 2000). Pour *Sa*, 7 gènes sont amplifiés par PCR puis séquencés : *arcC* (carbamate kinase), *aroE* (shikimate déshydrogénase), *glpF* (glycérol kinase), *gmk* (guanylate kinase), *pta* (phosphate acétyltransférase), *tpi* (triosephosphate isomérase) et *yqiL* (acétyl coenzyme A acétyltransférase) (Enright et al., 2000, Crisóstomo et al., 2001) (Tableau 2).

Tableau 2 : Amorces utilisées pour l'amplification des 7 gènes de ménage du schéma MLST de *S. aureus* (Enright et al., 2000)

Gène	Sens	Séquence des amorces (de 5' en 3')	Taille d'amplicon attendue (pb)	Nom des gènes
<i>arcC</i>	Up	CCT TTA TTT GAT TCA CCA GCG	456	Carbamate kinase
	Down	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG		
<i>aroE</i>	Up	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC	456	Shikimate déshydrogénase
	Down	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC		
<i>glpF</i>	Up	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C	465	Glycérol kinase
	Down	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC		
<i>gmk</i>	Up	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC	417	Guanylate kinase
	Down	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA		
<i>pta</i>	Up	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG	474	Phosphate acétyltransférase
	Down	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA		
<i>tpi</i>	Up	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA	402	Triosephosphate isomérase
	Down	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC		
<i>yqiL</i>	Up	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC	516	Acétyl coenzyme A acétyltransférase
	Down	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC		

pb : paire de bases

Ces gènes codent pour des protéines essentielles présentant des polymorphismes stables. Les séquences de ces gènes sont très conservées mais varient par la présence de single nucleotide polymorphism (SNP), ce qui va permettre de différencier les souches au sein d'une même espèce bactérienne.

Les séquences obtenues sont comparées à celles déjà connues et répertoriées dans des bases de données comme PubMLST (<https://pubmlst.org>). Les allèles inconnus sont alors répertoriés dans ces bases de données et l'ensemble des données est accessible librement via internet permettant un partage international de ces données. Les allèles sont identifiés par un numéro, et l'association des 7 numéros correspondant aux 7 allèles des gènes déterminent un profil allélique appelé sequence type (ST).

Ces STs peuvent ensuite être regroupés au sein d'un même complexe clonal (CC) s'ils possèdent 5 des 7 allèles identiques.

Les points forts de cette technique MLST, outre son haut pouvoir discriminant, résident dans sa grande précision et sa très bonne reproductibilité inter-laboratoire offrant la possibilité de partager des données au niveau international (Robles et al., 2004).

De plus, cette technique permet, à long terme, de définir des lignées circulantes ou des lignées inconnues. Cependant, le temps technique et le coût peuvent se révéler assez importants pour l'étude d'un grand nombre d'échantillons. De ce fait, cette technique est progressivement remplacée par l'étude des séquences génomiques totales.

Lors de notre étude, le MLST nous a permis de caractériser la diversité génétique de notre population bactérienne (63 souches génotypées par MLST).

2.2.1.2 Séquençage génomique complet ou Whole genome sequencing (WGS)

Cette technique permet pour des souches de même ST de définir s'il s'agit de souches clonales et de caractériser leur évolution génétique notamment en déterminant finement la variation de la quantité de SNP.

Le séquençage total permet une analyse complète du génome bactérien. Afin de séquencer le génome d'une souche de SARM, l'extraction de son ADN est réalisée. Suite à cette extraction, l'ADN obtenu est alors coupé en différents fragments par des enzymes (Ribarska et al., 2022) puis amplifié par PCR.

L'ensemble de ces fragments constitue une banque d'ADN ou ADN library (Balloux et al., 2018). Ces fragments de cinquante à quatre cents paires de bases (pb) sont analysés par séquenceur qui va coder l'enchaînement des nucléotides de l'ADN en fichiers de lettres correspondantes. Ces fichiers sont appelés des reads.

Les reads sont ensuite alignés et comparés à un génome de référence (Ng et al., 2010). Dans le cas des souches de SARM, la séquence génomique de la souche *Sa 300_FPR3757* est utilisée comme séquence de référence (accès à la séquence de référence GCF_000013465.1) (Chu et al., 2016, Krueger et al., 2021). Des logiciels de bioinformatique (Köser et al., 2012) permettent cet alignement et la comparaison des reads avec le génome de référence afin de reconstituer des séquences de plus grande taille ou contigs (Balloux et al., 2018) (Figure 16).

Cette technique a donc le potentiel de détecter et les SNPs dans l'ensemble du génome d'une souche (Van El et al., 2013). Par ailleurs, le coût financier de cette technique diminue la rendant utilisable par de nombreux laboratoires (Van El et al., 2013).

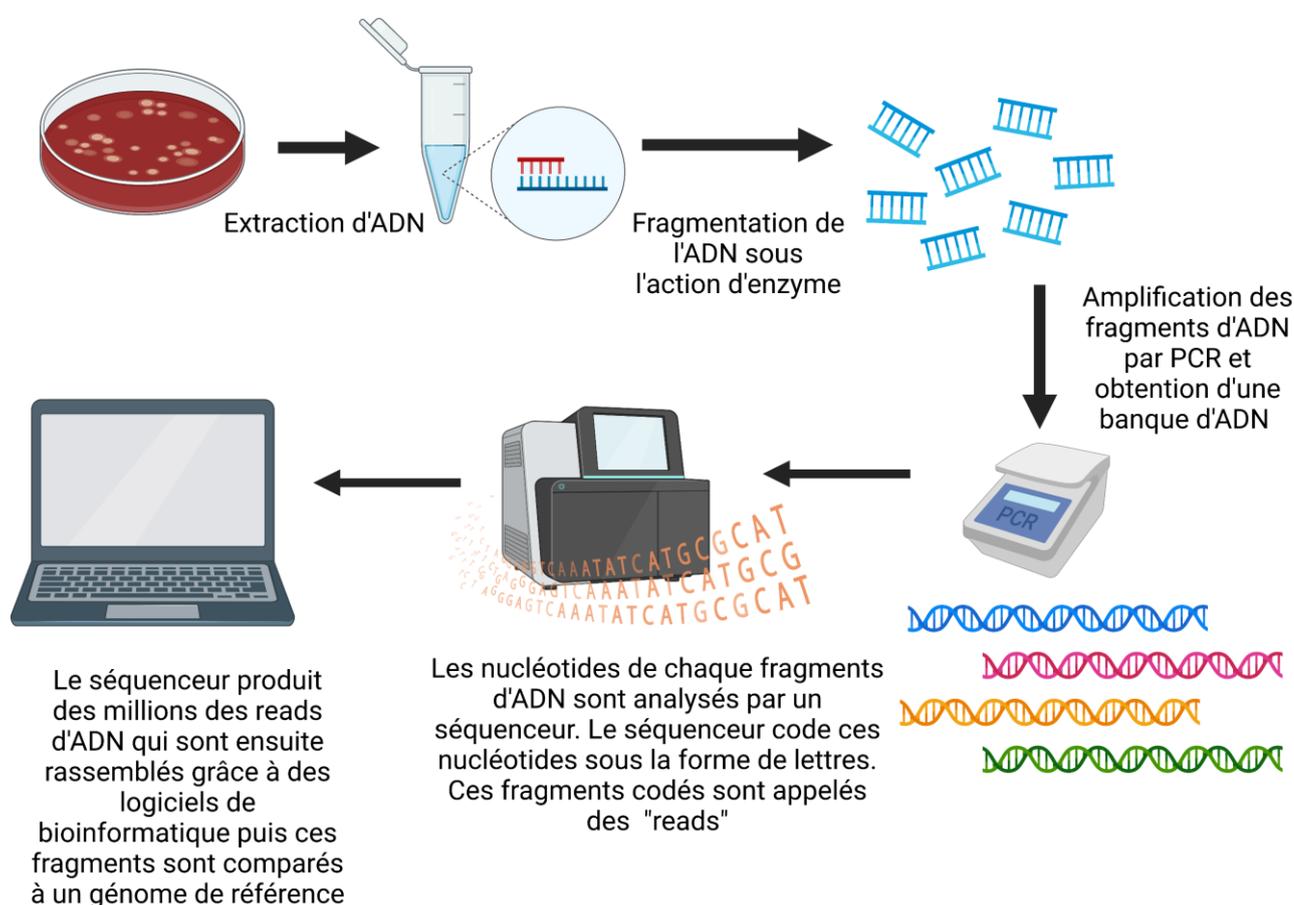


Figure 16 : Différentes étapes du séquençage total du génome bactérien. ADN : acide désoxyribonucléique, PCR : polymerase chain reaction

Dans le cadre de la partie longitudinale de notre étude, nous avons séquencé entièrement le génome de onze souches isolées de 4 patients CF colonisés de manière chronique. Parmi ces onze souches, six ont été isolées

en 2016 et cinq étaient isolées trois à neuf ans avant chez ces mêmes patients. Nous avons ainsi pu déterminer le nombre de SNP présents entre ces deux catégories de souches.

2.2.2 Utilisation de méthodes innovantes d'étude de la formation de biofilm

2.2.2.1 Détermination de l'adhésion précoce bactérienne par Biofilm Ring Test® (BRT®)

Le Biofilm Ring Test® permet d'étudier les étapes d'adhérence réversible puis définitive du biofilm (Chavant et al., 2007). Son principe de fonctionnement repose sur la mesure de l'emprisonnement de billes magnétiques dans le biofilm éventuellement formé (Figure 17) (Olivares et al., 2016).

En pratique, une suspension bactérienne réalisée en BHI est calibrée à une densité optique de 0,5 pour une longueur d'onde de 600 nm. Cette suspension est mélangée à des microbilles magnétiques avant d'être déposée dans les puits d'une microplaque 96 puits. La nature du matériau et le degré de granulométrie de la plaque peuvent faire varier la quantité de biofilm formé par les bactéries (verre, polystyrène, lisse, granuleux,...) (Boutaleb et al., 2008, Moulin et al., 2008). Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des microplaques 96 puits en polystyrène lisse à fond plat comme décrit dans l'étude de Olivares et al., en 2016.

Les microplaques sont ensuite incubées à 37 °C. Suite à cette incubation, un liquide de contraste est ajouté aux différents puits de la microplaque afin d'optimiser la lecture de la plaque. Celle-ci est alors magnétisée une minute par l'intermédiaire du Block test : l'application de ce support aimanté sous la microplaque engendre un champ magnétique agglomérant les billes en un point visible au fond des puits en l'absence de biofilm (Pouget et al., 2022). En présence de biofilm, les billes magnétiques vont être piégées dans ce biofilm et ne pourront plus se déplacer sous l'attraction de l'aimant (absence de spot) (Chavant et al., 2007).

La lecture du fond des puits de la microplaque se fait à l'aide d'un lecteur spécifique conçu par la société BioFilm Control commercialisant le BRT ® : le Biofilm reader. Une analyse d'images à l'aide du logiciel BFC Elements ® génère un score d'agrégation des billes, l'Index de Formation de BioFilm (BFI) pour chacun des puits analysés.

Il s'agit donc d'un indice représentant le niveau d'agrégation des microparticules magnétisables sous l'action du biofilm bactérien en fonction du temps. Celui-ci est inversement proportionnel à la capacité d'adhésion des souches. Sa valeur est inférieure à 2 pour les souches fortement adhérentes et supérieure à 8 pour celles faiblement adhérentes. Les souches ne produisant pas de biofilm ont un BFI égal à 20 à l'instar des témoins négatifs (Pouget et al., 2021). Grâce au BFI, il est possible d'identifier en moins de 24h les souches

bactériennes capables d'adhérer précocement. Des mesures successives de BFI peuvent également permettre d'étudier la cinétique de formation du biofilm précoce.

Le BRT® ne génère pas des résultats laboratoire dépendant ou manipulateur dépendant de par l'absence de fixation, lavage ou marquage au contraire de la méthode utilisant le marquage par Crystal Violet par exemple (Azeredo et al., 2017, Magana et al., 2018).

Cependant, cette technique ne peut pas être appliquée à l'étude de suspensions bactériennes en milieux opaques. Le milieu ASM ne peut donc pas être utilisé avec cette méthode justifiant le fait que nous avons réalisé des tests afin de valider son utilisation après filtration afin de pouvoir tout de même utiliser le milieu ASM pour nous rapprocher des condition *in vivo*.

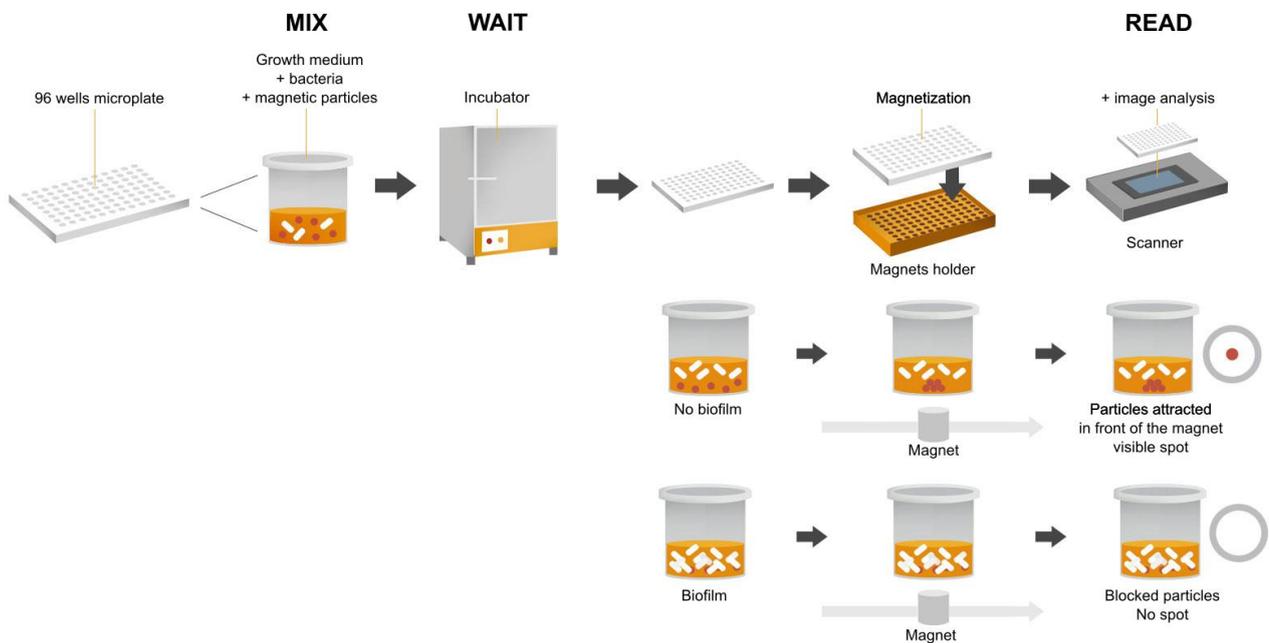


Figure 17 : Technologie du Biofilm Ring Test® Source <http://www.biofilmcontrol.com/fr/la-technique/>

2.2.2.2 Observation de l'efficacité anti biofilm des antibiotiques par la technique de l'antibiofilmogramme® et sa mise en œuvre

Une application supplémentaire du système BRT ® consiste en la caractérisation de la cinétique d'adhésion d'une souche bactérienne en présence de différentes concentrations d'antibiotiques (Antibiofilmogramme ® : ATBF).

Cette technique permet d'identifier les antibiotiques conservant une action anti SARM dans le biofilm et permet de déterminer la CMiB (Olivares et al., 2016).

Toutes les étapes du protocole de l'ATBF sont identiques à celles de l'évaluation de l'adhésion d'une souche

bactérienne décrites dans le paragraphe précédent. Seul diffère l'ajout d'antibiotiques lors de la préparation des microplaques. Toujours à l'aide du BFI, il sera possible d'identifier en moins de 24h, les antibiotiques susceptibles de retarder ou d'inhiber les étapes précoces de la formation de biofilm, en comparaison à l'adhésion de la souche analysée en l'absence d'antibiotique (Olivares et al., 2017). Une gamme de dilutions d'antibiotique est réalisée pour chaque antibiotique testé puis ajoutée à la suspension bactérienne et aux microbilles magnétiques (Tableau 3). Après une incubation statique à 37 °C, le liquide de contraste est ajouté aux puits de la microplaque qui est alors magnétisée par l'intermédiaire du Block test et scannée à l'aide du Biofilm reader (Olivares et al., 2016). Comme pour une mesure d'adhésion en l'absence d'antibiotique, la force d'adhésion des micro-organismes en contact avec les antibiotiques est exprimée par le BFI. La CMib est obtenue lorsque le BFI du mélange suspension bactérienne, antibiotique, microbilles aimantées atteint la valeur du BFI des témoins négatifs (Olivares et al., 2017).

Tableau 3 : Concentration des gammes de dilution d'antibiotiques utilisées

Antibiotique	Gamme des concentrations testées lors de notre étude (mg/L)							
Linézolide	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Rifampicine	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
Triméthoprim	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Ceftaroline	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Ceftobiprole	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32

2.2.2.3 Evaluation de la production dynamique de biofilm par le BioFlux™ 200

La cinétique de formation et la quantification du biofilm formé en l'absence et en présence d'antibiotiques a été évaluée avec le système BioFlux™ 200 (Naudin et al., 2019) avec deux milieux (BHI et ASM).

Dans ce système qui est un outil microfluidique d'imagerie cellulaire, la formation de biofilm est étudiée sous un flux de cisaillement dont le débit peut être contrôlé manuellement. Sa formation est suivie par microscopie optique (Benoit et al., 2010). Le système se compose d'une plaque de 48 puits avec une connexion microcanaulaire entre 24 paires de deux types de puits (puits d'entrée et puit de sortie) (Figure 18).

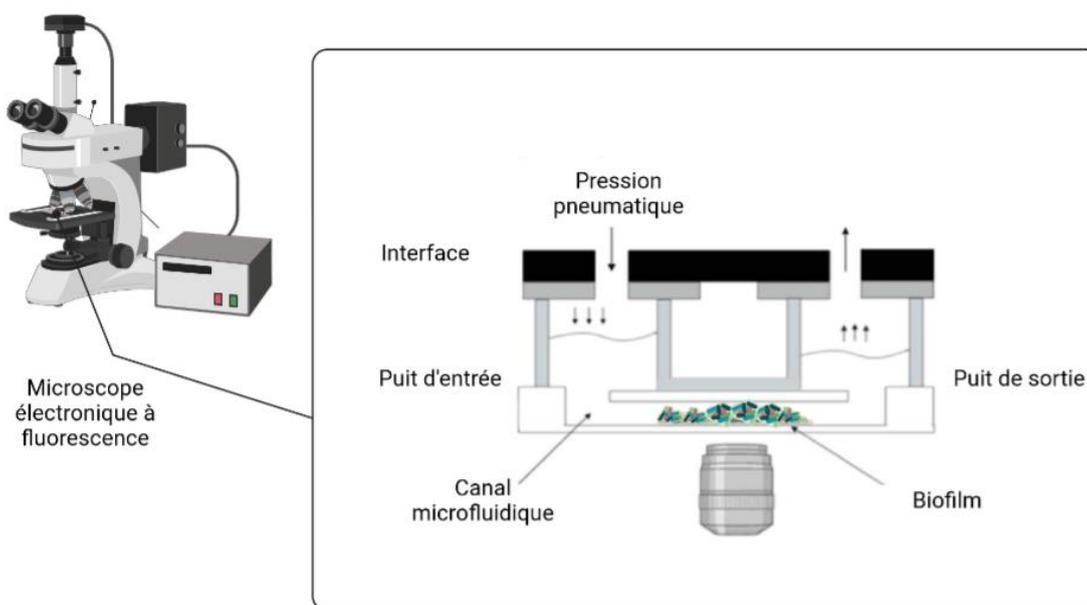


Figure 18 : Dispositif microfluidique BioFlux™ 200 permettant d'observer la formation dynamique de biofilm (d'après Pouget et al., 2021).

Afin d'enclencher la mise en route du système de BioFlux™ 200, nous ajoutons dans le canal microfluidique le milieu testé (BHI ou ASM) dans tous les puits d'entrée pendant dix minutes à une pression de 1 dyne/cm². Le milieu est évacué par les puits de sortie. Une fois les dix minutes écoulées, le milieu restant dans les puits d'entrée est éliminé. Une suspension bactérienne calibrée à une DO 0,1 (longueur d'onde λ à 600 nm) est ensuite ajoutée dans les puits d'entrée pour 36 h d'incubation à 37 °C avec une pression de 0,2 dyne/cm² (Pouget et al., 2021). La suspension bactérienne est ajoutée soit seule, soit en présence d'un antibiotique. Pour cette dernière condition, la suspension bactérienne est ajoutée à la solution d'antibiotique dont la concentration est la CMib déterminée par l'ATBF.

La quantification de la formation de biofilm est effectuée 5, 12, 24 et 36 h après l'inoculation en l'absence d'antibiotiques et à 5, 12 et 36 h après l'inoculation en présence d'antibiotiques.

Les biofilms sont visualisés avec un microscope à fluorescence inversé Leica DM IRB couplé à une caméra noir et blanc CoolSNAP FX (Roper Scientific, Trenton NJ, États-Unis).

Le logiciel ImageJ® permet d'obtenir des clichés photographiques de la formation du biofilm en ajustant les niveaux de gris (Pouget et al., 2021). Un calcul d'aire est alors effectué afin de déterminer par rapport à l'aire totale de l'image, l'aire occupée par le biofilm produit. Nous obtenons par la suite le pourcentage de production du biofilm en réalisant le ratio de l'aire du biofilm par rapport à l'aire totale. Les expériences ont été réalisées en duplicats.

Le Bioflux™ 200 permet d'observer les phases d'adhésion, de maturation et de dispersion du biofilm en fonction du temps en instaurant une force de cisaillement paramétrée manuellement. Contrairement à une approche statique, cette technique dynamique permet d'éviter l'accumulation de produits métaboliques et l'appauvrissement des ressources nutritives. De plus ce système s'associe avec différents dispositifs de microscopie (contraste de phase, confocale).

Dans le cadre de l'utilisation de cette technique, nous avons sélectionné deux souches issues du patient 17 (la souche 17.2 isolée en 2013 et la souche 17.6 isolée en 2016). Ces souches ont été choisies pour leur forte capacité d'adhérence (BFI = 0), suite aux résultats du BRT® mais aussi pour leurs caractéristiques génétiques. Ces souches sont clonales (différence de SNP égale à 18). Nous voulions par cette sélection, rechercher des différences quantitatives de production de biofilm entre ces deux souches en 36 h, en l'absence d'antibiotiques.

Nous avons également sélectionné à la suite des résultats des ATBF, les trois antibiotiques montrant l'efficacité anti SARM en biofilm la plus forte : le linézolide, la ceftaroline et le ceftobiprole. Nous avons souhaité évaluer la sensibilité de ces deux souches à ces antibiotiques en fonction du temps (36 heures) en présence de biofilm.

2.3 Principaux résultats obtenus

2.3.1 Diversité génétique des souches de SARM

L'analyse MLST a montré que les 63 souches appartenaient à 10 ST. Les SARM de ST5 (50,8 % des souches 32/63 et 48,6 % des patients 17/35) et de ST8 (30,2 % des souches 19/63 et 31,4 % des patients 11/35) étaient les plus fréquents. Ces 2 ST représentaient 81 % des souches (51 souches/63) et ont été identifiés chez 80 % des patients (28 patients/35) (Figure 19).

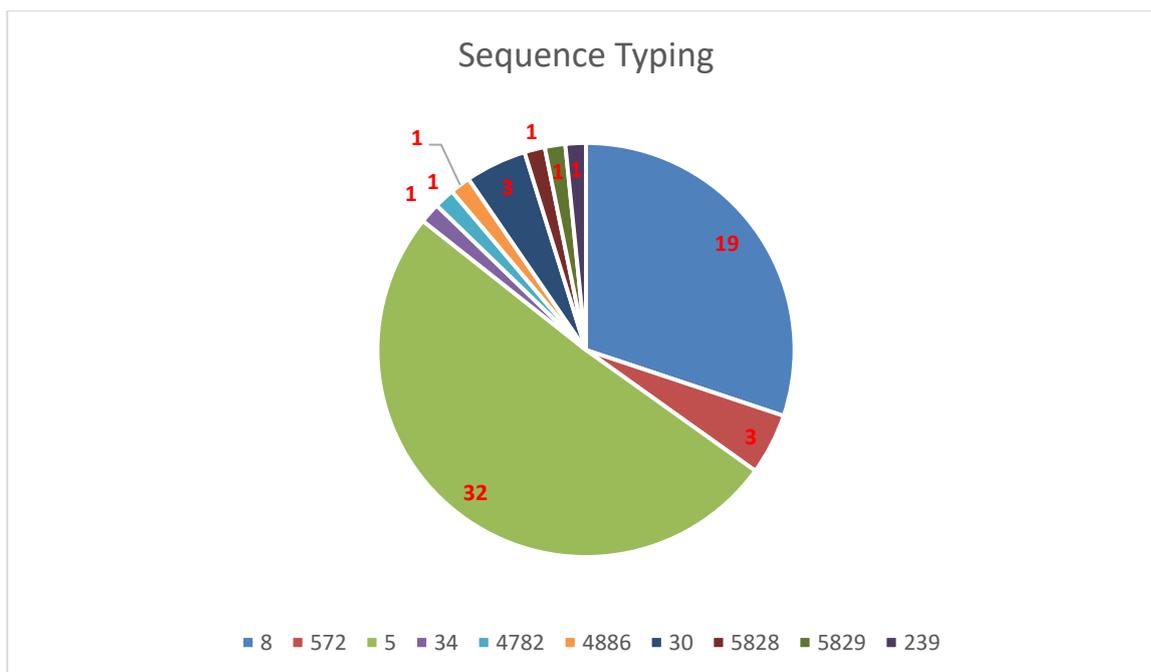


Figure 19 : Répartition des Sequences Types (ST) des 63 souches étudiées

Les ST5 et ST4782 font partie du même complexe clonal (CC), le CC5 et ont été isolés d'un même patient (Patient 14). Ces deux ST diffèrent d'une mutation présente dans le gène *aroE*. De même, les ST 8 et ST5829 font partie du CC8, ont été isolés du patient 33 et diffèrent de cinq mutations présentes au sein du gène *gmK*. Pour chacun de ces deux patients, les souches présentant 2 STs proches ont donc été considérées comme des variants adaptatifs.

Concernant le séquençage total effectué pour onze souches issues de quatre patients CF colonisés de manière chronique, les résultats montrent, pour chaque couple de souches, une quantité de SNP inférieure à 123 montrant une faible variabilité entre les souches les plus précocement (2007 à 2013) et les plus tardivement isolées (2016) (Ankrum et Hall., 2017). Le couple de souches présentant le moins de variation est le couple de souches 18.1/18.2 isolées du patient 18 à 5 années d'intervalle alors que le couple présentant le plus de variations est le couple de souches 5.1/5.3 isolées du patient 5 à 9 années d'intervalle (Figure 20).

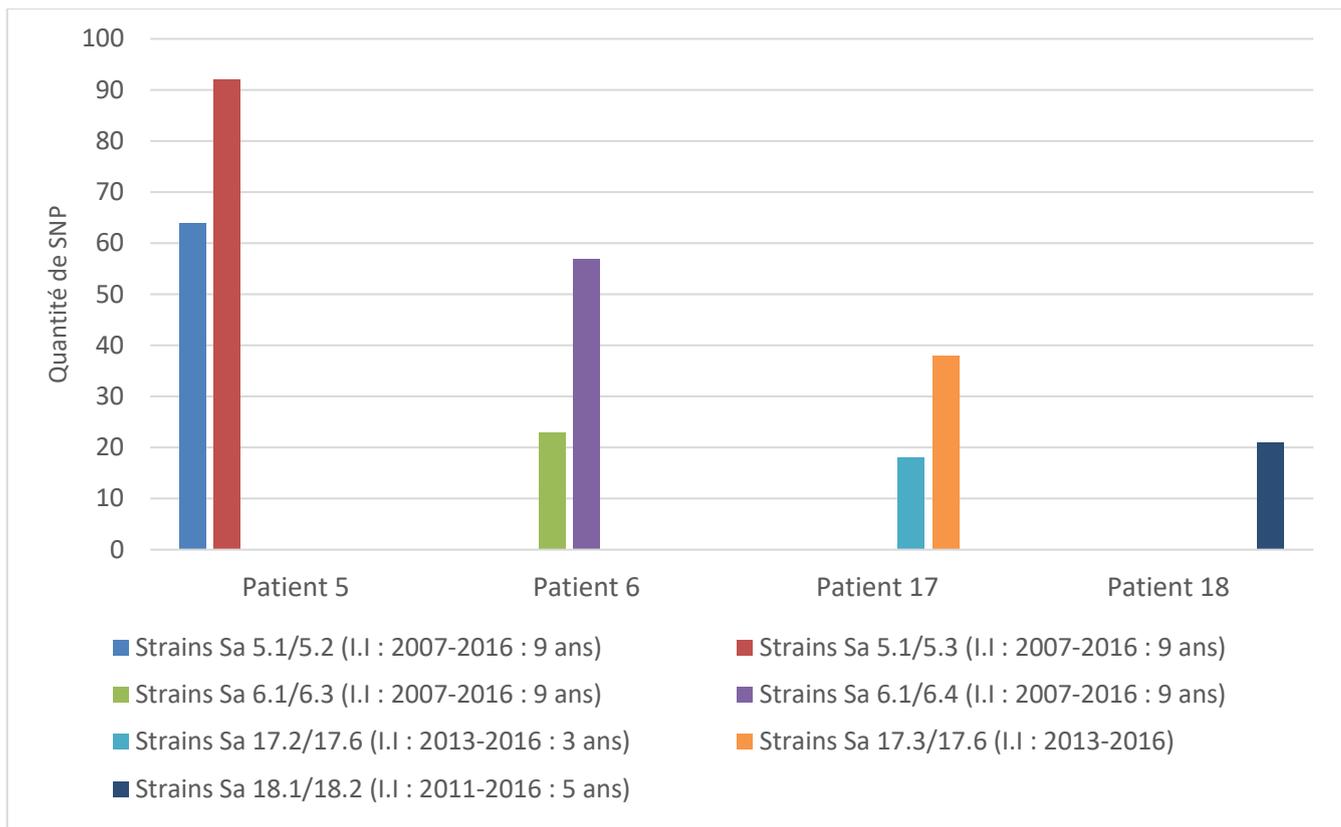


Figure 20 : Nombre de SNP entre des paires de souches de SARM isolées chez 4 patients colonisés chroniquement. I.I : intervalle d'isolements pour chaque couple de souches

2.3.2 Validation du milieu ASM filtré pour son utilisation avec le BRT®

L'un des objectifs de notre étude était de valider l'utilisation du milieu ASM filtré avec la technique du BRT®. Nous avons donc évalué l'impact de la filtration de l'ASM en réalisant des courbes de croissance et en comparant la croissance de trois souches de SARM en milieu BHI, ASM et ASM filtré à 0,22µm ; le milieu BHI étant le milieu de référence utilisé pour la technique du BRT®.

Les trois souches utilisées sont les souches 5.3 (patient 5), 6.4 (patient 6) et 17.6 (patient 17). Il s'agit de souches colonisant les patients de manière chronique et ce respectivement depuis 2003, 2003 et 2001. Ces souches ont été sélectionnées pour leur faible BFI. En effet, ces trois souches ont un BFI < 1 et sont donc considérées comme fortement productrices de biofilm (souche 5.3 : BFI de 0,75, souche 6.4 : BFI de 0,25 et souche 17.6 : BFI de 0).

La croissance bactérienne a été suivie en réalisant des dénombrements bactériens après 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h et 24h d'incubation.

Les figures 21, 22 et 23 ne montrent pas de différence significative concernant la croissance des trois souches au sein des trois milieux évalués. Nous montrons donc que la filtration du milieu ASM n'a pas eu de conséquence sur la croissance des souches.

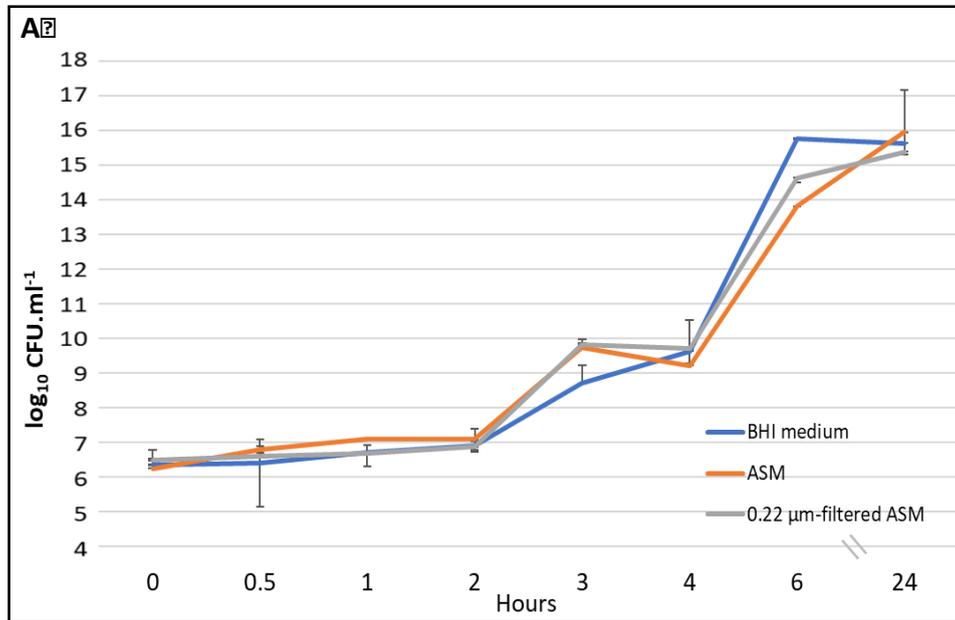


Figure 21 : Comparaison de la croissance bactérienne de la souche de SARM CF 5.3 dans le milieu BHI, l'ASM et l'ASM filtré à 0,22 µm durant une période de croissance de 24 heures

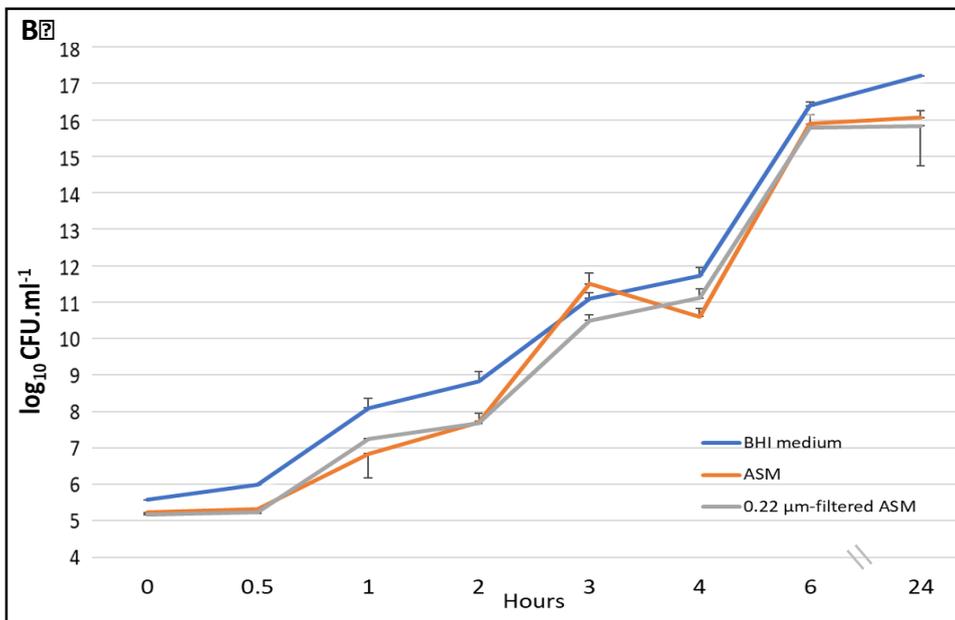


Figure 22 : Comparaison de la croissance bactérienne de la souche 6.4 de SARM CF dans le milieu BHI, l'ASM et l'ASM filtré à 0,22 µm durant une période de croissance de 24 heures

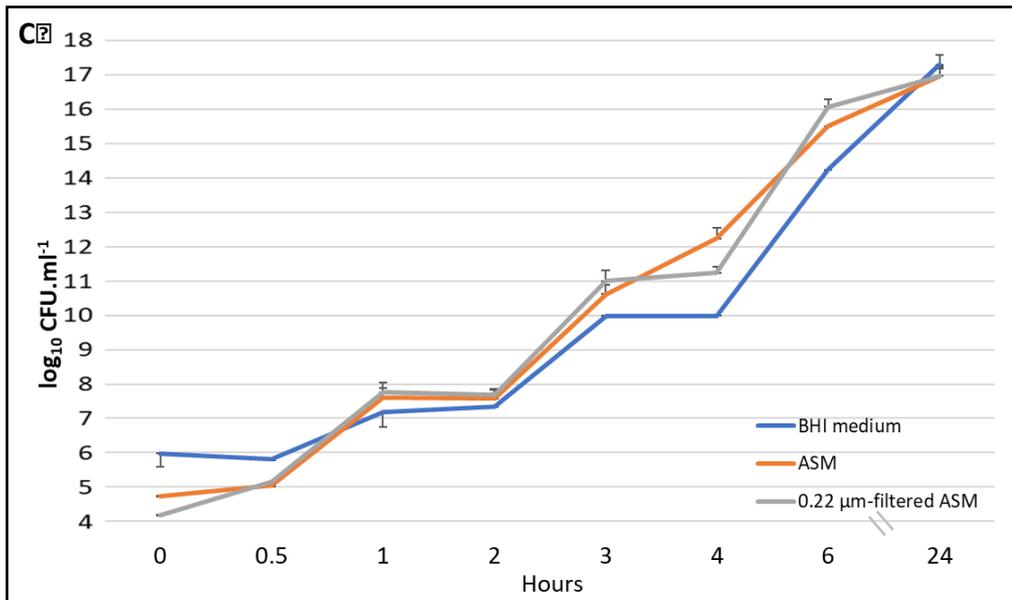


Figure 23 : Comparaison de la croissance bactérienne de la souche 17.6 de SARM CF dans le milieu BHI, l'ASM et l'ASM filtré à 0,22 µm durant une période de croissance de 24 heures

L'utilisation du milieu ASM sans filtration par la technique du BRT® amène à une valeur de BFI aberrante empêchant l'utilisation du milieu ASM pour réaliser le BRT®.

Le milieu ASM filtré, quant à lui, est utilisable par la technique de BRT® permettant d'obtenir une valeur de BFI équivalente à celle du BFI obtenu pour le milieu BHI recommandé par le fabricant. (Figure 24).

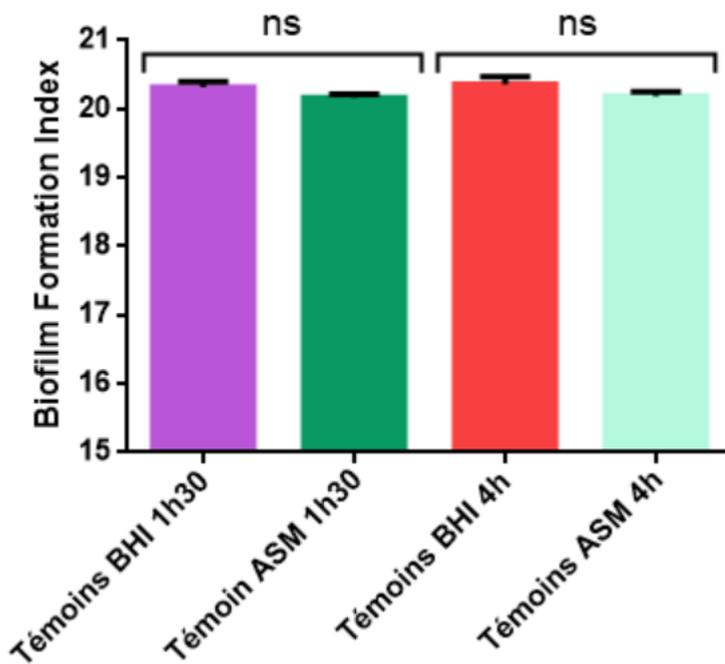


Figure 24 : Comparaison des index de formation de biofilm (BFI) des témoins négatifs en fonction du milieu de culture et du temps (non significatifs ns par Mann-Whitney U test). BHI : Brain Heart Infusion, ASM filtré: Artificial Sputum Medium filtré.

Cette filtration à 0,22 μm du milieu ASM a donc été jugée suffisante pour permettre son utilisation avec le BRT®.

Nous avons ensuite comparé les résultats de BFI obtenus en milieux ASM filtré et BHI après 4 h d'incubation pour deux souches de SARM CF, 5.3 et 6.4. Des différences d'adhésion ont été observées selon le milieu utilisé, avec des valeurs de BFI plus faibles avec l'ASM filtré par rapport au milieu BHI. L'adhérence de la souche 5.3 était significativement plus forte dans l'ASM filtré par rapport au milieu BHI (Figure 25). Un BFI plus faible en ASM filtré par rapport au BHI a également été observé pour la souche 6.4 même si la différence n'était pas statistiquement significative.

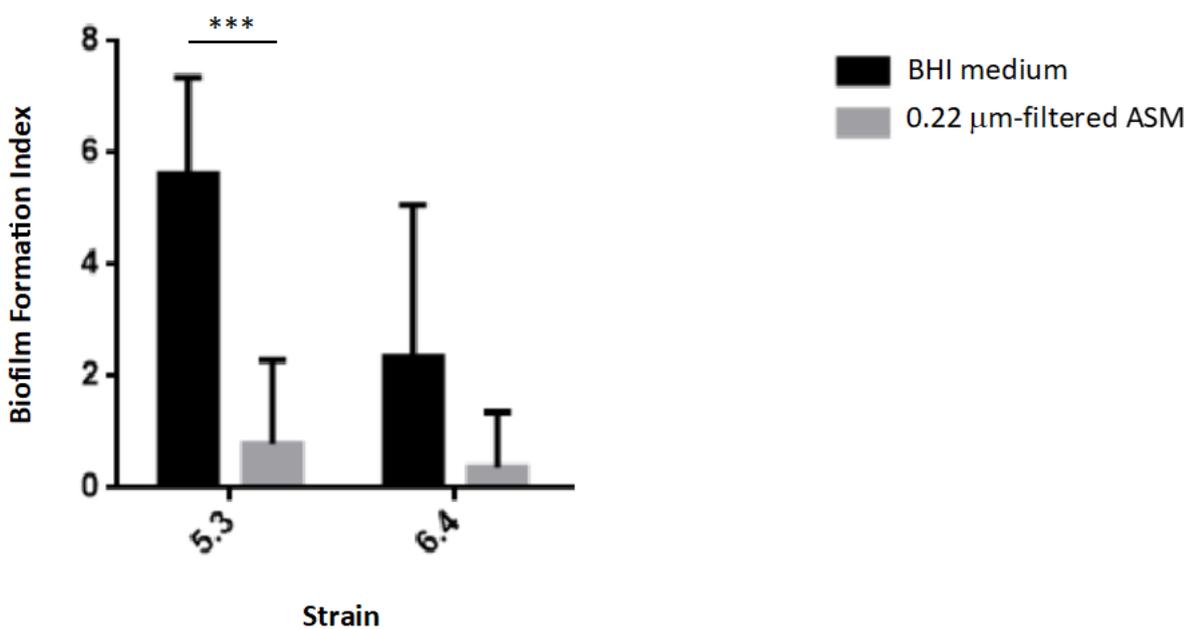


Figure 25 : Comparaison du BFI déterminé par le BRT® selon le milieu de culture pour 2 souches de SARM CF après une incubation de 4h à 37 °C (***, valeur de $p < 0,001$ par Mann-Whitney U test).

Suite à ces tests, l'évaluation de l'adhérence par la technique du BRT® a été effectuée pour les 63 souches de notre étude en milieu ASM filtré.

2.3.3 Évaluation des phases précoces de la formation de biofilm à l'aide du BRT®

L'étude des 63 souches de SARM par le BRT® en milieu ASM filtré a montré une répartition en 3 groupes en fonction du BFI mesuré après 4 heures d'incubation (Figure 26).

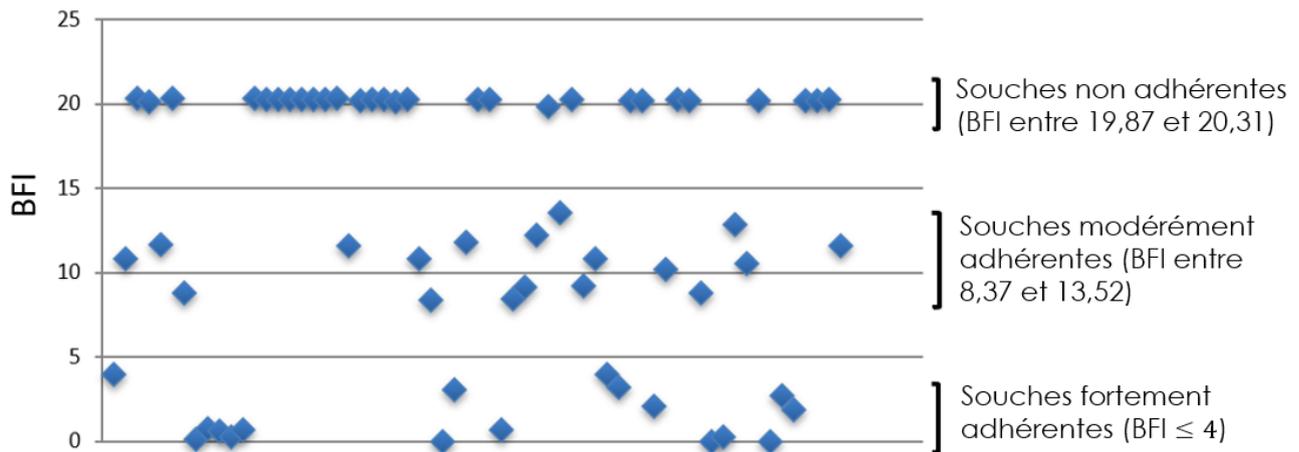


Figure 26 : Distribution des 63 souches de SARM CF au sein de 3 groupes. BFI : Index de Formation de biofilm

Sur la base de cette distribution, toutes les souches ayant un BFI inférieur à 4 ont été considérées comme fortement adhérentes, soit fortement productrices de biofilm ; les souches avec un BFI compris entre 8,37 et 13,52 ont été considérées comme modérément adhérentes/productrices du biofilm et les souches ayant un BFI compris entre 19,87 et 20,31 ont été considérées comme non adhérentes / non formatrices du biofilm dans les conditions de notre étude.

Au total, 27 % des souches de notre étude (17/63) (37,1% des patients, 13/35) étaient fortement adhérentes après 4 heures d'incubation en ASM filtré (BFI < 4). Deux souches de ST5 (souches 17.6 et 30.1) étaient fortement adhérentes dès une heure et trente minutes d'incubation. Les souches 17.6 et 30.1 ont été isolées respectivement des patients 17 et 30. Le patient 17 est un patient colonisé de manière chronique dont la primo colonisation date de 2001 alors que le patient 30 est un patient colonisé de manière sporadique par SARM. Presque toutes les souches (94,1%, 16/17) qui étaient fortement adhérentes appartenaient aux ST 5 et 8.

Par ailleurs, 28,6% des souches (18/63) (37,1% des patients 13/35) avaient des valeurs de BFI intermédiaires (8,37-13,52). Leur profil d'adhésion nécessiterait un temps d'incubation plus long afin d'être caractérisé avec plus de précision.

Enfin, 44,4% des souches (28/63) (25,7% des patients, 9/35) n'ont pas montré d'adhésion dans les conditions de notre étude.

2.3.4 Influence des antibiotiques sur la formation de biofilm des SARM

2.3.4.1 Effet des antibiotiques sur la production de biofilm des SARM par la technique de l'ATBF

Nous avons sélectionné les 17 souches ayant une forte capacité à adhérer en BRT® dans le milieu ASM filtré. Nous avons déterminé la sensibilité de ces souches aux antibiotiques en nous basant sur les recommandations du CA-SFM (CA-SFM, 2022). Les CMI critiques fixées pour ces cinq antibiotiques sont présentées dans le tableau ci-dessous, une souche présentant une CMI supérieure à cette CMI seuil sera déclarée résistante à l'antibiotique (Tableau 4).

Tableau 4 : Valeur des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) critiques définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) pour les antibiotiques suivants : linézolide, rifampicine, triméthoprim, ceftaroline et ceftobiprole.

Antibiotiques	CMI critique (en mg/L)
Linézolide	4
Rifampicine	0,5
Triméthoprim	4
Ceftaroline (pneumonies)	1
Ceftobiprole	2

La détermination des CMI des cinq antibiotiques considérés dans cette étude a montré que les souches étaient sensibles pour 82,4% d'entre elles au linézolide et pour 100% d'entre elles au triméthoprim, à la ceftaroline et au ceftobiprole. La sensibilité à la rifampicine était plus faible (35,3% des souches) (Figure 27).

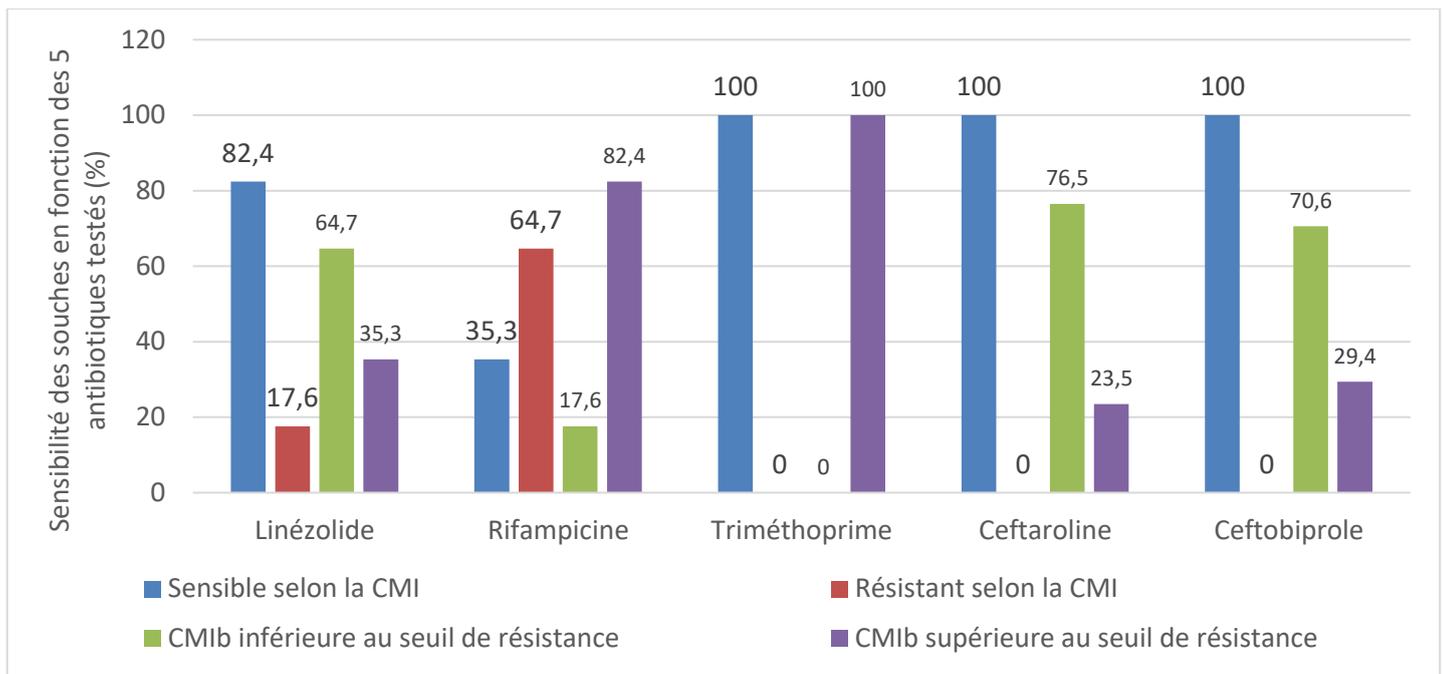


Figure 27 : Sensibilité des souches selon la valeur de la CMI et de la CMib (%)

Les CMib ont ensuite été déterminées en utilisant l'ATBF en ASM filtré.

Des profils très distincts de CMib ont été observés selon l'agent antimicrobien. Les souches testées possédaient une CMib en dessous du seuil de résistance pour le linézolide (64,7%), la ceftaroline (76,5%) et le ceftobiprole (70,6%). Concernant le triméthoprim et la rifampicine, respectivement 100% et 82,4 %, des souches avaient des CMib au-dessus du seuil de résistance montrant que ces deux antibiotiques étaient inefficaces sur l'initiation de la formation de biofilm.

2.3.4.2 Etude longitudinale des SARM issus de 4 patients atteints de mucoviscidose

Sur la base des résultats précédents et afin de réaliser une étude longitudinale, nous avons sélectionné les souches étant fortement adhérentes avec un BFI <4 et isolées de patients présentant une colonisation chronique, soit au total six souches (5.2, 5.3, 6.3, 6.4, 17.6, 18.2) isolées de quatre patients (patients 5, 6, 17 et 18) en 2016.

Cinq souches (5.1, 6.1, 17.2, 17.3, 18.1) isolées antérieurement chez ces quatre patients et présentant également un BFI < 4 ont été sélectionnées. Ces souches isolées antérieurement datent de 2007 concernant les souches 5.1 et 6.1 (soit neuf ans d'intervalle entre les souches étudiées pour les patients 5 et 6), de 2013 pour les souches 17.2 et 17.3 (soit trois ans d'intervalle entre les souches étudiées pour le patient 17), de 2011 pour la souche 18.1 (soit cinq ans d'intervalle entre les souches étudiées pour le patient 18) (Figure 28).

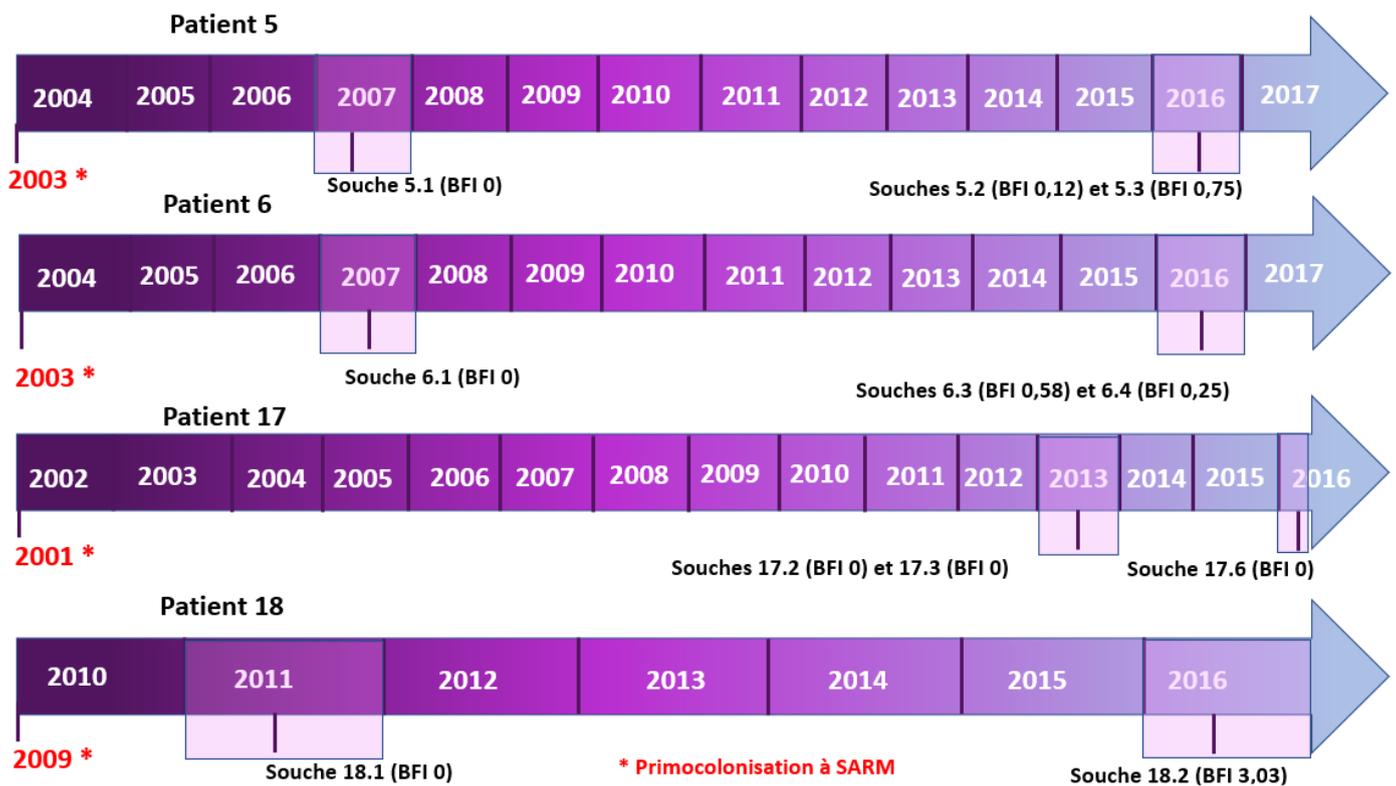


Figure 28 : Chronologie de colonisation des patients CF 5,6, 17 et 18 par les souches de SARM étudiées

La primocolonisation par du SARM de ces patients CF date de 2003 pour les patients 5 et 6, de 2001 pour le patient 17 et de 2009 pour le patient 18.

L'analyse des séquences génomiques des souches (isolées antérieurement et plus récemment) a montré la clonalité de ces souches. En effet, il a été observé au sein des souches les plus précocement isolées et celles isolées de manière plus récente, un nombre de SNP inférieur à 123, soit une variabilité entre ces souches compatible avec une origine clonale en accord avec les critères publiés par Ankrum et al. (Ankrum et Hall., 2017).

Les CMI ont été déterminées et un ATBF a été réalisé afin d'obtenir les CMIB de chaque souche isolée précocement. Les valeurs de CMI et de CMIB des cinq antibiotiques étaient toutes inférieures au seuil de sensibilité du CA-SFM pour les cinq souches les plus précocement isolées.

Pour les souches plus tardivement isolées et qui sont restées sensibles aux agents antimicrobiens en culture planctonique, nous avons montré que la ceftaroline et le ceftobiprole ont conservé leur capacité à empêcher la formation de biofilm (CMIB inférieures aux seuils de résistance du CA-SFM correspondants) entre 2007 et 2016 (Patient 5 et 6). Le linézolide (Patients 17 et 18) a conservé cette capacité pour des souches isolées à trois ans d'intervalle chez le patient 17 et pour des souches isolées à cinq ans d'intervalle pour le patient 18.

La pression de sélection antibiotique a été évaluée en colligeant les traitements reçus par les patients. La plus importante a été notée pour le linézolide et les patients 5 et 6. Trois des quatre souches isolées chez ces patients étaient résistantes au linézolide (résistance étudiée dans Boudet et al., 2021 et reliée à une substitution G2576T présente dans un nombre variable de copies du gène codant l'ARN ribosomique 23S). Pour les souches isolées chez les patients 17 et 18 (qui avaient reçu moins de cures de linézolide au cours de leur suivi), une augmentation des CMib a été observée entre 2013 et 2016 pour le patient 17 et entre 2011 et 2016 pour le patient 18. Cependant, les CMib de linézolide des souches sont restées inférieures au seuil de résistance.

A l'inverse, bien qu'un faible nombre de cures de rifampicine et de triméthoprime (éventuellement associés) ait été noté chez les quatre patients, les deux antibiotiques n'étaient plus actifs sur les souches les plus tardivement collectées qui présentaient des CMI et/ou des CMib supérieures aux seuils de résistance correspondants.

Aucun des patients n'avait reçu de ceftaroline ou de ceftobiprole.

2.3.4.3 Dynamique de formation de biofilm sous flux en présence et absence d'antibiotiques

Pour compléter la caractérisation de la formation de biofilm des SARM CF en présence ou en l'absence d'antibiotiques, une étude a été réalisée dans des conditions dynamiques à l'aide du système microfluidique BioFlux™ 200.

Nous avons sélectionné la souche 17.6, l'une des deux souches fortement adhérentes après 1,5 h d'incubation d'après le BRT® et la souche 17.2 isolée 3 ans auparavant chez le même Patient 17. Pour ces souches appariées et clonales (18 SNPs de différence entre les séquences génomiques totales) nous avons comparé la dynamique de formation de biofilm selon le milieu de culture (BHI ou ASM). La formation de biofilm a augmenté régulièrement au cours du temps pour chaque condition. Bien que les deux souches aient montré une capacité d'adhésion élevée avec le BRT®, les résultats de l'expérience en BioFlux™ 200 ont révélé que les souches 17.2 et 17.6 avaient chacune une dynamique distincte de formation de biofilm, avec une formation de biofilm plus lente pour la souche « précoce » 17.2.

Nous avons testé avec le BioFlux™ 200 l'effet du linézolide, de la ceftaroline et du ceftobiprole sur la formation de biofilm de ces deux souches.

Le pourcentage de biofilm formé en présence d'antibiotique était drastiquement inférieur à celui observé pour le contrôle sans antibiotique montrant que les trois antibiotiques avaient la capacité de limiter la formation de biofilm et que cet effet était persistant puisqu'il a été observé jusqu'à 36 h après l'exposition à la CMib de l'agent antimicrobien correspondant dans les deux milieux BHI et ASM. Une inhibition significativement plus élevée du biofilm formé par la souche 17.2 a été observée à partir de 12 h d'incubation et jusqu'à 36 h

d'incubation pour la ceftaroline et le ceftobiprole par rapport au linézolide (valeurs de $p < 0,05$ à 12 h ; valeurs de $p < 0,01$ à 36h).

Les différences observées entre la ceftaroline et le ceftobiprole étaient également statistiquement significatives (valeur de $p < 0,05$ à 36 h), la ceftaroline étant plus active dans l'inhibition de la formation de biofilm que le ceftobiprole après 12 h, tandis que le ceftobiprole était plus actif dans l'inhibition de la formation de biofilm que la ceftaroline après 36 h. L'inhibition de la formation de biofilm par la souche « tardive » 17.6 dans l'ASM était plus prononcée avec le ceftobiprole qu'avec le linézolide (valeurs de $p < 0,01$ à 12 et 36 h) ou la ceftaroline (valeurs de $p < 0,01$ à 36 h).

La ceftaroline était également plus active que le linézolide après 36 h (valeur de $p < 0,01$). Ces résultats se réfèrent aux données de la figure 4 et de la figure 5 de l'article (présenté dans le paragraphe 2.5).

2.4 Discussion

2.4.1 Le biofilm, un élément de persistance fréquent chez les souches de SARM isolées de patients CF

Les microorganismes colonisateurs développent plusieurs traits pour s'adapter au milieu environnant. Parmi ces traits, la croissance en biofilm a été observée pour plusieurs pathogènes opportunistes dans certaines maladies humaines dont la mucoviscidose, conférant une protection contre les traitements antimicrobiens et contribuant ainsi à la persistance bactérienne. (Donlan et Costerton., 2002). Alors que le rôle du biofilm et la dynamique de sa formation ont été largement étudiés pour *Pa* en contexte CF (Høiby et al., 2010), peu d'études ont été menées sur le SARM chez les patients CF.

Or, la formation de biofilm est un trait de virulence important de *Sa* qui a été fréquemment observé (67 % des 183 souches de SASM et SARM étudiées par Kodori.) dans une étude récente portant sur des souches de patients pédiatriques CF (Kodori et al., 2021).

La formation de biofilm a également été observée significativement plus souvent pour les souches isolées de patients atteints de CF par rapport à celles isolées de patients non atteints de CF (Aktas et al., 2013). En effet, la production de biofilm a été détectée pour 96,8% des isolats CF dont 32,3% étaient de fort producteurs de biofilm. Les isolats NCF en comparaison produisaient du biofilm pour 47,4% d'entre eux et aucun n'a montré une capacité à produire fortement du biofilm. Les isolats étaient issus de divers prélèvements des voies respiratoires (crachats, aspiration trachéales et LBA) (Aktas et al., 2013).

Concernant les SARM, le biofilm représente un obstacle supplémentaire à l'éradication en plus de la multirésistance, ce qui fait de ces souches une problématique sujette à préoccupation.

Une étude récente a révélé que 85,6 % des isolats de SARM étaient producteurs de biofilms, contre 54,2 % pour le SASM. Ces isolats provenaient de patients atteints de mucoviscidose. Ces résultats suggèrent que les isolats de SARM sont plus aptes à former des biofilms pendant la mucoviscidose (Kadkhoda et al., 2020). La formation de biofilm a également été observée pour 14 des 15 génotypes (définis sur la base de leur profil après électrophorèse en champ pulsé ou pulsotype) de SARM CF dans l'étude de Molina et al., montrant que la formation de biofilm est une caractéristique commune des SARM CF (Molina et al., 2008).

Nos résultats montrent que 27% des souches de SARM CF sont fortement productrices de biofilm après 4h d'incubation. Cette différence par rapport à l'étude de Kadkhoda et al. peut s'expliquer par une durée d'incubation différente des souches de SARM (4h dans notre étude versus 24h dans l'étude de Kadkhoda et

al.) mais aussi par la différence des techniques utilisées. Nous utilisons en effet la technique du BRT® alors que l'étude de Kadkhoda et al., repose sur la technique du Crystal Violet (Kadkhoda et al., 2020).

2.4.2 Caractéristiques moléculaire et génomique des souches de SARM isolées de patients CF

Certaines études conduites en Europe et aux Etats-Unis ayant génotypé des souches de SARM issues de patients CF montrent que les ST5 et ST 8 prédominent (Gilpin et al., 2021, Bernardy et al., 2020). Ce sont également les ST que nous avons majoritairement identifiés pour les souches de SARM étudiées avec respectivement 50,8% des souches de génotype ST5 et 30,2% de génotype ST8.

Toutefois, ces génotypes sont les mêmes que ceux observés dans la population générale, hors CF (Cocchi et al., 2011, Carrera-Salinas et al., 2022). Il ne semble donc pas y avoir de souches infectant spécifiquement les patients atteints de mucoviscidose.

2.4.3 Le milieu ASM : caractéristiques et intérêts

Les conditions environnementales influencent grandement la formation du biofilm bactérien. Dans les études in vitro, les caractéristiques du milieu de culture impactent la production de biofilm bactérien. Il est donc nécessaire de se rapprocher au maximum de l'environnement pulmonaire des patients CF. L'utilisation du milieu ASM est un atout de choix à cette fin (Srimulu et al., 2005, Dinesh et al., 2010).

Cependant, ce milieu de culture est pour le moment peu exploité et a jusqu'alors été principalement utilisé dans des études concernant des souches de référence de *Pa* comme les études de Rozenbaum et al., publiée en 2019 ainsi que Diaz Iglesias et Van Bambeke, publiée en 2020.

Concernant *S. aureus*, l'étude de Diaz Iglesias et al., compare la capacité à former du biofilm en absence ou en présence de sept antibiotiques pour deux souches de référence (une souche de SASM : ATCC 25923 et une souche de SARM : ATCC 33591) dans deux milieux de culture : le milieu ASM et le milieu trypticase soja additionné de glucose et de sodium (TSGN) (Diaz Iglesias et al., 2019).

La production de biofilm a été évaluée par la technique du Crystal Violet et les antibiotiques évalués sont le méropénème, la vancomycine, l'azithromycine, linézolide, la rifampicine, la ciprofloxacine et la tobramycine.

De plus, l'activité métabolique du biofilm a été déterminée par la capacité de la souche (activité mitochondriale) à réduire la résazurine (Sandberg et al., 2009) (indicateur coloré bleu peu fluorescent) en résorufine (indicateur coloré rose fortement fluorescent) (Diaz Iglesias et al., 2019). Il a été observé dans cette

étude, une production de biofilm et une activité métabolique plus faible en milieu ASM par rapport au milieu TSGN après 24 h pour les souches de SARM 25923 et SARM ATCC33591 (Diaz Iglesias et al., 2019).

De plus, la souche SARM ATCC 33591 décrit une résistance pour les sept antibiotiques testés notamment pour le linézolide et la rifampicine.

Dans notre étude, la CMIB du linézolide et de la rifampicine étaient inférieure au seuil de résistance pour respectivement 64,7% et 17,6% des dix-sept souches fortement adhérentes. Les valeurs de CMIB de la rifampicine concordent avec l'étude de Diaz Iglesias et al., cependant nos résultats diffèrent concernant la CMIB du linézolide. Ces différences peuvent s'expliquer par

- des techniques d'évaluation du biofilm différentes (Crystal Violet versus Antibiofilmogramme®)
- l'origine des souches testées (souches de référence versus souches cliniques issues de patients CF)

L'ASM n'est cependant pas adapté pour toutes les manipulations. Pour notre étude, nous avons été obligés de filtrer l'ASM à 0,22 µm afin de restreindre son opacité, sa turbidité naturelle et permettre son utilisation avec le BRT® (Srimulu et al., 2005).

Nos résultats montrent une production de biofilm plus importante en milieu ASM filtré par rapport au milieu BHI des souches cliniques de SARM CF. Ceci montre l'influence du milieu sur la formation de biofilm et semble souligner les propriétés spécifiques du milieu ASM propices à la formation de biofilm.

Certaines modifications de la composition du milieu ASM pourraient être envisagées dans de futurs travaux afin d'améliorer la formation de biofilm des souches de SARM. Le glucose est un élément nécessaire à la formation de biofilm de *Sa* (Lade et al., 2019). Le glucose possède une action inhibitrice sur le système de régulation *agr* (Regassa et al., 1992) par l'inhibition des gènes *sec* et *hla* codant respectivement pour des entérotoxines staphylococciques et pour l'hémolysine Hla (Ando et al., 2004). La diminution de l'expression de ces gènes induit une inhibition du gène *agr* provoquant l'augmentation de la production de biofilm (Regassa et al., 1992). Le sodium quant à lui, est décrit comme un activateur de l'opéron *ica* de *Sa* entraînant une augmentation de la production de PIA. L'augmentation de la PIA entraîne par la suite une augmentation de la formation du biofilm et de sa stabilité (O'Neill et al., 2007).

Dans l'étude de Lade et al., en 2019, le milieu TS a été complété par différentes concentrations de glucose (Trypticase soja Glucosé TSG). Les souches cliniques de SARM 12779 et SARM 6280, cultivées dans un milieu TSG ayant un pourcentage de glucose compris entre 0,5% et 1% ont montré une capacité plus importante à former du biofilm par rapport à une culture en milieu TS non supplémenté en glucose.

Quant à la complémentation en NaCl du milieu TS, des résultats variables ont été observés avec une réduction de la capacité à former du biofilm pour des valeurs de 2% de NaCl. En additionnant 1% de glucose et 1% de NaCl, la formation de biofilm des souches variait également allant d'une production modérée à forte de biofilm.

L'ASM a été conçu afin d'imiter de par sa composition en mucine les expectorations des patients CF, cependant ce milieu ne contient pas de glucose malgré la présence de glucose dans les expectorations de patients CF (Tableau 5 en annexe).

Les études de Van Sambeek et al., en 2015 et de Nielsen et al., en 2020 montrent en effet la présence de glucose dans les expectorations des patients CF. L'étude de Nielsen et al., a par exemple observé chez vingt-sept patients CF, une concentration moyenne de 1,2 mmol de glucose /L d'expectoration avec un Intervalle de Confiance (IC) de [0,5-32,7] (Nielsen et al., 2020).

De plus l'étude de Lapierre et al., publiée en 2017 montre au sein d'expectorations isolées de patients CF, des concentrations élevées en sels comprenant le NaCl. Une concentration moyenne de 10,5 g/L (IC : [7,7-13,3]) de sels incluant NaCl a été observée au sein d'un effectif de cinquante-sept patients CF. La concentration en sels présente dans l'ASM est égale à 2,2 g/L, soit bien inférieure aux conditions *in vivo*.

La supplémentation en glucose et la modulation de la concentration en sels incluant NaCl sont donc à envisager et peuvent représenter une perspective intéressante pour des travaux futurs. Cependant reproduire *in vitro*, les conditions présentes *in vivo* reste un défi sachant l'existence de variabilités inter-individuelle et intra-individuelles des concentrations en sodium et en glucose observées chez les patients CF (Lapierre et al., 2017, Nielsen et al., 2020).

2.4.4 L'Antibiofilmogramme, un outil prometteur

Le biofilm bactérien reste un problème majeur des infections des patients CF de par la présence des cellules sessiles et leur persistance malgré l'usage d'antibiotiques (Chen et al., 2011). Bien que les thérapies antibiotiques agissent sur les cellules planctoniques, leur efficacité reste limitée dans l'éradication d'un biofilm mature. Les techniques standards comme la technique du Crystal Violet (Christensen et al., 1985) marquent la biomasse de biofilm. Le recours au marquage des cellules adhérentes comprend des biais notamment par le détachement et la perte de biofilm par les processus de lavages (Azeredo et al., 2017).

De nouvelles techniques sont à mettre en place afin de permettre une meilleure détection du biofilm et une utilisation de techniques permettent en routine d'évaluer l'effet antibiofilm des thérapeutiques. Parmi ces techniques, l'étude de Di domenico et al., montre dans un contexte d'infections nosocomiales que la technique du BRT® permet d'évaluer la cinétique d'adhésion des souches cliniques de SARM isolées de prélèvements de diverses origines (cathéter urinaire et intraveineux, LBA) (Di domenico et al., 2016). Notre étude montre en contexte CF que cette technique permet à l'instar de l'étude de Di domenico et al., d'évaluer la capacité d'adhésion de souches cliniques CF de SARM mais aussi d'évaluer l'effet des antimicrobiens en réalisant des ATBF.

L'objectif est alors de déterminer en quelques heures les concentrations de prévention de formation du biofilm des antibiotiques. Ce nouvel outil permettrait de compléter les informations apportées par les antibiogrammes classiques afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique des patients CF.

2.4.5 Colonisation persistante et adaptation des souches de SARM à leur environnement au cours d'infections chroniques en contexte CF

L'étude d'Azarian et al., publiée en 2019 décrit une colonisation chronique de quatre patients CF. Des isolats ont été prélevés pour ces patients entre 2003 et 2009. Trois de ces patients sont colonisés par une souche de ST 5 et un des patients par une souche de ST72. Il a été observé au sein de ces souches, des variations de SNP évoluant de manière continue avec un taux de variation de SNP par site et par an compris dans l'intervalle suivant [1.91×10^{-6} - 9.96×10^{-7}] (Azarian et al., 2019). Parmi ces mutations, certaines sont impliquées dans l'augmentation de la production de biofilm et la diminution de la virulence bactérienne. Ainsi, il est décrit la mutation du gène *odhA* codant pour la 2-oxoglutarate déshydrogénase impliquée dans la synthèse de l'acide tricarboxylique (Faisy et al., 2016). Cet acide réprime la production de la protéine CCpA (Carbon catabolite protéine A), (Seidl et al., 2006). La diminution de la production de cette protéine provoque une diminution de l'expression d'*agr* ce qui augmente la production de biofilm.

A l'instar de cette étude, nous avons observé une colonisation persistante des patients de notre étude (patients 5, 6, 17, 18) par des lignées clonales de SARM. Neuf souches de ST 5 ont été isolées des patients 5, 6, 17 et deux souches de ST 8 ont été isolées du patient 18. Au sein de notre étude, les souches clonales présentaient un nombre de SNP < 123.

De plus, les souches de notre étude ont montré des capacités d'adaptation avec une augmentation de la production de biofilm pour les souches isolées de manière plus récente (souches « tardives ») comparés aux souches dont l'isolement était précoce. C'est notamment le cas de la souche 17.6 (souche tardive) isolée du

patient 17 dont la formation de biofilm est plus rapide comparée à la souche 17.2 (souche précoce). La souche 17.6 montre également une valeur de CM_{Ib} pour le linézolide plus importante comparée à la souche 17.2. Cette valeur ne dépasse cependant pas le seuil de résistance.

De plus, ces souches malgré leur adaptation à l'environnement pulmonaire des patients CF présentent des CM_{Ib} de la ceftaroline et du ceftobiprole faibles et inférieures au seuil de résistance.

Au sein d'un même biofilm, différents variants d'origine clonale peuvent être présents (Savage et al., 2013). Cette diversification de la population est une stratégie d'adaptation à l'hôte.

Dans l'étude de Savage et al., en 2013, deux sous-populations de souches ont été décrites au sein d'un biofilm de patients CF : les variants blancs dépourvus de pigmentation (WV pour White Variants) et les variants à grande colonie pâle (LPVS pour Large Pale Variants).

Les variants WV ne formaient pas de biofilm et présentaient des protéolyses et hémolyses accrues alors que les variants LPVS étaient capables de produire du biofilm mais la phase de dispersion était fortement réduite. De plus ces variants n'étaient pas hémolytiques.

Suite à une analyse génomique, l'incapacité à produire du biofilm des variants WV s'est avéré due à une mutation réduisant l'expression du gène *Sigma B* codant pour le facteur Sigma B alternatif (Lane et al., 2006). Ce facteur Sigma B alternatif induit l'expression du gène *ica* impliqué dans la production du PIA (Cotter et al., 2009).

La mutation du gène *Sigma B* entraîne donc une diminution du facteur Sigma B, une diminution de la PIA et une diminution de la production de biofilm (Lorenz et al., 2008). De plus, la diminution du facteur Sigma B entraîne une augmentation de l'activité du système *agr* ce qui conduit à une induction des facteurs extracellulaires comme les hémolysines, et les protéases (Marti et al., 2010). A contrario, les variants LPVS ont montré une mutation dans le système régulateur du gène *agr* provoquant un déficit en protéine Agr.

Ce déficit provoque une augmentation de la formation de biofilm par une expression non restreinte de la PIA et empêche la phase de dispersion du biofilm (Reynolds et al., 2011). De plus, le déficit en *agr* provoque une réduction de l'expression de protéases extracellulaires (Marti et al., 2010).

La colonisation chronique des patients CF se fait donc par des populations bactériennes diversifiées correspondant à des variants adaptatifs issus d'une souche clonale, ces colonisations sont des complexes, dynamiques et varient en fonction des conditions du milieu environnant (Rumpf et al., 2021).

Il est ainsi possible d'isoler des variants sensibles et des variants résistants aux antibiotiques que ce soit sous forme planctonique ou sessile en co existence au sein d'un même biofilm et cette diversité peut contribuer à empêcher une prise en charge efficace des patients CF par antibiothérapie.

Nous avons observé dans notre étude une diversité intra-échantillon pour deux patients. En effet, des souches de SARM de ST 5 et ST4782 faisant partie du CC5 ainsi que des souches de ST8 et de ST 5829 faisant partie du CC8 ont été respectivement isolés du patient 14 et du patient 33. Des tests complémentaires seraient nécessaires afin de caractériser ces souches clonales et de déterminer si ces souches ont des comportements différents en termes de formation de biofilm.

2.5 Article publié sur le sujet de thèse

Boudet A*, Sorlin P*, Pouget C, Chiron R, Lavigne J-P, Dunyach-Remy C, et al.,. Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Cystic Fibrosis Patients Is Strain-Dependent and Differentially Influenced by Antibiotics. *Front Microbiol.* 2021;12:750489.

* These two authors contributed equally to the work.



Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Cystic Fibrosis Patients Is Strain-Dependent and Differentially Influenced by Antibiotics

Agathe Boudet^{1†}, Pauline Sorlin^{2†}, Cassandra Pouget³, Raphaël Chiron⁴, Jean-Philippe Lavigne¹, Catherine Dunyach-Remy¹ and Hélène Marchandin^{2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Giovanni Di Bonaventura,
University of Studies G. d'Annunzio
Chieti and Pescara, Italy

Reviewed by:

Barbara C. Kahl,
University of Münster, Germany
Rosa Del Campo,
Ramón y Cajal Institute for Health
Research, Spain
Louise Frances Roddam,
University of Tasmania, Australia

*Correspondence:

Hélène Marchandin
helene.marchandin@umontpellier.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 July 2021

Accepted: 22 September 2021

Published: 15 October 2021

Citation:

Boudet A, Sorlin P, Pouget C,
Chiron R, Lavigne J-P,
Dunyach-Remy C and
Marchandin H (2021) Biofilm
Formation in Methicillin-Resistant
Staphylococcus aureus Isolated in
Cystic Fibrosis Patients Is
Strain-Dependent and Differentially
Influenced by Antibiotics.
Front. Microbiol. 12:750489.
doi: 10.3389/fmicb.2021.750489

¹VBIC, INSERM U1047, Université de Montpellier, Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière, CHU Nîmes, Nîmes, France, ²HydroSciences Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Département de Microbiologie, CHU de Nîmes, Montpellier, France, ³VBIC, INSERM U1047, Université de Montpellier, Nîmes, France, ⁴HydroSciences Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose, CHU de Montpellier, Montpellier, France

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease with lung abnormalities making patients particularly predisposed to pulmonary infections. *Staphylococcus aureus* is the most frequently identified pathogen, and multidrug-resistant strains (MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*) have been associated with more severe lung dysfunction leading to eradication recommendations. Diverse bacterial traits and adaptive skills, including biofilm formation, may, however, make antimicrobial therapy challenging. In this context, we compared the ability of a collection of genotyped MRSA isolates from CF patients to form biofilm with and without antibiotics (ceftaroline, ceftobiprole, linezolid, trimethoprim, and rifampicin). Our study used standardized approaches not previously applied to CF MRSA, the BioFilm Ring test® (BRT®), the Antibiofilmogram®, and the BioFlux™ 200 system which were adapted for use with the artificial sputum medium (ASM) mimicking conditions more relevant to the CF lung. We included 63 strains of 10 multilocus sequence types (STs) isolated from 35 CF patients, 16 of whom had chronic colonization. The BRT® showed that 27% of the strains isolated in 37% of the patients were strong biofilm producers. The Antibiofilmogram® performed on these strains showed that broad-spectrum cephalosporins had the lowest minimum biofilm inhibitory concentrations (bMIC) on a majority of strains. A focus on four chronically colonized patients with inclusion of successively isolated strains showed that ceftaroline, ceftobiprole, and/or linezolid bMICs may remain below the resistance thresholds over time. Studying the dynamics of biofilm formation by strains isolated 3 years apart in one of these patients using BioFlux™ 200 showed that inhibition of biofilm formation was observed for up to 36 h of exposure to bMIC and ceftaroline and ceftobiprole had a significantly greater effect than linezolid. This study has brought new insights into the behavior of CF MRSA which has been little studied for its ability to form biofilm. Biofilm formation is a common characteristic of prevalent MRSA clones in CF.

Early biofilm formation was strain-dependent, even within a sample, and not only observed during chronic colonization. Ceftaroline and ceftobiprole showed a remarkable activity with a long-lasting inhibitory effect on biofilm formation and a conserved activity on certain strains adapted to the CF lung environment after years of colonization.

Keywords: cystic fibrosis, methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), biofilm, antibiofilm activity, ceftaroline, ceftobiprole, linezolid

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a recessive genetic disease linked to a mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*cfr*) gene encoding for an ion channel whose dysfunction causes thickening of the respiratory mucus in CF patients (Rowe et al., 2005). The resulting dehydrated, sticky mucus provides an ideal environment for bacterial colonization, and CF patients are therefore particularly exposed to pulmonary infections from an early age. Among the prevalent opportunistic pathogens in CF worldwide, *Staphylococcus aureus* is generally the most commonly identified microorganism (Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données, 2019; The Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2019; Zolin et al., 2020). *S. aureus* is acquired early on in the life of CF patients, and from the age of 5 years, *S. aureus* will colonize or infect approximately 70% of children. Infections may be persistent in certain patients, and in 2018 in Europe, the prevalence of chronic *S. aureus* in CF patients was 35.68% (34.34% in children; 37.12% in adults; Zolin et al., 2020). Multidrug-resistant *S. aureus* strains, known as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), are of particular concern. A degree of variation in MRSA prevalence is observed between countries for the CF population with a lower prevalence observed in Europe (e.g., 5.9% in France in 2019; Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données, 2019) compared with the United States where the widespread distribution of community-acquired MRSA clones like the USA300 clone (Glikman et al., 2008; Goss and Muhlebach, 2011) is associated with a 25% rate of CF patients with at least one MRSA isolate in 2019 (The Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2019). In Europe, the epidemiology of circulating MRSA clones in the CF population remains largely unexplored. MRSA eradication in CF patients is currently recommended as compared with methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), MRSA persists longer in the airways of these patients, resulting in more serious pulmonary dysfunction and lung damage with a greater decline in mean forced expiratory volume in 1 s (FEV1) and in greater use of antibiotics (Ren et al., 2007; Dasenbrook et al., 2008; Vanderhelst et al., 2012). However, MRSA eradication is challenging, not only due to the antimicrobial multidrug resistance patterns of the strains but also to the diverse bacterial adaptation pathways developed in the CF lung environment, including biofilm formation which represents an important barrier to eradication treatment and host defenses, thus contributing to bacterial persistence

in the CF lung (Goerke and Wolz, 2010; Hirschhausen et al., 2013). Identifying antimicrobial treatments that may limit biofilm formation has become a matter of concern in the management of numerous infections, particularly those involving *S. aureus* which is a well-known pathogen causing diverse biofilm-associated infections other than those encountered in CF, such as medical device-associated and catheter-related infections, and bone infections (Miquel et al., 2016), and over the years, studies have aimed to evaluate the antibiofilm activity of various antimicrobial agents (antibiotics as well as antimicrobial peptides and natural substances). These studies underline the limitations of *in vitro* studies of bacterial biofilms, particularly the poor reproducibility of certain methods and the influence of cultivation conditions. Considering these limitations, a variety of protocols and methods for *in vitro* drug activity testing against staphylococcal biofilms has been successively introduced with the aim of standardizing protocols and improving inter-laboratory reproducibility, including microfluidics systems which more closely approximate natural biofilms (Benoit et al., 2010; Guzmán-Soto et al., 2021).

In this context, the main objective of our study was to evaluate the effects of antibiotics on the biofilm formation of MRSA isolates from CF patients. Our study focused on trimethoprim, rifampicin, and linezolid which are some of the drugs that may be used to deal with MRSA infections in CF patients (Fusco et al., 2015; Zobell et al., 2015; Akil and Muhlebach, 2018). Two broad-spectrum cephalosporins (more recently approved for the treatment of bacterial pneumonia due to MRSA), ceftaroline and ceftobiprole, were also evaluated. Our study was based on standardized approaches not previously applied to CF MRSA isolates, that is, the BioFilm Ring test[®] (Chavant et al., 2007; Ren et al., 2007) and the microfluidics system BioFlux[™] 200 (Benoit et al., 2010) which were adapted for use with the artificial sputum medium (ASM), a mucin-containing synthetic growth medium (Sriramulu et al., 2005; Dinesh, 2010) to test MRSA biofilm formation, and antibiotic efficacy against biofilm formation in conditions more relevant to the CF lung. The BRT[®] is used to quickly evaluate bacterial adhesion and early biofilm formation. The BRT[®] has also been proposed as a tool for evaluating the capacity of antibiotics to inhibit biofilm formation through an approach called the Antibiofilmogram[®] (Tasse et al., 2016), also used in our study. Finally, we used the BioFlux[™] 200 continuous flow system to study biofilm formation in dynamic conditions. Strains studied were clinical isolates genotyped by multi locus sequence typing (MLST)

and, for selected strains, by whole-genome sequencing (WGS). Due to the highly complex patterns of bacterial colonization in CF patients' airways, we also included strains that were co-isolated from within a sample or successively isolated from chronically colonized patients with the aim of bringing new insights into the behavior of strains adapted to the CF lung during persistent colonization.

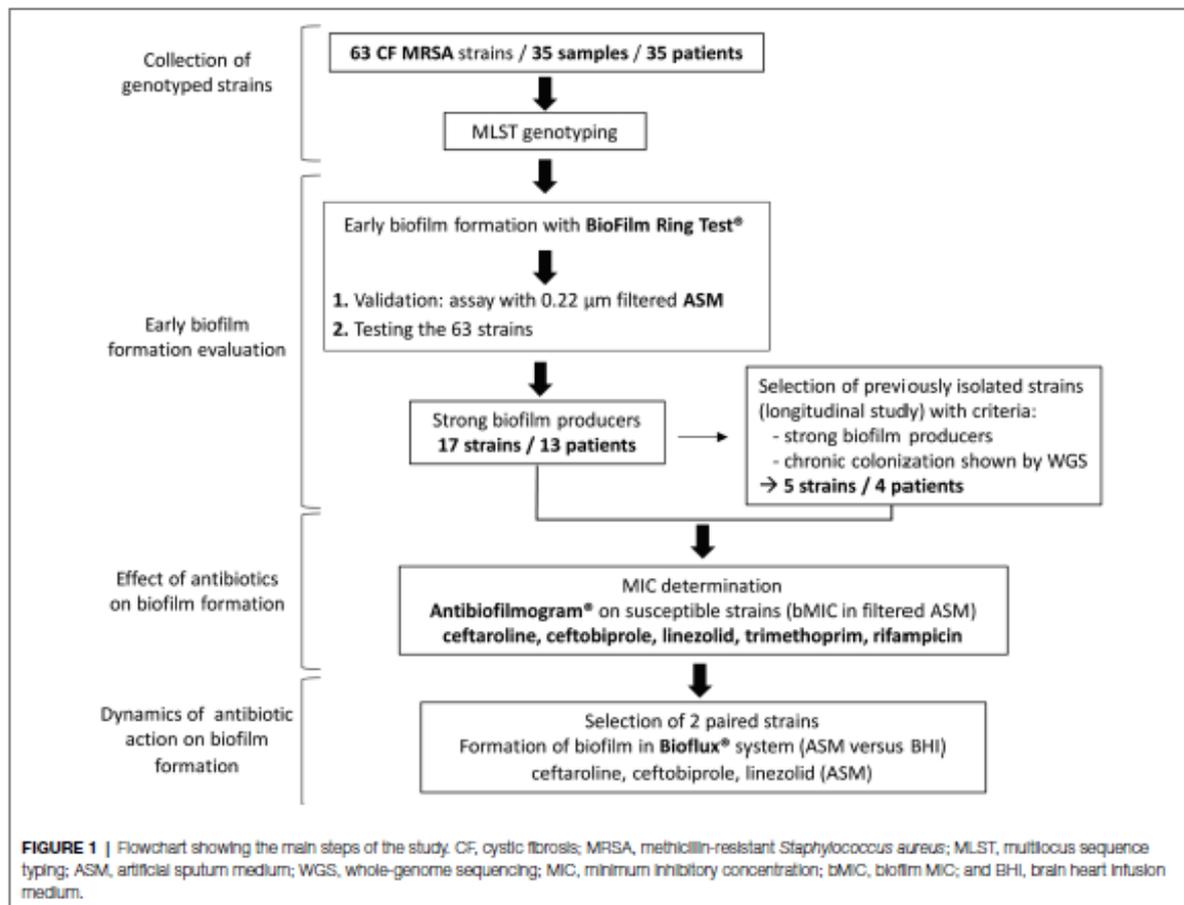
To the best of our knowledge, studies like this have never been performed before and our study therefore provides original results on comparative biofilm formation with and without antibiotics for a collection of clinically and genetically documented MRSA from CF patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients, Strains, and Study Design

Methicillin-resistant *S. aureus* strains included in this study were isolated from routinely sampled sputum specimens in patients attending the CF center at Montpellier University

Hospital, France, and analyzed as part of their standard follow-up. Strains were recovered in 35 patients representing all patients with MRSA isolation in our center over a 9-year period. Strains had been stored at -80°C . These strains were studied for their ability to form biofilm in the presence or absence of antibiotics according to the steps presented in the flow diagram in **Figure 1**. Briefly, we first identified strains that were strong biofilm producers among a collection of clinically documented and genetically characterized CF MRSA using the BRT[®] and the ASM. Strong biofilm producers were then included in the evaluation of antibiotic efficacy against biofilm formation using the Antibiofilmogram[®] method. Selected isolates were then used to conduct: (i) a longitudinal analysis of the evolution of antibiotic efficacy on biofilm formation over time in chronically colonized patients (selection of clonal strains successively isolated in four patients) and (ii) a study of the dynamics of biofilm formation under flow in the absence and presence of antibiotics (selection of two paired strains successively isolated in a chronically colonized patient).



Multilocus Sequence Typing

All strains were cultured on Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), and one colony was subcultured on the same agar medium for further analysis. DNA extraction was performed as previously described (Predari et al., 1991). The amplification of the seven housekeeping genes included in the MLST scheme for *S. aureus* was performed as previously described (Enright et al., 2000; Crisóstomo et al., 2001). Sequencing was done on a 3500xL Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, United States), and sequence analysis was performed using SeqScape Software v3.0™ from the same company. The sequence type (ST) was determined for each strain via the PubMLST database (Jolley et al., 2018)¹ or after whole-genome sequencing (wgMLST).

Whole-Genome Sequence Analysis

Whole-genome sequencing analysis was performed for the 11 CF MRSA isolates (five "early" isolated strains and six "late" isolated strains in four chronically colonized patients) selected for the longitudinal analysis of the evolution of antibiotic efficacy on biofilm formation over time to prove that the MRSA persistence in these patients was truly a chronic colonization by a clonal strain. For six of these strains, WGSs were available from previous work (Boudet et al., 2021); for the five remaining strains, WGSs were obtained by an Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, United States) and analyzed as previously described (Boudet et al., 2021). Regarding analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs), SNPs were called using Snippy (Seemann, 2015) and SNP numbers were interpreted according to the criteria of Ankrum and Hall (2017) which define strains with ≤ 71 SNPs as the "same" strains, strains with 72–123 SNPs as "very closely related" strains, strains with 124–156 SNPs as "closely related" strains, and strains with ≥ 157 SNPs as "distantly related" strains.

DDBJ/ENA/GenBank accession numbers for the 11 WGS are JAGPWS000000000, JAGPWY000000000 and JAGPWZ000000000 (strains 5.1, 5.2, and 5.3 in Patient 5); JAGPWI000000000, JAGPWQ000000000 and JAGPWR000000000 (strains 6.1, 6.3, and 6.4 in Patient 6); JAHXBM000000000, JAHXBL000000000, and JAHXBK000000000 (strains 17.2, 17.3, and 17.6 in Patient 17); JAHXBJ000000000 and JAHXBI000000000 (strains 18.1 and 18.2 in Patient 18).

Culture Media and Growth Rates

After initial culture of frozen strains on Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), we used different media according to the test performed. Mueller-Hinton broth was used as the broth microdilution reference method to determine minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics. The ASM, a medium mimicking the sputum found in the respiratory tract of CF patients (Sriramulu et al., 2005; Dinesh, 2010), was used to

evaluate biofilm formation and antibiotic efficacy against biofilm formation in conditions more relevant to the CF lung using the different approaches of this study and developed below: the Biofilm ring Test® (BRT®), the Antibiofilmogram®, and the continuous flow system BioFlux™ 200. However, the brain heart infusion (BHI) medium is recommended by the BRT® manufacturer and was therefore used with ASM for comparative purposes. As the opacity of the ASM did not provide a compatible image with the BRT® reading software, 0.22 μm -filtered ASM was compared to BHI medium on selected isolates with the BRT®. BHI medium was also compared with ASM in the assays conducted on the BioFlux™ system. According to the medium used for the assay, strains were pre-cultured for 24 h in the same medium, BHI broth, or ASM. Due to the use of these three culture conditions, growth properties of selected strains in BHI broth, ASM, and 0.22 μm -filtered ASM were compared. Overnight cultures at 37°C were inoculated into the same fresh medium [identical dilution factor for all three conditions to obtain a suspension of optical density (OD) at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1], and incubation was carried out at 37°C with agitation for 24 h. Cell growth was monitored over 24 h through colony-forming unit (CFU) counts with eight data points: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, and 24 h. For CFU counts, cultures were diluted serially in the medium and plated on Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood plates which were incubated for 24 h at 37°C. All assays were performed in duplicate.

Bacterial Adhesion and Biofilm Formation Assessment Using Biofilm Ring Test®

The BRT® based on the measurement of the mobility of superparamagnetic microbeads subjected to a magnetic field was used to study the early stages of biofilm formation according to the manufacturer's recommendations (Chavant et al., 2007). Briefly, standardized bacterial cultures were incubated at 37°C in 96-well microtiter plates in the presence of magnetic beads. At set time-points, the plates were placed on a magnetic block and put in the reader. The images of each well before and after magnetic attraction were analyzed with the BioFilm Control software (BFC Elements® 3), which gives a biofilm formation index (BFI). The adhesion ability of each strain was expressed as this BFI that is inversely proportional to the attached cell number. A high BFI value indicates high bead mobility under magnetic action that corresponds to the absence of biofilm formation (a spot is visible due to bead accumulation above the mini-magnet), while lower values reflect partial to complete immobilization of beads due to the bacteria embedded in a biofilm (no visible spot for complete bead immobilization). Two incubation times were defined: 1.5 and 4 h. Three replicate wells were performed per strain and per incubation time in three (BHI/filtered ASM comparison) or two independent experiments (tests in filtered ASM only). A negative control was systematically included in each experiment corresponding to the medium and beads without bacterial suspension. BFI values were calculated for each well, ranging from 0 (total bead

¹<https://pubmlst.org/saureus/>

immobilization, i.e., strongly adherent cells/strong biofilm formation) to 20 (no bead aggregation, i.e., non-adherent cells/no biofilm formation in the experiment conditions).

Susceptibility Testing

Minimum inhibitory concentrations of ceftaroline, ceftobiprole, linezolid, rifampicin, and trimethoprim were determined for all CF MRSA strains using the microdilution method in Mueller-Hinton broth. According to the interpretative criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), strains were classified as susceptible (including "susceptible" and "susceptible, increased exposure" categories) or resistant (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2021). Serial 2-fold dilutions of antibiotics were as follows: 0.125–16 mg/L for ceftaroline, 0.25–32 for ceftobiprole, 0.5–64 mg/L for linezolid, 0.015–2 mg/L for rifampicin, and 0.25–32 for trimethoprim. The reference strain *S. aureus* ATCC 29213 was used to monitor test performance.

The minimum biofilm inhibitory concentrations (bMIC) were determined using the Antibiofilmogram® test (BioFilm Control; Tasse et al., 2016). A schematic representation of the Antibiofilmogram® principle is available in Olivares et al. (2020). The test was performed using 0.22 µm-filtered ASM for initial bacterial growth and suspension preparation. The microplates containing bacteria, magnetic beads, and antibiotics (20 µl of antibiotic solutions) were incubated at 37°C for 4 h before visual reading. The bMIC was determined for each antibiotic as the lowest concentration at which a spot corresponding to free beads attracted to the center of each well during magnetization, similar to negative control (0.22 µm-filtered ASM and magnetic beads), was visible. A well without antibiotics filled with the bacterial suspension in 0.22 µm-filtered ASM and magnetic beads was used as the positive control (absence of spot due to bead immobilization in biofilm). All assays were performed in duplicate.

Biofilm Formation Assessment Using the BioFlux™ 200 System

The kinetics of biofilm formation and quantification in the absence and presence of antibiotics (ceftaroline, ceftobiprole, and linezolid) were assessed with the BioFlux™ 200 microfluidic system as previously described (Naudin et al., 2019) with two different media, BHI medium and ASM. In this system, biofilm formation is studied under dynamic and controlled flow conditions and is followed by light microscopy in microfluidic wells (Benoit et al., 2010). The system consists of a 48-well plate with a microchannel connection between 24 pairs of two types of wells, an input well and an output well. Bacteria were grown overnight in each media. Bacterial suspensions with an OD₆₀₀ of 0.1 ± 0.05 after two 200th serial dilutions from the overnight culture were prepared in both media. To quantify biofilm formation, we prepared BioFlux system by adding 500 µl of medium into the input well with a pressure of 1 dyne/cm² for 10 min. At the end of the 10 min, the medium remaining in the input well was removed. Bacterial suspensions were then added in the input well for 36 h of incubation at

37°C in BHI medium and ASM with a pressure of 0.2 dyne/cm². The bacterial suspension was either added alone or in the antibiotic solution, i.e., last dilution performed in the antibiotic solution to give final concentrations of bacteria of 10⁷ CFU/ml and antibiotic corresponding to the bMIC determined by the Antibiofilmogram® either in BHI broth or in filtered ASM. Biofilms were grown in monoculture, and the quantification of biofilm formation was done at 5, 12, 24, and 36 h post-inoculation in the absence of antibiotics and at 5, 12, and 36 h post-inoculation in the presence of antibiotics. Experiments were performed in duplicate. Biofilms were visualized with a Leica DM IRB inverted fluorescence microscope coupled with a CoolSNAP FX black and white camera (Roper Scientific, Trenton NJ, United States). ImageJ® software was utilized to calculate biofilm percentage. The 16-bit grayscale images were adjusted with the threshold function to fit the bacterial structure and were analyzed using the "Analyze Particles" function to calculate biofilm percentage in the microfluidic channel.

Statistics

Results are presented as the mean ± standard deviation. Statistical analyses were made using a t test in version 7 of GraphPad Prism (comparison of biofilm formed according to the condition, either medium or incubation time, in the BioFlux™ analyses) or using a Mann-Whitney U test in version 3.5.2 of R software (comparison of BFI values in BHI medium and filtered ASM). A value of $p \leq 0.05$ was considered to reflect significance.

RESULTS

Patients and MRSA Collection Characteristics

The 35 CF patients (54.3% of female) had a mean age of 22.1 years at inclusion in the study (range: 2–52 years). Sixteen of them fulfilled the criteria for chronic colonization (>50% of respiratory samples collected during the last 12 months positive for MRSA with at least four samples collected during that period; Zolin et al., 2020). The 63 strains had been isolated between 2007 and 2016 from 35 sputum samples in these patients (2–4 colonial morphotypes visually distinct observed during the routine bacteriological analysis of sputum samples recovered from 18 samples in 18 patients were included; **Supplementary Table**). MLST genotyping showed that the 63 strains belonged to 10 STs (**Figure 2A**). MRSA of ST5 (50.8% of strains and 48.6% of patients) and ST8 (30.2% of strains and 31.4% of patients) were the most frequent representing 81% of the strains (51 strains/63) and being identified in 80% of the patients (28 patients/35). Two patients had co-colonizations with strains from different STs within the same clonal complex (CC) identified in one sample [ST5 and ST4782 (CC5) in Patient 14, ST8 and ST5829 (CC8) in Patient 33]. In these cases, both genotypes identified differed by one (strains in Patient 14) or five mutations (strains in Patient 33) in one of the seven genes of the MLST scheme (*aroE* gene and *gmk* gene, respectively).

patients of the study, 40 MRSA strains were isolated in 21 patients with chronic colonization by *P. aeruginosa*. These strains were distributed in the three groups of strains defined according to their ability to form early biofilm (13 strains showed $BFI \leq 4$, 17 strains were non-adherent and 10 had intermediate BFI values).

Antimicrobial Susceptibility of the 17 Strongly Adherent Strains

Determination of the MICs of the five antibiotics under consideration in this study showed that 11 strains (64.7%) were resistant to rifampicin, and three strains (17.6%) were resistant to linezolid, while the 17 strains were susceptible to trimethoprim, ceftobiprole, and ceftaroline (Table 1). bMICs were then determined using the Antibiofilmogram® approach in filtered ASM. Highly distinct patterns of bMICs were observed according to the antimicrobial agent (Table 1). No strains displayed bMIC for trimethoprim below the EUCAST threshold for resistance at 4 mg/L (bMIC range: 8–>32 mg/L) showing that this antibiotic was totally inefficient on biofilm formation initiation. The lowest bMICs were observed for ceftaroline and ceftobiprole with efficacy in preventing biofilm formation observed for 76.5 and 70.6% of strains, respectively (bMICs below the respective resistance breakpoint of 1 and 2 mg/L) compared with linezolid (64.7% of strains with bMICs ≤ 4 mg/L) and rifampicin (17.6% of strains with bMICs ≤ 0.5 mg/L). Individual results for each of the 17 strains under evaluation are presented in Table 2. The capacity of rifampicin and linezolid to prevent biofilm installation was also evaluated for the sole strains that were susceptible in planktonic cultures; linezolid was able to inhibit biofilm formation of 78.6% of the susceptible strains (three out of 14) and rifampicin prevented biofilm installation of 50% of the susceptible strains (three out of six; Table 2).

For three strains (strains 1.1, 5.3, and 20.1), bMICs of all the five antibiotics were above the corresponding resistance breakpoint and these strains were excluded from further analysis conducted to compare the efficacy of the various antimicrobial agents on biofilm formation by CF MRSA. Analysis was, thus, restricted to susceptible strains (planktonic cultures) that

displayed at least one bMIC below the threshold for resistance ($n = 14$; Table 2). Under these conditions, bMICs for ceftaroline were below the resistance threshold for 13 strains, bMICs for ceftobiprole were below the resistance threshold for 12 strains, and bMICs for linezolid were below the resistance threshold for 11 strains. A limited effect was observed for rifampicin with three strains out of 14, isolated from three patients, showing low bMIC values < 0.015 mg/L. However for two patients, these strains were associated either with a resistant strain (Patient 28) or with a strain for which the formation of biofilm was not inhibited by rifampicin (Patient 25) thereby making the drug of low interest considering its global effect on biofilm formation inhibition. More generally, intra-sample heterogeneity with coexistence of adaptive variants displaying distinct bMICs was observed for three out of the four patients for whom the analysis of multiple strains from a sample was performed (Patients 5, 25, and 28; Table 2).

Study of Clonally-Related, Longitudinally-Isolated Strains in Four Patients

For chronically colonized patients, we searched for strains that had been isolated before the strains studied above, which met the following criteria: (i) strongly adherent strains/strains forming early biofilm as determined by the BRT® in filtered ASM ($BFI \leq 4$), and (ii) WGS-based analysis confirming the chronic colonization based on the identification of less than 123 SNPs between the sequences of the “early” and the “late” isolated strains (signing either a “same” strain or “very closely related” strains according to the criteria of Ankrum and Hall, 2017). A total of five earlier-isolated strains from four patients matching these criteria were selected and compared with six strains isolated during patient follow-up. The characteristics of patients and selected strains are presented in Figure 3A. MICs were determined, and an Antibiofilmogram® was performed on these strains (as described above), and bMICs are presented in Figure 3B. MIC and bMIC values for the five antibiotics were all below the EUCAST threshold for susceptibility for the five strains isolated earlier. For later-isolated strains that remained susceptible to antimicrobial agents in planktonic culture, we showed that ceftaroline and ceftobiprole (Patients 5 and 6) or linezolid (Patients 17 and 18)

TABLE 1 | Overall susceptibility results for the 17 CF MRSA strains that were classified as strongly adherent/strong biofilm producers according to the Biofilm Ring Test® assay.

Antimicrobial agent	Minimal inhibitory concentration (MIC in mg/L)				Minimal biofilm inhibitory concentration (bMIC in mg/L)			
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistant (% , n)	Range	bMIC ₅₀	bMIC ₉₀	Above the threshold for resistance (% , n)
Ceftaroline	<0.125–0.25	0.125	0.25	0	<0.125–4	0.25	4	23.5 (4)
Ceftobiprole	<0.25	<0.25	<0.25	0	<0.25–16	2	8	29.4 (5)
Linezolid	<0.5–32	1	16	17.6 (3)	<0.5–>64	2	>64	35.3 (6)
Rifampicin	<0.015–2	2	2	64.7 (11)	<0.015–>2	>2	>2	82.4 (14)
Trimethoprim	<0.25–2	0.5	2	0	8–>32	>32	>32	100 (17)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints for resistance were as follows: ceftaroline, 1 mg/L; ceftobiprole, 2 mg/L; linezolid, 4 mg/L; trimethoprim, 4 mg/L, and rifampicin, 0.5 mg/L.

TABLE 2 | Detailed susceptibility results for the 17 CF MRSA strains that were classified as strongly adherent/strong biofilm producers according to the Biofilm Ring Test[®] assay.

Patient	Strain	ST	BFI	Ceftaroline		Ceftobiprole		Linezolid		Rifampicin		Trimethoprim	
				MIC	bMIC	MIC	bMIC	MIC	bMIC	MIC	bMIC	MIC	bMIC
1	1.1	8	4	<0.125	2	<0.25	16	<0.5	16	2	>2	1	>32
5	5.2	5	0.12	<0.125	<0.125	<0.25	<0.25	32	>64	2	>2	0.5	>32
	5.3	5	0.75	<0.125	4	<0.25	8	16	32	2	>2	1	>32
6	6.3	5	0.58	<0.125	0.25	<0.25	2	1	16	2	>2	1	>32
	6.4	5	0.25	0.25	0.25	<0.25	<0.25	16	>64	2	1	1	>32
7	7.2	5	0.71	0.25	0.25	<0.25	2	<0.5	2	0.5	>2	0.5	8
17	17.6	5	0	<0.125	4	<0.25	4	<0.5	2	2	>2	0.5	>32
18	18.2	8	3.03	<0.125	0.5	<0.25	2	1	1	2	>2	1	8
20	20.1	582B	0.66	<0.125	4	<0.25	4	1	64	2	>2	2	>32
25	25.5	5	4	0.25	0.25	<0.25	<0.25	2	2	<0.015	<0.015	2	32
	25.6	5	3.22	<0.125	0.25	<0.25	8	4	4	<0.015	>2	0.5	>32
26	26.1	8	2.08	<0.125	<0.125	<0.25	2	<0.5	2	<0.015	0.015	<0.25	>32
28	28.3	5	0	<0.125	1	<0.25	2	<0.5	<0.5	2	>2	<0.25	>32
	28.4	5	0.25	<0.125	<0.125	<0.25	<0.25	<0.5	1	<0.015	<0.015	<0.25	8
30	30.1	5	0	<0.125	<0.125	<0.25	<0.25	<0.5	1	<0.015	>2	1	32
31	31.2	8	2.68	<0.125	<0.125	<0.25	0.5	<0.5	1	2	>2	0.5	>32
32	32.1	8	1.89	<0.125	<0.125	<0.25	<0.25	1	1	2	>2	0.5	>32

Minimum inhibitory concentrations (MIC) and biofilm MIC (bMIC) in mg/L. MICs were determined according to the reference dilution method. bMICs were determined in filtered ASM. Gray cells indicate MIC and bMIC values above the EUCAST breakpoints for resistance (indicated in footnotes of Table 1). ST, sequence type. BFI, biofilm formation index.

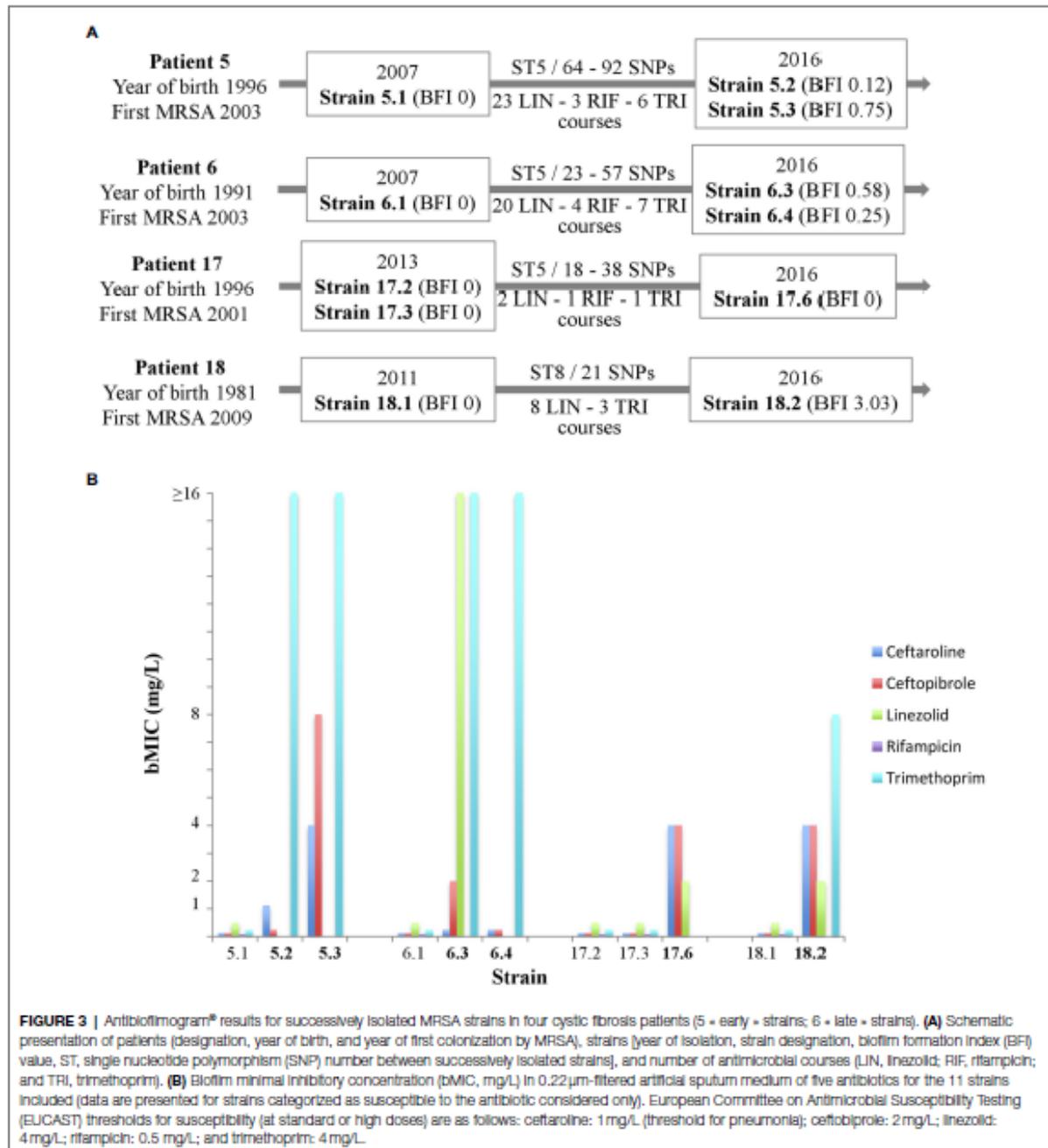
retained their ability to prevent biofilm formation (bMICs below the corresponding EUCAST thresholds for resistance) over time. We related these observations to the antimicrobial courses received by the patients (Figure 3). The more important antibiotic selective pressure was noted for linezolid and Patients 5 and 6. Three out of the four strains isolated in these patients were resistant to linezolid in planktonic cultures (resistance, investigated in a previous study; Boudet et al., 2021) was related to a G2576T substitution present in a variable number of 23S rRNA gene copies, while susceptible strain 6.3 displayed a high bMIC of 16mg/L. For strains isolated in Patients 17 and 18 (who had received fewer linezolid courses during their follow-up), increased bMICs were observed over time, but bMICs were still below the resistance threshold (Figure 3). Although a low number of rifampicin and trimethoprim courses (possibly associated) were noted in the four patients, both antibiotics were no more active on later-collected strains, showing MICs or bMICs above the corresponding resistance thresholds. None of the patients had received ceftaroline or ceftobiprole.

Dynamics of Biofilm Formation Under Flow in the Presence and Absence of Antibiotics

To complete the characterization of biofilm formation of CF MRSA in the presence or absence of antibiotics, a study was performed in dynamic conditions using the BioFluxTM 200 microfluidic system. We selected strain 17.6, one of the two strains that were strongly adherent after 1.5h of incubation in the BRT[®] and the paired 17.2 strain isolated 3 years before in Patient 17. For these paired strains, we first compared their dynamics of biofilm formation over time according to the medium used (BHI or ASM). The formation of biofilm increased regularly over time for each condition of the assay ("early" strain in BHI

medium, "early" strain in ASM, "late" strain in BHI medium, "late" strain in ASM) with a systematically higher percentage of biofilm formed in ASM compared with BHI medium and for "late" strain compared with "early" strain (Figure 4). Although both strains were shown to have high adhesion ability using the BRT[®], these results revealed that strains 17.2 and 17.6 each had distinct dynamics of biofilm formation, with a slower biofilm formation for the earlier-isolated strain 17.2 (Figure 4).

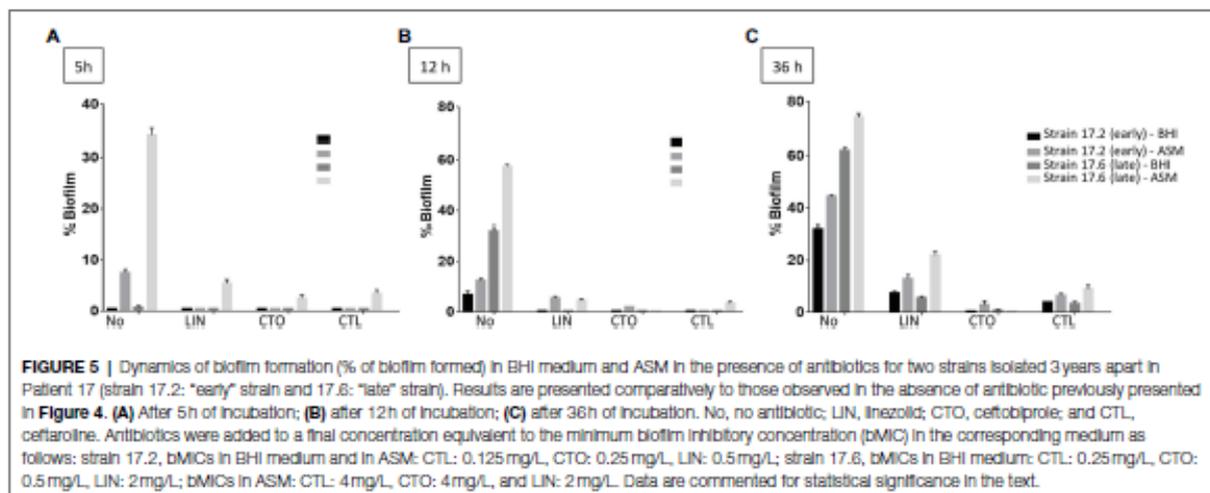
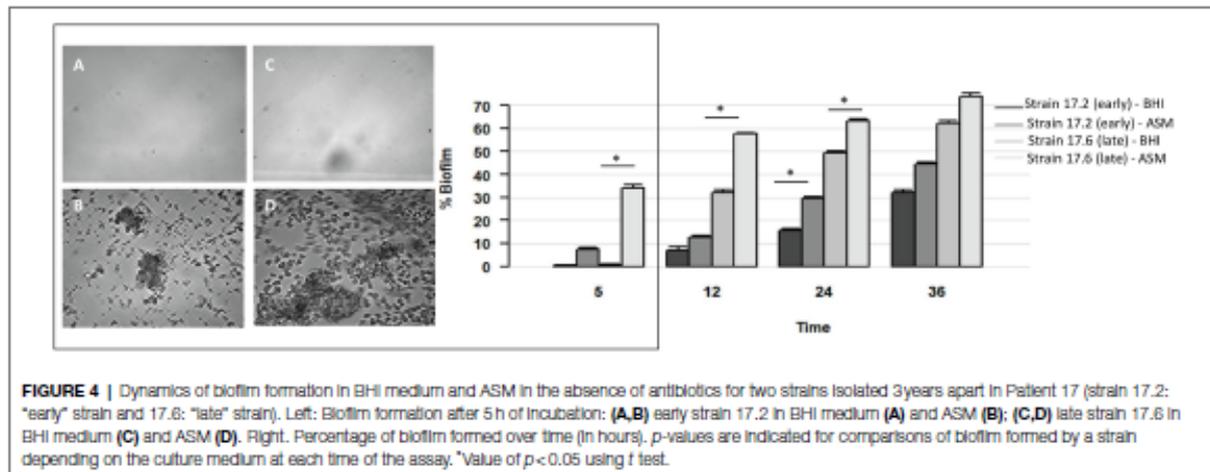
Further testing with antibiotics was limited to three times of measure (5, 12, and 36h) and to the three antimicrobial agents with the lowest bMICs, that is, ceftaroline, ceftobiprole, and linezolid. With the BioFluxTM device, the percentage of biofilm formed in the presence of one of the three drugs tested was drastically lower than that observed for the control without antibiotics showing that all three antibiotics had the ability to limit biofilm formation and that this effect was long-lasting as it was observed up to 36h of exposure to the bMIC of the corresponding antimicrobial agent in both media (Figure 5). Differences in biofilm formation in ASM were compared for statistical significance by a t test. A significantly higher inhibition of biofilm formed by the earlier isolated strain 17.2 was observed from 12h of incubation and up to 36h of incubation for ceftaroline and ceftobiprole compared with linezolid (values of $p < 0.05$ at 12h; values of $p < 0.01$ at 36h). Differences observed between ceftaroline and ceftobiprole were also statistically significant (value of $p < 0.05$ at 36h), ceftaroline being more active in biofilm formation inhibition than ceftobiprole after 12h, whereas ceftobiprole was more active in biofilm formation inhibition than ceftaroline after 36h. Inhibition of the biofilm formation by the "late" strain 17.6 in ASM was more pronounced with ceftobiprole than with linezolid (values of $p < 0.01$ at 12 and 36h) or ceftaroline (values of $p < 0.01$ at 36h). Ceftaroline was also more active than linezolid after 36h (value of $p < 0.01$).



DISCUSSION

Cystic fibrosis is a chronic disease in which bacterial colonizations/infections of the airways are usual. Due to local specific conditions in the CF lung, diverse selective pressure is applied to colonizing microorganisms (interactions with the host immune response, high levels of antibiotic use, oxygen

deprivation in mucus, altered antimicrobial peptide production, etc.) which, in turn, develop several traits to adapt to the surrounding environment and survive in the CF lung (Hauser et al., 2011). Among these traits, biofilm growth has been observed with several opportunistic pathogens in certain human diseases including CF, conferring protection against antimicrobial treatments and therefore contributing to bacterial persistence



(Donlan and Costerton, 2002). While the role of biofilm and the dynamics of its formation have been extensively studied for *P. aeruginosa* (Høiby et al., 2010), there have been few studies on MRSA in CF patients. However, biofilm formation is an important virulence trait of *S. aureus* which has been frequently observed (67% of the strains) in a recent study on CF pediatric patients (Kodori et al., 2021). Biofilm formation was also significantly more often observed for strains isolated from CF patients compared with those recovered from non-CF patients (Aktas et al., 2013). In MRSA, biofilm represents an additional obstacle to eradication in addition to multidrug resistance making these strains the most problematic ones and a great matter of concern due to their involvement in negative clinical evolution (Ren et al., 2007; Dasenbrook et al., 2008; Vanderhelst et al., 2012). One recent study found that 85.6% of MRSA isolates were biofilm producers compared with 54.2% of MSSA, suggesting that MRSA isolates are better able to form biofilm during CF (Kadkhoda et al., 2020). Biofilm formation was also observed in 14 of 15 CF MRSA pulsotypes

in the study by Molina et al. (2008), supporting the fact that biofilm formation is a common characteristic of CF MRSA. In the specific and distinct conditions of our study – BRT[®] used with a 4-h incubation for selection of strong producers of early biofilm rather than the microtiter test used in previous studies, we found a rate of strong biofilm-forming MRSA of 27% of the strains and these strains had been isolated in samples from 37% of the studied patients.

Previous studies have related the propensity of specific clones of *S. aureus* for forming biofilm (Vanhommerig et al., 2014; Tasse et al., 2018) as well as *Escherichia coli* (Flament-Simon et al., 2019). For CF MRSA, due to the lack of studies including genetically characterized strains, it remains to be explored whether some lineages are more prone to forming biofilm. More generally, there is a lack of knowledge of MRSA clones circulating in the CF population in Europe (Vu-Thien et al., 2010; Cocchi et al., 2011) although no comparisons can be drawn with non-European data, particularly American data, due to the highly distinct epidemiology between these continents

(Glikman et al., 2008). Congruent with the studies of Vu-Thien et al. (2010) in France and Cocchi et al. (2011) in Italy, we observed that ST5 and ST8 were the most frequent STs identified in our study with 81% of the strains isolated in 80% of the patients belonging to these MLST genotypes. We observed that clonal lineages differed in terms of their biofilm-forming capacities as the majority of strong biofilm-producing strains belonged to ST5 and ST8, a trait that may contribute to the large representation of both genotypes in CF. However, due to the important representation of both STs in the overall population, ST5 and ST8 were major MLST genotypes observed in the three groups of BFI values in our study. They are also major MRSA lineages in the global population. Previous studies showed that some MRSA lineages like the predominant clone of community-acquired (CA)-MRSA in the United States, the USA300 clone in the clonal complex 8, have enhanced biofilm-forming capacity (Vanhommerig et al., 2014). Strains included in our study did not harbor the Panton-Valentine leukocidin-encoding gene characteristic of some CA-MRSA clones (unpublished) but were not characterized further in our study, thus preventing any conclusions about the implication of specific biofilm-forming lineages of ST5 or ST8 in CF.

Although antimicrobial treatments are considered as effective according to the results of *in vitro* assays, microorganisms may still persist in the CF airways for years, partly due to their ability to be protected within the polymer matrix produced during biofilm formation. In this context, the efficacy of antimicrobial therapy is reduced within the biofilm and approaches targeting bacterial biofilms in cystic fibrosis airways are required (Martin et al., 2021). However, as recently stated by Guzmán-Soto et al. (2021), "for the successful development of antibiofilm treatments and therapies, understanding biofilm development and being able to mimic such processes is vital." Several natural or synthetic compounds have shown to be active on biofilm formed by *S. aureus* (Miquel et al., 2016). However, most studies on *S. aureus* focused on the effects of antibiotics on established biofilm in the context of biofilm-associated infections other than CF, mainly medical device-associated infections. The antibiofilm activity of antibiotics on *S. aureus* isolated from CF patients has been scarcely investigated. Considering the 5 antibiotics included in this work, a PubMed search conducted on July 19, 2021, with « cefaroline » or « ceftobiprole » or « linezolid » or « rifampicin » or « trimethoprim » and « *Staphylococcus aureus* » and « cystic fibrosis » and « biofilm » found five non-redundant publications supporting the need for data acquisition on the subject of antibiotics' antibiofilm activity against CF *S. aureus* isolates (Molina et al., 2008; Aktas et al., 2013; Iglesias et al., 2019; Gilpin et al., 2021; Harrington et al., 2021). This is reinforced by the observations that most of these antimicrobial agents have been found to display an antibiofilm activity on *S. aureus* isolated in other settings. For example, ceftaroline was effective against biofilm established by MRSA *in vitro* and *in vivo* models of catheter-associated biofilm formation suggesting that ceftaroline could be considered for the treatment of biofilm-associated MRSA infections (Meeker et al., 2016). In CF, ceftaroline was

recently shown to represent an effective antimicrobial option for the management of acute pulmonary exacerbations involving MRSA in pediatric CF patients (Branstetter et al., 2020) and, on the other hand, has been shown to have an antibiofilm effect on biofilm-producing MRSA in other chronic infections (Mottola et al., 2016). Ceftobiprole has also previously demonstrated promising activity against biofilm from methicillin-resistant staphylococci (Abbanat et al., 2014). However, previous studies mainly included limited numbers of strains, either reference strains that may not reflect the behavior of CF strains or strains with no associated clinical data. In our study, we report the first data on the effect of antibiotics, including fifth-generation cephalosporins, on biofilm formation *via* a collection of clinically documented and genotypically characterized CF MRSA and seek to mimic CF sputum by using ASM in the different *in vitro* assays.

Due to the strong influence of environmental conditions on bacterial biofilm formation, the use of ASM formulated to mimic the sputum of CF patients appears promising for *in vitro* studies on CF isolates (Sriramulu et al., 2005; Dinesh, 2010). However, this technique remains little used in published studies and has mostly been used in studies on *P. aeruginosa* (Sriramulu et al., 2005; Kirchner et al., 2012; Rozenbaum et al., 2019; Iglesias and Van Bambeke, 2020). For *S. aureus*, it was previously used in a single study to determine the influence of the medium on the antibiofilm activity of antibiotics including two of those under consideration in this study (linezolid and rifampicin). ASM, containing amino acids, mucin, and free DNA, was shown to provide the most protective matrix (Rozenbaum et al., 2019) and all the antibiotics previously tested were drastically less potent and less effective in ASM than in comparators with respect to viability, metabolic activity, and biomass (Iglesias and Van Bambeke, 2020; Frisch et al., 2021). Here, through the comparative study of biofilm formation dynamics in ASM and BHI medium, we show that the use of ASM should be encouraged for further studies on biofilm formation by CF MRSA clinical isolates as an enhanced and accelerated biofilm formation was observed in ASM. However, we also found that ASM was not adaptable to all devices probably due to some of its characteristics like turbidity and viscoelasticity (Iglesias et al., 2019) and we had to consider filtered ASM for use in the BRT[®] despite the impact of the ASM filtration and the components which may be affected by this step remain unknown. Of note, ASM did not contain glucose despite glucose is present, at various levels according to the studies, in the sputum of CF patients (Van Sambeek et al., 2015; Nielsen et al., 2020) and glucose was shown to promote *S. aureus* biofilm formation (Lade et al., 2019). The supplementation of ASM with glucose may thus represent an interesting perspective for future work unless the best glucose concentration to be used can be defined considering the inter-individual (but also intra-individual) variability highlighted in previous studies of sputum samples from CF patients (Van Sambeek et al., 2015; Nielsen et al., 2020).

The inhibition of early biofilm formation observed in ASM in this study for linezolid and, more markedly, for ceftobiprole and ceftaroline represents an important finding because the first

two stages of biofilm development, that is, adsorption and adhesion, are key determinants in the next stages leading to biofilm development during initial colonization by MRSA and also during the biofilm life cycle at the dispersal stage. These observations warrant complementary studies on established biofilm and on antibiotic combinations as previously studied in other settings such as endocarditis, diabetic foot infections, and medical device-associated infections for associations including ceftaroline (Barber et al., 2015; Mottola et al., 2016; Thieme et al., 2018), as they may contribute to the required optimization of antibiotic regimens against biofilm (Lebeaux et al., 2014).

Bacterial populations colonizing CF patients are known to be highly complex and dynamic, encompassing a variety of variants whose equilibrium varies according to the changing conditions of the surrounding environment. This population diversification is an increasingly well-known host adaptation strategy which has been widely studied in Gram-negative bacilli during chronic colonization of CF patients' lungs (Winstanley et al., 2016; Menetrey et al., 2021). For *S. aureus*, diversified populations have been more rarely documented in CF (Goerke et al., 2007; Vu-Thien et al., 2010; Hirschhausen et al., 2013; Ankrum and Hall, 2017; Boudet et al., 2021; Wieneke et al., 2021). Regarding biofilm formation, we observed that patients may be colonized by clonally related strains corresponding to adaptive variants displaying distinct abilities to form biofilm, as previously described (Savage et al., 2013; Wieneke et al., 2021). Such diversification of MRSA populations and intra-sample heterogeneity of biofilm formation ability may contribute to compromising the antibiotic management of CF airway infections. Other adaptive phenotypic modifications observed for CF *S. aureus* have included the increase in antimicrobial resistance and the biofilm development observed in certain studies (Hirschhausen et al., 2013). In our study, strains adapted to the CF lung environment after years of colonization may still display low bMICs for ceftaroline, an observation that requires further investigation on a larger panel of MRSA strains isolated in chronically colonized patients. Adaptive modifications like mucoidy and nuclease activity were recently shown to be more frequently observed in case of *P. aeruginosa* co-colonization highlighting the importance of cross-talk and interactions between bacterial pathogens in shaping the adaptation of *S. aureus* to the CF lung environment (Wieneke et al., 2021). In our study, no obvious association was observed between chronic colonization by *P. aeruginosa* and the ability of MRSA to form early biofilm. Finally, future studies are still needed to investigate the behavior of CF MRSA within multispecies biofilm as well as the effect of exposure of these multispecies biofilms to different antibiotics (Vandeplassche et al., 2020).

CONCLUSION

We hereby report the first data on early biofilm formation by MRSA clinical isolates from CF patients using original and standardized approaches which had never been previously applied to such isolates and whose use should be encouraged. Indeed, the BRT[®] is well-designed to investigate the early and capital stages of biofilm formation contrarily to the most frequently used

microtiter plate dye-staining (crystal violet) assays and presents the other advantages of being a rapid, high-throughput, easy-to-handle, and highly reproducible method. The BioFlux is meanwhile a fully integrated and easy-to-use system allowing the study of the dynamic formation of the biofilm and the small volumes required make this system highly applicable for screening of biofilm inhibitory agents (for a critical review of methods usable to study biofilm formation, see Azeredo et al., 2017).

As previously observed for other CF pathogens like *P. aeruginosa* or in other settings like medical device-associated infections, antibiotic susceptibility was reduced in biofilm, thereby complicating anti-MRSA treatments and representing a risk of treatment failure in CF patients. The Antibiofilmogram[®] is a promising tool for guiding the choice of the most effective drugs against biofilm formation by MRSA in CF airways. In our study, the two broad-spectrum anti-MRSA cephalosporins ceftaroline and ceftobiprole displayed a notable ability to limit biofilm formation of CF MRSA. Hitherto little used for CF patients, the characteristics of both antimicrobial agents, together with recent studies showing that ceftaroline represents an additional treatment option for treating MRSA-associated acute pulmonary exacerbations (Branstetter et al., 2020), should promote their larger use in the management of CF patients infected by MRSA.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Institutional Review Board at Nîmes University hospital (Interface Recherche Bioéthique IRB n 21.03.01, March 04, 2021). Written informed consent from the participants' legal guardian/next of kin was not required to participate in this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR'S NOTE

This work was partly presented at the 44th European Cystic Fibrosis Conference (digital), 9–12 June 2021.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HM: conceptualization. AB, PS, and CP: methodology. AB, PS, CP, CD-R, and HM: formal analysis. AB, PS, and RC: investigation. AB, PS, CP, and RC: data curation. AB, PS, and HM: writing – original draft preparation. CP, CD-R, RC, and J-PL: writing – review and editing. AB, CD-R, and HM: supervision. CD-R, J-PL,

and HM: funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was funded by the University Hospital of Nîmes (NimAO 2018.02 grant).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Teresa Sawyers, English medical writer at Nîmes University Hospital, for editing this

paper, and Bastien Baud and Vincenette Lopez for their help with clinical and therapeutic data collection. We thank Nîmes University Hospital for its structural, human, and financial support through the award obtained by our team during the internal call for tenders "Thématiques phares." All authors belong to the FHU InCh (Fédération Hospitalo-Universitaire Infections Chroniques, Aviesan).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.750489/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abbanat, D., Shang, W., Amsler, K., Santoro, C., Baum, E., Crespo-Carbone, S., et al. (2014). Evaluation of the in vitro activities of ceftobiprole and comparators in staphylococcal colony or microtitre plate biofilm assays. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 32–39. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.09.013
- Akıl, N., and Muhlebach, M. S. (2018). Biology and management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 53, S64–S74. doi: 10.1002/ppul.24139
- Aktas, N. C., Erturan, Z., Karatuna, O., and Yagci, A. K. (2013). Pantovaleutine leukocidin and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7, 888–891. doi: 10.3855/jidc.4135
- Ankrum, A., and Hall, B. G. (2017). Population dynamics of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients to determine transmission events by use of whole-genome sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2143–2152. doi: 10.1128/JCM.00164-17
- Azevedo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., et al. (2017). Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 313–351. doi: 10.1080/1040841X.2016.1208146
- Barber, K. E., Smith, J. R., Ireland, C. E., Boles, B. R., Rose, W. E., and Rybak, M. J. (2015). Evaluation of ceftaroline alone and in combination against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to daptomycin and vancomycin in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4497–4503. doi: 10.1128/AAC.00386-15
- Benoit, M. R., Conant, C. G., Ionescu-Zanetti, C., Schwartz, M., and Matin, A. (2010). New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4136–4142. doi: 10.1128/AEM.03065-09
- Boudet, A., Jay, A., Dunyach-Remy, C., Chiron, R., Lavigne, J.-P., and Marchandin, H. (2021). In-host emergence of linezolid resistance in a complex pattern of toxic shock syndrome toxin-1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in siblings with cystic fibrosis. *Toxins* 13:317. doi: 10.3390/toxins13050317
- Branstetter, J., Searcy, H., Benner, K., Yarbrough, A., Crowder, C., and Troxler, B. (2020). Ceftaroline vs vancomycin for the treatment of acute pulmonary exacerbations in pediatric patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 55, 3337–3342. doi: 10.1002/ppul.25029
- Chavant, P., Gaillard-Martinic, B., Talon, R., Hebraud, M., and Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* 68, 605–612. doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.010
- Cocchi, P., Cariani, L., Favari, F., Lambiase, A., Fiscarelli, E., Gioffrè, F. V., et al. (2011). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italian cystic fibrosis patients: a national overview. *J. Cyst. Fibros.* 10, 407–411. doi: 10.1016/j.jcf.2011.06.005
- Crisóstomo, M. I., Westh, H., Tomasz, A., Chung, M., Oliveira, D. C., and De Lencastre, H. (2001). The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9865–9870. doi: 10.1073/pnas.161272898
- Dasenbrook, E. C., Merlo, C. A., Diener-West, M., Lechtzin, N., and Boyle, M. P. (2008). Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV₁ decline in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 814–821. doi: 10.1164/rccm.200802-3270C
- Dinesh, S. D. (2010). Artificial sputum medium. *Protoc. Exch.* doi: 10.1038/protex.2010.212
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Enright, M. C., Day, N. P. J., Davies, C. E., Peacock, S. J., and Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015. doi: 10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2021). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. Available at: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf (Accessed February 8, 2021).
- Flament-Simon, S.-K., Dupilot, M., Mayer, N., Garcia, V., Alonso, M. P., Blanco, J., et al. (2019). Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 10:1183. doi: 10.3389/fmicb.2019.01183
- Frisch, S., Boese, A., Huck, B., Horstmann, J. C., Ho, D. K., Schwarzkopf, K., et al. (2021). A pulmonary mucus surrogate for investigating antibiotic permeation and activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 76, 1472–1479. doi: 10.1093/jac/dkab068
- Fusco, N. M., Toussaint, K. A., and Prescott, W. A. Jr. (2015). Antibiotic management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-associated acute pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Ann. Pharmacother.* 49, 458–468. doi: 10.1177/1060028014567526
- Gilpin, D., Hoffman, L. R., Ceppe, A., and Muhlebach, M. S. (2021). Phenotypic characteristics of incident and chronic MRSA isolates in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 20, 692–698. doi: 10.1016/j.jcf.2021.05.015
- Glikman, D., Siegel, J. D., David, M. Z., Okoro, N. M., Boyle-Vavra, S., Dowell, M. L., et al. (2008). Complex molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children with cystic fibrosis in the era of epidemic community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Chest* 133, 1381–1387. doi: 10.1378/chest.07-2437
- Goerke, C., Gressinger, M., Endler, K., Breitkopf, C., Wardecki, K., Stern, M., et al. (2007). High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ. Microbiol.* 9, 3134–3142. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01423.x
- Goerke, C., and Wolz, C. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 520–525. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.003
- Goss, C. H., and Muhlebach, M. S. (2011). Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 10, 298–306. doi: 10.1016/j.jcf.2011.06.002
- Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzalez-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E. J., et al. (2021). Mimicking biofilm formation and development: recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience* 24:102443. doi: 10.1016/j.isci.2021.102443

- Harrington, N. E., Sweeney, E., Alav, I., Allen, E., Most, J., and Harrison, F. (2021). Antibiotic efficacy testing in an ex vivo model of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in the cystic fibrosis lung. *J. Vis. Exp.* doi: 10.3791/62187
- Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M., and McColley, S. A. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 29–70. doi: 10.1128/CMR.00036-10
- Hirschhausen, N., Block, D., Bianconi, L., Bragonzi, A., Birtel, J., Lee, J. C., et al. (2013). Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 685–692. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.09.012
- Heiby, N., Ciofu, O., and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 5, 1663–1674. doi: 10.2217/fmb.10.125
- Iglesias, Y. D., and Van Bambeke, F. (2020). Activity of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro model of biofilms in the context of cystic fibrosis: influence of the culture medium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64, e02204–e02219. doi: 10.1128/AAC.02204-19
- Iglesias, Y. D., Wilms, T., Vanbever, R., and Van Bambeke, F. (2019). Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of biofilms in the context of cystic fibrosis: influence of the culture medium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e00602–e00619. doi: 10.1128/AAC.00602-19
- Jolley, K. A., Bray, J. E., and Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- Kadkhoda, H., Ghalavand, Z., Nikmanesh, B., Kodori, M., Hour, H., Maleki, D. T., et al. (2020). Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran. *Iran J. Basic Med. Sci.* 23, 691–698. doi: 10.22038/ijbms.2020.36299.8644
- Kirchner, S., Fothergill, J. L., Wright, E. A., James, C. E., Mowat, E., and Winstanley, C. (2012). Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung. *J. Vis. Exp.* 64:e3857. doi: 10.3791/3857
- Kodori, M., Nikmanesh, B., Hakimi, H., and Ghalavand, Z. (2021). Antibiotic susceptibility and biofilm formation of bacterial isolates derived from pediatric patients with cystic fibrosis from Tehran, Iran. *Arch. Razi. Inst.* 76, 397–406. doi: 10.22092/ari.2020.128554.1416
- Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., et al. (2019). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *J. Clin. Med.* 8:1853. doi: 10.3390/jcm8111853
- Lebeaux, D., Ghigo, J. M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543. doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- Martin, I., Waters, V., and Grasmann, H. (2021). Approaches to targeting bacterial biofilms in cystic fibrosis airways. *Int. J. Mol. Sci.* 22:2155. doi: 10.3390/ijms22042155
- Meeker, D. G., Beenken, K. E., Mills, W. B., Loughran, A. J., Spencer, H. J., Lynn, W. B., et al. (2016). Evaluation of antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on activity in an established biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5688–5694. doi: 10.1128/AAC.01251-16
- Menetrey, Q., Sorlin, P., Jumas-Bilak, E., Chiron, R., Dupont, C., and Marchandin, H. (2021). *Achromobacter xylosoxidans* and *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging pathogens well-armed for life in the cystic fibrosis patients' lung. *Gene* 12:610. doi: 10.3390/genes12050610
- Miquel, S., Lagrèfuelle, R., Souweine, B., and Forestier, C. (2016). Anti-biofilm activity as a health issue. *Front. Microbiol.* 7:592. doi: 10.3389/fmicb.2016.00592
- Molina, A., Del Campo, R., Mair, L., Morosini, M. I., Lamas, A., Baquero, F., et al. (2008). High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmecI capable of biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 961–967. doi: 10.1093/jac/dkn302
- Mottola, C., Matias, C. S., Mendes, J. J., Melo-Cristino, J., Tavares, L., Cavaco-Silva, P., et al. (2016). Susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* biofilms in diabetic foot infections. *BMC Microbiol.* 16:119. doi: 10.1186/s12866-016-0737-0
- Naudin, B., Heins, A., Pinhal, S., Dé, E., and Nicol, M. (2019). BioFlux™ 200 microfluidic system to study *A. baumannii* biofilm formation in a dynamic mode of growth. *Methods Mol. Biol.* 1946, 167–176. doi: 10.1007/978-1-4939-9118-1_16
- Nielsen, B. U., Kolpen, M., Jensen, P. Ø., Katzenstein, T., Pressler, T., Ritz, C., et al. (2020). Neutrophil count in sputum is associated with increased sputum glucose and sputum L-lactate in cystic fibrosis. *PLoS One* 15:e0238524. doi: 10.1371/journal.pone.0238524
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., and Jehl, F. (2020). Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Front. Microbiol.* 10:2894. doi: 10.3389/fmicb.2019.02894
- Predari, S. C., Ligozzi, M., and Fontana, R. (1991). Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2568–2573. doi: 10.1128/AAC.35.12.2568
- Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données (2019). Vaincre la Mucoviscidose Paris, 2020. Available at: https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre_2019_vf.pdf (Accessed July 24, 2021).
- Ren, C. L., Morgan, W. J., Konstan, M. W., Schechter, M. S., Wagener, J. S., and Fisher, K. A., et al. (2007). Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr. Pulmonol.* 42, 513–518. doi: 10.1002/ppul.20604
- Rowe, S. M., Miller, S., and Sorscher, E. J. (2005). Cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 352, 1992–2001. doi: 10.1056/NEJMra043184
- Rozenbaum, R. T., van der Mei, H. C., Woudstra, W., de Jong, E. D., Busscher, H. J., and Sharma, P. K. (2019). Role of viscoelasticity in bacterial killing by antimicrobials in differently grown *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e01972–e01978. doi: 10.1128/AAC.01972-18
- Savage, V. J., Chopra, I., and O'Neill, A. J. (2013). Population diversification in *Staphylococcus aureus* biofilms may promote dissemination and persistence. *PLoS One* 8:e62513. doi: 10.1371/journal.pone.0062513
- Seemann, T. (2015). Snippy: Fast bacterial variant calling from NGS reads. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy> (Accessed July 2, 2021).
- Sriramula, D. D., Lünsdorf, H., Lam, J. S., and Römling, U. (2005). Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* 54, 667–676. doi: 10.1099/jmm.0.45969-0
- Tasse, J., Croisier, D., Badel-Berchoux, S., Chavanet, P., Bernardi, T., Provot, C., et al. (2016). Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®. *Pathog. Dis.* 74:ftw057. doi: 10.1093/femsdp/ftw057
- Tasse, J., Trouillet-Assant, S., Josse, J., Martins-Simões, P., Valour, F., Langlois-Jacques, C., et al. (2018). Association between biofilm formation phenotype and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* strains from bone and joint infections. *PLoS One* 13:e0200064. doi: 10.1371/journal.pone.0200064
- The Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry (2019). Annual data report 2020. Available at: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2019-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf> (Accessed July 24, 2021).
- Thieme, L., Klinger-Strobel, M., Hartung, A., Stein, C., Makarewicz, O., and Pletz, M. W. (2018). In vitro synergism and anti-biofilm activity of ampicillin, gentamicin, ceftazidime and ceftriaxone against *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1553–1561. doi: 10.1093/jac/dky051
- Vandeplassche, E., Sass, A., Ostyn, L., Burmelle, M., Kragh, K. N., Bjarnsholt, T., et al. (2020). Antibiotic susceptibility of cystic fibrosis lung microbiome members in a multispecies biofilm. *Biofilm* 2:100031. doi: 10.1016/j.biofilm.2020.100031
- Vanderhelst, E., De Meirleir, L., Verbanck, S., Piérard, D., Vincken, W., and Malfroot, A. (2012). Prevalence and impact on FEV₁ decline of chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients with cystic fibrosis: a single-center, case control study of 165 patients. *J. Cyst. Fibros.* 11, 2–7. doi: 10.1016/j.jcf.2011.08.006
- Vanhommerig, E., Moons, P., Pirici, D., Lammens, C., Hernalsteens, J.-P., De Greve, H., et al. (2014). Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 9:e104561. doi: 10.1371/journal.pone.0104561
- Van Sambeek, L., Cowley, E. S., Newman, D. K., and Kato, R. (2015). Sputum glucose and glycemic control in cystic fibrosis-related diabetes: a cross-sectional study. *PLoS One* 10:e0119938. doi: 10.1371/journal.pone.0119938
- Vu-Thien, H., Hormigos, K., Corbineau, G., Fauroux, B., Corvol, H., Moissenet, D., et al. (2010). Longitudinal survey of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis

- patients using a multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis method. *BMC Microbiol.* 10:24. doi: 10.1186/1471-2180-10-24
- Wieneke, M. K., Dach, F., Neumann, C., Görlich, D., Kaese, L., Thißen, T., et al. (2021). Association of diverse *Staphylococcus aureus* populations with *Pseudomonas aeruginosa* coinfection and inflammation in cystic fibrosis airway infection. *mSphere* 6:e0035821. doi: 10.1128/mSphere.00358-21
- Winstanley, C., O'Brien, S., and Brockhurst, M. A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* 24, 327–337. doi: 10.1016/j.tim.2016.01.008
- Zobell, J. T., Epps, K. L., Young, D. C., Montague, M., Olson, J., Ampofo, K., et al. (2015). Utilization of antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 50, 552–559. doi: 10.1002/ppul.23132
- Zolin, A., Orenti, A., Naehrlich, L., Jung, A., and van Rens, J. (2020). ECFSPR annual report 2018. Available online: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report_2018_v1.4.pdf (Accessed July 24, 2021).

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Boudet, Sorlin, Pouget, Chiron, Lavigne, Duniach-Remy and Marchandin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Supplementary Table. Patients and characteristics of the CF MRSA collection.

Patient designation (chronic colonization*)	Year of birth, sex	Year of first MRSA colonization	MRSA strain designation**	Year of isolation	ST	Average BFI (BRT®, 4h)	BFI group***	Co-colonizing pathogens (CC)
1 (CC)	1988, M	NA	1.1	2014	8	4.00		<i>Pa</i>
2 (CC)	2000, F	2002	2.1	2009	572	10.8		<i>Pa</i>
			2.2		572	20.30		
			2.3		572	20.11		
3 (CC)	1967, M	2012	3.4	2016	5	11.68		-
			3.5		5	20.31		
4	1990, M	2010	4.1	2016	5	8.78		<i>Pa</i>
5 (CC)	1996, F	2003	5.2	2016	5	0.12		<i>Pa</i>
			5.3		5	0.75		
6 (CC)	1991, F	2003	6.3	2016	5	0.58		<i>Pa</i>
			6.4		5	0.25		
7	2005, F	2007	7.2	2016	5	0.71		-
8	1988, M	NA	8.1	2015	34	20.3		-
9	1982, M	2006	9.1	2016	8	20.27		<i>Pa</i>
10 (CC)	1984, M	NA	10.4	2016	8	20.26		<i>Pa</i>
			10.5		8	20.23		
			10.6		8	20.26		
11	2002, F	2013	11.3	2016	5	20.29		<i>Pa</i>
			11.4		5	20.27		
			11.5		5	20.30		
12	2002, F	2007	12.1	2007	5	11.61		<i>Ax</i>
13	1998, F	2014	13.1	2014	5	20.18		-
14	1983, M	2008	14.3	2014	5	20.27		<i>Pa, Ma</i>

			14.4		4782	20.28		
15	1989, M	NA	15.1	2016	4886	20.11		<i>Pa, Bc</i>
16 (CC)	1990, F	NA	16.2	2014	5	20.27		-
17 (CC)	1996, F	2001	17.4	2016	5	10.8		<i>Pa</i>
			17.5		5	8.37		
			17.6		5	0		
18 (CC)	1981, F	2009	18.2	2016	8	3.03		<i>Pa</i>
			18.3		8	11.77		

19	1983, M	NA	19.1	2016	30	20.28		<i>Pa, Ma</i>
			19.2		30	20.25		
20	1991, F	NA	20.1	2015	5828	0.66		<i>Pa</i>
21 (CC)	1999, F	2005	21.2	2016	5	8.47		-
			21.3		5	9.165		
22 (CC)	1964, F	2005	22.5	2016	8	12.20		<i>Ax</i>
			22.6		8	19.87		
			22.7		8	13.52		
23 (CC)	2014, M	2014	23.3	2016	8	20.24		-
24	1996, M	NA	24.1	2016	5	9.20		<i>Ax</i>
			24.2		5	10.85		
25 (CC)	1988, F	NA	25.5	2016	5	4		-
			25.6		5	3.22		
			25.7		5	20.20		
			25.8		5	20.20		
26	1982, M	2007	26.1	2016	8	2.08		<i>Pa</i>
			26.2		8	10.20		
27 (CC)	1973, F	2004	27.2	2016	8	20.28		<i>Pa</i>
			27.4		8	20.18		
			27.5		8	8.80		
28 (CC)	2005, F	2015	28.3	2016	5	0		<i>Pa</i>
			28.4		5	0.25		
			28.5		5	12.84		
			28.6		5	10.55		
29	1986, M	2005	29.1	2016	5	20.16		<i>Pa</i>
30	1983, M	NA	30.1	2016	5	0		<i>Pa</i>
31 (CC)	1998, F	2005	31.2	2016	8	2.68		<i>Pa</i>
32	2005, M	NA	32.1	2016	8	1.89		-
33	1998, F	NA	33.1	2015	8	20.19		<i>Sm</i>
			33.2		5829	20.20		
34	2004, F	NA	34.1	2015	30	20.27		-
35	1986, M	2009	35.2	2015	239	11.61		<i>Pa, Pp</i>

* chronic MRSA colonization at the time of strain inclusion in the study.

** multiple strains from the same patient correspond to distinct colony morphotypes co-cultured from one sputum sample.

*** Biofilm Formation Index groups: light grey, BFI of 19.87 to 20.31 (non-adherent strains); intermediate

grey, intermediate BFI values comprised between 8.37 and 13.52; dark grey, BFI ≤ 4 (early biofilm formers).

CC = chronic colonization.

M = male; F = female.

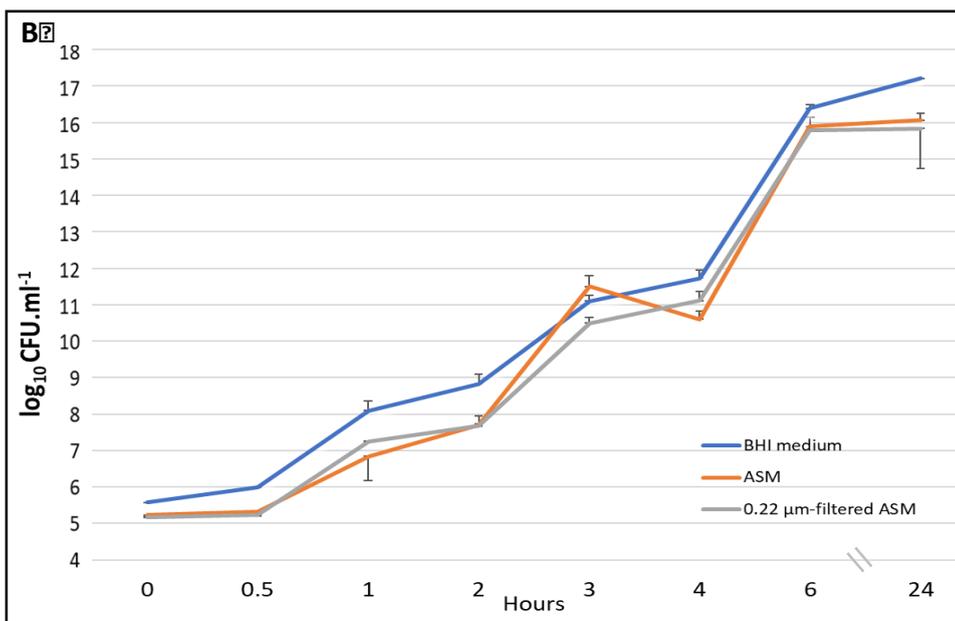
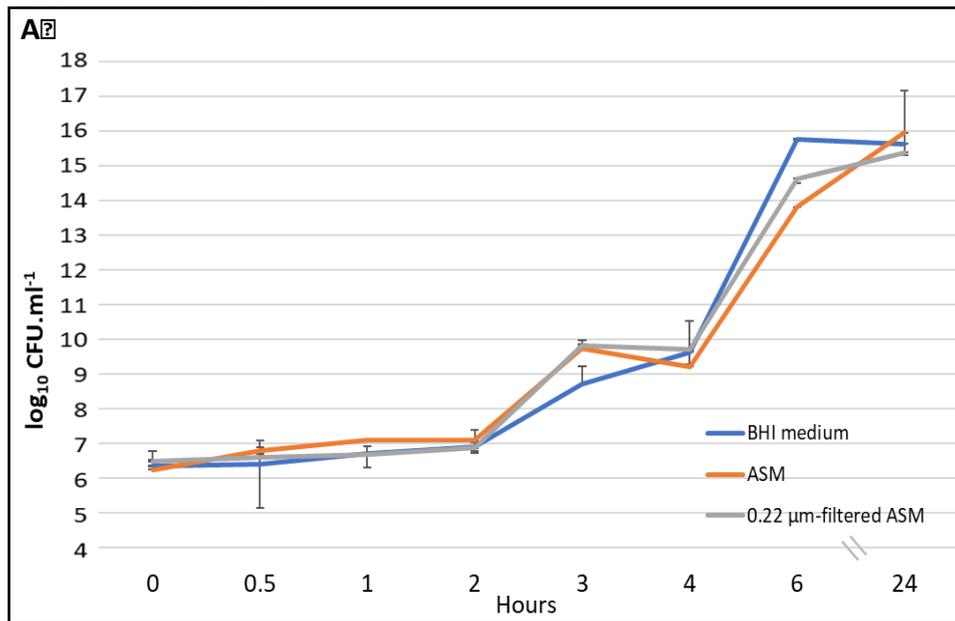
NA = not available.

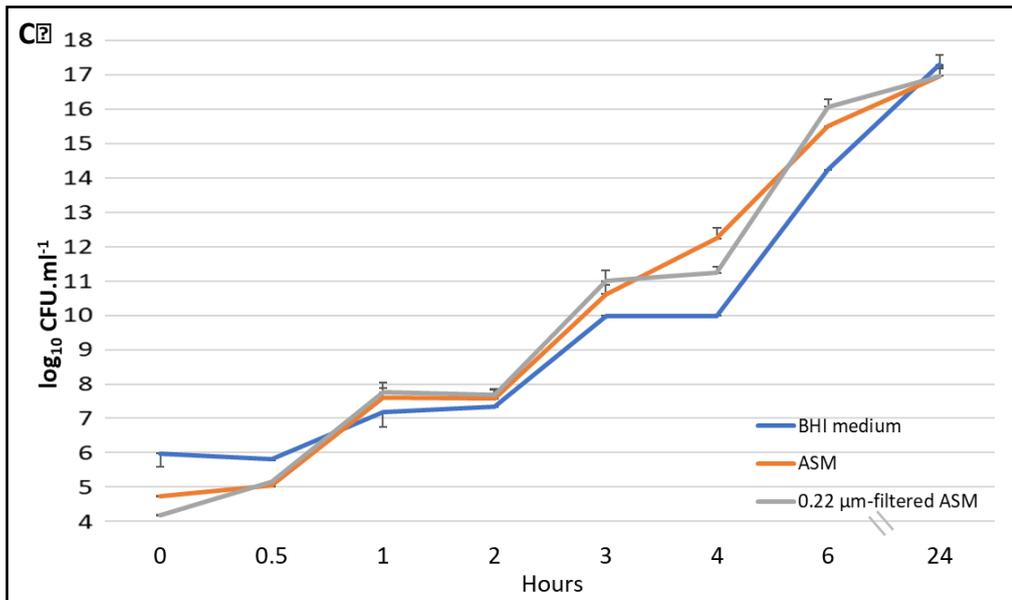
BFI = Biofilm Formation Index.

BRT® = BioFilm Ring Test® (results obtained after a 4-h incubation in 0.22 mm filtered Artificial Sputum Medium).

Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; *Ax*, *Achromobacter xylosoxidans*; *Ma*, *Mycobacterium abscessus*; *Bc*, *Burkholderia cenocepacia*; *Sm*, *Stenotrophomonas maltophilia*; *Pp*, *Pandoraea pulmonicola*.

Supplementary Figure 1



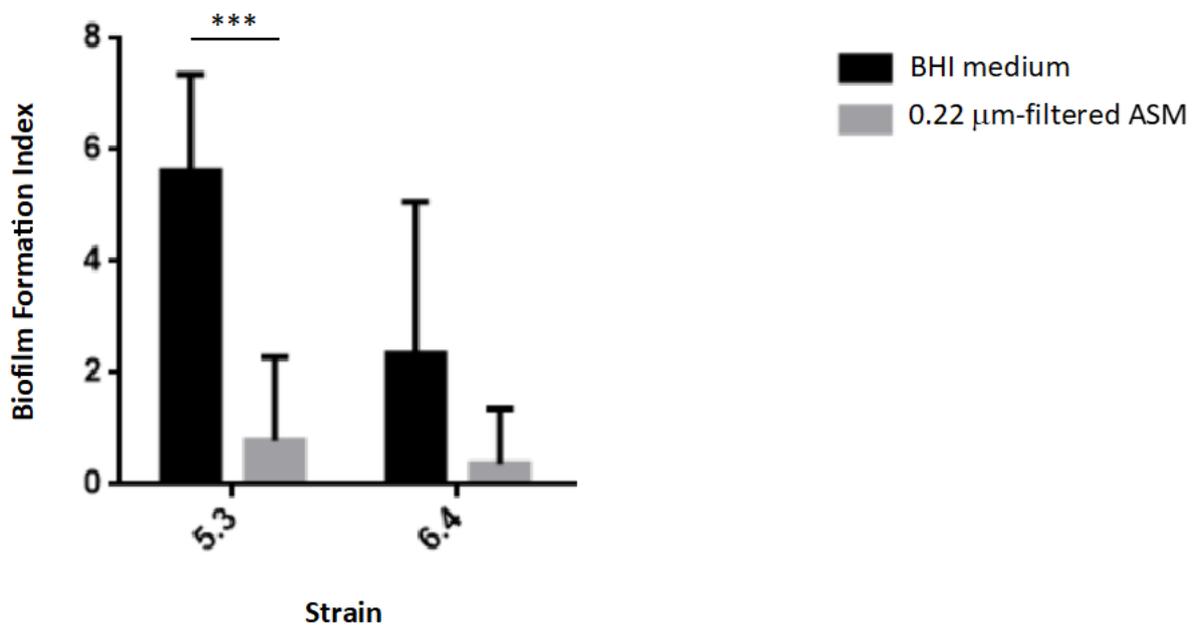


Comparison of bacterial growth of three CF MRSA strains in BHI medium, ASM and 0.22µm filtered-ASM over a 24-hour growth period.

A. Strain 5.3. **B.** Strain 6.4. **C.** Strain 17.6.

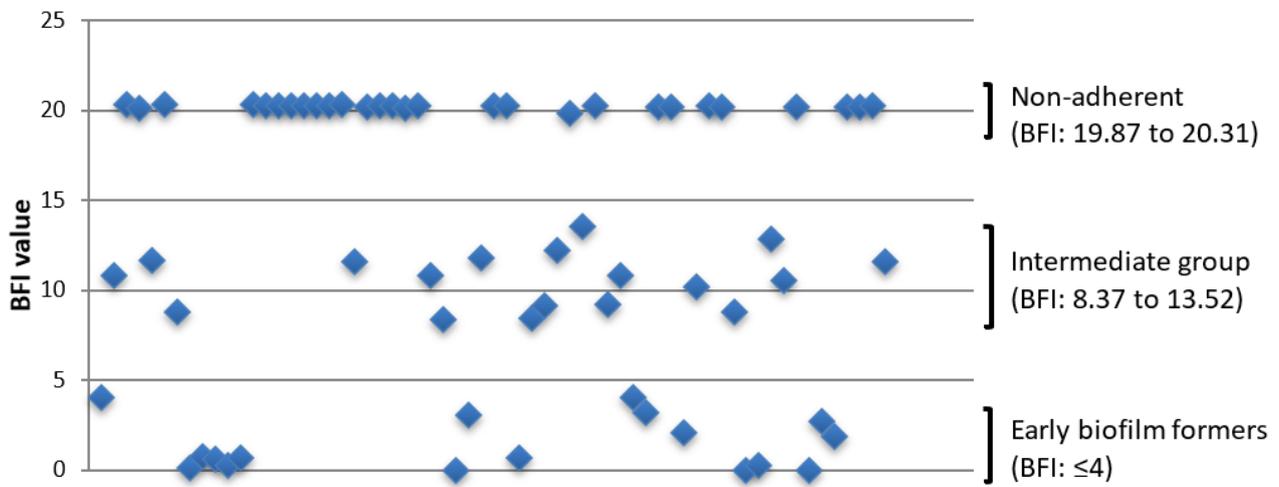
Growth curves present the number of Colony Forming Units (CFU) in log₁₀.ml⁻¹ according to the time of incubation at 37 °C (in hours).

Blue, Brain Heart Infusion (BHI) medium; orange, Artificial Sputum Medium (ASM); grey, 0.22µm filtered- ASM.



Supplementary Figure 2. Comparison of Biofilm Formation Index determined by the BioFilm Ring Test®

according to the medium for 2 CF MRSA strains after a 4h-incubation at 37 °C.
BHI, Brain Heart Infusion; ASM, Artificial Sputum Medium.
****P*-value <0.001 by Mann–Whitney U test.



Supplementary Figure 3. Distribution of the Biofilm Formation Index (BFI) values for the 63 CF MRSA strains of the study supporting the classification of the isolates in 3 groups according to their ability to form early biofilm.

3 Conclusion et perspectives

Nous rapportons ici les premières données concernant la formation de biofilm précoce par des isolats cliniques de SARM provenant de patients CF en utilisant des approches originales et standardisées. En effet, le BRT® est conçu pour étudier les étapes précoces et capitales de la formation de biofilm, contrairement aux tests basés sur la coloration du biofilm mature (méthode utilisant le Crystal Violet). De plus, le BRT® est une méthode rapide, facile à manipuler et hautement reproductible. Le BioFlux™ 200 est quant à lui un système entièrement intégré et facile à utiliser permettant l'étude de la formation dynamique du biofilm. Les petits volumes requis rendent ce système applicable au criblage d'agents inhibiteurs de la formation du biofilm (Azeredo et al., 2017). Comme observé précédemment pour d'autres agents pathogènes identifiés au cours de la mucoviscidose comme *Pa* ou dans d'autres contextes comme les infections associées aux dispositifs médicaux, la sensibilité aux antibiotiques est réduite dans le biofilm, compliquant ainsi les traitements anti-SARM et constituant un risque d'échec thérapeutique chez les patients CF. L'ATBF est un outil prometteur dans le choix d'une thérapie plus efficace et adaptée contre la formation de biofilm par les SARM. Il serait pertinent en routine de réaliser une première sélection d'antibiotiques efficaces à l'aide de l'antibiogramme conventionnel, puis dans un second temps de préciser l'effet des molécules antibiotiques sélectionnées sur l'adhésion bactérienne par l'ATBF. Ce dispositif permettrait d'optimiser le choix des thérapeutiques anti-infectieuses. Dans notre étude, les deux céphalosporines anti-SARM à large spectre, la ceftaroline et le ceftobiprole, ont montré une capacité notable à limiter la formation de biofilm des souches de SARM. Jusqu'à présent peu utilisées chez les patients CF, les caractéristiques de ces deux agents antimicrobiens, ainsi que des études récentes montrent le potentiel de la ceftaroline comme option thérapeutique supplémentaire afin de traiter les exacerbations pulmonaires aiguës associées aux SARM (Branstetter et al., 2020). Une étude complémentaire serait nécessaire afin de déterminer l'efficacité antibiofilm d'une combinaison d'antibiotiques comme cela a été décrit dans d'autres contextes tels que l'endocardite, les infections du pied diabétique et les infections associées à des dispositifs médicaux (Barber et al., 2015, Mottola et al., 2016, Thieme et al., 2018). De même, l'étude d'un panel plus large d'antibiotiques doit être envisagée afin de documenter la capacité de l'ensemble des antibiotiques potentiellement utilisables chez les patients atteints de CF à limiter la formation de biofilm par les différents pathogènes opportunistes importants au cours de cette pathologie.

4 Bibliographie

- Agostinho. A. M, Hartman. A, Lipp. C, Parker. A. E, Stewart. P. S, James. G. A. (2011). An *in vitro* model for the growth and analysis of chronic wound MRSA biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 111, 1275–1282 Doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05138.x
- Akil. N. M. D, Muhlebach. M. S. M. D. (2018). Biology and management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Pediatric. Pulmonology*. 53, S64–S74. Doi: 10.1002/ppul.24139
- Aktas. N. C., Erturan. Z, Karatuna. O, Yagci. A. K. (2013). Panton-valentine leukocidin and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract. *Journal. Infection in developing countries*. 7, 888–891. Doi: 10.3855/jidc.4135
- Álvarez. A, Fernández. L, Gutiérrez. D, Iglesias. B, Rodríguez. A, García.P. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals : latest trends and treatments based on bacteriophages *American Society for Microbiology Journal of Clinical Microbiology*. 57, 12. Doi : 57:e01006-19.
- Ando. E, Monden. K, Mitsuhata. R, Kariyama. R, Kumon. H. (2004). Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama*. 58,4, 207-214. Doi : 10.18926/AMO/32090
- Ankrum. A, Hall. B. G. (2017). Population dynamics of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients to determine transmission events by use of whole-genome sequencing. *American Society of Microbiology Journal of Clinical Microbiology*. 55, 2143–2152. doi: 10.1128/JCM.00164-17
- Archer. N.K, Mazaitis. M. J, Costerton. J. W, Leid J. G, Powers. M. E, Shirtliff. M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence*. 2:5,445-459. Doi: 10.4161/viru.2.5.17724
- Azarian. T, Ridgway. J. P, Yin. Z, David. M. Z. (2019). Long-term intrahost evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among cystic fibrosis patients with respiratory carriage. *Frontiers in Genetics*. 10,546.doi: 10.3389/fgene.2019.00546
- Azeredo. J, Azevedo. N. F, Briandet. R, Cerca. N, Coenye. T, Costa. A. R, Desvaux.M, Di Bonaventura. G et al. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical. Review of. Microbiology*. 43, 313–351. doi: 10.1080/1040841X.2016.1208146
- Balloux. F, Brynildsrud. O. B, Van Dorp. L, Shaw. L. P, Chen. H, Harris. K. A, Wang.H, Eldholm. V. (2018). From theory to practice: translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic. *Trends in microbiology*. 26,12, 1035-1048. Doi : 10.1016/j.tim.2018.08.004.
- Barber. K. E, Smith. J. R, Ireland. C. E, Boles. B. R, Rose. W. E, Rybak. M. J. (2015). Evaluation of ceftaroline alone and in combination against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to daptomycin and vancomycin in an *in vitro*

- pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*. 59, 4497–4503. doi: 10.1128/AAC.00386-15
- Benoit. M. R, Conant. C. G, Ionescu-Zanetti. C, Schwartz. M, Matin. A. (2010). New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Applied and Environmental. Microbiology*. 76, 4136–4142. doi: 10.1128/AEM.03065-09
 - Bernardy. E. E, Petit III. R. A, Raghuram. V, Alexander. A. M, Read. T. D, Goldberg. J. B. (2020). Genotypic and phenotypic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patient lung infections and their interactions with *Pseudomonas aeruginosa*. *American Society of Microbiology Journal of Clinical Microbiology*. 11,3. Doi : /10.1128/mBio.00735-20.
 - Boudet. A, Jay. A, Dunyach-Remy. C, Chiron. R, Lavigne. J.-P, Marchandin. H. (2021). In-host emergence of linezolid resistance in a complex pattern of toxic shock syndrome toxin-1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in siblings with cystic fibrosis. *Toxins* 13:317. doi: 10.3390/toxins13050317
 - Boutaleb. N, Latrache. H, Sire. O. (2008). Interactions bactéries-matériaux dans les canalisations d'eau potable. Rôle des propriétés physico-chimiques de surface sur le pouvoir d'adhésion. *Techniques Sciences Méthodes*. 11, 73-90.
 - Boyle. K. K, Wood. S, Tarity. T. D. (2018). Low-Virulence Organisms and Periprosthetic Joint Infection-Biofilm Considerations of These Organisms. *Current Review Musculoskeletal Medecine*. 11,3.409-419. doi: 10.1007/s12178-018-9503-2.
 - Branstetter. J, Searcy. H, Benner. K, Yarbrough. A, Crowder. C, Troxler. B. (2020). Ceftaroline vs vancomycin for the treatment of acute pulmonary exacerbations in pediatric patients with cystic fibrosis. *Pediatric. Pulmonology*. 55, 3337–3342. doi: 10.1002/ppul.25029
 - Carniello. V, Peterson. B. W, Van der Mei, H. C, Busscher. H. J. (2018) Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in Colloid and Interface Sciences*. 261, 1-14. Doi : 10.1016/j.cis.2018.10.005
 - Carrera-Salinas. A, González-Díaz. A, Vázquez-Sánchez. D. A, Camoez. M, Niubó. J, Càmara. J, Ardanuy .C, Marti.S, Domínguez. M. Á (2022). *Staphylococcus aureus* surface protein G (*sasG*) allelic variants: correlation between biofilm formation and their prevalence in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clones. *Research in Microbiology*, 173,3. Doi : 10.1016/j.resmic.2022.103921
 - Castagnola. E, Cangemi. G, Mesini. A, Castellani. C, Martelli. A, Cattaneo. D, Mattioli. F. (2021). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in cystic fibrosis: a narrative review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 58,3. Doi : 10.1016/j.ijantimicag.2021.106381
 - Caverly. L. J, LiPuma. J. J. (2018). Good cop, bad cop : anaerobes in Cystic Fibrosis airways. *European Respiratory Journal*. 52,1. Doi : 10.1183/13993003.01146-2018

- Cepias Auvergne, Définition des infections associées aux soins disponible en ligne : http://www.cpias-auvergnerhonealpes.fr/cpias/definition_ias.html consulté le 17/09/2022
- Cepias île de france BMR-Raisin 2018 en ligne : <http://www.cpias-ile-de-france.fr/surveillance/bmr/BMR2018.pdf> consulté le 17/09/2022
- Cepias Nouvelle Aquitaine- désinfection des locaux des établissements de soins 2010, disponible en ligne <https://www.cpias-nouvelle-aquitaine.fr/wp-content/uploads/2017/06/desinfection-locaux-def.pdf> consulté le 17/09/2022
- Ceri. H, Olson. M. E, Stremick. C, Read. R. R, Morck. D, Buret. A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 1771–1776. Doi : 10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999
- Charles. P. E, Dargent. A, Andreu. P (2017), Nouvelles molécules anti-infectieuses. Quelle place en médecine intensive réanimation pour le tédizolide, la ceftaroline et le ceftobiprole ? *New Drugs in Infectious Diseases. Which Place for Tedizolid, Ceftaroline, and Ceftobiprole in the ICU?*, *Médecine Intensive Réanimation*. 26, 3, 207-217. Doi : 10.1007/s13546-017-1271-2
- Chavant. P, Gaillard-Martinie. B, Talon. R, Hebraud. M, Bernardi. T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological. Methods*. 68, 605–612. Doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.010
- Chen. L, Wen. Y. M. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International journal of oral science*, 3, 2, 66-73. Doi : 10.4248/IJOS11022
- Childers. M, Eckel. G, Himmel. A, Caldwell. J. (2007). A new model of cystic fibrosis pathology: Lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. *Medical Hypothèses*. 68,1, 101–112. Doi : 10.1016/j.mehy.2006.06.020
- Chopra. S, Harjai. K, Chhibber. S. (2015). Antibiotic susceptibility of ica-positive and ica-negative MRSA in different phases of biofilm growth. *The Journal of antibiotics*, 68, 1, 15-22. Doi : 10.1038/ja.2014.96
- Christensen. G. D, Simpson. W. A, Younger. J. J, Baddour L.M, Barrett. F. F, Melton. D. M, Beachey. E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *American Society of Microbiology Journal of Clinical Microbiology*. 22, 996–1006. Doi : 10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985
- Chu. J, Vila-Farres, X, Inoyama. D, Ternei. M, Cohen. L. J, Gordon. E. A, Reddy. B. V. B, Charlop-Powers. Z, et al. (2016). Discovery of MRSA active antibiotics using primary sequence from the human microbiome. *Nature Chemical Biology*. 12, 12, 1004-1006. Doi : 10.1038/nchembio.2207

- Cocchi. P, Cariani. L, Favari. F, Lambiase. A, Fiscarelli. E, Gioffré. F. V, d'Aprile. A, Manso. E, Taccetti. G, Braggion. C, Döring. G, de Martino. M, Campana. S. (2011). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italian cystic fibrosis patients: a national overview. *Journal of Cystic. Fibrosis*. 10, 407–411. Doi : 10.1016/j.jcf.2011.06.005
- Comité de l'Antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) 2022 disponible sur le site : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/05/CASFM2022_V1.0.pdf? Consulté le 01/09/2022
- Costerton. J. W, Lewandowski. Z, (1997), The biofilm lifestyle, *Journal of dental research*. 11,1. Doi : 10.1177/08959374970110011101
- Costerton. J. W, Stewart. P. S, Greenberg. E. P, (1999), Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 284, 1318. Doi : 10.1126/science.284.5418.1318
- Cotter. J. J., O'Gara. J. P, Mack. D, Casey. E. (2009). Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor σ_B in *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and environmental microbiology*. 75,1, 261-264. Doi : 10.1128/AEM.00261-08
- Crisóstomo. M. I, Westh. H, Tomasz. A, Chung. M, Oliveira. D. C, De Lencastre. H. (2001). The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 9865–9870. doi: 10.1073/pnas.161272898
- Defres. S, Marwick. C, Nathwani. D, (2009). MRSA as a cause of lung infection including airway infection, community-acquired pneumonia and hospital-acquired pneumonia. *European respiratory journal*. 34, 1470-1476. DOI: 10.1183/09031936.00122309
- Deurenberg. R. H, Vink. C, Kalenic. S, Friedrich. A, Bruggeman. C. A, Stobberingh. E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical. Microbiology and Infection*. 13, 3, 222–235. Doi : 10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x
- Di Domenico. E. G, Toma. L, Provot. C, Ascenzioni. F, Sperduti. I, Prignano. G, Gallo. M.T, Pimpinelli. F, Bordignon. V, Bernardi.T, Ensoli. F (2016). Development of an in vitro assay, based on the biofilm ring test®, for rapid profiling of biofilm-growing bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1429. Doi : 10.3389/fmicb.2016.01429
- Diaz Iglesias. Y. D, Wilms. T, Vanbever. R, Van Bambeke. F. (2019). Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of biofilms in the context of cystic fibrosis: influence of the culture medium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63, 7. Doi: 10.1128/AAC.00602-19
- Diaz Iglesias. Y, Van Bambeke. F. (2020). Activity of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro model of biofilms in the context of cystic fibrosis: influence of the culture medium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 64, 4. Doi: 10.1128/AAC.02204-19

- Dinesh. S. D. (2010). Artificial sputum medium. *Protocole exchange*. Doi: 10.1038/ protex.2010.212
- Dinges. M. M, Orwin. P. M, Schlievert. P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13, 1, 16-34. Doi : 10.1128/CMR.13.1.16
- Donlan. R. M, Costerton. J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*. 15, 167–193. Doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Enright. M. C, Day. N. P. J, Davies. C. E, Peacock. S. J, Spratt. B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 3, 1008–1015. Doi : 10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000
- Epps. Q. J, Epps. K. L, Young. D. C, Zobell. J. T. (2021). State of the art in cystic fibrosis pharmacology optimization of antimicrobials in the treatment of cystic fibrosis pulmonary exacerbations: III. Executive summary. *Pediatric Pulmonology*, 1,13. Doi : 10.1002/ppul.25353
- Escolà-Vergé. L, Los-Arcos. I, Almirante.B. (2020). New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. *Medicina Clinica (English Edition)*, 154, 9, 351-357. Doi : 10.1016/j.medcle.2019.11.005
- Esposito. S, Pennoni. G, Mencarini. V, Palladino. N, Peccini. L, Principi. N. (2019). Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 849. Doi: 10.3389/fphar.2019.00849
- European Antibiotics Resistance surveillance network (Ears-net) : Fiche rapport *Staphylococcus aureus* consulté le 29/09/2022, disponibles en ligne <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2020.pdf> consulté le 02/09/2022
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2021). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. disponible en ligne https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf , consulté le 03/09/2022.
- Faisy. C, Sutterlin. L. (2016). Déficit énergétique aigu et infections acquises en réanimation. *Réanimation*. 25,2, 44-52. Doi : 10.1007/s13546-016-1185-4
- Fuller. C. M, Benos. D. J. (1992). Cfr!. *American Journal Physiological Society Cell Physiology*. 263, 2, 267-286. Doi : 10.1152/ajpcell.1992.263.2.C267
- Gabryszewski. S. J, Wong Fok Lung. T, Annavajhala. M. K, Tomlinson. K. L, Riquelme. S. A, Khan. I. N, Noguera. L.P, Wickersham. M, Zhao. A, et al. (2019). Metabolic adaptation in methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 61,2, 185-197. Doi : 10.1165/rcmb.2018-0389OC

- Gilpin. D, Hoffman. L. R, Ceppe. A, Muhlebach. M. S. (2021). Phenotypic characteristics of incident and chronic MRSA isolates in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 20, 692–698. Doi : 10.1016/j.jcf.2021.05.015
- Goeres. D. M, Hamilton. M. A, Beck. N. A, Buckingham-Meyer. K, Hilyard J.D, Loetterle. L. R, Lorenz. L.A, Walker. D. K, Stewart. P. S. (2009). A method for growing a biofilm under low shear at the air–liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nature Protocol*. 4, 783–788. Doi : 10.1038/nprot.2009.59
- Goerke. C, Wolz. C. (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *International. Journal of Medical Microbiology*. 300, 520–525. Doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.003
- Goss. C. H, Muhlebach. M. S. (2011). Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 10, 5, 298–306. Doi: 10.1016/j.jcf.2011.06.002
- Grama. A, Mărginean. O. C, Meliș. L. E, Georgescu. A. M, (2016), Staphylococcal Scalded Skin Syndrome in Child. A Case Report and a Review from Literature, *The Journal of Critical Care Medicine*. 2, 4, 192–197. Doi : 10.1515/jccm-2016-0028
- Gross. M, Cramton. S. E, Götz. F, Peschel. A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity*. 69, 5, 3423–3426. Doi : 10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001
- Guo. H, Tong. Y, Cheng. J, Abbas. Z, Li. Z, Wang. J, et al. (2022). Biofilm and Small Colony Variants—An Update on *Staphylococcus aureus* Strategies toward Drug Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 3, 1241. Doi : 10.3390/ijms23031241
- Hall-Stoodley. L, Costerton. J. W, Stoodley. P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Review Microbiology*. 2, 95–108. Doi : 10.1038/nrmicro821
- Hartmann. G. R, Heinrich. P, Kollenda. M. C, Skrobranek. B, Tropschug. M, Weiß. W. (1985). Molecular mechanism of action of the antibiotic rifampicin. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 24, 12. Doi : 10.1002/anie.198510093
- Hector. A, Kirn. T, Ralhan. A, Graepler-Mainka. U, Berenbrinker. S, Riethmueller. J, Hartl. D et al. (2016). Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 15, 3, 340-349. Doi : 10.1016/j.jcf.2016.01.004
- Hirschhausen. N, Block. D, Bianconi. I, Bragonzi. A, Birtel. J, Lee. J. C, Dübbers. A, Küster. P, Kahl. J, Peters. G, Kahl. B. C. (2013). Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is

associated with bacterial adaptation. *International Journal of Medical Microbiology*. 303, 685–692. Doi: 10.1016/j.ijmm.2013.09.012

- Høiby. N, Ciofu. O, Bjarnsholt. T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*. 5, 1663–1674. Doi : 10.2217/fmb.10.125
- Huigens. III. R. W, Abouelhassan. Y, Yang. H. (2019). Phenazine Antibiotic-Inspired Discovery of Bacterial Biofilm-Eradicating Agents. *ChemBioChem*. 20, 23, 2885-2902. Doi : 10.1002/cbic.201900116
- Jacqueline. C, Caillon. J, Le Mabecque. V, Miègeville. A. F, Donnio. P. Y, Bugnon. D, Potel. G. (2003). In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time–kill curve methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 4, 857-864. Doi : 10.1093/jac/dkg160
- Kadkhoda. H, Ghalavand. Z, Nikmanesh. B, Kodori. M, Hourii. H, Maleki. D. T, Bavandpour. A. K, Eslami. G. (2020). Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 23, 691–698. Doi: 10.22038/ijbms.2020.36299.8644
- Kaplan. J. B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*. 89, 3, 205-218. Doi : 10.1177/0022034509359403
- Kodori. M, Nikmanesh. B, Hakimi. H, Ghalavand. Z. (2021). Antibiotic susceptibility and biofilm formation of bacterial isolates derived from pediatric patients with cystic fibrosis from Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*. 76, 397–406. Doi: 10.22092/ari.2020.128554.1416
- Kong. K-F, Vuong. C, Otto. M. (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*. 296, 2-3, 133-9. Doi : 10.1016/j.ijmm.2006.01.042
- Kornegay. B. H, Andrews. J. F. (1968). Kinetics of fixed-film biologicalreactors. *Journal Water Pollution Control Federation*. 40, 460–468.
- Köser. C. U, Holden. M. T, Ellington. M. J, Cartwright. E. J, Brown. N. M, Ogilvy-Stuart. A. L, Peacock. S. J. et al. (2012). Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *The New England Journal of Medicine*, 366, 24, 2267-2275. Doi :10.1056/NEJMoa1109910
- Krueger. A, Zaugg. J, Chisholm. S, Linedale. R, Lachner. N, Teoh. S. M, et al. (2021). Secreted Toxins From *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Keratinocyte Skin Cancers Mediate Pro-tumorigenic Inflammatory Responses in the Skin. *Frontiers in microbiology*. 12. Doi : 10.3389/fmicb.2021.789042

- Kwan. B. W, Chowdhury. N, Wood. T. K. (2015). Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C. *Environmental microbiology*. 17, 11, 4406-4414. Doi : 10.1111/1462-2920.12873
- Ladhani. S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *S. aureus*. *Immunology and Medical Microbiology*. 39, 2, 181–189. Doi : 10.1016/S0928-8244(03)00225-6
- Lade. H, Park. J. H, Chung. S. H, Kim. I. H, Kim. J. M, Joo. H. S, Kim. J. S (2019). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *Journal of Clinical Medicine*. 8, 11, 1853. Doi : 10.3390/jcm8111853
- Lamoureux. C, Guilloux. C. A, Beauruelle. C, Jolivet-Gougeon. A, Héry-Arnaud. G. (2019). Anaerobes in cystic fibrosis patients' airways. *Critical reviews in microbiology*. 45, 1, 103-117. Doi : 10.1080/1040841X.2018.1549019
- Lane. W. J, Darst. S. A (2006) The structural basis for promoter -35 element recognition by the group IV sigma factors. *PLoS Biology*. 4, 9. Doi : 10.1371/journal.pbio.0040269
- Lapierre. S. G, Phelippeau. M, Hakimi. C, Didier. Q, Reynaud-Gaubert. M, Dubus. J. C, Drancourt. M. (2017). Cystic fibrosis respiratory tract salt concentration: an exploratory cohort study. *Medicine*, 96, 47. Doi : 10.1097/MD.00000000000008423
- Lebba. V. V, Totino. F, Santangelo. A, Gagliardi. L, Ciotoli. A, Virga. A et al. 2014. *Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cystic fibrosis isolates. *Frontiers in Microbiology*. 5, 280. Doi : 10.3389/fmicb.2014.00280
- Lemaoui. C. E, Layaida. H, Badi. A, Foudi. N. (2017). Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*. 19, 1, 12-19. Doi : 10.1016/j.antinf.2017.01.003
- Levin. B. R, Concepción-Acevedo. J, Udekwu. K. I. (2014). Persistence: a copacetic and parsimonious hypothesis for the existence of non-inherited resistance to antibiotics. *Current opinion in microbiology*, 21, 18-21. Doi : 10.1016/j.mib.2014.06.016
- Lewis. K. Persister cells, dormancy and infectious disease. (2007) *Nature review Microbiology*. 5, 48–56. Doi : 10.1038/nrmicro1557
- Li. C, Wu. Y, Riehle. A, Ma. J, Kamler. M, Gulbins. E, Grassmé. H. (2017). *Staphylococcus aureus* survives in cystic fibrosis macrophages, forming a reservoir for chronic pneumonia. *Infection and Immunity*. 85, 5. Doi : 10.1128/IAI.00883-16
- Liu. Y, Yang. J, Ji. M, Phillips. J, Wylam. M, Ji. Y. (2021). Identification of *cbio* gene critical for biofilm formation by MRSA CF Sa 36 strain isolated from pediatric patient with cystic fibrosis. *Pathogens*. 10, 11. Doi : 10.3390/pathogens10111363

- Llarrull. L. I, Testero. S. A, Fisher. J. F, Mobashery. S. (2010). The future of the β -lactams. *Current opinion in microbiology*. 13, 5, 551-557. Doi : 10.1016/j.mib.2010.09.008
- López-Collazo. E, Jurado. T, de Dios Caballero. J, Pérez-Vázquez. M, Vindel. A, Hernández-Jiménez. E, et al. (2015). *In vivo* attenuation and genetic evolution of a ST247-SCCmecI MRSA clone after 13 years of pathogenic bronchopulmonary colonization in a patient with cystic fibrosis: implications of the innate immune response. *Mucosal immunology*. 8, 2, 362-371. Doi : 10.1038/mi.2014.73
- Lorenz. U, Hüttinger. C, Schäfer. T, Ziebuhr. W, Thiede. A, Hacker. J et al. (2008). The alternative sigma factor sigma B of *Staphylococcus aureus* modulates virulence in experimental central venous catheter-related infections. *Microbes and infection*. 10, 3, 217-223. Doi : 10.1016/j.micinf.2007.11.006
- Lowy. F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*. 339, 8, 520-532. Doi : 10.1056/NEJM199808203390806
- Magana. M, Sereti. C, Ioannidis. A, Mitchell. C. A, Ball. A. R, Magiorkinis. E et al. (2018). Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews*, 31, 3. Doi : 10.1128/CMR.00084-16
- Malchau. K. S, Tillander. J, Zaborowska. M, Hoffman. M, Lasa. I, Thomsen. P et al. (2021). Biofilm properties in relation to treatment outcome in patients with first-time periprosthetic hip or knee joint infection. *Journal of Orthopaedic Translation*. 30, 31-40. Doi : 10.1016/j.jot.2021.05.008
- Marinelli. P, Pallares. I, Navarro. S, Ventura. S. (2016) Dissecting the contribution of *Staphylococcus aureus* α -phenol-soluble modulins to biofilm amyloid structure. *Scientific Reports*.6. Doi : 10.1038/srep34552
- Marti. M, Trotonda. M. P, Tormo-Mas. M. A, Vergara-Irigaray. M, Cheung. A.L, Lasa. I, Penadés. J. R. (2010). Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*. 12, 1, 55–64. Doi : 10.1016/j.micinf.2009.10.005
- McBain. A. J. (2009). Chapter 4: *in vitro* biofilm models: an overview. *Advances in Applied Microbiology*. 69, 99–132. Doi : 10.1016/S0065-2164(09)69004-3
- Melter. O, Radojevič. B. (2010). Small colony variants of *Staphylococcus aureus*-review. *Folia Microbiology*. 55, 6, 548-58. Doi : 10.1007/s12223-010-0089-3.
- Miquel. S, Lagrèfeuille. R, Souweine. B, Forestier. C. (2016). Anti-biofilm activity as a health issue. *Frontiers in Microbiology*. 7, 592. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00592
- Molina. A, Del Campo. R, Máiz. L, Morosini. M. I, Lamas. A, Baquero. F, Cantón.R. (2008). High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant

Staphylococcus aureus ST228-SCCmecI capable of biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62, 961–967. Doi: 10.1093/jac/dkn302

- Mottola. C, Matias. C. S, Mendes. J. J, Melo-Cristino. J, Tavares. L, Cavaco-Silva. P, Oliveira. M. (2016). Susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* biofilms in diabetic foot infections. *BMC Microbiology*. 16, 119. Doi: 10.1186/s12866-016-0737-0
- Moulin. L. (2008). Aptitude des matériaux à favoriser le développement de biofilms. Méthode d'essais. *Techniques Sciences Méthodes*. 5, 29-36.
- Naudin. B, Heins. A, Pinhal. S, Dé. E, Nicol. M. (2019). BioFlux™ 200 microfluidic system to study *A. baumannii* biofilm formation in a dynamic mode of growth. *Methods in Molecular Biology*. 1946, 167–176. Doi: 10.1007/978-1-4939-9118-1_16
- Ng. P. C, Kirkness. E. F. (2010). Whole genome sequencing. *Genetic variation*. 215-226. Doi : 10.1007/978-1-60327-367-1_12
- Nguyen. H. A, Denis. O, Vergison. A, Theunis. A, Tulkens. P. M, Struelens. M. J, Van Bambeke. F. (2009). Intracellular activity of antibiotics in a model of human THP-1 macrophages infected by a *Staphylococcus aureus* small-colony variant strain isolated from a cystic fibrosis patient : pharmacodynamic evaluation and comparison with isogenic normal-phenotype and revertant strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 4, 1434-1442. Doi : 10.1128/AAC.01145-08
- Nguyen. H. T. T, Nguyen. T. H, Otto. M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 18, 3324-3334. Doi : 10.1016/j.csbj.2020.10.027
- Nielsen. M. W, Sternberg. C, Molin. S, Regenberg. B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 47, 2383. Doi : 10.3791/2383
- Nielsen. B. U, Kolpen. M, Jensen. P. Ø, Katzenstein. T, Pressler. T, Ritz. C, Mathiesen. I. H. M, Faurholt-Jepsen. D. (2020). Neutrophil count in sputum is associated with increased sputum glucose and sputum L-lactate in Cystic Fibrosis. *PLoS One*. 15, 9. Doi: 10.1371/journal.pone.0238524
- O'Gara. J. P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*. 270, 2, 179-88. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x.
- Olivares. E, Badel-Berchoux. S, Provot. C, Jaulhac. B, Prévost. G, Bernardi. T, Jehl. F. (2016). The BioFilm Ring Test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of clinical microbiology*. 54, 3, 657-661. Doi : 10.1128/JCM.02938-15

- Olivares. E, Badel-Berchoux. S, Provot. C, Jaulhac. B, Prévost. G, Bernardi. T, Jehl. F. (2017). Tobramycin and amikacin delay adhesion and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1289. Doi : 10.3389/fmicb.2017.01289
- O'Neill. E, Pozzi. C, Houston. P, Smyth. D, Humphreys. H, Robinson. D. A, O'Gara. J. P. (2007). Association between Methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 45, 5, 1379–1388. Doi : 10.1128/JCM.02280-06
- Pacanowski. J. (2010). Linézolide: mécanisme d'action, propriétés et indications thérapeutiques. *La Lettre de l'infectiologue*. 25, 4, 152-159.
- Pande. S, Kaftan. F, Lang. S, Svatos. A, Germerodt. S, Kost. C. (2015). Privatization of cooperative benefits stabilizes mutualistic crossfeeding interactions in spatially structured environments. *International Society for Microbial Ecology Journal*. 10, 1413– 1423. Doi: 10.1038/ismej.2015.212
- Papa. R, Garzoli. S, Vrenna. G, Sabatino. M, Sapienza. F, Relucenti. M, et al. (2020). Essential oils biofilm modulation activity, chemical and machine learning analysis—Application on *staphylococcus aureus* isolates from Cystic Fibrosis patients. *International journal of molecular sciences*. 21, 23, 9258. Doi : 10.3390/ijms21239258
- Patti. J. M, Allen. B. L, McGavin. M. J, Hook. (1994) M. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annual. Review of. Microbiology*. 48, 1, 585–617.
- Pavarina. A. C, Dovigo. L. N, Sanità. P. V, Machado. A. L, Giampaolo. E. T, Vergani. C. E. (2011). Dynamic models for in vitro biofilm formation. *Biofilms: formation, development and properties*. 125-162
- Peng. H. C, Novick. R. P, Kreiswirth. B, Kornblum. J, Schlievert. P. M. (1988). Cloning, characterization, and sequencing of an agr in *S. aureus*. *Journal of Bacteriology*. 170, 9, 4365-72. Doi : 10.1128/jb.170.9.4365-4372.1988
- Pitts. B, Hamilton. M. A, Zilver. N, Stewart. P. S. (2003). A micro- titer-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*. 54, 2, 269–76. Doi : 10.1016/S0167-7012(03)00034-4
- Pompilio. A, Riviello. A, Crocetta. V, Di Giuseppe. F, Pomponio. S, Sulpizio. M. et al. (2016). Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future microbiology*, 11, 10, 1315-1338. Doi : 10.2217/fmb-2016-0049
- Porto. P. D, Cifani. N, Guarnieri. S, Di Domenico. E. G, Mariggì. M. A, Spadaro. F, Guglietta. S, Anile. M, Venuta. F, Quattrucci. S, Ascenzioni. F. (2011). Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*. 6, 5. Doi : 10.1371/journal.pone.0019970

- Pouget. C, Dunyach-Remy. C, Pantel. A, Schuldiner. S, Sotto. A, Lavigne. J. P. (2020). Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Significance and Clinical Relevance. *Microorganisms*. 14, 8, 10. Doi : 10.3390/microorganisms8101580
- Pouget. C, Gustave. C. A, Ngba-Essebe. C, Laurent. F, Lemichez. E, Tristan. A, Sotto. A, Dunyach-Rémy. C, Lavigne. J. P. (2021). Adaptation of *Staphylococcus aureus* in a medium mimicking a diabetic foot environment. *Toxins*, 13, 3, 230. Doi : 10.3390/toxins13030230
- Pouget. C, Dunyach-Remy. C, Pantel. A, Schuldiner. S, Sotto. A, Lavigne. J. P. (2021). New Adapted In Vitro Technology to Evaluate Biofilm Formation and Antibiotic Activity Using Live Imaging under Flow Conditions. *Diagnostics*. 11, 10, 1746. Doi : 10.3390/diagnostics11101746
- Pouget. C, Dunyach-Remy. C, Bernardi. T, Provot. C, Tasse. J, Sotto. A, Lavigne, J. P. (2022). A Relevant Wound-Like in vitro Media to Study Bacterial Cooperation and Biofilm in Chronic Wounds. *Frontiers in Microbiology*, 13, 705479. Doi : 10.3389/fmicb.2022.705479
- Queck. S. Y, Jameson-Lee. M, Villaruz. A. E, Bach. T. H, Khan. B. A, Sturdevant. D. E, Ricklefs S. M, Li. M, Otto. M. (2008). RNAIII-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular cell*. 10, 32, 1, 150-8. Doi : 10.1016/j.molcel.2008.08.005
- Quentin-Noury. C. (2016). Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2016, 482, 49–59. Doi : 10.1016/S1773-035X(16)30172-1
- Rebiahi. S. A, Rahmoun. M, Seddiki. S. M. L, Kadi. K, Belhadji. F, Chabni. N, Kunkel. D. (2014). Infections nosocomiales causées par *S.aureus* producteur de biofilm dans l'unité de néonatalogie de l'établissement hospitalier spécialisé mère-enfant de Tlemcen, Algérie. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*. 27, 5, 228–35. Doi : 10.1016/j.jpp.2014.08.008
- Ren. C. L, Morgan. W. J, Konstan. M. W, Schechter. M. S, Wagener. J. S, Fisher. K. A, Regelman. W. E. (2007). Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatric Pulmonology*. 42, 6, 513–518. Doi: 10.1002/ppul.20604
- Regassa. L. B, Novick. R. P, Betley. M. J. (1992). Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. 60, 8, 3381–3388. Doi : 10.1128/iai.60.8.3381-3388.1992
- Registre Français de la Mucoviscidose –Bilan des Données 2021, Vaincre la mucoviscidose Paris, disponible en ligne : https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre_francais_de_la_mucoviscidose_bilan_2021.pdf, consulté le 1 octobre 2022

- Reynolds. J, Wigneshweraraj. S. (2011) Molecular Insights into the Control of Transcription Initiation at the *Staphylococcus aureus agr* operon. *Journal of Molecular Biology*. 412, 5, 862–881. Doi : 10.1016/j.jmb.2011.06.018
- Ribarska. T, Bjørnstad. P. M, Sundaram. A. Y, Gilfillan. G. D. (2022). Optimization of enzymatic fragmentation is crucial to maximize genome coverage: a comparison of library preparation methods for Illumina sequencing. *BMC. Genomics*. 23, 92, 1-11. Doi : 10.1186/s12864-022-08316-y
- Rijnaarts. H. H, Norde. W, Bouwer. E. J, Lyklema. J, Zehnder. A. J. B. (1995). Reversibility and Mechanism of Bacterial Adhesion. *Colloids and Surfaces B : Biointerface*. 4, 1, 5–22. Doi : 10.1016/0927-7765(94)01146-V
- Roberts. S, Chambers. S. (2005). Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Internal Medicine Journal*. 35, 2, 97–105. Doi : 10.1111/j.1444-0903.2005.00983.x
- Robles. J. C, Koreen. L, Park. S, Perlin. D. S. (2004). Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *Journal of clinical Microbiology*, 42, 6, 2480-2488. Doi : 10.1128/JCM.42.6.2480-2488.2004
- Rogers. G. B, Carroll. M. P, Serisier. D. J, Hockey. P. M, Jones. G, Bruce. K. D. (2004). Characterization of Bacterial Community Diversity in Cystic Fibrosis Lung Infections by Use of 16S Ribosomal DNA Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 11, 5176–5183. Doi : 10.1128/JCM.42.11.5176–5183.2004
- Rouard. C, Garnier. F, Leraut. J, Lepointeur. M, Rahajamananav. L, Languépin. J, Ploy. M. C, Bourgeois-Nicolaos. N, Doucet-Populaire. F. (2018). Emergence and Within-Host Genetic Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to Linezolid in a Cystic Fibrosis Patient. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 62,12. Doi : 10.1128/AAC.00720-18
- Rozenbaum. R. T, Van der Mei. H. C, Woudstra. W, De Jong. E. D, Busscher. H. J, Sharma. P. K. (2019). Role of viscoelasticity in bacterial killing by antimicrobials in differently grown *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63, 4, 1972–2018. Doi: 10.1128/AAC.01972-18
- Rumpf. C, Lange. J, Schwartbeck. B, Kahl. B. C. (2021). *Staphylococcus aureus* and Cystic Fibrosis—A Close Relationship. What Can We Learn from Sequencing Studies? *Pathogens*. 10, 9, 1177. Doi : 10.3390/pathogens10091177
- Saint-Criq. V, Gray. M. A. (2017). Role of CFTR in epithelial physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74, 1, 93-115. Doi : 10.1007/s00018-016-2391-y
- Sandberg. M. E, Schellmann. D, Brunhofer. G, Erker. T, Busygin. I, Leino. R, Vuorela. P. M, Fallarero. A. (2009). Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable

Staphylococcus aureus biofilms in a screening assay. *Journal of Microbiological Methods*. 78, 1, 104–106. Doi : 10.1016/j.mimet.2009.04.014.

- Saunders. N. A, Holmes. A. (2007). Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology*. 391, 71-85. Doi : 10.1007/978-1-59745-468-1_6
- Savage. V. J, Chopra. I, O’Neill. A. J. (2013). Population diversification in *Staphylococcus aureus* biofilms may promote dissemination and persistence. *PLoS One*. 8, 4, doi : 10.1371/journal.pone.0062513
- Sawicki. G, Rasouliyan. L, Ren. C (2009). The impact of MRSA on lung function in patients with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 179, 8, 734-735. Doi : 10.1164/ajrccm.179.8.734a
- Seidl. K, Stucki. M, Ruegg. M, Goerke. C, Wolz. C, Harris. L, Berger-Bächli. B, Bischoff. M. (2006). *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50, 4, 1183-1194. Doi: 10.1128/AAC.50.4.1183-1194.2006
- Shi. J, Mao. N. F, Wang. L, Zhang. H. B, Chen. Q, Liu. H, et al. (2014). Efficacy of combined vancomycin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms in vivo. *PLoS one*. 9, 12, 113-133. Doi : 10.1371/journal.pone.0113133
- Silva. V, Almeida. L, Gaio. V, Cerca. N, Manageiro. V, Caniça. M, et al. (2021). Biofilm formation of multidrug-resistant MRSA strains isolated from different types of human infections. *Pathogens*, 10, 8, 970. Doi : 10.3390/pathogens10080970
- Sonnevile. F, Ruffin. M, Guillot. L, Rousselet. N, Le Rouzic. P, Corvol. H, Tabary. O. (2015). "New insights about miRNAs in Cystic Fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 185, 4, 897-908. Doi : 10.1016/j.ajpath.2014.12.022
- Sriramulu. D. D, Lünsdorf. H, Lam. J. S, Römling. U. (2005). Microcolony formation : a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *Journal of Medical Microbiology*. 54, 7, 667–676. Doi: 10.1099/jmm.0.45969-0
- Stepanovic. S, Vukovic. D, Hola. V, Di Bonaventura. G, Djukić. S, Ćirković. I, Ruzicka. F (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. 115, 8, 891–899. Doi : 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- «Surveillance de l’antibiorésistance en établissement de santé. Données. (2018). Partie 2 : résistance bactérienne aux antibiotiques» disponible en ligne : <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/documents/rapport-synthese/surveillance-de-l-antibioresistance-en-etablissement-de-sante.-donnees-2018.-partie-2-resistance-bacterienne-aux-antibiotiques>. Consulté le 05/09/2022

- Tan. X, Coureuil. M, Ramond. E, Euphrasie. D, Dupuis. M, Tros. F et al.(2019). Chronic *Staphylococcus aureus* lung infection correlates with proteogenomic and metabolic adaptations leading to an increased intracellular persistence. *Clinical infectious diseases*. 69, 11, 1937-1945. Doi : 10.1093/cid/ciz106
- Teodósio. J. S, Silva. F. C, Moreira. J. M. R, Simões. M, Melo. L. F, Alves. M. A, Mergulhão. F. J. (2013). Flow cells as quasi-ideal systems for biofouling simulation of industrial piping systems. *Biofouling*. 29, 8, 953-66. Doi : 10.1080/08927014.2013.821467
- Thieme. L, Klinger-Strobel. M, Hartung. A, Stein. C, Makarewicz. O, Pletz. M. W. (2018). *In vitro* synergism and anti-biofilm activity of ampicillin, gentamicin, ceftaroline and ceftriaxone against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73, 6, 1553–1561. Doi : 10.1093/jac/dky051
- Tong. S. Y. C, Davis. J. S, Eichenberger. E, Holland. T. L, Fowler. V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections : Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28, 3. Doi:10.1128/CMR.00134-14.
- Tremblay. Y.D, Hathroubi. S, Jacques. M. (2014). Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78, 2, 110-6.
- Turlej. A, Hryniewicz. W, Empel. J. (2011). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Classification and Typing Methods : an Overview. *Polish Journal of Microbiology*. 60, 2, 95–103.
- Turner. N. A, Sharma-Kuinkel. B. K, Maskarinec. S. A, Eichenberger. E. M, Shah. P. P, Carugati. M et al. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research *Nature Review Microbiology*. 17, 4, 203–218. Doi:10.1038/s41579-018-0147-4
- Ulrich. M, Bastian. M, Cramton. S. E, Ziegler. K, Pragman. A. A, Bragonzi. A. et al. (2007). The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Molecular microbiolog*. 65, 5, 1276-1287. Doi : 10.1111/j.1365-2958.2007.05863.x
- Valliammai. A, Sethupathy. S, Priya. A, Selvaraj. A, Bhaskar. J. P, Krishnan. V, Pandian. S. K. (2019). 5-Dodecanolide interferes with biofilm formation and reduces the virulence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) through up regulation of agr system. *Scientific reports*. 9, 1, 1-16. Doi : 10.1038/s41598-019-50207-y
- Vanassche. T, Peetermans. M, Van Aelst. L. N. L, Peetermans. W. E, Verhaegen. J, Missiakas. D. M, Schneewind. O, Hoylaerts. M. F, Verhamme. P. (2013). The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related *Staphylococcus aureus* infections. *The Journal of Infectious diseases*. 208, 1, 92–100. Doi : 10.1093/infdis/jit130

- Vanderhelst. E, De Meirleir. L, Verbanck. S, Piérard. D, Vincken. W, Malfroot. A. (2012). Prevalence and impact on FEV1 decline of chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients with Cystic Fibrosis : a single-center, case control study of 165 patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 11, 1, 2–7. Doi: 10.1016/j.jcf.2011.08.006
- Van El. C. G, Cornel. M. C, Borry. P, Hastings. R. J, Fellmann. F, Hodgson. S. V et al. (2013). Whole-genome sequencing in health care. *European Journal of Human Genetics*. 21, 6, 580-584. Doi : 10.1038/ejhg.2013.46
- Van Rens. J, Fox. A, Krasnyk. M, Orenti. A, Zolin. A, Jung. A, Naehrlich. L. (2020). The European Cystic Fibrosis Society Patient Registry’s Data Quality programme. *European Conference on Rare Diseases and Orphan Products*.
- Van Sambeek. L, Cowley. E. S, Newman. D. K, Kato. R. (2015). Sputum glucose and glycemic control in Cystic Fibrosis-related diabetes : a cross-sectional study. *PLoS One*. 10, 3, 0119938. Doi: 10.1371/journal.pone.0119938
- Vu-Thien. H, Hormigos. K, Corbineau. G, Fauroux. B, Corvol. H, Moissenet. D, Vergnaud. G, Pourcel. C. (2010). Longitudinal survey of *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis patients using a multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis method. *BMC Microbiology*. 10, 24. Doi: 10.1186/1471-2180-10-24
- Whitchurch. C. B, Tolker-Nielsen. T, Ragas. P. C, Mattick. J. S. (2002). Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*. 295, 5559, 1487–1487. Doi : 10.1126/science.295.5559.1487
- Yuan. Y, Zai. Y, Xi. X, Ma. C, Wang. L, Zhou. M. et al. (2019). A novel membrane-disruptive antimicrobial peptide from frog skin secretion against cystic fibrosis isolates and evaluation of anti-MRSA effect using *Galleria mellonella* model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 1863, 5, 849-856. Doi : 10.1016/j.bbagen.2019.02.013
- Zhang. Y, Li. X, Grassme. H, Doring. G, Gulbins. E. (2010). Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by CFTR-Deficient macrophages on infection. *Journal of Immunology*. 184, 9, 5104-11. Doi : 10.4049/jimmunol.0902851
- Zhanel. G. G, Sniezek. G, Schweizer. F, Zelenitsky. S, Lagace-Wiens. P. R, Rubinstein. E. et al (2009). Ceftaroline. *Drugs*, 69, 7, 809-831
- Zimmermann. G. R, Lehár. J, Keith. C. T. (2007). Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug discovery today*. 12, 1-2, 34-42. Doi : 10.1016/j.drudis.2006.11.008

5 Annexe

5.1 Poster présenté lors du congrès de l'ECFS 2021

EPS3.09

44th EUROPEAN CYSTIC FIBROSIS CONFERENCE
9-12 June 2021

eEFS DIGITAL

Biofilm formation in MRSA isolated in Cystic Fibrosis patients is strain-dependent and differentially influenced by antibiotics

A. Boudet^{1,2}, P. Sorlin³, C. Pouget¹, R. Chiron⁴, J.-P. Lavigne^{1,2}, C. Dunyach-Remy^{1,2}, H. Marchandin^{1,3}

1 INSERM U1047, Univ. Montpellier, Nîmes, France
2 Département de Microbiologie, CHU Nîmes, Nîmes, France
3 Equipe PHYSE, HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, Université de Montpellier, Montpellier, France
4 Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France



INTRODUCTION

- Staphylococcus aureus* is the most frequent pathogen in cystic fibrosis (CF) and multidrug resistant strains especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) have been associated with more severe lung dysfunction¹.
- MRSA eradication is thus recommended based on specific therapeutic strategies.
- Lung abnormalities in CF include a sticky mucus → microorganisms are protected from eradication treatments.
- Bacterial traits, including the ability to form biofilm, are also important features of persistence^{2,3}.

AIM

To evaluate the ability of MRSA isolated from CF patients to form biofilm, in absence and in presence of different antibiotics

METHODS

- 65 MRSA strains isolated from 35 CF patients at the CF center of the University Hospital of Montpellier, France + reference strain ATCC 29213.
- Genotyping by Multi Locus Sequence Typing (MLST) → Sequence Type (ST)⁴.
- Biofilm Ring test⁵ (BRT)⁵ for evaluating:
 - the ability to form biofilm in the Artificial Sputum Medium (ASM), mimicking the CF lung environment:
 - BFI > 7: weak biofilm production (BP), 4 < BFI < 7: moderate BP, BFI < 4: complete BP
- the Antibiofilmogram⁶ to evaluate the impact of **ceftazidime, ceftaroline, rifampicin, linezolid and trimethoprim** on the biofilm formation:
 - determination of the biofilm Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
 - comparison of BMC with MIC

RESULTS

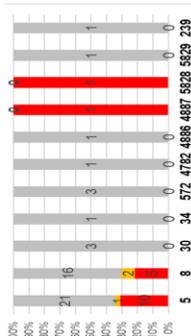


Figure 1: Sequence type (ST, bold type) distribution of 65 MRSA isolated in 35 CF patients (n1: no of strains, n2: no of patients indicated when >1 strain/ST)

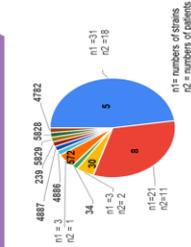


Figure 2: Relative distribution of MRSA strains according to their ST

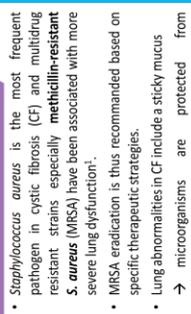


Figure 3: Ability to form biofilm using BRT in ASM. Grey: no biofilm production (BP), orange: partial BP, red: complete BP.

CONCLUSIONS

- We first report data on early biofilm formation by CF MRSA isolates using an original and standardized approach not previously applied to such isolates⁵.
- Strains of ST5 and ST8 were predominant among the MRSA population studied and more rapidly produced mature biofilm than the other genotypes⁶.
- Antibiotic susceptibility decreased in biofilm highlighting the risk of treatment failure in CF patients.
- Antibiofilmogram⁶ represents a promising tool to guide the choice of the most effective drugs against biofilm formation.
- In our study, prevention of biofilm formation was observed for ceftazidime > ceftazidime > linezolid.

REFERENCES

- Dankovsk MC et al. Staphylococcus aureus and role of FET1 adhesion in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178(8):934-21.
- Donaudou M et al. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2):167-93.
- Atan NC et al. Penicillin-Valentine-Indolacin and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract. *The Journal of Microbiology*. 2019; 15(1):1-10.
- Ernst MC et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(9):1508-15.
- Diaz Igeles Y et al. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* model of biofilms in the context of cystic fibrosis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2019; 113(1):1-10.
- Isaev I et al. Association between biofilm formation phenotype and clinical outcome in *Staphylococcus aureus* strains from bone and joint infections. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0200064.

CONTACT INFORMATION

agathe.boudet@chu-nimes.fr

Figure 29 : Poster commenté lors du 44^{ème} congrès de l'European Cystic Fibrosis Society (ECFS), 9-12 Juin 2021 (digital) : Agathe Boudet, Pauline Sorlin, Cassandra Pouget, Raphaël Chiron, Jean-Philippe Lavigne, Catherine Dunyach-Remy, Hélène Marchandin.

5.2 Composition du milieu ASM

Tableau 5 : Composition de l'Artificial Sputum medium (Sriramulu et al., 2005) Ingrédients pour 1 L

Composants	Quantité pour 1 Litre
ADN de sperme de poisson	4 g
Mucine	5 g
Ensemble d'acide aminés	0,25 g
Emulsion d'oeuf	5 mL
DTPA, chélateur	5,9 g
KCl, NaCl	2,2 g

ADN : Acide déoxy ribonucléique, DTPA : diethylene triamine pentaacetic acid, KCl : Chlorure de potassium, NaCl : Chlorure de sodium

L'Université n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses

Les opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs

Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le 6/10/2022

P/Le Président de l'Université de Montpellier et par délégation

Le Directeur de l'U.F.R
Des sciences pharmaceutiques et biologiques

Vincent LISOWSKI

Titre de la thèse : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et formation de biofilm au cours de la mucoviscidose : importance, influence des conditions environnementales et stratégies anti-biofilm

Titre de la thèse en anglais : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and biofilm formation in cystic fibrosis : importance, influence of environmental conditions and anti-biofilm strategies

Résumé

La mucoviscidose (Cystic Fibrosis, CF) est une maladie provoquée par la mutation du gène *cftr* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) entraînant un déséquilibre ionique cellulaire délétère pour de nombreux organes dont les poumons. Il en résulte une modification de la clairance mucociliaire et un mucus visqueux propices à la stase bactérienne et aux colonisations et infections respiratoires. *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus fréquemment isolée chez les patients CF. Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) sont par ailleurs responsables de la détérioration de la fonction pulmonaire des patients CF. Outre leur multirésistance aux antibiotiques, la capacité de ces souches à former du biofilm limite l'efficacité des thérapies antimicrobiennes. Dans ce contexte, nous avons étudié la capacité de souches cliniques de SARM issues de patients atteints de CF à produire du biofilm en présence ou en l'absence de cinq antibiotiques connus pour leur action anti-SARM : le linézolide, la rifampicine, le triméthoprim, la ceftaroline et le ceftobiprole. Nous avons utilisé des méthodes standardisées : le BioFilm Ring test® (BRT®), l'antibiofilmogramme ® et le système BioFlux™ 200 ainsi que l'Artificial Sputum Medium (ASM) mimant par sa composition, le mucus respiratoire des patients CF. Un total de 63 souches de SARM isolées de 35 patients CF a été sélectionné. Dix-sept souches (27%) ont montré une forte adhérence, étape initiale de la production de biofilm. Les Concentrations Minimales Inhibitrices dans le biofilm (CMIB) des cinq antibiotiques ont été déterminées pour ces 17 souches montrant que l'inhibition de la formation de biofilm la plus forte était observée pour le linézolide, la ceftaroline et le ceftobiprole. Cette action était conservée pour des souches adaptées à l'environnement pulmonaire après des années de persistance (3 à 9 ans). Enfin, l'étude de la dynamique de formation du biofilm a montré que celle-ci était favorisée en ASM justifiant une utilisation plus large de ce milieu pour les études de souches CF et qu'une inhibition de la formation de biofilm marquée et durable était observée pour la ceftaroline et le ceftobiprole et, de manière moins marquée, pour le linézolide. Cette étude permet d'acquérir de nouvelles connaissances sur la formation de biofilm par des souches de SARM isolées de patients CF montrant que celle-ci est fréquente, souche-dépendante, y compris au sein d'un même échantillon, et différenciellement influencée par les antibiotiques. L'étude de l'effet anti-biofilm d'un plus large panel d'antibiotiques voire d'associations d'antibiotiques serait à envisager afin de compléter les données obtenues dans ce travail.

Résumé en anglais

Cystic Fibrosis (CF) is a disease caused by mutation of the *cftr* gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) resulting in a cellular ionic imbalance that is harmful to many organs including the lungs. This results in a change in mucociliary clearance and a viscous mucus conducive to bacterial stasis and colonization and respiratory infections. *Staphylococcus aureus* is the most frequently isolated species in patients with cystic fibrosis. Methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA) are also responsible for the deterioration of lung function in CF patients. In addition to their multiresistance to prescribes, the ability of these strains to form biofilm limits the effectiveness of antimicrobial therapies. In this context, we examined the ability of clinical strains of MRSA from CF patients to produce biofilm in the presence or absence of five known anti-MRSA agents: linezolid, rifampicin, trimethoprim, ceftaroline and ceftobiprole. We used standardized methods: the BioFilm Ring test® (BRT®), the antibiofilmogram ® and the BioFlux™ 200 system as well as the Artificial Sputum Medium (ASM) mimicking by its composition, the respiratory mucus of CF patients. A total of 63 MRSA strains isolated from 35 CF patients was selected. Seventeen strains (27%) showed strong adhesion, the initial step in biofilm production. Minimum Inhibitory Concentrations in biofilm (MICb) of the five antibiotics were determined for these 17 strains showing that the strongest inhibition of biofilm formation was observed for linezolid, ceftaroline and ceftobiprole. This action was retained for strains adapted to the pulmonary environment after years of persistence (3 to 9 years). Finally, the study of the dynamics of biofilm formation showed that this was favored in ASM, justifying a wider use of this medium for studies of CF strains and that a marked and lasting inhibition of biofilm formation was observed for ceftaroline and ceftobiprole and, less markedly, for linezolid. This study provides new knowledge on the formation of biofilm by MRSA strains isolated from CF patients showing that it is frequent, strain-dependent, including within the same sample, and differentially influenced by antibiotics. The study of the anti-biofilm effect of a larger panel of antibiotics or even combinations of antibiotics should be considered in order to complete the data obtained in this work.

Mots clés :

Mucoviscidose, *Staphylococcus aureus*, SARM, biofilm, activité anti-biofilm, linézolide, rifampicine, triméthoprim, ceftaroline, ceftobiprole

Mots clés en anglais :

Cystic fibrosis, *Staphylococcus aureus*, MRSA, biofilm, antibiofilm activity, linezolid, rifampicin, trimethoprim, ceftaroline, ceftobiprole