



**Université de Montréal**

**Rôle des polysaccharides de surface dans la formation des biofilms  
et rôle du biofilm d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* dans la  
pathogénicité**

Par

Skander Hathroubi

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

**Thèse présentée à la faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de  
philosophiae doctor (Ph.D.) en sciences vétérinaires option microbiologie**

**Mai 2016**

**© Skander Hathroubi, 2016**

## RÉSUMÉ

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est un bacille Gram-négatif de la famille des *Pasteurellaceae*. *A. pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une maladie hautement contagieuse et endémique qui cause encore à ce jour d'énormes pertes économiques dans le monde de l'industrie porcine. La pathogenèse des infections à *A. pleuropneumoniae* implique plusieurs facteurs de virulence de la bactérie dont les principaux sont les lipopolysaccharides (LPS) et la capsule polysaccharidique (CPS). Ces derniers sont impliqués dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*. Très récemment, il a été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* était capable de produire, sous certaines conditions un biofilm riche en poly-N-acétyl-D-glucosamine (PGA). Cependant, le rôle de cette structure dans la pathogenèse ainsi que les facteurs intervenant dans sa formation et ses signaux déclencheurs sont peu connus à ce jour.

Dans cette étude, nous avons démontré que l'antigène O du LPS joue un rôle important dans la formation d'un biofilm mature par *A. pleuropneumoniae* que ce soit dans un modèle statique ou dans un modèle dynamique en flux, le «drip flow reactor», plus représentatif de l'environnement pulmonaire. Alors que l'absence de la capsule ou du noyau oligosaccharidique du LPS ne semble pas affecter la formation du biofilm, le défaut de formation du biofilm chez le mutant antigène O semble être lié à un problème de production de PGA. En effet, des tests d'immunodétection du PGA associé aux bactéries, à l'aide d'anticorps spécifiques, et les études d'expression du PGA démontrent que le mutant antigène O produit moins de polysaccharide. De plus, les gènes codant pour le système de stress exocytosomique CpxRA semblent être moins exprimés chez le mutant antigène O.

L'expression du système CpxRA a également été étudiée lors de l'exposition de souches faiblement productrices de biofilm à des doses sous inhibitrices de pénicilline G (sous-CMI de PG). L'expression des gènes *cpxR* et *cpxA* ainsi que d'un gène codant pour la biosynthèse du PGA est augmentée après exposition à des doses sous-CMI de PG. Cette augmentation est suivie d'une augmentation de la capacité des souches étudiées à former un biofilm ainsi que d'une modification de la composition de la matrice extracellulaire. Ces résultats suggèrent que des doses sous-CMI de PG semblent agir comme signaux activateurs de la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*.

Finalement, des expériences visant à établir l'implication du biofilm dans l'échappement d'*A. pleuropneumoniae* au système immunitaire ont démontré que les bactéries du biofilm sont moins susceptibles d'activer des cellules immunitaires que les bactéries planctoniques. À l'aide de la spectrométrie de masse, nous avons démontré une distribution différente des structures du lipide A du LPS entre les bactéries planctoniques et ceux du biofilm. Ces modifications structurales au niveau du lipide A pourraient expliquer, du moins en partie, cette diminution de la réponse inflammatoire suite à l'exposition des macrophages aux bactéries du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*.

Au cours de ce projet, nous avons ainsi pu identifier de nouveaux facteurs importants pour la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* nous permettant de mieux comprendre les mécanismes de formation du biofilm ainsi que son implication dans la pathogénicité.

**Mots clés :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, biofilm, lipopolysaccharide, lipide A, cytokines, pénicilline G

## ABSTRACT

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium belonging to the *Pasteurellaceae* family and the causative agent of porcine pleuropneumonia, a highly contagious disease that causes important economic losses to the swine industry worldwide. Several virulence factors of *A. pleuropneumoniae* have been identified. These factors include the Apx toxins, iron uptake systems and surface polysaccharides. Surface polysaccharides including lipopolysaccharides (LPS) and capsular polysaccharides (CPS) are implicated in the adhesion of *A. pleuropneumoniae*. Recent literature indicates that *A. pleuropneumoniae* has the ability to rapidly form a biofilm rich in poly-N-acetyl-D-glucosamine (PGA). However, the role of the biofilm in the pathogenesis as well as factors and signals involved in are little known to date.

In this study, we demonstrated that the LPS O antigen plays an important role in the biofilm formation by *A. pleuropneumoniae* whether in a static model or a dynamic model under continuous flow, the "drip flow reactor" which is more representative of the lung environment. While truncation of the LPS core oligosaccharide or the absence of CPS did not have any effect, absence of O antigen markedly reduced the ability of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 to form a mature biofilm. This finding was linked for the O-antigen mutant to a reduced *pgaA* expression and, consequently, a reduced PGA production. Indeed, compared to the parental or other strains, the biofilm of the O-antigen mutant was dramatically reduced and it had less cell-associated PGA. Real-time PCR analyses revealed a significant reduction in the level of *pgaA* which encodes for biosynthesis of PGA. Interestingly, the O-antigen mutant also exhibited reduced expression of stress extracytoplasmic CpxRA system.

Expression of CpxRA system was also investigated during the exposure of field isolates of *A. pleuropneumoniae* to sub-minimal inhibitory concentrations of penicillin G (sub-MICs of PG).

Surprisingly, *cpxR*, *cpxA* and *pgaA* expression was increased after exposure to sub-MICs of PG. The up-regulation of these genes was followed by an increase of the capacity of the studied strains to form a biofilm as well as a change in the composition of the induced biofilm extracellular matrix. These results suggest that sub-MICs of PG seem to act as activators signal towards biofilms of *A. pleuropneumoniae*.

Finally, experiments to establish the involvement of the biofilm in the immune evasion of *A. pleuropneumoniae* have shown that biofilm cells have weaker ability to stimulate innate immune cells compared to planktonic bacteria. Using mass spectrometry, we demonstrated a different distribution of structures of lipid A of LPS between planktonic bacteria and those of the biofilm. These structural changes in the lipid A could explain, at least in part, the reduction of the inflammatory response following exposure of macrophages to *A. pleuropneumoniae* biofilm cells compared to their planktonic counterparts.

During this project, we were able to identify new factors important for biofilm formation of *A. pleuropneumoniae* allowing us to better understand the biofilm formation and its involvement in pathogenicity.

**Keywords:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, biofilm, lipopolysaccharide, lipid A, cytokines, penicillin G

# TABLE DES MATIERES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>4</b>
<b>I. ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE</b> .....	<b>5</b>
1. Définition.....	5
2. Pleuropneumonie porcine .....	6
3. Facteurs de virulence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	7
3.1 Synthèse de toxines .....	8
3.2 Protéases.....	10
3.3 Uréase.....	11
3.4 Systèmes de captation de fer .....	12
3.5 Métabolisme anaérobie; comme facteur de virulence.....	13
3.6 Fimbriae de type IV.....	14
3.7 La capsule polysaccharidique.....	15
3.7.1 Structure et composition .....	15
3.7.2 Rôle de la capsule polysaccharidique .....	16
3.8 Le lipopolysaccharide .....	17
3.8.1 Structure et voies de biosynthèse.....	17
3.8.1.1 Structure du lipopolysaccharide .....	17
3.8.1.2 Voie de biosynthèse du lipopolysaccharide .....	19
a) Lipide A.....	20

b) Antigène O.....	22
3.8.2 Rôle du lipopolysaccharide dans l'adhésion.....	24
3.8.3 Rôle du lipopolysaccharide dans la virulence.....	24
4. Réaction inflammatoire .....	26
5. Traitement, vaccination et prévention .....	28
<b>II. BIOFILM FORMATION .....</b>	<b>32</b>
1. Historique .....	32
2. Introduction aux biofilms .....	32
3. Composition du biofilm.....	34
3.1 Les polysaccharides.....	35
3.2 L'ADN extracellulaire.....	38
3.3 Les protéines extracellulaires .....	40
3.4 Les lipides .....	42
4. La formation du biofilm .....	43
5. La régulation du biofilm.....	46
6. Résistance et tolérance aux antibiotiques .....	51
6.1 Résistance aux antibiotiques .....	52
6.2 Tolérance aux antibiotiques .....	53
7. Les antibiotiques comme signaux activateurs du biofilm .....	55
8. Échappement au système immunitaire .....	57
<b>III. FORMATION DU BIOFILM CHEZ <i>ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE</i> .....</b>	<b>60</b>
1. La production de biofilm chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	60
2. Facteurs importants pour la production du biofilm d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	62
3. Impact du biofilm sur <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	68
<b>PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>71</b>
<b>MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS .....</b>	<b>73</b>
<b>Article 1.</b> Surface polysaccharide mutants reveal that absence of O antigen reduces biofilm formation of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	74
<b>Article 2.</b> Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	117



<b>Article 3.</b> Impact of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biofilm mode of growth on the lipid A structures and stimulation of immune cells .....	156
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>188</b>
<b>I. ROLE DES POLYSACCHARIDES DE SURFACE (CPS ET LPS) DANS LA FORMATION DU BIOFILM .....</b>	<b>189</b>
<b>II. IMPACT DES DOSES SOUS-INHIBITRICES D'ANTIBIOTIQUES SUR LA FORMATION DU BIOFILM D'<i>A. PLEUROPNEUMONIAE</i> .....</b>	<b>194</b>
<b>III. INTERACTION BIOFILM ET CELLULES DE L'HOTE .....</b>	<b>197</b>
<b>IV. CONCLUSIONS .....</b>	<b>200</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>202</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>i</b>
Annexe 1 .....	ii
Annexe 2 .....	xxiii

# LISTE DES TABLEAUX

## REVUE DE LITTÉRATURE

**Tableau 1.** Modifications de la structure du lipide A et leurs conséquences. ....21

## MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

### Article 1

**Table 1.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains used in the present study. .... 107

**Table 2.** Primers used for quantitative real-time RT-PCR ..... 108

### Article 2

**Table 1.** Serotypes and MICs of the *A. pleuropneumoniae* field isolates used in the present study.  
..... 145

**Table 2.** Primers used for quantitative real-time reverse-transcriptase (RT)-PCR..... 146

**Table 3.** Biofilm biomass of selected *A. pleuropneumoniae* isolates was measured in the presence of 1/2 MIC of penicillin G..... 147

### Article 3

**Table 1.** Primers used for quantitative real-time reverse-transcriptase (RT)-PCR..... 181

# LISTE DES FIGURES

## REVUE DE LITTÉRATURE

<b>Figure 1.</b> Image par microscopie électronique d' <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype 1 et de sa capsule marquée à la ferritine polycationique.....	16
<b>Figure 2.</b> Schéma représentant la structure du lipopolysaccharide d' <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype 1. ....	18
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique de la structure du lipide A d' <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype 1. ....	19
<b>Figure 4.</b> Observation par microscopie laser confocale du biofilm d' <i>A. pleuropneumoniae</i> 4074 après coloration au WGA-Oregon Green 488.....	35
<b>Figure 5.</b> Schéma de l'opéron <i>pgaABCD</i> chez <i>A. pleuropneumoniae</i> qui code pour le PGA .....	36
<b>Figure 6.</b> Modèle de synthèse du PGA chez <i>E. coli</i> et l'organisation des protéines PGA au niveau de sa paroi.....	37
<b>Figure 7.</b> Modèle de développement d'un biofilm mature chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	46

## MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

### Article 1

<b>Figure 1.</b> Optical density of biofilm formation in 96-well microtiter plates by the <i>A. pleuropneumoniae</i> parental strain 4074Nal <sup>r</sup> and mutants.. ....	109
<b>Figure 2.</b> CLSM images of biofilms formed in 96-well microtiter plates by the <i>A. pleuropneumoniae</i> parental strain 4074Nal <sup>r</sup> and mutants.....	110
<b>Figure 3.</b> CLSM images of biofilms formed in 96-well microtiter plates by the <i>A. pleuropneumoniae</i> parental strain 4074 and the <i>pgaC</i> mutant.....	111
<b>Figure 4.</b> Dispersion of biofilms formed in 96-well microtiter plates by <i>A. pleuropneumoniae</i> parental strain (4074Nal <sup>r</sup> ) and mutants .....	112

<b>Figure 5.</b> Specific, dose-dependent binding between PGA and parental strain LPS or LPS from O-antigen mutant 44.1.....	113
<b>Figure 6.</b> Detection of PGA in the biofilm matrix isolated from the parental strain 4074Nal <sup>r</sup> and mutant strains .....	115
<b>Figure 7.</b> Relative expression of <i>pgaA</i> , <i>cpxA</i> and <i>cpxR</i> .....	116

## Article 2

<b>Figure 1.</b> Biofilm formation in 96-well microtiter plate by <i>A. pleuropneumoniae</i> field isolates of serotypes 1, 5a, 7 and 15 with or without sub-MICs of penicillin G .....	148
<b>Figure 2.</b> Sub-MICs of penicillin G induce autoaggregation in <i>A. pleuropneumoniae</i> S7_3060 when cultured for 24 h in broth.....	149
<b>Figure 3.</b> CLSM images of biofilms formed by <i>A. pleuropneumoniae</i> S1_7430, S5a_508 and S7_3060.....	150
<b>Figure 4.</b> Dispersion of biofilms formed by <i>A. pleuropneumoniae</i> S1_7430, S5a_508 and S7_3060 l.....	151
<b>Figure 5.</b> Relative expression of <i>pgaA</i> , <i>cpxA</i> and <i>cpxR</i> in biofilms of <i>A. pleuropneumoniae</i> S1_7430, S5a_508 and S7_3060 in the presence of 1/2 MIC of penicillin G .....	152

<b>Supplementary Figure 1.</b> Metabolic activity of different <i>A. pleuropneumoniae</i> field isolates. grown for 24 h in BHI-NAD with or without MIC of penicillin G. ....	153
<b>Supplementary Figure 2.</b> Growth kinetics of <i>A. pleuroneumoniae</i> S1_7430, S5a_508 and S7_3060 in the absence of penicillin or in the presence of 1/2 MIC of penicillin G.....	154
<b>Supplementary Figure 3.</b> CLSM images of biofilms formed by <i>A. pleuropneumoniae</i> S1_7430, S5a_508 and S7_3060 in 96-well microtiter plates and stained with SYTO9.....	155

## Article 3

<b>Figure 1.</b> (a) Volcano plot of distribution of <i>A. pleuropneumoniae</i> lipid A structures isolated from biofilm cells (n = 3) or planktonic cells (n = 3). (b) Chromatograms of structures indicated by black arrows in the volcano plot. ....	182
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

**Figure 2.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm and planktonic lipid A structures distribution.....184

**Figure 3.** Cytokine expression in porcine pulmonary alveolar macrophages exposed to biofilm or planktonic cells of *A. pleuropneumoniae* for different time periods. ....185

**Figure 4.** IL-8 production by pulmonary alveolar macrophages in response to stimulation by planktonic and biofilm cells for different time periods.....186

**Figure 5.** Proliferation of porcine peripheral blood monocytes exposed to biofilm and planktonic cells of *A. pleuropneumoniae*.....187

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN (*DNA*) : Acide désoxyribonucléique (*Deoxyribonucleic acid*)

ADNe : Acide désoxyribonucléique extracellulaire

ADP : Adénosine di-phosphate

AI-2 : autoinducteurs de type 2

ARN (*RNA*) : Acide ribonucléique (*Ribonucleic acid*)

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ARNr (*rRNA*) : Acide ribonucléique ribosomal (*Ribosomal ribonucleic acid*)

ATP : Adénosine tri-phosphate

Bap: *Biofilm-associated protein*

BHI: *Brain hearth infusion medium*

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid

CFIA : *Canadian Food Inspection Agency*

CFU : *Colony forming units*

CMI (*MIC*) : Concentration minimale inhibitrice (*Minimal inhibitory concentration*)

CPS : *Capsule polysaccharide*

dNTP : Désoxynucléotides tri-phosphate

DO (OD) : Densité optique (*Optical density*)

DPBS : *Dulbecco's phosphate-buffered saline*

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EPS : Exopolysaccharides

Fhu : *Ferric hydroxamate uptake*

Glc : Glucose

GlcNac : N-acétyl glucosamine

GTP : Guanine triphosphate

HU : *Histone-like protein*

Ig : *Immunoglobulin*

IHF : *Integration Host Factor*

IL : *Interleukin*

Kdo : 2-keto-3deoxyoctulosonic acid

LPS : Lipopolysaccharide

MS : *Mass spectrometry*

mRNA : *Messenger ribonucleic acid*

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

OMP : *Outer membrane protein*

ORF : *Open reading frame*

PAM : *Porcine alveolar macrophages*

Pb (*bp*) : Paire de base (*base pair*)

PBS : *Phosphate buffered saline*

PCR : *Polymerase chain reaction*

PGA/PNAG : Poly  $\beta$ -1, 6-N-acétylglucosamine

PIA : *Polysaccharide Intracellular Adhesin*

Rha : Rhamnose

RT-PCR : *Reverse transcriptase- polymerase chain reaction*

SD : *Standard deviation*

SDS : *Sodium dodecyl sulfate*

Sous-CMI (*sub-MIC*) : Concentration sous-inhibitrice (*subinhibitory concentration*)

Sp. : *Species*

UP : Undécaprényl phosphate

UPP : Undécaprényl pyrophosphate

UTP : Uracil triphosphate

WGA : *Wheat germ agglutinin*



"Quiconque emprunte un chemin à la recherche d'une science, Allah lui facilite par cela un chemin vers le Paradis."

*Le prophète Mohammed  
(Que la paix et les bénédictions de Dieu soient sur lui)*

"Whoever follows a path to seek knowledge, Allah will make easy for him the path to Paradise."

*Prophet Muhammad  
(Peace Be Upon Him)*

## REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur de recherche, le Dr Mario Jacques, pour m'avoir donné la possibilité de faire ma thèse de doctorat dans son laboratoire, de m'avoir encouragé et soutenu de tout au long de mon projet. Merci, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais en mai 2011 sur les biofilms bactériens, puis pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé, tout en me laissant une grande liberté et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.

Merci à mon co-directeur, Dr Carl Gagnon, pour sa supervision, sa disponibilité et ses conseils.

Merci aux membres du laboratoire, Josée Labrie, Coralie Goetz et Yannick Tremblay pour votre aide, vos conseils et votre amitié.

Merci à tous les membres, étudiant et personnel du centre de recherche en infectiologie porcine and avicole (CRIPA) et du groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP), pour leur collaboration et leur aide si précieuse.

Merci aux membres de mon comité conseil, Dre Josée Harel et Dr Francis Beaudry, ainsi qu'aux membres du jury d'évaluation de cette thèse.

Merci au Dr Francis Beaudry pour son aide précieuse dans la rédaction de mon dernier manuscrit.

Merci à Frédéric Berthiaume pour son aide avec la microscopie confocale, au Dr Marc Hancock pour le SPR et au Dre Mariela Segura pour l'ELISA.

Merci au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) ainsi qu'au Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) pour leur contribution financière.

Un grand merci à Skander, Amine, Makrem, Mohamed Amine, Seif, Hassan et Walid pour votre amitié.

Pour terminer, je souhaite remercier ma famille; mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans ma volonté de faire une thèse, ils ont toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Papa, maman je vous aime.

À mes sœurs qui m'ont supporté durant ces années universitaires, merci d'avoir toujours cru en moi.

Enfin, ces remerciements ne sauraient être complets sans dire « un grand merci » à Sabrina, mon épouse et Adam, mon petit ange. Je mesure chaque jour la chance que j'ai d'avoir ces deux rayons de soleil dans ma vie.

## **INTRODUCTION**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est un bacille Gram-négatif de la famille des *Pasteurellaceae*. Capable de coloniser les muqueuses des voies respiratoires, il est considéré comme un parasite obligatoire du tractus respiratoire porcine (Bossé, Janson et al. 2002). *A. pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une maladie hautement contagieuse et endémique qui cause encore à ce jour d'énormes pertes économiques dans le monde de l'industrie porcine (Bossé, Janson et al. 2002, Gottschalk 2012). La pleuropneumonie porcine peut se présenter sous différentes formes : la forme aiguë, la forme suraiguë et la forme chronique (Dubreuil, Jacques et al. 2000, Neumann, Ramirez et al. 2009, Gottschalk 2012, Gottschalk 2015). La pathogenèse des infections à *A. pleuropneumoniae* fait intervenir plusieurs facteurs de virulence de la bactérie. Les lipopolysaccharides (LPS) et la capsule polysaccharidique (CPS) font partie des principaux facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* et sont impliqués dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* (Rioux, Galarneau et al. 1999, Rioux, Galarneau et al. 2000). Leur position à l'interface bactérie/surface laisse à suggérer un rôle potentiel dans la formation du biofilm. Le biofilm est par définition une communauté de bactéries adhérant entre elles à une surface biotique et abiotique et qui sécrète une matrice extracellulaire adhésive et protectrice (Costerton, Geesey et al. 1978, Costerton 1999). Le biofilm est ubiquitaire et souvent associé à des infections chroniques et récurrentes (Costerton, Stewart et al. 1999, Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004). Plusieurs espèces bactériennes causant des infections chez l'animal sont capables de former des biofilms (Allard, Moisan et al. 2006, Clutterbuck, Woods et al. 2007, Jacques, Aragon et al. 2010, Tremblay, Hathroubi et al. 2014). Notre laboratoire a récemment démontré qu'*A. pleuropneumoniae* était capable de produire dans certaines conditions un biofilm mature en seulement 4 heures (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010). Le biofilm peut se produire sur des surfaces abiotiques (plaque de 96 puits) (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010) et biotiques (cellules épithéliales de poumon de porc) (Tremblay, Lévesque et al. 2013). Les

cellules sous forme biofilm présentent des taux de survie supérieurs à plusieurs antibiotiques (Archambault, Harel et al. 2012). La matrice extracellulaire du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* est principalement composée de N-acetyl-D-glucosamine (PGA). Ce dernier est encodé par l'opéron *pgaABCD* (Kaplan, Velliyagounder et al. 2004). L'opéron *pgaABCD* semble être positivement régulé par le facteur de stress extracytoplasmique sigma E suggérant que les bactéries du biofilm répondent à un stress mécanique extracytoplasmique (Bossé, Sinha et al. 2010). Auger et al., ont démontré que les gènes *pgaB* et *pgaC* étaient surexprimés lors du contact d'*A. pleuropneumoniae* avec des cellules épithéliales du tractus respiratoire porcine (Auger, Deslandes et al. 2009) laissant envisager la contribution du biofilm à la colonisation et à la persistance d'*A. pleuropneumoniae* chez le porc. Plus récemment, notre laboratoire a démontré à l'aide de l'hybridation *in situ* en fluorescence la présence des bactéries organisées en amas cellulaires dans des poumons infectés par *A. pleuropneumoniae*, établissant ainsi pour la première fois, le lien entre le mode de croissance en biofilm et la pleuropneumonie porcine (communication personnelle).

Les facteurs intervenant dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* sont peu connus et les signaux déclencheurs de ce phénotype doivent encore être élucidés. Dans cette étude, nous allons déterminer certains de ces paramètres et investiguer leur impact sur la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*.

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

## **I. *Actinobacillus pleuropneumoniae***

### **1. Définition**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est un petit bacille Gram-négatif de la famille des *Pasteurellaceae*. *A. pleuropneumoniae* est un germe non sporulé, capsulé, qui se présente sous forme isolée, en paire ou en courtes chaînes. Il est également anaérobie facultatif et possède un métabolisme de type fermentatif.

Chez ce pathogène animal, deux biotypes sont présents selon leur dépendance au facteur NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) nécessaire à leurs croissances. De plus, 16 sérotypes ont été décrits sur base de la diversité des antigènes des lipopolysaccharides (antigènes O) et des antigènes de la capsule polysaccharides (antigènes K) (Nielsen, Andresen et al. 1997, Sarkozi, Makrai et al. 2015). Les sérotypes 1 à 12 ainsi que les sérotypes 15 et 16 appartiennent au biotype 1 qui dépend du NAD alors que les sérotypes 13 et 14 seraient du biotype 2 indépendant du NAD (Jacques 2004, Sarkozi, Makrai et al. 2015). Les sérotypes les plus souvent impliqués dans l'infection varient en fonction des régions du monde : les sérotypes 1, 5 et 7 sont plus souvent retrouvés en Amérique du Nord, alors que le sérotype 2 est prédominant dans plusieurs pays européens (Dubreuil, Jacques et al. 2000). *A. pleuropneumoniae* est un pathogène obligatoire des porcs domestiques et sauvages (Vengust, Valencak et al. 2006, Gottschalk 2012). Il est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une maladie respiratoire hautement contagieuse dont la contamination de certains élevages porcins peut causer des pertes économiques considérables dans l'industrie porcine (Losinger 2005, Gottschalk 2012). Les pertes économiques aux États-Unis, en 1995, sont estimées à plus de 30 millions de dollar US (Losinger 2005).



## 2. Pleuropneumonie porcine

La pleuropneumonie porcine est une maladie respiratoire contagieuse qui affecte les porcs de tous âges en colonisant les muqueuses des voies respiratoires des animaux. La transmission se fait principalement par contact direct ou par inhalation de gouttelettes sur de courtes distances (Neumann, Ramirez et al. 2009). Malgré plusieurs cas d'épidémie dans les années 80 et 90, l'écllosion de la pleuropneumonie porcine est relativement moins fréquente ces dernières années en Amérique du Nord. Cependant, elle demeure un problème majeur en Amérique latine, en Chine ainsi que dans certains pays d'Europe de l'Est. Plusieurs facteurs peuvent précipiter l'écllosion de la maladie et la flambée d'épidémie tels que; le sérotype responsable de l'infection du troupeau, le statut immunitaire des animaux, le niveau d'hygiène, le surpeuplement, le stress, les changements climatiques et une éventuelle association avec des infections virales (Bossé, Janson et al. 2002, Gottschalk 2012). La maladie est plus souvent observée chez les porcs à l'engrais en post-sevrage entre 2 et 6 mois. Lors de l'introduction d'un animal infecté par une souche virulente dans un élevage indemne, la morbidité et la mortalité peuvent atteindre jusqu'à 70% et 25%, respectivement. La pleuropneumonie a été décrite sous quatre formes dans la littérature; la forme suraiguë, similaire à un choc septique, est celle qui provoque le plus grand taux de mortalité et cela dans un très court délai (la maladie est létale en moins de 48 heures), suivie de la forme aiguë, de la forme chronique et de la forme sous-clinique (porteurs sains). Cette dernière forme rend difficile l'élimination de l'agent infectieux du fait qu'il n'y a aucun symptôme visible (Dubreuil, Jacques et al. 2000, Neumann, Ramirez et al. 2009). Les formes aiguë et suraiguë sont les formes les plus létales pour l'animal, avec une mort qui peut intervenir en seulement quelques heures (Bossé, Janson et al. 2002, Gottschalk 2012). Les symptômes sont : fièvre, toux, dyspnée, saignements nasaux et buccaux. Au niveau pulmonaire, la maladie se

manifeste par l'apparition de pleurésie fibrineuse, de nécrose et d'hémorragies (Neumann, Ramirez et al. 2009, Gottschalk 2012). Ces zones hémorragiques sont principalement dues aux toxines sécrétées par les bactéries, aux endotoxines et à l'inflammation pulmonaire aiguë suite à l'infection. Certains survivants peuvent devenir des porteurs sains, présentant une forme moins aggravante de la maladie, asymptomatique et chronique (Neumann, Ramirez et al. 2009, Gottschalk 2015). Sous cette forme, les souches d'*A. pleuropneumoniae* peuvent se loger dans les lésions pulmonaires ou dans les cryptes des amygdales, y persister et se propager de nouveau (Gottschalk 2012, Gottschalk 2015). Plus rarement, les souches d'*A. pleuropneumoniae* peuvent également se retrouver dans la cavité nasale (Chiers, De Waele et al. 2010). Une étude réalisée au Canada a démontré que 78% des troupeaux étaient positifs à *A. pleuropneumoniae* (MacInnes, Gottschalk et al. 2008). La détection a été faite par PCR à partir d'écouvillons de voies aériennes respiratoires de porcelets sains (MacInnes, Gottschalk et al. 2008). Cette étude suggère qu'*A. pleuropneumoniae* pourrait être considéré comme un pathogène opportuniste. Certains facteurs externes décrits plus haut peuvent pousser les bactéries vers un statut plus virulent ou provoquer un passage de la maladie de sa forme chronique/sous-clinique vers la forme aiguë (Neumann, Ramirez et al. 2009, Gottschalk 2015). Lors de la forme chronique de la pleuropneumonie porcine; les porcs infectés manifestent de la fièvre, une anorexie et une toux sporadique. Des abcès pulmonaires ainsi que des pleurésies fibreuses sont également caractéristiques de cette forme chronique, mais ils ne sont généralement mis en évidence qu'à l'abattoir.

### **3. Facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae***

Chez *A. pleuropneumoniae*, plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés tels que les toxines Apx, les sidérophores et les polysaccharides de surface incluant le lipopolysaccharide, la capsule,

et l'exopolysaccharide de la matrice du biofilm (Jacques 2004, Jacques, Aragon et al. 2010). Ces facteurs de virulence agissent souvent conjointement dans l'établissement de la bactérie chez l'hôte ainsi que dans le développement de la pleuropneumonie porcine.

### 3.1 Synthèse de toxines

*A. pleuropneumoniae* produit des toxines RTX (Repeats in ToXin), des protéines à séquences répétées et riches en glycine particulièrement répandues chez la famille *Pasteurellaceae*. L'opéron codant pour les toxines RTX contient généralement quatre gènes contigus *rtxCABD*. Le gène *rtxA* code pour la protoxine alors que le *rtxC* code pour une acétyl transférase responsable de l'acylation post-transcriptionnelle de la protéine native et de l'activation de la toxine. Enfin, les gènes *rtxB* et *rtxD* codent pour des protéines membranaires qui vont permettre la sécrétion des toxines. Quatre types de toxines Apx ont été décrites chez *A. pleuropneumoniae* : ApxI, ApxII, ApxIII et ApxIV.

- ApxI : Protéine de masse moléculaire de 105 kDa, fortement hémolytique et cytolytique. Cette toxine a des fortes similarités avec l'alpha-hémolysine d'*Escherichia coli*. Elle est retrouvée chez les sérotypes 1, 5, 9, 10, 11, 14 et 16 (Frey 1995, Gottschalk 2012, Sarkozi, Makrai et al. 2015).
- ApxII : Protéine de masse moléculaire d'environ 103 kDa à faible potentiel hémolytique et cytolytique. Cette toxine est produite par tous les sérotypes à l'exception des sérotypes 10 et 14 (Frey 1995, Gottschalk 2012, Sarkozi, Makrai et al. 2015).
- ApxIII : Protéine de masse moléculaire de 120 kDa qui, à l'inverse des toxines précédemment décrites, est non hémolytique mais fortement cytolytique. Cette toxine est

retrouvée chez les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8 (Frey 1995, Gottschalk 2012).

- ApxIV : Plus récemment découverte, cette toxine est retrouvée chez tous les sérotypes, mais son expression n'a lieu qu'*in vivo* (Schaller, Kuhn et al. 1999). Cette dernière est essentielle à la virulence d'*A. pleuropneumoniae* puisqu'une mutation au niveau des gènes codant pour ApxIV diminue fortement le taux de lésions au niveau des poumons de porcelets infectés (Liu, Chen et al. 2009).

La cytotoxicité diffère d'une toxine à une autre et une corrélation a été montrée entre la production de ces protéines et la pathogénicité (Frey 1995). La présence de la toxine ApxI chez les sérotypes les plus virulents (sérotypes 1 et 5 en Amérique du Nord et les sérotypes 9 et 11 ailleurs dans le monde) a suggéré que cette toxine serait fortement associée à la virulence accrue chez ces sérotypes (Frey 1995). La présence d'au moins deux types de toxines parmi les toxines ApxI, ApxII et ApxIII augmente fortement la virulence des souches d'*A. pleuropneumoniae* (Frey 1995). L'inactivation de la toxine ApxI entraîne une diminution importante de l'activité hémolytique et de la virulence *in vivo*. Cependant, cette seule inactivation n'est pas suffisante pour abolir la virulence d'*A. pleuropneumoniae* (Segers, van den Bosch et al. 2004, Lin, Bei et al. 2007). En revanche, la délétion des gènes activateurs *apxIc* et *apxIIc* des toxines ApxI et ApxII chez la souche *A. pleuropneumoniae* 4074 sérotypes 1 a permis la création d'un mutant (MBHPP147) ayant perdu complètement son activité hémolytique (Segers, van den Bosch et al. 2004, Tremblay, Lévesque et al. 2013). La virulence de ce mutant a été fortement atténuée lors des essais d'infection *in vivo* chez des souris (Segers, van den Bosch et al. 2004). Le double mutant SLW03 déficient au niveau des toxines ApxI et ApxII ne cause aucune lésion pathologique chez les porcelets infectés, de plus aucun signe clinique n'a été observé (Lin, Bei et al. 2007). Le double mutant  $\Delta$ ApxI/ $\Delta$ ApxII est un excellent candidat comme vaccin vivant

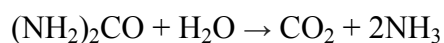
atténué. En effet, il permet de stimuler une forte réponse immunitaire qui se traduit par une bonne protection contre des souches virulentes telles que les souches des sérotypes 1 et 9 (Lin, Bei et al. 2007).

### **3.2 Protéases**

Les métalloprotéases constituent une famille d'enzyme de la classe des peptidases. Au moins 6 métalloprotéases ont été identifiées chez *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal, Tenorio et al. 1994). Ces enzymes, souvent retrouvées au niveau des lésions pulmonaires, sont très actives contre la gélatine porcine, les actines et les IgA et IgG porcins (Negrete-Abascal, Tenorio et al. 1994). Les métalloprotéases joueraient un rôle important lors du processus d'infection (Negrete-Abascal, Tenorio et al. 1994, Negrete-Abascal, Tenorio et al. 1998, González, García et al. 2004). Une sérine protéase autotransporteur, AasP, d'environ 104 kDa a été identifiée chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 7 (Baltes, Buettner et al. 2007) et sérotype 1 (Ali, Oldfield et al. 2008). Cette enzyme est capable de cliver la lipoprotéine OmlA, un autre facteur de virulence connu chez *A. pleuropneumoniae* (Ali, Oldfield et al. 2008). Des études transcriptomiques ont démontré que le gène AasP était surexprimé lors de la croissance d'*A. pleuropneumoniae* dans des conditions de carence en fer (Deslandes, Nash et al. 2007). AasP ne semble pas avoir un rôle direct dans la virulence puisque la perte de cette protéase n'affecte en rien la capacité de la bactérie à provoquer des lésions pulmonaires (Tegetmeyer et al., 2009). Toutefois il est possible qu'AasP ait un rôle intermédiaire via ses interactions avec d'autres facteurs de virulence tel que la lipoprotéine OmlA (Baltes et al., 2002).

### 3.3 Uréase

L'uréase est également un des facteurs importants de virulence chez *A. pleuropneumoniae* (Sheehan, Langford et al. 2000, Bossé, Janson et al. 2002). Cette enzyme catalyse la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniacque selon la formule :



Chez *A. pleuropneumoniae* l'uréase est codée par deux opérons; *ureABC*, codant pour la protéine de structure et *ureEFGD* qui code pour les protéines accessoires (Bossé and MacInnes 1997). Le rôle de l'uréase dans la pathogénie n'est pas très clair. L'absence de l'activité uréase ne semble pas avoir un rôle dans la virulence des souches (Blanchard, Walker et al. 1993, Tascón Cabrero, Vázquez-Boland et al. 1997). En effet, des variants d'*A. pleuropneumoniae* naturellement déficients en uréase ne sont pas atténués et sont capables de développer la maladie (Blanchard, Walker et al. 1993). De plus, Tascón Cabrero et al., ont démontré qu'un mutant déficient à l'uréase n'affecte pas le processus d'infection et l'établissement de la pleuropneumonie aiguë (Tascón Cabrero, Vázquez-Boland et al. 1997). Cependant, une étude menée par Bossé et al., (2000) a démontré qu'une infection à faibles doses à l'aide d'un mutant affecté au niveau du gène *ureG* affecte la capacité d'*A. pleuropneumoniae* à coloniser les poumons chez l'hôte et l'apparition de signes cliniques (Bossé and MacInnes 2000). Les auteurs ont démontré aussi que la charge bactérienne influençait l'établissement de la maladie. À de fortes doses, le mutant *ureG* était aussi virulent que la souche parentale et la capacité du mutant à coloniser les tissus et à causer des lésions n'était pas atténuée.

### 3.4 Systèmes de captation de fer

Le fer est nécessaire à la croissance d'une grande majorité de bactéries. En effet, la concentration minimale nécessaire à la croissance est de  $10^{-6}$ M. En dessous de cette concentration, des effets bactériostatiques ou bactéricides peuvent être observés.

Le fer existe sous deux états d'oxydoréduction :

- fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) : soluble, non toxique;
- fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) : forme prédominante, non soluble et séquestrée chez l'hôte.

Généralement, le fer extracellulaire est lié à des glycoprotéines (la transferrine et la lactoferrine). Le fer intracellulaire, quant à lui, est séquestré par des protéines qui contiennent l'hème (l'hémoglobine) diminuant ainsi la concentration du fer à  $10^{-18}$  M (Bandara, Lawrence et al. 2003). *A. pleuropneumoniae* fait face aux concentrations faibles en fer chez l'hôte en développant plusieurs mécanismes de captation de fer (Jacques 2004). L'un de ces systèmes est la synthèse et la sécrétion de chélateurs de fer, les sidérophores, qui forment des complexes avec la forme ferrique du fer extracellulaire et va ainsi permettre leur internalisation. Chez *A. pleuropneumoniae*, on retrouve le ferrichrome, un hexapeptide de type hydroxamate intervenant comme sidérophore et capable de chélater les cations de fer dissous (Diarra, Dolence et al. 1996). Une fois le complexe ferrichrome et le fer formé, il sera internalisé par le système Fhu (Ferric Hydroxamate Uptake), un récepteur membranaire retrouvé chez *A. pleuropneumoniae* (Mikael, Pawelek et al. 2002). Ce système est codé par l'opéron *fhu* qui est composé par (i) *fhuC* qui code pour une protéine membranaire appartenant à la famille des transporteurs ABC; (ii) *fhuD* qui code pour une protéine périplasmique responsable du transport du complexe ferrichrome/fer de la membrane externe à la membrane cytoplasmique; (iii) *fhuB* qui code pour une protéine membranaire appartenant également à la famille des transporteurs ABC et (iv) *fhuA* qui code

pour le récepteur de la membrane externe capable de se lier au ferrichrome (Mikael, Pawelek et al. 2002). D'autres mécanismes vont permettre de capter le fer lié aux protéines tel que la transferrine. Des études ont montré qu'*A. pleuropneumoniae* exprime à sa surface des protéines membranaires comme la TbpA (ou Tbp1; pour transferrin-binding-protein). Cette protéine se lie spécifiquement à la transferrine porcine et l'utilise comme source de fer (Jacques 2004). Une protéine de la membrane externe d'un poids moléculaire d'environ 75 kDa ayant de fortes homologies avec la protéine de la membrane externe TonB dépendante a également été retrouvée chez plusieurs bactéries Gram-négatif, cette protéine semble être capable de lier l'hémoglobine porcine (Archambault, Labrie et al. 2003). Cette même étude a permis d'identifier la protéine HgbA, retrouvée chez plusieurs bactéries de la famille *Pasteurellaceae*, ayant des sites de fixation pour l'hème (Archambault, Labrie et al. 2003). La génération du mutant du gène *hgbA* provoque l'abolition de l'acquisition du fer à partir de l'hémoglobine et une diminution de la virulence (Shakarji, Mikael et al. 2006). Cependant, lors d'infections chroniques, il est envisagé qu'*A. pleuropneumoniae* persiste sous forme d'un biofilm. Sous cette forme, l'expression de plusieurs gènes codant pour l'acquisition du fer incluant le gène *hgbA* est réduite (Tremblay, Deslandes et al. 2013).

### **3.5 Métabolisme anaérobie; comme facteur de virulence**

Au niveau des tissus nécrosés, les taux d'oxygène sont relativement bas ce qui poussent la bactérie à basculer vers un métabolisme anaérobie. Cette stratégie contribue à la virulence et la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae* (Baltes, N'Diaye et al. 2005, Jacobsen, Hennig-Pauka et al. 2005). Des enzymes du métabolisme anaérobie tel que le diméthyl sulfoxyde réductase (DmsA) et l'aspartate-ammoniaque lyase (AspA) semblent jouer un rôle important dans la virulence d'*A.*



*pleuropneumoniae* (Jacobsen, Hennig-Pauka et al. 2005). En effet, des mutations des gènes *dmsA* et *aspA* mènent à l'atténuation de la virulence *in vivo* des souches mutantes comparées à la souche mère (Jacobsen, Hennig-Pauka et al. 2005). De plus, le fumarate, composé synthétisé par AspA, et le diméthyl sulfoxyde réductase peuvent servir d'accepteurs finaux d'électrons lors la respiration anaérobie dans les zones nécrosées anoxiques. La baisse des niveaux d'oxygène peut être détectée par le système à deux composantes ArcA/ArcB. Ce système a été retrouvé chez *A. pleuropneumoniae* et sa perturbation affecte sévèrement la virulence de la bactérie et sa capacité à former des biofilms (Buettner, Bendallah et al. 2008). Plus récemment, une association a été observée entre d'une part les polysaccharides de surface tels que le lipopolysaccharide, l'exopolysaccharide du biofilm et d'autre part le métabolisme anaérobie (Li, Zhu et al. 2014). En effet, une augmentation de l'expression des gènes codant pour ces structures a été observée lors d'une culture d'*A. pleuropneumoniae* en condition anaérobie comparée à une culture en aérobie (Li, Zhu et al. 2014). Ces conditions semblent donc favoriser le métabolisme anaérobie, la formation du biofilm et la persistance de la bactérie dans les tissus nécrosés.

### **3.6 Fimbriae de type IV**

Des fimbriae de type 4 ont été identifiés à la surface d'*A. pleuropneumoniae* (Zhang, Tennent et al. 2000). Leur synthèse est sous le contrôle de l'opéron *apfABCD* (Stevenson, Macdonald et al. 2003). Ces fimbriae sont retrouvés chez tous les sérotypes et la séquence des gènes *apf* est fortement conservée (Stevenson, Macdonald et al. 2003, Zhou, Li et al. 2013). Des études ont été menées sur la régulation de l'opéron *apf* et sur l'expression des fimbriae. De manière intéressante, l'expression des fimbriae est étroitement liée à certaines phases de croissance et dans des conditions particulières (Boekema, Van Putten et al. 2004). Lors d'infections de cellules

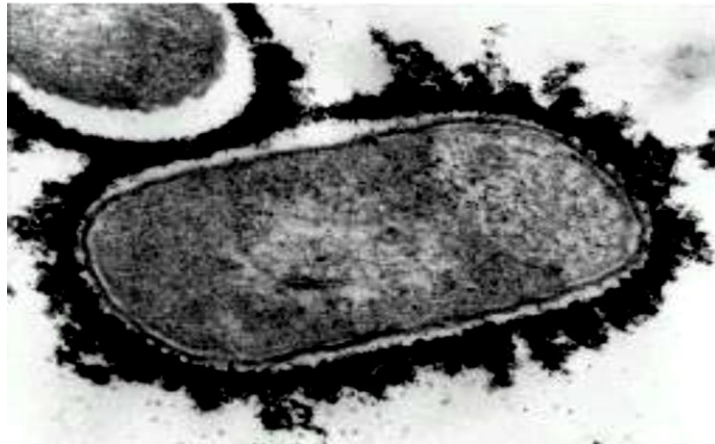
épithéliales, les auteurs de cette étude ont démontré que les gènes codants pour le fimbriae de type 4 étaient surexprimés lors de l'adhérence des bactéries aux cellules (Boekema, Van Putten et al. 2004) alors que les bactéries planctoniques non adhérentes n'expriment pas les gènes des fimbriae. De plus, dans cette même étude les auteurs ont démontré que lors d'infections *in vivo*, l'opéron *afp* est également surexprimé (Boekema, Van Putten et al. 2004). Ces résultats suggèrent que l'expression des fimbriae de type 4 chez *A. pleuropneumoniae* est 'strictement' régulée. Plus récemment, Zhou et al., ont démontré que l'inactivation du gène *apfA* réduit fortement la capacité *A. pleuropneumoniae* à coloniser les poumons des souris (Zhou, Li et al. 2013). Ces souris infectées par *A. pleuropneumoniae* produisent un sérum riche en anticorps anti-ApfA (Zhou, Li et al. 2013).

### **3.7 La capsule polysaccharidique**

#### **3.7.1 Structure et composition**

La capsule est l'enveloppe de nature polysaccharidique qui entoure les bactéries (**Figure. 1**) dont le rôle principal est la protection contre le système immunitaire (Inzana, Ma et al. 1988). La structure du polysaccharide a permis de déterminer chez *A. pleuropneumoniae* les différents sérotypes connus à ce jour.

Formé d'unités répétées d'oligosaccharides chargés négativement, le polysaccharide capsulaire est synthétisé par au moins deux opérons, l'opéron *cpxDCBA* codant pour le système d'exportation des composants capsulaires et l'opéron *cpsABCE* qui code pour des protéines homologues aux glycotransférases (Rioux, Galarneau et al. 2000).



**Figure 1.** Image par microscopie électronique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et de sa capsule marquée à la ferritine polycationique (Rioux, Galarneau et al. 2000).

### **3.7.2 Rôle de la capsule polysaccharidique**

La capsule polysaccharide du sérotype 1 est composée d'unités disaccharidiques répétées de 2-acétamido-2-déoxy-D-glucose et D-galactose (Altman, Brisson et al. 1986). La capsule polysaccharidique est considérée comme un facteur de virulence important chez *A. pleuropneumoniae* (Dubreuil, Jacques et al. 2000, Rioux, Galarneau et al. 2000, Bandara, Lawrence et al. 2003) et son absence diminue considérablement la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae* (Inzana, Ma et al. 1988, Rioux, Galarneau et al. 2000, Bandara, Lawrence et al. 2003). L'épaisseur de la capsule chez *A. pleuropneumoniae*, qui varie entre 80-90 et 210-230 nm, est en étroite relation avec la virulence de la bactérie (Jacques, Foiry et al. 1988). Contrairement à d'autres bactéries, des études sur des mutants acapsulaires chez *A. pleuropneumoniae* ont montré que la capsule ne jouait pas de rôle dans l'adhésion, mais bien au contraire, elle masquerait les adhésines (Rioux, Galarneau et al. 2000). En effet, le mutant acapsulaire 33.2 d' *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 démontre une adhérence accrue à des

sections congelées de la trachée porcine (Rioux, Galarneau et al. 2000), ce qui peut être expliqué du moins en partie par une augmentation de l'hydrophobicité de surface chez ce mutant (Labrie, Rioux et al. 2002).

### **3.8 Le lipopolysaccharide**

#### **3.8.1 Structure et voies de biosynthèse**

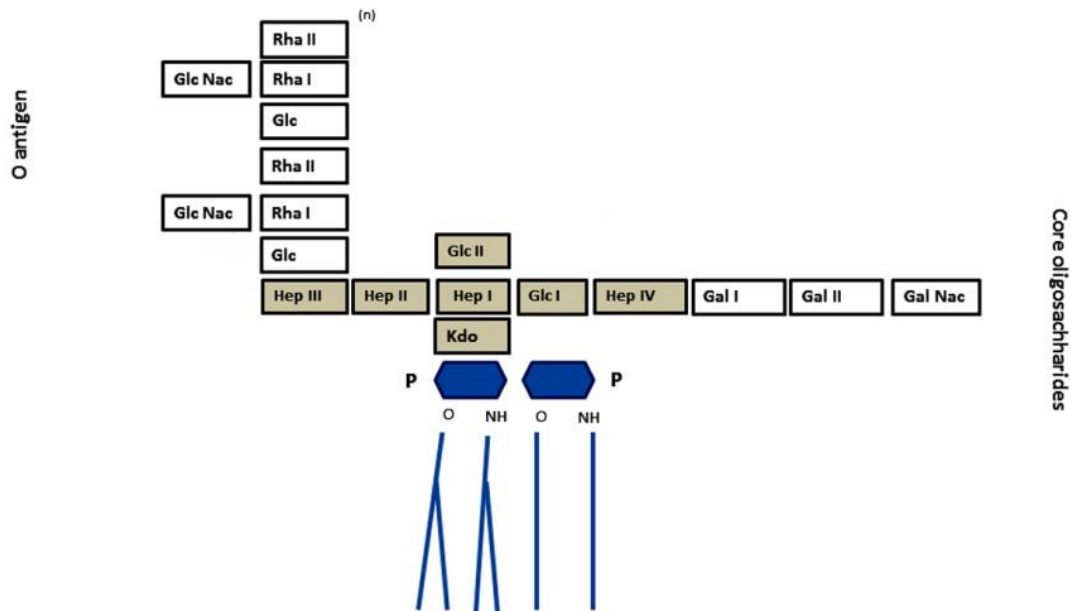
La membrane externe des bactéries à Gram-négatif est divisée en deux couches ; un feuillet interne composé de phospholipides (glycérol lié à deux acides gras et à un groupement phosphate) et de phosphatidyléthanolamine ; et un feuillet externe semblable au feuillet interne, mais riche en lipopolysaccharides.

##### **3.8.1.1 Structure du lipopolysaccharide**

Le lipopolysaccharide (LPS) est composé de trois parties: le lipide A, le noyau oligosaccharidique et l'antigène O (**Figure. 2**):

- L'antigène O est le polysaccharide le plus externe du LPS et il est spécifique à chaque sérotype. L'antigène O du sérotype 1 se compose d'une répétition de : deux résidus L-rhamnopyranosyl, un résidu D-glycopyranosyl, un résidu 2-acétamido-2-déoxy-D-glucose (Altman, Griffith et al. 1990).
- Le noyau oligosaccharide est composé d'un noyau interne relativement conservé entre les différentes souches d'*A. pleuropneumoniae* et d'un noyau externe variable selon les différents sérotypes. Les noyaux internes des sérotypes 1, 2, 5a et 5b sont principalement composés d'acide 2-céto-3-déoxyoctulosonique ou Kdo et d'heptose (Michael, Brisson et

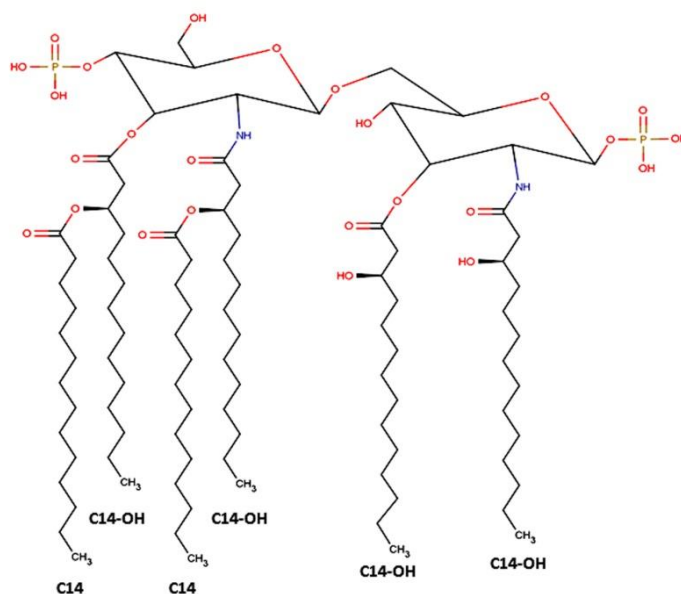
al. 2004). Une mutation au niveau du gène codant pour une d-glycéro-d-manno-heptosyltransférase a permis d'obtenir le mutant CG3 tronquée au niveau du noyau externe, mais exprimant toujours l'antigène O.



**Figure 2.** Schéma représentant la structure du lipopolysaccharide d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Le noyau interne (vert) est principalement composé de Kdo et d'heptose, alors que le noyau externe (en blanc, et à droite du noyau interne) est composé de galactose (Gal) et de N-acétyl-galactosamine (Gal Nac). La réalisation de mutations au niveau de la voie de biosynthèse du noyau oligosaccharidique a permis de démontrer que l'ancrage des sous-unités de l'antigène O se fait au niveau de l'heptose III (HepIII) du noyau interne (Altman, Griffith et al. 1990, Michael, Brisson et al. 2004).

- La composition du lipide A chez *A. pleuropneumoniae* n'a pas encore été complètement élucidée. Cependant, la proportion des chaînes d'acides gras composant le lipide A du sérotype 1 a été évaluée; acide n-dodécanoïque (0.6%), acide n-tétradécanoïque (12.9%), acide 3-hydroxytétradécanoïque (64.3%), acide n-hexadécanoïque (3.2%) et acide n-octadécanoïque (0.6%) (Altman, Griffith et al. 1990). La **Figure 3** propose une

représentation schématique de la structure du lipide A du sérotype 1 contenant principalement deux chaînes acides gras C14:O ainsi que quatre chaînes C14:OH proche de la structure d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autre membre de la famille des *Pasteurellaceae* (Zähringer, Lindner et al. 1999). Lors de la biosynthèse des lipides A, des structures intermédiaires ayant une composition en acide gras différente peuvent se retrouver ancrées à la surface des bactéries. De plus, la structure du lipide A peut subir diverses modifications suite à des stimulus externes.



**Figure 3.** Représentation schématique de la structure du lipide A d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 adaptée de Zähringer, Lindner et al. (1999) et d'Altman, Griffith et al. (1990).

### 3.8.1.2 Voie de biosynthèse du lipopolysaccharide

La biosynthèse du lipopolysaccharide comporte deux voies distinctes, la première voie aboutit à la synthèse d'une première entité composée du complexe lipide A-noyau. Quant à la deuxième

voie, elle permet de synthétiser l'antigène O qui sera greffé à l'extrémité distale du noyau externe du complexe lipide A-noyau et ainsi former une structure LPS complète (Raetz, Reynolds et al. 2007, Whitfield and Trent 2014).

### **a) Le lipide A**

La structure lipide A-acide 3-déoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo<sub>2</sub>) représente la forme minimale du lipide A requise pour la viabilité des bactéries à Gram-négatif (Whitfield and Trent 2014). Cette structure est synthétisée en neuf étapes, appelées la voie de Raetz (Whitfield and Trent 2014). La voie de biosynthèse du lipide A est fortement conservée chez les bactéries Gram-négatif (Whitfield and Trent 2014).

Cependant, la structure finale du lipide A est relativement dynamique et les chaînes d'acide gras qui la compose peuvent varier ou subir des modifications sous l'influence de stress environnementaux (Raetz, Reynolds et al. 2007). En effet, plusieurs modifications peuvent survenir telles que : (i) modification ou enlèvement du ou des groupements phosphates (ii) addition, enlèvement et modification des chaînes d'acides gras. Ces modifications permettent un remodelage rapide de la membrane externe qui ne requiert pas une nouvelle synthèse du lipide A (tableau 1) (Raetz, Reynolds et al. 2007, Whitfield and Trent 2014). À titre d'exemple, chez *E. coli*, l'enzyme LpxP est activé lorsque la température est en dessous de 12°C. Cette enzyme remplace le résidu lauréate (C12) par un acide gras mono-insaturé, le palmitate (C16:1) (Vorachek-Warren, Carty et al. 2002). Cette substitution permet à la bactérie d'ajuster la fluidité membranaire et une meilleure adaptation aux basses températures. D'autres exemples sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Modifications de la structure du lipide A et leurs conséquences.

Organismes	Type de modification	Conséquences	Références
<i>E. coli</i> <i>N. meningitidis</i> <i>C. jejuni</i>	Addition du groupement phosphoéthanolamine	Résistance à la colistine et à la polymyxine Rôle dans la motilité	(Liu, Wang et al. 2016) (Wanty, Anandan et al. 2013) (Fage, Brown et al. 2014)
<i>E. coli</i> <i>S. enterica</i> <i>C. jejuni</i> <i>H. pylori</i>	Addition du groupement 4-amino-4-déoxy-L-arabinose ou phosphoéthanolamine	Réduction de la charge nette négative Résistance aux peptides antimicrobiens	(Trent, Ribeiro et al. 2001) (Gunn, Ryan et al. 2000) (Herrera, Hankins et al. 2010) (Cullen, O'Brien et al. 2013) (Tran, Whittimore et al. 2006)
<i>H. pylori</i>	Ajout d'un groupement phosphate et deux chaînes acides gras	Diminution de l'hydrophobicité Résistance à la calprotectine Formation du biofilm	(Cullen, Giles et al. 2011)
<i>E. coli</i>	Addition d'un résidu palmitate	Augmente la fluidité membranaire Tolérance aux basses températures	(Vorachek-Warren, Carty et al. 2002)
<i>E. coli</i> <i>S. enterica</i> <i>C. jejuni</i> <i>B. bronchiseptica</i>	Ajout d'un palmitate	Résistance aux peptides antimicrobiens	(Bishop, Gibbons et al. 2000) (Guo, Lim et al. 1998)
<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. Typhimurium</i>	Ajout d'un palmitate	Persistance et échappement au système immunitaire Formation de biofilm	(Chalabaev, Chauhan et al. 2014)

*B. bronchiseptica*; *Bordetella bronchiseptica*, *C. jejuni* ; *Campylobacter jejuni*, *H. pylori* ; *Helicobacter pylori*, *K. pneumoniae*; *Klebsiella pneumoniae*, *N. meningitidis*; *Neisseria meningitidis*, *P. aeruginosa* ; *Pseudomonas aeruginosa*, *S. enterica*; *Salmonella enterica*, *S. Typhimurium*; *Salmonella Typhimurium*



## **b) Antigène O**

Le lipide A-noyau oligosaccharidique est synthétisé à l'interface cytoplasme-membrane interne puis transporté à travers la membrane interne par un transporteur de type ABC (Doerrler, Gibbons et al. 2004). Ce transporteur comporte une enzyme jouant le rôle d'une flippase, MsbA, qui est responsable de la translocation du lipide A-noyau à la membrane interne (Doerrler, Gibbons et al. 2004). C'est dans le périplasme qu'est associé le complexe lipide A-noyau à l'antigène O (Whitfield and Trent 2014). Cependant, comme pour le lipide A, la biosynthèse de l'antigène O débute du côté cytoplasmique (Whitfield 1995) dans lequel les précurseurs nucléotidiques de l'antigène O sont créés à l'aide des lipides porteurs (carrier), appelés, undécaprényl phosphate (und-P). Und-P sont attachés à la membrane interne coté cytoplasmique et permettent la synthèse des unités répétées de l'antigène O (unité O). Chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1, un locus comprenant 18 cadres ouverts de lecture (ORF) et impliqué dans la biosynthèse de l'antigène O a été identifié. (Labrie, Rioux et al. 2002). Certains de ces ORFs codent pour des glycosyltransférases (ORF12) et rhamnosyltransférases (ORF16 et 17) impliqués dans le processus de biosynthèse de l'antigène O (Labrie, Rioux et al. 2002). Ces ORFs ont également été retrouvés chez les sérotypes 9 et 11 d'*A. pleuropneumoniae* (Labrie, Rioux et al. 2002). Le mutant O antigène 44.1 utilisé lors des travaux de cette thèse est le résultat d'une mutation de l'ORF16 codant pour une rhamnosyltransférase, RfbN (Rioux, Galarneau et al. 1999, Labrie, Rioux et al. 2002).

Le processus d'export peut se faire via trois voies : (i) voie Wzy dépendante (ii) voie ABC transporteur dépendante et (iii) voie de synthèse dépendante (Whitfield 1995). Ces trois voies

sont différentes, mais ont deux points en communs : une réaction d'initiation similaire qui se déroule dans le cytoplasme et un processus de ligation similaire qui a lieu dans le périplasme (Whitfield 1995).

La voie de biosynthèse de l'antigène O, Wzy dépendante, serait utilisée chez *A. pleuropneumoniae* sérotypes 3, 8 et 15 puisque chez ces derniers les gènes *wzx*, *wzy* et *wzz* ont été détectés (Xu, Zhou et al. 2008).

Chez le sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*, deux ORFs, 10 et 11 ont de fortes homologies de séquence avec des gènes codant pour des protéines de la famille ABC transporteurs (Labrie, Rioux et al. 2002) ce qui laisse envisager que les souches de ce sérotype utilisent la voie ABC transporteur dépendante pour la biosynthèse et le transport de l'antigène O. Cette voie est destinée aux polysaccharides linéaires sans résidus latéraux (Whitfield 1995). La polymérisation dans cette voie a lieu au niveau cytoplasmique, une fois terminée, les chaînes d'antigène O seront transportées au périplasme par l'intermédiaire des protéines Wzt et Wzm qui codent respectivement pour une protéine de transport ATP dépendante et la protéine transmembranaire (Whitfield 1995). Le gène codant pour la protéine Wzm a été identifié chez les sérotypes 1, 9 et 11 chez *A. pleuropneumoniae* (Labrie, Rioux et al. 2002, Xu, Chen et al. 2010).

Finalement, le transport du lipopolysaccharide du périplasme à sa position finale au niveau de la membrane externe se fait selon un modèle impliquant des ponts protéiques, appelés ponts périplasmiques, qui sont des sites de contacts entre les membranes interne et externe et sont impliqués dans l'assemblage de différents constituants de la membrane externe (Tefsen, Geurtsen et al. 2005). Il a été démontré que ces ponts périplasmiques impliquent, le complexe protéique Lpt (Sperandeo, Cescutti et al. 2007, Simpson, May et al. 2015), ce dernier est important pour le transport du lipopolysaccharide à la surface de plusieurs bactéries Gram-négatif (Braun and Silhavy 2002, Bos, Tefsen et al. 2004, Putker, Bos et al. 2015).

### **3.8.2 Rôle du lipopolysaccharide dans l'adhésion**

Le lipopolysaccharide est décrit comme une adhésine (Belanger, Dubreuil et al. 1990, Belanger, Rioux et al. 1992, Paradis, Dubreuil et al. 1994). Les LPS d'*A. pleuropneumoniae* sont en effet impliqués dans l'adhérence aux cellules épithéliales ainsi qu'aux cellules du tractus respiratoire porcine (Belanger, Dubreuil et al. 1990, Paradis, Dubreuil et al. 1994). C'est principalement la région du noyau oligosaccharidique qui est indispensable pour l'adhésion (Rioux, Galarneau et al. 1999). En effet, des mutants affectés au niveau de gènes codant pour les voies de biosynthèse de noyau oligosaccharide ont démontré une diminution de l'adhérence *in vitro* (Rioux, Galarneau et al. 1999).

L'antigène O semble avoir également un rôle dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* à des sections congelées de la trachée porcine. En effet, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène O bloque l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 2 à ces cellules (Paradis, Dubreuil et al. 1999). Cependant, des mutations au niveau des gènes impliqués dans la biosynthèse ne semblent pas affecter l'adhésion *in vitro* (Rioux, Galarneau et al. 1999).

### **3.8.3 Rôle du lipopolysaccharide dans la virulence**

Le LPS est un facteur de virulence déterminant dû principalement à son activité endotoxique (Rioux, Galarneau et al. 1999, Ramjeet, Deslandes et al. 2005). Les infections *in vivo*, démontrent que des mutations au niveau de gènes codant pour la biosynthèse du noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* rendent la bactérie avirulente alors que les mutations affectant l'antigène O ne semblent pas affecter la virulence de la bactérie (Rioux, Galarneau et al. 1999, Labrie,

Rioux et al. 2002). Afin d'évaluer l'impact des mutations au niveau des LPS d'*A. pleuropneumoniae* sur la réponse inflammatoire des macrophages alvéolaires porcins, Ramjeet et collaborateurs, exposèrent les cellules immunitaires aux LPS de la souche parentale et de souches mutantes. Ces études ont démontré que l'absence de l'antigène O ou du noyau oligosaccharide externe n'a aucun impact sur la réponse inflammatoire des macrophages (Ramjeet et al., 2005). Ces résultats confirment donc que seul le lipide A (qui est présent et possède une structure identique chez la souche parentale et les souches mutantes) est nécessaire pour provoquer la réponse inflammatoire. Ainsi, la diminution de la virulence chez les mutants du noyau oligosacchridique semble être liée à leur faible capacité de coloniser le tractus respiratoire (Rioux, Galarneau et al. 1999).

De plus, des interactions entre LPS et les exotoxines ont été mises en évidence chez *A. pleuropneumoniae* à l'aide de la résonance plasmonique de surface (SPR) (Ramjeet, Cox et al. 2008). La SPR est une méthode de mesure de la liaison entre deux molécules dont une est absorbée à la surface d'une couche métallique. La détection de la liaison est basée sur une variance de l'indice de l'interface lorsque les deux molécules se lient. En effet, Ramjeet et collaborateurs, ont démontré une interaction directe entre le LPS purifié et les différentes protéines recombinantes ApxI et ApxII (Ramjeet, Cox et al. 2008). Cette interaction nécessite un noyau oligosaccharidique intact. L'absence de la région GalNac-GalII-GalI du noyau oligosaccharidique externe chez le mutant 5.1 abolit cette interaction. Les auteurs suggèrent que l'absence de cette région du noyau pourrait avoir un impact sur la conformation du noyau et ainsi annihiler l'interaction avec les toxines. Ces interactions LPS/toxines pourraient augmenter le potentiel cytolytique et ainsi contribuer à la détérioration des tissus lors des infections à *A. pleuropneumoniae*. Le mutant noyau oligosaccharidique 5.1 démontre une faible activité cytotoxique qui n'est pas liée à une diminution de la production des toxines ApxI et ApxII. En

effet, l'expression et la sécrétion de ces toxines ne sont pas affectées. Cependant, la diminution de l'activité cytotoxique pourrait être due à une plus faible association entre les LPS tronquées et les exotoxines (Ramjeet, Cox et al. 2008). Cela pourrait expliquer, du moins en partie, la faible virulence du mutant 5.1 et la diminution des lésions pulmonaires observées suite aux infections *in vivo* chez le porc sain à l'aide de ce mutant (Rioux, Galarneau et al. 1999).

#### **4. Réaction inflammatoire**

Lors des infections aiguës à *A. pleuropneumoniae*, il est envisagé que les toxines Apx seraient responsables des dommages cellulaires et de la nécrose des espaces alvéolaires alors que les LPS seraient responsables de la réponse inflammatoire aiguë. La réponse inflammatoire exacerbée est grandement responsable de la maladie et de la mort des animaux infectés. Une étude précédente a démontré que le LPS d'*A. pleuropneumoniae* est capable d'induire une forte stimulation des macrophages alvéolaires porcins (PAMs) traduite par une forte expression et production des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 et MCP-1 (Ramjeet, Deslandes et al. 2005). Comme indiqué auparavant, les mutations des gènes codant pour les voies de biosynthèse du noyau oligosaccharidique et de l'antigène O aboutissant à des modifications structurales du LPS n'affectent pas la réponse inflammatoire et confirme donc que seul le lipide A semble être impliqué dans cette stimulation. Dans cette même étude, une production importante de cytokine IL-8 a été détectée. L'IL-8 est une chimiokine, un médiateur essentiel de la réponse inflammatoire et joue un rôle capital dans le recrutement des neutrophiles (Brogaard, Klitgaard et al. 2015). Les observations de Ramjeet et collaborateurs, corroborent les observations précédentes qui démontrent une forte augmentation du stimulateur des IL-8, le TNF $\alpha$  dans le

fluide bronchoalvéolaire (Nelson et al., 1989) ainsi qu'une accumulation massive de neutrophiles (Baarsch et al., 2000 ; Nelson et al., 1989) au niveau des poumons infectés par *A. pleuropneumoniae*. La reconnaissance des LPS implique plusieurs récepteurs à la surface des cellules immunitaires. Parmi ces récepteurs, on retrouve la protéine TLR-4 (Toll Like Receptor type 4) qui appartient à la grande famille des récepteurs TLR (Male and Roitt 2007). Les TLRs reconnaissent un spectre large de motifs antigéniques (en anglais PAMPs ;Pathogen Associated Molecular Patterns) incluant le lipide A des LPS. Le TLR-4 reconnaît l'endotoxine avec l'aide des co-récepteurs membranaires CD14 et MD2 (Male and Roitt 2007). La liaison du LPS au complexe TLR-4/CD14/MD2 permet d'initier une cascade de signaux déclenchant le processus inflammatoire décrit plus haut (Male and Roitt 2007).

Brogaard et collaborateurs, ont récemment étudié l'expression des différents gènes impliqués dans la réponse immunitaire au niveau des tissus pulmonaires infectés par *A. pleuropneumoniae* (Brogaard, Klitgaard et al. 2015). Les auteurs ont utilisé la technique de microdissection par laser couplée à la technique de micropuce à ADN (microarray DNA). Les résultats ont démontré que les gènes codant pour le récepteur de type Toll (TLR-4) et les corécepteurs associés CD14 et MD2 étaient surexprimés dans les tissus pulmonaires porcins suite à l'infection (Brogaard, Klitgaard et al. 2015). Cette augmentation d'expression des récepteurs de l'immunité innée est suivie d'une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour les interleukines IL-1, IL-6, IL-8 et IL-17 (Brogaard, Klitgaard et al. 2015). L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires est également suivie d'un recrutement important de neutrophiles et des cellules mononuclées au site d'infection (Brogaard, Klitgaard et al. 2015). Ce recrutement des cellules est probablement dû aux chimiokines IL-8 et IL-17 qui exercent leur pouvoir d'attraction sur plusieurs cellules immunitaires (Nelson, Bagby et al. 1989, Baarsch, Foss et al. 2000, Brogaard,

Klitgaard et al. 2015). Une étude a récemment révélé qu'une adhésine autotransporteur trimérique appelée Ap1 était capable d'interagir avec la protéine membranaire des macrophages, OR5M11, membre de la famille des récepteurs olfactifs (Wang, Qin et al. 2016). Cette interaction entraîne une expression importante d'IL-8 par l'intermédiaire de la voie de signalisation MAPK p38 suivie de l'activation de la voie de signalisation Bax et de la production des caspases 3, 8 et 9 ce qui mène à l'apoptose des macrophages alvéolaires porcins (Wang, Qin et al. 2016). La surproduction de cytokines ainsi que la libération des dérivés réactifs de l'oxygène (anion superoxyde, l'oxygène singulet et peroxyde d'hydrogène) par les cellules de la réponse inflammatoire tels que les macrophages et les lymphocytes T auxiliaires (Male and Roitt 2007) pourraient participer aussi à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et à la détérioration de l'état des poumons (Morrison, Foss et al. 2000).

Une étude de Morrison et collaborateurs, a démontré que l'utilisation de IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, comme thérapie pouvait diminuer la production cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF $\alpha$ ) et par conséquent réduire les lésions pulmonaires suite à une infection aiguë par *A. pleuropneumoniae* (Morrison, Foss et al. 2000). Cette étude démontre donc que l'expression exacerbée de cytokines pro-inflammatoires lors des infections aiguës à *A. pleuropneumoniae* est fortement responsable de l'exacerbation des lésions pulmonaires et de la pathologie.

## **5. Traitement, vaccination et prévention**

La stratégie thérapeutique repose sur l'identification précoce des animaux infectés et leur traitement par voie parentérale (la perte d'appétit et de mouvement chez l'animal malade diminuent les chances d'inclure les médicaments dans la nourriture ou dans l'eau).

L'antibiothérapie est effective contre les infections à *A. pleuropneumoniae* si elle est débutée rapidement après la détection des premiers signes cliniques. Plusieurs antibiotiques incluant entre autres l'amoxicilline, le ceftiofur, le co-trimoxazole, la tiamuline, la tulathromycine et la pénicilline sont utilisés pour le traitement des infections à *A. pleuropneumoniae* (Muirhead, Alexander et al. 2013). Ces antibiotiques peuvent également être utilisés comme facteur de croissance ou comme agent prophylactique dans la nourriture ou dans l'eau (Burch 2013, Muirhead, Alexander et al. 2013). Lorsqu'ils sont prescrits en tant que facteurs de croissance, les antibiotiques sont donnés aux animaux à faibles doses (bien plus faibles que les doses thérapeutiques) et permettent entre autres un gain de poids et une augmentation du rendement (Burch 2013, Muirhead, Alexander et al. 2013). Cependant, les mécanismes d'action et les effets de ces antibiotiques à faibles doses ne sont pas clairs et suscitent beaucoup d'interrogations (Hao, Cheng et al. 2014). Un éventuel rôle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques est envisageable (Hao, Cheng et al. 2014). En effet, plusieurs résistances aux antibiotiques ont été détectées chez *A. pleuropneumoniae* (Morioka, Asai et al. 2008, Gottschalk 2012, Vanni, Merenda et al. 2012). En Italie, une étude rétrospective de 1994 à 2009 a démontré une augmentation de la résistance à l'amoxicilline, à l'ampicilline, au cotrimoxazole et à la pénicilline G (Vanni, Merenda et al. 2012). Au Canada, une étude récente démontre une faible résistance à l'ampicilline, à la danofloxacin, à la pénicilline et à la tiamuline (Archambault, Harel et al. 2012). Cependant, de fortes prévalences de bactéries résistantes à la chlortétracycline (88.4%) et l'oxytétracycline (90.7%) ont été enregistrées (Archambault, Harel et al. 2012). En dépit de la forte résistance à certains antibiotiques, les souches d'*A. pleuropneumoniae* au Canada restent tout de même susceptibles envers le ceftiofur, florfenicol, enrofloxacin, érythromycine, clindamycine, tilmicosine et la co-trimoxazole (Archambault, Harel et al. 2012).



L'antibiothérapie, malgré un certain succès clinique, ne peut protéger à elle seule le troupeau en entier et la prévention reste de nos jours la meilleure solution pour protéger les troupeaux contre l'infections à *A. pleuropneumoniae*. L'utilisation d'antibiotique en prophylaxie associée à la vaccination des troupeaux et une surveillance efficace permet de réduire considérablement les infections à *A. pleuropneumoniae*.

En ce qui concerne la vaccination, plusieurs vaccins sont commercialisés (Ramjeet, Deslandes et al. 2008). Les bactéries complètes inactivées ou bactérines, sont considérées comme la première génération de vaccins utilisés contre les infections à *A. pleuropneumoniae*. Elles représentent environ 90% des vaccins commercialisés de nos jours. Leur plus grand avantage est le fait que les bactérines présentent une panoplie de déterminants antigéniques au système immunitaire. Les bactérines permettent d'éliminer les risques de réversion observés avec les vaccins vivants. Ils sont souvent préparés dans des conditions de culture spécifique visant à mimer au maximum les conditions 'réelles' rencontrées par les bactéries *in vivo*. A titre d'exemple, des bactérines obtenues à partir de la souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 10 (NAD dépendant) cultivées dans des conditions appauvries en NAD ont démontré une meilleure protection chez les animaux comparées aux bactérines obtenues dans des conditions riches en NAD (van Overbeke, Chiers et al. 2003).

Cependant, malgré des résultats prometteurs, les bactérines ne confèrent qu'une protection limitée principalement du fait qu'elle soit spécifique au sérotype. De plus, leur processus d'inactivation (chimique ou physique) peut également altérer les différents antigènes de surface et diminuer ainsi leur capacité à offrir une bonne protection. Finalement, le fait que les bactéries soient tuées, certaines molécules hautement immunogènes telles que les toxines Apx ne sont plus sécrétées.

D'où l'importance de développer des vaccins sous-unitaires. Ces vaccins sont souvent composés des toxines Apx (ApxI, ApxII et ApxIII) fortement immunogènes associées ou non à certaines protéines de la membrane externe. Ce type de vaccins sous-unitaires permet de développer une forte réponse immunitaire et une protection à plus large spectre contre les différents sérotypes (Seah, Frey et al. 2002, van den Bosch and Frey 2003). Des vaccins sous-unitaires basés sur des antigènes de surface ont également été développés avec les lipoprotéines OmlA et PalA ou la protéine de la membrane externe Tbp (van den Bosch and Frey 2003, Alcon, Baca-Estrada et al. 2005, Kim, Kim et al. 2007). Cependant, comme pour les bactérines, les vaccins sous-unitaires sont dans certains cas peu efficaces et cela en raison des fortes variations retrouvées chez les multiples sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

Des vaccins vivants atténués ont également été développés (Inzana, Glindemann et al. 2004, Maas, Meens et al. 2006, Gottschalk 2012). À titre d'exemple, l'inactivation du locus codant pour la capsule chez le sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae*, a permis de développer une souche mutante avirulente utilisable comme vaccin vivant atténué (Inzana, Glindemann et al. 2004). Cependant, l'inactivation du gène codant pour la biosynthèse de la capsule est le résultat de l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine, ce qui laisse craindre une éventuelle transmission de la résistance vers d'autres bactéries même si aucune transmission de la cassette de résistance à la kanamycine n'a été enregistrée lors d'essais *in vivo* (Inzana, Glindemann et al. 2004).

## **II. Formation du biofilm**

### **1. Historique**

L'histoire moderne des biofilms bactériens commence à Philadelphie en 1976 lors du congrès de l'American Legion. Suite à ce congrès plusieurs anciens combattants déclarèrent une pneumonie sévère, 29 anciens combattants moururent de cette infection qui avait pour origine *Legionella pneumophila* (Fraser, Tsai et al. 1977). Cette bactérie avait en effet colonisé les conduits de climatisation sous forme de tapis recouvrant les parois et quelques fragments s'en détachaient parfois et passaient alors dans l'air ambiant sous forme d'aérosols, et de là, ils infectèrent les poumons des invités au congrès (Fraser, Tsai et al. 1977, Briandet, Fechner et al. 2012). Cette structure en forme de tapis bactérien était peu connue à cette époque jusqu'à la publication de l'article par le Dr J.W. Costerton en 1978 (Costerton, Geesey et al. 1978) qui définit cette structure avec le terme biofilm en mettant en garde la communauté scientifique qu'il faudrait désormais privilégier l'étude des bactéries sous cette forme, car elle représente le mode de vie de plusieurs bactéries dans leur environnement naturel. C'est donc à partir de cette époque qu'est fait le lien entre la chronicité de certaines maladies causées par des infections bactériennes et le biofilm.

### **2. Introduction aux biofilms**

J.W. Costerton définit le biofilm comme une communauté de bactéries agrégées en microcolonies, enrobée dans une matrice extracellulaire qu'elles ont sécrétée. Ces microcolonies sont adhérentes entre elles et à une surface inerte ou biologique et forme la structure du biofilm

(Costerton, Geesey et al. 1978, Costerton, Cheng et al. 1987, Costerton 1999). Plus de 90% à 95% des procaryotes sur terre vivent dans leur environnement naturel sous cette forme, fixée dans les sédiments, à la surface de microparticules du sol. Ceux-ci peuvent se retrouver dans les sols, dans l'eau et même dans les nuages, en effet, des bactéries sous la forme de biofilm ont été détectées à une hauteur de 70 km dans l'air attachées à des particules inertes (Briandet, Fechner et al. 2012).

Les biofilms se retrouvent partout, ils sont ubiquitaires, la plupart des espèces bactériennes peuvent passer, à un moment de leur vie d'un mode de vie planctonique et individuel vers ce mode de vie communautaire complexe. Ce changement est sous l'influence de plusieurs facteurs environnementaux et il est suivi d'importantes modifications de l'expression génétique et du phénotype de la bactérie.

Les biofilms bactériens confèrent entre autres la capacité de résister aux stress extérieurs, la résistance aux antibiotiques et l'échappement au système immunitaire (Costerton 1999, Mah and O'Toole 2001, Ciofu, Tolker-Nielsen et al. 2014). Plusieurs échecs thérapeutiques ainsi que la persistance de plusieurs pathogènes sont fréquemment associés aux biofilms (Annexe 1). Quelques exemples d'infections chroniques : la pneumopathie chez les personnes atteintes de la mucoviscidose, les otites, l'endocardite infectieuse, les infections urinaires récidivantes, l'infection associées aux plaies chroniques. Plusieurs autres infections sont liées également aux matériels implantés. Selon des rapports du CDC (Center of Disease Control and Prevention) et du NIH (National Institute of Health), 65% à 80% des infections chez l'homme impliquent les biofilms (Costerton, Stewart et al. 1999, Wolcott and Dowd 2011, Briandet, Fechner et al. 2012). Plus d'un million d'implants orthopédiques posés annuellement aux États-Unis sont contaminés par un biofilm et ce chiffre risque d'être multiplié par 4 d'ici 2030 selon des estimations (Kurtz, Ong et al. 2007).

Malgré le fait que cette structure représente le mode de vie normale d'une bactérie, plusieurs études sont encore menées sur la forme libre ou planctonique des bactéries et ceci en dépit du fait que cette forme ne révèle qu'une petite partie de la réalité, un pan énorme de la physiologie bactérienne est donc mis de côté.

### **3. Composition du biofilm**

Le biofilm peut être sous forme homogène, comprenant des individus d'une même espèce. Néanmoins, dans la nature, les biofilms sont rarement trouvés sous cette forme; ils sont souvent hétérogènes composés de plusieurs espèces de micro-organismes (Burmolle, Ren et al. 2014). L'architecture du biofilm va dépendre de plusieurs paramètres, incluant la ou les bactéries qui le compose, les conditions expérimentales et/ou environnementales qui permettent de produire le biofilm et la nature des composants de leur matrice extracellulaire (Flemming, Neu et al. 2007, Flemming and Wingender 2010).

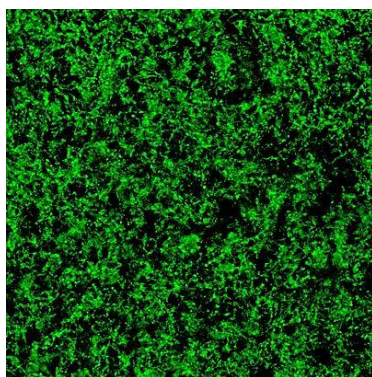
Les biofilms possèdent généralement une architecture stratifiée particulière, composée souvent d'une couche profonde qui est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier, suivie de plusieurs autres couches qui se superposent (Flemming and Wingender 2010, Briandet, Fechner et al. 2012).

Certains biofilms ont une forme aplatie d'autres ont plutôt l'allure d'un champignon (Briandet, Fechner et al. 2012). Chez le genre *Bacillus*, certaines bactéries produisent des biofilms ayant plusieurs centaines de micromètres de hauteur (Dervaux, Magniez et al. 2014). Les polymères qui composent la matrice extracellulaire sont souvent autoproduits et sécrétés par les bactéries et constituent le ciment de cette structure. La composition de cette matrice extracellulaire et ses

propriétés physico-chimiques varient énormément selon les bactéries ou l'espèce. Cependant comme points communs, le biofilm est très hydraté, en effet, l'eau peut représenter jusqu'à 90% de la matrice extracellulaire des biofilms (Sutherland 2001). La matrice du biofilm est composée également de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides. On retrouve également des cations tel que l'ion magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et l'ion calcium ( $Ca^{2+}$ ) (Montanaro, Poggi et al. 2011, Fong and Yildiz 2015, Limoli, Jones et al. 2015).

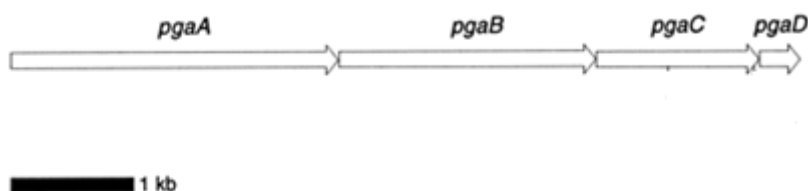
### 3.1 Les polysaccharides

Les polysaccharides sont les constituants les plus importants de la matrice extracellulaire (Öner 2013). Plusieurs types d'exopolysaccharides ont été retrouvés tel que l'alginate, cellulose, gellane, pullulane, xanthane (Vu, Chen et al. 2009, Öner 2013). Le polysaccharide majeur de la matrice extracellulaire chez *A. pleuropneumoniae* est le PGA, un polymère de résidus de N-acétyl-D-glucosamine liés en  $\beta$  (1,6), également appelé PNAG ou PIA (Polysaccharide Intracellular Adhesin) chez d'autres espèces (Figure 4).



**Figure 4.** Observation par microscopie laser confocale du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* 4074 après coloration au WGA-Oregon Green 488 qui se lie au PGA.

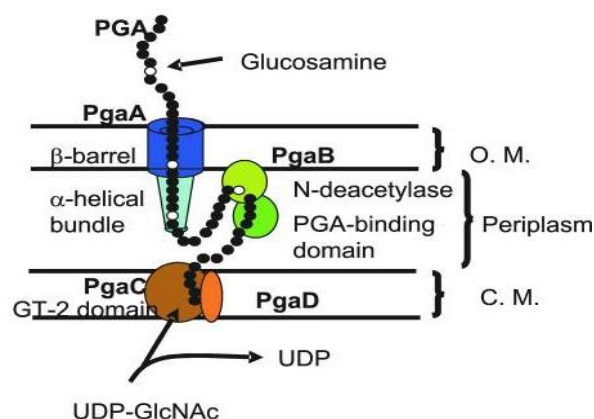
La synthèse du PGA est codée par l'opéron *pgaABCD*. Ce polymère est requis pour l'adhésion et joue le rôle d'un échafaudage qui maintient les bactéries entre elles et stabilise la structure du biofilm (Kaplan, Velliyagounder et al. 2004, Izano, Sadovskaya et al. 2007, Whitfield, Marmont et al. 2015) (Figure 5).



**Figure 5.** Schéma de l'opéron *pgaABCD* chez *A. pleuropneumoniae* qui code pour le PGA (Kaplan et al.,2004).

Des modifications enzymatiques post-polymérisation comme la déacétylation peuvent moduler les propriétés du PGA et affecter la formation du biofilm (Whitfield, Marmont et al. 2015). En effet, la déacétylation conduit à l'ajout de charges positives sur le polymère qui sont essentielles pour leurs interactions avec les molécules de surface anioniques telles que l'antigène O des bactéries à Gram négatif et les polysaccharides de la capsule (Vuong, Kocianova et al. 2004). Le degré de déacétylation varie d'une espèce à une autre : 20 % chez *S. epidermidis* (Mack, Fischer et al. 1996), 43% chez *S. aureus* (Joyce, Abeygunawardana et al. 2003) et de 1 à 15 % chez *A. pleuropneumoniae* (Izano, Sadovskaya et al. 2007). Cette déacétylation est médiée par les enzymes IcaB et PgaB, respectivement chez *S. epidermidis* et *A. pleuropneumoniae* (Itoh, Rice et al. 2008, Whitfield, Marmont et al. 2015). La mutation du gène *icaB* chez *S. epidermidis* résulte

en un PGA entièrement acétylé et sécrété dans le milieu de culture, mais marqué par un défaut d'attachement à la surface des bactéries et par conséquent d'une incapacité à produire un biofilm chez ce mutant (Vuong, Kocianova et al. 2004). Ces résultats démontrent donc que IcaB est essentiel à la déacétylation et à la formation de biofilm, mais il n'affecterait pas l'exportation du PGA (Vuong, Kocianova et al. 2004). À l'inverse d'IcaB, une mutation du gène codant pour la déacétylase PgaB qui affecte l'exportation du PGA suggérant que la déacétylation serait nécessaire également à l'export de l'exopolysaccharide (Itoh, Rice et al. 2008). Pour résumer, la synthèse du PGA chez *E. coli* et *A. pleuropneumoniae* se fait à l'aide de la glycotransférase PgaC et de la protéine PgaD dont le rôle reste à être déterminé. Suite à cette polymérisation, le PGA subit une déacétylation à l'aide de la déacétylase PgaB qui assiste également l'exportation du polymère à travers la porine PgaA (Figure 6) (Itoh, Rice et al. 2008).



**Figure 6.** Modèle de synthèse du PGA chez *E. coli* et l'organisation des protéines PGA au niveau de sa paroi (Itoh, Rice et al. 2008). O.M : membrane externe, C.M : membrane cytoplasmique, PgaA : porine, PgaB : déacétylase, PgaC : glycotransférase, PgaD : rôle inconnu.

À l'inverse d'*A. pleuropneumoniae* où seul un polysaccharide a été identifié, d'autres bactéries telles que *P. aeruginosa*, produisent plus qu'un polysaccharide. En effet, la matrice de *P.*



*aeruginosa* peut comporter trois polysaccharides : l'alginate, le Pel (pellicule) et le Psl (locus de synthèse de polysaccharides) (Colvin, Irie et al. 2012). Les souches de *P. aeruginosa* et *Bulkhorderia cepacia* dites *mucoïdes*, isolées de patients atteints de la mucoviscidose, démontrent une surproduction de l'alginate (Govan and Deretic 1996). Chez ces souches, l'alginate est le polysaccharide prédominant de la matrice du biofilm. Cependant, certaines souches non mucoïdes utilisent les polysaccharides Pel et Psl pour la formation du biofilm. La composition en polysaccharide de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* dépend de la souche étudiée, chez la souche de laboratoire non mucoïde PAO1, il a été démontré que le biofilm dépend de la production du polysaccharide Psl alors que chez une autre souche de laboratoire non mucoïde PA14, le polysaccharide Pel est essentiel à la maturation (Colvin, Irie et al. 2012).

Une étude menée par Coulon et al., sur la composition de la matrice extracellulaire de *P. aeruginosa* PA14 à l'aide de la résonance magnétique nucléaire a permis d'identifier les chaînes d'antigène O comme composantes importantes de la matrice du biofilm (Coulon, Vinogradov et al. 2010). Ces structures liées aux lipopolysaccharides ou libres représentent environ 20% du poids sec de la matrice polymérique (Coulon, Vinogradov et al. 2010). Cependant les rôles qui leur sont attribués dans l'architecture du biofilm restent flous.

### **3.2 L'ADN extracellulaire**

Les acides nucléiques extracellulaires (ADNe) sont des composants importants de la matrice extracellulaire. Relargués par les bactéries lysées, les fragments d'ADN se retrouvent séquestrés dans la matrice extracellulaire et participent au maintien de la structure du biofilm (Flemming and Wingender 2010, Lewenza 2013). Ces fragments d'ADN présentent évidemment des similitudes avec l'ADN génomique (Harmsen, Lappann et al. 2010), cependant des différences de séquences

ont été retrouvées chez l'ADN extracellulaire isolé du biofilm d'une gammaprotéobactérie F8 (Bockelmann, Janke et al. 2006). Chez cette souche aquatique, l'ADN extracellulaire forme un long réseau filamenteux essentiel à la stabilité du biofilm (Bockelmann, Janke et al. 2006).

L'excrétion des acides nucléiques peut être contrôlée entre autres par le système de communication intercellulaire quorum sensing et la concentration du fer (Li, Tang et al. 2002, Montanaro, Poggi et al. 2011, Binnenkade, Teichmann et al. 2014). Chez *S. epidermidis* l'autolysine AltE, lyse une sous-population bactérienne du biofilm ce qui permet la libération de l'ADN extracellulaire nécessaire pour promouvoir la production d'un biofilm stable par les sous-populations restantes (Qin, Ou et al. 2007, Flemming and Wingender 2010). De manière similaire la lyse cellulaire d'une sous-population au sein du biofilm et la libération de l'ADN extracellulaire sont importantes pour l'établissement du biofilm chez *S. aureus* (Ranjit, Endres et al. 2011). En effet, des mutations au niveau des gènes *cidA* et *lrgA*, qui codent respectivement pour une holine (protéine de lyse phagique) et une anti-holine, diminuent fortement la lyse cellulaire durant la croissance en biofilm et affectent négativement l'adhérence des bactéries et la morphologie du biofilm (Ranjit, Endres et al. 2011). Ces résultats confirment que la lyse cellulaire et la libération de l'ADN dans la matrice extracellulaire sont essentielles au développement du biofilm de *S. epidermidis* et *S. aureus* (Qin, Ou et al. 2007, Ranjit, Endres et al. 2011). L'ADN extracellulaire de par sa charge globale négative joue un rôle important dans la stabilité de la structure du biofilm. En effet, un traitement à la DNase fragilise le biofilm de plusieurs bactéries (Vilain, Pretorius et al. 2009, Harmsen, Lappann et al. 2010, Aung, Yam et al. 2015, Brown, Hanman et al. 2015).

La proximité physique des bactéries au sein du biofilm favorise l'échange de matériel génétique. (Ceri, Olson et al. 2010, Olsen 2015). Des études récentes démontrent que la variabilité génétique au sein des biofilms est fortement associée à une augmentation des taux de

transfert horizontal de gènes et de transformation, l'ADN extracellulaire est une source génétique non négligeable dans ces échanges (Molin and Tolker-Nielsen 2003, Madsen, Burmolle et al. 2012).

### **3.3 Les protéines extracellulaires**

Les protéines extracellulaires sont également des éléments importants de la matrice du biofilm, comme pour les acides nucléiques, ces protéines peuvent être excrétées lors de la lyse cellulaire. Les protéines de surfaces, adhésines, protéines sous-unitaires des pili et flagelles constituent la partie protéique de la matrice extracellulaire (Tremblay, Hathroubi et al. 2014, Fong and Yildiz 2015). Les pili, fimbriae et curli sont des appendices protéiques extracellulaires offrant des propriétés adhésives aux bactéries et constituent une part de la matrice extracellulaire chez les biofilm d'*E. coli* et certaines espèces de *Salmonella*. Les gènes codants pour ces structures sont en effet surexprimés dans des cultures en conditions biofilm comparé aux cultures planctoniques (Beloin, Valle et al. 2004, Domka, Lee et al. 2007). Chez *E. coli*, les pili assurent l'adhésion aux surfaces et l'agrégation entre bactéries dans les biofilms. La surexpression des fimbriae chez *Salmonella* Typhimurium augmente significativement l'adhérence des bactéries et leur capacité à produire un biofilm (Jonas, Tomenius et al. 2007). D'autre part, la mutation du gène *csgD*, codant pour un régulateur transcriptionnel des gènes essentiels à la biosynthèse du fimbriae, chez ce même sérotype abolit la formation de biofilm (Jonas, Tomenius et al. 2007). Chez *E.coli*, il a été démontré que les curli jouent un rôle important dans la formation de biofilm. En effet, une souche mutante de *E.coli* affectée au niveau du gène *focC* qui code pour la biosynthèse du curli de type F1C n'est plus capable de produire un biofilm *in vitro* (Lasaro, Salinger et al. 2009). Une étude protéomique sur la composition de la matrice extracellulaire du biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 a

révélé que 30% des protéines extracellulaires identifiées de cette matrice sont des protéines de la membrane externe (Toyofuku, Roschitzki et al. 2012). Ces protéines sont très similaires à celles retrouvées dans les vésicules de la membrane externe. Chez les bactéries Gram-négatif, ces vésicules sont des bourgeonnements de la membrane externe composés principalement de protéines, de lipopolysaccharides et de phospholipides. Ces dernières sont retrouvées en quantité importante dans les matrices du biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 et de *H. pylori* et semblent être des constituantes importantes de la matrice extracellulaire de ces biofilms (Schooling and Beveridge 2006, Yonezawa, Osaki et al. 2009, Toyofuku, Roschitzki et al. 2012). Les vésicules de membrane externe sont une source non négligeable de protéines extracellulaires et l'ajout de ces structures dans une culture d'*H. pylori* augmente significativement la production de biofilm (Yonezawa, Osaki et al. 2009). Des interactions entre les vésicules de la membrane externe et l'ADN extracellulaire ont également été rapportées (Schooling and Beveridge 2006). Dans un biofilm mature, ces vésicules membranaires peuvent également contenir de l'ADN extracellulaire (Renelli, Matias et al. 2004).

Les enzymes capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire représentent également une part importante de ces protéines extracellulaires et participent au maintien de l'architecture. La protéine extracellulaire DspB, est une hydrolase glycosidique, autoproduite par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et par *A. pleuropneumoniae* et très importante dans la régulation du biofilm. En effet, DspB hydrolyse le principal polysaccharide du biofilm, le PGA, et déclenche ainsi l'étape de détachement des bactéries et la dispersion du biofilm (Izano, Wang et al. 2007, Tremblay, Deslandes et al. 2013). D'autres protéines de surface jouent un rôle dans la rugosité et la stabilité du biofilm. À titre d'exemple, les lectines, protéines qui se lient aux glucides, sont importantes pour la formation des biofilms. Chez *P. aeruginosa*, les lectines LecA et LecB sont requises pour la formation du biofilm et leurs mutations résultent en un défaut dans

la production de biofilm (Tielker, Hacker et al. 2005, Diggle, Stacey et al. 2006). L'addition des ligands ayant une forte affinité pour LecA tel que l'isopropyl-beta-d-thiogalactoside (IPTG) et pour LecB, le L-fucose, inhibent la formation du biofilm de *P. aeruginosa* et déclenchent le détachement des biofilms formés (Tielker, Hacker et al. 2005, Diggle, Stacey et al. 2006). Les protéines Bap (Biofilm-Associated Protein) représentent une famille de protéines de hauts poids moléculaires identifiées comme importantes pour plusieurs biofilms bactériens (Fong and Yildiz 2015). Chez *Staphylococcus aureus*, la présence de Bap suffit à la bactérie pour produire un biofilm même en l'absence du polysaccharide PIA (Cucarella, Tormo et al. 2004). Des variants spontanés ayant perdu la fonction codante pour cette protéine Bap sont incapables de produire de biofilm (Tormo, Ubeda et al. 2007). Des protéines qui se lient à l'ADN ont récemment été identifiées comme ayant un rôle dans le biofilm. Ces protéines appartiennent à la super famille des DNABII qui composent les protéines HU (Histone-like protein) et les protéines IHF (Integration Host Factor). Ces dernières sont retrouvées associées à l'ADN extracellulaire dans la matrice des biofilms isolés chez des patients atteints de la mucoviscidose. IHF semble être important pour la stabilité de plusieurs biofilms et l'utilisation d'un sérum anti-IHF provoque la dispersion des biofilms incluant ceux formés par *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Goodman, Obergfell et al. 2011).

### **3.4 Les lipides**

Des lipides ont également été détectés dans la matrice extracellulaire (Conrad, Suutari et al. 2003). Des glycolipides, des lipopolysaccharides et des chaînes d'acide gras peuvent se retrouver séquestrés dans la matrice extracellulaire du biofilm (Coulon, Vinogradov et al. 2010, Flemming and Wingender 2010). Les rhamnolipides sont des biosurfactants qui jouent un rôle important

dans les différentes étapes de la formation du biofilm de *P. aeruginosa*. Ils sont impliqués dans l'attachement aux surfaces, dans la formation des microcolonies, dans l'architecture et la stabilité des structures et dans la dispersion du biofilm (Pamp and Tolker-Nielsen 2007).

La mobilité de type swarming se manifeste par un mouvement coordonné et rapide des bactéries au sein du biofilm sur une surface semi-solide. Cette mobilité nécessite le rhamnolipide comme biosurfactant et agent tensio-actif afin de réduire les frictions entre cellules et la surface sur laquelle elles circulent (Caiazza, Shanks et al. 2005).

#### **4. La formation du biofilm**

La formation du biofilm comprend généralement quatre étapes (**Figure 5**) (Costerton 1999, P. Stoodley, K. Sauer et al. 2002). La première étape du cycle est l'attachement des bactéries planctoniques ou libres à une surface abiotique ou biotique. Cette adhésion est sous l'influence de plusieurs variables telles que les propriétés des surfaces à coloniser, la composition du milieu en nutriments, la température, l'hydrophobicité des cellules et la présence d'éléments structuraux à la surface des bactéries (P. Stoodley, K. Sauer et al. 2002, Briandet, Fechner et al. 2012). L'attachement des bactéries planctoniques se fait de façon réversible en premier lieu à l'aide d'interactions dites non spécifiques comme les liaisons hydrogènes ou liaisons de Van der Waals (P. Stoodley, K. Sauer et al. 2002). Si les conditions sont réunies, les bactéries se fixent par la suite d'une manière irréversible, à l'aide de molécules de surface. Ces molécules de surfaces incluent les pili de type IV et les lipopolysaccharides (P. Stoodley, K. Sauer et al. 2002). Le rôle des lipopolysaccharides dans la formation de biofilm a été étudié ces dernières années. En effet, plusieurs études ont démontré l'importance d'un lipopolysaccharide intact pour la formation du

biofilm chez différentes bactéries (Li and Wang 2011, Clifford, Rapicavoli et al. 2013, Wang, Vinogradov et al. 2013, Murphy, Park et al. 2014). À titre d'exemple, Chassaing et collaborateurs, démontrèrent que des mutations dans l'opéron *waaWVL*, codant pour la biosynthèse du lipopolysaccharide, affectent négativement la formation du biofilm chez la souche AIEC (adherent-invasive *E. coli*) LF82 d'*E. coli* (Chassaing, Garénaux et al. 2015). Cependant, le rôle du lipopolysaccharide dans le biofilm suscite des interrogations. Les lipopolysaccharides sont des structures volumineuses et encombrantes à la surface des bactéries à Gram-négatif, les charges que sa structure comporte peuvent interagir avec l'exopolysaccharide du biofilm (Spiers and Rainey 2005, Amini, Goodarzi et al. 2009). De plus, des différences structurelles du lipopolysaccharide ont été observées entre les bactéries planctoniques et les bactéries sessiles. En effet, le biofilm de *P. aeruginosa* par exemple semble induire des modifications réversibles du lipopolysaccharide affectant la structure de l'antigène O et celle du lipide A (voir tableau 1) (Ciornei, Novikov et al. 2010, Chalabaev, Chauhan et al. 2014). Ces modifications pourraient avoir un rôle dans l'adaptation des bactéries au mode de vie sessile. La transition entre les deux modes de vie planctonique et biofilm est souvent associée à un profond changement physiologique des bactéries (P. Stoodley, K. Sauer et al. 2002).

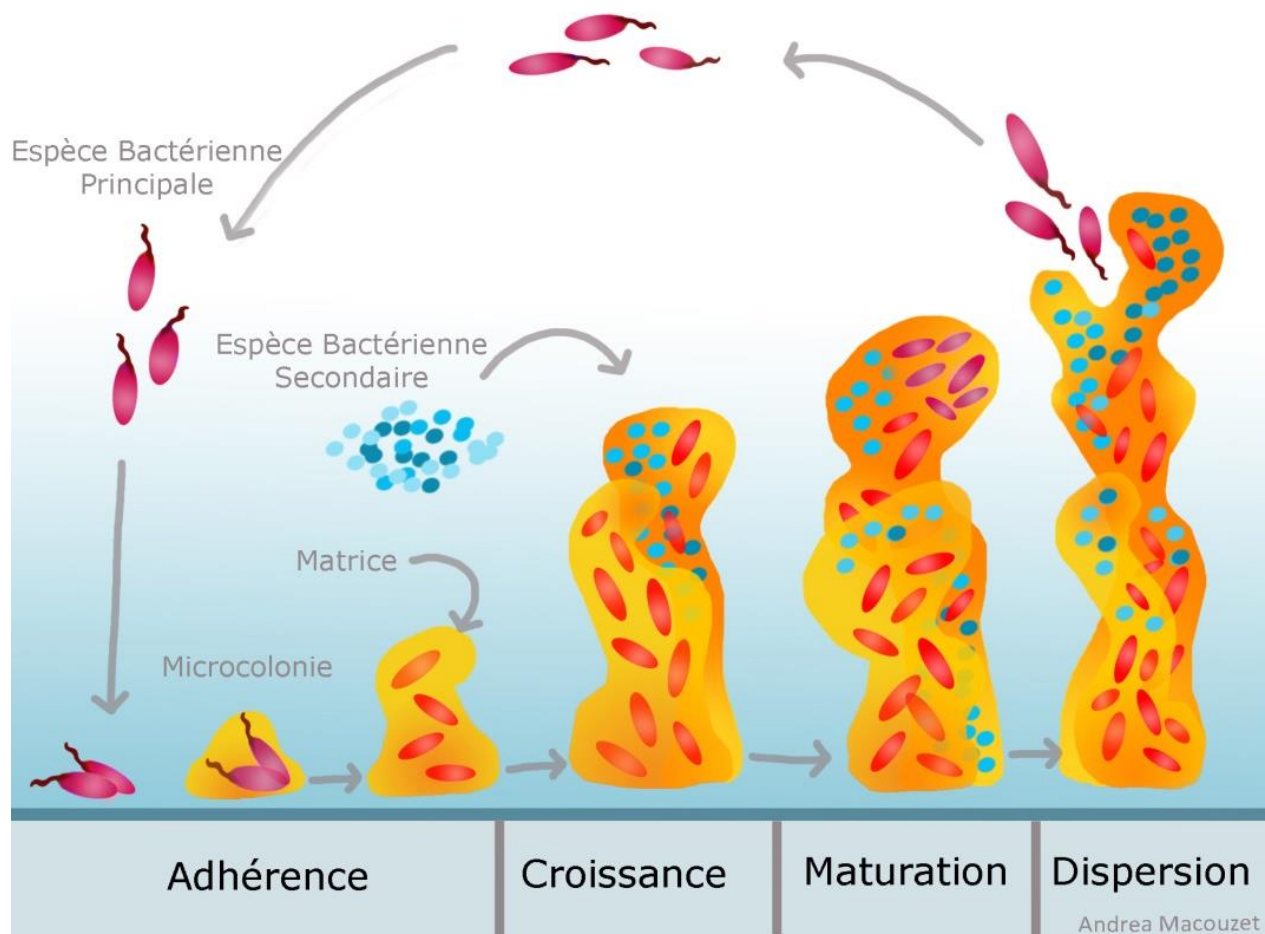
Une fois l'étape d'attachement irréversible aux surfaces réalisée, les bactéries se multiplient rapidement en formant des structures appelées microcolonies. Lors de cette étape, les microcolonies sont caractérisées par la présence d'un ou de plusieurs exopolysaccharides autosécrétés par les bactéries (Vu, Chen et al. 2009, Öner 2013). Ces polysaccharides renforcent l'attachement des bactéries entre elles et à la surface (Öner 2013).

Puis vient la phase suivante de la formation du biofilm, la maturation. Les bactéries continuent de sécréter l'exopolysaccharide ainsi que les autres composants de la matrice extracellulaire jusqu'à l'établissement d'une architecture complexe, stratifiée et hétérogène typique d'un biofilm

mature. Dans un biofilm mature, des canaux reliant certaines zones permettent entre autres, le transport de nutriments et déchets métaboliques, l'oxygénation et les échanges de molécule signal. Ces dernières sont importantes pour la communication entre les différentes sous-populations de bactéries au sein du biofilm et la synchronisation de leurs comportements (Smith and Iglewski 2003, Novick and Geisinger 2008). Le grand nombre de systèmes de communication et de signalisation à l'intérieur du biofilm illustrent bien à eux seuls la complexité de ce mode de vie sessile vis-à-vis des cellules planctoniques (P. Stoodley, K. Sauer et al. 2002).

La dernière étape est la phase de détachement qui se déclenche sous l'influence de plusieurs facteurs incluant la densité cellulaire, le manque de nutriment et la présence de forces de cisaillement ou d'enzymes dégradant la matrice polymérique (Kaplan 2010). Différentes stratégies ont été proposées pour cette dispersion, le détachement d'un fragment, la libération de bactéries planctoniques ou un déplacement du biofilm vers d'autres surfaces (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004, Kaplan 2010). La dispersion du biofilm permet aux bactéries détachées de coloniser de nouvelles surfaces, de se disséminer vers de nouveaux sites d'infection chez l'hôte et/ou de se transmettre à d'autres hôtes (Kaplan 2010).





**Figure 7.** Modèle de développement d'un biofilm mature chez *P. aeruginosa* (Andrea Macouzet).

## 5. La régulation du biofilm

La formation de biofilm est un processus complexe et énergivore qui nécessite un système de régulation hautement perfectionné. Plusieurs signaux sont perçus par ces systèmes de régulation et influencent les différentes étapes de formation de biofilm. Parmi ces systèmes nous citerons plus particulièrement le quorum sensing, car très répandu chez les bactéries. Le quorum sensing est un système basé sur la densité cellulaire et qui permet aux bactéries de s'adapter et de

coordonner l'expression de plusieurs gènes ainsi que leurs phénotypes (Henke and Bassler 2004). Ce système de communication intercellulaire et intracellulaire est indispensable pour la formation du biofilm de plusieurs bactéries, et plus particulièrement dans les étapes de maturation et de dispersion (Davies, Parsek et al. 1998, Karatan and Watnick 2009). Le quorum sensing est activé par de petites molécules signaux appelées les autoinducteurs, sécrétés par les bactéries et accumulés dans l'environnement extracellulaire, ces molécules signaux reflètent la densité bactérienne (Smith and Iglewski 2003).

Le système LuxI/LuxR a été l'un des premiers systèmes quorum sensing à être étudié (Fuqua, Winans et al. 1994). Ce système a été retrouvé chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* (Fuqua, Winans et al. 1994). Une fois activé, ce système déclenche la luminescence de la bactérie (Fuqua, Winans et al. 1994). La protéine LuxI est l'enzyme responsable de la synthèse des autoinducteurs de type 1 (AI-1), les AHLs (acylated homoserine lactone). Une fois produites en quantité suffisante, les AHLs s'attachent à l'activateur transcriptionnel LuxR. LuxR subit une modification structurelle et prend une forme active qui va permettre son association à des séquences spécifiques sur l'ADN et la modulation de l'expression de plusieurs gènes y compris les gènes codant pour la luminescence (gène *luxA* codant pour la luciférase) (Fuqua, Winans et al. 1994, Visick and Ruby 2006). Chez *P. aeruginosa*, les activateurs transcriptionnels LasR et RhlR appartiennent à la famille LuxR et contrôlent à eux seuls jusqu'à 10% du génome (Schuster and Greenberg 2006).

Les bactéries à Gram-positif telles que *S. aureus* utilisent également un système quorum sensing (Novick 2003). Cependant ces systèmes de détection sont plus complexes et utilisent des autoinducteurs de type oligopeptides modifiés qui sont détectés par des voies de transduction du signal à deux composants (Novick 2003). À la différence des AHLs, l'oligopeptide ne pénètre pas dans la cellule, et il est détecté de manière extracellulaire par une histidine kinase. Cette histidine

kinase s'autophosphoryle puis transfère le groupe phosphoryle à son régulateur. Ce dernier active l'expression de plusieurs gènes cibles (Novick 2003).

Le système quorum sensing de type 2 retrouvé chez plusieurs bactéries incluant la famille *Pasteurellaceae* et chez *A. pleuropneumoniae* (Chen, Schauder et al. 2002, Li, Zhou et al. 2008) implique des autoinducteurs de type 2 (AI-2), des diesters de furanosyl borate. Les AI-2 sont détectés comme pour les oligopeptides chez les Gram-positifs par des senseurs histidine kinases membranaires. La biosynthèse de ces molécules signales impliquent la protéine LuxS (Chen, Schauder et al. 2002). La délétion du gène *luxS* aboutit à un défaut de formation de biofilm chez *S. Typhimirium* (Prouty, Schwesinger et al. 2002). LuxS est également impliqué dans le biofilm de *Clostridium difficile* et la mutation du gène codant pour cette protéine rend la bactérie incapable de s'attacher à une surface en verre ou de produire un biofilm (Ethapa, Leuzzi et al. 2013). LuxS est également impliqué dans les biofilms de *Streptococcus mutans* (Merritt, Qi et al. 2003).

En plus des systèmes de quorum sensing, plusieurs autres systèmes à deux composants sont impliqués dans la régulation du biofilm (Mikkelsen, Sivaneson et al. 2011, Gross and Beier 2012). Parmi ces systèmes, nous retrouvons le système extracytoplasmique CpxRA. CpxRA qui est un système de réponse au stress membranaires chez plusieurs bactéries à Gram-négatif incluant *A. pleuropneumoniae* et *E. coli* (Vogt and Raivio 2012, Tremblay, Deslandes et al. 2013). C'est un système de régulation à deux composants, une histidine kinase, CpxA, et un régulateur, CpxR. Ce système est activé par différents stimuli comme le pH, l'osmolarité, l'accumulation anormale de protéines extracytoplasmiques dans l'espace périplasmique, la présence de protéines non fonctionnelles au niveau membranaire ou des stress mécaniques à la suite d'un contact avec la surface (Vogt and Raivio 2012). Une fois activée, la forme phosphorylée de CpxR va réguler l'expression de plusieurs gènes de virulence (Mitobe, Arakawa et al. 2005, Nevesinjac and Raivio

2005, Vogt and Raivio 2012, Tanner, Li et al. 2016). Le système CpxRA a été proposé comme étant un des régulateurs importants du biofilm chez *E. coli* (Otto and Silhavy 2002). En effet, une étude de Otto et Silhavy, a démontré que l'expression des gènes codant pour le système Cpx était fortement induite dans un biofilm mature d'*E. coli* (Otto and Silhavy 2002). Ces derniers formulèrent l'hypothèse que les fortes pressions mécaniques que subissent les bactéries retrouvées dans un biofilm en particulier au niveau des interfaces bactérie-bactérie et bactérie-surface seraient perçues comme un stimulus (Otto and Silhavy 2002). Le système Cpx joue un rôle important dans le biofilm d'*E. coli* en contrôlant l'expression de plusieurs gènes incluant ceux impliqués dans la formation du biofilm (Beloin, Valle et al. 2004, Price and Raivio 2009). La mutation au niveau du gène codant pour le régulateur CpxR abolit la capacité de la bactérie à produire un biofilm mature (Beloin, Valle et al. 2004, Price and Raivio 2009). De plus, la mutation du gène *cpxA*, codant pour le senseur de type histidine kinase diminue fortement la formation du biofilm chez *E. coli* (Dorel, Vidal et al. 1999).

En plus des régulateurs transcriptionnels, plusieurs régulateurs post-transcriptionnels ont été identifiés dans la régulation des biofilms (Martinez and Vadyvaloo 2014). La protéine chaperonne ARN, Hfq régule la formation de biofilm de plusieurs pathogènes (Martinez and Vadyvaloo 2014). Elle est décrite dans la littérature comme un régulateur positif du biofilm. En effet, les mutations du gène *hfq* affectent négativement les biofilms d'*E. coli* (Kulesus, Diaz-Perez et al. 2008), de *Salmonella enterica* (Kint, De Coster et al. 2010) et de *Stenotrophomas maltophilia* (Roschetto, Angrisano et al. 2012). Chez *E. coli*, Hfq interagit avec plusieurs petits ARN non codant (ARNnc) tel que McaS, RprA, GcvB, OmrA/B and SdsR (Boehm and Vogel 2012, Thomason, Fontaine et al. 2012, Martinez and Vadyvaloo 2014). Ces ARNnc jouent un rôle important dans la régulation de CsgD, un régulateur transcriptionnel des curli et de la cellulose, deux facteurs importants dans le biofilm d'*E. coli* (Ogasawara, Yamamoto et al. 2010,

Ogasawara, Yamamoto et al. 2011).

La protéine CsrA (carbone storage regulator A) est également une protéine liant l'ARN. CsrA régule l'expression du polysaccharide PGA chez *E. coli* en se liant spécifiquement au transcrit *pgaA* et conduit à sa dégradation et la diminution de sa traduction en protéine (Wang, Dubey et al. 2005). De plus, dans cette même étude les auteurs ont démontré que l'absence de CsrA provoque l'augmentation du biofilm. Ces résultats confirment donc que CsrA joue le rôle d'un régulateur posttranscriptionnel négatif en réprimant l'expression des polysaccharides de surface (Wang, Dubey et al. 2005).

Cependant, plus récemment, il a été démontré que CsrA peut également réguler le biofilm en affectant la production de la di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP), un messenger secondaire ubiquitaire ayant un rôle central dans la formation de biofilm de plusieurs bactéries à Gram-négatif (Tischler and Camilli 2004, Karatan and Watnick 2009). Cette molécule signalé est synthétisée par des enzymes ayant une activité diguanylate cyclase (DGC), protéines présentant un motif de 5 acides aminés (GGDEF) (Simm, Morr et al. 2004). L'expression de certaines de ces protéines est sous le contrôle de CsrA qui est capable de se lier à leurs ARN et en diriger leur dégradation. Par conséquent, la production du c-di-GMP est affectée et le biofilm est diminué (Jonas, Edwards et al. 2008).

Les riboswitchs ou ARN interrupteurs sont des séquences d'ARN plus généralement retrouvées dans l'extrémité non codante 5'UTR de différents gènes (Roth and Breaker 2009, Martinez and Vadyvaloo 2014). Cette région de l'ARN répond à la présence ou l'absence d'un ligand spécifique et replie sa structure complexe et altère ainsi l'expression du gène en aval du riboswitch (Mandal and Breaker 2004, Roth and Breaker 2009). Le c-di-GMP est un ligand d'une classe de riboswitch appelée GEMM (genes for the environment, for membranes, and for motility) (Sudarsan, Lee et al. 2008, Smith, Lipchock et al. 2010). Ces séquences d'ARNm sont

retrouvées en aval de plusieurs gènes contrôlés par le c-di-GMP incluant les gènes codant pour sa synthèse (DGC) (Sudarsan, Lee et al. 2008, Smith, Lipchok et al. 2010). La régulation des gènes par les riboswitchs peut se faire soit au niveau transcriptionnel ou au niveau posttranscriptionnel (Mandal and Breaker 2004).

## **6. Résistance et tolérances aux antibiotiques**

La formation de biofilm apporte plusieurs avantages aux bactéries. En particulier, la capacité de résister aux antimicrobiens (Annexe 2). En effet, les infections associées aux biofilms sont souvent de 10 à 1000 fois plus résistantes à l'action d'un antibiotique (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010, Jacques, Aragon et al. 2010, Archambault, Harel et al. 2012, Lopes, Ceri et al. 2012, Lewenza 2013, Olsen 2015). Cette résistance aux antibiotiques se produit par deux mécanismes différents: le premier mécanisme de résistance aux antibiotiques est génétiquement codé et donc la résistance aux antibiotiques peut être héritable d'une génération à une autre. À l'opposé de ce type de résistance, on retrouve la tolérance aux antibiotiques, qui se décrit plus comme un phénotype transitoire et non héritable. Cette tolérance se définit par l'état physiologique des bactéries et n'est pas causée par une mutation ou la transmission d'un gène de résistance (Stewart and Costerton 2001, Parsek and Singh 2003, Olsen 2015, Stewart 2015). La tolérance peut être aussi médiée par des caractéristiques spécifiques du biofilm qui limitent la diffusion et l'activité de l'antibiotique (Chiang, Nilsson et al. 2013, Ciofu, Tolker-Nielsen et al. 2014). La résistance et la tolérance aux antibiotiques associées aux biofilms jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de nombreuses bactéries en particulier lors des infections sous-aiguës et chroniques qui sont particulièrement récalcitrantes aux antibiothérapies telles que les infections liées aux implants médicaux, les infections chroniques des plaies et les infections pulmonaires incurables chez les

patients atteints de mucoviscidose (Donlan and Costerton 2002, Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004, James, Swogger et al. 2008, Bjarnsholt, Jensen et al. 2010, Hoiby, Ciofu et al. 2010, Bjarnsholt 2013, Zhao, Usui et al. 2013).

## **6.1 Résistance aux antibiotiques**

Les biofilms sont souvent considérés comme un réservoir de diversité génétique favorisant la diversification génétique et offrant aux bactéries la capacité de s'adapter, d'évoluer et de survivre dans des environnements hostiles (Fraud and Poole 2011, Limoli, Rockel et al. 2014, Cullen and McClean 2015) (Sousa and Pereira 2014). Cette diversification contribue au développement de la résistance aux antibiotiques (Annexe 2).

Plusieurs études ont démontré une association entre la capacité des bactéries à former des biofilms et la prévalence de la résistance aux antibiotiques (Sanchez, Mende et al. 2013, Bae, Oh et al. 2014). En effet, une étude récente a démontré que les souches d'*Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* capables de produire un biofilm démontrent une prévalence de la résistance à plusieurs antimicrobiens bien plus élevés comparés à leurs homologues incapables de produire un biofilm (Sanchez, Mende et al. 2013). Ces résultats suggèrent que le biofilm pourrait favoriser par l'augmentation des échanges génétiques. En effet, la nature fortement hydratée de la matrice polymérique du biofilm offre des conditions favorables au transfert de l'ADN extracellulaire et la transformation naturelle (Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010, Poole 2011, Olsen 2015).

Le transfert horizontal de gènes et la conjugaison, connus pour avoir un rôle clé dans l'adaptation des bactéries et leur évolution se produisent à des fréquences plus élevées dans des

conditions de culture en biofilm comparé aux cultures planctoniques (Madsen, Burmolle et al. 2012).

À titre d'exemple, Bae et collaborateurs, démontrèrent qu'une co-culture en biofilm de deux souches *C. jejuni*, l'une résistante à la kanamycine et l'autre au chloramphénicol abouti à l'apparition de souches de *C. jejuni* résistantes aux deux antibiotiques. Cette multirésistance se produit plus fréquemment lorsque les bactéries sont cultivées dans des conditions de culture en biofilm comparée à des conditions de cultures planctoniques (Bae, Oh et al. 2014). De plus, il a été démontré que la croissance d'*Enterococcus faecalis* sous forme de biofilm est associée à une augmentation de nombre de copie du plasmide pCF10. Ce plasmide est porteur de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, ce mécanisme est réversible puisque la culture de cellules du biofilm d'*E. faecalis* dans des conditions planctoniques diminue le nombre de copies du plasmide pCF10 (Cook and Dunny 2013). Bien que la résistance semble être augmentée par le biofilm, elle ne peut à elle seule expliquer l'échec de l'antibiothérapie, d'autres mécanismes étant clairement impliqués.

## **6.2 Tolérance aux antibiotiques**

La tolérance aux antibiotiques dans le biofilm est un processus multifactoriel impliquant les différents composants de la matrice extracellulaire ainsi que l'hétérogénéité physiologique du biofilm (Annexe 2). La matrice extracellulaire du biofilm a un rôle primordial dans cette tolérance. Contenant plusieurs molécules cationiques et anioniques, la matrice forme une barrière physique et électrostatique qui interagit avec certains antibiotiques. La matrice peut affecter le taux de pénétration de l'antibiotique jusqu'aux couches les plus profondes du biofilm. Dans le



biofilm de *P. aeruginosa*, il a été démontré que l'alginate était capable de lier certains antibiotiques chargés positivement tel que les aminosides (Alipour, Suntres et al. 2009, Chiang, Nilsson et al. 2013, Limoli, Jones et al. 2015). Face à cette tolérance, une étude récente a démontré qu'un prétraitement des biofilms de *P. aeruginosa* par l'alginate lyase, une enzyme capable de dégrader l'alginate, permettait d'augmenter l'activité de certains aminoglycosides (Alipour, Suntres et al. 2009). L'ADN extracellulaire, autre composant important de la matrice extracellulaire du biofilm, est capable également de se lier à différents antimicrobiens cationiques et de jouer le rôle de barrière électrostatique par l'intermédiaire des charges négatives associées à sa structure (Mulcahy, Charron-Mazenod et al. 2008, Chiang, Nilsson et al. 2013, Jennings, Storek et al. 2015).

En plus des composants de la matrice extracellulaire qui jouent le rôle d'une barrière protectrice, un ralentissement du métabolisme des bactéries est souvent observé dans le biofilm (Ceri, Olson et al. 2010). Le défaut d'oxygène et de nutriments dans les couches les plus profondes de certains biofilms peut induire le ralentissement de la croissance et du métabolisme (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004, Hoiby, Bjarnsholt et al. 2010). Ceci réduira l'efficacité de certains antibiotiques ayant pour cible des fonctions cellulaires telles que la synthèse protéique ou la biosynthèse du peptidoglycane (Williamson, Richards et al. 2012). L'apparition de cellules dites persistantes ou dormantes est fortement associée au biofilm, ces cellules sont généralement la résultante des stress que subissent les bactéries dans les biofilms (Wood, Knabel et al. 2013). Les bactéries persistantes contribuent fortement à la tolérance aux antibiotiques (Wood, Knabel et al. 2013). À titre d'exemple, le manque de nutriments dans le biofilm induit la production de l'alarmone (p)ppGpp, une petite molécule qui influe l'expression de plusieurs gènes (Wood, Knabel et al. 2013). (p)ppGpp est capable d'inhiber la réplication de l'ADN et la synthèse

protéique (Dalebroux and Swanson 2012). Le stress nutritionnel et l'augmentation des quantités d'alarmone induit une réponse appelée, la réponse stringente. Cette réponse est suivie d'une diminution de la croissance cellulaire qui a pour conséquence une tolérance accrue à plusieurs antibiotiques comme la gentamicine, l'ofloxacine et le méropénem dans le biofilm de *P. aeruginosa* (Nguyen, Joshi-Datar et al. 2011) et contre l'ofloxacine dans le biofilm d'*E. coli* K-12 (Bernier, Lebeaux et al. 2013).

## **7. Les antibiotiques comme signaux activateurs du biofilm**

L'un des concepts majeurs de l'antibiothérapie est la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui se définit comme la concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber totalement la croissance bactérienne. Des doses sous la CMI ne sont pas létales mais sont capables d'affecter la croissance, la morphologie, les propriétés de surface, la pathogénicité et même la formation du biofilm chez différentes bactéries (Davies, Spiegelman et al. 2006, Fonseca and Sousa 2007, Kaplan 2011, Gomes, Peixoto et al. 2013, Andersson and Hughes 2014, Wu, Li et al. 2014). En effet, plusieurs études ont démontré que des doses sous-CMI de  $\beta$ -lactames étaient capables d'induire la formation de biofilm incluant les biofilms d'*Acinetobacter baumannii* (Nucleo, Steffanoni et al. 2009), *P. aeruginosa* (Bagge, Schuster et al. 2004), *S. aureus* (Mirani and Jamil 2011), *Staphylococcus lugdunensis* (Frank, Reichert et al. 2007) et *Streptococcus intermedius* (Ahmed, Petersen et al. 2009). Les mécanismes associés à cette augmentation du biofilm varient selon la nature de l'antibiotique et l'espèce bactérienne affectée. Chez *S. intermedius*, par exemple, l'exposition à des sous-CMI d'ampicilline induit la formation du biofilm par l'intermédiaire de la molécule signalé LuxS et l'augmentation de la production des

autoinducteurs de type 2 (Ahmed, Petersen et al. 2009). Chez *Corynebacterium diphtheriae*, il a été démontré que des doses sous-CMI de pénicilline induisent une hyperfilamentation et une augmentation de l'hydrophobicité de surface et par conséquent une hyperproduction du biofilm (Gomes, Peixoto et al. 2013). Certains antibiotiques tels que l'imipénème sont capables à des doses sous-CMI d'induire l'expression de gènes codant pour la biosynthèse de l'alginate (Bagge, Schuster et al. 2004). Ce dernier est un important polysaccharide dans le biofilm de *P. aeruginosa* (Bagge, Schuster et al. 2004). De manière similaire, Bedran et al., démontrèrent que l'exposition de *S. mutans* à des doses sous la CMI de triclosan augmente l'expression des gènes *gtfC* et *atIA* codant respectivement pour une glycotransférase et une protéine liant la fibronectine qui entraîne une augmentation de l'adhésion aux cellules épithéliales et une plus grande production de biofilm (Bedran, Grignon et al. 2014). L'exposition d'un biofilm de *S. aureus* à de faibles doses de  $\beta$ -lactames induits la libération de l'ADN extracellulaire menant à de l'autoagrégation et l'augmentation du volume du biofilm (Kaplan, Izano et al. 2012).

Les antibiotiques dans les élevages porcins sont prescrits pour un usage curatif, préventif et comme additif. Dans ce dernier cas, les antibiotiques peuvent être utilisés comme facteur de croissance, c'est le cas en Amérique du Nord dans la production animale (CVMA 2008, Guardabassi, Jensen et al. 2008, Marshall and Levy 2011, Burch 2013, Thacker 2013). Cette utilisation suscite cependant, des craintes quant à la dissémination et l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et à leurs conséquences pour la santé animale et humaine (van der Fels-Klerx, Puister-Jansen et al. 2011, Thacker 2013). En tant que facteur de croissance, les antibiotiques sont ajoutés à de faibles doses dans la nourriture ou l'eau. Ces concentrations sont bien en deçà de celles requises dans les traitements thérapeutiques, ce qui pourrait affecter le

mode de vie des bactéries et promouvoir leur persistance et leur résistance aux antibiotiques par l'intermédiaire des biofilms.

## 8. Échappement au système immunitaire

Le biofilm est souvent associé aux infections chroniques due à une meilleure habilité à échapper au système immunitaire de l'hôte et à une capacité accrue à persister dans l'organisme (Alhede, Bjarnsholt et al. 2014, Roilides, Simitsopoulou et al. 2015). Plusieurs études ont démontré que les bactéries dans un biofilm sont capables d'éviter l'action des cellules immunitaires par différents mécanismes (Hanke and Kielian 2012, Roilides, Simitsopoulou et al. 2015). En effet, chez *S. aureus*, les bactéries sous forme de biofilm résistent à la phagocytose par les macrophages (Thurlow, Hanke et al. 2011). Ces mêmes macrophages sont cependant capables de phagocyter les bactéries planctoniques (Thurlow, Hanke et al. 2011). Les composants de la matrice extracellulaire jouent le rôle d'une barrière protectrice en empêchant l'opsonisation des bactéries à l'intérieur du biofilm. L'alginate, par exemple, en tant que composant principal du biofilm des souches mucoïdes de *P. aeruginosa*, offre une protection contre des leucocytes humains (Leid, Willson et al. 2005). D'autre part, les cellules des biofilms de *S. epidermidis* et *S. pneumoniae* ont développé la capacité d'échapper à l'opsonisation par les neutrophiles en inhibant l'action du complément c3b (Kristian, Birkenstock et al. 2008, Domenech, Ramos-Sevillano et al. 2013).

Dans une récente étude, Abu Khweek et collaborateurs, ont démontré que les souches de *L. pneumophila* issues d'une culture en biofilm étaient capables de survivre plus longtemps dans des

macrophages murins alors que les bactéries planctoniques étaient, quant à elles, rapidement dégradées dans les lysosomes des macrophages (Abu Khweek, Fernandez Davila et al. 2013). Cette évasion à l'action des lysosomes serait liée au fait que les bactéries ayant été cultivées dans des conditions de biofilm seraient dépourvues de flagelles. Ces cellules du biofilm n'activent pas les caspases 1 et 7 et évitent ainsi le déclenchement de la voie lysosomale de l'apoptose (Abu Khweek, Fernandez Davila et al. 2013). Dans cette même étude, les cellules de *L. pneumophila* planctoniques induisaient une plus forte production de l'IL-1 $\beta$  par les macrophages comparés aux bactéries du biofilm (Abu Khweek, Fernandez Davila et al. 2013). Cette dernière observation est soutenue par plusieurs autres études qui démontrent que le biofilm est souvent associé à une faible réponse inflammatoire (Hanke and Kielian 2012, Roilides, Simitopoulou et al. 2015). Daw et al., ont observé que l'exposition de macrophages à des cellules d'*E. faecalis* cultivées en biofilm induisait une plus faible production de cytokines pro-inflammatoires comparée à celle faisant suite à une exposition à des bactéries planctoniques (Daw, Baghdayan et al. 2012). De manière similaire, il a été démontré que le biofilm de *Streptococcus pneumoniae* activait moins les macrophages *in vivo* et par conséquent la réponse pro-inflammatoire était diminuée (Blanchette-Cain, Hinojosa et al. 2013). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que des mutations abolissant le biofilm de *S. pneumoniae* permettaient d'augmenter significativement l'activation des macrophages et les taux de production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-6 (Blanchette-Cain, Hinojosa et al. 2013).

Comme mentionné dans le tableau 1, le lipide A peut subir plusieurs modifications dont certaines affecteront sa reconnaissance par les TLR-4. Certaines de ces modifications semblent être associées au biofilm. Récemment, Chalabaev et collaborateurs, ont démontré que le lipide A de plusieurs bactéries à Gram-négatif incluant *E. coli* et *P. aeruginosa* subit une palmitoylation

lors de la formation du biofilm (Chalabaev, Chauhan et al. 2014). Cette modification diminue de manière significative la réponse inflammatoire *in vivo* et permet à la bactérie de survivre et de persister lors d'infections *in vivo* des souris (Chalabaev, Chauhan et al. 2014).

### **III. Formation du biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae***

#### **1. La production de biofilm chez *A. pleuropneumoniae***

Il a été accepté par la communauté scientifique qu'une majorité des bactéries avait la capacité de produire un biofilm sous certaines conditions, et ce aussi bien dans leur écosystème naturel que dans un écosystème artificiel (systèmes *in vitro*) (Briandet, Fechner et al. 2012). La famille *Pasteurellaceae* n'échappe pas à cette règle: d'ailleurs au cours de la dernière décennie plusieurs études ont démontré que ses membres étaient capables de produire un biofilm (Olson, Ceri et al. 2002, Kaplan, Velliyagounder et al. 2004, Jin, Zhou et al. 2006, Sandal, Hong et al. 2007, Bossé, Sinha et al. 2010, Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010).

Kaplan et son équipe ont été les premiers à étudier la capacité d'*A. pleuropneumoniae* à former un biofilm *in vitro* dans le modèle statique, très populaire dans l'étude des biofilms, de la microplaque de 96 puits (Kaplan, Velliyagounder et al. 2004). Dans ce modèle, les biofilms se forment au fond du puits à l'interface solide-liquide (Coffey and Anderson 2014). Cette étude rapportait que les sérotypes 5b et 11 comme étant producteurs de biofilms *in vitro* (Kaplan, Velliyagounder et al. 2004). Cette capacité de former un biofilm semble être fréquent chez *A. pleuropneumoniae* puisqu'il a été observé chez tous les sérotypes (à l'exception du sérotype 16 tout récemment découvert) (Kaplan and Mulks 2005, Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010).

La production du biofilm chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 est un processus rapide (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010, Tremblay, Deslandes et al. 2013). La biomasse est détectable, chez certaines souches, à partir de 3 heures de culture et atteint un maximum vers 5 heures ce qui correspond à la forme mature du biofilm (Tremblay, Deslandes et al. 2013). La dispersion du

biofilm commence vers 6 heures et la biomasse n'est plus détectable après 7 heures de culture (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Le renouvellement du milieu de culture du biofilm mature (4 heures) provoque une augmentation de la biomasse et un retard dans la dispersion du biofilm suggérant que la dispersion pourrait être due à l'appauvrissement du milieu de culture où l'accumulation d'une ou plusieurs molécules signales capables d'activer la dispersion du biofilm (Tremblay, Deslandes et al. 2013).

Les biofilms d'*A. pleuropneumoniae* ont également été évalués dans des tubes en verre, un autre modèle d'étude de biofilm dans des conditions statiques, mais incluant cette fois-ci des forces de cisaillement (Kaplan and Mulks 2005). Dans ce modèle, les biofilms prennent la forme d'un anneau à l'interface air-liquide (Kaplan and Mulks 2005).

Plusieurs autres modèles dits dynamiques plus représentatifs des conditions réelles auxquelles sont exposées les bactéries dans leur environnement naturel ont été développés pour l'étude des biofilms (Coenye and Nelis 2010). Le système «drip flow reactor» est un système à flux continu où les biofilms sont formés sur des lames de verre installées à l'intérieur de chambres hermétiquement fermées et continuellement irriguées de milieu frais (Goeres, Hamilton et al. 2009). Dans ce modèle, le biofilm se forme à l'interface solide-liquide en présence de faibles forces de cisaillement représentatives de l'environnement des poumons et de la cavité orale (Goeres, Hamilton et al. 2009, Schwartz, Stephenson et al. 2010). Dans ce modèle dynamique, *A. pleuropneumoniae* est capable d'établir un biofilm en présence du milieu BHI-NAD dilué à 50% et sous un flux de 200 mL par heure (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Après 24 heures de culture, le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* est visible à l'œil nu et représente une structure imposante évaluée à environ  $10^9$  à  $10^{10}$  unités formant de colonies par chambre (Tremblay, Deslandes et al. 2013). À l'inverse des modèles de microplaque de 96 puits très utilisés pour le



criblage à haut débit de la formation de biofilm, le « drip flow reactor » est idéal pour l'étude des composants de la matrice du biofilm tel que les exopolysaccharides (Schwartz, Stephenson et al. 2010).

Toujours dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions réelles rencontrées par les bactéries, Tremblay et collaborateurs, ont évalué la formation de biofilm de la souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 sur des cellules épithéliales de poumon de porc (Tremblay, Lévesque et al. 2013). Dans cette étude les auteurs ont utilisé une souche d'*A. pleuropneumoniae* non hémolytique MBHPP147, cette dernière a développé un biofilm robuste après 24 ou 48 heures (Tremblay, Lévesque et al. 2013). Plus récemment, le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* a été étudié sur un substrat poreux, un gel d'agarose 0.5% qui simule les surfaces des cavités alvéolaires. Deux souches cliniques d'*A. pleuropneumoniae* des sérotypes 5 et 7 développèrent des agrégats d'environ 20 à 30  $\mu\text{m}$  à l'intérieur des réseaux formés par l'agarose (Tremblay et al., 2016, non publié). Ces agrégats sont très semblables aux structures qu'ont développées ces deux souches cliniques *in vivo* au niveau des poumons infectés (Tremblay et al., 2016, non publié). Cette étude est la première à rapporter la croissance d'*A. pleuropneumoniae* en agrégats lors d'infection naturelle chez le porc (Tremblay et al., 2016, non publié).

## **2. Facteurs importants pour la production du biofilm d'*A. pleuropneumoniae***

La culture de biofilm d'*A. pleuropneumoniae* dépend de plusieurs paramètres tels que le milieu de culture, la durée d'incubation ou la surface d'attachement. Le milieu de culture ainsi que sa composition affectent en effet la formation de biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. Li et collaborateurs, démontraient que la souche de référence d'*A. pleuropneumoniae* 4074 sérotype 1

produisait un biofilm dans du milieu TSB (tryptic soy broth), mais seulement en absence de sérum (Li, Zhou et al. 2008). La présence de sérum semble inhiber la capacité de production de biofilm de la souche de référence par un mécanisme qui reste à décrire (Li, Zhou et al. 2008).

Plus récemment, Labrie et collaborateurs, démontrèrent que l'utilisation du milieu BHI (brain heart infusion) favorisait la formation de biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010). En effet, la croissance du biofilm de la souche de référence d'*A. pleuropneumoniae* 4074 est augmentée par l'utilisation du milieu BHI comparée à celle des biofilms formés dans du milieu TSB. Dans ces conditions, 54% des souches de sérotypes 1, 5, 7 et 15 démontraient un biofilm renforçant l'idée que l'utilisation du BHI serait adéquate pour l'étude *in vitro* des biofilms d'*A. pleuropneumoniae*. Fait étonnant, lors de cette étude, deux milieux BHI (BHI-A Vs BHI-B) de deux compagnies distinctes ont été utilisés, mais seulement le milieu BHI-B permettait la production du biofilm par *A. pleuropneumoniae*. L'étude de la composition de ces deux milieux a abouti à l'identification d'un élément important pour la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*. En effet, le milieu BHI-A ne permettant pas la production de biofilm contenait une concentration plus élevée de zinc comparé au milieu BHI-B. L'ajout de zinc au milieu BHI-B inhiba de façon dose-dépendante la production du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. Le zinc ne démontra aucun effet sur la croissance de la bactérie, mais sembla inhiber spécifiquement la production de biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010, Wu, Labrie et al. 2013). L'effet inhibiteur du zinc a également été observé contre les biofilms de pathogènes porcins tels qu'*E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* et *S. suis* (Wu, Labrie et al. 2013). L'inhibition du biofilm en présence du zinc pourrait être due à une possible interférence avec la production de l'exopolysaccharide PGA, élément très important dans la production du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010). En effet, il a été montré que le zinc pouvait inhiber l'activité de PgaB chez *E. coli* (Little, Poloczek et

al. 2012). Cependant, l'action du zinc sur la synthèse du PGA chez *A. pleuropneumoniae* reste à élucider.

Chez *A. pleuropneumoniae*, l'exopolysaccharide PGA est sous le contrôle de l'opéron *pgaABCD* (Figure 5) (Kaplan *et al.*, 2004, Izano *et al.*, 2007). Cet opéron semble être prévalent et conservé puisqu'il est retrouvé chez tous les sérotypes étudiés (Izano, Sadovskaya *et al.* 2007). Une analyse par PCR a permis de démontrer que le gène *pgaC* codant pour la biosynthèse du PGA était présent chez la totalité des souches de référence d'*A. pleuropneumoniae* étudiées (sérotypes 1 à 12) ainsi que dans le génome de 76 souches environnementales sur les 77 souches d'*A. pleuropneumoniae* étudiées (Izano, Sadovskaya *et al.* 2007). Le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* est dépendant de l'exopolysaccharide PGA (Izano, Sadovskaya *et al.* 2007). En effet, la mutation du gène *pgaC* chez les sérotypes 1 et 5 abolit la production du PGA et compromet la formation du biofilm (Izano, Sadovskaya *et al.* 2007, Bossé, Sinha *et al.* 2010). Les polymères de PGA peuvent être dégradés par la dispersine B, une enzyme produite par *A. pleuropneumoniae* (Izano, Sadovskaya *et al.* 2007). Le détachement du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* par la dispersine B a été observé sur différentes surfaces : abiotique (Izano, Sadovskaya *et al.* 2007, Grasteau, Tremblay *et al.* 2011) et biotique (Tremblay, Lévesque *et al.* 2013).

La production de PGA dépend également d'une protéine régulatrice de type histone H-NS (histone-like protein), cette dernière est capable de réprimer la production du biofilm (Dalai, Zhou *et al.* 2009). En effet, H-NS réprime spécifiquement l'expression de l'opéron *pgaABCD* en se liant à des séquences types en amont du gène *pgaA* (Bossé, Sinha *et al.* 2010). La mutation du gène *hns* chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 résulte en une forte augmentation de la formation de biofilm et une perte de la virulence (Dalai, Zhou *et al.* 2009).

Contrairement au H-NS, le facteur sigma alternatif RpoE (ou  $\sigma$ E) joue le rôle d'un activateur transcriptionnel de l'opéron *pgaABCD* (Bossé, Sinha et al. 2010). La mutation du gène codant pour le régulateur négatif de facteur  $\sigma$ E, RseA (regulator of sigma E), résulte en l'augmentation de l'expression des gènes codant pour le PGA et une forte production de biofilm (Bossé, Sinha et al. 2010). Le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* est également régulé par LuxS, une protéine impliquée dans la production des AI-2 chez plusieurs bactéries (Prouty, Schwesinger et al. 2002, Merritt, Qi et al. 2003, Ethapa, Leuzzi et al. 2013). L'inactivation de LuxS chez *A. pleuropneumoniae* a démontré une forte augmentation de la production du biofilm et une diminution de la virulence (Li, Zhou et al. 2008, Li, Xu et al. 2011). Cependant, cette augmentation de production de biofilm semble être indépendante de la production d'AI-2 puisqu'il a été montré récemment que l'ajout d'AI-2 au milieu de culture permettait l'augmentation de la production du biofilm autant chez la souche mutant *luxS* que chez la souche parentale d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (Li, Xu et al. 2011).

D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation du biofilm tels que la protéine régulatrice ArcA du système à deux composant ArcAB, qui une fois supprimée provoque un défaut au niveau de l'autoagrégation et la formation du biofilm (Buettner, Bendallah et al. 2008). La protéine AasP, une sérine protéase de type autotransporteur semble également jouer un rôle important dans l'adhésion et la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* puisque la mutation du gène codant pour cette protéine induit la perte du phénotype biofilm (Tegetmeyer, Fricke et al. 2009). ClpP, une protéase membre de la famille Clp (caseinolytic protease) joue aussi un rôle important dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 8. En effet, le mutant *clpP* a démontré un défaut de production de biofilm (Xie, Zhang et al. 2013).

Le rôle de deux adhésines autotransporteurs trimériques, Apa1 et Apa2, dans la formation du

biofilm a été aussi récemment mis en évidence dans l'autoaggrégation et la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Qin, Wang et al. 2016).

Dans le but d'identifier d'autres gènes d'*A. pleuropneumoniae* susceptibles d'être impliqués dans la formation du biofilm, une banque de mutants obtenus par mutagenèse insertionnelle à l'aide du mini transposon Tn-10 a été réalisée chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et 1200 mutants ont été criblés sur microplaques de 96 puits afin d'identifier de nouveaux gènes associés à la formation du biofilm (Grasteau, Tremblay et al. 2011). Au cours de cette étude, 16 gènes porteurs de mutation ont été identifiés comme affectant la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Grasteau, Tremblay et al. 2011). Parmi les gènes identifiés on retrouve le gène *hns* précédemment décrit comme important dans le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Dalai, Zhou et al. 2009, Bossé, Sinha et al. 2010). La mutation du gène *hns* mena à une augmentation du biofilm (Grasteau, Tremblay et al. 2011). L'inactivation du gène *galU* entraîna également une augmentation du biofilm (Grasteau, Tremblay et al. 2011). Le gène *galU* code pour l'UTP- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate uridylyltransférase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique du lipopolysaccharide chez *A. pleuropneumoniae* (Ramjeet, Cox et al. 2008).

D'autre part, les mutations des gènes *dus*, *potD2* et *rpmF* qui codent, respectivement, pour une dihydrouridine de l'ARNt, une protéine qui lie la polyamine/spermidine et une protéine ribosomale L32 furent associées à une diminution de la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Grasteau, Tremblay et al. 2011). Des homologues de ces gènes ont été associés au biofilm de *P. aeruginosa* et leurs mutations atténuèrent la production du biofilm (Musken et al., 2010).

La mutation des gènes *pyrF*, codant pour une orotidine-5-phosphate décarboxylase, *ptsI*, codant pour phosphotransférase et *ribA*, impliqué dans la synthèse de la riboflavine, provoquèrent une

diminution de la production du biofilm chez *A. pleuropneumoniae* (Grasteau, Tremblay et al. 2011). La voie de synthèse de la riboflavine semble être un élément important dans la formation du biofilm puisque l'expression de certains gènes de cette voie métabolique semble être modulée au cours de la formation du biofilm (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Dans cette même étude, Tremblay et al., ont comparé les transcriptomes des biofilms cultivés durant 4 heures et 6 heures représentant, respectivement, la phase mature du biofilm et la phase de dispersion (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Cette comparaison a démontré que le biofilm mature semble être un environnement riche en fer comparé au biofilm en phase de dispersion. En effet, plusieurs gènes important dans l'acquisition du fer incluant les gènes *tbpB* et *fur* sont réprimés dans le biofilm mature (Tremblay, Deslandes et al. 2013).

D'autre part et de manière intéressante, l'opéron *wecABD* et le gène *wzz* codant pour la biosynthèse de l'antigène O du lipopolysaccharide semble être induit dans les biofilms matures (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Cette observation vient renforcer l'idée que ce polysaccharide de surface jouerait un rôle dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. Plusieurs études ont, en effet, démontré l'importance des chaînes O dans la formation du biofilm chez plusieurs Gram-négatif tel que *Stenotrophomonas maltophilia* (Huang, Somers et al. 2006), *Xanthomonas citri* ssp.citri (Li and Wang 2011), *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* (Wang, Vinogradov et al. 2013) et *Xylella fastidiosa* (Clifford, Rapicavoli et al. 2013).

De plus, il a été montré que les bactéries du biofilm avaient un métabolisme énergétique moins actif comparé aux bactéries planctoniques (Tremblay, Deslandes et al. 2013). En effet, la majorité des gènes du métabolisme énergétique tel que les gènes codant pour les enzymes clés du métabolisme anaérobique semblent être réprimés dans le biofilm (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Cependant, il est intéressant de noter que l'expression de *cpxA*, gène codant pour le système de réponse au stress membranaire CpxRA, est induite chez les bactéries cultivées en

biofilm comparée aux bactéries planctoniques (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Chez *E. coli*, ce système est induit lors de la phase de maturation du biofilm (Otto and Silhavy 2002). Le système Cpx peut être activé, entre autres, par des pressions mécaniques (Vogt and Raivio 2012), pressions que peuvent rencontrer les bactéries à l'intérieur d'une structure de biofilm.

Les profils transcriptionnels d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 sous des conditions de croissance simulant l'environnement rencontré chez l'hôte ont été également étudiés à l'aide d'une biopuce à ADN (AppChip1) (Auger, Deslandes et al. 2009). Lors de cette étude, le contact direct d'*A. pleuropneumoniae* avec des cellules épithéliales provoqua une augmentation de l'expression de plusieurs gènes incluant les gènes des opérons *pgaABCD* et *tad*. Chez *A. actinomycetemcomitans*, les gènes *tadB* et *rcpA* de l'opéron *tad* sont responsables du phénotype rugueux des colonies et joue un rôle important dans l'adhésion (Tomich *et al.*, 2007).

### **3. Impact du biofilm sur *A. pleuropneumoniae***

Il est bien connu que le biofilm offre divers avantages aux bactéries (Jefferson 2004, Nadell, Drescher et al. 2015, Olsen 2015). Ce mode de croissance permet aux bactéries de résister à l'action des antibiotiques et de persister chez l'hôte (Annexe 2). Dans une étude récente, il a été démontré que le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* permettait aux bactéries de tolérer des CMI allant jusqu'à des doses de 100 à 30,000 fois plus élevées que celles nécessaires pour tuer les mêmes bactéries cultivées dans des conditions planctoniques (Archambault, Harel et al. 2012). Cette tolérance accrue aux antibiotiques a été observée avec plusieurs antibiotiques très souvent utilisés dans l'élevage porcin incluant l'ampicilline, le florfenicol, la tiamuline et la tilmicosine (Archambault, Harel et al. 2012). Cette tolérance aux antibiotiques est principalement due à la

séquestration des antibiotiques par les composants de matrice extracellulaire tel que le PGA, principale composant de la matrice extracellulaire du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. En effet, Izano *et al.*, ont montré qu'un prétraitement des biofilms à la dispersine B rendait les souches d'*A. pleuropneumoniae* plus sensibles à l'effet de l'ampicilline suggérant que le PGA pourrait limiter la diffusion de cet antibiotique (Izano, Sadovskaya et al. 2007).

D'autre part, le biofilm peut permettre aux bactéries de survivre dans des conditions hostiles ou non adéquates à leur croissance (Jefferson 2004). À titre d'exemple, *A. pleuropneumoniae* est considéré comme un parasite obligatoire du système respiratoire porcin et ne survit pas dans l'environnement. Cependant, une étude récente a démontré qu'*A. pleuropneumoniae* était capable de survivre et de persister dans l'environnement, grâce notamment à sa capacité à former des biofilms (Loera-Muro, Jacques et al. 2013). En effet, 20 % des échantillons isolés des abreuvoirs de fermes d'élevage porcin au Mexique se sont avérés positifs à *A. pleuropneumoniae* (Loera-Muro, Jacques et al. 2013). À l'aide de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence et en utilisant un marqueur fluorescent spécifique au PGA, les auteurs ont démontré que les souches d'*A. pleuropneumoniae* se retrouvent à l'intérieur d'une structure de biofilm.

Dans la nature, les biofilms sont généralement composés de plusieurs microorganismes, des biofilms mixtes dans lesquels des interactions de compétition et de mutualisme peuvent se mettre en place (Peters, Jabra-Rizk et al. 2012, Willems, Xu et al. 2016). Cependant, les interactions polymicrobiennes au sein des biofilms mixtes sont très peu étudiées malgré le fait que certaines études prometteuses démontrent que des échanges croisés de gènes de résistance peuvent intervenir entre espèces (Harriott and Noverr 2009, De Brucker, Tan et al. 2015).

Très récemment, il a été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* était capable de former des biofilms mixtes avec d'autres pathogènes porcins tels que *S. suis* (Loera-Muro, Loera-Muro et al. 2014,



Ramírez-Castillo, Loera-Muro et al. 2015). Même si aucune donnée ne démontre l'impact de ces biofilms mixtes sur la résistance et la tolérance aux antibiotiques, cette association apparaît toute même comme bénéfique pour *A. pleuropneumoniae* puisque ce dernier peut croître même en absence du facteur NAD, essentiel à sa croissance. En effet, au sein d'un biofilm mixte, *A. pleuropneumoniae* semble être capable d'obtenir le NAD ou d'autres pyridines importantes à sa croissance des autres bactéries (données non publiées).

D'autre part, le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* peut aussi être avantageux pour d'autres microorganismes. En effet, il a été démontré que certains virus pathogènes importants chez le porc tel que le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et le circovirus porcin de type 2 pouvaient persister pendant plusieurs jours à l'intérieur du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Jacques, Grenier et al. 2015).

## **PROBLÉMATIQUES, HYOTHÈSES ET OBJECTIFS**

Les problématiques de ce projet de recherche sont que (i) le rôle des polysaccharides de surface sur la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* n'est pas étudié, (ii) l'impact de doses sous-CMI de pénicilline G sur la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* n'a pas été décrit et (iii) l'implication du biofilm dans l'échappement d'*A. pleuropneumoniae* au système immunitaire n'a pas été démontré.

Les hypothèses ayant été émises lors de cette étude sont que (i) les polysaccharides de surface incluant le lipopolysaccharide, la capsule polysaccharide et l'exopolysaccharide PGA auraient un rôle à jouer dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*, (ii) les concentrations sous inhibitrices de pénicilline G affecteraient la production du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* et (iii) le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* perturberait la réponse immunitaire innée.

Les objectifs du présent projet sont :

1. Caractériser les biofilms formés par des mutants isogéniques affectés au niveau des polysaccharides de surface
2. Étudier l'effet de doses sous-inhibitrices d'antibiotiques sur la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*
3. Étudier le rôle du biofilm dans la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae*

## **MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**

Article 1

Publié le 19 octobre 2015 dans Infection and Immunity

Vol. 84 Issue 01, 127-137

**Surface polysaccharide mutants reveal that absence of O antigen reduces biofilm formation  
of *Actinobacillus pleuropneumoniae***

S. Hathroubi<sup>1</sup>, M.A. Hancock<sup>2</sup>, J.T. Bossé<sup>3</sup>, P.R. Langford<sup>3</sup>, Y.D.N Tremblay<sup>1</sup>,

J. Labrie<sup>1</sup> and M. Jacques<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Faculté de médecine vétérinaire,

Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

<sup>2</sup>McGill SPR-MS Facility, McGill University, Montréal, Québec, Canada H3A 2B4

<sup>3</sup>Section of Paediatrics, Imperial College London, St Mary's Campus, London, UK

Running title : *O-antigen role in biofilm formation of Actinobacillus pleuropneumoniae*

\*To whom correspondence should be addressed : Mario Jacques, Faculté de médecine vétérinaire,

Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

Tel.: 450-773-8521 (ext. 8348); Fax: 450-778-8108; E-mail: mario.jacques@umontreal.ca

**Keywords :** *A. pleuropneumoniae*, Biofilm, Surface polysaccharides, LPS, CPS, PGA, Drip flow reactor, Surface plasmon resonance

## **Implication de l'auteur dans cet article**

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué la majorité des expérimentations, j'ai analysé les résultats et j'ai écrit le manuscrit. La mutation du gène *pgaC* a été réalisée par J.T. Bossé et P.R. Langford du Imperial College London. Le SPR a été réalisée par M. A. Hancock de l'Université McGill.

## ABSTRACT

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium belonging to the *Pasteurellaceae* family and the causative agent of porcine pleuropneumonia, a highly contagious lung disease causing important economic losses. Surface polysaccharides, including lipopolysaccharides (LPS) and capsular polysaccharides (CPS), are implicated in the adhesion and virulence of *A. pleuropneumoniae*, but their role in biofilm formation is still unclear. In this study, we investigated the requirement for these surface polysaccharides in biofilm formation by *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Well-characterized mutants were used: an O-antigen LPS mutant, a truncated core LPS mutant with an intact O antigen, a capsule mutant, and a poly-*N*-acetylglucosamine (PGA) mutant. We compared the amount of biofilm produced by the parental strain and the isogenic mutants using static and dynamic systems. Compared to the findings for the biofilm of the parental or other strains, the biofilm of the O antigen and the PGA mutants was dramatically reduced, and it had less cell-associated PGA. Real-time PCR analyses revealed a significant reduction in the level of *pgaA*, *cpxR*, and *cpxA* mRNA in the biofilm cells of the O-antigen mutant compared to that in the biofilm cells of the parental strain. Specific binding between PGA and LPS was consistently detected by surface plasmon resonance, but the lack of O antigen did not abolish these interactions. In conclusion, the absence of the O antigen reduces the ability of *A. pleuropneumoniae* to form a biofilm, and this is associated with the reduced expression and production of PGA.

## INTRODUCTION

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium belonging to the *Pasteurellaceae* family and is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a disease causing important economic losses to the swine industry worldwide (1). Several virulence factors of *A. pleuropneumoniae* have been identified. These factors include the Apx toxins, iron uptake systems, and surface polysaccharides. These polysaccharides are divided into three categories: the lipopolysaccharides (LPS), the capsular polysaccharides (CPS), and the poly-*N*-acetyl-D-glucosamine polymer (PGA) present in the biofilm matrix (2,–4).

LPS are large biomolecules composed of three well-defined regions: (i) lipid A, anchored in the outer membrane; (ii) the core oligosaccharide; and (iii) the O antigen, a polysaccharide consisting of repeating units. Altman and coworkers described the structure of the *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O antigen to be branched tetrasaccharide repeating units composed of two L-rhamnopyranosyl residues, one D-glycopyranosyl residue, and one 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose residue (5). The LPS inner core oligosaccharide is relatively conserved among *A. pleuropneumoniae* serotype 1, 2, 5a, and 5b strains and is composed of 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid and heptose, whereas the outer core oligosaccharide is variable among serotypes and is generally made of a variable number of branching hexoses (6). The *A. pleuropneumoniae* LPS has been identified to be an adhesin, and the polysaccharide part of the LPS, but not the lipid A, is implicated in the adhesion to porcine respiratory tract cells and mucus (7, 8). Furthermore, an intact LPS core is essential for adhesion and virulence (9, 10).

Another major surface component of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 is the capsular polysaccharide, composed of a repeating disaccharide unit of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose and D-galactose (11). CPS is encoded by the *cpsABCD* and *cpxDCBA* genes, which also encode



an ABC transport system that is responsible for the export of the CPS (12) and is considered a crucial virulence factor of *A. pleuropneumoniae* (13, 14). A capsule mutant had enhanced adhesion to porcine epithelial cells (13, 15). Thus, it is thought that the CPS is not involved in adherence but, rather, appears to mask the adhesins required for attachment (13, 16).

Recent literature indicates the presence of a third category of surface polysaccharides in *A. pleuropneumoniae*, an exopolysaccharide (EPS) that covers and holds bacteria together and that is composed of PGA (17, 18). In *A. pleuropneumoniae*, this polymeric matrix has been shown to be involved in the formation of a robust biofilm in a very short period of time (4). Biofilms are sessile communities of microorganisms attached to a biotic or abiotic surface and enclosed in a self-produced extracellular polymer matrix (19, 20). These are more frequently associated with chronic diseases due particularly to an increased resistance to both conventional biocides and the host immune system (20,–22). In this context, we have shown that *A. pleuropneumoniae* biofilm cells are 100 to 30,000 times more tolerant to antimicrobials than their planktonic counterparts (23).

The position of surface polysaccharides at the bacterium/surface interface is crucial for adhesion (24) and, consequently, likely plays a key role in biofilm formation by facilitating attachment, microcolony formation, and/or subsequent maturation of the biofilm. Indeed, several genetic determinants of *A. pleuropneumoniae* have also been associated with biofilm formation in microtiter plates or drip-flow reactors, and genes associated with LPS, CPS, and PGA biosynthesis have been identified in transposon mutants and by transcriptomic analysis (25,–27). In this study, we investigated the role of surface polysaccharides in the biofilm formation of *A. pleuropneumoniae*. We specifically used well-characterized LPS, CPS, and PGA isogenic mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 (9, 13, 15, 25) and investigated the

influence of these structural mutations on functional biofilm formation under static conditions or low-shear-force conditions.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains and growth conditions.**

*A. pleuropneumoniae* strains were grown on brain heart infusion (BHI) agar or broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) supplemented with 15 µg/ml β-NAD (BHI-NAD) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. All bacterial strains used in the present study are listed in Table 1.

### **Microtiter plate biofilm assay.**

We used a microtiter plate biofilm assay as described previously (4). Briefly, the wells of a 96-well microtiter plate (Costar 3599; Corning, Corning, NY, USA) were filled in triplicate with a dilution (1/100) of an overnight bacterial culture. Following an incubation of 4 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, the culture medium was removed by aspiration and the plate was washed once by immersion in water. The wells were then filled with 100 µl of crystal violet (0.1%, wt/vol), and the plate was incubated for 2 min at room temperature. After removal of the crystal violet solution, the plate was washed and dried in a 37°C incubator for 30 min and 100 µl of ethanol (70% vol/vol) was added to the wells. The absorbance at 590 nm was measured using a spectrophotometer (PowerWave; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The surface attachment of bacteria to polystyrene after a short incubation time of 2 h was measured as described before (26). Images of the adherent bacteria were captured with a microscope (DMI 4000 B; Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, ON, Canada) using a DFC490 digital camera (Leica) and documented using the associated software (version 2.4.0). These images were analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA); the average

number of particles (bacterial cells) from three fields of view across two independent biological replicates is reported.

### **Drip-flow biofilm reactor.**

A drip-flow biofilm reactor (model DFR 110-4; BioSurface Technologies Corporation, Bozeman, MT, USA) was used to cultivate biofilms under a continuous low shear force on a glass slide as described before (27) with some modification; the flow rate was set to 50 ml/h per channel. After 24 h, the attached cells were scraped off the glass slide and resuspended in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation, the supernatant was discarded and pellets were dried using a DNA 120 Speed Vac apparatus (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada). When possible, the dry weight of the biofilms was measured and the dried biofilms were kept for further analyses.

### **CLSM.**

Biofilms were grown in the microtiter plate biofilm assay as described above and stained with wheat germ agglutinin (WGA)-Oregon Green 488 (Invitrogen, Eugene, OR, USA), BOBO-3 (Invitrogen), FilmTracer SYPRO Ruby biofilm matrix stain (Invitrogen), the stain from a FilmTracer LIVE/DEAD biofilm viability kit (Invitrogen), or FilmTracer FM1-43 stain (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. On the basis of the information provided by the manufacturer, WGA binds to *N*-acetyl-D-glucosamine and *N*-acetylneuraminic acid residues, BOBO-3 is a cell-impermeant extracellular DNA (eDNA) stain, and SYPRO Ruby stain labels most classes of proteins. FilmTracer FM1-43 is a green cell dye that stains bacterial membranes. The stained biofilms were visualized by confocal laser scanning microscopy (CLSM; FV1000 IX81; Olympus, Markham, ON, Canada), and images were acquired using FluoView software

(Olympus). Biomass analysis of the biofilms was carried using the z-stack images obtained from areas selected randomly. The biomass and average thickness of biofilms were determined using Image-Pro software (Media Cybernetics, MD, USA) as described before (27).

### **Enzymatic treatments.**

A biofilm dispersion assay was performed as described previously (28). Biofilms were grown in microtiter plates, and after the 4 h of incubation, 50  $\mu$ l of DNase I (500  $\mu$ g/ml in 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>), 50  $\mu$ l of dispersin B (100  $\mu$ g/ml in PBS; Kane Biotech Inc., Winnipeg, MB, Canada), or 50  $\mu$ l of proteinase K (500  $\mu$ g/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) was added to the wells. Control wells were treated with 50  $\mu$ l of the buffer without the enzyme. Wells treated with dispersin B were incubated for 5 min at 37°C, and those treated with proteinase K or DNase I were incubated for 1 h at 37°C. After the treatments, the biofilms were stained with crystal violet as described above.

### **Semiquantitative detection of PGA.**

*A. pleuropneumoniae* strains were grown either in 6-well plates (Costar 3516) or in the drip-flow reactor. Culture supernatants were collected, centrifuged to remove the bacteria, and used for immunodetection of PGA. Biofilms were scraped off, resuspended in PBS, centrifuged, and dried as described above in “Drip-flow biofilm reactor.” The dried biofilms were resuspended in water to a concentration of 10 mg/ml and were then treated with proteinase K (100  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37°C. The treated biofilm suspensions were serially diluted, and these 2-fold dilutions were transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) using a 96-well dot blot vacuum manifold system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membrane was air dried and then blocked with 5% (wt/vol) skim milk in Tris-buffered saline with Tween 20 (TTBS; 145 mM

NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, supplemented with 0.15% [vol/vol] Tween 20) for 1 h. The blocked membrane was incubated with a goat anti-PGA antibody (1:2,500; kindly supplied by G. Pier, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) in TTBS containing 5% (wt/vol) skim milk for 1 h, followed by three washes with TTBS. The membrane was then incubated with a rabbit anti-goat horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories West Grove, PA, USA) in TTBS containing 5% (wt/vol) skim milk for 30 min and then washed twice with TTBS. The membrane was developed with the substrate tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich). Water was added to wells as a negative control. The experiments were repeated three times.

#### **Extraction and analysis of eDNA in biofilm matrix.**

A 1/100 dilution of an overnight culture of *A. pleuropneumoniae* strains was incubated in 6-well plates (Costar 3516) for 4 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After this time, the medium was removed and the biofilms were washed, gently scraped from the surface, and resuspended in 1.5 ml of 0.9% NaCl. For each strain, the biofilms from five wells were pooled to represent one sample. The biofilms were resuspended and treated with 20 µg/ml of dispersin B to promote the release of eDNA. Cells were then separated from the supernatant containing the eDNA fraction by centrifugation at 14,000 × *g* for 2 min. The eDNA and intracellular DNA (iDNA) from the supernatant and cell pellet, respectively, were extracted using the phenol-chloroform method as described before (29, 30). The DNA concentration and purity were determined with a NanoDrop spectrophotometer, and the eDNA/iDNA ratio was calculated. eDNA and iDNA were also visualized on agarose (0.8%) gels.

### **qRT-PCR analysis.**

Parental and surface polysaccharide mutant strains were grown in 6-well plates (Costar 3516) for 4 h. Planktonic and biofilm cells were collected separately using ice-cold methanol to prevent changes in transcript levels. RNA extraction and a two-step quantitative real-time reverse transcriptase (RT) PCR (qRT-PCR) were performed as described elsewhere (27). The primers used to amplify the *pgaA*, *cpxR*, *cpxA*, *dspB*, and 16S rRNA genes are listed in Table 2. A Maxima SYBR green kit (Thermo Scientific Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) was used for SYBR green labeling analysis (16-place Cepheid smart cycler system). Triplicates of qRT-PCR mixtures (25  $\mu$ l) containing 0.75 ng of cDNA were prepared for each experiment. Relative expression was normalized using the 16S rRNA gene as the endogenous control, and the results were analyzed by a threshold cycle ( $\Delta\Delta C_7$ ) method to calculate the fold change in gene expression (31). The expression in each sample was measured in duplicate, and the experiment was repeated in its entirety three times.

### **LPS extraction.**

LPS of parental strain 4074NaI<sup>r</sup> and O-antigen mutant 44.1 were isolated from dried cell masses by the Darveau-Hancock method (32). Briefly, disrupted cells were treated with DNase, RNase, pronase, and sodium dodecyl sulfate (SDS). Treated cells were subjected to MgCl<sub>2</sub> precipitation and high-speed centrifugation. All samples were lyophilized, and the LPS purity was evaluated on SDS-polyacrylamide gels stained with silver (9).

### **Surface plasmon resonance (SPR).**

Binding between purified PGA (generously provided by Irina Sadovskaya, Université du Littoral-Côte d'Opale, Boulogne-sur-Mer, France) and LPS (both parental and O-antigen mutant

44.1 LPS) was examined using a Biacore 3000 system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). All lyophilized stocks were resuspended to 1 mg/ml in PBS. Experiments were performed on HPA sensor chips (Biacore) at 25°C using filtered (pore size, 0.2 µm) and degassed running buffers: HBS-N (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl) and/or PBS-E (1 mM EDTA in 10 mM sodium phosphate dibasic, 1.8 mM potassium phosphate monobasic, 137 mM NaCl, 2.7 mM potassium chloride; EDTA is believed to favor the smallest 1,000-kDa form of LPS, as noted in Sigma [St. Louis, MO, USA] product data sheet L-2630). All chemicals were reagent-grade quality, including protein-grade *n*-octyl-β-D-glucopyranoside (nOG; 10% [vol/vol] nOG stock; catalog number 0311; Affymetrix-Anatrace, IL, USA), fatty acid-free bovine serum albumin (BSA; a 10-mg/ml BSA stock prepared in water; catalog number A-8806; Sigma, St. Louis, MO, USA), and glucocerebrosides (a 2-mg/ml glucocerebroside stock prepared in chloroform-methanol [2:1] solution; catalog number 1322; Matreya Pleasant Gap, PA, USA). Immobilized surfaces were prepared via hydrophobic adsorption to HPA sensors as previously described (33). Briefly, the flow cells were prewashed (5 µl/min, 25 µl, 2 times) with nOG (10% stock, 1/9 dilution in water = ~40 mM). Active biomolecules (e.g., 1 mg/ml PGA in PBS) and reference biomolecules (e.g., 0.7 mg/ml glucocerebroside in 70% ethanol, 1 mg/ml BSA in buffer) were injected at 5 µl/min until surface densities of ~1,000 relative units (RU) were obtained. The surfaces were washed with NaOH (5 mM in buffer; 50 µl/min, 25 µl) before blocking with BSA (0.5 mg/ml in buffer; 50 µl/min, 250 µl). The surfaces were finally stabilized with NaCl (1 M in buffer; 50 µl/min, 25 µl, 3 times) before use. For the reversed analyte-ligand orientation, active surfaces (1 mg/ml parental LPS or O-antigen mutant LPS in PBS) and reference surfaces (e.g., 1 mg/ml PGA in PBS) were prepared in a fashion similar to that described above.

To screen for binding specificity, fixed concentrations of LPS (parental or O-antigen mutant), PGA, and/or BSA (negative control) were injected over the reference and active surfaces in tandem at 10 to 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  (e.g., 1 min association, 1 min dissociation; multicycle mode using HBS-N or PBS-E running buffer). Between sample injections, the surfaces were regenerated at 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  using two 30-s pulses of solution I (1 M imidazole, pH 9.5) and solution II (1 M guanidine, pH 2.0), followed by routine washing procedures (i.e., extraclean and wash options). To further examine the binding kinetics, parental/mutant LPS and PGA were titrated over the sensor surfaces at 10 to 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  (e.g., 1 min association, 1 to 5 min dissociation; single-cycle mode using HBS-N or PBS-E running buffer); between titrations, the surfaces were regenerated as noted above. The double-referenced data (34) presented are representative of those from duplicate injections acquired from three independent trials. Due to the inherent sample heterogeneity with both PGA and LPS (i.e., each is a mixture of species with highly variable molecular masses), the binding kinetics could not be fit to a 1:1 titration model in the BIAevaluation software.

### **Statistical analysis.**

Data were analyzed with GraphPad Prism (version 5.0) software (GraphPad Inc., San Diego, CA) using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple-comparison test. A *P* value of 0.05 or less was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **The absence of O antigen and PGA reduces biofilm formation.**

Biofilm formation by the parental strain and surface polysaccharide mutants was assessed using static and low-shear-force models. In a static 96-well microtiter plate assay, the biofilm formed



by the *pgaC* mutant was, as expected, barely detected when the amount of biofilm formed was compared to that formed by the parental strain (Fig. 1A). The amount of biofilm formed by O-antigen mutant 44.1 was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) compared to that formed by parental strain 4074Nal<sup>r</sup>, LPS core mutant CG3, and capsule mutant 33.2 (Fig. 1A). Our results indicate that the absence of either PGA or O antigen negatively impacts biofilm formation by *A. pleuropneumoniae*.

To further analyze the LPS, CPS, and PGA mutants, we examined biofilm formation in the drip-flow reactor, a continuous-flow model with an air-liquid interface and low shear force considered to be more representative of the lung environment (35). While the O-antigen mutant barely formed detectable thin biofilms, parental strain 4074Nal<sup>r</sup>, LPS core mutant CG3, and capsule mutant 33.2 formed similar amounts of thick, rough biofilms (Fig. 1B). The *pgaC* mutant was unable to form a biofilm in this system. These results cross-validate the finding that the absence of the O antigen or PGA reduces the ability of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 to form a mature biofilm, whereas truncation of the core oligosaccharide with an intact O antigen or the absence of the capsule polysaccharide does not affect biofilm formation under static (i.e., 96-well microtiter plate assay) and low-shear-force (i.e., drip-flow reactor) conditions.

**The absence of O antigen and PGA does not affect the initial attachment of *A. pleuropneumoniae* to an abiotic surface.**

Given that the initial attachment of bacteria to a surface is a critical step for biofilm formation, we examined the attachment of *A. pleuropneumoniae* to the plastic surface of 96-well plates (see Fig. S1 in the supplemental material). Image analysis showed that the overall number of attached cells for both O-antigen mutant 44.1 (see Fig. S1B in the supplemental material) and LPS core

mutant CG3 (see Fig. S1C in the supplemental material) appeared to be similar to that for the parental strain (see Fig. S1A in the supplemental material). The *pgaC* mutant (see Fig. S1E in the supplemental material) had fewer cells; however, this difference was not significant ( $P > 0.05$ ). In contrast, more attached cells were detected for capsule mutant 33.2 (see Fig. S1D in the supplemental material). It is unlikely that the initial rate of *A. pleuropneumoniae* attachment accounts for the inability of both the O-antigen and PGA mutants to form a biofilm.

### **Biofilm morphology and composition.**

The biofilm architecture was visualized by CLSM using a WGA fluorescent probe specifically targeted to PGA, the major component of the biofilm matrix of *A. pleuropneumoniae*. While O-antigen mutant 44.1 formed only small, patchy microcolonies after 4 h of incubation in microtiter plates (Fig. 2B), LPS core mutant CG3 (Fig. 2C) and capsule mutant 33.2 (Fig. 2D) formed biofilms similar to those formed by the parental strain (Fig. 2A). As quantified from the confocal images, the biofilm biomass of O-antigen mutant 44.1 was significantly reduced (i.e., under  $0.1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) compared to the biofilm biomasses of the parental strain, LPS core mutant CG3, and capsule mutant 33.2 (i.e.,  $4.50 \pm 0.84$ ,  $5.26 \pm 1.1$ , and  $4.44 \pm 0.89 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ , respectively). Since the *pgaC* mutant is deficient in PGA production, the staining with WGA, which recognizes *N*-acetyl-D-glucosamine and *N*-acetylneuraminic acid residues, was negative (data not shown). Therefore, we used FilmTracer FM1-43, a fluorescent probe that targets bacterial membranes, to visualize the biofilm of the *pgaC* mutant. As observed by CLSM, the biofilm of the *pgaC* mutant was characterized by isolated clusters (Fig. 3). Similarly to the O-antigen mutant, the *pgaC* mutant was deficient in biofilm formation. Therefore, the CLSM data were consistent with the biofilm results obtained from the microtiter plate (crystal violet staining) and drip-flow (dry weight measurement) assays. In addition to PGA, the biofilm of the *A.*

*pleuropneumoniae* parental strain was also stained with cell-impermeant dyes to determine the overall matrix composition. Significant amounts of eDNA (stained with BOBO-3) and proteins (stained with SYPRO Ruby) were detected within the parental biofilm (data not shown).

To further examine the contribution of PGA, proteins, and eDNA to the matrix architecture, preformed biofilms were treated with dispersin B, proteinase K, and DNase I. Dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase that degrades PGA, was able to significantly disperse the preformed biofilms ( $P < 0.05$ ) of the parental strain, the LPS core mutant, and the capsule mutant (Fig. 4). Given that the O-antigen and *pgaC* mutants produced biofilms in amounts barely above the limit of detection of the assay, dispersal of their biofilms by enzymatic digestion was difficult to detect and, thus, not observable (data not shown). Indicative of the fact that eDNA and proteins do not play a major role in the architecture of static *A. pleuropneumoniae* biofilms, digestions with proteinase K, a broad-spectrum serine protease, and DNase I, a site-specific nuclease, were not able to disperse the mature biofilms. The small amount of eDNA in the biofilm matrices (range, 26 to 45 ng/ $\mu$ l; approximately 1/10 of the intracellular DNA content, based upon our equalized parental, CG3, and 33.2 strain biofilm extractions) suggests that eDNA does not contribute to the architecture of *A. pleuropneumoniae* biofilms.

### **Specific binding between PGA and LPS.**

Label-free, real-time SPR was utilized to test if PGA specifically interacts with LPS. With PGA (net positive charge at pH 7) immobilized to HPA sensor surfaces (Fig. 5A), fixed concentrations of LPS from the parental strain and O-antigen mutant 44.1 (both with a net negative charge in HBS-N running buffer) generated significant binding responses. In contrast, there was little or no signal change when BSA, a negatively charged protein at pH 7 (36), was injected as a nonbinding

control. Moreover, glucocerebrosides (net neutral charge) were chosen as the corresponding reference surfaces in the assays whose results are shown in Fig. 5A to ensure that there was minimal nonspecific binding of parental/mutant LPS to the sensors in the absence of PGA. Due to the inherent heterogeneity of the parental/mutant LPS and PGA samples tested (i.e., they form aggregates of various sizes), the observed binding profiles deviated from simple 1:1 kinetics, as anticipated (e.g., see the heterogeneous O-antigen binding profile in Fig. 5A). Regardless, fixed concentrations of PGA (in PBS-E running buffer) once again generated significant binding responses against LPS from both the parental strain and O-antigen mutant 44.1 when the analyte-ligand orientation was reversed (Fig. 5B). Using the optimized assay orientation (i.e., for the ease of regeneration of sensor surfaces when LPS was injected over immobilized PGA), additional kinetic titrations (Fig. 5C) demonstrated that the binding of both the parental strain and O-antigen mutant LPS to PGA was dose dependent. Although equimolar concentrations of parental and mutant 44.1 LPS were anticipated to yield similar SPR signal changes (i.e., similar molecular masses) when interacting with PGA, differences in their intrinsic properties (e.g., exposed binding interfaces) likely account for fluctuations in the absolute binding responses (e.g., see Fig. 5A and 5C, which show a larger signal shift with mutant 44.1 LPS, and Fig. 5B, which shows a larger signal shift with the parental strain LPS). While the inherent heterogeneity of both PGA and LPS (i.e., each is a mixture of species with highly variable molecular masses) did not allow us to assess overall binding affinities, specific dose-dependent binding between PGA and LPS was consistently detected using multiple assay orientations, running buffers, and reference surfaces. A lack of interaction between LPS and PGA does not account for the inability of O-antigen mutant 44.1 to form mature biofilms.

### **The O-antigen mutant produces less PGA.**

Biofilms grown under both static and drip-flow conditions were collected, their amounts were normalized according to dry weight, and the relative amounts of associated PGA were semiquantified by immunoblotting. In both cases, biofilms of O-antigen mutant 44.1 had less PGA associated with the biofilm cells, whereas similar amounts of PGA were found to be associated with the biofilm cells for parental strain 4074Nal<sup>f</sup>, LPS core mutant CG3, and capsule mutant 33.2 (Fig. 6). Under static conditions, the amount of PGA in the biofilm supernatant was also measured to verify that the PGA produced was not released into the growth medium. As with the biofilm/cell-associated PGA results, less PGA was also detected in the O-antigen mutant supernatant (see Fig. S2 in the supplemental material). Taken together, our data indicate that O-antigen mutant 44.1 produced less PGA than the parental strain. It should be noted that the barely detectable biofilm formed by the *pgaC* mutant did not allow us to perform immunoblotting with this mutant.

### **Analysis of *pgaA*, *cpxR*, *cpxA*, and *dspB* expression by real-time RT-PCR.**

To verify the effect of the LPS and CPS biosynthetic gene mutations on PGA production, the expression of *pgaA* (one of the genes in the *pgaABCD* operon encoding PGA production) was measured in mature biofilms. The expression of *pgaA* was downregulated ( $P < 0.05$ ) in O-antigen mutant 44.1 (Fig. 7A), whereas expression in core oligosaccharide mutant CG3 and acapsular mutant 33.2 was not significantly different from that in parental strain 4074Nal<sup>f</sup>. Given that *cpxR* and *cpxA* (37,-39) are differentially regulated in *A. pleuropneumoniae* biofilms (27), their expression was also measured. Both genes were downregulated ( $P < 0.05$ ) in O-antigen mutant 44.1, whereas no significant differences in expression were observed for LPS core

oligosaccharide mutant CG3 and acapsular mutant 33.2 (Fig. 7B). The expression of *dspB*, coding for the dispersin B enzyme, was also measured. No difference in expression of the *dspB* gene was detected between O-antigen mutant 44.1 and the parental strain (data not shown). Once again, it should be noted that the barely detectable biofilm formed by the *pgaC* mutant did not allow us to perform qRT-PCR with this mutant.

## DISCUSSION

Surface polysaccharides, including LPS, CPS, and PGA, have been linked to biofilm formation in several bacterial species (17, 25, 40,–51); thus, investigation of their unassessed role in the biofilm formation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was the focus of our present study. LPS and CPS have been implicated in both the adhesion and virulence of *A. pleuropneumoniae*, but their role in biofilm formation is still unclear. For example, LPS and CPS can affect the adhesion of *A. pleuropneumoniae* to epithelial cells and mucus (9, 13,15). Furthermore, as previously demonstrated by our laboratory, the core oligosaccharide of LPS is required for its adherence to porcine respiratory tract cells (9). To our knowledge, this is the first report that an O-antigen mutant of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 is severely defective in biofilm formation in both static and low-shear-force models (Fig. 1). Confocal microscopy with PGA-specific staining confirmed that the O-antigen mutant biofilms were patchy, small microcolonies, whereas parental strain biofilms were dense and thick (Fig. 2). These findings indicate that a lack of the O antigen significantly impairs the biofilm formation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1. At the same time, the adherence of O-antigen mutant 44.1 to an abiotic surface was not affected (see Fig. S1 in the supplemental material), and on the basis of our previous work, the absence of the O chains does not affect the overall surface hydrophobicity or charge of O-antigen mutant 44.1 (15). Overall, the defective biofilm formation that we observed with the O-antigen mutant of *A.*

*pleuropneumoniae* serotype 1 is likely due to its inability to progress from microcolonies into a mature biofilm. Our findings are consistent with those for other bacterial species where a loss of O antigen has profound effects. For example, the biofilm formation and EPS accumulation of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* were affected by the loss of O antigen (40). Li and Wang observed that mutations in the *wxacO* and *rfbC* genes (involved in the biosynthesis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* O-antigen LPS) impaired biofilm formation on plastic surfaces and host plant leaves (41). The formation of *Stenotrophomonas maltophilia* biofilms requires an intact LPS, and a mutation in O-antigen biosynthesis affects EPS production and biofilm formation (42). Clifford and coworkers showed that the O antigen of *Xylella fastidiosa* is needed for biofilm maturation and surface attachment (50). It was recently demonstrated that mutations in the *waaWVL* operon, encoding LPS biosynthesis genes, lead to a shorter LPS species and a decreased ability of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82 to form biofilms (51). On the other hand, Ciornei and coworkers have demonstrated that the ability of *Pseudomonas aeruginosa* to form a mature biofilm is dependent on a shorter form of LPS or a complete loss of O antigen (52). Additionally, Coulon and coworkers found that the extracellular matrix of *P. aeruginosa* biofilms contains significant amounts of O-antigen polysaccharides (53).

The *pgaC* mutant, which lacks an integral membrane glycoside transferase enzyme (PgaC) catalyzing the polymerization of PGA from UDP-GlcNAc monomers, was also deficient in biofilm formation, like the O-antigen mutant. The biofilms produced by the *pgaC* and O-antigen mutants were barely detectable *in vitro* and were characterized by few dispatched colonies attached to the surface; however, adherence to an abiotic surface was not affected for either mutant. Izano et al. previously showed that an *A. pleuropneumoniae* serotype 5 *pgaC* mutant was

deficient in EPS, and this mutant failed to form a biofilm *in vitro* (54). Our results indicate that both PGA and O antigen are important for biofilm production by *A. pleuropneumoniae* serotype 1.

While other groups have shown that the LPS core oligosaccharide is essential for biofilm formation by *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *S. maltophilia* (42,–44), our LPS core mutant, strain CG3, was still able to produce biofilms similarly to the parental *A. pleuropneumoniae* strain (Fig. 1). Other groups have also shown that capsule expression can affect the biofilm formation of pathogens such as *Vibrio vulnificus* (45) and *Porphyromonas gingivalis* (46). For example, capsule synthesis genes (*wza* and *wzc* for *K. pneumoniae* and *kpsM* for *E. coli*) were recently shown to negatively affect biofilm formation (47, 48). In contrast, our acapsular mutant, strain 33.2, produced a biofilm similar to that formed by the parental *A. pleuropneumoniae* strain, even though the former exhibited enhanced adherence. These results are consistent with those of a previous study demonstrating that acapsular mutant 33.2 adheres significantly more to piglet tracheal frozen sections than the parental strain (13) and also with those of a study by Karwacki and coworkers, who showed that biofilms of an acapsular *A. pleuropneumoniae* serotype 5 mutant were not affected on 96-well polystyrene microtiter plates compared to the wild-type strain (49).

As the importance of surface polysaccharide in biofilm formation continues to be recognized in the literature, our data and the studies noted above reinforce the potential role of O antigen and PGA, but not the core oligosaccharide and the capsule, in the biofilm formation and maturation of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strains. Treatment with dispersin B completely dispersed preformed biofilms, thereby confirming that PGA is a key scaffolding component of the matrix (4, 26). Within the biofilms of *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, eDNA is required for the attachment, aggregation, and stabilization of microcolonies, and DNase treatment removes the



biofilms (55, 56). While we detected eDNA within the biofilm matrix of our parental and mutant *A. pleuropneumoniae* strains, DNase I treatment did not disperse the preformed biofilms. Since proteinase K treatment also did not lead to a dispersion of the biofilms, our data indicate that PGA, eDNA, and proteins are all part of the matrix, but only PGA is critical for biofilm formation by *A. pleuropneumoniae* serotype 1.

It has been shown that LPS mediates interactions with EPS. For example, binding has been observed between LPS and PGA from *E. coli* (43) and between LPS and cellulose, an EPS in the biofilm of *Pseudomonas fluorescens* (57). Amini and coworkers showed that modified *E. coli* LPS (which has less negatively charged phosphate groups) decreases its interaction with the positively charged exopolysaccharide PGA (43). The findings by Amini et al. highlight the importance of electrostatic interactions between LPS and EPS for biofilm development, strength, and integrity (43).

While significantly less is known about interactions between surface polysaccharides in *A. pleuropneumoniae*, the findings of the studies with *P. fluorescens* and *E. coli* prompted us to hypothesize that PGA may interact directly with LPS in *A. pleuropneumoniae*. Using SPR, multiple assay designs (i.e., assays with different coupling orientations, running buffers, and reference surfaces) consistently detected specific binding between the two surface polysaccharides (Fig. 5). In comparison to other LPS studies in the SPR literature, our assays were performed using a stringent flow rate (i.e., 25  $\mu$ l/min, like that used by Bahl et al. [58]) and avoided the use of complicating carrier proteins, such as BSA, in the running buffer (59). Like the high-affinity interaction reported by Bahl et al. (58) that mapped specific LPS-binding hot spots on hemoglobin, the slow dissociation kinetics that we observed suggest that the PGA-LPS interaction is not weak (e.g., there was no immediate return of the SPR signal to the baseline at 70

to 120 s in Fig. 5A and andB).B). These results indicate that the SPR binding detected between LPS and PGA is specific (i.e., it does not result from random electrostatic or hydrophobic interactions or the use of a low, nonstringent flow rate of 5  $\mu$ l/min). Therefore, our current study provides the first direct evidence of a specific binding between PGA and LPS in *A. pleuropneumoniae* serotype 1.

Our subsequent evaluation of PGA production by immunoblotting demonstrated that O-antigen mutant 44.1 had less cell-associated PGA than the parental strain, core mutant CG3, or capsule mutant 33.2 (Fig. 6). Complementary qRT-PCR analyses also revealed a downregulation of the *pgaA* gene in O-antigen mutant 44.1 (Fig. 7), thereby corroborating the defect in PGA production observed by immunoblotting. This defect likely accounts for the inability of the O-antigen mutant to form robust biofilms. It is important to note that the O-antigen mutant that we used in this study, mutant 44.1, has a transposon insertion in the *rfbN* gene which encodes a rhamnosyl transferase involved in the assembly of the O chain (15). Recently, a mutant with a rhamnosyl transferase (*wxocB*) mutation, which resulted in a complete loss of the O chain in *X. oryzae* pv. *Oryzicola*, produced significantly less EPS (40).

Considering the critical position of LPS at cell-cell and cell-surface interfaces, we investigated the putative effect of the O-antigen truncation on the two-component regulatory system CpxRA. It is well established that CpxRA senses envelope stress, such as overproduction or misfolding of membrane molecules (37), and the Cpx system controls genes involved in biofilm formation by *E. coli* strains (38, 39). In several Gram-negative bacteria, the Cpx envelope stress response is activated by pH, osmolarity, alterations in inner membrane composition, and surface adhesion (37). Indeed, Otto and Silhavy showed that the *E. coli* Cpx system is highly induced in mature biofilms (60). Using a *cpxR* mutant, Beloin and coworkers demonstrated that *E. coli* K-12 was

unable to produce mature biofilms, with only dispatched microcolonies being observed by confocal microscopy (39). In addition, previous transcriptomic analyses from our group have demonstrated the differential regulation of *cpxR* or *cpxA* when *A. pleuropneumoniae* grew as biofilms (27). In the present study, we now show that *cpxA* and *cpxR* expression in O-antigen mutant 44.1 is significantly downregulated compared to their levels of expression in LPS core mutant CG3, capsule mutant 33.2, or the parental strain (Fig. 7). Therefore, it is conceivable that the absence of O antigen results in the downregulation of *cpxRA*. With the knowledge that both the regulators  $\sigma^E$  (a positive regulator) and H-NS (a negative regulator) independently regulate the expression of the *pga* operon (25), further investigations will be required to determine how the Cpx system in *A. pleuropneumoniae* directly or indirectly affects the *pgaABCD* operon.

In conclusion, our current study provides important new insights about surface polysaccharides in *A. pleuropneumoniae*. While truncation of the LPS core oligosaccharide or the absence of CPS did not have any effect, the absence of PGA or O antigen markedly reduced the ability of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strains to form a mature biofilm. This finding was linked for the O-antigen mutant to a reduced level of *pgaA* expression and, consequently, a reduced level of PGA production. Moreover, we have successfully demonstrated for the first time a direct binding interaction between LPS and PGA in *A. pleuropneumoniae* serotype 1, and this may represent a new strategy to prevent biofilm formation. However, our study demonstrated that the absence of the LPS O antigen did not abolish this binding interaction and the defect in *A. pleuropneumoniae* biofilm formation was associated with the reduced expression and production of PGA. Interestingly, the O-antigen mutant also exhibited reduced *cpxRA* expression; the link between the CpxRA system and biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* warrants further investigation.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Irina Sadovskaya and G. Pier for kindly providing PGA and anti-PGA antibodies, respectively. We declare that we have no conflicts of interest with the contents of this article.

S.H., Y.D.N.T., and M.J. designed the study. S.H., Y.D.N.T., M.A.H., and M.J. wrote the manuscript. S.H. performed the biofilm assays, CLSM analysis, qRT-PCR, and immunodetection of PGA. Y.D.N.T. optimized the PGA immunodetection and early adhesion assays. J.L. helped with the biofilm and the adhesion assays. M.A.H. carried out the SPR experiments. P.R.L. and J.T.B. designed and created the *pgaC* mutant. All authors analyzed the results and approved the final version of the manuscript.

## **FUNDING STATEMENT**

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) 0003428 to M.J. UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council BB/G018553/1 to P.R.L. The Canada Foundation for Innovation provided funding to the McGill Surface Plasmon Resonance-Mass Spectrometry Facility. The Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) provided a scholarship to S.H.

## **FOOTNOTES**

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00912-15>

## REFERENCES

1. Gottschalk M. 2012. Actinobacillosis, p 653–669. *In* Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, Zimmerman J. (ed), Diseases of swine, 10th ed John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ
2. Jacques M. 2004. Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* 68:81–85
3. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microb Infect* 4:225–235. doi:10.1016/S1286-4579(01)01534-9
4. Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V, Ramjeet M, Auger E, Nash JH, Jacques M. 2010. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res* 41:3. doi:10.1051/vetres/2009051
5. Altman E, Brisson JR, Perry MB. 1986. Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem Cell Biol* 64:1317–1325. doi:10.1139/o86-173
6. Michael FS, Brisson JR, Larocque S, Monteiro M, Li J, Jacques M, Perry MB, Cox AD. 2004. Structural analysis of the lipopolysaccharide derived core oligosaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5a and the genome strain 5b. *Carbohydr Res* 339:1973–1984. doi:10.1016/j.carres.2004.04.019
7. Paradis SE, Dubreuil D, Rioux S, Gottschalk M, Jacques M. 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* 62:3311–3319

8. Belanger M, Rioux S, Foiry B, Jacques M. 1992. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 76:119–125
9. Rioux S, Galarneau C, Harel J, Frey J, Nicolet J, Kobisch M, Dubreuil JD, Jacques M. 1999. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can J Microbiol* 45:1017–1026. doi:10.1139/w99-107
10. Ramjeet M, Deslandes V, St Michael F, Cox AD, Kobisch M, Gottschalk M, Jacques M. 2005. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Biol Chem* 280:39104–39114. doi:10.1074/jbc.M502852200
11. Altman E, Brisson JR, Perry MB. 1986. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem Cell Biol* 64:707–716. doi:10.1139/o86-097
12. Ward CK, Inzana TJ. 1997. Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Infect Immun* 65:2491–2496
13. Rioux S, Galarneau C, Harel J, Kobisch M, Frey J, Gottschalk M, Jacques M. 2000. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb Pathog* 28:279–289. doi:10.1006/mpat.1999.0347
14. Bandara AB, Lawrence ML, Veit HP, Inzana TJ. 2003. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect Immun* 71:3320–3328. doi:10.1128/IAI.71.6.3320-3328.2003

15. Labrie J, Rioux S, Wade MM, Champlin FR, Holman SC, Wilson WW, Savoye C, Kobisch M, Sirois M, Galarneau C, Jacques M. 2002. Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants. *J Endotoxin Res* 8:27–38. doi:10.1179/096805102125000065
16. Van Overbeke I, Chiers K, Charlier G, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2002. Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Vet Microbiol* 88:59–74. doi:10.1016/S0378-1135(02)00080-9
17. Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK, Ramasubbu N. 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 186:8213–8220. doi:10.1128/JB.186.24.8213-8220.2004
18. Wang X, Preston JF III, Romeo T. 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* 186:2724–2734. doi:10.1128/JB.186.9.2724-2734.2004
19. Costerton JW. 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11:217–221. doi:10.1016/S0924-8579(99)00018-7
20. Jacques M, Aragon V, Tremblay YD. 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 11:97–121. doi:10.1017/S1466252310000149
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
22. Gardner A, Percival L, Cochrane C. 2011. Biofilms and role to infection and disease in veterinary medicine, p 111–128. *In* Percival L, Knottenbelt D, Cochrane C. (ed). *Biofilms and veterinary medicine*. Springer, Berlin, Germany.

23. Archambault M, Harel J, Goure J, Tremblay YD, Jacques M. 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Drug Resist* 18:198–206. doi:10.1089/mdr.2011.0150
24. Jacques M. 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol* 4:408–409. doi:10.1016/0966-842X(96)10054-8
25. Bossé JT, Sinha S, Li MS, O'Dwyer CA, Nash JH, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR. 2010. Regulation of *pga* operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by  $\sigma^E$  and H-NS. *J Bacteriol* 192:2414–2423. doi:10.1128/JB.01513-09
26. Grasteau A, Tremblay YD, Labrie J, Jacques M. 2011. Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 153:134–143. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.029
27. Tremblay YD, Deslandes V, Jacques M. 2013. *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes expression in biofilms cultured under static conditions and in a drip-flow apparatus. *BMC Genomics* 14:364. doi:10.1186/1471-2164-14-364
28. Tremblay YD, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M. 2013. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci* 96:234–246. doi:10.3168/jds.2012-5795
29. Shields RC, Mokhtar N, Ford M, Hall MJ, Burgess JG, Elbadawey MR, Jakubovics NS. 2013. Efficacy of a marine bacterial nuclease against biofilm forming microorganisms isolated from chronic rhinosinusitis. *PLoS One* 8:e55339. doi:10.1371/journal.pone.0055339
30. Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE. 2012. Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS One* 7:e51241. doi:10.1371/journal.pone.0051241



31. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
32. Darveau RP, Hancock RE. 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J Bacteriol* 155:831–838
33. Taillon C, Hancock MA, Mourez M, Dubreuil JD. 2012. Biochemical and biological characterization of *Escherichia coli* STb His12 to Asn variant. *Toxicon* 59:300–305. doi:10.1016/j.toxicon.2011.11.015
34. Myszka DG. 1999. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12:279–284. doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199909/10)12:5<279::AID-JMR473>3.0.CO;2-3
35. Goeres DM, Hamilton MA, Beck NA, Buckingham-Meyer K, Hilyard JD, Loetterle LR, Lorenz LA, Walker DK, Stewart PS. 2009. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat Protoc* 4:783–788. doi:10.1038/nprot.2009.59
36. Barbosa LR, Ortore MG, Spinozzi F, Mariani P, Bernstorff S, Itri R. 2010. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study. *Biophys J* 98:147–157. doi:10.1016/j.bpj.2009.09.056
37. Vogt S, Raivio T. 2012. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol Lett* 326:2–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02406.x
38. Price NL, Raivio TL. 2009. Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *J Bacteriol* 191:1798–1815. doi:10.1128/JB.00798-08

39. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, Haagensen JA, Molin S, Prensier G, Arbeille B, Ghigo JM. 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 51:659–674
40. Wang L, Vinogradov EV, Bogdanove AJ. 2013. Requirement of the lipopolysaccharide O-chain biosynthesis gene *wxocB* for type III secretion and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*. *J Bacteriol* 195:1959–1969. doi:10.1128/JB.02299-12
41. Li J, Wang N. 2011. The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Mol Plant Pathol* 12:381–396. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00681.x
42. Huang TP, Somers EB, Wong AC. 2006. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* 188:3116–3120. doi:10.1128/JB.188.8.3116-3120.2006
43. Amini S, Goodarzi H, Tavazoie S. 2009. Genetic dissection of an exogenously induced biofilm in laboratory and clinical isolates of *E. coli*. *PLoS Pathog* 5:e1000432. doi:10.1371/journal.ppat.1000432
44. Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagensen JA, Forestier C. 2008. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ Microbiol* 10:685–701. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01491.x
45. Joseph LA, Wright AC. 2004. Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* 186:889–893. doi:10.1128/JB.186.3.889-893.2004

46. Davey ME, Duncan MJ. 2006. Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 188:5510–5523. doi:10.1128/JB.01685-05
47. Ong CL, Ulett GC, Mabbett AN, Beatson SA, Webb RI, Monaghan W, Nimmo GR, Looke DF, McEwan AG, Schembri MA. 2008. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J Bacteriol* 190:1054–1063. doi:10.1128/JB.01523-07
48. Wu MC, Lin TL, Hsieh PF, Yang HC, Wang JT. 2011. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS One* 6:e23500. doi:10.1371/journal.pone.0023500
49. Karwacki MT, Kadouri DE, Bendaoud M, Izano EA, Sampathkumar V, Inzana TJ, Kaplan JB. 2013. Antibiofilm activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 capsular polysaccharide. *PLoS One* 8:e63844. doi:10.1371/journal.pone.0063844
50. Clifford JC, Rapicavoli JN, Roper MC. 2013. A rhamnose-rich O-antigen mediates adhesion, virulence and host colonization for the xylem-limited phytopathogen, *Xylella fastidiosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 26:676–685. doi:10.1094/MPMI-12-12-0283-R
51. Chassaing B, Garénaux E, Carriere J, Rolhion N, Guérardel Y, Barnich N, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A. 2015. Analysis of the  $\sigma^E$  regulon in Crohn's disease-associated *Escherichia coli* revealed involvement of the *waaWVL* operon in biofilm formation. *J Bacteriol* 197:1451–1465. doi:10.1128/JB.02499-14
52. Ciornei CD, Novikov A, Beloin C, Fitting C, Caroff M, Ghigo JM, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. 2010. Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun* 16:288–301. doi:10.1177/1753425909341807

- 53.** Coulon C, Vinogradov E, Filloux A, Sadovskaya I. 2010. Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS One* 5:e14220. doi:10.1371/journal.pone.0014220
- 54.** Izano EA, Sadovskaya I, Vinogradov E, Mulks MH, Velliyagounder K, Ragunath C, Kher WB, Ramasubbu N, Jabbouri S, Perry MB, Kaplan JB. 2007. Poly-*N*-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* 43:1–9. doi:10.1016/j.micpath.2007.02.004
- 55.** Lewenza S. 2013. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 4:21. doi:10.3389/fmicb.2013.00021
- 56.** Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. 2008. Differential roles of poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:470–476. doi:10.1128/AEM.02073-07
- 57.** Spiers AJ, Rainey PB. 2005. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. *Microbiology* 151:2829–2839. doi:10.1099/mic.0.27984-0
- 58.** Bahl N, Du R, Winarsih I, Ho B, Tucker-Kellogg L, Tidor B, Ding JL. 2011. Delineation of lipopolysaccharide (LPS)-binding sites on hemoglobin: from *in silico* predictions to biophysical characterization. *J Biol Chem* 286:37793–37803. doi:10.1074/jbc.M111.245472
- 59.** Clark RW, Cunningham D, Cong Y, Subashi TA, Tkalcovic GT, Lloyd DB, Boyd JG, Chrnyk BA, Karam GA, Qiu X, Wang IK, Francone OL. 2010. Assessment of cholesteryl ester transfer protein inhibitors for interaction with proteins involved in the immune response to infection. *J Lipid Res* 51:967–974. doi:10.1194/jlr.M002295

- 60.** Otto K, Silhavy TJ. 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2287–2292.  
doi:.10.1073/pnas.042521699

**Table 1.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains used in the present study.

Strains	Relevant traits	Affected gene	Putative gene function	Reference
<b>4074Nal<sup>r</sup></b>	Serotype 1 (Nal <sup>r</sup> ) <sup>a</sup> , parent strain			(15)
<b>44.1<sup>b</sup></b>	LPS O-antigen mutant	<i>rfbN</i>	rhamnosyltransferase	(15)
<b>CG3<sup>b</sup></b>	LPS core oligosaccharide mutant; still expressing a complete O-antigen	<i>lbgB</i>	D-glycero-D-manno- heptosyl transferase	(9)
<b>33.2<sup>b</sup></b>	Acapsular mutant	<i>cpxC</i>	capsule polysaccharide export inner-membrane protein	(13)
<b><i>ΔpgaC<sup>c</sup></i></b>	Exopolysaccharide PGA mutant	<i>pgaC</i>	Integral membrane glycoside transferase enzyme	(25)

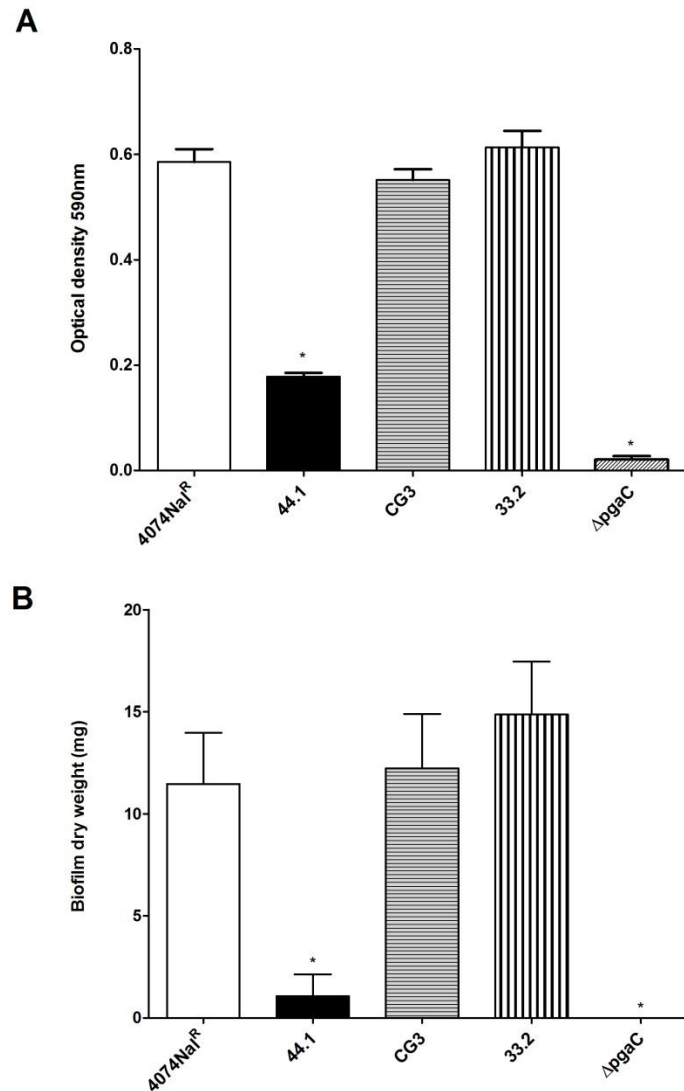
<sup>a</sup> Nalidixic acid-resistant, Nal<sup>r</sup>

<sup>b</sup> Derived from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 4074Nal<sup>r</sup>

<sup>c</sup> Derived from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 4074

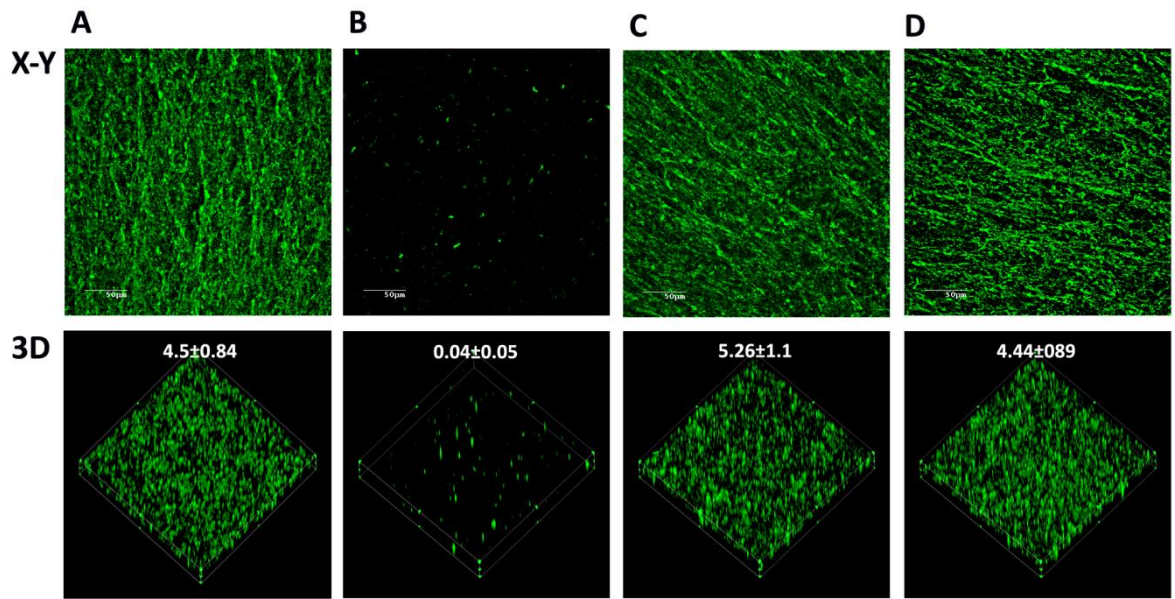
**Table 2.** Primers used for quantitative real-time RT-PCR.

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>Fragment size (bp)</b>
<b>16SrRNA_Fw</b>	GGAATAACTGGGCGTAAAGG	200
<b>16SrRNA_Dw</b>	GCTCAGTACATTCCCAAGG	
<i>pgaA_Fw</i>	GATAAAGCAAGCCAGTTCTTAGGT	215
<i>pgaA_Dw</i>	GCTGTTTGATGAGAAATACCGA	
<i>cpxR_Fw</i>	TTGATGTTAAGCGCCAGAGA	185
<i>cpxR_Dw</i>	CCGGAGACTGGTTGGAATAA	
<i>cpxA_Fw</i>	CGGATATTTTCGCATGAACTG	187
<i>cpxA_Dw</i>	GCGGGTCAAATGCTGATTG	
<i>dspB_Fw</i>	CATTCAAGCCGGCATTTC	216
<i>dspB_Dw</i>	TTGAGCGTCACCGTCGTA	

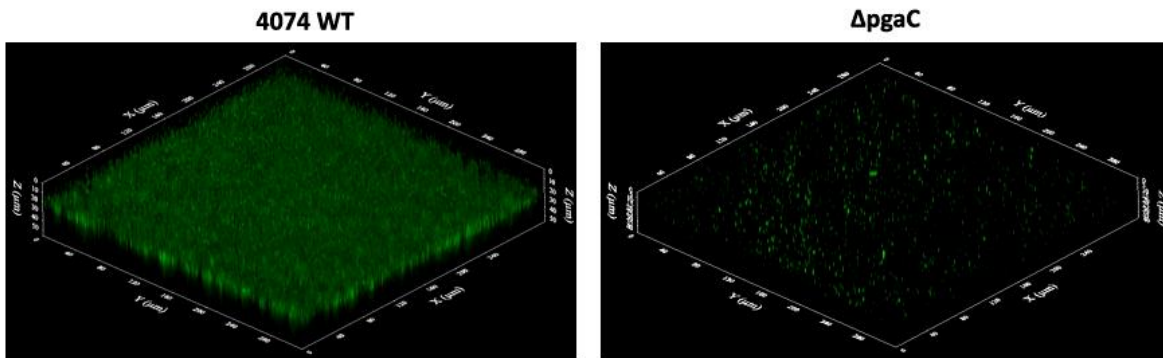


**Figure 1.** (A) Optical density of biofilm formation in 96-well microtiter plates by the *A. pleuropneumoniae* parental strain 4074NaI<sup>F</sup>, O-antigen mutant 44.1, LPS-core mutant CG3, capsule mutant 33.2 and *pgaC* mutant. (B) Dry weight of 24h biofilms (average weight (in milligrams)  $\pm$  SD from 3 independent experiments) formed on a glass slide in the drip flow reactor system by the *A. pleuropneumoniae* parental strain 4074NaI<sup>F</sup> ( $11.6 \pm 2.5$  mg), the O-antigen mutant 44.1 (for which biofilm formation was barely detectable), the LPS-core mutant CG3 ( $12.2 \pm 4.6$  mg), the capsule mutant 33.2 ( $14.9 \pm 4.5$  mg) and *pgaC* mutant (for which biofilm was not detected). Statistical analysis was performed using ANOVA, \* $P < 0.05$  compared to parental strain 4074 NaI<sup>F</sup>.

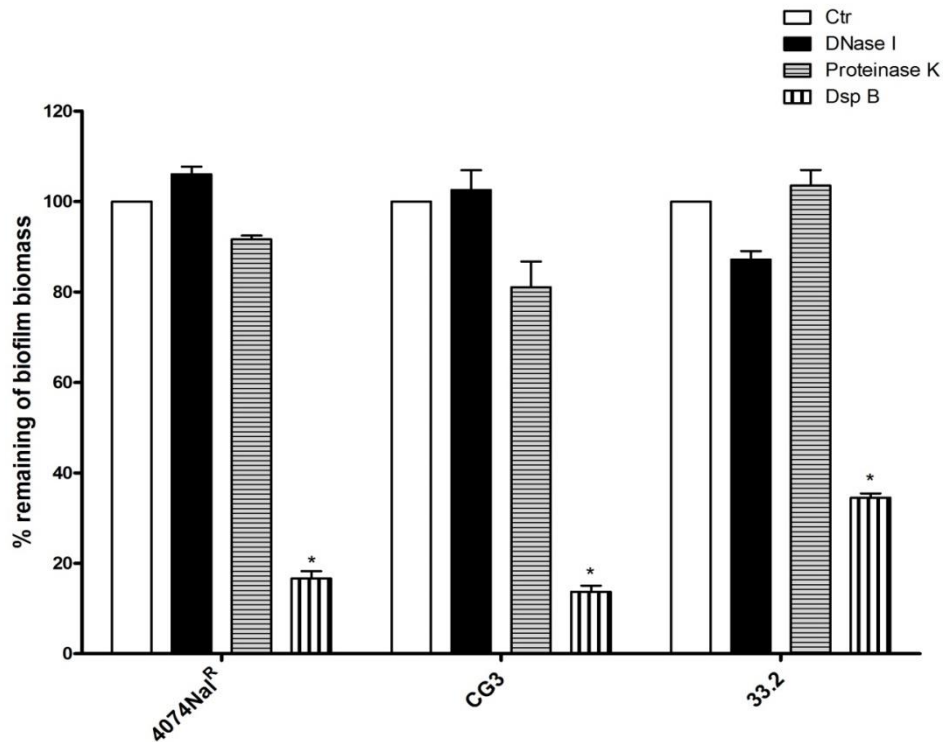




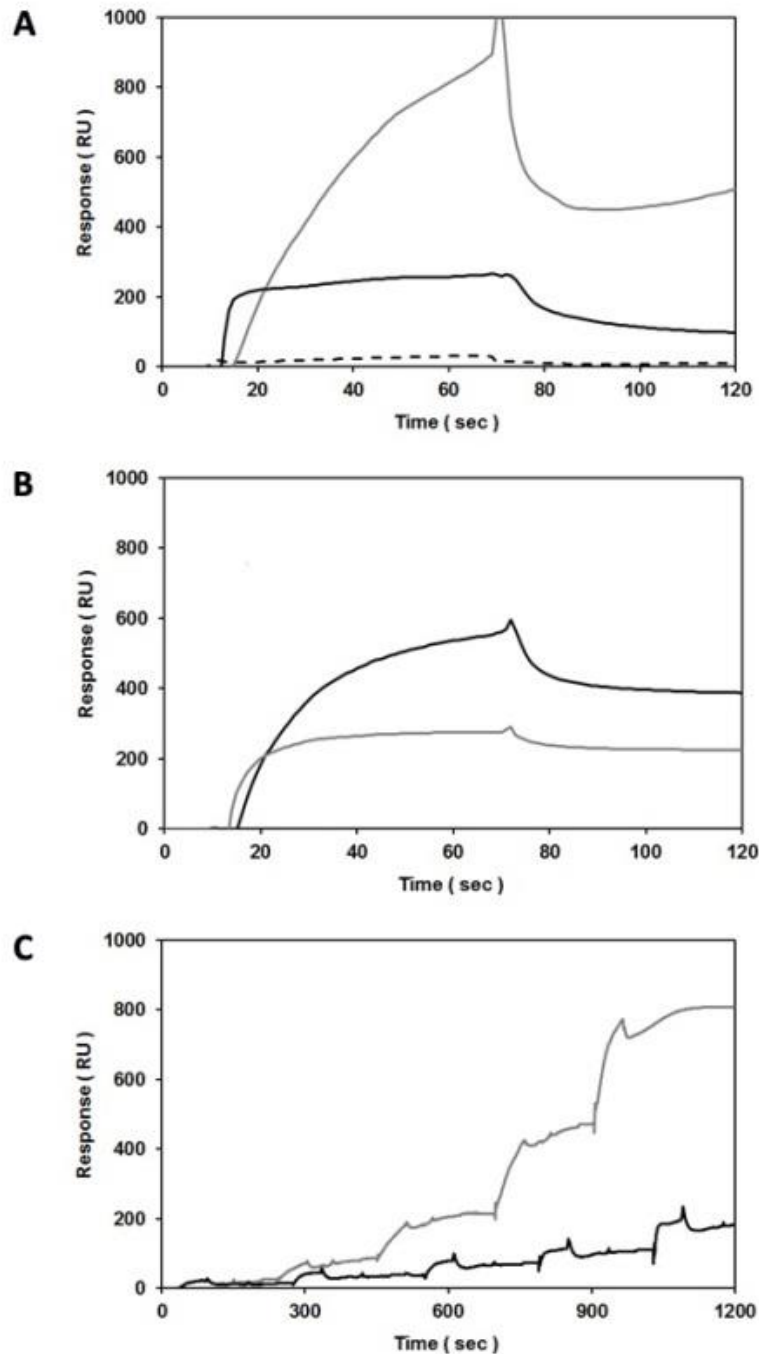
**Figure 2.** CLSM images of biofilms formed in 96-well microtiter plates by the *A. pleuropneumoniae* parental strain 4074Nal<sup>r</sup> (A), the O-antigen mutant 44.1 (B), the LPS-core mutant CG3 (C), and the capsule mutant 33.2 (D) stained with WGA-Oregon Green 488. (Top) x-y planes of the biofilms; (bottom) three-dimensional (3D) images. The numerical values represent the biomass (in cubic micrometers per square micrometer) of each biofilm.



**Figure 3.** CLSM images of biofilms formed in 96-well microtiter plates by the *A. pleuropneumoniae* parental strain 4074 and the *pgaC* mutant stained FilmTracer™ FM®1-43, a fluorescent probe that stains bacterial membranes. The three-dimensional images were obtained by using the FluoView software.

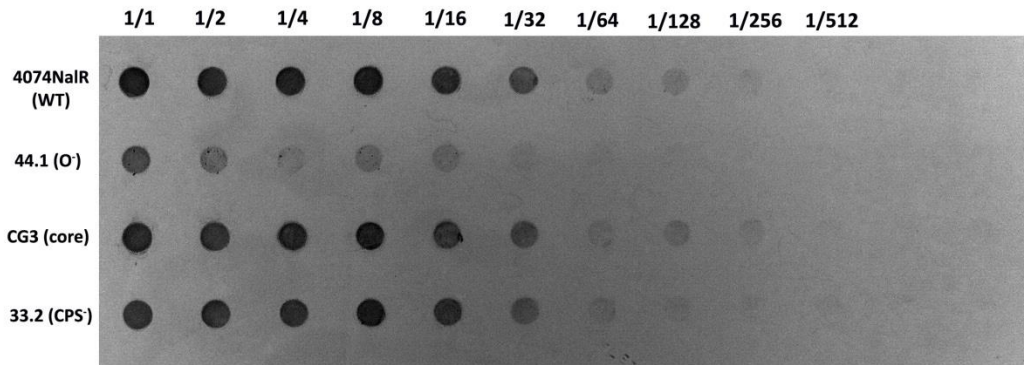


**Figure 4.** Dispersion of biofilms formed in 96-well microtiter plates by *A. pleuropneumoniae* parental strain 4074NaI<sup>r</sup>, the LPS-core mutant CG3, and the capsule mutant 33.2 by DNase I, proteinase K, and dispersin B (DspB). The means  $\pm$  SD of 3 independent experiments are shown. Statistical analysis was performed using ANOVA. \* $P < 0.05$  when compared to the control (Ctr).

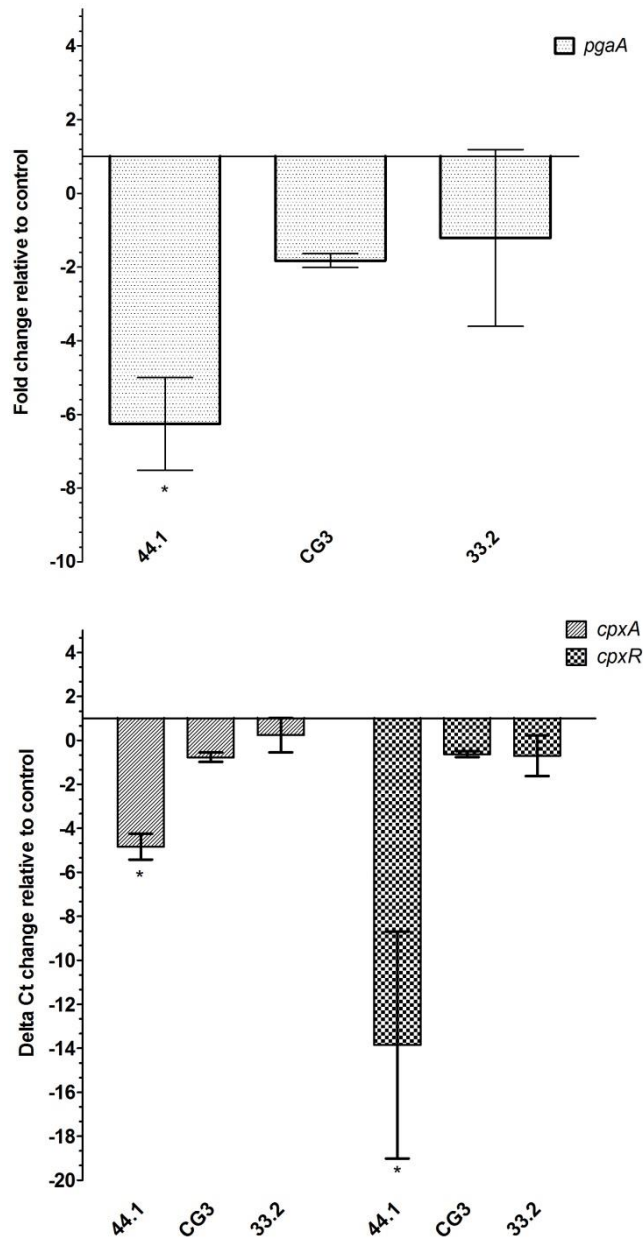


**Figure 5.** Specific, dose-dependent binding between PGA and parental strain LPS or LPS from O-antigen mutant 44.1, as assessed by SPR using HPA sensors. (A) screening of BSA (dashed line, 0.1 mg/mL = 1  $\mu$ M; 66 kDa), parental LPS (black line, 1 mg/mL; 1  $\mu$ M if MW = 1000 kDa), and LPS mutant 44.1 (grey line, 1 mg/mL; 1  $\mu$ M if MW = 1000 kDa) binding to immobilized PGA (1400 RU; in-line reference subtraction = 1400 RU glucocerebrosides) at 25

$\mu\text{L}/\text{min}$  in HBS running buffer; (B) screening of solution-phase PGA (1 mg/mL) binding to immobilized parental strain LPS and LPS of mutant 44.1 (1000 RU each, black and grey lines, respectively; in-line reference subtraction = 1000 RU immobilized PGA) at 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  in PBS running buffer; (C) single-cycle titrations of parental strain LPS and mutant 44.1 LPS (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL; black and grey lines, respectively) binding to immobilized PGA (1000 RU; in-line reference subtraction = 1000 RU BSA) at 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  in PBS running buffer.



**Figure 6.** Detection of PGA in the biofilm matrix isolated from the parental strain 4074NaI<sup>r</sup> and mutant strains cultured in a drip flow reactor for 24 h. Starting wells (1/1) contained 75μg and then were serially diluted (1/2 to 1/512).



**Figure 7.** Relative expression of *pgaA* (A), *cpxA* and *cpxR* (B) of the O-antigen mutant 44.1, the LPS-core mutant CG3, and the capsule mutant 33.2 compared to the parental strain 4074NaI<sup>r</sup>. The means  $\pm$  SD from 3 independent experiments are shown. Statistical analysis were performed using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  values and all results with (\*) were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

## Article 2

Publié le 30 septembre 2015 dans Veterinary Microbiology

Vol. 179, Issue 3-4, 277-286

### **Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae***

S. Hathroubi, S-È. Fontaine-Gosselin, Y.D.N. Tremblay, J. Labrie and M. Jacques \*

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc,

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,

C. P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

\* Corresponding author: Mario Jacques, Ph.D.

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,

3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

Tel.: (450) 773-8521 ext. 8348; Fax (450) 778-8108

E-mail: [mario.jacques@umontreal.ca](mailto:mario.jacques@umontreal.ca)



## Highlights

- Penicillin G is used in porcine production
- Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm of *A. pleuropneumoniae*
- Changes in the biofilm matrix components were observed after exposure to sub-inhibitory concentrations of penicillin G
- Sub-inhibitory concentrations of penicillin G appear to induce a cell envelope stress sensed by the CpxRA system

## **Implication de l'auteur dans cet article**

En tant que premier auteur de cet article, j'ai supervisé l'étudiante S-È. Fontaine-Gosselin et effectué avec elle la majorité des expérimentations, j'ai analysé les résultats et j'ai écrit le manuscrit.

## **Abstract**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium and causative agent of porcine pleuropneumonia. This is a highly contagious disease that causes important economic losses to the swine industry worldwide. Penicillins are extensively used in swine production and these antibiotics are associated with high systemic clearance and low oral bioavailability. This may expose *A. pleuropneumoniae* to sub-inhibitory concentrations of penicillin G when the antibiotic is administered orally. Our goal was to evaluate the effect of sub-minimum inhibitory concentration (MIC) of penicillin G on the biofilm formation of *A. pleuropneumoniae*. Biofilm production of 13 field isolates from serotypes 1, 5a, 7 and 15 was tested in the presence of sub-MIC of penicillin G using a polystyrene microtiter plate assay. Using microscopy techniques and enzymatic digestion, biofilm architecture and composition were also characterized after exposure to sub-MIC of penicillin G. Sub-MIC of penicillin G significantly induced biofilm formation of nine isolates. The penicillin G-induced biofilms contained more poly-N-acetyl-D-glucosamine (PGA), extracellular DNA and proteins when compared to control biofilms grown without penicillin G. Additionally, penicillin G-induced biofilms were sensitive to DNase which was not observed with the untreated controls. Furthermore, sub-MIC of penicillin G up-regulated the expression of *pgaA*, which encodes a protein involved in PGA synthesis, and the genes encoding the envelope-stress sensing two-component regulatory system CpxRA. In conclusion, sub-MICs of penicillin G significantly induce biofilm formation and this is likely the result of a cell envelope stress sensed by the CpxRA system resulting in an increased production of PGA and other matrix components.

**Keywords :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Biofilm; Penicillin G; eDNA; Poly-N-acetyl-D-glucosamine (PGA); CpxRA

## 1. Introduction

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium belonging to the *Pasteurellaceae* family. It is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a highly contagious disease that causes important economic losses to the swine industry worldwide (Zimmerman et al., 2012). Vaccines currently available only provide a partial protection (Ramjeet et al., 2008) and antibiotics still represent the most effective measures for controlling *A. pleuropneumoniae* outbreaks. Antibiotic therapy is used at the onset of symptoms to prevent mortality and the spread of the infection. Commonly used agents for infection control include tiamulin, chlortetracycline, ceftiofur, tilmicosin, florfenicol, enrofloxacin and penicillin (Archambault et al., 2012). Despite an increase in the number of penicillin G resistant isolates reported in the last decade in Canada, the United States, and Europe (Archambault et al., 2012; Gutierrez-Martin et al., 2006; Salmon et al., 2003; Vanni et al., 2012), penicillin is recommended as the first-choice antibiotic by guideline of prudent use of antimicrobials in animals (Guardabassi et al., 2008; CVMA, 2008). It is well known that  $\beta$ -lactamases represent the main mechanism of bacterial resistance to penicillin G but a number of reports demonstrate that biofilms also contribute to  $\beta$ -lactam resistance (Archambault et al., 2012; Ciofu and Høiby, 2008; Hengzhuang et al., 2013; Olson et al., 2002). Biofilms are sessile communities of microorganisms enclosed within a matrix of extracellular polymeric substances and attached to biotic or abiotic surfaces (Costerton, 1999a; Jacques et al., 2010). Biofilms are frequently associated with chronic diseases in humans (Costerton et al., 1999b) and in animals (Clutterbuck et al., 2007; Gardner et al., 2011; Jacques et al., 2010), and protect bacteria by decreasing their susceptibility to conventional biocides and the host immune system (Gardner et al., 2011). We have recently shown that *A. pleuropneumoniae* is able to

produce a dense biofilm on abiotic and biotic surfaces (Labrie et al., 2010; Tremblay et al., 2013a; Tremblay et al., 2013c). The biofilm matrix of *A. pleuropneumoniae* is mainly composed of an extracellular polymer of N-acetyl-D-glucosamine (PGA) (Kaplan et al., 2004).

Numerous studies have shown that sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MIC) of some antibiotics can affect growth, morphology, surface properties, pathogenicity and biofilm formation (Andersson and Hughes, 2014; Davies et al., 2006; Fonseca and Sousa, 2007; Gomes et al., 2013; Kaplan, 2011; Wu et al., 2014). Specifically, antibiotics at sub-MIC may induce bacterial biofilm. Among the  $\beta$ -lactam family, ampicillin, imipenem, nafcillin, and oxacillin increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* (Ahmed et al., 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (Bagge et al., 2004), *Acinetobacter baumannii* (Nucleo et al., 2009), *Staphylococcus lugdunensis* (Frank et al., 2007) and *Staphylococcus aureus* (Mirani and Jamil, 2011), respectively. Mechanisms associated with antibiotic-induced biofilm formation are dependent on the nature of the antibiotic and the bacterial species. Recent studies have shown that sub-MIC of ampicillin induced biofilm formation by *S. intermedius* via the autoinducer-2/LuxS signalling pathway (Ahmed et al., 2009). On the other hand, exposing *P. aeruginosa* to sub-MIC of imipenem resulted in the up-regulation of genes involved in alginate biosynthesis (Bagge et al., 2004). Recently, Gomes et al. (2013) demonstrated that sub-MIC of penicillin induced bacterial filamentation, cell-surface hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* and increased biofilm formation. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effect of sub-MIC of penicillin G on the biofilm formation by field isolates of *A. pleuropneumoniae*.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Bacterial strains and growth conditions**

*A. pleuropneumoniae* field isolates were grown on Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) agar or in BHI broth supplemented with 15 ug/mL  $\beta$ -NAD (BHI-NAD) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The bacterial strains and the antibiotic minimum inhibitory concentration (MIC) for each strain used in the present study are listed in Table 1. The bacterial isolates selected were susceptible to penicillin G (Archambault et al., 2012) and classified as weak or moderate biofilm producers as previously determined in our laboratory (Labrie et al., 2010). The growth (OD<sub>600nm</sub>) of isolates in the presence of 1/2 MIC of penicillin G was monitored and compared to a control without antibiotics.

### **2.2 Biofilms assay**

A microtiter plate biofilm assay was used as described previously (Labrie et al., 2010). Briefly, wells of a 96-well microtiter plate (Costar 3599, Corning, NY, USA) were filled in triplicate with a dilution (1/100) of an overnight culture. Penicillin G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added as sub-MIC (1/2, 1/4 and 1/8 MIC) to the appropriate wells. A culture without antibiotic was included as a control. After 24 h incubation at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, the culture medium was removed by aspiration and the plate was washed once by immersing in water. The biofilms were stained with 100  $\mu$ l of crystal violet (0.1% w/v) for 2 min at room temperature, washed with distilled water then dried at 37°C for 30 min. The stain was then released by adding 100  $\mu$ L of ethanol (70% v/v) to each well. Absorbance was measured at 590 nm using a spectrophotometer (Powerwave, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). For the autoaggregation assay, biofilms

were also done in glass tube using a dilution (1/100) of an overnight culture in 5 ml of BHI-NAD and incubated 24 h 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.3 Reduction of resazurin**

Viability of cells in biofilms formed in the absence or presence of penicillin G was evaluated using the CellTiter-Blue® Reagent (CTB, Promega Corporation, Madison, MI, USA). Briefly, the CTB reagent contains resazurin, a molecule converted to resorufin, a fluorescent end product, by living cells. Nonviable cells do not convert resazurin to resorufin and, thus, do not generate fluorescence. Biofilms were prepared in 96-well microtiter plate as described above. After the 24 h incubation period, 20 µl of CTB reagent was added directly to the growth medium and fluorescence was measured every 30 min for up to 4 h ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 560nm and  $\lambda_{\text{em}}$  : 590 nm) using a Synergy™ HT multi-detection microplate reader (BioTek Instruments).

### **2.4 Confocal laser scanning microscopy**

Biofilms of isolates S1\_7430, S5a\_508 and S7\_3060 were prepared as described above and stained with Wheat Germ Agglutinin (WGA)–Oregon Green 488 (Invitrogen, Eugene, OR, USA), FilmTracer™ FM®1-43 (Invitrogen), BOBO™-3 Iodide (Invitrogen), FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (Invitrogen) or the FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. WGA will bind specifically to N-acetyl-D-glucosamine and N-acetylneuraminic acid residues, FM®1-43 will stain membranes of bacteria, BOBO-3 is a cell-impermeable DNA stain and will stain extracellular DNA and SYPRO Ruby labels most classes of proteins. Stained biofilms were visualized by confocal laser scanning microscopy (CLSM; FV1000 IX81; Olympus, Markham, ON, Canada) and images were acquired using the Fluoview software (Olympus).

## **2.5 Biomass analysis of the biofilms**

Biomass analysis of the biofilms was carried using z-stack images obtained by CLSM from randomly-selected areas. The biomass and average thickness of biofilms were determined using Image Pro (Media Cybernetics, MD, USA) as described before (Tremblay et al., 2013a).

## **2.6 Enzymatic treatments**

A biofilm dispersion assay was performed on isolates S1\_7430, S5a\_508 and S7\_3060 as described previously (Tremblay et al., 2013b). Biofilms were grown with or without penicillin G in microtiter plates as described above, and after the 24 h incubation period, 50  $\mu$ L of dispersin B (100  $\mu$ g/mL in PBS; Kane Biotech Inc., Winnipeg, MB, Canada), 50  $\mu$ L of DNase I (500  $\mu$ g/mL in 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich) or 50  $\mu$ L of proteinase K (500  $\mu$ g/mL in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich) was added directly to the biofilms. Control wells were treated with 50  $\mu$ L of the buffer without enzyme. Wells treated with dispersin B were incubated for 5 min at 37°C, and those treated with proteinase K or DNase I were incubated for 1 h at 37°C. After the treatments, the biofilms were stained with crystal violet as described above.

## **2.7 Quantitative real-time reverse-transcriptase (RT)-PCR analysis**

Isolates were grown in 6-well plates (Costar® 3516, Corning, NY, USA) with or without penicillin G for 24 h. Biofilm cells were collected using PBS + 10% v/v stop solution (95% EtOH et 5% buffer-saturated phenol) to prevent changes in transcript levels. RNA extraction and two-step quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) were performed as described before (Tremblay et al., 2013a). The primers used to amplify *pgaA*, *cpxA*, *cpxR* and 16SrRNA are listed in Table 2. The synthesized cDNA was diluted with 80  $\mu$ l of water and used as template for real-



time PCR reactions using the Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green kit (Thermo Scientific Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) and experiments were performed in a 16-place Cepheid Smart Cycler<sup>®</sup> System (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). Each reactions (25  $\mu$ l) contained Maxima SYBR Green PCR Master mix, forward and reverse primer (300 nM each), cDNA and nuclease free water. Relative expression was normalized using the 16SrRNA gene as the endogenous control (Mitra et al., 2013, Al Safadi et al., 2012), and the results were analyzed by a threshold cycle ( $\Delta\Delta Ct$ ) to calculate fold change in gene expression (Livak and Schmittgen, 2001). Each sample was measured in duplicate, and expression data was collected from three biological replicates.

## **2.9 Statistical analysis**

Data were analyzed with GraphPad Prism, version 5.0, software (GraphPad Inc., San Diego, CA) using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's multiple comparison test. A *P*-value of 0.05 or less was considered to be statistically significant. Statistical analyses for qPCR were done using the  $\Delta Ct$  values.

### 3. Results

#### 3.1 Effect of sub-inhibitory concentrations of penicillin G on biofilm formation

The MIC for penicillin G of the selected field isolates ranged from 0.25 to 1 µg/ml (Table 1). We tested in this study the effect of sub-MICs of penicillin G on biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* isolates known to exhibit weak to moderate biofilm phenotypes (Labrie et al., 2010) (Table 1). Biofilm formation was significantly induced by sub-MICs of penicillin G in 69% (9/13) of the isolates (Fig. 1). The effect was not serotype specific because the affected isolates belong to every serotype tested (i.e. 1, 5a, 7 and 15).

The increase in biofilm formation was dose-dependent and 1/2 MIC of penicillin G had the strongest effect on biofilm formation. No differences in biofilm formation were observed for the 1/4 and 1/8 MIC when compared to the untreated controls with the exception of isolates S5a\_996 and S5a\_37943. Using a resazurin assay as an indicator of cell growth and viability, we confirmed that the cells in the penicillin G-induced biofilms were metabolically active (Supplementary Figure 1). CFU's and growth kinetics on selected isolates confirmed that exposure to sub-MIC of penicillin G did not affect their viability during the 24 hour incubation (Supplementary Figure 2).

Glass tube biofilm assay was also used to investigate the effect of sub-MICs of penicillin G on biofilm formation. When exposed to 1/2 MIC of penicillin G, isolates, whose biofilms were affected by penicillin G, settled to the bottom of the tube as aggregates whereas bacteria in the control tube without antibiotic remained in suspension as planktonic cells (Fig. 2). Aggregation was not observed for isolates whose biofilm were not affected by the presence of sub-MIC of penicillin G with the exception of strain S1\_2521.

### **3.2 Characterization of penicillin G-induced biofilm**

Confocal microscopy in combination with different dyes and probes was used to characterize the biofilms in the presence of sub-MIC of penicillin G for three isolates, S1\_7430, S5a\_508 and S7\_3060 representing serotypes 1, 5a and 7, respectively. These represent the most common serotypes recovered from pigs in Canada. The untreated biofilms were weak or moderate and the biofilm matrix components were barely detectable by staining in some cases (Fig. 3). As observed above, sub-MIC of penicillin G enhanced biofilm formation by the three isolates tested. PGA (stained with the WGA lectin), extracellular DNA (eDNA) and proteins were detectable and their amounts seemed to increase in the presence of 1/2 MIC of penicillin G (Fig. 3). An increase in the amount of dead cells was observed for isolates exposed to 1/2 MIC of penicillin G when compared to the control (Supplementary Figure 3).

The biofilm biomass for each isolate exposed to sub-MIC of penicillin G and the untreated control was quantified using stacks of confocal images. The biofilm biomass of isolate S1\_7430 was  $0.16 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  which is significantly less compared to the biomass of the biofilm exposed to 1/2 MIC of penicillin G which was  $6.26 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ . This represents a 39 fold increase (Table 3). The biofilm biomass of isolates S5a\_508 and S7\_3060 exposed to penicillin G was increased by 27-fold and 31-fold compared to control biofilms, respectively (Table 3). The microscopy data thus confirmed the observations made with the microtiter plate assay and crystal violet staining.

### **3.3 Enzymatic treatments of penicillin G-induced biofilms**

We observed by confocal microscopy that *A. pleuropneumoniae* biofilms contain PGA, extracellular proteins and extracellular DNA (eDNA). To determine the importance of these components in penicillin G-induced biofilm, enzymatic treatments were done with the same three

isolates used for CLSM. Figure 4A showed that biofilms exposed to 1/2 MIC of penicillin G were significantly reduced by a treatment with dispersin B. Interestingly, treatments with DNase I also significantly reduced the biofilms of all tested isolates exposed to 1/2 MIC of penicillin G (Fig. 4B). All penicillin G-induced biofilms were, however, resistant to a proteinase K treatment (Fig. 4C).

### **3.5 Relative expression of *pgaA*, *cpxR* and *cpxA***

Given that PGA seemed to be present in large quantity and that the penicillin G-induced biofilms were sensitive to dispersin B treatment, expression of *pgaA*, one of the genes in the *pgaABCD* operon encoding for PGA production, was measured in biofilms exposed to sub-MIC of penicillin G. For every strain tested, the expression of *pgaA* was up-regulated ( $p < 0.05$ ) in the presence of penicillin G (Fig. 5). It is well established that CpxRA, a two-component regulatory system involved in envelope stress response, controls genes involved in biofilm formation of *Escherichia coli* strains (Beloin et al., 2004; Price and Raivio, 2009). Furthermore, previous transcriptomic analysis from our group also demonstrated differential regulation of the *cpxR* or *cpxA* in *A. pleuropneumoniae* biofilms (Tremblay et al., 2013a). Thus, expression of *cpxA* and *cpxR* was measured in the presence of sub-MICs of penicillin G. Again, both genes were up-regulated ( $p < 0.05$ ) in the presence of the antibiotic (Fig. 5). As expected, the expression of *cpxR*, *cpxA* and *pgaA* of isolates S1\_2521, S5a\_3128, S7\_06-4108 and S15\_05-2080, whose biofilm was not induced by penicillin G, remains unchanged (data not shown).

#### **4. Discussion**

In North America, antibiotics are still extensively used in animal production as growth promoters or during prophylactic therapy (Marshall and Levy, 2011; Thacker, 2013) and this has been raised as a concern for the emergence of multidrug resistant strains (Thacker, 2013; Van der Fels-Klerx et al., 2011). In general, injecting pigs with antibiotics is a laborious process and requires several injections. It is used primarily to treat acute respiratory infections when sick pigs are too ill to eat or drink (Burch, 2013). In contrast, oral administration of antibiotics is the most common method in swine medicine for the prevention of disease or early treatment. Medication added to water or feed is widely used in porcine production (Burch, 2013). Antibiotics are often used at lower levels to prevent infection and re-infection from contaminated environments. The concentration in feed or water is generally lower than the required therapeutic level but it remains theoretically effective to treat infections. Moreover, there are several pharmacokinetic caveats with respect to oral administration (J.R.E Del Castillo, personal communications). Penicillin has a short half-life and a high systemic clearance (Prescott, 2013). Furthermore, feed or water may reduce the bioavailability of penicillin (Nielsen, 1997; Prescott, 2013). Dose and inclusion rates are also critical and depend on feed intake/kg of body weight of the pig (Del Castillo et al., 1998). Feed intake depends on several parameters such as a pig age, weight, health and environmental temperature. Unhealthy or stressed pigs will lose appetite and drink less than a healthy animal, and, in these cases, it may be more difficult to achieve an effective antibiotic dose (Del Castillo et al., 2002).

Additionally, penicillins are used as growth promoter in North America (Burch 2013, Guardabassi et al., 2008 and CVMA, 2008). The Canadian Food Inspection Agency approves the use of penicillin combined with other products in swine feeds for the following indications: to (i)

aid the maintenance of growth rate and feed efficiency, (ii) maintain weight gain and stimulate appetite during periods of stress caused by moving, castration, vaccination and extreme temperature changes and (iii) prevent bacterial enteritis (Canadian Food Inspection Agency, 2014). Importantly, the prescribed uses stated above results in a sub-therapeutic dose based on mg/kg body weight (BW). For example, 55 mg/kg of procaine penicillin G in feed results in a dose of 2.75 mg/kg BW for a 15-kg weaner pig, while the approved dose for procaine penicillin G administered by intra muscular injection is 15 mg/kg BW (Canadian Food Inspection Agency, 2014). Therefore, *A. pleuropneumoniae* is likely exposed to sub-MIC concentrations of penicillin G.

Low concentrations of antibiotics including  $\beta$ -lactams can potentially function as signalling molecules and induce virulence, quorum sensing and biofilm formation (Andersson and Hughes, 2014; Kaplan, 2011; Wu et al., 2014; Yim et al., 2007). The mechanisms associated with these effects differ for each species, isolates and antibiotics. In this study, we focused on the effect of sub-inhibitory concentration of penicillin G on biofilm formation by *A. pleuropneumoniae* field isolates. The results of the present study demonstrate that sub-MICs of penicillin G markedly induce biofilm formation of *A. pleuropneumoniae* isolates belonging to different serotypes. Numerous studies have shown that  $\beta$ -lactams below their MIC (e.g. 1/4 and 1/2 MIC) could induce biofilm formation of different bacterial species (Ahmed et al., 2009; Davies et al., 2006; Frank et al., 2007; Gomes et al., 2013; Kaplan, 2011; Mirani and Jamil, 2011; Nucleo et al., 2009; Wu et al., 2014). Our findings demonstrated that 1/2 MIC of penicillin G induced biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*. Growth kinetics and resazurin assay confirmed that bacteria exposed to sub-MIC of penicillin G were viable and metabolically active after 24h of growth.

Interestingly, DNase I treatments degraded *A. pleuropneumoniae* biofilms formed in the presence of penicillin G which was not observed with the untreated controls (this study) or with the serotype 1 reference strain S4074 in a previous study (Grasteau et al., 2011). Therefore, the biofilm sensitivity to DNase suggests that exposure to sub-MIC of penicillin G modifies the composition of the biofilm matrix. A similar phenomenon has been observed previously for  $\beta$ -lactam-induced *S. aureus* biofilm (Kaplan et al., 2012). This biofilm was eDNA-dependent and associated with an increase in eDNA amounts and autoaggregation (Kaplan et al., 2012). In our study, autoaggregation was also observed with isolates exposed to 1/2 MIC of penicillin G when using a glass tube biofilm assay.

Sub-MIC of antibiotics that target the cell wall or the outer membrane induce a cell envelope stress among several Gram-negative bacteria (Kohanski et al., 2010b; Manoil, 2013; Poole, 2012). The response to this stress is mainly controlled by the two component regulatory system CpxRA and the alternative sigma factor  $\sigma^E$  (Poole, 2012). Additionally, CpxRA and  $\sigma^E$  regulons have overlaps and share some gene targets (Price and Raivio, 2009). The CpxRA system also controls the expression of genes involved in biofilm formation of *E. coli* (Beloin et al., 2004; Price and Raivio, 2009). Moreover, it was demonstrated that *E. coli* K12 *cpxR* deletion mutant had less cells attached to surfaces (Otto and Silhavy 2002). Similarly, Dorel et al. showed that a *cpxA* mutant formed a biofilm with less biomass than the wild type strain (Dore et al. 1999). Interestingly, previous study has demonstrated that the operon *pgaABCD* of *A. pleuropneumoniae* was regulated by the alternative sigma factor  $\sigma^E$  (*rpoE*) (Bossé et al., 2010) and that CpxRA was differently regulated during biofilm formation of *A. pleuropneumoniae* (Tremblay et al., 2013a). In the present study, *cpxR* and *cpxA* were up-regulated in the presence of the 1/2 MIC of penicillin G for isolates whose biofilm formation was induced. On the other hand, the expression

of *cpxR*, *cpxA* and *pgaA* was unchanged in the presence of 1/2 MIC of penicillin G for isolates S1\_2521, S5a\_3128, S7\_06-4108 and S15\_05-2080 whose biofilms were not induced by penicillin G.

These findings suggest that CpxRA is involved directly or indirectly in the biofilm formation of *A. pleuropneumoniae*. The signalling pathway that leads to enhanced biofilm formation after exposure to sub-MIC of penicillin G has yet to be characterized.

Cell envelope damages done by sub-MICs of penicillin G may stimulate the CpxRA signalling pathway leading to restricted cell lysis before the bacteria has adapted and damages are repaired (Kohanski et al., 2010a; Kohanski et al., 2010b; Manoil, 2013). Additionally, the role of eDNA in the stability of the biofilm induced by sub-MIC of penicillin G suggests that penicillin G may induce some limited cell death in the population, especially during the early stages of growth. After 24 hours, this lysis would be barely detectable using a resazurin assay or CFU counts (Supplementary Figure 1). Furthermore, confocal microscopy analysis showed a population of dead cells in the biofilm of isolates exposed to sub-MIC of penicillin G (Supplementary Figure 3). Therefore, penicillin G-induced lysis could release chromosomal DNA and this would be a major source of eDNA for the biofilm of *A. pleuropneumoniae*. This eDNA would be used by the surviving population to aggregate and build a biofilm (Karatan and Watnick, 2009). Lysis and DNA release is an important step for biofilm formation for some bacteria (Bayles, 2007; Karatan and Watnick, 2009; Montanaro et al., 2011; Okshevsky and Meyer, 2013). For example, *Streptococcus mutans* will produce and secrete a quorum sensing signal that will induce the production of a bacteriocin that lyses and kills a subset of the population (Perry et al., 2009). This lysis and release of DNA is critical for biofilm formation in *S. mutans*. Additionally, it was demonstrated that *Staphylococcus epidermidis* releases eDNA in biofilm through cell lysis



mediated by AltE, an autolysin involved in cell division and cell lysis (Biswas et al., 2006; Qin et al., 2007). Similarly, eDNA and lysis are important for *S. aureus* biofilm development. Indeed, mutations in *cidA* and *lrgA*, predicted to encode holins and antiholins, decreased cell lysis and this had a negative impact on biofilm morphology and adherence (Rice et al., 2007). Furthermore, eDNA is often used as an adhesive substance that mediates cell adhesion; it is a crucial molecule to maintain structural integrity of biofilms and to mediate bacterial aggregation for many species (Karatan and Watnick, 2009; Okshevsky and Meyer, 2013).

To the best of our knowledge, this is the first description, at least for *A. pleuropneumonie*, of activation of the CpxRA system and stimulation of biofilm formation by sub-MICs of penicillin G. The multicellular organization of bacteria in biofilms is a crucial mechanism to withstand unfavourable conditions including low nutrient availability or the presence of antibiotics. The sub-lethal concentrations of penicillin G tested in this study did not kill *A. pleuropneumonie*, as expected, but seem to induce a cell envelope stress and consequently activate the CpxA membrane stress sensor. Once activated, CpxR could induce *A. pleuropneumoniae* biofilm formation through a pathway that has yet to be characterized. Since antibiotics are widely used as prophylactic therapy and for feed efficiency in North American swine production, our findings indicate that sub-lethal concentrations of penicillin might promote the persistence of *A. pleuropneumoniae* in pigs by enhancing its ability to form biofilms. This highlights the importance of encouraging a prudent and a judicious use of antibiotics in veterinary medicine.

## **5. Conclusion**

Sub-inhibitory concentrations of penicillin G up-regulated the *pga* and *cpxRA* genes involved in PGA production and envelope stress sensing, respectively, and stimulated autoaggregation and the production of biofilm by *A. pleuropneumoniae*. Penicillin G-induced biofilms were thicker and contained more PGA, eDNA and proteins. Furthermore, eDNA had an important role in the penicillin G-induced biofilm stability. Our results suggest that sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce a cell envelope stress sensed by CpxRA system which subsequently leads to autoaggregation, the production of PGA and an enhanced release of eDNA in the biofilm matrix.

## **Acknowledgments**

This work was supported by a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to MJ. We thank Dr. M. Archambault and Dr. J.R.E. Del Castillo (Université de Montréal) for precious advices.

## References

- Ahmed, N.A., Petersen, F.C., Scheie, A.A., 2009. AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4258-4263.
- Al Safadi, R., Abu-Ali, G.S., Sloup, R.E., Rudrik, J.T., Waters, C.M., Eaton, K.A., Manning, S.D., 2012. Correlation between *In Vivo* Biofilm Formation and Virulence Gene Expression in *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS One* 7:e41628. doi:10.1371/journal.pone.0041628
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465-478.
- Archambault, M., Harel, J., Gouré, J., Tremblay, Y.D., Jacques, M., 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 18, 198-206.
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P., Hoiby, N., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1175-1187.
- Bayles KW (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nature Rev. Microbiol.* 5:721-726.

- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., Ghigo, J.M., 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51, 659-674.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G., Gotz, F., 2006. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 260-268.
- Bossé, J.T., Sinha, S., Li, M.S., O'Dwyer, C.A., Nash, J.H., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., Langford, P.R., 2010. Regulation of *pga* operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by sigmaE and H-NS. *J. Bacteriol.* 192, 2414-2423.
- Burch, D. G. S. 2013. Antimicrobial Drug Use in Swine. In: Giguère, S., Prescott, J. F., Baggot, J.D., Walker, R.D., Dowling, P.M. (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, John Wiley & Sons, Inc pp. 553-568.
- Canadian Food Inspection Agency, 2014. Chlortetracycline hydrochloride, sulfamethazine and procaine penicillin - MIB #38. Retrieved 07, 2014, from <http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/medicating-ingredients/mib/mib-38/eng/1330991268088/1330991334507>.
- Ciofu, O., Høiby, N. 2008. Cystic Fibrosis—Coping with Resistance, In: Gould, I., van der Meer, J. (Eds.) *Antibiotic Policies: Fighting Resistance*. Springer US, 149-174.
- Clutterbuck, A.L., Woods, E.J., Knottenbelt, D.C., Clegg, P.D., Cochrane, C.A., Percival, S.L., 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol* 121, 1-17.
- Costerton, J.W., 1999a. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217-221.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999b. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Cromwell, G.L., 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.* 13, 7-27.
- CVMA. 2008. Antimicrobial prudent use guidelines 2008 for beef cattle, dairy cattle, poultry and swine. Available from <http://canadianveterinarians.net/documents/cvma-antimicrobial-prudent-use-guidelines-2008-for-beef-dairy-poultry-swine>. Last accessed December 10, 2014.
- Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G., 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 445-453.
- Del Castillo, J. R. E., Elsener, J., Martineau G.-P., 1998. Pharmacokinetic modeling of in-feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach. *J. Swine Health Prod.* 6,189-202.
- Del Castillo, J.R.E., Beauchamp, G., Martineau, G.P., Besner, J.G., 2002. Short-term effects of in-feed supplementation of tetracyclines for disease control on feed intake pattern and growth in weaned pigs. *Live. Prod. Sci.* 76, 115-24.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I., Lejeune, P., 1999. Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 169-175.

- Fonseca, A.P., Sousa, J.C., 2007. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1828-1837.
- Frank, K.L., Reichert, E.J., Piper, K.E., Patel, R., 2007. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 888-895.
- Gardner, A.J., Percival, S.L., Cochrane, C.A., 2011. Biofilms and role to infection and disease in veterinary medicine, In: Percival S, Knottenbelt D, Cochrane C., *Biofilms and Veterinary Medicine*. Springer. pp. 111-128
- Gomes, D.L., Peixoto, R.S., Barbosa, E.A., Napoleao, F., Sabbadini, P.S., dos Santos, K.R., Mattos-Guaraldi, A.L., Hirata, R., Jr., 2013. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J. Med. Microbiol.* 62, 754-760.
- Grasteau, A., Tremblay, Y.D., Labrie, J., Jacques, M., 2011. Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 153, 134-143.
- Guardabassi, L., Jensen, L.B., Kruse, H., 2008. *Guide to antimicrobial use in animals*. Blackwell Pub., Oxford, UK ; Ames, Iowa, 223 p.
- Gutierrez-Martin, C.B., del Blanco, N.G., Blanco, M., Navas, J., Rodriguez-Ferri, E.F., 2006. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Vet. Microbiol.* 115, 218-222.

- Hengzhuang, W., Ciofu, O., Yang, L., Wu, H., Song, Z., Oliver, A., Hoiby, N., 2013. High beta-lactamase levels change the pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 196-204.
- Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y.D., 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim. Health Res. Rev.* 11, 97-121.
- Kaplan, J.B., 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 34, 737-751.
- Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W., Horswill, A.R., 2012. Low levels of beta-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 3, e00198-00112.
- Kaplan, J.B., Velliyagounder, K., Rangunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K., Ramasubbu, N., 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J. Bacteriol.* 186, 8213-8220.
- Karatan, E., Watnick, P., 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 310-347.
- Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J., 2010a. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell* 37, 311-320.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., 2010b. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 423-435.

- Labrie, J., Pelletier-Jacques, G., Deslandes, V., Ramjeet, M., Auger, E., Nash, J.H., Jacques, M., 2010. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res.* 41, 3.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Manoil, C., 2013. Clarifying the role of two-component regulation in antibiotic killing. *J. Bacteriol.* 195, 1857-1858.
- Marshall, B.M., Levy, S.B., 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718-733.
- Mirani, Z.A., Jamil, N., 2011. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* 51, 191-195.
- Mitra, A, Palaniyandi, S. Herren, C.D., Zhu, X., Mukhopadhyay, S., 2013. Pleiotropic roles of *uvrY* on biofilm formation, motility and virulence in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *PLoS One* 8:e55492.
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., Arciola, C.R., 2011. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs* 34, 824-831.
- Nielsen, P. 1997. The Influence of Feed on the Oral Availability of Antibiotics/chemotherapeutics in Pigs. *Dansk Veterinaertidsskrift* 80, 495-501.
- Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L., Landini, P., 2009. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory



concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol. 9, 270.

Okshevsky, M., Meyer, R.L., 2013. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. Crit. Rev. Microbiol. doi:10.3109/1040841X.2013.841639.

Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can. J. Vet. Res. 66, 86-92.

Otto, K., Silhavy, T. J., 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 99, 2287-2292.

Perry, J.A., Cvitkovitch, D.G., Lévesque, C.M., 2009. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. FEMS Microbiol. Lett. 299, 261-266.

Poole, K., 2012. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. Trends Microbiol. 20, 227-234.

Price, N.L., Raivio, T.L., 2009. Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. J. Bacteriol. 191, 1798-1815.

Prescott, J. F. 2013. Beta-lactam antibiotics. In: Giguère, S., Prescott, J. F., Baggot, J.D., Walker, R.D., Dowling, P.M. (Eds.), Antimicrobial therapy in veterinary medicine, John Wiley & Sons, Inc pp. 133-152.

- Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin, and D. Qu. 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 153, 2083-2092.
- Ramjeet, M., Deslandes, V., Gouré, J., Jacques, M., 2008. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 9, 25-45.
- Rice, K. C., E. E. Mann, J. L. Endres, E. C. Weiss, J. E. Cassat, M. S. Smeltzer, and K. W. Bayles. 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8113-8118.
- Salmon, S., Portis, E., Lindeman, C., 2003. Minimum inhibitory concentrations for ceftiofur and comparator antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine. *American Association of Swine Veterinarians, Proceedings*, 235-239.
- Thacker, P.A., 2013. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 35.
- Tremblay, Y.D., Deslandes, V., Jacques, M., 2013a. *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes expression in biofilms cultured under static conditions and in a drip-flow apparatus. *BMC Genomics* 14, 364.
- Tremblay, Y.D., Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S., Jacques, M., 2013b. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J. Dairy Sci.* 96, 234-246.

- Tremblay, Y.D., Lévesque, C., Segers, R.P., Jacques, M., 2013c. Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. BMC Vet. Res. 9, 213.
- Van der Fels-Klerx, H.J., Puister-Jansen, L.F., van Asselt, E.D., Burgers, S.L.G.E., 2011. Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production. J. Anim. Sci. 89, 1922-1929.
- Vanni, M., Merenda, M., Barigazzi, G., Garbarino, C., Luppi, A., Tognetti, R., Intorre, L., 2012. Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine. Vet. Microbiol. 156, 172-177.
- Wu, S., Li, X., Gunawardana, M., Maguire, K., Guerrero-Given, D., Schaudinn, C., Wang, C., Baum, M.M., Webster, P., 2014. Beta-lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable *Haemophilus influenzae* by up-regulating carbohydrate metabolism. PLoS ONE. 9, e99204.
- Yim, G., Huimi Wang, H., Davies FRS, J., 2007. Antibiotics as signalling molecules. Phil. Trans. R. Soc. B 362, 1195-1200.
- Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., 2012. Diseases of Swine. John Wiley & Sons, pp. 348-361.

**Table 1.** Serotypes and MICs of the *A. pleuropneumoniae* field isolates used in the present study.

Bacterial isolate	Serotype <sup>1</sup>	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) of Penicillin G <sup>2</sup>	Biofilm forming ability (OD <sub>600nm</sub> ) <sup>3</sup>
<b>7430</b>	1	0.5	0.230 $\pm$ 0.10
<b>7431</b>	1	0.5	0.155 $\pm$ 0.10
<b>2398</b>	1	0.25	0.341 $\pm$ 0.16
<b>111A</b>	1	0.5	0.317 $\pm$ 0.18
<b>2521</b>	1	0.5	0.269 $\pm$ 0.14
<b>508</b>	5a	0.5	0.395 $\pm$ 0.14
<b>996</b>	5a	0.5	0.510 $\pm$ 0.14
<b>37943</b>	5a	0.5	0.488 $\pm$ 0.21
<b>3128</b>	5a	0.25	0.205 $\pm$ 0.08
<b>3060</b>	7	1	0.349 $\pm$ 0.09
<b>06-4108</b>	7	0.25	0.050 $\pm$ 0.02
<b>13146</b>	15	1	0.167 $\pm$ 0.06
<b>05-2080</b>	15	0.5	0.496 $\pm$ 0.54

<sup>1</sup>Labrie et al., 2010

<sup>2</sup>Archambault et al., 2012

<sup>3</sup>This study

**Table 2.** Primers used for quantitative real-time reverse-transcriptase (RT)-PCR.

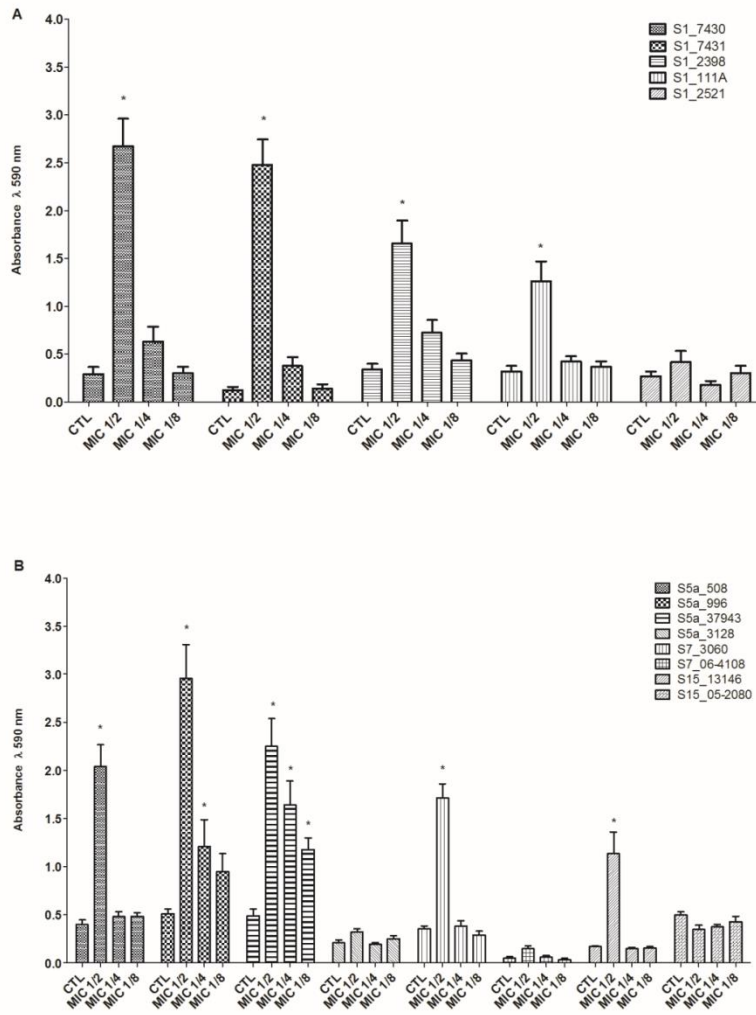
Primer	Sequence	Fragment size (bp)
<i>16s rRNA</i>	<i>16s</i> -Fw_GGAATAACTGGGCGTAAAGG	200
	<i>16s</i> -Rev_GCGTCAGTACATTCCCAAGG	
<i>pgaA</i>	<i>pgaA</i> -Fw_GATAAAGCAAGCCAGTTCTTAGGT	215
	<i>pgaA</i> -Rev_GCTGTTTGATGAGAAATACCGA	
<i>cpxA</i>	<i>cpxA</i> -Fw_CGGATATTTTCGCATGAACTG	185
	<i>cpxA</i> -Rev_GCGGGTCAAATGCTGATTG	
<i>cpxR</i>	<i>cpxR</i> -Fw_TTGATGTTAAGCGCCAGAGA	187
	<i>cpxR</i> -Rev_CCGGAGACTGGTTGGAATAA	

**Table 3.** Biofilms biomass of selected *A. pleuropneumoniae* isolates was measured in the presence of 1/2 MIC of penicillin G.

Bacterial isolate	Biomass ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) <sup>1</sup>	
	Control <sup>2</sup>	1/2 MIC of Penicillin G
S1_7430	0.16 $\pm$ 0.04	6.26 $\pm$ 0.84
S5a_508	0.37 $\pm$ 0.04	10.12 $\pm$ 0.3
S7_3060	0.42 $\pm$ 0.01	12.98 $\pm$ 0.04

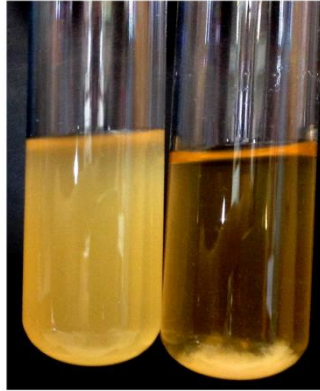
<sup>1</sup> The biomass ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) for each isolate was calculated from two biological replicates and in each experiment, a 3D-image was generated with a minimum of fifteen CLSM z-stack images.

<sup>2</sup> Grown in absence of penicillin G.



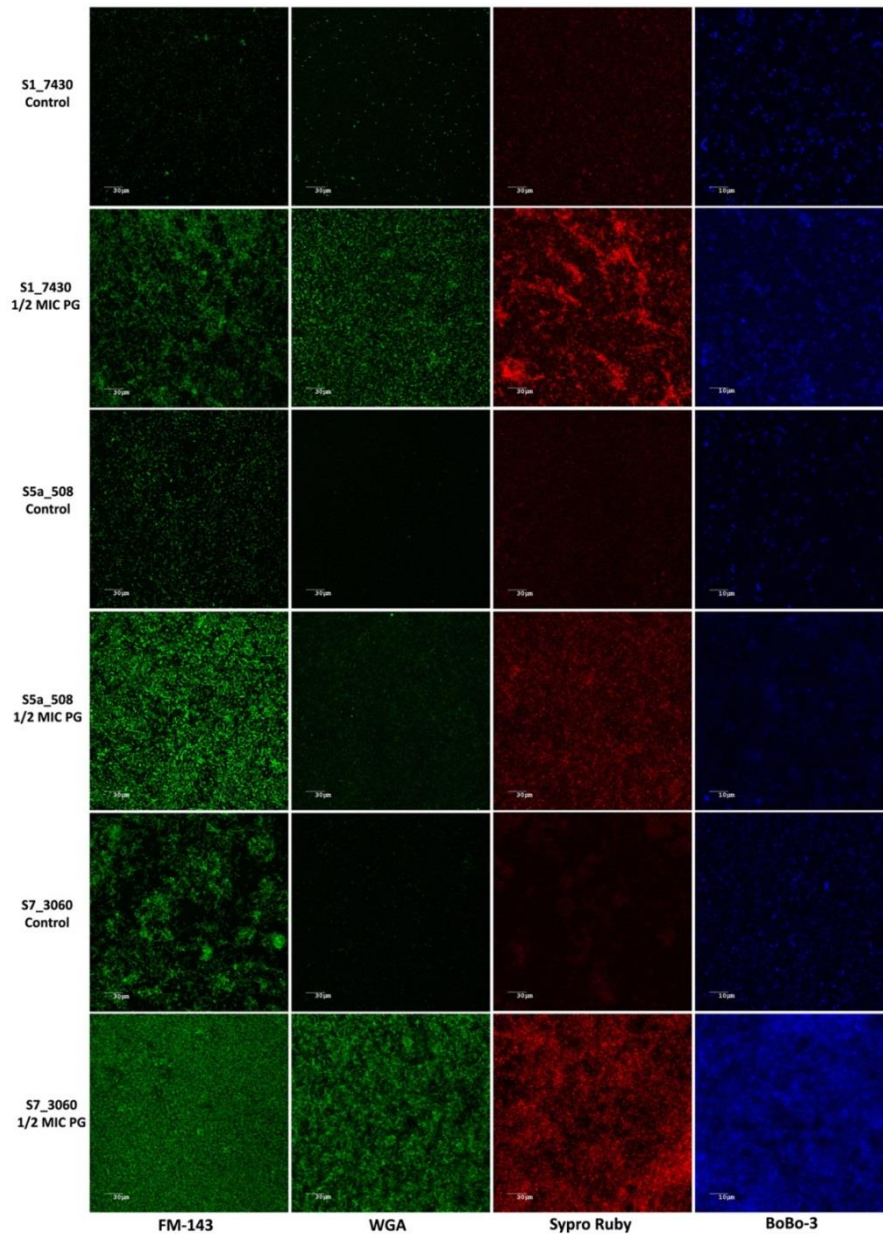
**Fig 1.** Biofilm formation in 96-well microtiter plate by *A. pleuropneumoniae* field isolates of serotypes 1 (A), 5a, 7 and 15 (B). Isolates were grown for 24 h in BHI-NAD with or without sub-MICs of penicillin G and stained with crystal violet. The means  $\pm$  SD from 3 independent experiments are shown. Statistical analysis was performed using ANOVA. \* $P < 0.05$  when compared to the control (CTL).

S7\_3060 Control S7\_3060 1/2 MIC

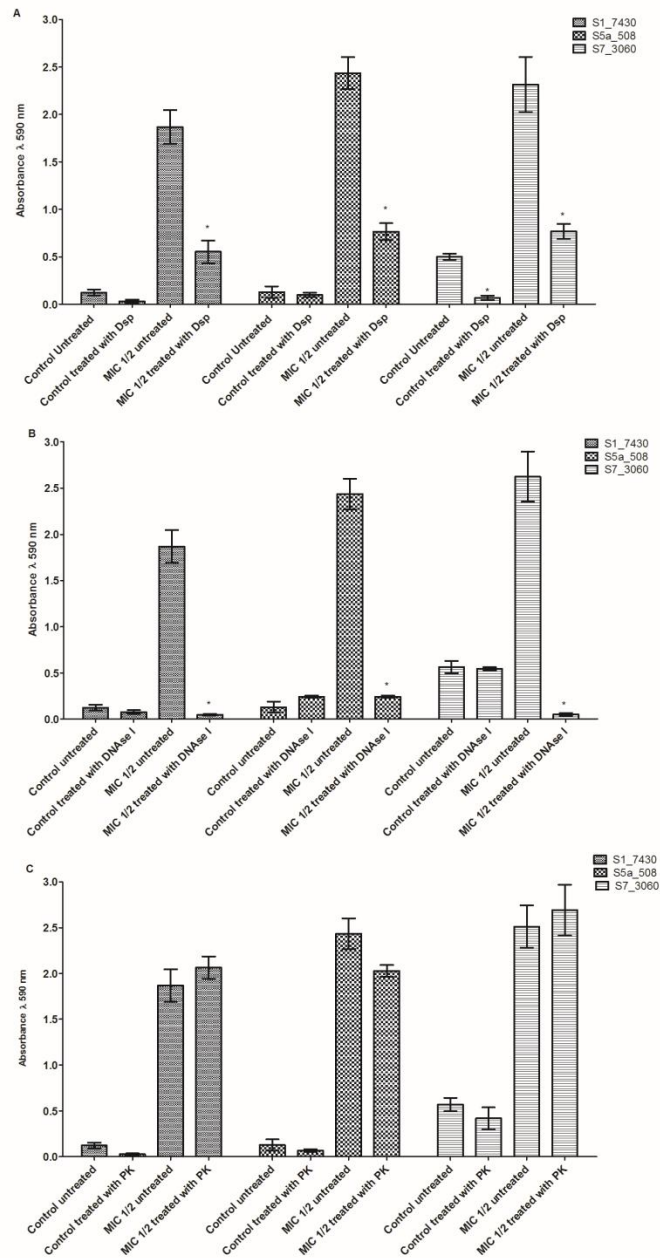


**Fig 2.** Sub-MICs of penicillin G induce autoaggregation in *A. pleuropneumoniae* S7\_3060 when cultured for 24 h in broth. A control was grown without penicillin G.

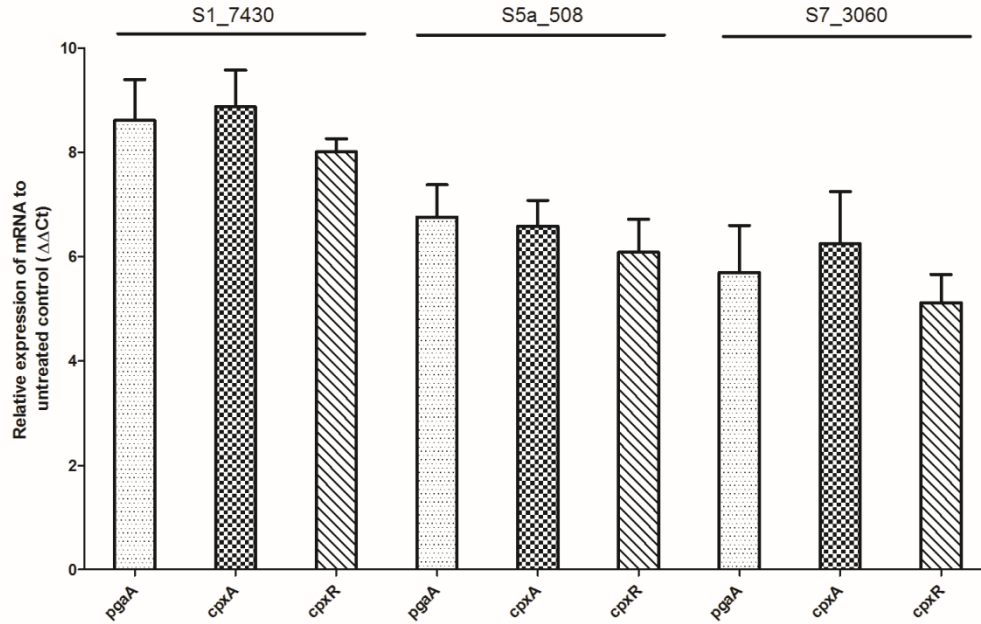




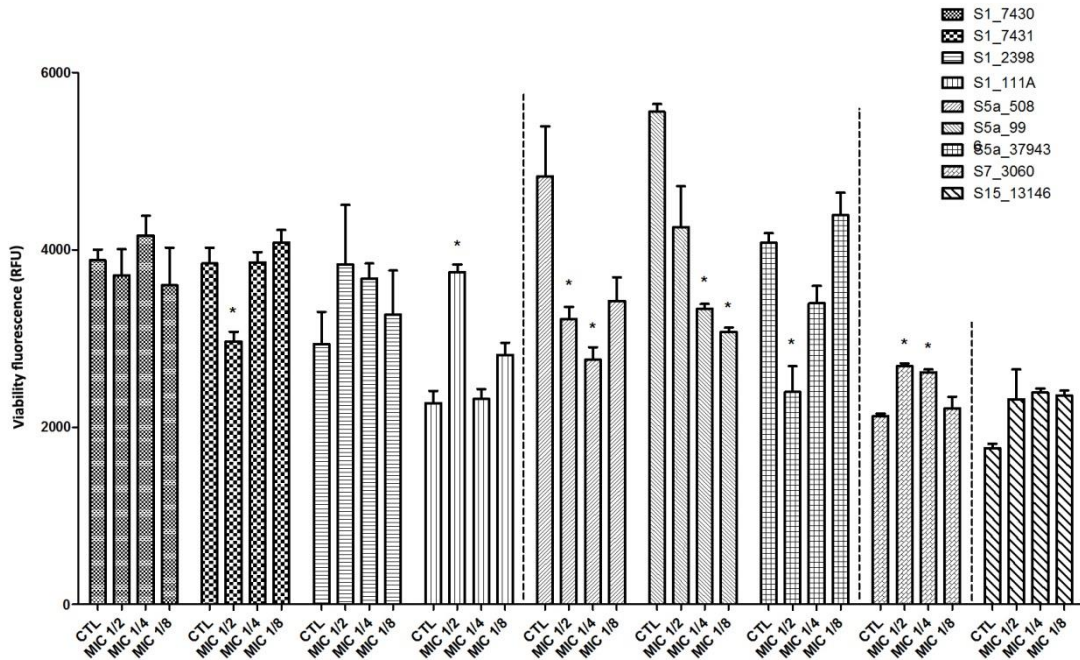
**Fig 3.** CLSM images of biofilms formed by *A. pleuropneumoniae* S1\_7430, S5a\_508 and S7\_3060 in 96-well microtiter plates and stained with FM-143, WGA-Oregon Green 488, Sypro Ruby and BoBo-3. Biofilms were grown without penicillin G (control) or in the presence of 1/2 MIC of penicillin G (PG).



**Fig 4.** Dispersion of biofilms formed by *A. pleuropneumoniae* S1\_7430, S5a\_508 and S7\_3060 in 96-well microtiter plates using dispersin B (A), DNase I (B) and proteinase K (C). The means  $\pm$  SD from 3 independent experiments are shown. Statistical analysis was performed using ANOVA. \* $P < 0.05$  when compared to the untreated control.



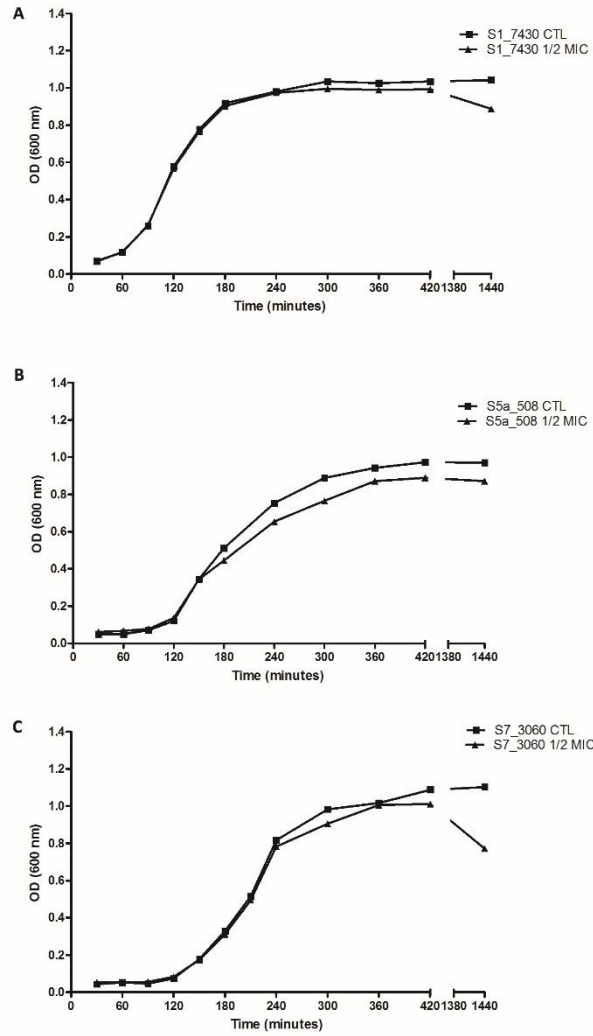
**Fig 5.** Relative expression of *pgaA*, *cpxA* and *cpxR* in biofilms of *A. pleuropneumoniae* S1\_7430, S5a\_508 and S7\_3060 in the presence of 1/2 MIC of penicillin G and compared to the untreated control (in absence of penicillin G). The means  $\pm$  SD from 3 independent experiments are shown. Statistical analysis were done using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  values and every genes were significantly up-regulated when compared to the untreated control ( $P < 0.05$ ).



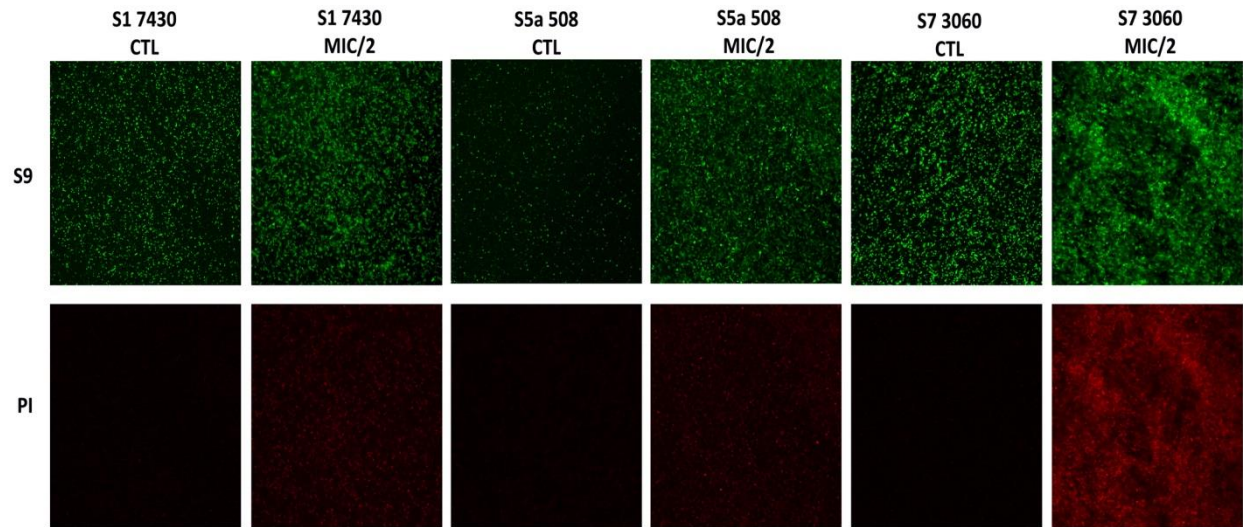
**Supplementary Figure 1.** Metabolic activity of different *A. pleuropneumoniae* field isolates.

Isolates were grown for 24 h in BHI-NAD with or without MIC of penicillin G and 20  $\mu$ l of CellTiter blue reagent (resazurin solution) was added to the wells. Fluorescence recorded after 2 h is shown in this graph ( $\lambda_{ex}$  : 560nm and  $\lambda_{em}$  : 590 nm) and was measured using a Synergy™ HT multi-detection microplate reader. The means ( $\pm$  SD) from 3 independent experiments are shown.

\*  $P < 0.05$  when compared to the control (CTL).



**Supplementary Figure 2.** Growth kinetics of *A. pleuroneumoniae* S1\_7430 (A), S5a\_508 (B) and S7\_3060 (C) in the absence of penicillin (CTL) or in the presence of 1/2 MIC of penicillin G.



**Supplementary Figure 3.** CLSM images of biofilms formed by *A. pleuropneumoniae* S1\_7430, S5a\_508 and S7\_3060 in 96-well microtiter plates and stained with SYTO9 (S9; green; viable cells) and propidium iodide (PI; red; dead cells). Biofilms were grown without penicillin G (CTL) or in the presence of 1/2 MIC of penicillin G (1/2MIC).

## Article 3

Accepté le 19 avril 2016 dans *Innate Immunity*

### **Impact of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm mode of growth on the lipid A structures and stimulation of immune cells**

Skander Hathroubi<sup>1</sup>, Francis Beaudry<sup>2</sup>, Chantale Provost<sup>1</sup>, Léa Martelet<sup>1</sup>, Mariela Segura<sup>1</sup>, Carl A  
Gagnon<sup>1</sup> and Mario Jacques<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

<sup>2</sup>Groupe de recherche en pharmacologie animale du Québec, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, Québec, Canada.

---

\* Corresponding author: Mario Jacques, Ph.D.

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,  
3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2

Tel: +1 450 773-8521 ext. 8348; Fax: +1 450 778-8108

Email: [mario.jacques@umontreal.ca](mailto:mario.jacques@umontreal.ca)

## **Implication de l'auteur dans cet article**

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué les différentes expérimentations de culture cellulaires ainsi que l'ELISA, la qRT-PCR et les extractions du lipide A. L'analyse par spectrométrie de masse des structures du lipide A a été réalisée par F. Beaudry. J'ai analysé les résultats et j'ai écrit le manuscrit avec l'aide des co-auteurs.



## **ABSTRACT**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), the etiologic agent of porcine pleuropneumonia, forms biofilms on both biotic and abiotic surfaces. APP biofilms confers resistance to antibiotics. To our knowledge, no studies have examined the role of APP biofilm in immune evasion and infection persistence. This study was undertaken to: (i) investigate biofilm-associated lipopolysaccharide modifications occurring during the switch to biofilm mode of growth; (ii) characterize pro-inflammatory cytokines expression in porcine pulmonary alveolar macrophages (PAMs) and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) challenged with planktonic or biofilm APP cells. Extracted lipid A samples from biofilm and planktonic cultures were analyzed by HPLC-high resolution accurate mass spectrometry. Biofilm cells displayed significant changes in lipid A profiles when compared to their planktonic counterparts. Furthermore, *in vitro* experiments were conducted to examine the inflammatory response of PAMs exposed to UV-inactivated APP grown in biofilm or in suspension. Relative mRNA expression of pro-inflammatory genes IL-1, IL-6, IL-8 and MCP-1 decreased in PAMs when exposed to biofilm cells compared to planktonic cells. Additionally, the biofilm state reduced PBMCs proliferation. Taken together, APP biofilm cells show a weaker ability to stimulate innate immune cells which could be due, in part, to lipid A structure modifications.

**KEYWORDS:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Biofilm, Cytokines, Innate immune cells, Lipid A, Macrophages

## INTRODUCTION

Biofilms are adherent communities of bacteria attached to biological or non-biological surfaces and encased within a self-produced polymeric matrix that protects cells from noxious elements in the surrounding environment.<sup>1,2</sup> Biofilm represents a serious therapeutic challenge, since bacteria within biofilm are usually more resistant to antibiotics and to immune clearance.<sup>3-6</sup> Biofilms are ubiquitous and nearly all microorganisms are able to adhere to surfaces and generate biofilms. This includes *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a Gram-negative porcine pathogen and member of the *Pasteurellaceae* family.<sup>7</sup> *A. pleuropneumoniae* strains can form biofilms on both abiotic<sup>7-9</sup> and biotic<sup>10</sup> surfaces. *A. pleuropneumoniae* cells within biofilms are 100 to 30,000 times more resistant to antibiotics than their planktonic counterparts<sup>11</sup> and might play an important role in the persistence of bacterial infection in swine.

*A. pleuropneumoniae* is the etiologic agent of porcine pleuropneumonia, a fibrinous, hemorrhagic, highly contagious disease affecting pigs of all ages and leading to high economic losses in the swine industry.<sup>12</sup> Symptoms and signs of porcine pleuropneumonia are depression, loss of appetite, fever, and severe breathing difficulties with some coughing.<sup>13</sup> After death, it is common to see blood discharge out of the nasal cavity due to extensive lung tissue damage.<sup>13</sup> The disease in its acute form is associated with high rates of morbidity and mortality.<sup>13,14</sup> Lung tissues are damaged by the RTX toxins, ApxI, Apx II, Apx III and Apx IV.<sup>15,16</sup> In addition, surface lipopolysaccharides (LPS) induce an inflammatory response that contributes to necrosis of porcine lung epithelial cell.<sup>17-19</sup> Inflammatory cytokines in lung tissue may exacerbate the effect of *A. pleuropneumoniae*, and add to host-mediated tissue damage.<sup>17,19,20</sup> Conversely, subclinical or chronic forms of the disease are asymptomatic, undetectable and less invasive.<sup>21,22</sup> Chronic infection plays a role in persistence and transmission of several bacteria.<sup>19,20</sup> Numerous studies

have also reported that biofilms play a role in immune evasion and bacterial survival.<sup>23-25</sup> In *A. pleuropneumoniae*, most studies were performed using planktonic cells despite the important role played by biofilms in the pathogenesis of human and animal chronic infection.<sup>26-29</sup>

Nothing is known about how *A. pleuropneumoniae* biofilm interacts with immune cells, and if lipid A undergoes structural modifications in *A. pleuropneumoniae* biofilms. The purpose of this study was to (i) investigate modifications of lipid A occurring during the switch to the biofilm mode of growth and (ii) characterize the pattern of inflammatory cytokines expression in porcine pulmonary alveolar macrophages (PAMs) and the proliferative response of porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) challenged with *A. pleuropneumoniae* planktonic and biofilm cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Cell line and bacterial strain***

*A. pleuropneumoniae* MBHPP147 (APP147) is a non-hemolytic derivative of the serotype 1 reference strain S4074.<sup>10</sup> APP147 contains deletions in both the *apxIC* and *apxIIC* genes. Bacterial strain was cultured in brain heart infusion (BHI) broth or agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) supplemented with 15 µg/mL nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Porcine pulmonary alveolar macrophage (PAM) 3D4/21 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-2843) and was maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Eugene, OR, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS; heat inactivated) and adjusted to contain 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, 1 mM nonessential amino acids (Invitrogen) and 0.1 mg/mL streptomycin/100U penicillin solution (Invitrogen). Cells were cultivated in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### ***Biofilm and planktonic cultures***

*A. pleuropneumoniae* was grown in 6-well plates (Costar® 3516, Corning, Corning, NY, USA) as previously described.<sup>30</sup> After 4 hours in culture, media containing non-attached, planktonic bacteria were removed (the planktonic fraction). Attached bacteria were washed twice with phosphate buffered-saline (PBS) to remove remaining planktonic cells. Attached cells (the biofilm fraction) were scraped off the plate. Both planktonic and biofilm fractions were washed again with PBS, centrifuged and resuspended in fresh RPMI 1640 medium. Bacterial counts (CFU) and optical density were used to normalize bacterial concentrations. Bacteria were killed using UV irradiation (254 nm, 30 min), then plated on BHI agar to verify the loss of viability.

### ***Lipid A isolation***

Lipid A molecules were extracted from both planktonic and biofilm bacteria as described by El Hamidi et al.<sup>31</sup> Briefly, bacteria from both planktonic and biofilm fractions were lyophilized. Freeze-dried bacteria (10 mg) were suspended in 200  $\mu$ L isobutyric acid-1M ammonium hydroxide mixture (5:3, v:v), and kept for 2 h at 100°C in a screw-cap test tube under agitation. Suspensions were cooled in ice, and then centrifuged 10 min at 2000 g. Supernatants were diluted with 2 volumes of water and lyophilized. The dried materials were then washed twice with 200  $\mu$ L of methanol. Finally, lipid A was extracted from pellets with 100  $\mu$ L of a mixture of chloroform, methanol and water (3:1.5:0.25, v:v:v).

### ***Mass spectrometry and data processing***

Analyses were performed using a Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA), interfaced with a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system, using a pneumatic assisted heated electrospray ion source (ESI). Chromatography was achieved using an isocratic mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 100  $\times$  1 mm, with a particle size of 5  $\mu$ m. The mobile phase consisted of methanol and water (fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 95:5. The flow rate was fixed at 75  $\mu$ L/min and 2  $\mu$ L samples were injected. Mass spectrometry was performed in positive ion mode and operated in scan mode at high-resolution and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases, set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. The scan range was set to m/z 1000-2500. Data were acquired at a resolving power of 140,000 (defined as full width at half maximum, FWHM), resulting in a scanning rate of 700 msec/scan when using

automatic gain control target of  $3.0 \times 10^6$  and maximum ion injection time of 200 msec. The instrument was calibrated prior to all analyses, and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. Differential analyses of planktonic versus biofilm were performed using Thermo Scientific SIEVE 2.1 software, which executes background subtraction, component detection, peak alignment and differential analyses. Parameters used in SIEVE were: time range 1–10 min, mass range 1000–2500 Da, frame width 10 mDa and retention time width 2 min. SIEVE output was transferred into SIEVE Extractor, an Excel spreadsheet and Lipid Maps databases. SIEVE software measures p-values using a two-tailed Student's t-test. Fold changes and p-values were used to construct a volcano-plot and a Venn diagram analysis. Significance was set a priori to  $p < 0.01$  and only 2-fold changes were considered biologically significant.

### ***Stimulation of porcine pulmonary alveolar macrophages***

PAMs were prepared in 6-well plates (Costar® 3516) to a final concentration of  $1 \times 10^6$  viable cells/ml in 1.5 mL of RPMI 1640 medium. Plates were incubated at 37°C in a humidified incubator 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Medium was removed and fresh medium containing planktonic or biofilm bacteria in suspension with a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 was added to the wells<sup>32</sup>. As negative control, medium alone was added. Exposed and non-exposed cells were incubated for 1 to 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### ***Cytokine mRNA expression***

The expression of several pro-inflammatory cytokines was determined in PAMs exposed to planktonic or biofilm bacteria using qRT-PCR. To begin, non-adherent PAMs were rinsed away, and the remaining attached macrophages were collected in Trizol reagent, and RNA was

extracted as described by the manufacturer (Invitrogen). Purified mRNA was resuspended in 30 $\mu$ L of RNase-free water. Total RNA from samples was stored at -80°C until reverse-transcription was done. Quantification of RNA was performed with a Nanodrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). 1 $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to manufacturer's instructions. cDNA was amplified using the SsoFast™ EvaGreen\_Supermix kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA). The primers used for amplification<sup>32-34</sup> are presented in **Table 1**. Primer sequences were all designed from the NCBI GenBank mRNA sequences using web-based software primerquest from Integrated DNA technologies ([www.idtdna.com/SciTools](http://www.idtdna.com/SciTools)). 16-place Cepheid Smart Cycler® System apparatus (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), was used for the cDNA amplification. Quantification of differences between groups was calculated using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> method.  $\beta$ 2-microglobulin was used as normalizing gene to compensate for potential differences in cDNA amounts. Non-infected PAM cells were used as a calibrator in the analysis.

### ***IL-8 quantification by ELISA***

Levels of IL-8 in cell culture supernatants were measured by sandwich ELISA using pair-matched antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations. Twofold dilutions of recombinant porcine IL-8 (R&D Systems) were used to generate the standard curves. Sample dilutions giving optical density readings in the linear portion of the standard curve were used to quantify the levels of IL-8.

### ***Proliferation of porcine peripheral blood mononuclear cells***

The procedures for animal care followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the protocol for blood collection was approved by our Institutional Animal Care Committee (Protocol 13-Rech-1558). Blood was collected from 4 healthy pigs (3 to 10 weeks of age) into heparinized tubes, and mononuclear cells were isolated using lymphocyte separation medium (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) centrifugation at  $400 \times g$  for 30 min. The buffy coat containing mononuclear cells was isolated, transferred to a fresh centrifuge tube, and washed twice with PBS. The final cell pellet containing peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was resuspended to a final level of  $2 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate,  $5 \times 10^{-5}$  M mercaptoethanol (Invitrogen), 0.1 mg/mL streptomycin/100U penicillin solution and 10% FBS (heat inactivated). Fresh isolated PBMCs cells were incubated with planktonic and biofilm cells ( $2 \times 10^7$  cells/mL). As positive control, concanavalin A (5 ug/mL; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was used and fresh RPMI 1640 medium was used as negative control.

Cell proliferation was measured upon completion of the 48 h incubation period using a BrdU-ELISA kit (Millipore, Billerica, MA, USA) as per manufacturer instructions. In brief, kit-provided BrdU labeling solution (20  $\mu$ L) was added to each well and the plate was incubated at 37°C for 24 h. Thereafter, the cells were centrifuged at  $300 \times g$  for 10 min, the labeling solution was removed, and the cells were fixed by addition of fixative/denaturing solution (200  $\mu$ L/well) and incubation at room temperature for 30 min. Antibody conjugate (anti-BrdU solution, 100  $\mu$ L/well) was then added and the plate was incubated at room temperature for 1h. The cells were then washed twice with washing buffer (200  $\mu$ L) and a peroxidase goat anti-mouse IgG HRP conjugate (100  $\mu$ L) was added to each well for 30 min. Again, the cells were washed twice with



washing buffer (200  $\mu$ L). Substrate solution (100  $\mu$ L) was added to the wells and incubated in the dark at room temperature for 15 min. Then 100 $\mu$ L of stop solution was added and the absorbance in each well was measured at 450 nm in an automated plate reader (Powerwave, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Blanks (100  $\mu$ L culture medium alone) and control wells were included in each experiment.

### ***Statistical analysis***

qRT-PCR, ELISA and PBMCs proliferation assays data were analyzed statistically using GraphPad Prism software (version 4.03, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) by application of Wilcoxon-Mann-Whitney test or one-way ANOVA with Bartlett's test.  $p < 0.05$  or  $< 0.01$  were considered reflecting statistically significant differences.

## RESULTS

### *Lipid A structure analysis*

Lipid A molecules were extracted following a validated protocol<sup>31</sup> and their relative abundance in *A. pleuropneumoniae* planktonic and biofilm cells were analyzed using mass spectrometry. For both planktonic and biofilm cells, a total of 228 distinct molecular entities were observed and compared. Analyses were performed using an untargeted HPLC-HRAM MS lipidomic workflow. After data acquisition, the results were processed using bioinformatics software SIEVE 2.1 to perform retention time alignment and identify specific ions (i.e.  $m/z$ ) that differed between planktonic and biofilm cell groups. The  $m/z$  values for peaks of interest were searched in public metabolite/lipid databases (i.e. METLIN, mzCloud and Lipid MAPS) to obtain putative identifications without success. This is not surprising since the lipid A molecular structure and associated molecules for *A. pleuropneumoniae* remain unknown and not available in public databases. Following peak alignment and identification from biofilm lipid A ( $n = 3$ ) and planktonic lipid A ( $n = 3$ ), relative ion intensities and  $m/z$  values were used to study the molecular abundance distribution and modifications between the two cell states. Extracted data were represented using volcano plot with a  $p$  value = 0.01 (CI of 99%) and a two-fold change cut off were assumed to be biologically significant. **Figure 1(a)** illustrates the significant variations in lipid A abundance and molecular structures between *A. pleuropneumoniae* planktonic and biofilm cells with representative chromatograms shown in **Figure 1(b)**.

Following an exhaustive analysis, a total of 23 lipid A structures in the planktonic fraction and 17 in the biofilm fraction were found to be significantly different (**Figure 2(a)**). Inspection of the

detected peaks (m/z) revealed an interesting shift of the lipid A towards higher molecular weight in biofilm cells, as shown in **Figure 2(b)**.

### ***Activation of Macrophages***

Relative mRNA expression of pro-inflammatory cytokine genes (IL-1, IL-6, IL-8 and MCP-1) was measured in PAM cells following exposition to either inactivated *A. pleuropneumoniae* biofilm or planktonic cells. The expression of all tested cytokines mRNA was up-regulated when PAMs were exposed to *A. pleuropneumoniae* cells compared to unexposed control cells. qRT-PCR data showed an early expression of all cytokines tested when exposed to planktonic cells (**Figure 3**). A peak value is reached at 1 h post-stimulation and declined shortly except for IL-8, which demonstrated a particularly high and sustained expression compared with the other cytokines. Two other peaks at 8h and 24h post-stimulation for the MCP-1, and one peak for the IL-1 at 24h post-stimulation were observed. These peaks could be the result of an autoactivation process caused by the increase of cytokines in the culture media.

Interestingly, exposition of macrophages to *A. pleuropneumoniae* biofilm cells appeared to induce significantly lower expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines in general compared to macrophages exposed to planktonic cells ( $P<0.05$ ) (**Figure 3**).

The level of cytokine IL-8 in the supernatant of PAM cells following exposition to either *A. pleuropneumoniae* biofilm or planktonic cells was also measured by ELISA at 1h, 2h, 4h and 8h (**Figure 4**). Our results demonstrated that the amount of IL-8 tends to increase with time. As expected, levels of IL-8 detected at 4h and 8h post-stimulation with biofilm cells were significantly lower compared to levels obtained with planktonic cells ( $P<0.05$ ), confirming mRNA results.

### ***Porcine peripheral blood mononuclear cells proliferation***

Since *A. pleuropneumoniae* biofilm induces less activation of PAMs, we hypothesized that biofilms cells could also modulate the proliferative response of PBMCs. PBMCs were exposed to both biofilm and planktonic cells, and the proliferation was evaluated and compared to unexposed cells (negative controls) (**Figure 5**). As expected, a significantly higher proliferation was observed when immune cells were exposed to concanavalin A or *A. pleuropneumoniae* cells (planktonic and biofilm) compared to unexposed cells control ( $P<0.05$ ). The proliferative response of PBMCs exposed to planktonic and biofilm cells was then evaluated. Biofilm cells induced a lower response compared to their planktonic counterparts ( $P<0.05$ ) (**Figure 5**).

## DISCUSSION

Lipopolysaccharide (LPS) has been implicated as one of the major virulence factors in *A. pleuropneumoniae*<sup>18,36-38</sup> and other Gram-negative bacteria.<sup>39,40</sup> LPS has several functions. First of all, it protects bacteria by establishing a permeability barrier.<sup>40-42</sup> The biological activity of LPS stems from its hydrophobic anchor, lipid A,<sup>39</sup> which stimulates the Toll-like receptor 4 (TLR4), found on the surface of monocytes, macrophages and neutrophils.<sup>43-45</sup> Lipid A will first bind the co-receptor MD-2, before interacting with the TLR4 receptor.<sup>43,44</sup> The formed complex TLR-4/MD-2/LPS subsequently activates transcription factor NF-kB and pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and IL-8.<sup>45,46</sup> Several structural modifications in lipid A, such as the loss of phosphate groups and variation in length and number of the fatty acyl chains, have an important role in TLR4 recognition and response.<sup>40,45,47-50</sup> Variations in lipid A structure provide bacteria fitness advantages to colonize surfaces, evade the immune system and persist during infections.<sup>49,51,52</sup> Some of these variations are associated with chronic infection<sup>51,53</sup> and biofilm formation.<sup>47</sup>

Biofilm bacteria are encased within a polymeric matrix that contains among other things, polysaccharides, extracellular DNA, proteins and lipids.<sup>54-56</sup> They are frequently associated with chronic disease<sup>25,26,57</sup> and represent a serious therapeutic challenge, since bacteria within biofilm exhibit enhanced antibiotic tolerance and are more resistant to clearance by the immune system.<sup>3,11,24,57</sup> We recently demonstrated that LPS has an important role in biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*, and that a biofilm matrix exopolysaccharide, poly-N-acetyl-D-glucosamine, can interact specifically with LPS<sup>30</sup>. However, the impact on host cells of LPS and particularly lipid A in biofilms remains to be determined.

In this study, using an HPLC-HRAM MS untargeted lipidomic based approach, we demonstrated that lipid A molecular structure seems to be influenced by the bacterial mode of growth (sessile or planktonic). Planktonic and biofilm cells differed significantly in lipid A structure and quantity, with larger lipid A molecular entities observed in biofilm cells. This constitutes an additional manner biofilm cells differ phenotypically from their free-floating counterparts.<sup>58-60</sup> However, further analyses will be required to determine molecular identity (i.e. extensive purification and <sup>1</sup>H / <sup>13</sup>C NMR).

Lipid A contributes to cell rigidity by increasing cell wall strength.<sup>61,62</sup> During biofilm formation, embedded bacteria may exert pressure on their neighbors,<sup>62</sup> and the increased molecular interactions could favor reactions leading to modified lipid A structures and cell surface remodeling.

Several studies have demonstrated that biofilms can undergo LPS structural modifications that modulate the immune response.<sup>47,48,51</sup> Recently, Chalabaev and colleagues described an interesting biofilm associated-phenotype linked to lipid A structure.<sup>47</sup> They found that among several Gram-negative bacteria, including *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, lipid A can undergo palmitoylation, and these changes were found to be more abundant in biofilm than in planktonic cells.<sup>47</sup> Lipid A structural modifications, including addition of arabinose and palmitate were also observed in *P. aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis, a chronic lung infection wherein biofilms have a preponderant role.<sup>51,53</sup> These modifications were associated with resistance to host innate defenses and persistence.<sup>53</sup> In biofilms, lipid A modification may confer a fitness advantage by enabling bacteria to escape and survive host defense systems, by increasing steric hindrance, and by promoting chronic infection.

Cytokines like IL-1, IL-6, IL-8 and MCP-1 play important roles in mediating inflammatory response to pathogens. Pro-inflammatory IL-8 and MCP-1 trigger neutrophils migration to the site of the infection. One of our objectives was to see how planktonic and biofilm *A. pleuropneumoniae* cells interact with immune cells. Our data indicate that biofilm cells trigger a different innate immune response than do planktonic cells. Previous studies showed that *A. pleuropneumoniae* infections were followed by increased TNF, IL-1 and IL-8 mRNA expression. These cytokines were detected at the periphery of the lung lesion.<sup>17,63</sup> Increased inflammatory cytokine levels were also seen in lung lesions from acute porcine pleuropneumonia.<sup>17,63</sup>

Using IL-10 gene therapy, Morrison et al. demonstrated that this anti-inflammatory cytokine can diminish levels of pro-inflammatory cytokines, IL-1 and TNF $\alpha$ , and consequently reduce lung damage and severity in pleuropneumonia.<sup>20</sup> In this study, we observed that levels of pro-inflammatory cytokines were significantly lower in PAMs exposed to biofilm cells compared to those exposed to planktonic cells. Furthermore, porcine PBMCs exhibited a lower proliferative response when exposed to biofilm compared to planktonic cells. Overall our data suggest that the biofilm mode of growth mitigates the innate immune response to this pathogen.

The role of biofilm in chronic disease and low-level inflammation response is increasingly recognized. Many studies support this hypothesis.<sup>64,65</sup> Daw et al. showed that macrophages infected with of *Enterococcus faecalis* biofilm cells secreted lower pro-inflammatory cytokine levels compared to planktonic cells.<sup>66</sup> Similarly, macrophages infected with *Legionella pneumophila* biofilm exhibited significantly lower levels of pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , compared to those infected with planktonic bacteria.<sup>67</sup> In this way, biofilm-derived *L. pneumophila* avoids major inflammatory responses and recruitment of inflammatory cells.<sup>67</sup> Similarly, Thurlow et al. demonstrated that *Staphylococcus aureus* biofilm evades TLR recognition and alters the immune response to infection.<sup>68</sup> Indeed, several inflammatory signals

including MCP-1, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  were significantly attenuated in *S. aureus* biofilm-infected tissues compared to the wound healing response elicited by insertion of sterile catheter.<sup>68</sup>

Less lung lesions and low inflammation and are often associated with the chronic form of pleuropneumonia<sup>17,20,63</sup> suggesting the involvement of biofilm. *A. pleuropneumoniae* growing in biofilm may overcome host defenses by modifying its lipid A structure, which enables a lower immune reactivity. However, lipid A structural modifications may not be the sole cause of the immune dysfunction observed here and other bacterial surface components may also be implicated. Further studies will be needed to demonstrate the direct impact of these biofilm associated-lipid A structural modifications in the altered immune response.

The lipid A structure in *A. pleuropneumoniae* has yet to be elucidated. However, fatty acids in the lipid A of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 were identified, and it was shown that lipid A contains different proportions of n-dodecanoic acid (0.6%), n-tetradecanoic acid (12.9%), 3-hydroxytetradecanoic acid (64.3%), n-hexadecanoic acid (3.2%), and n-octadecanoic acid (0.6%).<sup>69</sup> Knowing lipid A structure and the fatty acids arrangement in *A. pleuropneumoniae* would help to identify the modifications occurring in lipid A during the switch from planktonic to biofilm form and identify their impact on immune response.

This study demonstrates that the *A. pleuropneumoniae* biofilm mode of growth has an impact on lipid A structure and mitigates the innate immune response. Further investigation must focus on these lipid A modifications associated with lower immune cells stimulation.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The mutant strain *A. pleuropneumoniae* MBHPP147 was kindly provided by Ruud P.A.M Segers (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands). We would like to thanks Philip Dominico for reading the manuscript and providing precious advices. Thermo Fisher Scientific provided generous access to a Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer to FB.

## **FUNDING**

This work was supported by a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC grant 003428) to MJ; SH and LM received a scholarship from the Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA); the analyses were performed using analytical instruments acquired with an NSERC Research Tools and Instruments grant to FB (439748-2013); partial funding was also provided by NSERC (grant 342150) to MS.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## REFERENCES

1. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999; **11**:217-221.
2. Hall-Stoodley L, Costerton JW and Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**:95-108.
3. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**:322-332.
4. Donlan RM and Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**:167-193.
5. Cerca F, Franca A, Perez-Cabezas B et al. Dormant bacteria within *Staphylococcus epidermidis* biofilms have low inflammatory properties and maintain tolerance to vancomycin and penicillin after entering planktonic growth. *J Med Microbiol* 2014 ; doi:10.1099/jmm.0.073163-0.
6. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PO et al., Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev* 2014 ; doi:10.1016/j.addr.2014.11.017.
7. Kaplan J and Mulks M. Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 2005; **108**:89 - 94.
8. Tremblay Y, Deslandes V and Jacques M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes expression in biofilms cultured under static conditions and in a drip-flow apparatus. *BMC Genomics* 2013; **14**:364.
9. Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V et al. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res* 2010 ; **41**:3.

10. Tremblay YD, Lévesque C, Segers RP et al. Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Vet Res* 2013; **9**:213.
11. Archambault M, Harel J, Goure J et al. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Drug Res* 2012; **18**:198 - 206.
12. Losinger WC. Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on grower/finisher swine operations in the United States. *Prev Vet Med* 2005; **68**:181-193.
13. Bosse J, Janson H, Sheehan B et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* 2002; **4**:225 - 235.
14. Gottschalk M. Actinobacillosis. In: L Karriker, A Ramirez, K Schwartz, G Stevenson, J Zimmerman (eds). *Diseases of Swine*. 10th ed. Wiley: Hoboken, NJ, 2012, pp. 653-669.
15. Rayamajhi N, Shin SJ, Kang SG et al. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *J Vet Diagn Invest* 2005; **17**:359-362.
16. Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol* 1997; **58**:239-249.
17. Baarsch MJ, Scamurra RW, Burger K et al. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1995 ; **63**:3587-3594.
18. Ramjeet M, Deslandes V, St Michael F et al. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Biol Chem* 2005; **280**:39104-39114.

19. Huang H, Potter AA, Campos M et al. Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumonia*, part II: roles of proinflammatory cytokines. *Can J Vet Res* 1999; **63**:69-78.
20. Morrison DF, Foss DL and Murtaugh MP. Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infect Immun* 2000; **68**:4752-4758.
21. Reiner G, Fresen C, Bronnert S et al. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *J Wildl Dis* 2010; **46**:551-555.
22. MacInnes JI, Gottschalk M, Lone AG, et al. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* 2008; **72**:242-248.
23. Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv Appl Microbiol* 2014; **86**:1-40.
24. Domenech M, Ramos-Sevillano E, Garcia E et al. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2013 ; **81**:2606-2615.
25. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 2004; **279**:54881-54886.
26. Bjarnsholt T.. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl* 2013; doi:10.1111/apm.12099:1-51.
27. Burmolle M, Thomsen TR, Fazli M et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; **59**:324-336.

28. Jacques M, Aragon V and Tremblay Y. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 2010; **11**:97 - 121.
29. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol* 2007; **121**:1-17.
30. Hathroubi S, Hancock MA, Bosse JT et al. Surface polysaccharide mutants reveal that absence of O antigen reduces biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 2015; **84**:127-137 doi:10.1128/IAI.00912-15.
31. El Hamidi A, Tirsoaga A, Novikov A et al. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J Lipid Res* 2005; **46**:1773-1778.
32. Lévesque C, Provost C, Labrie J et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* 2014 **9**: e98434.
33. Savard C, Pinilla V, Provost C et al. *In vitro* effect of deoxynivalenol (DON) mycotoxin on porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Food Chem Toxicol* 2014; **65**:219-226.
34. Dang Y, Lachance C, Wang Y et al. Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*. *BMC Vet Res* 2014; **10**:86.
35. Wang Y, Gagnon CA, Savard C et al. Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 2013; **81**:4498-4508.

36. Jacques M. Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* 2004; **68**:81-85.
37. Ramjeet M, Cox AD, Hancock MA et al. Mutation in the LPS outer core biosynthesis gene, galU, affects LPS interaction with the RTX toxins ApxI and ApxII and cytolytic activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Mol Microbiol* 2008; **70**:221-235.
38. Huang H, Potter AA, Campos M, et al. Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Part I. Effects of surface components of *Actinobacillus pleuropneumoniae* *in vitro* and *in vivo*. *Can J Vet Res* 1998; **62**:93-101.
39. Raetz CR and Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:635-700.
40. Penterman J, Nguyen D, Anderson E et al. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Rep* 2014 ; **6**:293-300.
41. Snyder DS and McIntosh TJ. The lipopolysaccharide barrier: correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics. *Biochemistry* 2000, **39**:11777-11787.
42. Vaara M and Nurminen M. 1999. Outer membrane permeability barrier in *Escherichia coli* mutants that are defective in the late acyltransferases of lipid A biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1459-1462.
43. Meng J, Gong M, Björkbacka H et al. Genome-wide expression profiling and mutagenesis studies reveal that lipopolysaccharide responsiveness appears to be absolutely dependent on TLR4 and MD-2 expression and is dependent upon intermolecular ionic interactions. *J Immunol* 2011; **187**:3683-3693.

44. Park BS and Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 2013; **45**:e66.
45. Shah NR, Albitar-Nehme S, Kim E, et al. Minor modifications to the phosphate groups and the C3' acyl chain length of lipid A in two *Bordetella pertussis* strains, BP338 and 18-323, independently affect Toll-like receptor 4 protein activation. *J Biol Chem* 2013; **288**:11751-11760.
46. Medzhitov R and Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; **173**:89-97.
47. Chalabaev S, Chauhan A, Novikov A et al. Biofilms formed by gram-negative bacteria undergo increased lipid a palmitoylation, enhancing *in vivo* survival. *MBio* 2014; **5**.
48. Ciornei CD, Novikov A, Beloin C et al. Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun* 2010; **16**:288-301.
49. Needham BD and Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2013; **11**:467-481.
50. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**:295-329.
51. Ernst RK, Moskowitz SM, Emerson JC et al. Unique lipid a modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2007; **196**:1088-1092.
52. Kawahara K, Tsukano H, Watanabe H et al. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect Immun* 2002; **70**:4092-4098.

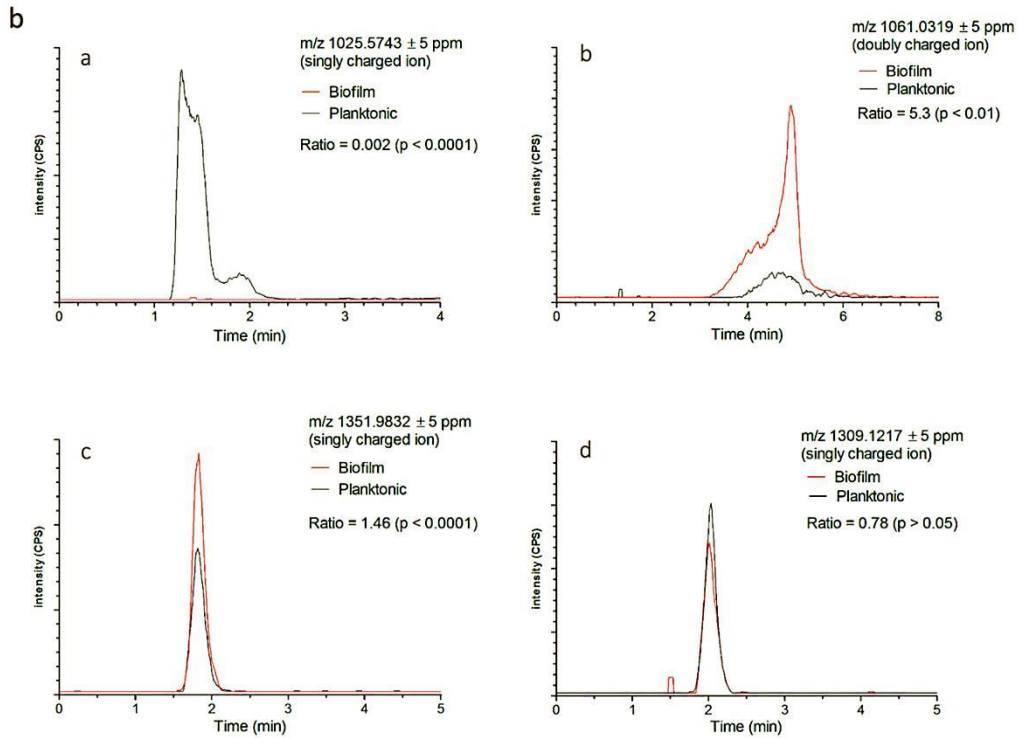
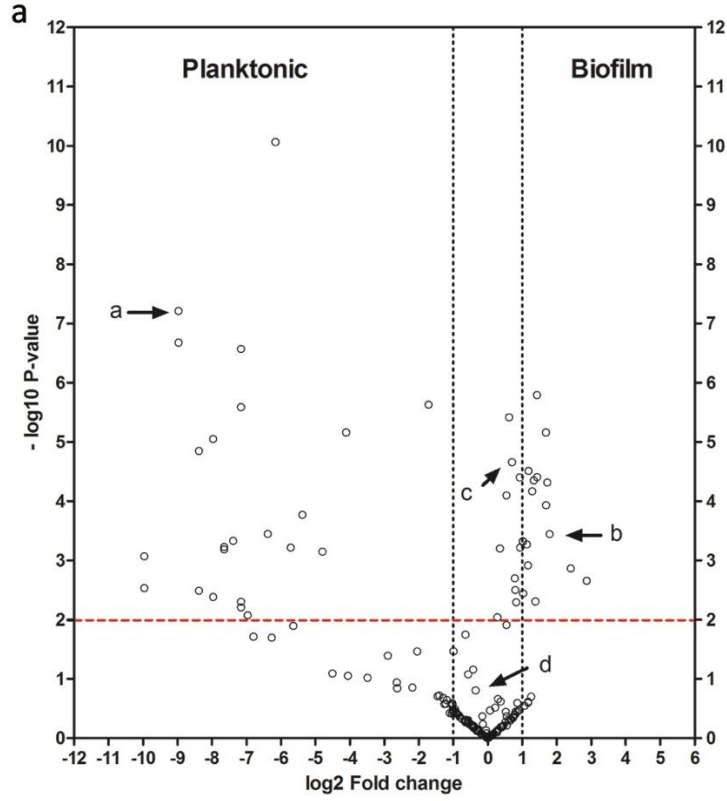
53. Ernst RK, Adams KN, Moskowitz SM et al.. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J Bacteriol* 2006; **188**:191-201.
54. Öner ET. Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass, p 35-56. In: Fang Z (ed) *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*. Springer Berlin Heidelberg, 2013, doi:10.1007/978-3-642-32735-3\_2.
55. Flemming HC and Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**:623-633.
56. Flemming HC, Neu TR and Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007; **189**:7945-7947.
57. Costerton J, Stewart P and Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**:1318 - 1322.
58. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; **184**:1140-1154.
59. Drenkard E and Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002; **416**:740-743.
60. Stewart PS and Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008; **6**:199-210.
61. Silhavy TJ, Kahne D and Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**:a000414.
62. Lambert G, Bergman A, Zhang QC et al. Physics of biofilms: the initial stages of biofilm formation and dynamics. *New J Phys* 2014; **16**.
63. Brogaard L, Klitgaard K, Heegaard PM et al. Concurrent host-pathogen gene expression in the lungs of pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics* 2015; **16**:417.



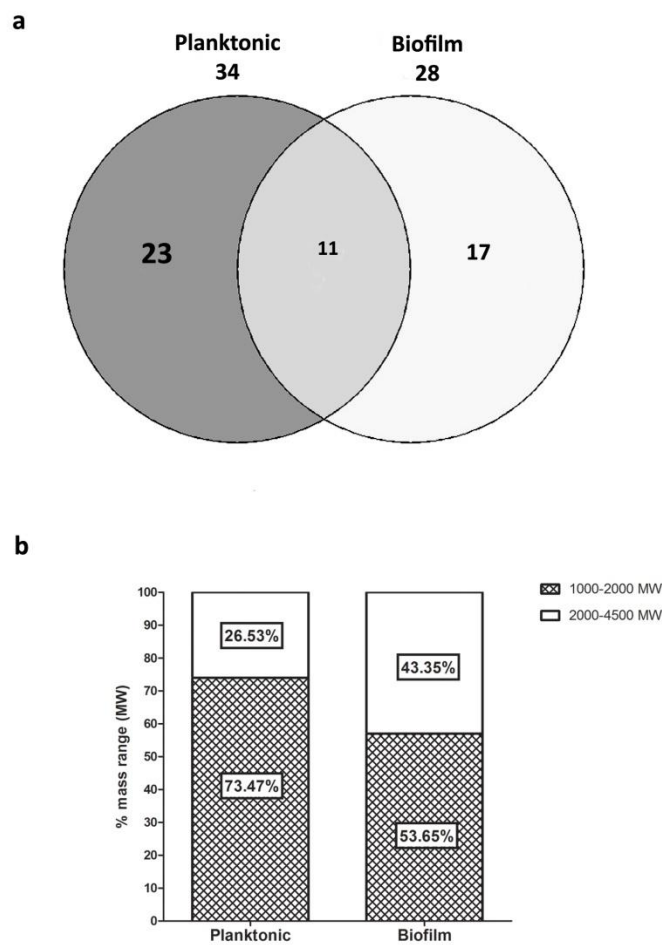
64. Roilides E, Simitopoulou M, Katragkou A et al. How biofilms evade host defenses. *Microbiol Spectr* 2015 ; doi: 10.1128/microbiolspec.
65. Hanke ML and Kielian T. Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; **2**:62.
66. Daw K, Baghdayan AS, Awasthi S et al. Biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; **65**:270-282.
67. Abu Khweek A, Fernandez Davila NS, Caution K et al. Biofilm-derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; **3**:18.
68. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J Immunol* 2011; **186**:6585-6596.
69. Altman E, Brisson JR and Perry MB. Structure of O-chain of the lipopolysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem Cell Biol* 1986; **64**:1317-1325

**Table 1.** Primers used for quantitative real-time reverse-transcriptase (RT)-PCR.

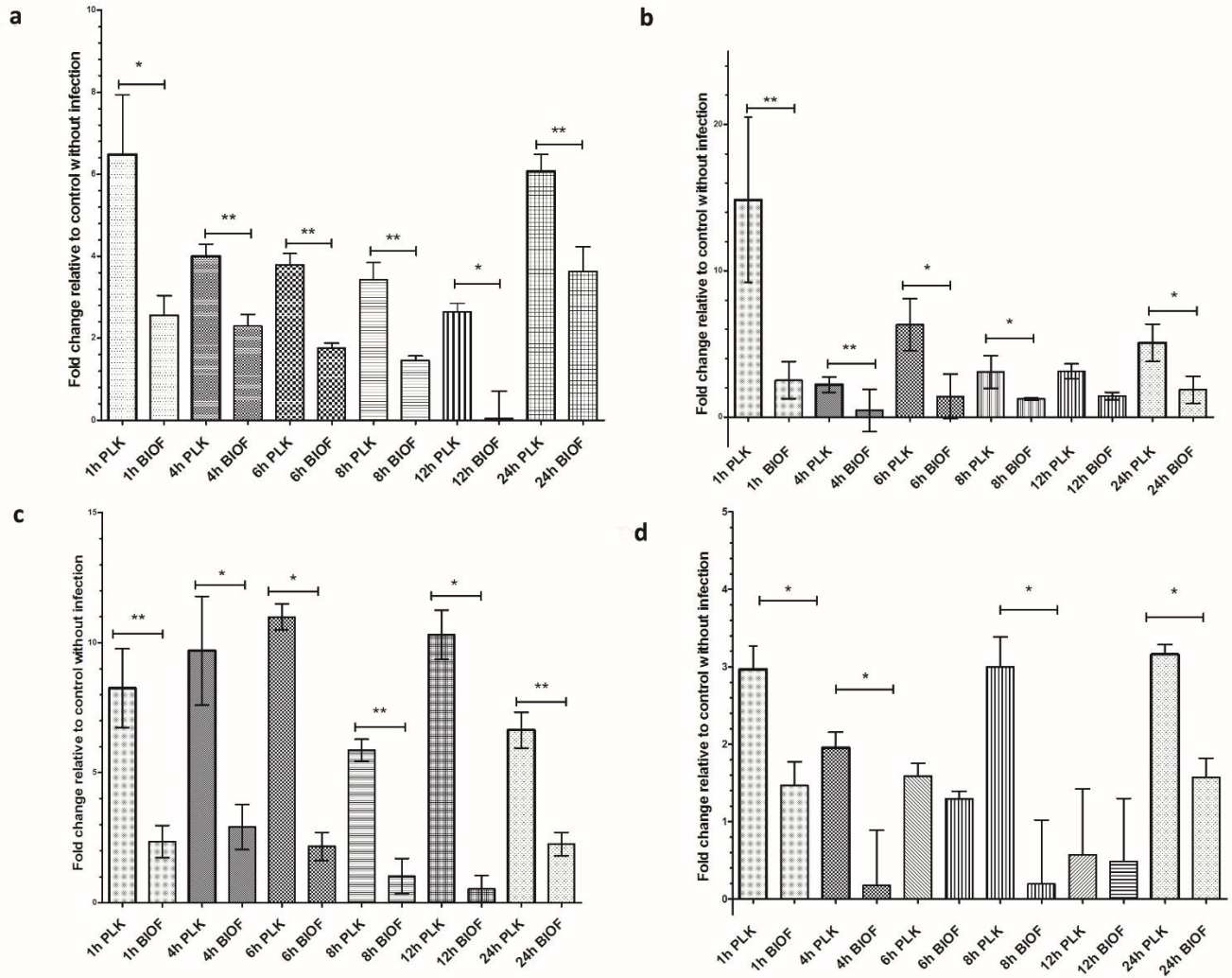
<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>Size (bp)</b>	<b>References</b>
<b>β2m</b>	B2m_Fw CGTGGCCTTGGTCCTGCTCG	103	(33)
	B2m_Rev TCCGTTTTCCGCTGGGTGGC		
<b>IL-1α</b>	IL1a_Fw TGAAGATGGCCAAAGTCCCTGACCT	152	(34)
	IL1a_Rev ATCCATGCCGTCCCCAGGAAGTG		
<b>IL-6</b>	IL6_Fw ACTCCCTCTCCACAAGCGCCTT	105	(34)
	IL6_Rev TGGCATCTTCTTCCAGGCGTCCC		
<b>IL-8</b>	IL8_Fw TGTGAGGCTGCAGTTCTGGCAAG	80	(34)
	IL8_Rev GGGTGGAAAGGTGTGGAATGCGT		
<b>MCP-1</b>	MCP-1_Fw CAGGTCCTTGCCCAGCCAGATG	143	(35)
	MCP-1_Rev CACAGATCTCCTTGCCCCGCGA		



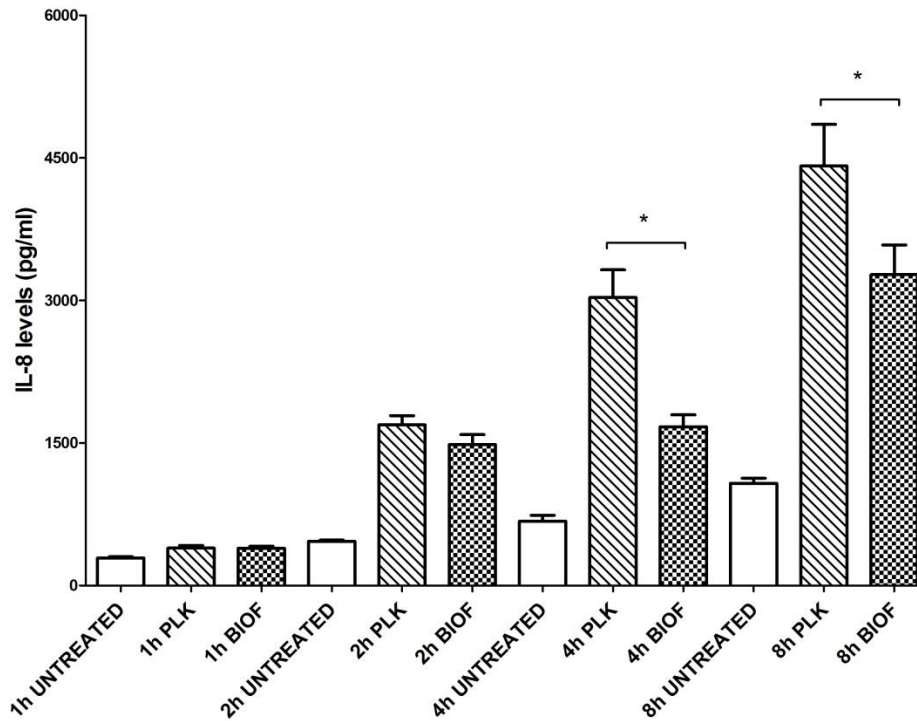
**Figure 1.** (a) Volcano plot of distribution of *A. pleuropneumoniae* lipid A structures isolated from biofilm cells (n = 3) or planktonic cells (n = 3). The volcano plot displays the relationship between fold-change and significance between the two groups, using a scatter plot view. The y-axis is the negative log<sub>10</sub> of *P* values (a higher value indicates greater significance) and the x-axis is log<sub>2</sub> fold change or the difference in abundance between two experimental groups. The dashed red-line shows where  $p = 0.01$  with points above the line having  $P < 0.01$  and points below the line having  $P > 0.01$ . (b) Chromatograms of structures indicate by black arrows in the volcano plot.



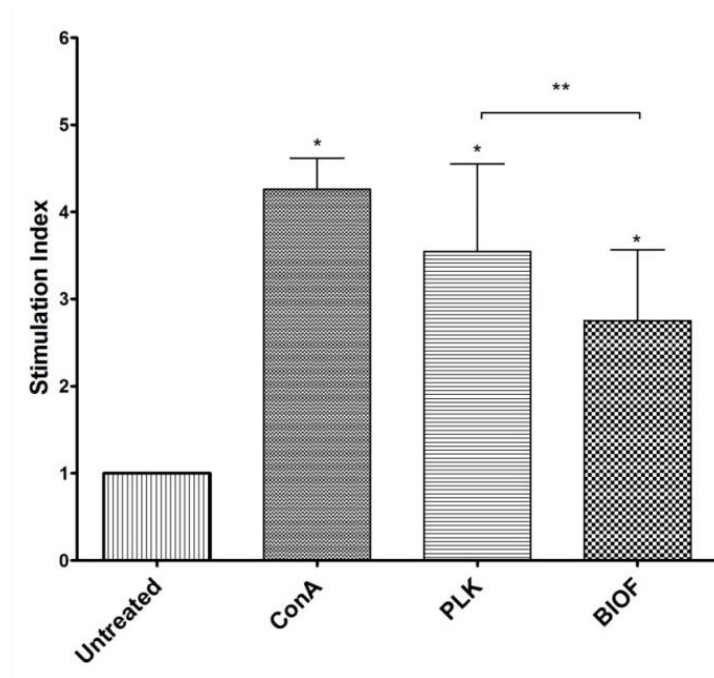
**Figure 2.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm and planktonic lipid A structures distribution. (a) Venn diagram showing the differential abundance of lipid A structures between planktonic and biofilm cells with two fold change or higher and  $P$  value  $> 0.01$ . (b) Distribution of small (1000-2000 Da) and large (2000-4500 Da) molecular weight (MW) lipid A structures in biofilm and planktonic cells.



**Figure 3.** Cytokine expression in porcine pulmonary alveolar macrophages exposed to biofilm (BIOF) or planktonic (PLK) cells of *A. pleuropneumoniae* (MOI 10:1) for different time periods (1h to 24h). Fold changes in mRNA expression of (a) IL-1, (b) IL-6, (c) IL-8 and (d) MCP-1 relative to the uninfected control are presented. The means  $\pm$  SD from 3 independent experiments are shown. Statistical analyses were performed using  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values and all results with (\*) or (\*\*) were statistically significant ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  respectively).



**Figure 4.** IL-8 production by PAMs in response to stimulation by planktonic (PLK) and biofilm (BIOF) cells (MOI 10:1) for different time periods (1h to 8h). Data are expressed as mean  $\pm$  SD (in pg/ml) from at least three independent experiments and results with (\*) were statistically significant ( $P < 0.05$ ).



**Figure 5.** Proliferation of porcine peripheral blood monocytes exposed to biofilm and planktonic cells of *A. pleuropneumoniae* ( $2 \times 10^7$  cells/mL). Proliferation rate in PBMCs stimulated with concanavalin A (ConA), planktonic (PLK) and biofilm cells (BIOF) of *A. pleuropneumoniae* was evaluated using a BrdU-ELISA assay. The means  $\pm$  SD from 3 independent experiments are shown. (\*) or (\*\*), results were statistically significant ( $P < 0.05$ ).



## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

Le biofilm d'*A. pleuropneumoniae* est une structure complexe qui implique plusieurs facteurs dont plusieurs demeurent encore peu connus. De plus, le rôle du biofilm dans la pathogénicité n'a pas encore été déterminé et cela malgré le grand nombre d'évidences de l'impact de la croissance en biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. Dans ce projet de recherche nous avons comme objectifs d'établir le rôle des polysaccharides de surface dans la formation du biofilm chez *A. pleuropneumoniae* et d'évaluer l'effet des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques sur la production du biofilm mais également sur sa structure et sa composition. Finalement, nous avons évalué la réponse cellulaire des macrophages alvéolaires et la prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique suite à des infections *in vitro* par des cellules d'*A. pleuropneumoniae* planctoniques et isolées de biofilms dans l'espoir d'apporter plus d'information sur l'impact du biofilm sur la réponse inflammatoire innée.

### **I. Rôle des polysaccharides de surface (CPS et LPS) dans la formation du biofilm**

La position des polysaccharides de surface à l'interface bactérie-surface est essentielle pour l'adhésion (Rioux, Galarneau et al. 1999, Rioux, Galarneau et al. 2000, Labrie, Rioux et al. 2002), et par conséquent, elle pourrait jouer un rôle clé dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*, en facilitant l'attachement, la formation des microcolonies et/ou la maturation du biofilm. De plus, plusieurs déterminants génétiques incluant des gènes codant pour la biosynthèse des LPS, CPS et du PGA ont été récemment associés à la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Bossé, Sinha et al. 2010, Grasteau, Tremblay et al. 2011, Tremblay, Deslandes et al. 2013).

Afin de déterminer le rôle des polysaccharides de surface dans la formation du biofilm, nous avons utilisé lors de cette étude (Article 1) des mutants bien caractérisés: un mutant LPS rugueux, n'exprimant pas l'antigène O (44.1); un mutant LPS présentant un noyau oligosaccharidique tronqué, mais exprimant toujours l'antigène O (CG3); un mutant capsule (33.2); et un mutant *pgaC* ne produisant plus d'exopolysaccharide (Tableau 1, Article 1). La formation du biofilm a été évaluée en utilisant un modèle statique sur des plaques de polystyrène de 96 puits ainsi qu'un modèle dynamique en flux de goutte («drip flow reactor») plus représentatif de l'environnement pulmonaire (Tremblay, Deslandes et al. 2013). Dans ces deux modèles, nous avons démontré que le mutant antigène O 44.1 était incapable de former un biofilm mature (Figure 1, Article 1). En effet, seulement quelques microcolonies ont été observées pour le mutant antigène O représentant quelques bactéries adhérees aux surfaces (Figure 2, Article 1). Ces structures sont bien différentes des structures de biofilms matures formés par le mutant noyau oligosaccharidique CG3, le mutant acapsulaire 33.2 et la souche parentale (Figure 2, Article 1). Pour cette étude nous avons également utilisé le mutant *pgaC* ayant une insertion au niveau du gène codant pour la glycotransférase essentielle à la biosynthèse du PGA. Ce dernier est incapable de produire un biofilm (Figure 3, Article 1) et de manière similaire au mutant antigène O, le mutant *pgaC* démontre une incapacité à produire un biofilm mature et seulement quelques microcolonies sont observées lors de la croissance en condition de biofilm. Ces résultats nous ont permis de démontrer que l'absence de l'antigène O altère la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. Ces résultats concordent avec des études précédentes associant la perte de l'antigène O à une perte de capacité à produire un biofilm chez d'autres espèces bactériennes (Huang, Somers et al. 2006, Ciornei, Novikov et al. 2010, Clifford, Rapicavoli et al. 2013, Wang, Vinogradov et al.

2013, Chassaing, Garénaux et al. 2015). Cependant, les mécanismes derrière cet effet sur la biomasse, la composition et l'architecture du biofilm restent flous.

Dans le but d'établir le lien entre le défaut de formation du biofilm et l'absence de l'antigène O nous avons ciblé plusieurs facteurs importants lors des étapes de formation du biofilm tels que l'adhésion aux surfaces, la production de PGA et les interactions possibles entre le PGA et le LPS. L'adhésion aux surfaces étant une étape cruciale dans la formation du biofilm, nous avons donc évalué l'attachement initial du mutant antigène O 44.1 sur les plaques de 96 puits (Figure S1, Article 1). Ce test a démontré que l'attachement du mutant 44.1 n'est pas affecté. L'antigène O ne semble pas être impliqué dans l'adhésion et le défaut de formation du biofilm du mutant 44.1 ne peut être expliqué par une altération de l'adhésion. Ces résultats ne sont pas surprenants puisqu'à l'aide de microscopie confocale, nous avons observé chez le mutant antigène O plusieurs microcolonies réparties à la surface des puits (Figure 2, Article 1) ce qui confirme que ces mutants sont capables d'y adhérer. De plus des travaux précédents ont démontré que la perte de l'antigène O chez *A. pleuropneumoniae* n'a aucun impact sur l'hydrophobicité et les charges globales retrouvées à la surface de ces mutants (Labrie, Rioux et al. 2002). Ces charges sont impliquées dans l'attachement initial aux surfaces (Labrie, Rioux et al. 2002).

Nous avons par la suite étudié l'interaction entre l'exopolysaccharide PGA et les LPS issus de la souche mutante 44.1 et de la souche parentale par résonance plasmonique de surface (Figure 5, Article 1). L'expérience avait pour objectifs (i) de déterminer les interactions entre le PGA et les LPS et (ii) d'évaluer le rôle de l'antigène O dans ces interactions. En effet, l'antigène O présentant des longues structures ramifiées et chargées négativement pourrait être essentiel à l'attachement des PGA produit lors de la formation du biofilm. Une étude chez *E. coli* a démontré des interactions spécifiques entre les LPS et le PGA. En effet, le PGA chargé

positivement interagissait avec les charges négatives portées par les groupements phosphates des LPS (Amini, Goodarzi et al. 2009).

Lors de cette étude nous avons également démontré une interaction spécifique entre le PGA et les LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Cependant, cette interaction semble être indépendante de la présence de l'antigène O puisque les LPS du mutant 44.1 interagissent également avec le PGA de manière semblable de celles observées avec les LPS de la souche parentale (Figure 5, Article 1).

Afin d'évaluer un possible effet sur la production du PGA chez le mutant antigène O, nous avons effectué une immunodétection du PGA associé aux bactéries à l'aide d'anticorps spécifiques. Cette étude semi-quantitative nous a permis de démontrer que la quantité de PGA associée au mutant antigène O 44.1 est bien inférieure à celle associée aux cellules de la souche parentale (Figure 6, Article 1). De plus, le mutant antigène O 44.1 relâche moins de PGA dans le surnageant du biofilm que la souche parentale (Figure 6, Article 1). L'étude de l'expression du gène *pgaA* a également révélé une diminution d'environ 6 fois de la quantité des transcrits par rapport à la souche parentale (Figure 7, Article 1) et confirme donc les résultats obtenus par immunoblot. Ces résultats démontrent donc que la diminution de production de PGA est vraisemblablement responsable du défaut de production de biofilm chez le mutant antigène O 44.1. Il est important de noter que le mutant antigène O 44.1 utilisé dans cette étude est affecté au niveau du gène *rfbN* codant pour une rhamnosyltransférase impliquée dans l'assemblage des chaînes O (Labrie, Rioux et al. 2002). Tout récemment, une mutation au niveau d'une rhamnosyltransférase essentielle à l'antigène O de *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*, *wxocB*, a affecté négativement la production du biofilm de cette bactérie. Le défaut de formation de biofilm chez ce mutant a été lié à une diminution de la production des composants de la matrice

extracellulaire (Wang, Vinogradov et al. 2013). Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que le défaut de production du biofilm chez le mutant antigène O semble être dû à son incapacité à produire du PGA, une production essentielle pour la progression de l'étape des microcolonies vers l'étape de maturation du biofilm.

D'autre part, les gènes codant pour le système de stress exocytoplasmique CpxRA sont également moins exprimés chez le mutant antigène O (Figure 7, Article 1). Ce résultat suggère que l'absence de l'antigène O pourrait affecter négativement l'expression du système stress Cpx, ce dernier pourrait avoir un rôle important dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. En effet, l'expression des gènes codant pour le système de stress Cpx a été précédemment décrite comme étant modulée lors de la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* (Tremblay, Deslandes et al. 2013), mais également chez *E. coli*, où l'expression du système de stress Cpx est induite lors de la maturation du biofilm (Otto and Silhavy 2002).

En conclusion, cette étude nous a permis de démontrer que l'antigène O du LPS est un facteur important dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae* alors que l'absence de capsule et de noyau oligosaccharidique du LPS ne semble pas affecter la formation du biofilm. Cependant, d'autres études seraient nécessaires pour déterminer le rôle direct ou indirect du système Cpx dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. La création d'un mutant *cpxR* ou *cpxA* pourrait apporter une meilleure compréhension du rôle du système Cpx dans la formation du biofilm. Il serait également intéressant de déterminer le site de fixation du PGA sur le LPS. Des LPS isolés de mutants affectés au niveau du noyau oligosaccharidique ou au niveau du lipide A pourraient être utilisés afin de déterminer la région du LPS responsable de cette interaction.

## **II. *Impact des doses sous-inhibitrices d'antibiotiques sur la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae****

Chez les porcs d'élevage, les antibiotiques sont utilisés à trois fins; l'usage thérapeutique, l'usage prophylactique ainsi qu'un usage à titre de facteur de croissance (CVMA 2008, Guardabassi, Jensen et al. 2008, Burch 2013). Plusieurs antibiotiques incluant les pénicillines sont souvent administrés par voie orale et à de faibles doses (Burch 2013). Les pénicillines présentent une demi-vie courte et une clairance systémique élevée (Prescott 2013). De plus, l'eau diminue la biodisponibilité des pénicillines (Prescott 2013). Leur utilisation en tant que facteur de croissance chez le porc suscite plusieurs interrogations et craintes (van der Fels-Klerx, Puister-Jansen et al. 2011, Thacker 2013). En effet, selon les instructions de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (CFIA 2014), les doses de pénicilline G (PG) approuvées en tant que facteur de croissance dans la nourriture conduisent après absorption par le porc à des concentrations d'antibiotiques sous la concentration minimale inhibitrice (CMI). Ces doses sous-inhibitrices d'antibiotiques par définition ne sont ni bactéricide ni bactériostatique, mais pourraient avoir un effet secondaire sur les bactéries exposées. En effet, plusieurs études ont démontré que de faibles doses d'antibiotiques pouvaient influencer, entre autres, la morphologie des bactéries, certaines propriétés de surface, la pathogénicité et plus récemment la formation du biofilm chez plusieurs bactéries (Davies, Spiegelman et al. 2006, Linares, Gustafsson et al. 2006, Fonseca and Sousa 2007, Kaplan 2011, Gomes, Peixoto et al. 2013, Andersson and Hughes 2014, Wu, Li et al. 2014).

Lors de cette étude (Article 2) notre objectif était donc d'évaluer l'effet de doses sous inhibitrices (sous-CMI) de PG sur la formation du biofilm chez des souches d'*A.*

*pleuropneumoniae* faibles productrices de biofilms appartenant aux sérotypes les plus fréquemment isolés au Canada en production porcine (sérotypes 1, 5a et 7) (Tableau 1, Article 2).

Les résultats ont montré que 9 souches sur 13 présentent une augmentation de leur capacité à former un biofilm en présence de sous-CMI de PG sur plaque de 96 puits (Figure 1, Article 2). Cette augmentation est dose-dépendante et culmine à un demi de la CMI (Figure 1 et 3, Article 2). Les cinétiques de croissance et les tests de résazurine ont démontré que l'exposition des bactéries aux doses sous-CMI de PG n'affecte pas leur croissance ni leur viabilité (Figure S1 et S2, Article 2). Les bactéries exposées sont métaboliquement actives et ne diffèrent pas des bactéries non exposées (Figure S1, Article 2). À l'aide de la qRT-PCR, nous avons démontré que l'expression du gène *pgaA*, un des gènes de l'opéron *pgaABCD* codant pour la biosynthèse du PGA, est augmentée après exposition à des sous-CMI de PG (Figure 5, Article 2). Ce qui démontre donc clairement que les doses sous-CMI de PG ont un effet sur la production du biofilm.

De manière intéressante, la caractérisation de la matrice extracellulaire a attribué à l'ADN extracellulaire (ADNe) un nouveau rôle dans les biofilms induits par la PG. En effet, les traitements enzymatiques à la DNase I affectent la stabilité des biofilms induits par la PG, mais pas ceux non traités avec la PG (contrôles) (Figure 4, Article 2). L'exposition des bactéries à des doses sous-inhibitrices de PG semble donc modifier la composition de la matrice du biofilm. De manière similaire, Kaplan et collaborateurs, ont récemment démontré que l'exposition de *S. aureus* à des doses sous-inhibitrices de  $\beta$ -lactamines était associée à une augmentation des taux d'ADNe dans la matrice du biofilm ainsi que de l'autoagrégation (Kaplan, Izano et al. 2012). L'autoagrégation a également été observée chez la plupart des biofilms induits par les doses sous-CMI de PG (Figure 2, Article 2). L'ADNe est souvent considéré comme une molécule essentielle



à l'intégrité des biofilm jouant un rôle dans l'attachement aux surfaces et dans l'agrégation de plusieurs bactéries (Karatan and Watnick 2009, Okshevsky and Meyer 2015).

Dans cette étude nous avons également observé une augmentation de l'expression des gènes codant pour le système de stress Cpx (Figure 5, Article 2), *cpxR* et *cpxA*. Ces derniers, comme décrits auparavant, semblent avoir un rôle important dans la formation du biofilm d'*E. coli* et d'*A. pleuropneumoniae* (Dorel, Vidal et al. 1999, Otto and Silhavy 2002, Tremblay, Deslandes et al. 2013). À titre d'exemple, la mutation de ces deux gènes chez *E. coli* est associée à une perte de la production du biofilm et à un défaut d'attachement aux surfaces (Dorel, Vidal et al. 1999, Otto and Silhavy 2002). D'autre part, l'expression des gènes codant pour le système de stress Cpx chez les souches dont le biofilm n'est pas affecté par l'exposition à des doses sous-CMI de PG, ne démontre aucune variation. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de la production du biofilm suite à l'exposition à des doses sous-CMI de PG semble être associée à l'activation du système de stress Cpx.

Le système de stress extracytoplasmique Cpx est souvent activé en cas de lésion ou dommage détectés au niveau du périplasme. Une fois déclenché, le système tente de réparer les dommages, mais s'il échoue, il peut activer la lyse cellulaire (Kohanski, DePristo et al. 2010, Kohanski, Dwyer et al. 2010, Manoil 2013). Dans notre étude nous avons utilisé la PG, une  $\beta$ -lactamine qui a pour cible les liens interpeptidoglycanes dans l'espace périplasmique. Il est donc envisageable que même à des doses sous-inhibitrices, la PG pourrait affecter une sous-population de bactéries et déclencher leur lyse. La microscopie confocale démontre bien que les biofilms induits par les doses sous-CMI de PG contiennent une proportion importante de bactéries mortes (Figure S3, Article 2). Ceci pourrait donc expliquer du moins en partie le nouveau rôle de l'ADNe chez les biofilm induits par la PG. En effet, la libération de l'ADN pourrait avoir un effet positif sur la formation du biofilm par *A. pleuropneumoniae*. Plusieurs études ont démontré l'importance de la

lyse cellulaire et la libération de l'ADN dans la formation du biofilm. Ils sont même suggérées comme étant des étapes cruciales pour la production d'un biofilm mature (Bayles 2007, Karatan and Watnick 2009, Montanaro, Poggi et al. 2011, Okshevsky and Meyer 2015).

Pour conclure, nous avons démontré au cours de cette étude, et ce pour la première fois, que des doses sous-inhibitrices de PG pouvaient induire la formation du biofilm de plusieurs sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Cette augmentation de la production du biofilm pourrait être due à un stress détecté par le système Cpx. Ce dernier, une fois activé, pourrait induire la formation du biofilm. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour déterminer les voies de signalisation impliquées.

### **III. *Interaction biofilm et cellules de l'hôte***

L'objectif de cette étude (Article 3) est d'établir l'implication du biofilm dans la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae*. Comme nous soupçonnons que le biofilm ait un rôle prépondérant dans la pleuropneumonie en particulier lors des infections chroniques ou sous-cliniques, nous avons envisagé d'étudier l'effet du biofilm sur la réponse inflammatoire innée. En raison de la forte cytotoxicité d'*A. pleuropneumoniae* nous avons donc opté pour la souche non hémolytique MBHPP147 dérivée de la souche de laboratoire APP4074 sérotype 1 (Tremblay, Lévesque et al. 2013). Cependant, puisque ces bactéries étaient capables de produire un biofilm sur des cellules (Tremblay, Lévesque et al. 2013), nous avons donc tué les bactéries avant de les exposer aux cellules immunitaires innées. Les bactéries ont donc été traitées aux ultra-violets qui contrairement aux traitements à la chaleur ne dénaturent pas les protéines de surface.

Le modèle pour l'étude du biofilm a été la plaque de 6 puits en condition statique, un modèle facile à utiliser et qui à l'inverse de la plaque de 96 puits nous permet d'obtenir des quantités importantes de biomasse. Après 5 heures de culture, le surnageant contenant les bactéries non attachées et représentant la phase planctonique est séparée des bactéries attachées au fond des puits qui représentent quant à elles les bactéries du biofilm. Nous avons donc exposé des macrophages alvéolaires porcins (MAP, lignée 3D4/21) avec les fractions biofilm ou planctonique de la souche mutante d'*A. pleuropneumoniae* MBHPP147.

Nous avons par la suite évalué l'expression des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6 IL-8 et MCP-1) par la technique q-RT-PCR. Ces cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire contre les pathogènes incluant *A. pleuropneumoniae*. En effet, des études précédentes ont démontré que l'infection des porcs par *A. pleuropneumoniae* est suivie d'une forte production des cytokines IL-1 et IL-8. Ces dernières sont également détectées aux alentours des lésions pulmonaires causées par le pathogène (Baarsch, Scamurra et al. 1995, Brogaard, Klitgaard et al. 2015). Les résultats de nos travaux ont démontré que suite à l'exposition des MAPs aux bactéries planctoniques nous avons également une forte expression des cytokines pro-inflammatoires. Cette augmentation est rapide puisqu'elle atteint un pic à 1h post-infection (Figure 3, Article 3). Cependant, de manière intéressante, les résultats démontrent également que les bactéries issues du biofilm activent significativement moins les macrophages que les bactéries sous forme planctonique (Figure 3, Article 3). De manière similaire, les essais de proliférations des *cellules* mononucléaires porcines du sang périphérique (PBMC) suite à leurs expositions à des cellules d'*A. pleuropneumoniae* planctoniques ou biofilms démontrent que le mode de croissance en biofilm semble aussi diminuer la prolifération de ces dernières en comparaison aux cellules planctoniques (Figure 5, Article 3). Ces résultats semblent cohérents

avec plusieurs études précédentes qui suggèrent une association entre le biofilm, les infections chroniques et la faible réponse inflammatoire (Daw, Baghdayan et al. 2012, Hanke and Kielian 2012, Abu Khweek, Fernandez Davila et al. 2013, Roilides, Simitsopoulou et al. 2015).

En effet, chez *S. aureus*, les cellules planctoniques induisent une plus forte réponse cytokinaire chez les kératinocytes en comparaison aux cellules du biofilm (Secor, James et al. 2011). De manière similaire il a été observé que les biofilms d'*E. faecalis* et de *L. pneumophila* atténuent la réponse cytokinaire des macrophages comparativement à leurs contreparties planctoniques (Daw, Baghdayan et al. 2012, Abu Khweek, Fernandez Davila et al. 2013).

Compte tenu du rôle des LPS dans la réponse inflammatoire, nous avons donc évalué l'impact de la croissance en biofilm sur sa structure. Des modifications structurelles du LPS (voir tableau 1, introduction) peuvent être associées à un échappement au système immunitaire. Plus particulièrement, nous avons ciblé le lipide A du LPS car ce dernier est capable à lui seul d'activer la réponse inflammatoire (Ramjeet, Deslandes et al. 2005). Nous avons donc isolé les lipides A de bactéries planctoniques et de bactéries issues d'un biofilm à partir des biofilms de 5 heures cultivés dans les plaques de 6 puits. Puis à l'aide de la spectrométrie de masse (HPLC-HRAM MS) nous avons comparé les structures des lipides A et leur abondance au sein des deux échantillons. Nos résultats ont révélé une distribution différente des structures du lipide A entre les bactéries planctoniques et celles du biofilm (Figure 1, Article 3). De plus, les biofilms semblent être enrichis de lipides A de haut poids moléculaire (Figure 2, Article 3). Ces résultats laissent envisager que les bactéries du biofilm subissent des modifications structurelles qui pourraient expliquer l'atténuation de la réponse inflammatoire des cellules de la réponse innée.

En conclusion, cette étude nous a permis de démontrer l'impact qu'a le biofilm en tant que mode de croissance sur la structure du lipide A. Ces modifications chimiques au niveau du lipide A pourraient expliquer, du moins en partie, la diminution de la réponse inflammatoire chez les bactéries du biofilm. Le biofilm semble ainsi contrecarrer l'action des cellules immunitaires et pourrait favoriser la survie et la persistance d'*A. pleuropneumoniae* chez son hôte.

#### **IV. Conclusions**

Ce projet a permis de démontrer le rôle crucial de l'antigène O du LPS dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. En effet, nous avons montré que la perte de l'antigène O affectait la production du PGA et la maturation du biofilm. Nous avons également observé pour la première fois une interaction entre le PGA et le LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Cette interaction ne semble pas se produire au niveau de l'antigène O. Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle du système de stress extracytoplasmique CpxRA dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. En effet, le défaut de production du biofilm identifié chez le mutant antigène O est suivi d'une baisse de l'expression du système de stress CpxRA. Par contre, l'expression de ce dernier était augmentée lorsque les biofilms étaient induits en présence de doses sous-inhibitrices de PG. Cette stimulation du biofilm en présence de faibles doses d'antibiotiques est associée à une modification de la composition de la matrice du biofilm caractérisée par une présence accrue d'ADNe. D'autre part, l'étude de l'impact du biofilm sur les cellules de la réponse immunitaire innée suggère que le biofilm pourrait jouer un rôle important dans l'atténuation de la réponse inflammatoire ainsi que dans la persistance des bactéries. Cet

échappement au système immunitaire pourrait être dû aux modifications structurelles que subissent les lipides A des bactéries cultivées en biofilm. Cependant, d'autres constituants de la bactérie pourraient intervenir dans ce mécanisme.

En conclusion, ce projet a permis d'identifier certains facteurs importants dans la formation du biofilm d'*A. pleuropneumoniae*. De plus, nos résultats ont permis d'apporter des informations supplémentaires sur l'impact que le biofilm pourrait avoir sur les cellules immunitaires de l'hôte ouvrant également la voie à d'autres études, notamment sur les mécanismes d'échappement au système immunitaire et son rôle dans la persistance des infections à *A. pleuropneumoniae*.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Abu Khweek, A., N. S. Fernandez Davila, K. Caution, A. Akhter, B. A. Abdulrahman, M. Tazi, H. Hassan, L. A. Novotny, L. O. Bakaletz and A. O. Amer (2013). "Biofilm-derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages." Front Cell Infect Microbiol **3**: 18.

Ahmed, N. A., F. C. Petersen and A. A. Scheie (2009). "AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **53**(10): 4258-4263.

Alcon, V., M. Baca-Estrada, M. Vega-Lopez, P. Willson, L. A. Babiuk, P. Kumar, R. Hecker and M. Foldvari (2005). "Mucosal delivery of bacterial antigens and CpG oligonucleotides formulated in biphasic lipid vesicles in pigs." AAPS J **7**(3): E566-571.

Alhede, M., T. Bjarnsholt, M. Givskov and M. Alhede (2014). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion." Adv Appl Microbiol **86**: 1-40.

Ali, T., N. J. Oldfield, K. G. Wooldridge, D. P. Turner and D. A. Ala'Aldeen (2008). "Functional characterization of AasP, a maturation protease autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Infect Immun **76**(12): 5608-5614.

Alipour, M., Z. E. Suntres and A. Omri (2009). "Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*." J Antimicrob Chemother **64**(2): 317-325.

Allard, M., H. Moisan, E. Brouillette, A. L. Gervais, M. Jacques, P. Lacasse, M. S. Diarra and F. Malouin (2006). "Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth *in vitro* and in a tissue cage model *in vivo*." Microbes Infect **8**(7): 1679-1690.

Altman, E., J. R. Brisson and M. B. Perry (1986). "Structural studies of the capsular polysaccharide from *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1." Biochem Cell Biol **64**(8): 707-716.



Altman, E., D. W. Griffith and M. B. Perry (1990). "Structural studies of the O-chains of the lipopolysaccharides produced by strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5." Biochem Cell Biol **68**(11): 1268-1271.

Amini, S., H. Goodarzi and S. Tavazoie (2009). "Genetic dissection of an exogenously induced biofilm in laboratory and clinical isolates of *E. coli*." PLoS Pathog **5**(5): e1000432.

Andersson, D. I. and D. Hughes (2014). "Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics." Nat Rev Microbiol **12**(7): 465-478.

Archambault, M., J. Harel, J. Goure, Y. Tremblay and M. Jacques (2012). "Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microb Drug Res **18**: 198 - 206.

Archambault, M., J. Labrie, C. R. Rioux, F. Dumas, P. Thibault, C. Elkins and M. Jacques (2003). "Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1." Can J Vet Res **67**(4): 271-277.

Auger, E., V. Deslandes, M. Ramjeet, I. Contreras, J. Nash, J. Harel, M. Gottschalk, M. Olivier and M. Jacques (2009). "Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells." Infect Immun **77**: 1426 - 1441.

Aung, T. T., J. K. Yam, S. Lin, S. M. Salleh, M. Givskov, S. Liu, N. C. Lwin, L. Yang and R. W. Beuerman (2015). "Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches." Antimicrob Agents Chemother **60**(1): 24-35.

Baarsch, M. J., D. L. Foss and M. P. Murtaugh (2000). "Pathophysiologic correlates of acute porcine pleuropneumonia." Am J Vet Res **61**(6): 684-690.

Baarsch, M. J., R. W. Scamurra, K. Burger, D. L. Foss, S. K. Maheswaran and M. P. Murtaugh (1995). "Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Infect Immun **63**(9): 3587-3594.

Bae, J., E. Oh and B. Jeon (2014). "Enhanced transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* biofilms by natural transformation." Antimicrob Agents Chemother **58**(12): 7573-7575.

Bagge, N., M. Schuster, M. Hentzer, O. Ciofu, M. Givskov, E. P. Greenberg and N. Hoiby (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production." Antimicrob Agents Chemother **48**(4): 1175-1187.

Baltes, N., F. F. Buettner and G. F. Gerlach (2007). "Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein." Vet Microbiol **123**(1-3): 110-121.

Baltes, N., M. N'Diaye, I. D. Jacobsen, A. Maas, F. F. Buettner and G. F. Gerlach (2005). "Deletion of the anaerobic regulator HlyX causes reduced colonization and persistence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine respiratory tract." Infect Immun **73**(8): 4614-4619.

Bandara, A. B., M. L. Lawrence, H. P. Veit and T. J. Inzana (2003). "Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs." Infect Immun **71**(6): 3320-3328.

Bayles, K. W. (2007). "The biological role of death and lysis in biofilm development." Nat Rev Microbiology **5**(9): 721-726.

Bedran, T. B., L. Grignon, D. P. Spolidorio and D. Grenier (2014). "Subinhibitory concentrations of triclosan promote *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to oral epithelial cells." PLoS One **9**(2): e89059.

Belanger, M., D. Dubreuil, J. Harel, C. Girard and M. Jacques (1990). "Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings." Infect Immun **58**(11): 3523-3530.

Belanger, M., S. Rioux, B. Foiry and M. Jacques (1992). "Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." FEMS Microbiol Lett **76**(1-2): 119-125.

Beloin, C., J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J. A. Haagensen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille and J. M. Ghigo (2004). "Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression." Mol Microbiol **51**(3): 659-674.

Bernier, S. P., D. Lebeaux, A. S. DeFrancesco, A. Valomon, G. Soubigou, J. Y. Coppee, J. M. Ghigo and C. Beloin (2013). "Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin." PLoS Genet **9**(1): e1003144.

Binnenkade, L., L. Teichmann and K. M. Thormann (2014). "Iron triggers lambdaSo prophage induction and release of extracellular DNA in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms." Appl Environ Microbiol **80**(17): 5304-5316.

Bishop, R. E., H. S. Gibbons, T. Guina, M. S. Trent, S. I. Miller and C. R. Raetz (2000). "Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria." EMBO J **19**(19): 5071-5080.

Bjarnsholt, T. (2013). "The role of bacterial biofilms in chronic infections." APMIS Suppl(136): 1-51.

Bjarnsholt, T., P. O. Jensen, T. H. Jakobsen, R. Phipps, A. K. Nielsen, M. T. Rybtke, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, N. Hoiby, O. Ciofu and C. Scandinavian Cystic Fibrosis Study (2010). "Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients." PLoS One **5**(4): e10115.

Blanchard, P. C., R. L. Walker and I. Gardner (1993). "Pleuropneumonia in swine associated with a urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1." J Vet Diagn Invest **5**(2): 279-282.

Blanchette-Cain, K., C. A. Hinojosa, R. Akula Suresh Babu, A. Lizcano, N. Gonzalez-Juarbe, C. Munoz-Almagro, C. J. Sanchez, M. A. Bergman and C. J. Orihuela (2013). "*Streptococcus*

*pneumoniae* biofilm formation is strain dependent, multifactorial, and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during colonization." mBio **4**(5): e00745-00713.

Bockelmann, U., A. Janke, R. Kuhn, T. R. Neu, J. Wecke, J. R. Lawrence and U. Szewzyk (2006). "Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure." FEMS Microbiol Lett **262**(1): 31-38.

Boehm, A. and J. Vogel (2012). "The *csgD* mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs." Mol Microbiol **84**(1): 1-5.

Boekema, B. K., J. P. Van Putten, N. Stockhofe-Zurwieden and H. E. Smith (2004). "Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Infect Immun **72**(2): 691-700.

Bos, M. P., B. Tefsen, J. Geurtsen and J. Tommassen (2004). "Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9417-9422.

Bossé, J., H. Janson, B. Sheehan, A. Beddek, A. Rycroft, J. Kroll and P. Langford (2002). "*Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection." Microbes Infect **4**: 225 - 235.

Bossé, J., S. Sinha, M. Li, C. O'Dwyer, J. Nash, A. Rycroft, J. Kroll and P. Langford (2010). "Regulation of *pga* operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by *sigmaE* and H-NS." J Bacteriol **192**: 2414 - 2423.

Bossé, J. T., H. Janson, B. J. Sheehan, A. J. Beddek, A. N. Rycroft, J. S. Kroll and P. R. Langford (2002). "*Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection." Microbes Infect **4**(2): 225-235.

Bossé, J. T. and J. I. MacInnes (1997). "Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease." Infect Immun **65**(11): 4389-4394.

Bossé, J. T. and J. I. MacInnes (2000). "Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection." Can J Vet Res **64**(3): 145-150.

Braun, M. and T. J. Silhavy (2002). "Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **45**(5): 1289-1302.

Briandet, R., L. Fechner, M. Naïtali and C. Dreanno (2012). Biofilms, quand les microbes s'organisent. Editions Quae, France.

Brogaard, L., K. Klitgaard, P. M. Heegaard, M. S. Hansen, T. K. Jensen and K. Skovgaard (2015). "Concurrent host-pathogen gene expression in the lungs of pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*." BMC Genomics **16**: 417.

Brown, H. L., K. Hanman, M. Reuter, R. P. Betts and A. H. van Vliet (2015). "*Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment." Front Microbiology **6**: 699.

Buettner, F., I. Bendallah, J. Bosse, K. Dreckmann, J. Nash, P. Langford and G. Gerlach (2008). "Analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ArcA regulon identifies fumarate reductase as a determinant of virulence." Infect Immun **76**: 2284 - 2295.

Burch, D. G. S. (2013). Antimicrobial Drug Use in Swine. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, John Wiley & Sons, Inc: 553-568.

Burmolle, M., D. Ren, T. Bjarnsholt and S. J. Sorensen (2014). "Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?" Trends Microbiol.

Caiazza, N. C., R. M. Shanks and G. A. O'Toole (2005). "Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **187**(21): 7351-7361.

Ceri, H., M. E. Olson and R. J. Turner (2010). "Needed, new paradigms in antibiotic development." Expert Opin Pharmacother **11**(8): 1233-1237.

CFIA. (2014). "Chlortetracycline hydrochloride, sulfamethazine and procaine penicillin - MIB #38." Retrieved 07, 2014, from <http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/medicating-ingredients/mib/mib-38/eng/1330991268088/1330991334507>.

Chalabaev, S., A. Chauhan, A. Novikov, P. Iyer, M. Szczesny, C. Beloin, M. Caroff and J. M. Ghigo (2014). "Biofilms formed by gram-negative bacteria undergo increased lipid palmitoylation, enhancing *in vivo* survival." MBio **5**(4).

Chassaing, B., E. Garénaux, J. Carriere, N. Rolhion, Y. Guérardel, N. Barnich, R. Bonnet and A. Darfeuille-Michaud (2015). "Analysis of  $\sigma$ E regulon in Crohn disease-associated *E. coli* revealed *waaWVL* operon involved in biofilm formation." J Bacteriol **197**(8); 1451-1465.

Chen, X., S. Schauder, N. Potier, A. Van Dorselaer, I. Pelczer, B. L. Bassler and F. M. Hughson (2002). "Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron." Nature **415**(6871): 545-549.

Chiang, W. C., M. Nilsson, P. O. Jensen, N. Hoiby, T. E. Nielsen, M. Givskov and T. Tolker-Nielsen (2013). "Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother **57**(5): 2352-2361.

Chiers, K., T. De Waele, F. Pasmans, R. Ducatelle and F. Haesebrouck (2010). "Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host." Vet Res **41**(5): 65.

Ciofu, O., T. Tolker-Nielsen, P. O. Jensen, H. Wang and N. Hoiby (2014). "Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients." Adv Drug Deliv Rev.

Ciornei, C. D., A. Novikov, C. Beloin, C. Fitting, M. Caroff, J. M. Ghigo, J. M. Cavaillon and M. Adib-Conquy (2010). "Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes." Innate Immun **16**(5): 288-301.

Clifford, J. C., J. N. Rapicavoli and M. C. Roper (2013). "A rhamnose-rich O-antigen mediates adhesion, virulence, and host colonization for the xylem-limited phytopathogen *Xylella fastidiosa*." Mol Plant Microbe Interact **26**(6): 676-685.

Clutterbuck, A. L., E. J. Woods, D. C. Knottenbelt, P. D. Clegg, C. A. Cochrane and S. L. Percival (2007). "Biofilms and their relevance to veterinary medicine." Vet Microbiol **121**(1-2): 1-17.

Coenye, T. and H. J. Nelis (2010). "*In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation." J Microbiol Methods **83**(2): 89-105.

Coffey, B. M. and G. G. Anderson (2014). "Biofilm formation in the 96-well microtiter plate." Methods Mol Biol **1149**: 631-641.

Colvin, K. M., Y. Irie, C. S. Tart, R. Urbano, J. C. Whitney, C. Ryder, P. L. Howell, D. J. Wozniak and M. R. Parsek (2012). "The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix." Environ Microbiol **14**(8): 1913-1928.

Conrad, A., M. K. Suutari, M. M. Keinänen, A. Cadoret, P. Faure, L. Mansuy-Huault and J. C. Block (2003). "Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs." Lipids **38**(10): 1093-1105.

Cook, L. C. and G. M. Dunny (2013). "Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*." Antimicrob Agents Chemother **57**(4): 1850-1856.

Costerton, J., P. Stewart and E. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**: 1318 - 1322.

Costerton, J. W. (1999). "Introduction to biofilm." Int J Antimicrob Agents **11**(3-4): 217-221;

Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta and T. J. Marrie (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." Annu Rev Microbiol **41**: 435-464.

Costerton, J. W., G. G. Geesey and K. J. Cheng (1978). "How bacteria stick." Sci Am **238**(1): 86-95.

Coulon, C., E. Vinogradov, A. Filloux and I. Sadovskaya (2010). "Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14." PLoS One **5**(12): e14220.

Cucarella, C., M. A. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzon, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa and J. R. Penades (2004). "Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*." Infect Immun **72**(4): 2177-2185.

Cullen, L. and S. McClean (2015). "Bacterial adaptation during chronic respiratory infections." Pathogens **4**(1): 66-89.

Cullen, T. W., D. K. Giles, L. N. Wolf, C. Ecobichon, I. G. Boneca and M. S. Trent (2011). "*Helicobacter pylori* versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa." PLoS Pathog **7**(12): e1002454.

Cullen, T. W., J. P. O'Brien, D. R. Hendrixson, D. K. Giles, R. I. Hobb, S. A. Thompson, J. S. Brodbelt and M. S. Trent (2013). "EptC of *Campylobacter jejuni* mediates phenotypes involved in host interactions and virulence." Infect Immun **81**(2): 430-440.

CVMA (2008). "Antimicrobial prudent use guidelines 2008 for beef cattle, dairy cattle, poultry and swine." CVMA. Available from <http://canadianveterinarians.net/documents/cvma-antimicrobial-prudent-use-guidelines-2008-for-beef-dairy-poultry-swine> (last accessed 10.12.14).

Dalai, B., R. Zhou, Y. Wan, M. Kang, L. Li, T. Li, S. Zhang and H. Chen (2009). "Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microb Pathog **46**(3): 128-134.

Dalebroux, Z. D. and M. S. Swanson (2012). "ppGpp: magic beyond RNA polymerase." Nat Rev Microbiology **10**(3): 203-212.

Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science **280**(5361): 295-298.



Davies, J., G. B. Spiegelman and G. Yim (2006). "The world of subinhibitory antibiotic concentrations." Curr Opin Microbiol **9**(5): 445-453.

Daw, K., A. S. Baghdayan, S. Awasthi and N. Shankar (2012). "Biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes *in vitro*." FEMS Immunol Med Microbiol **65**(2): 270-282.

De Brucker, K., Y. Tan, K. Vints, K. De Cremer, A. Braem, N. Verstraeten, J. Michiels, J. Vleugels, B. P. Cammue and K. Thevissen (2015). "Fungal beta-1,3-glucan increases ofloxacin tolerance of *Escherichia coli* in a polymicrobial *E. coli/Candida albicans* biofilm." Antimicrob Agents Chemother **59**(6): 3052-3058.

Dervaux, J., J. C. Magniez and A. Libchaber (2014). "On growth and form of *Bacillus subtilis* biofilms." Interface Focus **4**(6): 20130051.

Deslandes, V., J. Nash, J. Harel, J. Coulton and M. Jacques (2007). "Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions." BMC Genomics **8**: 72.

Diarra, M. S., J. A. Dolence, E. K. Dolence, I. Darwish, M. J. Miller, F. Malouin and M. Jacques (1996). "Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores." Appl Environ Microbiol **62**(3): 853-859.

Diggle, S. P., R. E. Stacey, C. Dodd, M. Camara, P. Williams and K. Winzer (2006). "The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*." Environ Microbiol **8**(6): 1095-1104.

Doerrler, W. T., H. S. Gibbons and C. R. Raetz (2004). "MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*." J Biol Chem **279**(43): 45102-45109.

Domenech, M., E. Ramos-Sevillano, E. Garcia, M. Moscoso and J. Yuste (2013). "Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*." Infect Immun **81**(7): 2606-2615.

Domka, J., J. Lee, T. Bansal and T. K. Wood (2007). "Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms." Environ Microbiol **9**(2): 332-346.

Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin Microbiol Rev **15**(2): 167-193.

Dorel, C., O. Vidal, C. Prigent-Combaret, I. Vallet and P. Lejeune (1999). "Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation." FEMS Microbiol Lett **178**(1): 169-175.

Dubreuil, J. D., M. Jacques, K. R. Mittal and M. Gottschalk (2000). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity." Anim Health Res Rev **1**(2): 73-93.

Ethapa, T., R. Leuzzi, Y. K. Ng, S. T. Baban, R. Adamo, S. A. Kuehne, M. Scarselli, N. P. Minton, D. Serruto and M. Unnikrishnan (2013). "Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*." J Bacteriol **195**(3): 545-555.

Fage, C. D., D. B. Brown, J. M. Boll, A. T. Keatinge-Clay and M. S. Trent (2014). "Crystallographic study of the phosphoethanolamine transferase EptC required for polymyxin resistance and motility in *Campylobacter jejuni*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **70**(Pt 10): 2730-2739.

Flemming, H. C., T. R. Neu and D. J. Wozniak (2007). "The EPS matrix: the "house of biofilm cells"." J Bacteriol **189**(22): 7945-7947.

Flemming, H. C. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." Nat Rev Microbiol **8**(9): 623-633.

Fong, J. N. C. and F. H. Yildiz (2015). "Biofilm Matrix Proteins." Microbiology Spectrum **3**(2).

Fonseca, A. P. and J. C. Sousa (2007). "Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states." J Appl Microbiol **103**(5): 1828-1837.

Fonseca, A. P. and J. C. Sousa (2007). "Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes." Int J Antimicrob Agents **30**(3): 236-241.

Frank, K. L., E. J. Reichert, K. E. Piper and R. Patel (2007). "In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 888-895.

Fraser, D. W., T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard and P. S. Brachman (1977). "Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia." N Engl J Med **297**(22): 1189-1197.

Fraud, S. and K. Poole (2011). "Oxidative Stress Induction of the MexXY Multidrug Efflux Genes and Promotion of Aminoglycoside Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **55**(3): 1068-1074.

Frey, J. (1995). "Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins." Trends Microbiology **3**(7): 257-261.

Fuqua, W. C., S. C. Winans and E. P. Greenberg (1994). "Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators." J Bacteriol **176**(2): 269-275.

Goeres, D., M. Hamilton, N. Beck, K. Buckingham-Meyer, J. Hilyard, L. Loetterle, L. Lorenz, D. Walker and P. Stewart (2009). "A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor." Nat Protoc **4**: 783 - 788.

Gomes, D. L., R. S. Peixoto, E. A. Barbosa, F. Napoleao, P. S. Sabbadini, K. R. dos Santos, A. L. Mattos-Guaraldi and R. Hirata, Jr. (2013). "SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains." J Med Microbiol **62**(Pt 5): 754-760.

González, O. G., R. M. García, M. de la Garza, S. Vaca P., G. Luz Paniagua, R. Mejía, V. R. Tenorio and E. Negrete-Abascal (2004). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expression." FEMS Microbiol Lett **234**(1): 81-86.

Goodman, S. D., K. P. Obergfell, J. A. Jurcisek, L. A. Novotny, J. S. Downey, E. A. Ayala, N. Tjokro, B. Li, S. S. Justice and L. O. Bakaletz (2011). "Biofilms can be dispersed by focusing the

immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins." Mucosal Immunol **4**(6): 625-637.

Gottschalk, M. (2012). Actinobacillosis. Diseases of swine. J. J. Zimmerman and H. W. Dunne. Chichester, West Sussex, Wiley-Blackwell: 653-669.

Gottschalk, M. (2015). "The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet J **206**(1): 30-38.

Govan, J. R. and V. Deretic (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." Microbiol Rev **60**(3): 539-574.

Grasteau, A., Y. Tremblay, J. Labrie and M. Jacques (2011). "Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Microbiol **153**: 134 - 143.

Gross, R. and D. Beier (2012). Two-component Systems in Bacteria, Caister Academic Press.

Guardabassi, L., L. B. Jensen and H. Kruse (2008). Guide to antimicrobial use in animals. Oxford, UK ; Ames, Iowa, Blackwell Pub.

Gunn, J. S., S. S. Ryan, J. C. Van Velkinburgh, R. K. Ernst and S. I. Miller (2000). "Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium." Infect Immun **68**(11): 6139-6146.

Guo, L., K. B. Lim, C. M. Poduje, M. Daniel, J. S. Gunn, M. Hackett and S. I. Miller (1998). "Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides." Cell **95**(2): 189-198.

Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton and P. Stoodley (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbiol **2**(2): 95-108.

Hanke, M. L. and T. Kielian (2012). "Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity." Front Cell Infect Microbiol **2**: 62.

Hao, H., G. Cheng, Z. Iqbal, X. Ai, H. I. Hussain, L. Huang, M. Dai, Y. Wang, Z. Liu and Z. Yuan (2014). "Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals." Front Microbiol **5**: 288.

Harmsen, M., M. Lappann, S. Knochel and S. Molin (2010). "Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **76**(7): 2271-2279.

Harriott, M. M. and M. C. Noverr (2009). "*Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **53**(9): 3914-3922.

Henke, J. M. and B. L. Bassler (2004). "Bacterial social engagements." Trends Cell Biol **14**(11): 648-656.

Herrera, C. M., J. V. Hankins and M. S. Trent (2010). "Activation of PmrA inhibits LpxT-dependent phosphorylation of lipid A promoting resistance to antimicrobial peptides." Mol Microbiol **76**(6): 1444-1460.

Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin and O. Ciofu (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." Int J Antimicrob Agents **35**(4): 322-332.

Hoiby, N., O. Ciofu and T. Bjarnsholt (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis." Future Microbiol **5**(11): 1663-1674.

Huang, T. P., E. B. Somers and A. C. Wong (2006). "Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*." J Bacteriol **188**(8): 3116-3120.

Inzana, T. J., G. Glindemann, B. Fenwick, J. Longstreth and D. Ward (2004). "Risk assessment of transmission of capsule-deficient, recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Microbiol **104**(1-2): 63-71.

Inzana, T. J., J. Ma, T. Workman, R. P. Gogolewski and P. Anderson (1988). "Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5." Infect Immun **56**(8): 1880-1889.

Itoh, Y., J. D. Rice, C. Goller, A. Pannuri, J. Taylor, J. Meisner, T. J. Beveridge, J. F. Preston, 3rd and T. Romeo (2008). "Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine." J Bacteriol **190**(10): 3670-3680.

Izano, E., H. Wang, C. Rangunath, N. Ramasubbu and J. Kaplan (2007). "Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS." J Dent Res **86**: 618 - 622.

Izano, E. A., I. Sadvskaya, E. Vinogradov, M. H. Mulks, K. Velliyagounder, C. Rangunath, W. B. Kher, N. Ramasubbu, S. Jabbouri, M. B. Perry and J. B. Kaplan (2007). "Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microb Pathog **43**(1): 1-9.

Jacobsen, I., I. Hennig-Pauka, N. Baltés, M. Trost and G. F. Gerlach (2005). "Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence." Infect Immun **73**(1): 226-234.

Jacques, M. (2004). "Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Can J Vet Res **68**(2): 81-85.

Jacques, M., V. Aragon and Y. Tremblay (2010). "Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance." Anim Health Res Rev **11**: 97 - 121.

Jacques, M., B. Foiry, R. Higgins and K. R. Mittal (1988). "Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." J Bacteriol **170**(7): 3314-3318.

Jacques, M., D. Grenier, J. Labrie, C. Provost and C. Gagnon (2015). "Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in bacterial biofilms." J Swine Health Prod **23**(3): 132-136.

James, G. A., E. Swogger, R. Wolcott, E. Pulcini, P. Secor, J. Sestrich, J. W. Costerton and P. S. Stewart (2008). "Biofilms in chronic wounds." Wound Repair Regen **16**(1): 37-44.

Jefferson, K. K. (2004). "What drives bacteria to produce a biofilm?" FEMS Microbiol Lett **236**(2): 163-173.

Jennings, L. K., K. M. Storek, H. E. Ledvina, C. Coulon, L. S. Marmont, I. Sadovskaya, P. R. Secor, B. S. Tseng, M. Scian, A. Filloux, D. J. Wozniak, P. L. Howell and M. R. Parsek (2015). "Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(36): 11353-11358.

Jin, H., R. Zhou, M. Kang, R. Luo, X. Cai and H. Chen (2006). "Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*." Vet Microbiol **118**(1-2): 117-123.

Jonas, K., A. N. Edwards, R. Simm, T. Romeo, U. Romling and O. Melefors (2008). "The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins." Mol Microbiol **70**(1): 236-257.

Jonas, K., H. Tomenius, A. Kader, S. Normark, U. Romling, L. M. Belova and O. Melefors (2007). "Roles of curli, cellulose and BapA in Salmonella biofilm morphology studied by atomic force microscopy." BMC Microbiol **7**: 70.

Joyce, J. G., C. Abeygunawardana, Q. Xu, J. C. Cook, R. Hepler, C. T. Przysiecki, K. M. Grimm, K. Roper, C. C. Ip, L. Cope, D. Montgomery, M. Chang, S. Campie, M. Brown, T. B. McNeely, J. Zorman, T. Maira-Litran, G. B. Pier, P. M. Keller, K. U. Jansen and G. E. Mark (2003). "Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*." Carbohydr Res **338**(9): 903-922.

Kaplan, J. B. (2010). "Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses." J Dent Res **89**(3): 205-218.

Kaplan, J. B. (2011). "Antibiotic-induced biofilm formation." Int J Artif Organs **34**(9): 737-751.

Kaplan, J. B., E. A. Izano, P. Gopal, M. T. Karwacki, S. Kim, J. L. Bose, K. W. Bayles and A. R. Horswill (2012). "Low levels of beta-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*." MBio **3**(4): e00198-00112.

- Kaplan, J. B. and M. H. Mulks (2005). "Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Microbiol **108**(1-2): 89-94.
- Kaplan, J. B., K. Velliyagounder, C. Ragunath, H. Rohde, D. Mack, J. K. Knobloch and N. Ramasubbu (2004). "Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms." J Bacteriol **186**(24): 8213-8220.
- Karatan, E. and P. Watnick (2009). "Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms." Microbiol Mol Biol Rev **73**(2): 310-347.
- Kim, T. J., K. H. Kim and J. I. Lee (2007). "Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against recombinant transferrin-binding protein B of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with chitosan after tracheal administration in piglets." J Vet Med Sci **69**(5): 535-539.
- Kint, G., D. De Coster, K. Marchal, J. Vanderleyden and S. C. De Keersmaecker (2010). "The small regulatory RNA molecule MicA is involved in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation." BMC Microbiol **10**: 276.
- Kohanski, M. A., M. A. DePristo and J. J. Collins (2010). "Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis." Mol Cell **37**(3): 311-320.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer and J. J. Collins (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nat Rev Microbiol **8**(6): 423-435.
- Kristian, S. A., T. A. Birkenstock, U. Sauder, D. Mack, F. Gotz and R. Landmann (2008). "Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing." J Infect Dis **197**(7): 1028-1035.
- Kulesus, R. R., K. Diaz-Perez, E. S. Slechta, D. S. Eto and M. A. Mulvey (2008). "Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **76**(7): 3019-3026.



Kurtz, S., K. Ong, E. Lau, F. Mowat and M. Halpern (2007). "Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030." J Bone Joint Surg Am **89**(4): 780-785.

Labrie, J., G. Pelletier-Jacques, V. Deslandes, M. Ramjeet, E. Auger, J. Nash and M. Jacques (2010). "Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Res **41**: 3.

Labrie, J., S. Rioux, M. M. Wade, F. R. Champlin, S. C. Holman, W. W. Wilson, C. Savoye, M. Kobisch, M. Sirois, C. Galarneau and M. Jacques (2002). "Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants." J Endotoxin Res **8**(1): 27-38.

Lasaro, M. A., N. Salinger, J. Zhang, Y. Wang, Z. Zhong, M. Goulian and J. Zhu (2009). "F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917." Appl Environ Microbiol **75**(1): 246-251.

Leid, J. G., C. J. Willson, M. E. Shirtliff, D. J. Hassett, M. R. Parsek and A. K. Jeffers (2005). "The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing." J Immunol **175**(11): 7512-7518.

Lewenza, S. (2013). "Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*." Front Microbiol **4**: 21.

Li, J. and N. Wang (2011). "The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence." Mol Plant Pathol **12**(4): 381-396.

Li, L., Z. Xu, Y. Zhou, T. Li, L. Sun, H. Chen and R. Zhou (2011). "Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism." Microb Pathog **50**(6): 293-302.

Li, L., R. Zhou, T. Li, M. Kang, Y. Wan, Z. Xu and H. Chen (2008). "Enhanced biofilm formation and reduced virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae luxS* mutant." Microb Pathog **45**(3): 192-200.

Li, L., J. Zhu, K. Yang, Z. Xu, Z. Liu and R. Zhou (2014). "Changes in gene expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in response to anaerobic stress reveal induction of central metabolism and biofilm formation." J Microbiol **52**(6): 473-481.

Li, Y. H., N. Tang, M. B. Aspiras, P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen and D. G. Cvitkovitch (2002). "A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation." J Bacteriol **184**(10): 2699-2708.

Limoli, D. H., C. J. Jones and D. J. Wozniak (2015). "Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function." Microbiol Spectr **3**(3).

Limoli, D. H., A. B. Rockel, K. M. Host, A. Jha, B. T. Kopp, T. Hollis and D. J. Wozniak (2014). "Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections." PLoS Pathog **10**(4): e1004083.

Lin, L., W. Bei, Y. Sha, J. Liu, Y. Guo, W. Liu, S. Tu, Q. He and H. Chen (2007). "Construction and immunogenicity of a DeltaapxIC/DeltaapxIIC double mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1." FEMS Microbiol Lett **274**(1): 55-62.

Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero and J. L. Martinez (2006). "Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(51): 19484-19489.

Little, D. J., J. Poloczek, J. C. Whitney, H. Robinson, M. Nitz and P. L. Howell (2012). "The structure- and metal-dependent activity of *Escherichia coli* PgaB provides insight into the partial de-N-acetylation of poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine." J Biol Chem **287**(37): 31126-31137.

Liu, J., X. Chen, C. Tan, Y. Guo, Y. Chen, S. Fu, W. Bei and H. Chen (2009). "*In vivo* induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Microbiol **137**(3-4): 282-289.

Liu, Y. Y., Y. Wang, T. R. Walsh, L. X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L. F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J. H. Liu and J. Shen (2016). "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study." Lancet Infect Dis **16**(2): 161-168.

Loera-Muro, V. M., M. Jacques, Y. D. Tremblay, F. J. Avelar-Gonzalez, A. Loera Muro, E. M. Ramirez-Lopez, A. Medina-Figueroa, H. M. Gonzalez-Reynaga and A. L. Guerrero-Barrera (2013). "Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms." Microbiology **159**(Pt 3): 536-544.

Loera-Muro, V. M., A. Loera-Muro, M. Morfin-Mata, M. Jacques, F. J. Avelar-Gonzalez, F. Ramirez-Castillo, E. M. Ramirez-Lopez and A. L. Guerrero-Barrera (2014). "Porcine respiratory pathogens in swine farms environment in Mexico." Open J Anim Sci **4**(4): 10.

Lopes, S. P., H. Ceri, N. F. Azevedo and M. O. Pereira (2012). "Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection." Int J Antimicrob Agents **40**(3): 260-263.

Losinger, W. C. (2005). "Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on grower/finisher swine operations in the United States." Prev Vet Med **68**(2-4): 181-193.

Maas, A., J. Meens, N. Baltes, I. Hennig-Pauka and G. F. Gerlach (2006). "Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection." Vaccine **24**(49-50): 7226-7237.

MacInnes, J. I., M. Gottschalk, A. G. Lone, D. S. Metcalf, S. Ojha, T. Rosendal, S. B. Watson and R. M. Friendship (2008). "Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds." Can J Vet Res **72**(3): 242-248.

Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge and R. Laufs (1996). "The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis." J Bacteriol **178**(1): 175-183.

Madsen, J. S., M. Burmolle, L. H. Hansen and S. J. Sorensen (2012). "The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer." FEMS Immunol Med Microbiol **65**(2): 183-195.

Mah, T. F. and G. A. O'Toole (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." Trends Microbiol **9**(1): 34-39.

Male, D. K. and I. M. Roitt (2007). Immunologie. Issy-les-Moulineaux, Elsevier Masson.

Mandal, M. and R. R. Breaker (2004). "Gene regulation by riboswitches." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 451-463.

Manoil, C. (2013). "Clarifying the Role of Two-Component Regulation in Antibiotic Killing." J Bacteriol **195**(9): 1857-1858.

Marshall, B. M. and S. B. Levy (2011). "Food animals and antimicrobials: impacts on human health." Clin Microbiol Rev **24**(4): 718-733.

Martinez, L. C. and V. Vadyvaloo (2014). "Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms." Front Cell Infect Microbiol **4**: 38.

Merritt, J., F. Qi, S. D. Goodman, M. H. Anderson and W. Shi (2003). "Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*." Infect Immun **71**(4): 1972-1979.

Michael, F. S., J. R. Brisson, S. Larocque, M. Monteiro, J. Li, M. Jacques, M. B. Perry and A. D. Cox (2004). "Structural analysis of the lipopolysaccharide derived core oligosaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5a and the genome strain 5b." Carbohydr Res **339**(11): 1973-1984.

Mikael, L. G., P. D. Pawelek, J. Labrie, M. Sirois, J. W. Coulton and M. Jacques (2002). "Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microbiology **148**(9): 2869-2882.

Mikkelsen, H., M. Sivaneson and A. Filloux (2011). "Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*." Environ Microbiol **13**(7): 1666-1681.

Mirani, Z. A. and N. Jamil (2011). "Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*." J Basic Microbiol **51**(2): 191-195.

Mitobe, J., E. Arakawa and H. Watanabe (2005). "A sensor of the two-component system CpxA affects expression of the type III secretion system through posttranscriptional processing of InvE." J Bacteriol **187**(1): 107-113.

Molin, S. and T. Tolker-Nielsen (2003). "Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure." Curr Opin Biotechnol **14**(3): 255-261.

Montanaro, L., A. Poggi, L. Visai, S. Ravaioli, D. Campoccia, P. Speziale and C. R. Arciola (2011). "Extracellular DNA in biofilms." Int J Artif Organs **34**(9): 824-831.

Morioka, A., T. Asai, H. Nitta, K. Yamamoto, Y. Ogikubo, T. Takahashi and S. Suzuki (2008). "Recent trends in antimicrobial susceptibility and the presence of the tetracycline resistance gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates in Japan." J Vet Med Sci **70**(11): 1261-1264.

Morrison, D. F., D. L. Foss and M. P. Murtaugh (2000). "Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia." Infect Immun **68**(8): 4752-4758.

Muirhead, M. R., T. J. L. Alexander, J. Carr and T. J. L. Alexander (2013). Managing pig health : a reference for the farm. (2nd ed). Edited by J Carr. 5M Publishing, United Kingdom, UK

Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod and S. Lewenza (2008). "Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." PLoS Pathog **4**(11): e1000213.

Murphy, K., A. J. Park, Y. Hao, D. Brewer, J. S. Lam and C. M. Khursigara (2014). "Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J Bacteriol **196**(7): 1306-1317.

Nadell, C. D., K. Drescher, N. S. Wingreen and B. L. Bassler (2015). "Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms." ISME J **9**(8): 1700-1709.

Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, A. L. Guerrero, R. M. Garcia, M. E. Reyes and M. de la Garza (1998). "Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes." Can J Vet Res **62**(3): 183-190.

Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, J. J. Serrano, C. Garcia and M. de la Garza (1994). "Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A." Can J Vet Res **58**(2): 83-86.

Nelson, S., G. J. Bagby, B. G. Bainton, L. A. Wilson, J. J. Thompson and W. R. Summer (1989). "Compartmentalization of intraalveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response." J Infect Dis **159**(2): 189-194.

Neumann, E. J., A. Ramirez and K. J. Schwartz (2009). *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP). Swine disease manual. E. J. Neumann, A. Ramirez and K. J. Schwartz. Perry, Iowa, American Association of Swine Veterinarians: 3-4.

Nevesinjac, A. Z. and T. L. Raivio (2005). "The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(2): 672-686.

Nguyen, D., A. Joshi-Datar, F. Lepine, E. Bauerle, O. Olakanmi, K. Beer, G. McKay, R. Siehnel, J. Schafhauser, Y. Wang, B. E. Britigan and P. K. Singh (2011). "Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria." Science **334**(6058): 982-986.

Nielsen, R., L. O. Andresen, T. Plambeck, J. P. Nielsen, L. T. Krarup and S. E. Jorsal (1997). "Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds." Vet Microbiol **54**(1): 35-46.

Novick, R. P. (2003). "Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence." Mol Microbiol **48**(6): 1429-1449.

Novick, R. P. and E. Geisinger (2008). "Quorum sensing in staphylococci." Annu Rev Genet **42**: 541-564.

Nucleo, E., L. Steffanoni, G. Fugazza, R. Migliavacca, E. Giacobone, A. Navarra, L. Pagani and P. Landini (2009). "Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*." BMC Microbiol **9**: 270.

Ogasawara, H., K. Yamamoto and A. Ishihama (2010). "Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **312**(2): 160-168.

Ogasawara, H., K. Yamamoto and A. Ishihama (2011). "Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis." J Bacteriol **193**(10): 2587-2597.

Okshevsky, M. and R. L. Meyer (2015). "The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms." Crit Rev Microbiol **41**(3): 341-352.

Olsen, I. (2015). "Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance." Eur J Clin Microbiol Infect Dis.

Olson, M. E., H. Ceri, D. W. Morck, A. G. Buret and R. R. Read (2002). "Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics." Can J Vet Res **66**(2): 86-92.

Öner, E. T. (2013). Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass. Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries. Z. Fang, Springer Berlin Heidelberg: 35-56.

Otto, K. and T. J. Silhavy (2002). "Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2287-2292.

P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies and J. W. Costerton (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." Annu Rev Microbiol **56**(1): 187-209.

Pamp, S. J. and T. Tolker-Nielsen (2007). "Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **189**(6): 2531-2539.

Paradis, S. E., D. Dubreuil, S. Rioux, M. Gottschalk and M. Jacques (1994). "High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells." Infect Immun **62**(8): 3311-3319.

Paradis, S. E., J. D. Dubreuil, M. Gottschalk, M. Archambault and M. Jacques (1999). "Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors." Curr Microbiol **39**(6): 313-0320.

Parsek, M. R. and P. K. Singh (2003). "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis." Annu Rev Microbiol **57**: 677-701.

Peters, B. M., M. A. Jabra-Rizk, G. A. O'May, J. W. Costerton and M. E. Shirtliff (2012). "Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease." Clin Microbiol Rev **25**(1): 193-213.

Poole, K. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max." Front Microbiol **2**: 65.

Prescott, J. F. (2013). Beta-lactam Antibiotics. Antimicrobial therapy in veterinary medicine, John Wiley & Sons, Inc: 133-152.

Price, N. and T. Raivio (2009). "Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100." J Bacteriol **191**: 1798 - 1815.

Prouty, A. M., W. H. Schwesinger and J. S. Gunn (2002). "Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp." Infect Immun **70**(5): 2640-2649.

Putker, F., M. P. Bos and J. Tommassen (2015). "Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface." FEMS Microbiol Rev **39**(6): 985-1002.

Qin, W., L. Wang, R. Zhai, Q. Ma, J. Liu, C. Bao, H. Zhang, C. Sun, X. Feng, J. Gu, C. Du, W. Han, P. R. Langford and L. Lei (2016). "Trimeric autotransporter adhesins contribute to *Actinobacillus pleuropneumoniae* pathogenicity in mice and regulate bacterial gene expression during interactions between bacteria and porcine primary alveolar macrophages." Antonie Van Leeuwenhoek **109**(1): 51-70.



- Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin and D. Qu (2007). "Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." Microbiology **153**(Pt 7): 2083-2092.
- Raetz, C. R., C. M. Reynolds, M. S. Trent and R. E. Bishop (2007). "Lipid A modification systems in gram-negative bacteria." Annu Rev Biochem **76**: 295-329.
- Ramírez-Castillo, F. Y., A. Loera-Muro, M. Jacques, P. Garneau, F. J. Avelar-González, J. Harel and A. L. Guerrero-Barrera (2015). "Waterborne pathogens: detection methods and challenges." Pathogens **4**(2): 307-334.
- Ramjeet, M., A. D. Cox, M. A. Hancock, M. Mourez, J. Labrie, M. Gottschalk and M. Jacques (2008). "Mutation in the LPS outer core biosynthesis gene, galU, affects LPS interaction with the RTX toxins ApxI and ApxII and cytolytic activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1." Mol Microbiol **70**(1): 221-235.
- Ramjeet, M., V. Deslandes, J. Goure and M. Jacques (2008). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies." Anim Health Res Rev **9**(1): 25-45.
- Ramjeet, M., V. Deslandes, F. St Michael, A. D. Cox, M. Kobisch, M. Gottschalk and M. Jacques (2005). "Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1." J Biol Chem **280**(47): 39104-39114.
- Ranjit, D. K., J. L. Endres and K. W. Bayles (2011). "*Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties." J Bacteriol **193**(10): 2468-2476.
- Renelli, M., V. Matias, R. Y. Lo and T. J. Beveridge (2004). "DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential." Microbiology **150**(Pt 7): 2161-2169.
- Rioux, S., C. Galarnau, J. Harel, J. Frey, J. Nicolet, M. Kobisch, J. D. Dubreuil and M. Jacques (1999). "Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1." Can J Microbiol **45**(12): 1017-1026.

Rioux, S., C. Galarneau, J. Harel, M. Kobisch, J. Frey, M. Gottschalk and M. Jacques (2000). "Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1." Microb Pathog **28**(5): 279-289.

Roilides, E., M. Simitopoulou, A. Katragkou and T. J. Walsh (2015). "How biofilms evade host defenses." Microbiol Spectr **3**(3).

Roscetto, E., T. Angrisano, V. Costa, M. Casalino, K. U. Forstner, C. M. Sharma, P. P. Di Nocera and E. De Gregorio (2012). "Functional characterization of the RNA chaperone Hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*." J Bacteriol **194**(21): 5864-5874.

Roth, A. and R. R. Breaker (2009). "The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches." Annu Rev Biochem **78**: 305-334.

Sanchez, C. J., Jr., K. Mende, M. L. Beckius, K. S. Akers, D. R. Romano, J. C. Wenke and C. K. Murray (2013). "Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections." BMC Infect Dis **13**: 47.

Sandal, I., W. Hong, W. E. Swords and T. J. Inzana (2007). "Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*." J Bacteriol **189**(22): 8179-8185.

Sarkozi, R., L. Makrai and L. Fodor (2015). "Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 16." Acta Vet Hung **63**(4): 444-450.

Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. Segers and J. Frey (1999). "Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microbiology **145** ( Pt 8): 2105-2116.

Schooling, S. R. and T. J. Beveridge (2006). "Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms." J Bacteriol **188**(16): 5945-5957.

Schuster, M. and E. P. Greenberg (2006). "A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*." Int J Med Microbiol **296**(2-3): 73-81.

Schwartz, K., R. Stephenson, M. Hernandez, N. Jambang and B. R. Boles (2010). "The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis." J Vis Exp (46): e2470.

Seah, J. N., J. Frey and J. Kwang (2002). "The N-terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice." Infect Immun **70**(11): 6464-6467.

Secor, P. R., G. A. James, P. Fleckman, J. E. Olerud, K. McInnerney and P. S. Stewart (2011). "*Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes." BMC Microbiol **11**: 143.

Segers, R. P. A. M., J. F. van den Bosch and J. Frey (2004). Live attenuated RTC-producing bacteria of the family, Google Patents.

Shakarji, L., L. G. Mikael, R. Srikumar, M. Kobisch, J. W. Coulton and M. Jacques (2006). "Fhua and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants." Can J Microbiol **52**(4): 391-396.

Sheehan, B. J., P. R. Langford, A. N. Rycroft and J. S. Kroll (2000). "[Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host." Infect Immun **68**(8): 4778-4781.

Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz and U. Romling (2004). "GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility." Mol Microbiol **53**(4): 1123-1134.

Simpson, B. W., J. M. May, D. J. Sherman, D. Kahne and N. Ruiz (2015). "Lipopolysaccharide transport to the cell surface: biosynthesis and extraction from the inner membrane." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **370**(1679).

Smith, K. D., S. V. Lipchock, A. L. Livingston, C. A. Shanahan and S. A. Strobel (2010). "Structural and biochemical determinants of ligand binding by the c-di-GMP riboswitch." Biochemistry **49**(34): 7351-7359.

Smith, R. S. and B. H. Iglewski (2003). "*P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence." Curr Opin Microbiol **6**(1): 56-60.

Sousa, A. M. and M. O. Pereira (2014). "*Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs-a review." Pathogens **3**(3): 680-703.

Sperandio, P., R. Cescutti, R. Villa, C. Di Benedetto, D. Candia, G. Deho and A. Polissi (2007). "Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*." J Bacteriol **189**(1): 244-253.

Spiers, A. J. and P. B. Rainey (2005). "The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity." Microbiology **151**(Pt 9): 2829-2839.

Stevenson, A., J. Macdonald and M. Roberts (2003). "Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Microbiol **92**(1-2): 121-134.

Stewart, P. S. (2015). "Antimicrobial tolerance in biofilms." Microbiol Spectr **3**(3).

Stewart, P. S. and J. W. Costerton (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." Lancet **358**(9276): 135-138.

Sudarsan, N., E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N. Kim, K. H. Link and R. R. Breaker (2008). "Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP." Science **321**(5887): 411-413.

Sutherland, I. (2001). "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework." Microbiology **147**(Pt 1): 3-9.

Tanner, J. R., L. Li, S. P. Faucher and A. K. Brassinga (2016). "The CpxRA two-component system contributes to *Legionella pneumophila* virulence." Mol Microbiol **100**(6): 1017-1038

Tascón Cabrero, R.-I., J. A. Vázquez-Boland, C. B. Gutiérrez, J. I. Rodríguez-Barbosa and E. F. Rodríguez-Ferri (1997). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* does not require urease activity to produce acute swine pleuropneumonia." FEMS Microbiol Lett **148**(1): 53-57.

Tefsen, B., J. Geurtsen, F. Beckers, J. Tommassen and H. de Cock (2005). "Lipopolysaccharide transport to the bacterial outer membrane in spheroplasts." J Biol Chem **280**(6): 4504-4509.

Tegetmeyer, H., K. Fricke and N. Baltes (2009). "An isogenic *Actinobacillus pleuropneumoniae* AasP mutant exhibits altered biofilm formation but retains virulence." Vet Microbiol **137**: 392 - 396.

Thacker, P. A. (2013). "Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review." J Anim Sci Biotechnol **4**(1): 1-12.

Thomason, M. K., F. Fontaine, N. De Lay and G. Storz (2012). "A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **84**(1): 17-35.

Thurlow, L. R., M. L. Hanke, T. Fritz, A. Angle, A. Aldrich, S. H. Williams, I. L. Engebretsen, K. W. Bayles, A. R. Horswill and T. Kielian (2011). "*Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*." J Immunol **186**(11): 6585-6596.

Tielker, D., S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau and K. E. Jaeger (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." Microbiology **151**(Pt 5): 1313-1323.

Tischler, A. D. and A. Camilli (2004). "Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation." Mol Microbiol **53**(3): 857-869.

Tormo, M. A., C. Ubeda, M. Marti, E. Maiques, C. Cucarella, J. Valle, T. J. Foster, I. Lasa and J. R. Penades (2007). "Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (Bap) in *Staphylococcus aureus*." Microbiology **153**(Pt 6): 1702-1710.

Toyofuku, M., B. Roschitzki, K. Riedel and L. Eberl (2012). "Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix." J Proteome Res **11**(10): 4906-4915.

Tran, A. X., J. D. Whittimore, P. B. Wyrick, S. C. McGrath, R. J. Cotter and M. S. Trent (2006). "The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin." J Bacteriol **188**(12): 4531-4541..

Tremblay, Y. D., V. Deslandes and M. Jacques (2013). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* genes expression in biofilms cultured under static conditions and in a drip-flow apparatus." BMC Genomics **14**: 364.

Tremblay, Y. D., S. Hathroubi and M. Jacques (2014). "[Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]." Can J Vet Res **78**(2): 110-116.

Tremblay, Y. D., C. Lévesque, R. P. Segers and M. Jacques (2013). "Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface." BMC Vet Res **9**: 213.

Trent, M. S., A. A. Ribeiro, W. T. Doerrler, S. Lin, R. J. Cotter and C. R. Raetz (2001). "Accumulation of a polyisoprene-linked amino sugar in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structural characterization and transfer to lipid A in the periplasm." J Biol Chem **276**(46): 43132-43144.

van den Bosch, H. and J. Frey (2003). "Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs." Vaccine **21**(25-26): 3601-3607.

van der Fels-Klerx, H. J., L. F. Puister-Jansen, E. D. van Asselt and S. L. G. E. Burgers (2011). "Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production1." Journal of Animal Science **89**(6): 1922-1929.

van Overbeke, I., K. Chiers, E. Donne, R. Ducatelle and F. Haesebrouck (2003). "Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 of pigs vaccinated with bacterins consisting of *A. pleuropneumoniae* serotype 10 grown under NAD-rich and NAD-restricted conditions." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **50**(6): 289-293.

Vanni, M., M. Merenda, G. Barigazzi, C. Garbarino, A. Luppi, R. Tognetti and L. Intorre (2012). "Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine." Vet Microbiol **156**(1-2): 172-177.

Vengust, G., Z. Valencak and A. Bidovec (2006). "A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **53**(1): 24-27.

Vilain, S., J. M. Pretorius, J. Theron and V. S. Brozel (2009). "DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms." Appl Environ Microbiol **75**(9): 2861-2868.

Visick, K. L. and E. G. Ruby (2006). "*Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango." Curr Opin Microbiol **9**(6): 632-638.

Vogt, S. and T. Raivio (2012). "Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response." FEMS Microbiol Lett **326**: 2 - 11.

Vorachek-Warren, M. K., S. M. Carty, S. Lin, R. J. Cotter and C. R. Raetz (2002). "An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shock-induced palmitoleoyltransferase of lipid A biosynthesis: absence of unsaturated acyl chains and antibiotic hypersensitivity at 12 degrees C." J Biol Chem **277**(16): 14186-14193.

Vu, B., M. Chen, R. J. Crawford and E. P. Ivanova (2009). "Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation." Molecules **14**(7): 2535-2554.

Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo and M. Otto (2004). "A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence." J Biol Chem **279**(52): 54881-54886.

Wang, L., W. Qin, J. Zhang, C. Bao, H. Zhang, Y. Che, C. Sun, J. Gu, X. Feng, C. Du, W. Han, P. L. Richard and L. Lei (2016). "Adh enhances *Actinobacillus pleuropneumoniae* pathogenicity by binding to OR5M11 and activating p38 which induces apoptosis of PAMs and IL-8 release." Sci Rep **6**: 24058.

Wang, L., E. V. Vinogradov and A. J. Bogdanove (2013). "Requirement of the lipopolysaccharide O-chain biosynthesis gene wxocB for type III secretion and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*." J Bacteriol **195**(9): 1959-1969.

Wang, X., A. Dubey, K. Suzuki, C. Baker, P. Babitzke and T. Romeo (2005). "CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **56**: 1648 - 1663.

Wanty, C., A. Anandan, S. Piek, J. Walshe, J. Ganguly, R. W. Carlson, K. A. Stubbs, C. M. Kahler and A. Vrielink (2013). "The structure of the neisserial lipooligosaccharide phosphoethanolamine transferase A (LptA) required for resistance to polymyxin." J Mol Biol **425**(18): 3389-3402.

Whitfield, C. (1995). "Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens." Trends Microbiol **3**(5): 178-185.

Whitfield, C. and M. S. Trent (2014). "Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides." Annu Rev Biochem **83**: 99-128.

Whitfield, G. B., L. S. Marmont and P. L. Howell (2015). "Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence." Front Microbiol **6**: 471.

Willems, H. M., Z. Xu and B. M. Peters (2016). "Polymicrobial Biofilm Studies: From Basic Science to Biofilm Control." Curr Oral Health Rep **3**(1): 36-44.

Williamson, K. S., L. A. Richards, A. C. Perez-Osorio, B. Pitts, K. McInnerney, P. S. Stewart and M. J. Franklin (2012). "Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population." J Bacteriol **194**(8): 2062-2073.

Wolcott, R. and S. Dowd (2011). "The role of biofilms: are we hitting the right target?" Plast Reconstr Surg **127 Suppl 1**: 28S-35S.

Wood, T. K., S. J. Knabel and B. W. Kwan (2013). "Bacterial persister cell formation and dormancy." Appl Environ Microbiol **79**(23): 7116-7121.

Wu, C., J. Labrie, Y. D. Tremblay, D. Haine, M. Mourez and M. Jacques (2013). "Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria." J Appl Microbiol **115**(1): 30-40.



Wu, S., X. Li, M. Gunawardana, K. Maguire, D. Guerrero-Given, C. Schaudinn, C. Wang, M. M. Baum and P. Webster (2014). "Beta- lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable *haemophilus influenzae* by up-regulating carbohydrate metabolism." PLoS One **9**(7): e99204.

Xie, F., Y. Zhang, G. Li, S. Liu and C. Wang (2013). "The ClpP protease is required for the stress tolerance and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." PLoS One **8**: e53600.

Xu, Z., X. Chen, L. Li, T. Li, S. Wang, H. Chen and R. Zhou (2010). "Comparative genomic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." J Bacteriol **192**(21): 5625-5636.

Xu, Z., Y. Zhou, L. Li, R. Zhou, S. Xiao, Y. Wan, S. Zhang, K. Wang, W. Li, L. Li, H. Jin, M. Kang, B. Dalai, T. Li, L. Liu, Y. Cheng, L. Zhang, T. Xu, H. Zheng, S. Pu, B. Wang, W. Gu, X. L. Zhang, G. F. Zhu, S. Wang, G. P. Zhao and H. Chen (2008). "Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China." PLoS One **3**(1): e1450.

Yonezawa, H., T. Osaki, S. Kurata, M. Fukuda, H. Kawakami, K. Ochiai, T. Hanawa and S. Kamiya (2009). "Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation." BMC Microbiol **9**: 197.

Zähringer, U., B. Lindner and E. T. Rietschel (1999). Chemical structure of lipid A: recent advances in structural analysis of biologically active molecules. Endotoxin in health and disease. H. B. D.C. Morrison, S. Opal, and S. Vogel New York, Marcel Dekker: 93–114.

Zhang, Y., J. M. Tennent, A. Ingham, G. Beddome, C. Prideaux and W. P. Michalski (2000). "Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." FEMS Microbiol Lett **189**(1): 15-18.

Zhao, G., M. L. Usui, S. I. Lippman, G. A. James, P. S. Stewart, P. Fleckman and J. E. Olerud (2013). "Biofilms and inflammation in chronic wounds." Adv Wound Care (New Rochelle) **2**(7): 389-399.

Zhou, Y., L. Li, Z. Chen, H. Yuan, H. Chen and R. Zhou (2013). "Adhesion protein ApfA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is required for pathogenesis and is a potential target for vaccine development." Clin Vaccine Immunol **20**(2): 287-294.

## **ANNEXES**

## Annexe 1

Revue publiée dans Canadian Journal of Veterinary Microbiology

Vol. 78 Issue 02, 110-116

### **Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique**

Yannick D.N. Tremblay<sup>1,2</sup>, Skander Hathroubi<sup>2</sup> et Mario Jacques<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait

<sup>2</sup>Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,

St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

\*Correspondance: Mario Jacques, Faculté de médecine vétérinaire,

Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Tél.: 450-773-8521 (poste 8348); Fax: 450-778-8108;

E-mail: [mario.jacques@umontreal.ca](mailto:mario.jacques@umontreal.ca)

Ce texte est dédié à la mémoire de J. William (Bill) Costerton; un ami et un mentor.

## **Résumé**

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. La présence de biofilms lors d'infections demande donc de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement. De même, la présence de biofilms sur des surfaces retrouvées à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation affectera l'efficacité du protocole de désinfection. De façon surprenante, la formation de biofilms chez les bactéries pathogènes des animaux et les bactéries zoonotiques est un sujet relativement peu étudié. Ce bref compte rendu a pour objectif de sensibiliser les intervenants en santé animale à l'importance des biofilms.

## **Abstract**

Bacterial biofilms are structured communities of bacterial cells enclosed in a self-produced polymer matrix that is attached to a surface. Biofilms protect and allow bacteria to survive and thrive in hostile environments. Bacteria within biofilms can withstand host immune responses, and are much less susceptible to antibiotics and disinfectants when compared to their planktonic counterparts. The ability to form biofilms is now considered an attribute of many microorganisms. Diseases associated with biofilms require novel methods for their prevention, diagnosis and treatment, this is largely due to the properties of biofilms. Furthermore, the

presence of biofilms on surfaces found at farms, slaughterhouses or food processing plants will have an impact on the efficacy of disinfection protocols. Surprisingly, biofilm formation by bacterial pathogens of veterinary or zoonotic importance has received relatively little attention. The objective of this brief Review article is to bring awareness about the importance of biofilms to animal health stakeholders.

### **Caractéristiques des biofilms**

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique (1-3) (Figure 1). Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique (e.g. cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (e.g. plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation). La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi (Figure 2). La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm (4).

Les biofilms bactériens isolés de divers environnements partagent des caractéristiques communes (1-3) : (i) les cellules bactériennes sont retenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques; (ii) le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes; (iii) le biofilm protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et les biocides (antibiotiques et désinfectants). Cette dernière caractéristique est particulièrement importante. La présence de

biofilms pourra avoir comme effet d'interférer avec un traitement adéquat de l'animal ou une désinfection efficace des surfaces (1-6).

### **Étapes de la formation d'un biofilm**

Tel que mentionné précédemment, la formation d'un biofilm est constituée de plusieurs étapes (Figure 2) (1-3). Le biofilm peut se former très rapidement, en quelques heures; un bon exemple étant la plaque dentaire. Les bactéries doivent, dans un premier temps, adhérer à une surface biotique ou abiotique. Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie (e.g. fimbriae, flagelle). Puis les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se multiplier et former des microcolonies. Lors de l'étape de maturation du biofilm, les bactéries synthétisent un exopolysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents. L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes (7). Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm. Le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs : des perturbations mécaniques (e.g. force de cisaillement, abrasion), la dégradation enzymatique de la matrice polymérique (e.g. dispersine B), la dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est attaché (e.g. hyaluronidase), l'induction de la motilité, la production d'agents tensioactifs (e.g. rhamnolipides) et le relâchement de l'exopolysaccharide. Il est bien connu que les bactéries réagissent à de multiples signaux environnementaux (e.g. concentration d'éléments nutritifs) ainsi qu'à la densité de cellules bactériennes, phénomène mieux connu sous le nom de *quorum sensing*, et que ceci aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm (8). Le détachement et la dispersion de cellules bactériennes d'un biofilm jouent un rôle important dans la transmission de

bactéries de réservoirs environnementaux à un hôte (animal ou humain), dans la transmission entre les hôtes et dans la propagation de l'infection chez un hôte (7).

### **Composition de la matrice du biofilm**

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations (8, 9). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance. Un des exopolysaccharides le plus souvent retrouvés est un polymère de  $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (polyglucosamine, PGA ou PNAG). On retrouve ce polymère chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis*, *Bordetella* spp. et *Actinobacillus* spp. La cellulose, un polymère linéaire de glucose, est également retrouvée fréquemment chez diverses espèces bactériennes, dont *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Il existe plusieurs autres polysaccharides dont le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate retrouvé chez *Pseudomonas*.

### **Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens**

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels (1). Comme indiqué précédemment, les biofilms permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (10, 11). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance



(certains auteurs préfèrent plutôt parler d'une tolérance) des biofilms aux agents antimicrobiens (2, 5, 11). Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique peuvent aussi lier certains agents antimicrobiens. Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. Étant donné la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante; ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (12). La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) demeure la mesure de référence pour déterminer la sensibilité des bactéries planctoniques à divers agents antimicrobiens. Cependant, il faut être conscient qu'il n'existe pas une bonne corrélation entre la CMI de cultures bactériennes planctoniques et la concentration de l'agent antimicrobien requise pour éradiquer un biofilm (10). Il est maintenant possible de déterminer la concentration minimale d'un antibiotique pouvant éradiquer un biofilm (ou "minimal biofilm eradication concentration", MBEC). En effet, un groupe de chercheurs de l'University of Calgary a développé une technologie permettant de déterminer la sensibilité de biofilms à divers antibiotiques et désinfectants (13). L'appareil originalement connu sous le nom de "Calgary Biofilm Device" est maintenant appelé "MBEC Assay" et est disponible commercialement (Innovotech inc., Edmonton, AB). Son format de 96 puits, bien que ne reproduisant évidemment pas à la perfection l'environnement normal d'un biofilm ou d'un biofilm formé dans une cuve à flux continu, permet le criblage rapide d'agents antimicrobiens (seuls ou en combinaison). Ces chercheurs ont été les premiers à démontrer une

augmentation de la résistance aux antibiotiques lors de la croissance sous forme d'un biofilm d'une vaste gamme de bactéries pathogènes des animaux (10).

### **Modèles de laboratoire pour l'étude des biofilms**

Plusieurs systèmes sont couramment utilisés afin d'étudier en laboratoire la formation de biofilms (14). Les cuves à flux continu (ou "flow cell") sont de petites chambres qui permettent la formation d'un biofilm à l'interface solide-liquide en présence d'une force de cisaillement et d'un apport continu d'éléments nutritifs. Ce système reproduit assez bien les conditions auxquelles sont exposés les biofilms dans leur environnement naturel. De plus, il permet de visualiser facilement le biofilm sous un microscope confocal. Une modification apportée au système permet la formation d'un biofilm à l'interface air-liquide en présence d'une faible force de cisaillement (15). Ce système (appelé « drip flow reactor ») serait plus représentatif de l'environnement des poumons et de la cavité orale. Plus récemment, des systèmes de microfluidique ont été développés et adaptés à l'étude des biofilms (16). Les biofilms peuvent également être étudiés dans un système statique en microplaques de 96 puits (17). Ce système très populaire permet la formation d'un biofilm à l'interface solide-liquide et le criblage à haut débit. Le Calgary Biofilm Device, mentionné à la section précédente, combine les caractéristiques d'un système de microplaques à 96 puits auquel une force de cisaillement constante est appliquée (12). Finalement, la pellicule qui se forme à l'interface air-liquide d'une culture en tube représente un autre modèle d'étude des biofilms.

### **Molécules pouvant interférer avec la formation du biofilm**

Il existe différentes stratégies permettant d'inhiber la formation du biofilm (4, 18-22). Celles-ci peuvent prévenir l'adhérence initiale du microorganisme, prévenir la croissance microbienne,

empêcher la communication entre les cellules bactériennes, inhiber la synthèse de la matrice polymérique ou bien dégrader cette matrice. Le criblage à haut débit de banques de composés chimiques (naturels ou synthétiques) est utilisé afin d'identifier des produits capables d'interférer avec la formation d'un biofilm ou capables de disperser un biofilm existant (4, 18). Bien que la plupart de ces produits antibiofilm ne tuent pas les bactéries, elles peuvent toutefois les rendre plus susceptibles à l'action des agents antimicrobiens ou à la réponse immunitaire de l'hôte. La grande majorité de ces produits est toujours au stade expérimental. Nous donnerons ici quelques exemples démontrant la diversité des molécules antibiofilm et de leurs cibles potentiels.

Davies et Marques (23) ont identifié une petite molécule signal (acide *cis*-2-décénoïque) produite par *Pseudomonas aeruginosa* et capable d'inhiber le développement d'un biofilm et d'induire sa dispersion. Cette molécule s'est également montrée efficace contre des biofilms produits par d'autres bactéries à Gram-négatif, à Gram-positif et par des levures. Certains acides aminés D (dextrogyres) produits par les bactéries (e.g. *Bacillus*) sont capables de disperser les biofilms produits par différentes bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (24). Il a été récemment rapporté que certains polysaccharides bactériens avaient la capacité d'inhiber la formation de biofilms chez un vaste spectre de bactéries et de champignons (25).

La bromoageliférine, molécule d'origine marine de la famille des 2-amino-imidazoles, a démontré une activité antibiofilm chez *P. aeruginosa* et d'autres bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif (26). Une molécule synthétique, le 2-amino-imidazole/triazole (ou 2-AIT), a démontré une activité antibiofilm chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif ainsi qu'une activité synergique avec des antibiotiques traditionnels (27). Truchado et coll. (28) ont démontré que le miel de châtaignier contient un inhibiteur du *quorum sensing* pouvant réduire la formation d'un biofilm chez diverses bactéries à Gram-négatif. Une approche chémoinformatique a permis

à Dürig et coll. (29) d'identifier des produits naturels d'origine végétale (acide ellagique, esculétine et fisétine) inhibant la formation de biofilm chez *S. aureus* et *Streptococcus dysgalactiae*.

Les peptides cationiques antimicrobiens peuvent également affecter la formation du biofilm. Par exemple, le peptide LL-37, membre de la famille des cathélicidines retrouvées chez les vertébrés, peut inhiber la formation d'un biofilm chez *Francisella novicida* (30). Notre laboratoire a démontré que de faibles concentrations de zinc (e.g.  $ZnCl_2$ ) pouvaient inhiber la formation de biofilm chez diverses bactéries pathogènes du porc (31, 32).

Plusieurs enzymes se sont montrées efficaces à dégrader la matrice polymérique du biofilm. Ainsi, l'alginate lyase est capable de dégrader l'alginate contenu dans la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* (33). La dispersine B est une enzyme bactérienne capable de dégrader le polymère de N-acétyl-glucosamine de la matrice du biofilm de plusieurs espèces bactériennes dont *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli* (34). La DNase quant à elle peut hydrolyser les acides désoxyribonucléiques contenus dans la matrice de certains biofilms (35, 36). Les bactériophages produisent certaines enzymes capables de dégrader les polysaccharides de la matrice du biofilm et provoquer sa dispersion (37). La spécificité des bactériophages pour un groupe de bactéries bien précis suggère par contre qu'un cocktail composé de plusieurs bactériophages soit nécessaire afin d'être efficace.

Finalement, l'interférence avec des signaux bactériens représentent une approche privilégiée par plusieurs chercheurs. Par exemple, la furanone (molécule extraite d'une algue marine) et des molécules analogues sont capables d'inhiber le *quorum sensing* et donc d'interférer par la même occasion avec la formation/dispersion du biofilm (38, 39). Le sulfathiazole est un antibiotique

pouvant interférer avec la biosynthèse de la molécule signal c-di-GMP jouant un rôle important dans la formation/dispersion de biofilm chez plusieurs espèces bactériennes (40).

### **Formation de biofilm chez les bactéries pathogènes des animaux**

Plusieurs espèces bactériennes causant des infections chez l'animal, et ayant ou non un potentiel zoonotique, sont capables de former des biofilms (Tableau 1). L'espace limité nous empêche d'inclure une liste exhaustive de références sur ces espèces bactériennes mais le lecteur intéressé est invité à consulter un article de synthèse récent sur le sujet (41). Mentionnons à titre d'exemple que *S. aureus* est souvent impliqué dans les cas de mammite chez la vache laitière, une maladie économiquement très importante. Il est suggéré par plusieurs chercheurs que la formation d'un biofilm favorise la persistance dans la glande mammaire tout en diminuant l'efficacité des traitements aux antibiotiques (42). Plusieurs gènes impliqués dans la formation du biofilm ont été identifiés dont ceux (gènes *icaADBC*) codant pour la synthèse de l'exopolysaccharide PGA de la matrice polymérique. La capacité de former un biofilm a également été observée chez d'autres espèces pouvant causer une mammite chez la vache laitière, dont *S. epidermidis* (un staphylocoque à coagulase négative ou SCN) et *Streptococcus agalactiae*. Notre laboratoire s'intéresse d'ailleurs à la formation de biofilms par les SCN isolés du lait de fermes canadiennes (Figure 1)(43). Fait intéressant, plus les souches proviennent d'échantillons de lait prélevés tardivement au cours de la lactation plus elles ont tendance à démontrer une grande capacité à former des biofilms. Nous avons également observé que la croissance sous forme d'un biofilm diminue de façon marquée (de 4 à 500 fois) l'efficacité d'antibiotiques d'usage courant (pénicilline G/novobiocine et ceftiofur) chez les souches de CNS que nous avons testées (Tremblay YDN et M Jacques, communication personnelle).

Plusieurs espèces bactériennes intéressent particulièrement l'industrie agroalimentaire à cause de leur capacité à causer des infections ou des toxi-infections alimentaires chez l'homme (6, 44). C'est le cas notamment des souches entérohémorragiques d'*E. coli* O157:H7 dont le bœuf est le principal réservoir. Plusieurs de ces souches sont capables de former des biofilms et le plasmide pO157 semble y jouer un rôle essentiel (45). De plus, des souches d'*E. coli* O157:H7 incapables de former un biofilm peuvent tout de même s'associer à un biofilm produit par une souche non pathogène d'*E. coli* et profiter ainsi de la protection fournie par le biofilm (46).

*Listeria monocytogenes*, agent de la listériose, est un microorganisme pouvant survivre et croître dans diverses conditions environnementales incluant la température de réfrigération, un pH acide et une haute concentration en sel (47). Il peut être isolé d'aliments crus ou transformés (ex. lait, produits laitiers, viandes, poissons et fruits de mer). La formation d'un biofilm par *L. monocytogenes* et le fait que *L. monocytogenes* peut également se retrouver dans des biofilms multi-espèces (48) compliquent par le fait même les procédures de désinfection. Il a été montré que l'hydrophobicité de la surface bactérienne (49) et la motilité due aux flagelles (50) sont tous les deux importants dans le développement des biofilms chez cette espèce. L'ADN semble être un composant important de la matrice du biofilm (51).

Les *Campylobacter* thermophiles, *C. jejuni* et *C. coli*, sont responsables d'un grand nombre d'infections gastro-intestinales. Ces bactéries peuvent former des biofilms et survivre sur les surfaces d'équipement des usines de transformation (52). Ces bactéries peuvent également former des biofilms dans les systèmes d'approvisionnement en eau à la ferme (53). Ces biofilms peuvent représenter une source continue de contamination des animaux. Ces espèces bactériennes peuvent également s'incorporer à des biofilms existants (54). Les flagelles (53, 55) et le *quorum sensing* (53) semblent requis pour une formation optimale du biofilm.

Les salmonelles sont également capables de former des biofilms sur une variété de surfaces (56). Les salmonelles d'un biofilm sont plus résistantes à l'action des désinfectants que les salmonelles planctoniques (57). Bien que les désinfectants puissent grandement diminuer le nombre de cellules viables d'un biofilm, les cellules viables restantes représentent une source problématique de contamination. L'utilisation du Calgary Biofilm Device a permis de démontrer une plus grande résistance des salmonelles face à plusieurs antibiotiques lors d'une croissance sous forme d'un biofilm (10).

### **Conclusions et perspectives**

Le biofilm semble faciliter la survie des bactéries pathogènes dans l'environnement et chez leurs hôtes. Parce que les bactéries formant des biofilms ont des caractéristiques différentes des bactéries planctoniques, de nouveaux outils et de nouvelles approches pour la prévention, le traitement et le diagnostic de ces bactéries pathogènes sont requis. L'impact des biofilms en santé animale et en santé publique est très évident. La formation d'un biofilm peut augmenter la résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et à la réponse immunitaire de l'hôte. Le cas échéant, ceci aura comme effet d'interférer avec un traitement adéquat de l'animal ou une désinfection efficace à la ferme à l'abattoir ou à l'usine de transformation.

La vaccination contre les bactéries produisant des biofilms n'a pas été évaluée de façon approfondie, mais des résultats prometteurs ont été obtenus dans certains cas. Par exemple, un vaccin composé de cellules inactivées d'une souche de *S. aureus* produisant un abondant biofilm induit une forte production d'anticorps contre le PGA et protège contre la mammite ovine et bovine (58, 59). De même, un vaccin composé de cellules d'*Aeromonas hydrophila* sous forme d'un biofilm induit une réponse immunitaire protectrice chez le poisson (60).

Le développement de la prochaine génération d'agents antimicrobiens devra tenir compte de la synergie possible entre deux antibiotiques, ou entre un antibiotique et une autre molécule (ex. biocide, ion métallique, enzyme, agent tensioactif ou un inhibiteur du *quorum sensing*) afin d'accroître leur efficacité envers les biofilms (11). Pour ce faire, il faudra également développer des essais standardisés permettant d'évaluer ces synergies potentielles. De même, l'efficacité des biocides/désinfectants devra être évaluée contre des bactéries d'un biofilm et non plus uniquement contre des cellules planctoniques. Considérant son impact sur la santé animale et la santé publique, la persistance de gènes de résistance aux antibiotiques à l'intérieur des biofilms est un autre aspect important qui ne peut être négligé. De plus, les bactéries ne forment que très rarement des biofilms composés d'une seule espèce bactérienne. Certaines bactéries peuvent aussi s'incorporer à des biofilms existants. Il existe d'ailleurs des exemples bien documentés chez *L. monocytogenes* et *E. coli* O157:H7. L'existence de biofilms multi-espèces amène d'ailleurs un niveau de complexité supplémentaire à l'étude et au contrôle des biofilms.

En résumé, il nous faut effectuer des recherches en vue de développer des stratégies pour la prévention et le traitement des infections chez l'animal en tenant compte des caractéristiques du biofilm. Des recherches sont également requises afin de développer des procédures de désinfection permettant d'éliminer les biofilms à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation, car ces biofilms représentent des réservoirs potentiels d'agents infectieux.

## **Remerciements**

Les travaux sur les biofilms réalisés dans le laboratoire de MJ sont financés par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRNSG), le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQ-NT), le Conseil canadien de la santé porcine et la Grappe de



recherche laitière du Canada. Les auteurs tiennent à remercier les deux évaluateurs anonymes pour la pertinence de leurs commentaires.

## **Références**

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
2. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009;11:1034-1043.
3. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95-108.
4. Richards JJ, Melander C. Controlling bacterial biofilms. *ChemBioChem* 2009;10:2287-2294.
5. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:85-105.
6. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol* 2010;109:1117-1131.
7. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 2010;89:205-218.
8. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;73:310-347.
9. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623-633.
10. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002;66:86-92.
11. Ceri H, Olson ME, Turner RJ. Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:1233-1237.

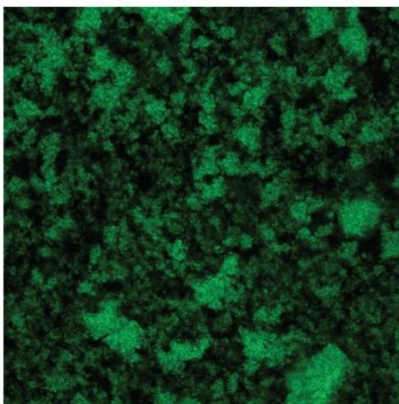
12. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:107-131.
13. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc* 2010;5:1236-1254.
14. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2010;83:89-105.
15. Goeres DM, Hamilton MA, Beck NA, Buckingham-Meyer K, Hilyard JD, Loetterle LR, Lorenz LA, Walker DK, Stewart PS. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat Protoc* 2009;4:783-788.
16. Benoit MR, Conant CG, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Matin A. New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:4136-4142.
17. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol* 2005;00:1B.1.1-1B.1.17.
18. Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86:813-823.
19. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36:972-989.
20. Lebeaux D, Ghigo JM. Infections associées aux biofilms – Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Med Sci (Paris)* 2012;28 :727-739.
21. Worthington RJ, Richards JJ, Melander C. Small molecule control of bacterial biofilms. *Org Biomol Chem* 2012;10:7457-7474.
22. Yang L, Liu Y, Wu H, Song Z, Hoiby N, Molin S, Givskov M. Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65:146-157.

23. Davies DG, Marques CNH. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* 2009;191:1393-1403.
24. Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 2010;328:627-629.
25. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM. Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol* 2012;doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x
26. Huigens RW III, Ma L, Gambino C, Moeller PDR, Basso A, Cavanagh J, Wozniak DJ, Melander C. Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. *Mol Biosyst* 2008;4:614-621.
27. Rogers SA, Huigens RW III, Cavanagh J, Melander C. Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2112-2118.
28. Truchado P, Gil-Izquierdo A, Tomás-Barberán F, Allende A. Inhibition by chestnut honey of N-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem* 2009;57:11186-11193.
29. Dürig A, Kouskoumvekaki I, Vejborg RM, Klemm P. Chemoinformatics-assisted development of new antibiofilm compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;87:309-317.
30. Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem Biophys Res Comm* 2010;396:246-251.
31. Labrie J, Pelletier-Jacques G, Deslandes V, Ramjeet M, Auger E, Nash JH, Jacques M. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res* 2010;41:03.
32. Wu C, Labrie J, Tremblay YDN, Haine D, Mourez M, Jacques M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* 2013; 115: 30-40 doi:10.1111/jam.12197.

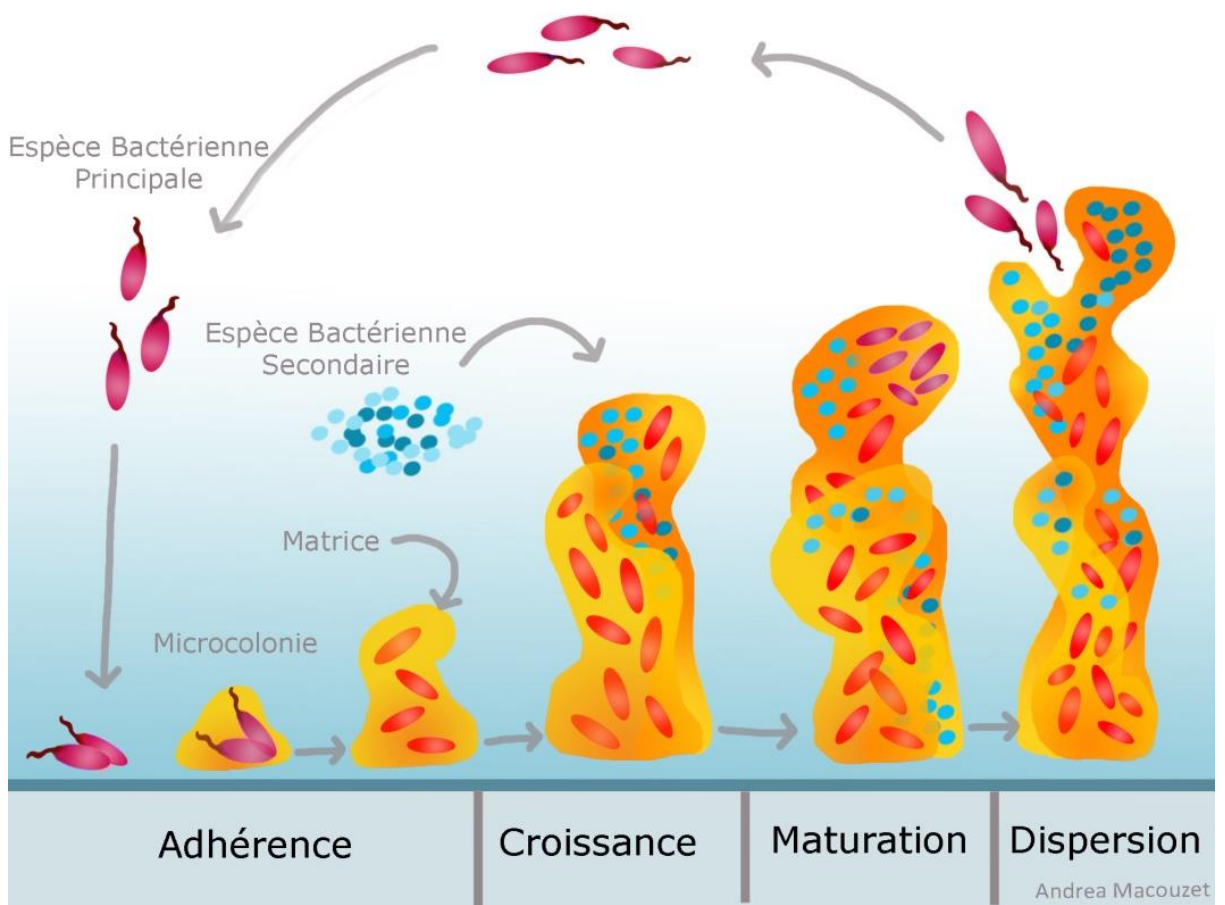
33. Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:2355-2359.
34. Kerrigan JE, Ragnath C, Kandra L, Gyémant G, Liptak A, Janossy L, Kaplan JB, Ramasubbu N. Modeling and biochemical analysis of the activity of antibiofilm agent Dispersin B. *Acta Biol Hung* 2008;59:439-451.
35. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002;295:1487.
36. Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR, Bayles KW. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* 2009;4:e5822.
37. Donlan RM. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol* 2009;17:66-72.
38. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Hoiby N, Kjelleberg S, Givskov M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 2002;148:87-102.
39. Müh U, Schuster M, Heim R, Singh A, Olson ER, Greenberg EP. Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3674-3679.
40. Antoniani D, Bocci P, Maciag A, Raffaelli N, Landini P. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:1095-1104.
41. Jacques M, Aragon V, Tremblay YDN. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 2010;11:97-121.
42. Melchior MB. Bovine mastitis and biofilms. In: Percival SL, Knottenbelt DC, Cochrane CA, eds. *Springer Series on Biofilms, Vol. 6 Biofilms and Veterinary Medicine*. New York: Springer, 2011:205-222.

43. Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci* 2013;96:234-246.
44. Jacques M, Tremblay YDN. Les biofilms : s'en préoccupe-t-on assez dans l'industrie agroalimentaire? Centre québécois de valorisation des biotechnologies, Fiche BioTendance<sup>®</sup> 2010:BTD 10-7, [www.cqvb.ca](http://www.cqvb.ca).
45. Puttamreddy S, Cornick NA, Minion FC. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect Immun* 2010;78:2377-2384.
46. Uhlich GA, Rogers DP, Mosier DA. *Escherichia coli* serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathog Dis* 2010;7:935-943.
47. Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* 2007;113:1-15.
48. Habimana O, Meyrand M, Meylheuc T, Kulakauskas S, Briandet R. Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7814-7821.
49. Takahashi H, Suda T, Tanaka Y, Kimura B. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Lett Appl Microbiol* 2010;50:618-625.
50. Todhanakasem T, Young GM. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J Bacteriol* 2008;190:6030-6034.
51. Harmsen M, Lappann M, Knochel S, Molin S. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2010;76: 2271-2279.
52. Peyrat MB, Soumet C, Maris P, Sanders P. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: analysis of a potential source of carcass contamination. *Int J Food Microbiol* 2008;124:188-194.

53. Reeser RJ, Medler RT, Billington SJ, Jost BH, Joens LA. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1908-1913.
54. Sulaeman S, Le Bihan G, Rossero A, Federighi M, Dé E, Tresse O. Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test. *J Appl Microbiol* 2010;108:1303-1312.
55. Moe KK, Mimura J, Ohnishi T, Wake T, Yamazaki W, Nakai M, Misawa N. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J Vet Med Sci* 2010;72:411-416.
56. Jain S, Chen J. Attachment and biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *J Food Prot* 2007;70:2473-2479.
57. Wong HS, Townsend KM, Fenwick SG, Trengove RD, O'Handley RM. Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella* Typhimurium biofilms to disinfectants. *J Appl Microbiol* 2010;108:2222-2228.
58. Pérez MM, Prenafeta A, Valle J, Penadés J, Rota C, Solano C, Marco J, Grilló MJ, Lasa I, Irache JM, Maira-Litrán T, Jiménez-Barbero J, Costa L, Pier GB, de Andrés D, Amorena B. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl  $\beta$ -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine* 2009;27:2379-2386.
59. Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, COSTA L. Study of the humoral immunological responses after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;134:208-217.
60. Nayak DK, Asha A, Shankar KM, Mohan CV. Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus* – a carnivore model. *Fish Shellfish Immunol* 2004;16:613-619.



**Figure 1.** Biofilm produit par une souche de *Staphylococcus epidermidis* dans un système en microplaque. Image obtenue en microscopie confocale suite à une coloration du biofilm à l'aide de FilmTracer™ FM® 1-43.



**Figure 2.**  tapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien.



## Annexe 2

Revue publiée le 23 mai 2016 dans *Microbial Drug Resistance*

### **Biofilms:**

#### **Microbial shelters against antibiotics**

S. Hathroubi<sup>1</sup>, M.A. Mekni<sup>2</sup>, P. Domenico<sup>3</sup>, D. Nguyen<sup>4</sup> and M. Jacques<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C. P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

<sup>2</sup>The National Bone Marrow Transplant Centre, UR12ES02. Faculty of Medicine, Tunis, Tunisia

<sup>3</sup>Microbion Corporation, Boseman, Montana, 59715 USA

<sup>4</sup> Meakins Christie Laboratories and Department of Medicine, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada H4A 3J1

\* Corresponding author: Mario Jacques, Ph.D.

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 2M2 Tel.: (450) 773-8521 ext. 8348; Fax (450) 778-8108

E-mail: [mario.jacques@umontreal.ca](mailto:mario.jacques@umontreal.ca)

**Keywords:** Biofilm, multi-species biofilm, antibiotic resistance, antibiotic tolerance, anti-biofilm agents

## **Abstract**

Biofilms are communities of aggregated bacterial cells embedded in a self-produced, extracellular polymeric matrix. Biofilms are recalcitrant to antibiotic treatment and immune defenses and are implicated in many chronic bacterial and fungal infections. In this review, we provide an overview of the contribution of biofilms to persistent infections resistant to antibiotic treatment, the impact of multi-species biofilms on drug resistance and tolerance, and recent advances in the development of anti-biofilm agents. Understanding the mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in biofilms is essential for developing new preventive and therapeutic strategies and curbing drug resistance.

## **Introduction**

Antibiotics, no doubt, have played an important role in medicine, having saved millions of lives, while combatting numerous illnesses caused by many different pathogens. Antibiotics have altogether changed the way we view disease, and their use has grown exponentially. Antibiotics are now manufactured at an estimated worldwide scale of about 100,000 tons annually (Nikaido, 2009). This massive drug deployment over time has selected for antibiotic and multi-drug resistant pathogens that now dominate the hospital setting (Chang et al., 2015).

Biofilms, which are surface-associated communities of bacteria embedded in a hydrated matrix of extracellular polymeric substances (EPS), add to the problem, and render infections more difficult, if not impossible, to eradicate with conventional antibiotic therapy (Costerton, 1999a; Costerton et al., 1999b). Biofilm growth offers several advantages to bacteria, including protective shelter from hostile environments (e.g. iron deprivation, osmotic stress, metal toxicity and antibiotic exposure) (Harrison et al., 2007; Jefferson, 2004; Nadell et al., 2015; Watnick & Kolter, 2000).

Microbial biofilms resist antibiotic treatment in two principal ways: a genetically-encoded mechanism of antibiotic resistance, and a reversible phenotype that confer drug tolerance (Olsen, 2015; Parsek & Singh, 2003; Stewart & Costerton, 2001; Stewart, 2015). Antibiotic resistance is the acquired ability of a microorganism to resist the effect of an antimicrobial agent and is associated with inheritable antibiotic resistance. In contrast to antibiotic resistance, antibiotic tolerance is not caused by mutation or inheritance of a resistance gene. It is a transient and non-heritable phenotype defined by the physiological state of biofilm cell populations. It can also be mediated by biofilm-specific characteristics that limit drug diffusion and activity (Chiang et al.,

2013; Ciofu et al., 2014). Biofilm-associated drug resistance and tolerance play a major role in the pathogenesis of many subacute and chronic bacterial diseases and their recalcitrance to antibiotic treatment, including medical device-related infections, chronic wounds, and intractable lung infections in cystic fibrosis patients (Bjarnsholt, 2010, 2013; Donlan & Costerton, 2002; Hall-Stoodley et al., 2004; Hoiby et al., 2010b; James et al., 2008; Zhao et al., 2013). This review addresses recent insights into the mechanisms underlying biofilm-associated drug resistance and tolerance, and highlights key advances in anti-biofilm agent development.

## **Mechanisms of antibiotic tolerance in biofilms**

### **Biofilm as a physical barrier**

The biofilm matrix consists of EPS, which include exopolysaccharides, minerals, proteins and extracellular deoxyribonucleic acid (DNA) (Flemming et al., 2007; Hall-Stoodley et al., 2004; Limoli et al., 2015). The composition and physical properties of EPS vary greatly among different genera and within species. Hydrated networks formed by EPS facilitate cell-to-cell and surface adhesion, and provide structural support for biofilm architecture (Costerton et al., 1999b; Flemming et al., 2007). Exopolysaccharides constitute the main EPS in many biofilms and a wide range of exopolysaccharides such as poly-N-acetyl-D-glucosamine, acetan, alginate, cellulose, gellan, pullulan, xanthan, serve as biofilm scaffolding for different microbial species (Öner, 2013; Vu et al., 2009).

Biofilm EPS form a dense barrier containing numerous anionic and cationic molecules (e.g., uronic acids, proteins, glycoproteins, glycolipids, eDNA, etc.) that can bind charged antimicrobial agents and provide shelter for microorganisms (Flemming et al., 2007; Harrison et al., 2007; Nadell et al., 2015). These chemical and structural features help impart antibiotic

tolerance to cells embedded within the biofilm aggregates (Mah & O'Toole, 2001). The EPS can limit the diffusion of some antibiotics through several different mechanisms, thus mitigating their antibacterial activity against biofilm bacteria (Anderson & O'Toole, 2008; Chiang et al., 2013; Jefferson et al., 2005; Limoli et al., 2015; Singh et al., 2010; Stewart et al., 2001; Sun et al., 2013).

Reaction with, or sorption to, EPS may limit transport of antimicrobial agents into biofilm cells (Singh et al., 2010). For example, penetration of  $\beta$ -lactams (e.g. oxacillin, cefotaxime) and vancomycin was significantly reduced in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms (Singh et al., 2010). Singh et al. (2010) assessed the penetration of these antibiotics through mature biofilms formed on polycarbonate membrane. Using a nitrocellulose membrane placed on the top of a biofilm, they assayed directly for antibiotic diffusion from the antibiotic disc positioned at the top of the biofilm to the agar plate, pre-inoculated with bacteria, thus enabling the production of a zone of inhibition. The experiment showed that oxacillin, cefotaxime and vancomycin have limited penetration through *S. epidermidis* biofilm (Singh et al., 2010). Using infrared and Raman spectroscopies, Lu et al also showed that the transport rate of ciprofloxacin and erythromycin into *Campylobacter jejuni* biofilms was reduced, compared to natural antibiotic diallyl sulphide from *Allium*, which freely penetrated the phospholipid bilayer (Lu et al., 2012).

Charged EPS polymers may also inactivate or bind antibiotics (Hoiby et 2010a; Mah & O'Toole, 2001). In *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, polyanionic exopolysaccharides, such as alginate, an EPS overproduced by mucoid *P. aeruginosa* strains, decrease the activity of positively charged antibiotics such as aminoglycosides (Chiang et al., 2013; Hentzer et al., 2001; Limoli et al., 2015) (Alipour et al., 2009; Hentzer et al., 2001), while alginate lyase enhances the activity of some aminoglycosides against *P. aeruginosa* biofilms (Alipour et al., 2009).

Interestingly, the host antimicrobial peptide LL-37 produced by polymorphonuclear cells promotes alginate overproduction in *P. aeruginosa* by inducing *mucA* mutations via interactions with the DNA polymerase DinB (Limoli et al., 2014). Such interactions highlight the role of bacterial adaptation to host responses that leads to antibiotic tolerance. Pel exopolysaccharides, another EPS component of *P. aeruginosa* biofilms, is also able to sequester cationic antibiotics such as aminoglycosides and thus confers tolerance to these molecules (Colvin et al., 2011). The mechanism responsible for this protection is not clear, but Pel is a cationic polysaccharide and is tightly associated with negatively charged eDNA (Jennings et al., 2015). eDNAs are well known to bind cationic antimicrobials (e.g. aminoglycosides, antimicrobial peptides) and thus provide a protective shield effect (Chiang et al., 2013; Jennings et al., 2015; Mulcahy et al., 2008).

Different mathematical models have shown that in addition to interaction and sorption, delayed antibiotic penetration can be affected by biofilm thickness and age (Roberts & Stewart, 2004; Stewart, 2003; Stewart, 2015).

Accumulation of  $\beta$ -lactamases within the *P. aeruginosa* biofilm matrix can lead to increased hydrolysis of antibiotics such as imipenem and ceftazidime (Bagge et al., 2004a; Bagge et al., 2004b). *P. aeruginosa* cells growing in biofilms and exposed to imipenem showed increased expression of AmpC  $\beta$ -lactamases, followed by an increased number of AmpC within the matrix and higher tolerance to  $\beta$ -lactam antibiotics (Bagge et al., 2004b). Ampicillin is also unable to reach the deeper layers of *Klebsiella pneumoniae* biofilms which are associated with  $\beta$ -lactamase activity, while deletion of  $\beta$ -lactamase activity restores ampicillin diffusion (Anderl et al., 2000).

## **Slow growth, physiological heterogeneity and persister cells**

Biofilm cells are not completely eradicated even when antibiotics successfully penetrate biofilms (Barraud et al., 2013; Conlon et al., 2015; Zheng & Stewart, 2002; Lewis, 2008). Although diffusion limitation may occur with some compounds, other mechanisms are clearly involved in biofilm tolerance. During growth in biofilm structures, nutrient and oxygen concentration gradients develop, resulting in physiologically heterogeneous bacterial populations displaying different growth rates (Hall-Stoodley et al., 2004; Hoiby et al., 2010a; Møller et al., 1996). Since, conventional antibiotics usually targets cellular functions required in actively replicating cells (e.g. protein synthesis, peptidoglycan synthesis), metabolically inactive or slow growing cells are less affected. Studies on *P. aeruginosa* biofilms revealed that slow growing cells showed tolerance to ciprofloxacin and tobramycin (Williamson et al., 2012), while antimicrobial peptides such as colistin were active against cells with low metabolic activity and persister cells (Pamp et al., 2008).

Persister cells are subpopulations of phenotypically dormant cells generated stochastically or under endogenous stress (e.g. oxidative stress, exposure to antibiotics) that are highly antibiotic tolerant (Conlon et al., 2015; Germain et al., 2015; Qu et al., 2010; Stewart 2015; Maisonneuve et al., 2013; Williamson et al., 2012). While persister cells are also found in planktonic populations, they are likely present in higher numbers in biofilms and likely contribute significantly to biofilm antibiotic tolerance. Toxin-antitoxin (TA) systems and the alarmone guanosine 5'-(tri)diphosphate 3'-diphosphate or (p)ppGpp are tightly associated with induced cell dormancy, persister cell formation and antibiotic tolerance (Bokinsky et al., 2013; Germain et al., 2015; Maisonneuve et al., 2013, Conlon et al., 2015; Prax & Bertram, 2014). In *E. coli*, the *hipA* (higher persister protein A) gene encodes for the toxin of type II *hipAB* TA system, and hyperactivation

of HipA via mutation leads to 100 to 1000 fold increases in persistence (Germain et al., 2015). Persistence in hyperactivated-HipA mutants was linked to an increased frequency of cells with high levels of (p)ppGpp (Germain et al., 2015). (p)ppGpp mediates cell dormancy by inhibiting PPX, an exopolyphosphatase that degrades inorganic polyphosphate (polyP) (Maisonneuve et al., 2013). Together, polyP and Lon protease mediate degradation of the 11 antitoxins in *Escherichia coli* K-12, leading to activation of toxins, inducing slow growth, cell dormancy and antibiotic tolerance (Germain et al., 2015; Maisonneuve et al., 2013).

Nutrient starvation also induces (p)ppGpp production, which mediates a global stress response known as the stringent response. The stringent response and (p)ppGpp signaling contribute to multidrug tolerance in *P. aeruginosa* biofilms, as ofloxacin, gentamicin, meropenem and colistin killing increased upon inactivation of the stringent response (Nguyen et al., 2011). Nutrient starvation also induced ofloxacin tolerance in *E. coli* K-12 biofilm through mechanisms dependent on the stringent and SOS response (Bernier et al., 2013).

SOS response, a DNA repair system, can also mediate antibiotic tolerance in biofilms (Bernier et al., 2013). Upon ciprofloxacin challenge, *E. coli* cells undergo DNA damage, leading to an increased drug tolerance through a mechanism dependent on TisB. This SOS-dependent small toxin binds to cell membranes and disrupts the proton motive force, leading to a drop in ATP levels and reduced susceptibility to multiple antibiotics, including ampicillin and streptomycin. Interestingly, a complete tolerance to ciprofloxacin, known to be effective against non-growing cells, was also recorded (Dorr et al., 2010).



## **Mechanisms of antibiotic resistance in biofilms**

### **Genetic diversification and antibiotic resistance in biofilms**

Biofilms are considered as a reservoir of genetic diversity that promotes bacterial adaptation, evolution and survival in hostile environments. Biofilm growth favors genetic diversification (Cullen & McLean, 2015; Fraud & Poole, 2011; Limoli et al., 2014; Sousa & Pereira, 2014), and may thus contribute to the development of drug resistance. Increased plasmid copy number may also occur during biofilm growth. Cook & Dunny demonstrated that in *Enterococcus faecalis* biofilm, plasmid copy number increases with increased transcription of plasmid-borne antibiotic resistance genes. However, this mechanism appears reversible upon transfer of biofilm cells to planktonic conditions (Cook & Dunny, 2013).

Several studies have revealed an interconnection between biofilm formation and the prevalence of antibiotic resistance (Bae et al., 2014; Sanchez et al., 2013). Indeed, higher rates of multi-drug resistant patterns were observed in *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* biofilm forming strains compared to non-forming ones (Sanchez et al., 2013). Biofilms may contribute to the emergence and dissemination of antibiotic resistance genes through horizontal gene transfer and integrative conjugative elements (Ceri et al., 2010; Madsen et al., 2012; Olsen, 2015). The polymicrobial nature of biofilms and close proximity between species may facilitate horizontal gene transfer (HGT). The highly hydrated matrix provides favorable conditions for the transfer of extracellular DNA and natural transformation (Hoiby et al., 2010a; Olsen, 2015; Poole, 2011). HGT and conjugative plasmids play a key role in bacterial adaptation and evolution (Harrison & Brockhurst, 2012), and occur at higher frequencies in biofilms than in their planktonic counterparts (Madsen et al., 2012). For example, co-cultures of two *C. jejuni* kanamycin or chloramphenicol resistant strains lead to multi-resistant *C. jejuni*

through natural transformation, which occurs more frequently during biofilm, compared to planktonic growth (Bae et al., 2014). Merod et al., demonstrated that the transformation frequency in *Acinetobacter baylyi* biofilms was correlated to the EPS surface area-to-biovolume, suggesting that architectural characteristics but not relative amounts of EPS affected natural transformation in *A. baylyi* (Merod & Wuertz, 2014).

### **Efflux pumps in biofilm resistance**

Efflux pumps are transport proteins involved in the extrusion of different metabolites, including antibiotics and secondary metabolites to prevent toxic accumulation (Fraud & Poole, 2011; Poole, 2001). They are thus implicated in antibiotic resistance and may promote biofilm antimicrobial resistance in several bacterial species (Soto, 2013) including, *Burkholderia cenocepacia* (Buroni et al., 2014), *E. coli* (Matsumura et al., 2011) and *P. aeruginosa* (Brooun et al., 2000; Pamp et al., 2008). The PA1874-1877 efflux pump in *P. aeruginosa* is more highly expressed in biofilms compared to planktonic cells, and is involved in resistance to ciprofloxacin, gentamicin and tobramycin (Zhang & Mah, 2008). Similarly, De Kievit et al., observed that *P. aeruginosa* efflux pumps MexAB-oprM and MexCD-oprJ were over expressed at the biofilm substratum, where bacterial cells are more susceptible to be exposed to stressful conditions (De Kievit et al., 2001). Over expression of MexAB-oprM was linked to increased biofilm resistance to tetracycline (De Kievit et al., 2001).

Conversely, uropathogenic *E. coli* biofilm exhibited a mutation in *rapA* (RNA polymerase-associated protein) that leads to reduced biofilm and increased susceptibility to penicillin G (Lynch et al., 2007). Transcriptomic analysis demonstrated 22 genes down-regulated in *rapA* mutants, one of which (*yhcQ*) encodes a putative multi-drug resistance pump (Lynch et al., 2007). Mutation in *yhcQ* gene increased penicillin G sensitivity, suggesting that the YhcQ multi-

drug resistance pump contributes to biofilm penicillin G resistance in uropathogenic *E. coli* (Lynch et al., 2007).

### **Multi-species-impact on antibiotic tolerance**

Although biofilms in nature are likely polymicrobial, most *in vitro* biofilm studies are carried out with single species (Burmolle et al., 2014). This overlooks the potential competitive advantage that multi-species biofilms confer, particularly in stressful and noxious environments (Burmolle et al., 2014; Burmolle et al., 2006). For example, dental plaque, a model biofilm, may harbor up to 1000 different Gram-positive and Gram-negative bacterial species that cooperatively form biofilms (Saini et al., 2011; Yang et al., 2011). The distance between cells of different species affects biofilm architecture and density (Kolenbrander et al., 2010), while polymicrobial interactions influence biofilm antibiotic tolerance. For example, *Inquilinus limosus* and *Dolosigranulum pigrum*, unusual antibiotic-sensitive species isolated from the airways of cystic fibrosis patients, became more antibiotic tolerant upon co-culture in biofilm conditions with *P. aeruginosa* (Lopes et al., 2012). Similarly, mixed-species biofilms composed of *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 and *K. pneumoniae* were more tolerant to tobramycin and SDS compared to mono-species biofilms, suggesting that increased tolerance stems from a cross-protection beneficial to the entire community (Lee et al., 2013). More recently, Manavathu et al. developed a polymicrobial biofilm of *P. aeruginosa* and *Moraxella catarrhalis*, both highly prevalent in the airways of cystic fibrosis patients, and found that the mixed biofilm had reduced susceptibility to cefepime (Manavathu et al., 2014).

Biofilm matrices and EPS that sequester antibiotics may confer cross-species shelter. For example, *Candida albicans* exopolysaccharide,  $\beta$ -1,3-glucan can bind ofloxacin. Mixed *E. coli* - *C. albicans*

biofilms thus have increased ofloxacin tolerance compared to *E. coli* mono-species biofilms (De Brucker et al., 2015). Similarly, *S. aureus* cells embedded within *Candida* biofilm showed increased tolerance to vancomycin (Harriott & Noverr, 2009). Interestingly, *Candida* EPS itself was sufficient to confer vancomycin tolerance to *S. aureus*, suggesting that the *Candida* matrix mediates cross-species tolerance by sequestering vancomycin (Harriott & Noverr, 2009). Billings et al. demonstrated that the Psl polysaccharide provides an electrostatic barrier to colistin and contributes to colistin tolerance in *P. aeruginosa* biofilms, and this protective effect was transferable to non Psl-producers (Billings et al., 2013).

Polymicrobial biofilms formed by *M. catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* rendered both bacteria more resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics and bacterial clearance (Perez et al., 2014). In the mixed biofilms,  $\beta$ -lactamase produced by *M. catarrhalis* provided passive protection to *S. pneumoniae* against amoxicillin killing. In turn, *S. pneumoniae* protected *M. catarrhalis* from azithromycin killing by an unknown mechanism (Perez et al., 2014). Antibiotic tolerance in multi-species biofilms, remains poorly studied, and will require a better understanding of the key elements of cell-cell interaction in mixed communities.

### **Antibiotics as biofilm signals**

Sub-inhibitory (sub-MICs) antibiotic concentrations increase the risk of tolerance and resistance to antibiotics (Hao et al., 2014). Bacterial pathogens are potentially exposed to sub-inhibitory and ineffective doses of antibiotics: (i) during clinical therapy with inadequate dosing regimens; (ii) following delayed drug penetration in biofilms (Drescher et al., 2013; Flemming et al., 2007); and (iii) in food-producing animals exposed to antibiotics as growth promoters to prevent infection in contaminated environments (Burch et al., 2013). Such sub-MICs antibiotics may have broad effects on bacterial gene expression, virulence, quorum sensing (QS) and biofilm

formation (Andersson & Hughes, 2014; Kaplan, 2011; Linares et al., 2006; Wu et al., 2014; Yim et al., 2007). The mechanisms associated with sub-MIC antibiotic-induced biofilm formation and antibiotic tolerance are dependent on the nature of the antibiotic, the dosage and the bacterial species, among other things.

Multiple lines of evidence suggest that sub-MIC antibiotics increase EPS production. Using flow conditions, Berlutti et al., demonstrated that azithromycin influenced *S. aureus* biofilm development by increasing matrix production (Berlutti et al., 2014). Sub-MIC erythromycin, tetracycline and quinpristin-dalfopristin induced the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) expression in *S. epidermidis* (Rachid et al., 2000; Wang et al., 2010), leading to increased EPS expression and invasiveness (Hualin et al., 2005). Sub-MIC tigecycline increased biofilm matrix poly-N-acetyl-glucosamine production (Kaplan et al., 2011), and sub-MIC aminoglycoside stimulated EPS production in *P. aeruginosa* (Hoffman et al., 2005). Similarly, sub-MIC imipenem activated genes involved in alginate biosynthesis in *P. aeruginosa* (Bagge et al., 2004b). Colanic acid, an important biofilm component in *E. coli*, was induced in the presence of sub-MIC of certain  $\beta$ -lactam antibiotics (Sailer et al., 2003). Sub-MICs of  $\beta$ -lactam drugs (i.e., ampicillin, cefuroxime) up-regulated genes involved in glycogen biosynthesis by non-typeable *Haemophilus influenzae*, resulting in thicker biofilms (Wu et al., 2014). Similarly, exposure of *Streptococcus mutans* to sub-MICs of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent, up-regulated expression of genes involved in biofilm formation and surface adhesion, such as *gtfC* (encoding a glucotransferase) and *atIA* (encoding a cell surface fibronectin-binding adhesin), leading to increased adherence to epithelial cells (Bedran et al., 2014).

More recently, Hathroubi et al., demonstrated that sub-MIC of penicillin G induced cell envelope stress, increased the expression of extracellular polysaccharide genes and enhanced

release of extracellular DNA in the biofilm matrix in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, leading to auto-aggregation and increased biofilm formation (Hathroubi et al., 2015). Similarly, sub-MIC  $\beta$ -lactams also led to increased extracellular DNA and autoaggregation in *S. aureus* biofilms (Kaplan et al., 2012).

Exposure to sub-MIC antibiotics also alters bacterial morphology. Sub-MIC penicillin induced bacterial filamentation and increased cell-surface hydrophobicity in *Corynebacterium diphtheriae*, leading to increased biofilm formation (Gomes et al., 2013).

Sub-MIC antibiotics may also modulate QS signaling, a form of cell-cell communication. Sub-MIC ampicillin induced *Staphylococcus intermedius* biofilm formation via the autoinducer-2/LuxS signaling pathway (Ahmed et al., 2009). Additionally, the autoinducer type 2 synthase *luxS*, was also up-regulated when *Streptococcus mutans* was cultivated in the presence of sub-MIC triclosan (Bedran et al., 2014).

Taken together, these observations strongly suggest that sub-MIC of antibiotics may promote biofilm formation and modulate biofilm matrix composition, leading to greater persistence and protection against antibiotics.

## **Strategies for biofilm control**

### **Strategies to prevent biofilm formation**

Various strategies have been examined to prevent biofilm formation on diverse surfaces (e.g., prosthetics, medical devices, industrial water pipe systems, food product packaging, etc.). One approach has focused on modifying abiotic surface properties by either coating or impregnating

them with antibacterial agents which are released in a controlled fashion to inhibit surface bacterial adhesion and growth (Francolini & Donelli, 2010, Bjarnsholt et al., 2013b). Unfortunately, such coated biomaterials usually only have short term efficiency (Bjarnsholt et al., 2013b), and may promote the emergence of multi-resistant bacteria (Zilberberg et al., 2014).

Alternatives to antibiotics that inhibit biofilm formation have been intensively investigated (Domenico et al., 2004, Lidor et al., 2015, Mansour et al., 2015, Salem et al., 2015, Shakibaie et al., 2015, Wu et al., 2015). Bismuth thiols (BTs) have potent antimicrobial and anti-biofilm activity against a wide range of bacterial species (Domenico et al., 1997; Domenico et al., 2001). Sub-MICs of BTs reduce *Klebsiella pneumoniae*, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) and *P. aeruginosa* biofilms substantially (Domenico et al., 1999; Domenico et al., 2001; Folsom et al., 2001; Huang & Stewart, 1999). At sub-lethal doses, BTs reduce MRSA and *P. aeruginosa* biofilm formation *in vitro* under continuous flow biofilm growth conditions (Domenico et al., 2001; Folsom et al., 2001; Huang & Stewart, 1999). Biofilm formation was also reduced *in vivo* on subcutaneous, BT-coated prosthetic contaminated with MRSA (Domenico et al., 2004). Recently, BTs have been used to prevent biofilm-related wound infections. When administrated locally to infected open fracture wounds, BTs prevented *S. aureus* biofilm formation, disrupted preexisting biofilms and sensitized bacteria to antibiotic treatment and immune defenses (Penn-Barwell et al., 2015). Indeed, several antibiotics can be potentiated or repurposed in combination with sub-MIC BTs (Domenico et al., 2003), even against highly-resistant *Burkholderia* strains (Veloira et al., 2003). By virtue of their activity at micromolar concentrations to enhance antibiotic activity, reduce virulence, and enable immune defenses, without inducing bacterial resistance, as well as low toxicity in mammals, BTs may address several unmet needs and present as ideal candidates in the fight against biofilm-related infections.

Metal ions have also been intensely investigated. Silver molecules are tolerated by eukaryotic cells, and thus can be incorporated into medical devices and implants (Markowska et al., 2013; Salem et al., 2015). Using a coating technique called Sol–gel processing, Marini et al. fabricated a silver-doped organic–inorganic hybrid coating of tetraethoxysilane- and triethoxysilane-terminated poly(ethylene glycol)-block-polyethylene, which was effective in inhibiting *E. coli* and *S. aureus* biofilms (Marini et al., 2007). Nanotechnology further adds to silver’s promise. Selenium and silver nanoparticles inhibit biofilm formation through mechanisms not fully understood, although likely implicating the antimicrobial properties of these metals (Gurunathan et al., 2014; Palanisamy et al., 2014; Shakibaie et al., 2015). Selenium nanoparticles synthesized from Se-reducing *Bacillus* sp. strain MSh-1 inhibited biofilms from several pathogens, including *P. aeruginosa* and *S. aureus* (Shakibaie et al., 2015). Similarly, silver nanoparticles inhibited biofilm formed by multi-drug resistant *P. aeruginosa* (Palanisamy et al., 2014) and *S. epidermidis* (Kalishwaralal et al., 2010). The acylated homoserine AiiA lactonase purified from *Bacillus licheniformis* has QS inhibitory activity by inactivating acylated homoserine lactones, which are cell-cell communication signals implicated in biofilm formation. Coupling of AiiA with gold nanoparticles significantly enhanced the inhibition of *Proteus* biofilms compared to that of AiiA alone (Vinoj et al., 2015).

Several thiazolidine-2,4-dione (TZD) derivatives, heterocyclic compounds belonging to the anti-diabetic drug family, exhibit specific anti-biofilm and anti-adhesion activities against *C. albicans* (Feldman et al., 2014; Kogan et al., 2014). Incorporated into food packaging, TZD successfully interfered with several bacterial and fungal biofilms (Srebnik et al., 2011).

Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) are positively charged hydrophobic amino acid molecules that kill bacteria mainly through membrane perturbation (Wimley, 2010) and have a broad-spectrum antimicrobial activity, high potency and low mammalian cell toxicity. They are



novel antimicrobials that may also be attractive anti-biofilm agents, either alone or as adjuncts to therapies against antibiotic-resistant biofilms. Several anti-biofilm CAMPs were investigated including AS10, a synthetic peptide, a variant of the mouse antimicrobial peptide LL-37. AS10 inhibited biofilm formation from various Gram-negative bacteria, including *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Porphyromonas gingivalis* (De Brucker et al., 2014). Similarly, the antimicrobial peptide 1018 also inhibited biofilm formation in a broad range of pathogens, putatively due to degradation of the alarmone signal ppGpp (De la Fuente-Núñez et al., 2014). More recently, a synthetic peptide innate defense regulator (IDR-1080), derived from the bovine neutrophil host defense peptide bactenecin, demonstrated anti-biofilm activity against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* and *S. aureus* biofilms (Mansour et al., 2015). Urinary catheters coated with CWR11, a synthetic antimicrobial peptide, displayed potent anti-biofilm properties against several urinary tract pathogens (Lim et al., 2015).

### **Strategies to overcome pre-established biofilm**

Once established, biofilms are very difficult to eradicate. Therapeutic approaches have focused on weakening and/or disrupting the biofilm architecture by targeting the EPS and biofilm matrix. Dornase alfa or Pulmozyme<sup>®</sup>, a recombinant human DNase enzyme, can target extracellular DNA in biofilm matrix. It has been commercially developed for inhaled clinical use to treat the chronic lung disease in patients with cystic fibrosis (Sawicki et al., 2015). Tested against *S. pneumoniae* biofilms, Pulmozyme<sup>®</sup> significantly reduced biofilm biomass and thickness (Hall-Stoodley et al., 2008). Other biofilm-disrupting enzymes have also been explored. The serine protease ESP produced by *S. epidermidis* (Sugimoto et al., 2013) and the elastase LasB by *P.*

*aeruginosa* (Park et al., 2012) disrupt *S. aureus* biofilms. More recently, Yu et al reported that PslG, a glycosyl hydrolase from *P. aeruginosa*, disrupted established biofilms from a wide range of *Pseudomonas* strains at nanomolar concentrations, while pre-treatment with PslG sensitized biofilms to tobramycin and ciprofloxacin and decreased the minimum biofilm eradication concentration by 8 and 4-fold, respectively (Yu et al., 2015). More recently, the combination of DispersinB<sup>®</sup>, a polysaccharide-hydrolyzing enzyme that degrades poly-N-acetylglucosamine, with a silver wound dressing (Anticoat<sup>™</sup>) (Gawande et al., 2014a) or an antimicrobial peptide-based wound gel (Gawande et al., 2014b), demonstrated synergistic anti-biofilm activity against chronic wound associated biofilm infections, including MRSA. The use of biofilm disrupting enzymes such as polysaccharide-hydrolyzing enzymes, DNase and proteases could thus be a promising strategy to treat established biofilm-related infections, most likely in combination with conventional antibiotic therapy that can target newly released bacterial cells (Barraud et al., 2013; Domenico et al., 2003; Lewis, 2008; Varposhti et al., 2014).

Bacteriophages may also hold promise against biofilms. These are highly specific, self-replicating agents that can infect and rapidly lyse bacteria, and may be used in a variety of applications, e.g., food production (Atterbury et al., 2007; Jassim & Limoges, 2014; Jones et al., 2012), and as potential alternative treatments against pathogenic bacteria, such as *P. aeruginosa* (Soothill, 2013; Hraiech et al., 2015; Yilmaz et al., 2013). For example, combinations of bacteriophages and conventional antibiotics eradicated MRSA biofilm, while antibiotic treatment alone had no significant effect on the biofilm, indicating synergistic activity of the combined therapy (Yilmaz et al., 2013). An anti-*Enterococcus faecalis* bacteriophage isolated from sewage effluent proved to be more effective than conventional antibiotics in disrupting a two-week old biofilm of *E. faecalis*, demonstrating the superiority of phage therapy over antibiotherapy (Khalifa et al., 2015). Lu and Collins engineered an enzymatic phage that expressed Dispersin B<sup>®</sup>

(Izano et al., 2007), and reduced biofilm cell counts by two orders of magnitude greater than the non-engineered phage, leading to nearly complete biofilm removal (Lu & Collins, 2007).

Interfering with biofilm structures may also be achieved by inhibiting QS systems, which are implicated in coordinating bacterial biofilm formation (Antunes et al., 2010; Bjarnsholt et al., 2010; Fuqua & Greenberg, 2002). For example, TZDs act as QS inhibitors in *Vibrio harveyi* (Backman et al., 2013) and *P. aeruginosa* (Lidor et al., 2015), and negatively affected biofilm formation without affecting bacterial growth (Lidor et al., 2015). Trans-cinnamaldehyde also inhibited *P. aeruginosa* N-acyl-homoserine lactone (AHL) synthase without affecting bacterial viability (Chang et al., 2014). 6-gingerol oil reduced *P. aeruginosa* biofilms by repressing QS pathways (Kim et al. 2015). Antifungal agents produced by streptomycetes, called maniwamycins, demonstrated high anti-QS potential in the soil bacterium *Chromobacterium violaceum* (Fukumoto et al. 2015). However, recent studies have shown that loss of QS function emerged readily during chronic human biofilm-associated infections (Cullen & McLean, 2015; Hoffman et al., 2009), and raise questions about the role of QS and the relevance of QS inhibitors as therapeutic agents in such infections.

## **Conclusion**

Biofilms pose intractable problems and are key contributors to many chronic and recurrent infections. Conventional antibiotic treatments are often inadequate to eradicate biofilm infections in the presence of drug tolerant cells. Sub-MIC antibiotics may also promote biofilm formation and thus compromise treatment effectiveness. However, strategies are being developed to directly prevent/treat biofilms, break down the biofilm matrix, and improve the effectiveness of antibiotics against biofilms. Alternative approaches, such as the use of bismuth thiols, silver

nanoparticles, bacteriophages, and biofilm-dispersing enzymes could improve, repurpose or stand alone as alternatives to conventional antibacterial therapies. Future approaches for controlling biofilms will also require a better understanding of microbial interactions in mixed species biofilms and their impact on antibiotic activity.

## **Acknowledgments**

Work in MJ laboratory is supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## **Conflict of interest**

Dr Domenico is inventor of the bismuth thiol technology, and has received compensation as a member of the scientific advisory board of Microbion Biosciences and owns shares in the company.

## **References**

- Ahmed, N.A., Petersen, F.C. & Scheie, A.A. (2009).** AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4258-4263.
- Alipour, M., Suntres, Z.E. & Omri, A. (2009).** Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **64**, 317-325.
- Alipour M., Dorval C., Suntres Z.E. & Omri A. (2011).** Bismuth-ethanedithiol incorporated in a liposome-loaded tobramycin formulation modulates the alginate levels in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pharm Pharmacol* **63**, 999-1007. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01304.x.

- Anderl, J.N., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. (2000).** Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1818-1824.
- Anderson, G.G. & O'Toole, G.A. (2008).** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 85-105.
- Andersson, D.I. & Hughes, D. (2014).** Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **12**, 465-478.
- Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M. & Finlay, B.B. (2010).** Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* **156**, 2271-2282.
- Atterbury, R.J., Van Bergen, M.A., Ortiz, F., Lovell, M.A., Harris, J.A., De Boer, A., Wagenaar, J.A., Allen, V.M. & Barrow, P.A. (2007).** Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4543-4549.
- Bae, J., Oh, E. & Jeon, B. (2014).** Enhanced transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* biofilms by natural transformation. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 7573-7575.
- Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M. & Hoiby, N. (2004a).** Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1168-1174.
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P. & Hoiby, N. (2004b).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1175-1187.
- Barraud, N., Buson, A., Jarolimek, W. & Rice, S.A. (2013).** Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* **8**, e84220.
- Bedran, T.B., Grignon, L., Spolidorio, D.P. & Grenier, D. (2014).** Subinhibitory concentrations of triclosan promote *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to oral epithelial cells. *PLoS One* **9**, e89059.
- Berlutti, F., Frioni, A., Natalizi, T., Pantanella, F. & Valenti, P. (2014).** Influence of sub-inhibitory antibiotics and flow condition on *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 biofilm development and biofilm growth rate: BioTimer assay as a study model. *J Antibio* **67**, 763-769.

- Bernier, S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppee, J.Y., Ghigo, J.M. & Beloin, C. (2013).** Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet* **9**, e1003144.
- Billings, N., Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R. & Ribbeck, K. (2013).** The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* **9**, e1003526.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Jakobsen, T.H., Phipps, R., Nielsen, A.K., Rybtke, M.T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Hoiby, N. & Ciofu, O. Scandinavian Cystic Fibrosis Study, Consortium, (2010).** Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PloS One* **5**, e10115.
- Bjarnsholt, T. (2013a).** The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl* **136**, 1-51.
- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M. & Hoiby, N. (2013b).** Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov* **12**, 791-808.
- Bokinsky, G., Baidoo, E.E., Akella, S., Burd, H., Weaver, D., Alonso-Gutierrez, J., Garcia-Martin, H., Lee, T.S. & Keasling, J.D. (2013).** HipA-triggered growth arrest and beta-lactam tolerance in *Escherichia coli* are mediated by RelA-dependent ppGpp synthesis. *J Bacteriol* **195**, 3173-3182.
- Brooun, A., Liu, S. & Lewis, K. (2000).** A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 640-646.
- Burch, D. G. S. (2013).** Antimicrobial Drug Use in Swine. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, pp. 553-568. Edited by S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker, & P.M. Dowling, John Wiley & Sons, Inc.
- Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J. & Kjelleberg, S. (2006).** Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *App Environ Microbiol* **72**, 3916-3923.

- Burmolle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T. & Sorensen, S.J. (2014).** Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol* **22**, 84-91. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.004
- Buroni, S., Matthijs, N., Spadaro, F., Van Acker, H., Scoffone, V.C., Pasca, M.R., Riccardi, G. & Coenye, T. (2014).** Differential roles of RND efflux pumps in antimicrobial drug resistance of sessile and planktonic *Burkholderia cenocepacia* cells. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 7424-7429.
- Ceri, H., Olson, M.E. & Turner, R.J. (2010).** Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother* **11**, 1233-1237.
- Chang, C.Y., Krishnan, T., Wang, H., Chen, Y., Yin, W.F., Chong, Y.M., Tan, L.Y., Chong, T.M. & Chan, K.G., (2014).** Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against N-acyl homoserine lactone synthase as druggable target. *Sci Rep* **4**, 7245. doi: 10.1038/srep07245
- Chang, H.H., Cohen, T., Grad, Y.H., Hanage, W.P., O'Brien, T.F. & Lipsitch, M. (2015).** Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol. Mol Biol Rev* **79**, 101-116. doi: 10.1128/MMBR.00039-14.
- Chiang, W.C., Nilsson, M., Jensen, P.O., Hoiby, N., Nielsen, T.E., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2013).** Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 2352-2361. doi: 10.1128/AAC.00001-13
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H.E. & Hoiby, N. (2005).** Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2276-2282.
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P.O., Wang, H. & Hoiby, N. (2015).** Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev* **85**, 7-23. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.017.
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C. & Parsek, M.R. (2011).** The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **7**, e1001264. doi: 10.1371/journal.ppat.1001264

- Conlon, B.P., Rowe, S.E. & Lewis, K. (2015).** Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol* **831**, 1-9. doi: 10.1007/978-3-319-09782-4\_1.
- Cook, L.C. & Dunny, G.M. (2013).** Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 1850-1856. doi: 10.1128/AAC.02010-12
- Costerton, J.W. (1999a).** Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**, 217-221; discussion 237-219.
- Costerton J.W., Stewart P.S. & Greenberg E.P. (1999b).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318.
- Cullen, L. & McClean, S. (2015).** Bacterial adaptation during chronic respiratory infections. *Pathogens* **4**, 66–89. doi.org/10.3390/pathogens4010066
- De Brucker, K., Delattin, N., Robijns, S., Steenackers, H., Verstraeten, N., Landuyt, B., Luyten, W., Schoofs, L., Dovgan, B. & other authors (2014).** Derivatives of the mouse cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) inhibit fungal and bacterial biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 5395-5404.
- De Brucker, K., Y. Tan, K. Vints, K. De Cremer, A. Braem, N. Verstraeten, J. Michiels, J. Vleugels, B. P. Cammue & K. Thevissen. (2015).** Fungal beta-1,3-glucan increases ofloxacin tolerance of *Escherichia coli* in a polymicrobial *E. coli/Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 3052-3058.
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Haney, E.F., Straus S.K. & Hancock, R.E.W. (2014).** Broad-Spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog* **10**, e1004152. doi: 10.1371/journal.ppat.1004152
- De Kievit, T. R., Parkins, M. D., Gillis, R. J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B.H. & Storey, D. G. (2001).** Multidrug Efflux Pumps: Expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1761–1770. doi.org/10.1128/AAC.45.6.1761-1770.2001



- Domenico P., Salo R. J., Novick S. G., Schoch P. E., Van Horn K. & Cunha B. A. (1997).** Enhancement of bismuth antibacterial activity with lipophilic thiol chelators. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1697-1703. vv
- Domenico P., Tomas J.M., Merino S., Rubires X. & Cunha B.A. (1999).** Surface antigen exposure by bismuth-dimercaprol suppression of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *Infect Immun* **67**, 664-669.
- Domenico, P., Baldassarri, L., Schoch, P.E., Kaehler, K., Sasatsu, M. & Cunha, B.A. (2001).** Activities of bismuth thiols against staphylococci and staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1417-1421.
- Domenico P., Kazzaz J.A. & Davis J.M. (2003).** Combating antibiotic resistance with bismuth-thiols. *Antimicrob Agents Chemother* **3**: 79-85.
- Domenico P., Gurzenda E., Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., Korem M., Saba V., Scalise G. & Balaban N. (2004).** BisEDT and RIP act in synergy to prevent graft infections by resistant staphylococci. *Peptides* **25**, 2047-2053.
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193.
- Dorr, T., Vulic, M. & Lewis, K. (2010).** Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* **8**, e1000317. doi: 10.1371/journal.pbio.1000317.
- Drescher, K., Shen, Y., Bassler, B.L. & Stone, H.A. (2013).** Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 4345-4350. doi: 10.1073/pnas.1300321110.
- Feldman, M., Al-Quntar, A., Polacheck, I., Friedman, M. & Steinberg, D. (2014).** Therapeutic potential of thiazolidinedione-8 as an antibiofilm agent against *Candida albicans*. *PloS One* **9**, e93225. doi: 10.1371/journal.pone.0093225
- Flemming, H.C., Neu, T.R. & Wozniak, D.J. (2007).** The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **189**, 7945-7947.

- Folsom, J.P., Baker, B. & Stewart, P.S. (2011).** *In vitro* efficacy of bismuth thiols against biofilms formed by bacteria isolated from human chronic wounds. *J Appl Microbiol* **111**, 989-996.
- Francolini, I. & Donelli, G. (2010).** Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 227-238. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x.
- Fraud, S. & Poole, K. (2011).** Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1068-1074. doi: 10.1128/AAC.01495-10.
- Fukumoto, A., Murakami, C., Anzai Y. & Kato, F. (2015).** Maniwamycins: new quorum-sensing inhibitors against *Chromobacterium violaceum* CV026 were isolated from *Streptomyces* sp. TOHO-M025. *J Antibiot (Tokyo)* doi: 10.1038/ja.2015.126.
- Fuqua, C. & Greenberg, E.P. (2002).** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 685-695.
- Gawande, P.V., Clinton, A.P., LoVetri, K., Yakandawala, N., Rumbaugh, K.P. & Madhyastha, S. (2014a).** Antibiofilm Efficacy of DispersinB<sup>®</sup> Wound Spray Used in Combination with a Silver Wound Dressing. *Microbiol Insights* **7**, 9-13. doi: 10.4137/MBI.S13914.
- Gawande, P.V., Leung, K.P. & Madhyastha, S. (2014b).** Antibiofilm and antimicrobial efficacy of DispersinB<sup>®</sup>-KSL-W peptide-based wound gel against chronic wound infection associated bacteria. *Curr Microbiol* **68**, 635-641. doi: 10.1007/s00284-014-0519-6
- Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K. & Maisonneuve, E. (2015).** Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 5171-5176. doi: 10.1073/pnas.1423536112.
- Gomes, D.L., Peixoto, R.S., Barbosa, E.A., Napoleao, F., Sabbadini, P.S., dos Santos, K.R., Mattos-Guaraldi, A.L. & Hirata, R., Jr. (2013).** SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J Med Microbiol* **62**, 754-760. doi: 10.1099/jmm.0.052373-0.

- Gurunathan, S., Han, J.W., Kwon, D.N. & Kim, J.H. (2014).** Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett* **9**, 373. doi: 10.1186/1556-276X-9-373
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95-108.
- Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sambanthamoorthy, K., Dice, B., Nguyen, D., Mershon, W.J., Johnson, C., Hu, F.Z., Stoodley, P., Ehrlich, G.D. & other authors (2008).** Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol* **8**, 173. doi: 10.1186/1471-2180-8-173.
- Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H.I., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z. & Yuan, Z. (2014).** Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front Microbiol* **5**, 288.
- Harriott, M.M. & Noverr, M.C. (2009).** *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3914-3922. doi: 10.1128/AAC.00657-09.
- Harrison, E. & Brockhurst, M.A. (2012).** Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol* **20**, 262-267.
- Harrison, J.J., Ceri, H. & Turner, R.J. (2007).** Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**, 928-938.
- Hathroubi, S., Fontaine-Gosselin, S.E., Tremblay, Y.D., Labrie, J. & Jacques, M. (2015).** Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **179**, 277-286. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.06.011.
- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. & Parsek, M.R. (2001).** Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **183**, 5395-5401.
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A. & Miller, S.I. (2005).** Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, 1171-1175.

- Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Emerson, J., Houston, L. S., Burns, J. L., Ramsey, B. W. & Miller, S. I. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros* **8**, 66–70. doi.org/10.1016/j.jcf.2008.09.006 8: 66-70
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. (2010a).** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 322-332. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009
- Hoiby, N., Ciofu, O. & Bjarnsholt, T. (2010b).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* **5**, 1663-1674.
- Hraiech, S., Bregeon, F. & Rolain, J.M. (2015).** Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections: rationale and current status. *Drug Des Devel Ther* **9**, 3653-3663. doi: 10.2147/DDDT.S53123.
- Hualin L., Xu L. & Wang J. (2005).** Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun* **73**, 3188–3191.
- Huang C.T. & Stewart P.S. (1999).** Reduction of polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by bismuth dimercaprol (BisBAL) treatment. *J Antimicrob Chemother* **44**, 601-5.
- Izano, E.A., Wang, H., Rangunath, C., Ramasubbu, N. & Kaplan, J.B. (2007).** Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. *J Dent Res* **86**, 618-622.
- James G.A., Swogger E., Wolcott R., Pulcini Ed., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W. & Stewart, P.S. (2008).** Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* **16**, 37–44.
- Jassim, S.A. & Limoges, R.G. (2014).** Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World J Mmicrobial Biotechnol* **30**, 2153-2170. doi: 10.1007/s11274-014-1655-7.
- Jefferson, K.K. (2004).** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* **236**, 163-173.
- Jefferson, K.K., Goldmann, D.A. & Pier, G.B. (2005).** Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2467-2473.

- Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., Secor, P.R., Tseng, B.S Scian, M., & Filloux, A. (2015).** Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PNAS* **112**, 11353-11358. doi:10.1073/pnas.1503058112
- Jones, J.B., Vallad, G.E., Iriarte, F.B., Obradovic, A., Wernsing, M.H., Jackson, L.E., Balogh, B., Hong, J.C. & Momol, M.T. (2012).** Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage* **2**, 208-214.
- Kagan, S., Jabbour, A., Sionov, E., Alquntar, A.A., Steinberg, D., Srebnik, M., Nir-Paz, R., Weiss, A. & Polacheck, I. (2014).** Anti-Candida albicans biofilm effect of novel heterocyclic compounds. *J Antimicrob Chemother* **69**, 416-427. doi: 10.1093/jac/dkt365.
- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S.R.K., Deepak, V. & Gurunathan, S. (2010).** Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*, *Colloids Surf B, Biointerfaces* **79**,340-344
- Kaplan, J.B. (2011).** Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* **34**, 737-751. doi: 10.5301/ijao.5000027.
- Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W. & Horswill, A.R. (2012).** Low levels of beta-lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* **3**, e00198-00112. doi: 10.1128/mBio.00198-12
- Kaplan, J.B., Jabbouri, S. & Sadovskaya, I. (2011).** Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Res Microbiol* **162**, 535-541.
- Khalifa, L., Brosh, Y., Gelman, D., Copenhagen-Glazer, S., Beyth, S., Poradosu-Cohen, R., Que, Y.A., Beyth, N. & Hazan, R. (2015).** Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *App Environ Microbiol* **81**, 2696-2705. doi: 10.1128/AEM.00096-15.
- Kim, H. S., Lee, S. H., Byun, Y. & Park, H. D. (2015).** 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Sci Rep* **5**, 8656.

- Kolenbrander P.E., Palmer, R.J. Jr., Periasamy, S. & Jakubovics, N.S. (2010).** Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* **8**, 471-80. doi: 10.1038/nrmicro2381.
- Lee, K.W., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S. & Rice, S.A. (2013).** Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J* **8**, 894-907. doi: 10.1038/ismej.2013.194.
- Lewis, K. (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 107-131.
- Lim, K., Chua, R. R., Bow, H., Tambyah, P. A., Hadinoto, K. & Leong, S. S. (2015).** Development of a catheter functionalized by a polydopamine peptide coating with antimicrobial and antibiofilm properties. *Acta Biomater* **15**, 127-138.
- Limoli, D.H., Rockel, A.B., Host, K.M., Jha, A., Kopp, B.T., Hollis, T. & Wozniak, D.J. (2014).** Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog* **10**(4): e1004083.
- Limoli, D. H., Jones, C. J. & Wozniak, D. J. (2015).** Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr* **3**, doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F. & Martinez, J.L. (2006).** Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 19484-19489.
- Lopes, S.P., Ceri, H., Azevedo, N.F. & Pereira, M.O. (2012).** Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int J Antimicrob Agents* **40**, 260-263.
- Lu, T.K. & Collins, J.J. (2007).** Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 11197-11202.
- Lu, X., Samuelson, D.R., Rasco, B.A. & Konkol, M.E. (2012).** Antimicrobial effect of diallyl sulphide on *Campylobacter jejuni* biofilms. *J Antimicrob Chemother* **67**, 1915-1926. doi: 10.1093/jac/dks138

- Lynch, S.V., Dixon, L., Benoit, M.R., Brodie, E.L., Keyhan, M., Hu, P., Ackerley, D.F., Andersen, G.L. & Matin, A. (2007).** Role of the *rapA* gene in controlling antibiotic resistance of *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3650-3658.
- Madsen, J.S., Burmolle, M., Hansen, L.H. & Sorensen, S.J. (2012).** The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* **65**, 183-195. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x.
- Mah, T.F. & O'Toole, G.A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34-39.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M. & Gerdes, K. (2013).** (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* **154**, 1140-1150. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.048.
- Manavathu, E.K., Vager, D.L. & Vazquez, J.A. (2014).** Development and antimicrobial susceptibility studies of in vitro monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **14**, 53. doi: 10.1186/1471-2180-14-53.
- Mansour, S. C., de la Fuente-Núñez, C. & Hancock, R. E. W. (2015).** Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *J Pept Sci* **21**, 323–329. doi: 10.1002/psc.2708.
- Marini, M., De Niederhausern, S., Iseppi, R., Bondi, M., Sabia, C., Toselli, M. & Pilati, F. (2007).** Antibacterial activity of plastics coated with silver-doped organic-inorganic hybrid coatings prepared by sol-gel processes. *Biomacromolecules* **8**, 1246-1254.
- Markowska, K., Grudniak, A.M. & Wolska, K.I. (2013).** Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol* **60**, 523-530.
- Matsumura, K., Furukawa, S., Ogihara, H. & Morinaga, Y. (2011).** Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Sci* **16**, 69-72.
- Merod, R. T. & Wuertz, S. (2014).** Extracellular polymeric substance architecture influences natural genetic transformation of *Acinetobacter baylyi* in biofilms. *Appl Environ Microbiol* **80**, 7752-7757. Doi:10.1128/AEM.0198-14
- Møller, S., Pedersen, A.R., Poulsen, L.K., Arvin, E. & Molin, S. (1996).** Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies

biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4632-4640

- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. & Lewenza, S. (2008).** Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* **4**, e1000213. doi: 10.1371/journal.ppat.1000213.
- Nadell, C.D., Drescher, K., Wingreen, N.S. & Bassler, B.L. (2015).** Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. *ISME J* **9**, 1700-1709. doi: 10.1038/ismej.2014.246.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang & other authors (2011).** Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**, 982-986. doi: 10.1126/science.1211037.
- Nikaido, H. (2009).** Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* **78**, 119-146.
- Olsen, I. (2015).** Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **34**, 877-86. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z.
- Öner, E.T. (2013).** Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass, In *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*, pp. 35-56. Edited by Z. Fang. Springer Berlin Heidelberg.
- Palanisamy, N.K., Ferina, N., Amirulhusni, A.N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L.J. & Durairaj, R. (2014).** Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nanobiotechnology* **12**, 2.
- Pamp, S.J., Gjermansen, M., Johansen, H.K. & Tolker-Nielsen, T. (2008).** Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* **68**, 223-240. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x
- Park, J.H., Lee, J.H., Cho, M.H., Herzberg, M. & Lee, J. (2012).** Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. *FEMS Microbiol Lett* **335**, 31-38. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02635.x.
- Parsek, M.R. & Singh, P.K. (2003).** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **57**, 677-701.



- Penn-Barwell, J.G., Baker, B. & Wenke, J.C. (2015).** Local bismuth thiols potentiate antibiotics and reduce infection in a contaminated open fracture model. *J Orthop Trauma* **29**, e73-78.
- Perez, A.C., Pang, B., King, L.B., Tan, L., Murrah, K.A., Reimche, J.L., Wren, J.T., Richardson, S.H., Ghandi, U. & Swords, W.E. (2014).** Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence *in vivo*. *Pathog Dis* **70**, 280-288. doi: 10.1111/2049-632X.12129.
- Poole, K. (2001).** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 500-508.
- Poole, K. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* **2**, 65.
- Prax, M. & Bertram, R. (2014).** Metabolic aspects of bacterial persisters. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 148.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J. & Ziebuhr, W. (2000).** Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3357-3363.
- Roberts, M. E. & Stewart, P. S. (2004).** Modeling antibiotic tolerance in biofilms by accounting for nutrient limitation. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 48-52. doi.org/10.1128/AAC.48.1.48-52.2004
- Sailer, F.C., Meberg, B.M. & Young, K.D. (2003).** beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 245-249.
- Saini R., Saini S & Sharma S. (2011).** Biofilm: A dental microbial infection. *J Nat Sci Biol Med* **2**, 71-75. doi: 10.4103/0976-9668.82317 PMID: PMC3312703.
- Salem, W., Leitner, D.R., Zingl, F.G., Schratte, G., Prassl, R., Goessler, W., Reidl, J. & Schild, S. (2015).** Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **305**, 85-95. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.005.
- Sanchez, C.J., Jr., Mende, K., Beckius, M.L., Akers, K.S., Romano, D.R., Wenke, J.C. & Murray, C.K. (2013).** Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* **13**, 47. doi: 10.1186/1471-2334-13-47.

- Sawicki, G.S., Chou, W., Raimundo, K., Trzaskoma, B. & Konstan, M.W. (2015).** Randomized trial of efficacy and safety of dornase alfa delivered by eRapid nebulizer in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* **14**, 777-83.
- Shakibaie, M., Forootanfar, H., Golkari, Y., Mohammadi-Khorsand, T. & Shakibaie, M.R. (2015).** Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *J Trace Elem Med Biol* **29**, 235-241. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.07.020.
- Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. (2010).** Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* **65**, 1955-1958. doi: 10.1093/jac/dkq257.
- Soothill, J. (2013).** Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* **11**, 909-915. doi: 10.1586/14787210.2013.826990.
- Soo, V. W. C. & Wood, T. K. (2013).** Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. *Sci Rep* **3**, 3186.
- Soto, S.M. (2013).** Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* **4**, 223-229. doi: 10.4161/viru.23724.
- Sousa, A. M. & Pereira, M. O. (2014).** *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in Cystic Fibrosis lungs—a review. *Pathogens* **3**, 680–703. doi.org/10.3390/pathogens3030680
- Srebnik, M., Polacheck, I., Steinberg, D., Jabbour, A. & Sionov, E. (2011).** Novel anti-biofilm agents. Google Patents. US 20110281921 A1.
- Stewart P.S. & Costerton J.W. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135.
- Stewart, P.S. (2003).** Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* **185**, 1485-1491.
- Stewart, P.S. (2015).** Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol Spectr* **3**.
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K., Tajima, A., Iwase, T. & Mizunoe, Y. (2013).** *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol* **195**, 1645-1655. doi: 10.1128/JB.01672-12.

- Sun, F., Qu, F., Ling, Y., Mao, P., Xia, P., Chen, H. & Zhou, D. (2013).** Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiol* **8**, 877-886. doi: 10.2217/fmb.13.58.
- Varposhti M., Ali AA & Mohammadi P. (2014).** Synergistic effects of bismuth thiols and various antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Jundishapur J Microbiol* **7**, e9142.
- Veloira W.G., Gurzenda E.M., Domenico P., Davis J.M. & Kazzaz J.A. (2003).** Synergy of tobramycin and bismuth thiols against *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother* **52**, 915-919.
- Vinoj, G., Pati, R., Sonawane, A. & Vaseeharan, B. (2015).** *In vitro* cytotoxic effects of gold nanoparticles coated with functional acyl homoserine lactone lactonase protein from *Bacillus licheniformis* and their antibiofilm activity against Proteus species. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 763-771. doi: 10.1128/AAC.03047-14.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J. & Ivanova, E.P. (2009).** Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **14**, 2535-2554. doi:10.3390/molecules14072535.
- Wang, Q., Sun, F.J., Liu, Y., Xiong, L.R., Xie, L.L. & Xia, P.Y. (2010).** Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2707-2711.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**, 2675-2679.
- Williamson, K.S., Richards, L.A., Perez-Osorio, A.C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P.S. & Franklin, M.J. (2012).** Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J Bacteriol* **194**, 2062-2073.
- Wimley, W. C. (2010).** Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol* **5**, 905–917.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.Z., Hoiby, N. & Song, Z.J. (2015).** Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* **7**, 1-7.

- Wu, S., Li, X., Gunawardana, M., Maguire, K., Guerrero-Given, D., Schaudinn, C., Wang, C., Baum, M.M. & Webster, P. (2014).** Beta- lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable *Haemophilus influenzae* by up-regulating carbohydrate metabolism. *PLoS One* **9**, e99204. doi: 10.1371/journal.pone.0099204.
- Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hoiby, N., Molin, S. & Song, Z.J. (2011).** Current understanding of multi-species biofilms. *Int J Oral Sci* **3**, 74-81. doi: 10.4248/IJOS11027.
- Yilmaz, C., Colak, M., Yilmaz, B.C., Ersoz, G., Kutateladze, M. & Gozlugol, M. (2013).** Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *The J Bone Joint Surg Am* **95**, 117-125. doi: 10.2106/JBJS.K.01135.
- Yim, G., Huimi Wang, H. & Davies J. (2007).** Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1195-1200.
- Yu, S., Su, T., Wu, H., Liu, S., Wang, D., Zhao, T., Jin, Z., Du, W., Zhu, M.J., Chua, S.L., & other authors (2015).** PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix. *Cell Res* **25**, 1352-1367.
- Zhang, L. & Mah, T.F. (2008).** Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* **190**, 4447-4452. doi: 10.1128/JB.01655-07.
- Zhao G., Usui M.L., Lippman S.I., James, G.A., Stewart, P.S., Fleckman, P. & Olerud, J.E. (2013).** Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**, 389–399. doi: 10.1089/wound.2012.0381. PMID: PMC3763221
- Zheng, Z. & Stewart, P.S. (2002).** Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 900-903.
- Zilberberg, M.D., Shorr, A.F., Micek, S.T., Vazquez-Guillamet, C. & Kollef, M.H. (2014).** Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. *Crit Care* **18**, 596. doi: 10.1186/s13054-014-0596-8.

