

Université de Montréal

**Sélection de mutations affectant la formation de biofilm  
chez *Actinobacillus pleuropneumoniae***

par

ALEXANDRA GRASTEAU

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Février 2011

© Alexandra Grasteau, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Sélection de mutations affectant la formation de biofilm  
chez *Actinobacillus pleuropneumoniae***

présenté par

**Alexandra Grasteau**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....

Josée Harel, présidente-rapporteuse

.....

Mario Jacques, directeur de recherche

.....

Michaël Mourez, membre du jury

## **RÉSUMÉ**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une infection pulmonaire contagieuse chez les porcs. Parmi les nombreux mécanismes de virulence retrouvés chez les bactéries, la formation de biofilms joue souvent un rôle important dans la pathogénèse. Il a été récemment démontré qu'App avait la capacité de former des biofilms *in vitro*. Dans notre laboratoire, la formation de biofilms par App a été évaluée en microplaques dans différents milieux de culture. Nous avons démontré que la souche de référence de sérotype 1 est capable de former des biofilms. Le but de ce travail est d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la régulation de l'expression des biofilms chez App.

L'objectif de cette étude était de générer une banque de mutants d'App 4074NaIR à l'aide du transposon mini-*Tn10*. Cette banque de 1200 mutants a été criblée à l'aide du modèle *in vitro* de formation de biofilms en microplaques et en tubes : 24 mutants démontrant une formation de biofilms modifiée par rapport à la souche mère App 4074NaIR ont été sélectionnés et identifiés, nous permettant ainsi de localiser le site d'insertion du transposon. Une analyse a permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la régulation de l'expression des biofilms chez App. Notre criblage a permis d'identifier 16 gènes connus impliqués dans la formation de biofilms chez App (*hns*) ou chez d'autres pathogènes (*potD2*, *ptsI*, *tig* and *rpmF*) mais également de nouveaux gènes impliqués dans la formation de biofilm (*APL\_0049*, *APL\_0637* and *APL\_1572*). Une caractérisation plus poussée de ces gènes nous permettra d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation de biofilm chez App.

**Mots clés :** *Actinobacillus pleuropneumoniae* / biofilm / criblage / mutagénèse / gènes.

## **ABSTRACT**

*A. pleuropneumoniae* (App) is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a contagious pulmonary infection in swine. Among the numerous virulence mechanisms found in bacteria, the formation of biofilms often plays an important role in pathogenesis. It has been recently demonstrated that App has the ability to form biofilms *in vitro*. In our laboratory, the formation of biofilms by App has been evaluated in microplates under different growth conditions. We showed that the reference strain of serotype 1 is capable of forming biofilms when cultured in a specific growth medium. The objective of this work is to identify genes implicated in the biosynthesis and regulation of biofilm formation in App.

The objective of this study was to generate a mutant library of App using the mini-*Tn10* transposon. A total of 1200 mutants has been screened with the help of *in vitro* models for biofilm formation which use microtiter plates or test tubes; 24 mutants exhibited modified biofilm formation when compared to the parental strain 4074NaIR. The selection and identification of these mutants allowed the identification of the insertion site of the transposon. Analysis revealed novel genes implicated in biosynthesis and regulation of the biofilm formation in App. Our screen allowed the identification of genes already associated in biofilm formation of App (*hns*) or other pathogens (*potD2*, *ptsI*, *tig* and *rpmF*). Genes (*APL\_0049*, *APL\_0637* and *APL\_1573*) that have not yet been associated with biofilm formation were also identified. Further characterization of the genes mentioned above would permit a greater understanding of the mechanisms implicated in biofilm formation of App.

**Key words:** *A. pleuropneumoniae*, biofilm, screen, mutagenesis, genes.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xii</b>
<b>DÉDICACE .....</b>	<b>xiv</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>RECENSION DES ÉCRITS .....</b>	<b>3</b>
<b>I. ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE.....</b>	<b>4</b>
1.1 Généralités .....	4
1.2 Famille des <i>Pasteurellaceae</i> .....	4
1.3 Caractéristiques phénotypiques.....	4
1.4 Les infections chez les porcs.....	5
1.5 Détection et traitement .....	6
<b>II. LES FACTEURS DE VIRULENCE .....</b>	<b>6</b>
2.1 La capsule.....	7
2.2 Le lipopolysaccharide (LPS).....	8
2.3 L'antigène O .....	9
2.4 Les mutants LPS .....	10
2.5 L'acquisition du fer .....	11
2.6 Les exotoxines Apx.....	13
2.7 Les autres facteurs de virulence .....	15
<b>III. AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE : approches génomiques.....</b>	<b>16</b>
3.1 Le génome d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	16
3.2 Les approches génomiques .....	16
<b>IV. LES BIOFILMS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Généralités.....	23
4.2 Les différentes étapes de formation d'un biofilm .....	24
4.3 Facteurs favorisant la formation de Biofilm .....	32

4.4 Les facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm.....	33
4.5 Le Quorum Sensing, régulation de la formation des biofilms .....	34
4.6 Les autres mécanismes régulateurs de la formation de biofilms par les polysaccharides, le GMP-c et par l'acétyl phosphate et l'alarmone .....	36
4.7 Les Biofilms dans leur environnement .....	37
4.8 Importance des biofilms.....	40
4.9 Les biofilms et les infections chez les animaux.....	42
4.10 Les biofilms et <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	43
<b>V. APPROCHE ET DÉMARCHE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>47</b>
<b>VI. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....</b>	<b>49</b>
<b>Novel Genes Associated with Biofilm Formation of <i>Actinobacillus</i></b>	
<b><i>pleuropneumoniae</i>.....</b>	<b>50</b>
<i>Abstract</i> .....	52
<i>Introduction</i> .....	53
<i>Materials and methods</i> .....	54
<i>Results</i> .....	58
<i>Discussion</i> .....	62
<i>Acknowledgements</i> .....	66
<i>References</i> .....	66
<i>Figures legends</i> .....	75
<b>VII. DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
<b>VIII. CONCLUSION.....</b>	<b>88</b>
<b>IX. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>90</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>108</b>



## LISTE DES TABLEAUX

### Recension des écrits

Tableau 1.	
Expression des toxines Apx chez les sérotypes d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	15
Tableau 2.	
Les principales infections associées à la présence de biofilms.....	41

### Article

Table 1.	
Oligonucleotide primers used in this study.....	72
Table 2.	
<i>A. pleuropneumoniae</i> 4074 NaIR enhanced –biofilm mutants identified and sequenced in the present study.....	73
Table 3.	
<i>A. pleuropneumoniae</i> 4074 NaIR reduced –biofilm mutants identified and sequenced in the present study.....	74

## LISTE DES FIGURES

### Recension des écrits

Figure 1.	
Structure du polysaccharide capsulaire retrouvé chez <i>A. pleuropneumoniae</i> du sérotype 1.....	7
Figure 2.	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> au microscope électronique à transmission.....	7
Figure 3.	
Structure du noyau OS retrouvé chez <i>A. pleuropneumoniae</i> du sérotype 1.....	9
Figure 4.	
Structure de l'antigène-O chez le sérotype 1 d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	9
Figure 5.	
Représentation schématique de l'acquisition du fer chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	12
Figure 6.	
Description schématique des trois variantes de l'IVET.....	17
Figure 7.	
Schéma récapitulatif de la méthode STM.....	19
Figure 8.	
Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm.....	24
Figure 9.	
Le système de fonctionnement par paire auto-inducteur/détecteur.....	35
Figure 10.	
Formation d'un biofilm et résistance à la réponse immunitaire de l'hôte.....	42
Figure 11.	
Extraite d'un article du Journal of Bacteriology: Roles of <i>pgaABCD</i> genes in synthesis, modification and export biofilm adhesin Poly- $\beta$ -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine.....	44
Figure 12: Observation de biofilm chez <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype 1 en microscopie confocale.....	46

## Article

### Figure 1.

Comparison between the amount of biofilm and the growth of the 24 sequenced *A. pleuropneumoniae* mutants after 6h of incubation.....76

### Figure 2.

Genome distribution (A) and functional classification (B) of the different genes identified in *A. pleuropneumoniae* enhanced-biofilm mutants and reduced-biofilms mutants.....77

### Figure 3.

Initial attachment to the plastic substrate by *A. pleuropneumoniae* parental strain (4074NalR), two enhanced-biofilms mutants (B22 and X34) and five reduced-biofilm mutants (57, 556, T16, T7 and 320) .....78

### Figure 4.

Confocal scanning laser microscopic images of 6h-biofilms stained with Film Tracer™ FM® 1-43 produced by the parental strain (A: 4074NalR), an enhanced biofilm mutant (B: *hns* mutant), and a reduced biofilm mutant (C: *rpmF* mutant) of *A. pleuropneumoniae*. Images of the X-Z plane of the biofilms are included below their corresponding top view images.....79

## Annexes

### Annexe 1 : Formation de biofilm en présence de phospholipides

#### Figure 1.

Test en micoplaque de formation de biofilm de la souche parentale 4074 NalR et des mutants après ajout de phosphatidylcholine dimyristoyl glycérol pendant 1h à 37°C. (Bares noires: sans phospholipide, Bares blanches: avec phospholipide).....110

#### Figure 2.

Test en micoplaque de formation de biofilm de la souche parentale 4074 NalR et des mutants après ajout de phosphatidylcholine dipalmitoyl pendant 1h à 37°C. (Bares noires: sans phospholipide, Bares blanches: avec phospholipide).....110

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

- Aap** : Accumulation-associated protein  
**App**: *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
**Apx** : *A. pleuropneumoniae* RTX  
**BCAAs**: Branched chain amino acids  
**BHI** : Brain Heart Infusion  
**CaCl<sub>2</sub>**: Chlorure de calcium  
**CI**: Competitivity Index  
**CPC**: Chlorure de cétylpiridinium  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**E. coli**: *Escherichia coli*  
**EDTA**: Ethylenediamine dihydroxyphenyl acetic acid  
**ELISA**: Enzyme-linked immunosorbent assay  
**EPS**: Exopolysaccharides  
**GFP** : Green fluorescent protein  
**GMP-c** : Guanosine monophosphate cyclique  
**GTP** : Guanosine triphosphate  
**IPTG**: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside  
**IVET**: In vivo expression technology  
**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**: Phosphate de potassium dibasique  
**KDO** : Acide-3-désoxy-D-manno-octulosonique  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**: Phosphate de potassium monobasique  
**LB** : Luria Bertani  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**Lrp**: Leucine responsive protein  
**MgSO<sub>4</sub>**: Sulfate de magnésium  
**MH**: Mueller Hinton  
**NaCl**: Chlorure de sodium  
**NAD**: β-Nicotinamide adénine dinucléotide  
**NPTr**: Newborn Pig Trachea  
**OMP**: Outer membrane protein  
**OS**: Noyau oligosaccharidique  
**PCR**: Polymerase chain reaction

- PGA:** Poly- $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine
- PIA:** Adhésine polysaccharidique intercellulaire
- RTX:** Repeats in the structural toxin
- SCOTS:** Selective capture of transcribed sequences
- SDS:** Sodium dodecyl sulfate
- SOD:** Superoxide dismutase
- STM:** Signature-tagged mutagenesis
- Tbp:** Transferrin-binding proteins
- TTC:** Triphenyltetrazolium chloride
- TSB:** Tryptone soy broth
- UPEC:** Souches uropathogènes d'*E. coli*
- UTP:** Uracile triphosphate
- WGA:** Wheat-germ agglutinin

## DÉDICACE

***À ma famille pour être là pour moi,  
À mes deux papis qui me manquent énormément,  
À mes parents, Pierre et Patricia, pour avoir toujours su me montrer  
les valeurs essentielles et nous avoir construit un avenir solide,  
pour leur soutien, et qui sont tout simplement  
ma plus grande source d'inspiration  
À mon frère Fabien pour qu'il soit fier de sa grande sœur.***

*Certainly we felt that pure, planktonic cultures were the only way to work. Yet, in nature, bacteria don't live like that; in fact most of them occur in mixed, surface-dwelling, communities.*

*Roberto Kolter*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet, autant au niveau personnel que professionnel. Un merci tout particulier pour...

Dr Mario Jacques, professeur titulaire, Université de Montréal, Département de pathologie et microbiologie et directeur de mon projet de maîtrise pour m'avoir permis de réaliser ce projet sous sa direction et aussi pour la patience, la confiance et les conseils qu'il m'a offerts tout au long de ce projet ;

Dre Josée Harel et le Dr Michaël Mourez pour leur participation à mon comité conseil, leur disponibilité et autres réunions improvisées ainsi que pour leurs excellents conseils et suggestions et pour avoir contribué à ma formation.

Dr J. Daniel Dubreuil et Dr John Fairbrother, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire à titre de membre substitut.

Les membres du GREMIP et du laboratoire Mario Jacques que je côtoie ou que j'ai côtoyé pour les discussions et les conseils judicieux, le Dr Vincent Deslandes, Cynthia Lévesque, Dr Yannick Tremblay et en particulier Josée Labrie qui a su me guider au début de mon projet et m'a apporté beaucoup de ses connaissances.

Merci à mes collègues et amis Eliane Auger, Geneviève Pelletier-Jacques, Marie-Ève Charbonneau, Frédéric Berthiaume, Richard Graveline, Mohammed Chekabab (Simo) et Claudia Syed qui m'ont soutenue.

Merci à Micheline St-Germain, qui aide tous les étudiants étrangers dans nos démarches administratives.

Je remercie également, Ludivine et ma choupie Alexandra, pour les bons moments passés ensemble à St HyaHya la Jolie, pour votre soutien, réconfort et votre fidèle amitié. Un merci spécial à tous ceux qui m'ont accueillie dans leur maison : Pascal, Michel, Sylvie, Robert, Claire et Guy et pour avoir été là tout simplement. Je ne vous oublierai jamais.

## **INTRODUCTION**



La pleuropneumonie porcine due à *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) est une maladie répandue mondialement, fréquente, hautement infectieuse et qui engendre des pertes économiques importantes pour l'industrie porcine. En général, parmi les nombreux mécanismes de virulence utilisés par les bactéries pathogènes, la formation de biofilms joue un rôle important dans la pathogenèse. Le biofilm permet de voir les microorganismes en tant que communauté organisée, dynamique et caractérisée par un changement radical de phénotype. Par exemple, les biofilms acquièrent des propriétés qui leur sont spécifiques, notamment l'acquisition d'une résistance accrue aux antibiotiques, aux désinfectants et à de nombreux stress. Ceci pose de graves problèmes en santé humaine, parce que les biofilms peuvent se former sur plusieurs types de supports (implants médicaux, ...) et être à l'origine d'infections chroniques. Au-delà de ces problèmes, les biofilms sont impliqués dans de nombreux phénomènes tels que la colonisation et la transmission de la bactérie. Ce qui implique de reconsidérer les stratégies thérapeutiques et vaccinales. Beaucoup d'études portant sur les biofilms ont été réalisées sur divers pathogènes humains mais peu de données sont disponibles à ce sujet chez App.

Le but de cette étude est de proposer un axe de recherche sur la problématique des biofilms chez App en vue d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes de formation des biofilms et de développer de nouvelles stratégies de contrôle contre la pleuropneumonie porcine.

Le criblage d'une banque de mutants isogéniques d'*A. pleuropneumoniae* devrait nous permettre d'identifier les gènes impliqués dans l'expression du biofilm et de mieux cerner son rôle dans la pathogénie. Ce projet consiste donc à générer une banque de mutants d'App 4074 NalR obtenus par mutagenèse à l'aide d'un transposon mini-*Tn10*. Cette banque est par la suite criblée à l'aide du modèle *in vitro* en microplaques dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation du biofilm.

## **RECENSION DES ÉCRITS**

Les productions agricoles animales sont souvent exposées à de nombreux pathogènes qui causent des infections majeures ce qui entraîne par le fait même des pertes économiques importantes pour les producteurs. *Actinobacillus pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une infection pulmonaire très contagieuse chez les porcs. Une revue de littérature a été réalisée afin de présenter mon projet de recherche.

## ***I. ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

### **1.1 Généralités**

En 1957, Pattison et *al.* (Pattison 1957) isolent, de lésions de pleuropneumonie porcine, une bactérie qui sera dénommée *Haemophilus-like* avant d'être inscrite sur la liste officielle des dénominations bactériennes sous le nom de *Haemophilus pleuropneumoniae*. En 1978, Bertschinger et Seifert (Bertschinger 1978) isolent un cas de pleuropneumonie ressemblant à *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Ces deux bactéries, présentent des analogies phénotypiques et par hybridation ADN-ADN, (Pohl 1983) montrent que ces bactéries appartiennent à une unique espèce fortement apparentée à *Actinobacillus lignieresii* et que cette nouvelle espèce est éloignée de l'espèce type du genre *Haemophilus*. Compte tenu de ces données, les chercheurs ont proposé un nouveau genre/espèce, *Actinobacillus pleuropneumoniae* comprenant deux biotypes (voir la section 3).

### **1.2 Famille des *Pasteurellaceae***

*A. pleuropneumoniae*, est une bactérie faisant partie de la famille des *Pasteurellaceae*. Cette dernière est constituée de plusieurs genres dont *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* et *Mannheimia* qui sont tous pathogènes pour une grande variété d'animaux, y compris l'homme, et qui causent diverses maladies caractéristiques (Taylor 1999).

### **1.3 Caractéristiques phénotypiques**

*A. pleuropneumoniae* est un petit cocobacille ou un petit bacille, Gram négatif, non sporulé, non mobile, capsulé, se présentant de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes. La bactérie est anaérobie facultative et son métabolisme est de type fermentatif. Un caractère positif est noté pour l'oxydase, l'uréase généralement rapide et intense (exceptionnellement, il est possible d'isoler des variants uréase négative), l'ONPG, la réduction des nitrates et des nitrites, la phosphatase alcaline,

l'acidification du fructose, du mannose, du saccharose et du xylose. Les souches d'*A. pleuropneumoniae* sont réparties dans deux biotypes :

↳ le biotype 1 pour les souches NAD dépendantes

↳ le biotype 2 pour les souches NAD indépendantes

Ce dernier biotype requiert cependant la présence de certains précurseurs du NAD. Il existe 13 sérotypes du biotype 1 (1 à 12 et 15) et 2 sérotypes du biotype 2 (13 et 14) (Blackall, Klaasen et al. 2002) (Schaller, Kuhn et al. 1999). Mais néanmoins certains sérotypes peuvent se retrouver dans les deux biotypes. Ces sérotypes se basent sur la structure du LPS et des polysaccharides capsulaires (Perry 1990). Tous les sérotypes causent la pleuropneumonie et sont répartis en fonction de leur localisation géographique. En Amérique du Nord ce sont les sérotypes 1, 5 et 7 qui sont prévalents alors qu'en Europe et au Japon, le sérotype 2 est le plus souvent retrouvé (Dubreuil, Jacques et al. 2000). Les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et leur prévalence en Amérique du Nord ont été répertoriés récemment (Gottschalk 2007).

#### **1.4 Les infections chez les porcs**

*A. pleuropneumoniae* est un agent infectieux de l'appareil respiratoire du porc et la pleuropneumonie est une des affections majeures en élevage porcin dans le monde. La maladie en général touche des porcs à l'engraissement âgés de plus de 12 semaines ainsi que les porcelets. Le mode de transmission s'effectue lors de contacts rapprochés ou par aérosols. Après une durée d'incubation variant de quelques heures à quelques jours, la maladie évolue sous trois formes cliniques principales :

La forme suraiguë débute par des signes généraux (hyperthermie de l'ordre de 41 à 42°C, abattement, anorexie) et éventuellement par de la diarrhée et des vomissements de courte durée. Les animaux se couchent, la peau est cyanosée.

La forme aiguë présente une évolution moins rapide mais souvent se transforme en une forme chronique. Les animaux en général présentent un syndrome respiratoire grave avec dyspnée et toux. L'évolution clinique est très variable d'un animal à un autre et les porcs qui survivent deviennent des porteurs asymptomatiques qui excrètent les germes restés présents au niveau des lésions pulmonaires, des amygdales et des cavités nasales.

La forme chronique se développe généralement après des signes cliniques de la phase aiguë. On observe des retards de croissance, la présence ou non de fièvre et

une toux sporadique. La bactérie est présente dans des lésions pulmonaires nécrotiques et peut envahir les voies respiratoires antérieures et les amygdales.

Toutes les lésions causées par la pleuropneumonie porcine sont principalement localisées au niveau de l'appareil respiratoire.

### 1.5 Détection et traitement

La titration d'anticorps dirigés contre *A. pleuropneumoniae* chez les porcs infectés est réalisé par des tests sérologiques ELISA et les tests de fixation du complément (Sidibe, Messier et al. 1993). Néanmoins ces méthodes de détection peuvent conduire à des réactions croisées entre sérotypes (Perry 1990). Le sérotypage des souches isolées se fait grâce à des tests de coagglutination (Mittal, Higgins et al. 1983) (Sidibe, Messier et al. 1993). D'autres techniques sont utilisées comme les billes de polystyrène paramagnétiques couplées à des anticorps dirigés contre *A. pleuropneumoniae* (Gagné, Lacouture et al. 1998) et des techniques de PCR ont été développées permettant la détection de gènes codant pour des protéines d'*A. pleuropneumoniae* (Fittipaldi, Broes et al. 2003) (Zhou, Jones et al. 2008).

Les antibiotiques comme la quinolone, céphalosporine, tiamuline, chlortétracycline, ceftiofure, tilmicosine, enrofloxacin et la pénicilline G permettent de traiter les porcs et de prévenir l'infection d'*A. pleuropneumoniae* mais on observe de plus en plus de résistance acquise à divers antibiotiques notamment la tétracycline (Sewartz 2004).

## II. LES FACTEURS DE VIRULENCE

La pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae*, comme celle d'autres bactéries pathogènes d'ailleurs, est multifactorielle. Différents facteurs de virulence incluant les polysaccharides capsulaires, les lipopolysaccharides, les exotoxines (hémolysines et cytotoxines), les protéines membranaires et les facteurs d'adhésion jouent un rôle important (Haesebrouck, Chiers et al. 1997, Nicolet 1990, Bossé, Janson et al. 2002, Jacques 2004). Des différences de virulence entre les sérotypes et même à l'intérieur du même sérotype ont souvent été observées. Il a été suggéré que ces différences soient dues à la structure de la capsule, à la composition du LPS ou au type d'hémolysine (Rosendal, Boyd et al. 1985).

## 2.1 La capsule

La spécificité des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* est déterminée par les polysaccharides capsulaires et mise en évidence à l'aide de diverses techniques telles l'agglutination et la coagglutination. Ces polysaccharides sont formés d'unités répétées d'oligosaccharides chargés négativement dû aux acides carboxyliques ou aux phosphates (Fedorka-Cray, Stine et al. 1993). La composition et la structure de la capsule du sérotype 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* a été déterminé (Altman, Brisson et al. 1992) (Figure 1).

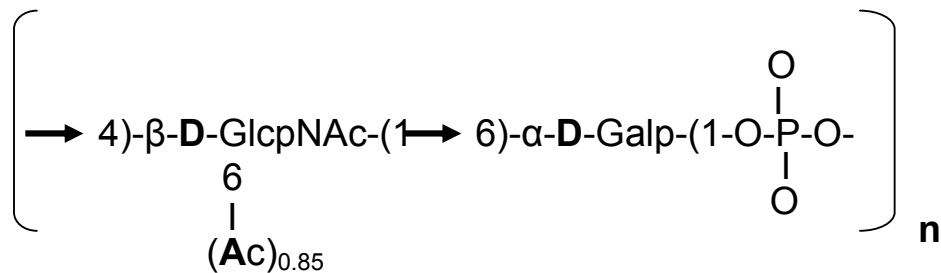


Figure 1 : Structure du polysaccharide capsulaire retrouvé chez *A. pleuropneumoniae* du sérotype 1 (Altman, Brisson et al. 1992).

La capsule d'*A. pleuropneumoniae* est d'une épaisseur variant de 80 à 230 nm dépendant du sérotype. Jacques et *al.* ont suggéré que la différence dans la quantité de polysaccharides capsulaires pourrait expliquer des variations dans la virulence notée entre les sérotypes (Jacques, Foiry et al. 1988). La capsule joue un rôle important car elle protège les bactéries de la phagocytose et est considérée comme étant la barrière de défense principale de la bactérie contre les mécanismes humoraux de l'hôte (Inzana, Ma et al. 1988).

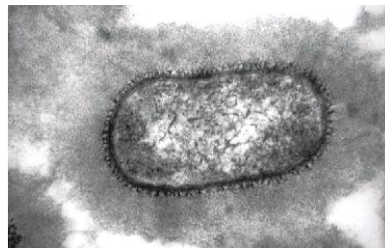


Figure 2 : *A. pleuropneumoniae* au microscope électronique à transmission (source : laboratoire M Jacques).

## 2.2 Le lipopolysaccharide (LPS)

Les LPS sont des molécules complexes faisant partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS (ou endotoxine) est composé de trois parties bien définies : le lipide A, le noyau oligosaccharidique et la chaîne O-spécifique. Les deux derniers composants forment la partie polysaccharidique, laquelle est reliée à la partie lipidique.

**Le lipide A :** le composant lipidique des endotoxines, est en fait le principal constituant de la couche externe de la membrane externe des cellules bactériennes. Ce lipide A permet l'ancrage du LPS dans la membrane externe. Il est responsable du pouvoir toxique et du pouvoir immunostimulant des endotoxines.

### **Le noyau oligosaccharidique :**

Une étude de Jacques *et al* (Jacques 1996), basée sur la mobilité électrophorétique et l'antigénicité, suggère la présence de deux types de noyau oligosaccharidique chez les LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Ceci a par la suite été confirmé lorsque les structures des noyaux oligosaccharidiques ont été déterminées (Michael, Brisson et al. 2004). Le noyau oligosaccharidique (OS) est composé d'un noyau interne (la partie liée au lipide A) et d'un noyau externe (la partie généralement liée à la chaîne O-spécifique). Ce noyau OS est la partie charnière entre le lipide A et l'antigène O.

**Le noyau interne** est composé de deux sucres inhabituels : l'heptose, qui possède 7 atomes de carbone, et le KDO (l'acide 2-céto-3-désoxyoctonoïque). Le KDO (un octose) est un sucre unique toujours présent dans les LPS. Chez *A. pleuropneumoniae*, ce noyau présente des similitudes dans sa composition entre les différents sérotypes (Michael, Brisson et al. 2004). Celui-ci est composé de L-glycéro-D-manno-heptose lié à un résidu KDO. Cette structure est également retrouvée chez d'autres *Pasteurellaceae* (Brisson, Crawford et al. 2002).

**Le noyau externe** est pour sa part composé d'hexoses (Raetz and Whitfield 2002). La biosynthèse du noyau externe est contrôlée par plusieurs gènes de l'opéron *waa*. En général dans tous les types de noyaux identifiés chez certains pathogènes, on retrouve un glucose comme premier résidu qui est ajouté par la glycosyltransférase WaaG. D'autres glycosyltransférases codées par les gènes *waaOTWV* vont par la suite catalyser l'élongation du noyau externe par l'ajout séquentiel de résidus glucose ou galactose essentiellement par des liaisons  $\alpha$ . Des études ont montré le rôle de ce noyau dans l'attachement de la chaîne O, mais il a été montré que le noyau interne pouvait également servir de site d'attachement à l'antigène O. Ce site, composé d'un

résidu galactose de l'antigène O a été identifié au niveau du noyau interne chez *A. pleuropneumoniae* de sérotype 5a (Michael, Brisson et al. 2004).

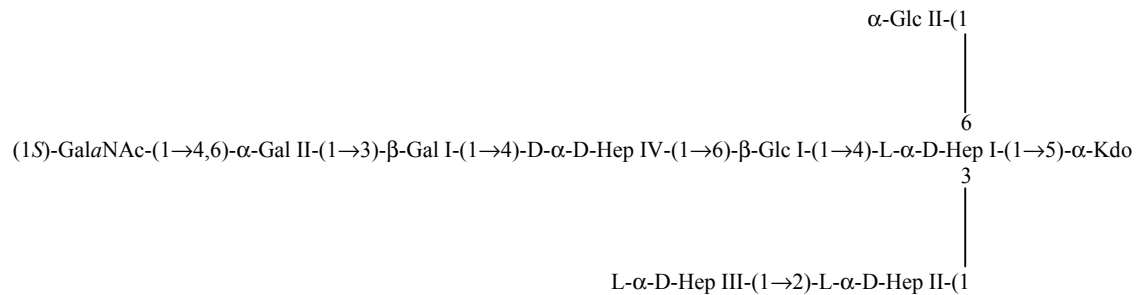


Figure 3 : Structure du noyau OS retrouvés chez *A. pleuropneumoniae* du sérotype 1 (Michael, Brisson et al. 2004).

### 2.3 L'antigène O

La chaîne O-spécifique est le segment le plus variable du LPS. Chez *A. pleuropneumoniae*, la chaîne O est un polymère d'unités répétées comprenant de 1 à 8 résidus glycosyl (Jacques 1996).

Une souche bactérienne présentant de longues chaînes est dite lisse alors qu'une souche sans antigène-O est qualifiée de rugueuse. Ainsi, chez *A. pleuropneumoniae*, les sérotypes 2, 4 et 7 ont un LPS lisse, les sérotypes 1 et 5 ont un LPS semi-rugueux et les sérotypes 3 et 6 ont un LPS rugueux. La structure du LPS des sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* a été précédemment identifiée (Dubreuil, Jacques et al. 2000) (Perry 1990). L'antigène-O du sérotype 1 est un polymère branché d'unités répétées d'un tétrasaccharide composé de L-rhamnopyranosyl, de D-glycopyranosyl et de 2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucose (2:1:1).

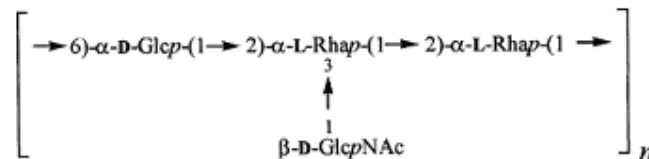


Figure 4 : Structure de l'antigène-O chez le sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*. Adaptée de (Perry 1990) (MacLean, Perry et al. 2004).

Une étude de MacLean a permis d'identifier l'antigène-O du sérotype 13 comme étant un polymère d'unités répétées d'un tétrasaccharide composé de résidus



de L-rhamnose, de 2-acétamido-2-désoxy-D-galactose, et de D-galactose (1:1:2) (MacLean, Perry et al. 2004). L'antigène-O du sérotype 14 est un polymère d'unités répétées d'un disaccharide composé d'une chaîne de  $\beta$ -D-galactofuranose substitué en position 2 par un résidu D-galactopyranose (MacLean, Perry et al. 2004). La structure de l'antigène-O du sérotype 15 est semblable à celle des sérotypes 3 et 8 et consiste en un polymère linéaire d'unités répétées d'un pentasaccharide constitué de 2 résidus D-glucose et de 3 résidus D-galactose (Perry, MacLean et al. 2005).

Une étude de notre laboratoire a permis d'identifier, une région de 18 cadres ouverts de lecture chez *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 potentiellement impliquée dans la biosynthèse de l'antigène-O (Labrie, Rioux et al. 2002).

Récemment une étude (Ramjeet, Deslandes et al. 2005) a montré que le LPS est impliqué dans de nombreux mécanismes de virulence comme la colonisation, la résistance aux peptides antimicrobiens et l'activité cytotoxique. Cette étude suggère que le LPS contribue grandement à l'inflammation lors de la pleuropneumonie porcine en permettant la synthèse de cytokines proinflammatoires.

#### **2.4 Les mutants LPS**

Une étude (Rioux, Galarneau et al. 1999) a identifié le LPS comme étant l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae* impliquée dans l'adhérence aux cellules du tractus respiratoire porcin. Le but de cette étude était d'isoler et de caractériser des mutants au niveau de la biosynthèse des LPS en utilisant le transposon mini-*Tn10*. Sept mutants possédaient des LPS rugueux (dont deux possédaient un profil similaire sur Southern blot) tandis qu'un autre mutant exprimait les LPS de haut poids moléculaire et possédait une bande additionnelle dans la région du noyau oligosaccharidique-lipide A, comme observé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de Tricine et de SDS. Les mutants LPS étaient sensibles à différents degrés au sérum normal de porc tandis que la souche mère était résistante au sérum. L'utilisation de coupes congelées de trachée de porcelet indique que les mutants possédant des LPS rugueux ont adhéré similairement ou en plus grand nombre que la souche mère. Cependant, un mutant adhérait significativement moins que la souche mère et était aussi moins virulent chez le porc. Le gène affecté par le mini-*Tn10* chez le mutant #5.1 est *galU*, gène codant pour l'UTP- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate uridylyltransférase impliquée dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique. L'analyse de complémentation confirme que les caractéristiques

phénotypiques du mutant #5.1 sont le résultat de l'inactivation du gène *galU*. L'étude des mutants rugueux a démontré que la perte de l'antigène-O ne semble pas être nécessaire à l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcine mais qu'un noyau oligosaccharidique complet pourrait être requis. À notre connaissance, ces mutants isogéniques déficients au niveau de la biosynthèse des LPS sont les premiers à être isolés chez *A. pleuropneumoniae*.

## 2.5 L'acquisition du fer

En général, les bactéries acquièrent le fer indispensable à leur croissance grâce à des sidérophores. Les souches d'*A. pleuropneumoniae* des biotypes 1 et 2 ne synthétisent pas de sidérophores. Néanmoins des chercheurs (Diarra, Dolence et al. 1996) ont montré qu'une souche du sérotype 1 et une souche du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* étaient capables de produire des sidérophores. Le fer extracellulaire est généralement lié à des glycoprotéines telles que la transferrine ou la lactoferrine. En revanche au niveau intracellulaire, le fer est stocké par des protéines qui contiennent l'hème (comme dans l'hémoglobine molécule composée de quatre sous-unités, chacune d'entre elles liées de façon covalente à un atome de fer). D'autres mécanismes de captation du fer sont connus chez les bactéries et certains d'entre eux existent chez *A. pleuropneumoniae* (Jacques 2004).

Certaines espèces des genres *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Neisseria*, cultivées dans des milieux carencés en fer expriment à leur surface deux protéines de membrane externe, nommés Tbp : transferrin-binding proteins. La Tbp 1 est une protéine transmembranaire et la Tbp 2 est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe grâce à sa partie lipidique. Ces deux protéines semblent agir en synergie pour capter le fer lié à la transferrine. Les Tbp d'*A. pleuropneumoniae* sont spécifiques à la transferrine porcine ce qui expliquerait, en partie, la spécificité d'hôte.

Au cours de l'infection, *A. pleuropneumoniae* produit des toxines hémolytiques permettant la libération de l'hémoglobine qui sera utilisée comme source de fer par la bactérie.

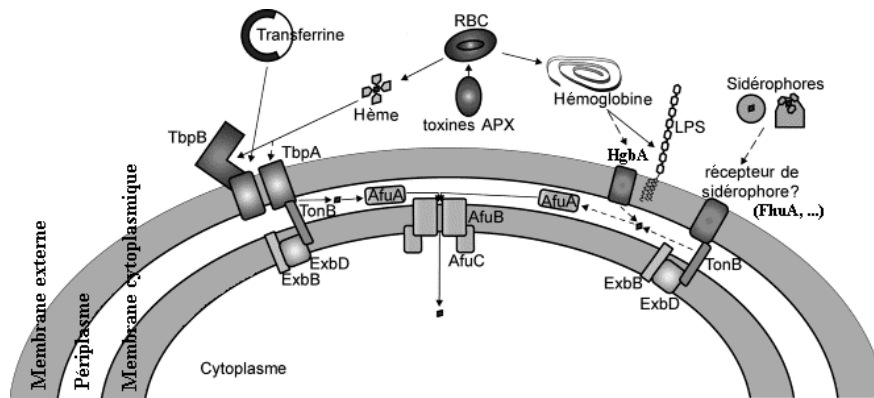


Figure 5 : Représentation schématique de l'acquisition du fer chez *A. pleuropneumoniae* (Bossé, Janson et al. 2002).

On sait que HgbA est une protéine de la membrane externe qui semble être impliquée dans la captation de l'hémoglobine par *A. pleuropneumoniae*. (Srikumar, Mikael et al. 2004; Shakarji, Mikael et al. 2006) (Figure 5). HgbA possède des sites de fixation pour l'hème (Srikumar, Mikael et al. 2004). Une étude a montré que le gène *hgbA* est présent chez tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Srikumar, Mikael et al. 2004) (Shakarji, Mikael et al. 2006) et d'autres analyses ont permis de montrer qu'il est surexprimé en condition de restriction en fer (Deslandes, Nash et al. 2007). Le répresseur Fur a un site de liaison au niveau du promoteur d'*hgbA* permettant de confirmer la régulation de son expression par le fer. Des études d'infections expérimentales ont montré qu'un mutant *hgbA* du sérotype 1 était atténué (Shakarji, Mikael et al. 2006), suggérant ainsi un rôle important d'HgbA dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae*.

Les souches d'*A. pleuropneumoniae* peuvent capter le ferrichrome à l'aide d'un récepteur FhuA inséré dans la membrane externe (Mikael, Srikumar et al. 2003). Certaines souches d'*A. pleuropneumoniae* peuvent utiliser le ferrichrome exogène grâce à un mécanisme codé par l'opéron *fhuCDBA* (Mikael, Pawelek et al. 2002) (Shakarji, Mikael et al. 2006) néanmoins ce système d'acquisition de fer, n'est pas régulé par le fer (Mikael, Srikumar et al. 2003). L'opéron *fhu* est composé du gène *fhuA* qui est le récepteur et le transporteur du ferrichrome à travers la membrane externe, le gène *fhuD* est une protéine qui prend en charge le ferrichrome dans le périplasme et les gènes *fhuC* et *fhuB* constituent un ABC transporteur permettant l'internalisation du ferrichrome (Figure 5).

Chez le sérotype 15 du biotype 1, récemment décrit, ainsi que chez les sérotypes 13 et 14 du biotype 2 d'*A. pleuropneumoniae*, la présence de FhuA et de HgbA a été démontrée. Afin de déterminer la spécificité de substrat des récepteurs du fer FhuA et HgbA ainsi que leur rôle dans la virulence, deux mutants isogéniques, d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1, délétés de FhuA ou HgbA ont été utilisés. Les résultats indiquent que FhuA et HgbA semblent être spécifiques de leur ligand respectif, le ferrichrome et l'hémoglobine. La virulence des deux mutants a été évaluée par des infections expérimentales chez des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés. Tout comme la souche mère sauvage S4074, le mutant FhuA (DG02) est très virulent. Par contre la virulence du mutant HgbA ( $\Delta hgbA$ ) est atténuée. Les résultats suggèrent que FhuA ainsi que HgbA sont conservés chez tous les sérotypes et biotypes d'*A. pleuropneumoniae*. De plus, le récepteur pour l'hémoglobine porcine, HgbA, semblerait jouer un rôle dans la virulence.

## 2.6 Les exotoxines Apx

*A. pleuropneumoniae* produit des hémolysines actives sur les érythrocytes et des cytotoxines actives sur les cellules endothéliales, les macrophages et les neutrophiles du poumon du porc (Rycroft, Williams et al. 1991). Ces protéines sont membres de la famille des toxines RTX (repeats in the structural toxin), présentent des séquences répétées, riches en glycine et constituées de 9 acides aminés et agissent en s'insérant dans les membranes et en formant des pores. Des protéines de la famille RTX sont produites par plusieurs espèces bactériennes et, en général, il existe une corrélation entre la synthèse de ces protéines et la pathogénicité des bactéries (Schutte, Rosseau et al. 1997) (Leite, Gyles et al. 2003). De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, ces toxines RTX sont constituées de quatre domaines :

- ↳ un domaine hydrophobe en N-terminal qui se replie en hélice alpha qui joue un rôle dans la formation de pores membranaires (Hyland, Vuillard et al. 2001) (Schindel, Zitzer et al. 2001).
- ↳ un domaine qui constitue 40% de la molécule qui semble nécessaire pour l'attachement aux cellules cibles. Ce domaine est composé de résidus lysine. Ces résidus sont liés de façon covalente à une ou deux chaînes d'acides gras et jouent un rôle dans l'attachement de la toxine

aux membranes (Stanley, Packman et al. 1994) (El-Azami-El-Idrissi, Bauche et al. 2003).

↪ un domaine formé par des séquences riches en glycine qui chélatent les ions calcium et qui interviennent dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires (Frey, Meier et al. 1991).

↪ un domaine constituant un signal de sécrétion permettant le transport de la toxine au travers des enveloppes cellulaires (Koronakis, Koronakis et al. 1989).

Les opérons codant pour les toxines RTX sont constitués de quatre gènes contigus dans l'ordre *CABD* (Frey, Haldimann et al. 1994). Le gène A code pour la prototoxine, le gène C code pour une acétyl transférase qui greffe des acides gras, les gènes B et D codent pour des protéines associées à la membrane et permettant l'excrétion de la toxine avec TolC. La nomenclature des toxines chez *A. pleuropneumoniae* a été unifiée et elles sont appelées ApxI (*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin I), ApxII, ApxIII et ApxIV (Tableau 1). Les souches appartenant à divers sérotypes produisent diverses combinaisons de ces quatre toxines. Ces différentes toxines sont présentées ci dessous (Frey, Haldimann et al. 1994):

La toxine ApxI a été décrite initialement comme étant une puissante hémolysine (hémolysine I= HlyI) puisque celle-ci est douée de propriétés cytotoxiques pour les cellules endothéliales, les macrophages alvéolaires et les neutrophiles et elle est également appelée cytolysine I (ClyI).

La toxine ApxII est décrite comme un facteur faiblement hémolytique (HlyII). L'opéron *apxII* est dépourvu des gènes permettant l'excrétion de la toxine qui est permise grâce à une complémentation en *trans* par les produits des gènes *apxIB* et *apxID* ou *apxIIIB* et *apxIIID*.

La toxine ApxIII a initialement été dénommée cytolysine III (ClyIII) ou pleurotoxine (Ptx) ou toxine macrophagique (Mat). Cette toxine dépourvue d'activité hémolytique est fortement cytotoxique pour les cellules endothéliales, les macrophages bronchoalvéolaires et les neutrophiles.

La toxine ApxIV est la moins caractérisée et est produite uniquement *in vivo* par tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. C'est une toxine qui a une faible

activité hémolytique et une synergie co-hémolytique avec la sphingomyélinase (toxine) retrouvée chez *Staphylococcus aureus*. Néanmoins le rôle de la toxine ApxIV dans la pathogénèse d'*A. pleuropneumoniae* reste à démontrer.

Sérotypes	Toxines exprimées <i>in vitro</i>
1, 5, 9 et 11	ApxI et ApxII
2, 4, 6 et 8	ApxII et ApxIII
3	ApxIII
7 et 12	ApxII
10	ApxI
15	ApxII et ApxIII

Tableau 1: Expression des toxines Apx chez les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Frey 1995) (Blackall, Klaasen et al. 2002).

Récemment il a été démontré (Ramjeet, Cox et al. 2008), qu'il y a une interaction entre les toxines hémolytique et cytotoxique ApxI et ApxII et le LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1, via le noyau OS. Pour la première fois, il a été observé une interaction directe entre la partie OS du LPS et une toxine RTX.

## 2.7 Les autres facteurs de virulence

Environ la moitié des souches d'*A. pleuropneumoniae* porte des fimbriae péritriches de 0.5 à 2 nm de largeur sur 60 à 450 nm de longueur, qui pourraient être impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales du rhino-pharynx. Des pili de type IV ont été identifiés à la surface d'*A. pleuropneumoniae*. La biosynthèse de ce fimbriae est codée par l'opéron *apfABCD*; ces protéines semblent correspondre aux équivalents des protéines PilB, PilC et PilD du pilus de type IV de *Pseudomonas aeruginosa* (Stevenson, Macdonald et al. 2003).

On sait également qu'*A. pleuropneumoniae* produit des protéases telle qu'une métalloprotéase zinc-dépendante, qui est active sur les IgA du porc mais non sur les IgA de l'homme. Cette protéase pourrait intervenir dans la pathogénie et sa spécificité serait un des facteurs expliquant que cette bactérie ne soit naturellement pathogène que chez le porc (Garcia Gonzalez, Garcia et al. 2004).

Il existe deux types de superoxyde dismutase (SOD) codées par les gènes *sodA* (SOD manganèse dépendante) et *sodC* (SOD cuivre, zinc-indépendante). Des études ont été réalisées sur *sodA* mais toutefois son rôle dans la virulence n'est pas

connu mais il pourrait prolonger la survie de la bactérie en éliminant les ions produits par les phagocytes. Toutefois un mutant *sodC* d'*A. pleuropneumoniae* n'a montré aucune atténuation dans la virulence dans un modèle d'infection expérimentale (Langford, Loynds et al. 1996) (Sheehan, Langford et al. 2000).

Il a été démontré qu'une uréase est synthétisée grâce à une région d'ADN possédant les gènes de structure *ureABC* ainsi que les gènes accessoires *ureEFGD*. L'utilisation d'un mutant *ureC* a permis de montrer que l'uréase jouait un rôle dans la persistance de la bactérie au niveau des poumons, en affectant la réponse immunitaire (Bossé and MacInnes 1997) (Baltes, Tonpitak et al. 2001)

### III. AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE : approches génomiques

#### 3.1 Le génome d'*A. pleuropneumoniae*

Le génome de la souche L20 de sérotype 5b a été séquencé et contient 2274482 pb (Foote, Bossé et al. 2008). Une autre équipe de chercheurs (Xu, Zhou et al. 2008) a séquencé le génome d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 3, composé de 2242062 pb réparties dans 2,097 séquences codantes, 6 opérons d'ARNr et 63 d'ARNt. Des biopuces à ADN ont été développées à partir de la séquence du génome de la souche L20 (Foote, Bossé et al. 2008) (Deslandes, Nash et al. 2007) (Gouré, Findlay et al. 2009). Suite à l'utilisation de multiples algorithmes bioinformatiques pour cribler le génome d'*A. pleuropneumoniae* L20, 93 gènes ont été identifiés comme encodant potentiellement des OMPs ou des lipoprotéines (Chung, Ng-Thow-Hing et al. 2007). Ces protéines de surface représentent des candidats intéressants pour le développement de vaccins. Plusieurs facteurs de virulence sont impliqués dans la pathogénèse, notamment les polysaccharides capsulaires, les toxines RTX, les lipopolysaccharides et plusieurs systèmes d'acquisition du fer. Le paragraphe sur l'approche génomique va nous permettre de mieux comprendre les techniques permettant d'identifier d'autres gènes jouant un rôle dans la virulence.

#### 3.2 Les approches génomiques

L'identification et la caractérisation des gènes qui permettent à une bactérie pathogène de survivre et de se répliquer à l'intérieur de l'hôte est essentielle afin de mieux comprendre la pathogénie. L'utilisation de cultures tissulaires de cellules hôtes peut permettre de reproduire certaines étapes spécifiques de l'infection bactérienne. Cependant, en utilisant des systèmes de sélection *in vitro*, on ne peut

s'attendre à identifier tous les gènes impliqués dans la virulence car on ne représente jamais parfaitement les conditions environnementales complexes auxquelles un pathogène fait face lors de sa croissance *in vivo*.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses approches ont été utilisées pour identifier des séquences du génome bactérien activement transcrites *in vivo*, dans le but d'identifier des nouvelles cibles pour l'élaboration d'un vaccin. Les méthodes IVET, STM, SCOTS ainsi que les biopuces permettent toutes la détection de gènes qui sont exprimés par un pathogène au cours de l'infection de l'hôte.

**IVET (In Vivo Expression Technology)** est une méthode au cours de laquelle des fragments génomiques, contenant potentiellement des promoteurs actifs *in vivo*, sont introduits dans un plasmide devant un gène rapporteur essentiel sans promoteur (figure 6). Par la suite, la présence d'activité du gène rapporteur peut être utilisée comme un indicateur de l'activation du promoteur cloné dans la condition expérimentale testée.

L'utilisation de l'IVET en 1993, a permis d'identifier des gènes induits *in vivo* chez un pathogène de mammifère (Hunt, Boucher et al. 2001). Une stratégie similaire, basée sur la sélection par un antibiotique, avait déjà permis à Osbourn et al d'identifier les gènes de virulence chez *Xanthomonas campestris* (Osborn, Barber et al. 1987) (Figure 6).

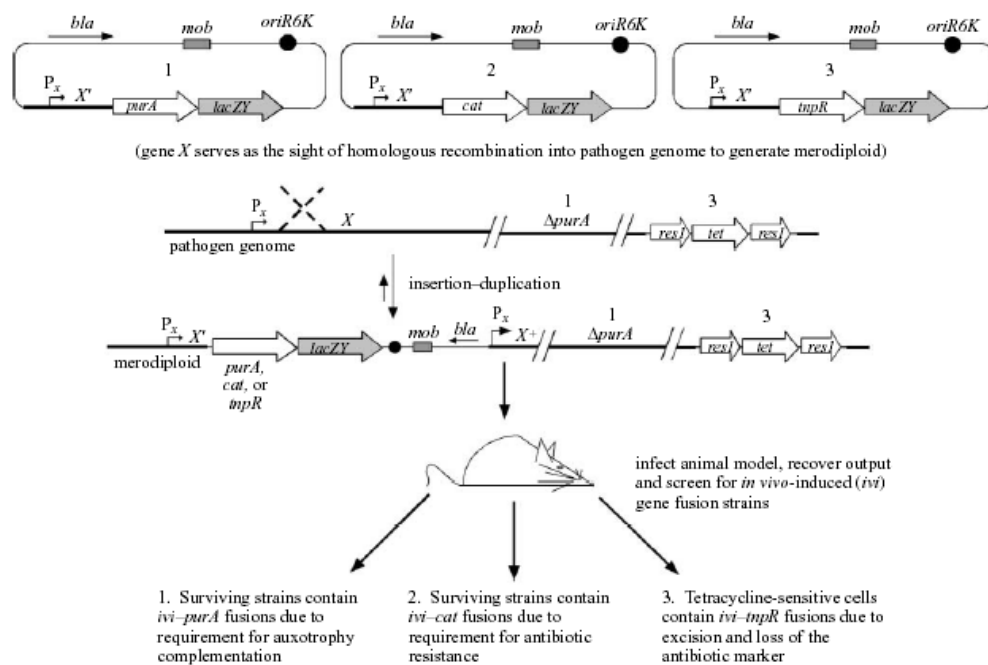




Figure 6 : Description schématique des trois variantes de l'IVET (Osbourn, Barber et al. 1987).

Grace à IVET, Fuller et *al.* (Fuller, Shea et al. 1999) ont criblé une banque de 2400 clones, en recherchant les promoteurs induits durant une infection expérimentale chez le porc. Dix loci ont été identifiés et séquencés, et six d'entre eux ont présenté une homologie significative avec des séquences de gènes connus. Ces gènes ont été appelés genes *ivi*, pour « *in vivo induced* ». Bien que la plupart de ces gènes soient impliqués dans les voies métaboliques, certains d'entre eux semblent jouer un rôle dans la virulence. Utilisant un milieu chimiquement connu, Wagner et Mulks (Wagner and Mulks 2006) ont montré que huit des dix gènes *ivi* (*iviG*, *iviI*, *iviP*, *iviS*, *iviU*, *iviX*, *iviY* et *iviI7g*), étaient surexprimés lorsque le milieu était dépourvu de BCAAs (Branched Chain Amino Acids). Lors d'une étude ultérieure, un gène présentant des similarités au gène *lrp* d'*E. coli*, et codant pour une « Leucine Responsive Protein » (Lrp), soit une protéine régulatrice répondant au niveau de leucine présent dans la cellule, a été cloné, séquencé et exprimé *in vitro* (Wagner and Mulks 2007).

La méthode **STM (Signature-Tagged Mutagenesis)** est une approche dite de sélection négative utilisée essentiellement pour identifier des gènes de virulence sur la base de la détection de mutations affectant la survie *in vivo* de la bactérie. Au cours d'une expérience de STM, une banque de mutants couvrant, généralement, la totalité du génome, est générée par insertion d'une banque de transposons portant chacun une séquence unique d'ADN permettant de distinguer les différents mutants les uns des autres. Par la suite, la banque de mutants est introduite dans le modèle d'infection puis au bout d'un certain temps, les bactéries sont récupérées du modèle animal (ou de l'hôte naturel). Des techniques d'hybridation sont alors utilisées pour comparer l'inoculum de départ et les bactéries récupérées du modèle d'infection, et on peut déterminer les signatures manquantes dans la fraction récupérée et donc les mutants qui n'ont pas eu de croissance dans le modèle d'infection.

Il est alors possible d'identifier les gènes mutés, c'est-à-dire les gènes absents de la fraction récupérée du modèle animal, grâce au transposon, marqué d'une signature et présent dans chacun des mutants (Figure 7).

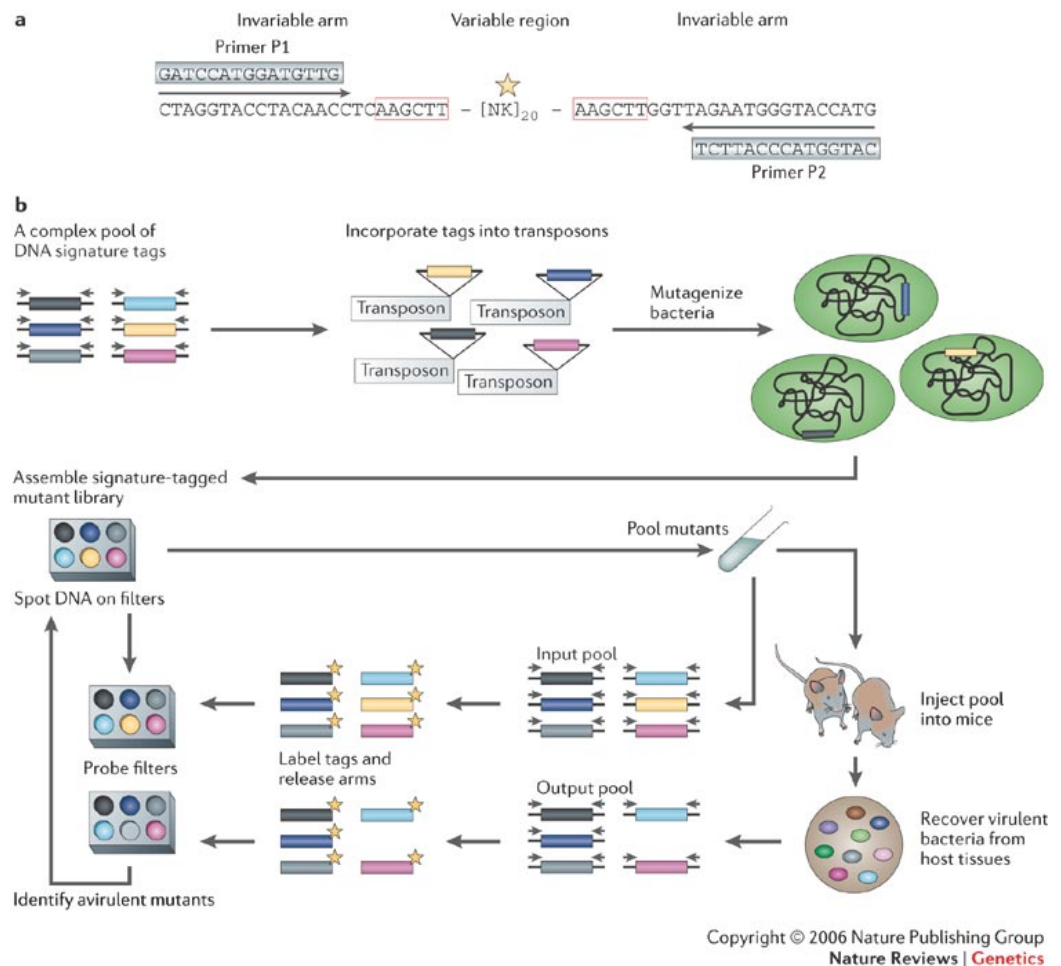


Figure 7 : Schéma récapitulatif de la méthode STM (Fuller, Kennedy et al. 2000).

La méthode STM permet d'identifier les gènes requis pour survivre et croître directement dans l'hôte, souvent en assignant une fonction au gène identifié durant ce procédé. C'est une technologie qui est beaucoup utilisée et elle a été appliquée jusqu'à maintenant à une grande variété d'organismes tels que : *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*. Dans chacun des cas, les gènes identifiés et impliqués dans la virulence auparavant ont été ré-identifiés, permettant de valider la méthode STM.

L'utilisation d'un tel système par Fuller, Sheehan et al. (Fuller, Kennedy et al. 2000), leur a permis de cribler un total de 2064 mutants possédant le transposon mini *Tn 5* lors d'une infection chez App. Alors que le système de (Sheehan et al. 2003) a permis de cribler un total de 800 mutants possédant le transposon mini *Tn10*. Les bactéries qui ont été retrouvées par lavage des poumons, lors de la première étude par la méthode STM chez *A. pleuropneumoniae* (Fuller, Thacker et al. 2000), et par

homogénéisation des poumons de porcs dans l'étude de (Sheehan et al. 2003). Des 105 mutants atténués ont été identifiés 55 gènes différents par la méthode de Sheehan et al. Certains gènes sont impliqués dans l'export de polysaccharides capsulaires, dans la biosynthèse du LPS et le transport du fer, qui sont considérés comme étant des gènes de virulence chez *A. pleuropneumoniae*, et seulement trois de ces gènes (*tig*, *pnp*, *apvD/macA*) avaient été identifiés auparavant par (Fuller et al. 2000). Onze des 55 mutants atténués ne poussent pas *in vitro*. *In vivo*, le CI (Competitivity Index) a été déterminé pour 14 mutants et 8 d'entre eux ont montré une atténuation élevée mais 6 mutants ne semblaient pas être atténués même si on ne retrouve pas ces mutants après le criblage *in vivo*. Cette observation est commune à d'autres études STM (Autret, Dubail et al. 2001) (Maroncle, Balestrino et al. 2002). Les auteurs pensent que ces mutants ont vraiment des effets subtils sur la virulence, effets qui ne sont pas observés en dose élevée ou dans des populations moins diversifiées.

La méthode **SCOTS (Selective Capture of Transcribed Sequences)** permet l'identification d'ADN complémentaires provenant des ARNm produits par les bactéries pathogènes (Marsh, 1999). Un des problèmes majeurs retrouvés dans la plupart des études de virulence bactérienne conduites *in vivo*, est l'isolement du matériel bactérien à partir d'échantillons mixtes d'éléments procaryotes et eucaryotes. SCOTS identifie les gènes potentiellement importants, plutôt que les régions promotrices, et n'est pas affecté par les effets polaires, générés par l'arrangement des gènes en opérons polycistroniques des procaryotes. SCOTS possède aussi l'avantage non négligeable de pouvoir déterminer l'expression différentielle à partir d'un très petit nombre de cellules bactériennes (Daigle, 2002). La technique SCOTS se base sur un système d'hybridation dans lequel l'ARN total d'une condition d'infection *in vivo* ou *in vitro* donnée, est convertie en ADN complémentaires spécifiquement marqués, par une amorce oligonucléotide contenant un monomère aléatoire à l'extrémité 3' et une séquence terminale définie (marquée) à l'extrémité 5'. En parallèle, l'ARN total provenant d'une condition de référence est inversement transcrit selon la même procédure mais avec une amorce marquée différemment. Le matériel provenant des deux conditions est ensuite regroupé afin d'éliminer les séquences qui ne sont pas spécifiques à la condition d'infection, et les séquences restantes sont ensuite récupérées, clonées et séquencées. Alternativement, le matériel récupéré des deux conditions peut être amplifié et ensuite hybridé à une biopuce

d'ADN afin de déterminer l'expression différentielle de tous les gènes du micro-organisme.

L'approche de SCOTS a été utilisée avec *A. pleuropneumoniae* : à l'aide de tissus pulmonaires porcins nécrosés récupérés lors d'une infection chronique de 7 jours, Baltes et al ont identifié 46 gènes, dont 20 avaient déjà été identifiés comme étant activés *in vivo* ou impliqués dans la virulence chez d'autres pathogènes (Baltes et al. 2007). Parmi les 20, il a été retrouvé les gènes codant pour: (i) la toxine ApxIV, (ii) le transporteur ABC putatif ApaA, et (iii) la TbpB qui est une petite sous-unité du récepteur de la transferrine. L'expérience a été répétée à partir d'échantillons de porcs suite à une infection chronique de 21 jours. Cette fois-ci 36 gènes ont été identifiés, dont 21 codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme. Trois gènes, codant pour le facteur d'élongation EF-Tu, une ubiquinone réductase et l'ARN polymérase B avaient été également identifiés dans la précédente étude SCOTS (Baltes, Tonpitak et al. 2001). On retrouve le gène *hlyX* codant pour un régulateur anaérobique global homologue à la protéine Fnr (fumarate and nitrate reduction) retrouvée chez *E.coli*, le gène *aasP* qui code pour la protéase sérine autotransporteuse. Ce gène a été également identifié par Deslandes et al (2007), à l'aide de biopuce en condition de restriction en fer, mais identifié sous le nom de *ssal*.

**Les biopuces à ADN**, aussi appelées *DNA chip*, *biochip*, *DNA-microarray* ou *microarray*, sont composées d'un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface comme du verre, du silicium ou du plastique. Cette technologie récente permet de quantifier le niveau d'expression des gènes transcrits dans une cellule d'un organisme, à un moment donné et dans une condition donnée. Les biopuces à ADN reposent sur la propriété que possède l'ADN dénaturé à se reformer en double hélice et à s'apparier avec son brin complémentaire. Afin d'identifier de nouvelles cibles pour l'élaboration de vaccins, Auger et al, ont étudié à l'aide d'une biopuce à ADN (AppChip1), le profil transcriptionnel d'*A. pleuropneumoniae* après croissance en présence de cellules épithéliales des voies respiratoires du porc (Auger et al. 2009). Le profil transcriptionnel d'*A. pleuropneumoniae* après croissance planctonique dans le milieu de culture au dessus de cellules épithéliales pulmonaires porcines ou suite à leur adhésion directe à ces cellules a permis d'identifier respectivement 170 et 131 gènes différemment

exprimés. Plusieurs gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans l'adhésion aux cellules de l'hôte ont été identifiés. Parmi ces gènes, *tadB* (tight adherence protein B) et *pgaBC*, impliqués dans la formation du biofilm, montrent une surexpression chez les bactéries adhérentes, alors que le gène codant pour l'adhésine auto-transporteur Hsf est surexprimé pendant la croissance planctonique. Le profil transcriptionnel d'App dans ces conditions permet d'identifier plusieurs gènes potentiellement impliqués dans les premières étapes de l'infection par *A. pleuropneumoniae*, et permettant ainsi d'élaborer de nouveaux vaccins qui pourraient prévenir les infections. Afin d'identifier les gènes impliqués dans la virulence et qui sont exprimés *in vivo*, Deslandes et al ont procédé à d'autres analyses de profil transcriptomique à l'aide d'une biopuce d'ADN après avoir récolté une souche pathogène du sérotype 5b d'un poumon de porc infecté (Deslandes, Denicourt et al. 2010). L'AppChip1, contient 1954 amplicons PCR, basées sur le génome d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5b souche L20, correspondant à plus de 92% des ORFs d'une longueur supérieur à 160 pb ([http://www.ibs-isb.nrc-cnrc.gc.ca/glycobiology/group\\_software\\_e.html](http://www.ibs-isb.nrc-cnrc.gc.ca/glycobiology/group_software_e.html)). L'AppChip2 contient 2033 amplicons PCR, basées sur le génome d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5b souche L20, correspondant à plus de 95% des ORFs d'une longueur supérieur à 160 pb (GEO Accession Number GPL 6658) (Gouré et al 2009).

Le profil transcriptomique d'*A. pleuropneumoniae* récupéré des poumons d'un porc naturellement infecté a permis d'effectuer une comparaison avec celui de la même souche après croissance dans un bouillon BHI. L'ARN total a été extrait des lésions pulmonaires grâce à une technique au phénol-acide chaud, permettant d'obtenir des rendements et une qualité d'ARN élevé, puis l'ARN eucaryote a été éliminé par la suite. Suivant ce protocole, tous les gènes ont présenté un signal détectable sur la biopuce. Leurs résultats suggèrent que le gène *apxIVA*, codant pour la sous-unité structurale de la toxine RTX ApxIV, est hautement surexprimé *in vivo*. Ces résultats obtenus combinés à d'autres résultats préalablement obtenus par génomique comparative (Gouré, Findlay et al. 2009), révèlent que 3 des 72 gènes surexprimés *in vivo* codent pour des lipoprotéines ou des protéines de la membrane externe, et qui sont conservés chez les 15 sérotypes. Les produits de ces gènes représentent des candidats potentiels pour le développement d'un vaccin offrant une protection croisée contre la pleuropneumonie porcine.

## IV. LES BIOFILMS

### 4.1 Généralités

La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des micro-organismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile, est un processus dynamique et complexe. Il est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotypes des micro-organismes concernés : les mêmes individus ne possèdent plus les mêmes propriétés ni les mêmes fonctions. L'environnement particulier du biofilm permet aux cellules de coopérer et d'interagir de manière différente que sous forme planctonique. Ainsi, les bactéries vivant en biofilm ont des propriétés sensiblement différentes de celles des bactéries planctoniques de la même espèce. L'activation de nombreux groupes de gènes ( $10^3$ ) en quelques minutes régule cette permutation de mode de vie (Costerton 1999). Les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie commencent tout juste à être identifiés et compris (Goller and Romeo 2008). Les micro-organismes d'un biofilm disposent de mécanismes originaux pour s'attacher de façon réversible à une surface, y adhérer et former une communauté. Un véritable écosystème va se former, puis se détacher sous l'influence de divers facteurs environnementaux (Donlan 2002). Les moyens utilisés par les bactéries pour former des biofilms diffèrent selon les espèces considérées, mais on peut définir trois propriétés communes à tous les biofilms (Goller and Romeo 2008):

- ❖ Les cellules constituant le biofilm sont reliées entre elles par une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques;
- ❖ Le développement d'un biofilm est sous l'influence de signaux extracellulaires (environnementaux) et cellulaires (notion de quorum sensing);
- ❖ Le biofilm protège les bactéries qui le constituent de l'action des agents antimicrobiens, des défenses immunitaires de l'hôte et d'éventuels prédateurs.

On va tout d'abord s'intéresser aux différentes étapes de formation d'un biofilm.

## 4.2 Les différentes étapes de formation d'un biofilm

Dans la littérature plusieurs modèles ont été proposés pour schématiser les étapes de développement ou de cycle de vie de biofilm (<http://www.biofilm.montana.edu>). En général, les *Pseudomonas* font partie des microorganismes les plus souvent utilisés pour démontrer les 5 étapes de formation du biofilm, accompagnés d'images prises en microscopie confocale représentant chaque étape. Les bactéries adhèrent aux différents types de substrat, ensuite elles commencent à se multiplier et à émettre des signaux chimiques. Au moment où la concentration de ces signaux atteint un seuil donné, les mécanismes génétiques permettent la production d'exopolysaccharides s'activent. Ainsi les bactéries se multiplient dans une matrice d'exopolysaccharides, ce qui donne lieu à la formation d'une microcolonie. Une fois que les bactéries sont fermement attachées, elles produisent un biofilm structuré à partir duquel, certaines bactéries vont être libérées et peuvent retourner à l'étape initiale (Figure 8).

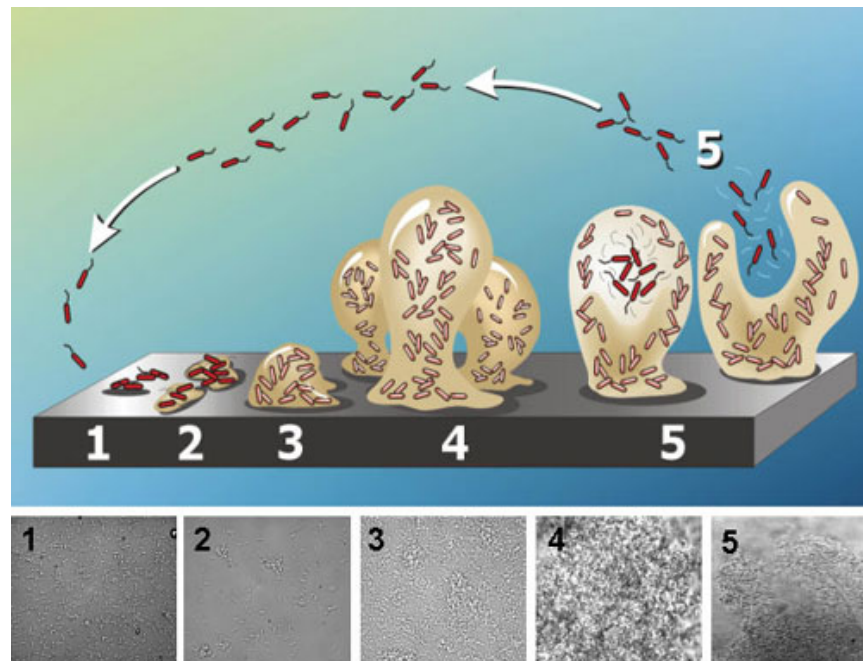


Figure 8: Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm. Étape 1 : adhésion initiale (réversible); étape 2 : adhésion permanente (irréversible); étape 3 : formation de la micro-colonie et sécrétion de la matrice extracellulaire ; étape 4: maturation du biofilm et étape 5 : dispersion de cellules. Les images (1 à 5) montrent la croissance du biofilm en microscopie confocale.

### Adhésion primaire réversible et non spécifique à une surface

Cette étape permet la transition de l'état planctonique à l'état sessile (Fig.8, étape1). Les bactéries colonisent des tissus vivants, elles utilisent des mécanismes

d'adhésion pour éviter d'être décrochées avec les flux naturels du mucus nasal ou vaginal et le flux de la nourriture ou par des forces mécaniques, telles que la mastication ou le péristaltisme intestinal. La nature et les propriétés de la surface sur laquelle les bactéries vont adhérer, sont des facteurs déterminants dans l'adhésion. En général, l'adhésion est favorisée lorsque que la surface de contact possède une rugosité élevée (Arnold and Bailey 2000; Jones, Morgan et al. 2001).

L'hydrophobicité des cellules et de la surface de contact est associée à l'adhésion initiale (Busscher, Weerkamp et al. 1984). L'effet de l'hydrophobicité peut varier en fonction de trois composants étudiés : l'organisme, le milieu, et la surface. L'hydrophobicité des bactéries, variable selon les espèces et l'état physiologique des bactéries concernées, par les substances polymériques extracellulaires produites par celle-ci (Van der Mei 1998). En général, l'hydrophobicité est associée à la présence de structures à la surface des cellules comme les flagelles, pili, lipopolysaccharides et bien d'autres, variant d'une espèce à une autre, de l'état physiologique des cellules et des conditions environnementales.

La charge électrostatique peut également jouer un rôle dans l'attachement des bactéries à une surface (Van der Mei 2001). Sachant que les cellules bactériennes et les surfaces sont entourées d'une couche ionique négative, la superposition de celle-ci conduit à une répulsion électrostatique.

Certaines structures de surface telle que les adhésines (récepteur pour la fibronectine de *Staphylococcus*) prennent part normalement à l'adhérence initiale aux épithéliums. De fait, il a été décrit des mécanismes d'adhérence semblables pour presque toutes les espèces bactériennes. Ces adhésines et fimbriae sont cependant "dangereuses" pour la bactérie parce que leur "caractère adhésif" les rend facilement reconnaissables par les phagocytes circulants et elles sont, donc, rapidement éliminées.

Chez *E. coli*, il a également été montré que des structures extracellulaires comme les fimbriae (Pratt and Kolter 1998) et les « curli » (Prigent-Combaret, Brombacher et al. 2001) sont également importantes lors de la formation du biofilm. Il existe aussi chez cette bactérie, un système de signalisation Cpx mais les modes de fonctionnement ne sont pas encore connus (Goller and Romeo 2008). En utilisant le type de criblage décrit par O'Toole et Kolter 1998, mais en modifiant légèrement les conditions de croissance, il a été identifié chez *P. aeruginosa* de nouveaux facteurs d'attachement (Vallet, Olson et al. 2001). En effet, des mutations dans les gènes,



appelés *cupA* (pour *chaperone usher pathway*) empêchent l'attachement au plastique. La voie *chaperone usher pathway* permet l'assemblage de fimbriae (type I), qui sont essentiels à l'adhérence des *E. coli* uropathogènes (Sauer, Barnhart et al. 2000). Le flagelle, les pili de type IV ou encore les Cup sont donc des structures de surface, essentielles à la formation du biofilm, plus particulièrement dans sa phase initiale. Il a été démontré que le flagelle et les pili de type IV permettent l'approche et la colonisation de la surface. Les gènes codant pour les caractères de motilité (synthèse de flagelle, motilité, chimiotactisme...) sont inhibés une fois que les bactéries se sont fixées à la surface (Prigent- Combaret C 1999). Par la suite, ces structures laissent la place à d'autres déterminants qui vont permettre la structuration et la différenciation en biofilm.

Certaines caractéristiques du milieu environnant vont également avoir un rôle à jouer dans l'étape initiale d'adhésion. Il a été démontré dans diverses études que le pH et la force ionique du milieu ont une influence sur l'attachement aux surfaces inertes. *P. aeruginosa* montre un attachement maximal à pH neutre et à une force ionique faible (Busalmen and de Sanchez 2001). Certains cations ( $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) peuvent également favoriser l'attachement de *P. fluorescens* aux surfaces abiotiques (Fletcher 1988) (O'toole 1998 b).

La formation d'un film de conditionnement à la surface du support par l'adsorption d'éléments nutritifs du milieu va également intervenir dans les tous premiers instants de la rencontre entre la cellule et la surface et influencer son adhésion. Cette étape est suivie par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface.

### **Adhésion permanente irréversible et spécifique à une surface**

Plusieurs facteurs sont responsables de cette adhésion irréversible. Parmi ceux-ci, il y a la formation de micro-colonies. Une micro-colonie consiste en un petit agrégat de cellules associées à une surface (O'Toole and Kolter 1998 a), (Sauer and Camper 2001). La formation de micro-colonies est assurée par la présence de certains types de pili (Tfp) à la surface de la bactérie. Ces pili vont permettre une certaine forme de mouvement en saccades (*twitching motility*, retrouvé chez les bactéries du genre *Pseudomonas*) des cellules à la surface faisant intervenir un mécanisme d'extension, d'attachement et de rétraction des pili et qui rendra possible l'agglomération des cellules et la formation de micro-colonies (Merz, So et al. 2000).

L'attachement irréversible est généralement l'étape où les cellules se départissent de leurs flagelles et adoptent le phénotype de mouvement en saccades (*twitching motility*) (Sauer and Camper 2001). Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont particulièrement été associées au mouvement en saccades Tfp-dépendant et à la formation de micro-colonies. Il a été démontré que des cellules mutantes de *P. aeruginosa* et *P. putida* dépourvues de pili Tfp sont capables d'association avec la surface sous forme d'une mono-couche mais sont incapables de former des micro-colonies et de développer un biofilm normal. *Pseudomonas aeruginosa* constitue un exemple éloquent de ce phénomène faisant intervenir les pili de type IV (Tfp). Chez *P. aeruginosa*, la production de pili est régulée par des signaux nutritionnels par l'intermédiaire des changements au niveau du Crc (*Catabolic repression control*) aussi responsable de la régulation des gènes de biosynthèse de l'alginate et de la dérégulation des gènes de synthèse flagellaire (O'Toole, Gibbs et al. 2000). Le mouvement en saccades des cellules associé aux pili de type IV et conséquemment la formation de micro-colonies, sont aussi responsables chez *P. aeruginosa* de l'architecture tri-dimensionnelle du biofilm qui, une fois mature, prend la forme d'un champignon. Cette structure sous forme de champignon est entourée de canaux pouvant laisser passer librement les éléments nutritifs et l'oxygène donnant ainsi accès à ces éléments aux cellules enfouies profondément dans le biofilm. La formation de micro-colonies permet donc de focaliser la croissance des cellules à de multiples endroits de la surface et d'accroître l'adhésion avec celle-ci jusqu'à recouvrir entièrement la surface. En plus de la formation des micro-colonies, les cellules à cette étape-ci vont commencer à produire un polymère extracellulaire (EPS) qui va les ancrer à la surface et conduire à l'attachement irréversible. La production d'EPS peut être contrôlée par 30 gènes induits par le contact des cellules avec la surface. Par exemple, les gènes responsables de la biosynthèse de l'alginate chez *P. aeruginosa* peuvent être induits suite à l'attachement (Boyd 1995). On estime d'ailleurs que la régulation positive des gènes pour la production d'alginate par *P. aeruginosa* surviendrait après 15 minutes seulement suivant l'attachement initial dans un système de culture en continu (Davies and Geesey 1995).

De nombreux nutriments sont immobilisés au niveau du biofilm et attirent les bactéries. Toutefois la matrice extracellulaire qui est sécrétée demeure un facteur

important, bien que jusqu'ici partiellement inconnu (Kodjikian, Burillon et al. 2003). L'adhérence spécifique due aux fimbriae est basée sur l'interaction des structures protéiques, mais elle est néanmoins considérée comme irréversible. La seconde phase du processus d'adhérence de *S. epidermidis* est plus prolongée et médiée par la production bactérienne d'un glycocalyx polysaccharidique (Intraocular Lens) (Griffiths, Elliot et al. 1989) et par l'expression d'un autre antigène appelé l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) (Pinna, Sechi et al. 2000). L'épaisseur du biofilm peut varier de quelques  $\mu\text{m}$  à quelques mm (Carpentier and Cerf 1993). Il faut ainsi plusieurs heures pour que le biofilm devienne mature avec une colonisation complète de la surface (Pinna, Sechi et al. 2000).

Le pili de conjugaison intervient lors du contact initial avec la surface et lors de la maturation du biofilm. Il jouera un rôle de stabilisation dans la structure du biofilm (Beloin, Roux et al. 2008). L'utilisation des pili de conjugaison met un terme à une mobilité désorganisée des bactéries et permet des interactions stables. L'attachement devient donc irréversible (O'Toole and Kolter 1998 a).

Certaines bactéries expriment à leur surface des molécules spécifiques intervenant lors de leur fixation à un substrat, différentes molécules d'adhésion fréquemment rencontrées et citées précédemment. Prenons l'exemple des souches d'*E.coli* responsables d'infections du tractus urinaires suite à la colonisation de sondes urinaires. Soixante pour-cent de ces souches uropathogènes d'*E.coli*, appelées aussi UPEC, expriment à leur surface une adhésine Ag43. Il s'agit d'un facteur protéique intervenant dans les phénomènes d'auto-aggrégation cellulaire. Ag43 intervient dans les contacts cellule-substrat et cellule-cellule et est exprimée de façon importante durant le mode de vie sous forme de biofilms (Schembri, Kjaergaard et al. 2003).

### **Formation de la micro-colonies et sécrétion de la matrice extracellulaire EPS**

Les micro-organismes se divisent, commençant ainsi des microcolonies. À partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les microcolonies commencent la sécrétion de la matrice extracellulaire. La capacité de certaines bactéries à Gram positif et négatif à former des biofilms, a fait l'objet de nombreuses études. Voici un aperçu des avancées les plus pertinentes à ce sujet.

Dans une autre étude basée sur la microscopie électronique à balayage, il a été montré que les bactéries sont englobées dans un matériel adhésif et mucoïde à la

surface de l'IOL (Lentille Intraoculaire) (Kodjikian, Burillon et al. 2003). La rupture de cette couche mucoïde par l'impact du faisceau d'électrons produits au cours de l'examen met clairement en évidence que ce matériel gélatineux entoure les bactéries et les microcolonies bactériennes en globalité expliquant ainsi pourquoi les bactéries s'accumulent à la surface de l'IOL sous cette forme. Selon l'espèce impliquée, une microcolonie peut se composer de 10 % à 25 % de cellules bactériennes et de 75 % à 90 % de matrice exopolysaccharidique (Costerton 1999). Le biofilm est connu pour être composé de multicouches de microcolonies bactériennes englobées dans le biofilm (Mack, Riedewald et al. 1999).

L'adhésine polysaccharidique intracellulaire (PIA) contrôle l'adhérence intercellulaire et est ainsi responsable de l'accumulation des bactéries en microcolonies et de la maturation du biofilm (McKenney, Hubner et al. 1998) (Mack, Riedewald et al. 1999). Lors d'une étude sur 179 souches de *S. epidermidis*, une corrélation positive significative a été mise en évidence entre la capacité de production de biofilm et l'expression de PIA : 86,8 % des souches de *S. epidermidis* productrices de biofilm exprimaient PIA (Mack 1999). En revanche, dans la même étude, 88,6 % des souches ne produisant pas de biofilm n'exprimaient pas PIA qui semble ainsi essentiel dans la formation du biofilm par *S. epidermidis*. L'expression de ces deux adhésines (PS/A et PIA) est codée par le locus *ica* (« IntraCellular Adhesin »). Celui-ci est composé de l'opéron *ica* ACDB et du gène *ica* R qui joue un rôle dans la régulation de l'opéron *ica* ACDB, en tant que répresseur (Gotz 2002). Cet opéron contrôle l'expression de quatre protéines indispensables à la synthèse des adhésines. Il est très fréquemment isolé du génome de souches multirésistantes de *S. epidermidis* à l'origine d'infections liées à la présence d'implants, mais ne se retrouve que rarement dans celui des souches saprophytes de la peau et des muqueuses (Ziebuhr, Heilmann et al. 1997). Ainsi, la recherche du locus *ica* par méthode PCR a été proposée comme facteur prédictif de la virulence d'une souche (Kodjikian, Burillon et al. 2003). La présence du locus *ica* ne semble pas absolument indispensable à la bactérie pour produire un biofilm (Cho, Naber et al. 2002) et Gelosia *et al.* (Gelosia, Baldassarri et al. 2001) ont mis en évidence une souche de *S. epidermidis* *ica*-négative capable de former un biofilm. D'autres molécules bactériennes interviennent donc dans ce processus. L'autolysine AtlE codée par le gène *atlE*, la protéine Bap (« biofilm-associated protein »), la protéine AAP (« accumulation-associated protein »), la protéine SSP1, qui intervient par exemple

dans l'adhésion de *S. epidermidis* 354 au polystyrène, sont les molécules les plus fréquemment citées (Gotz 2002), (Heilmann, Hussain et al. 1997), (Veenstra, Cremers et al. 1996).

Récemment, Greenberg et ses collaborateurs (Whiteley, Banger et al. 2001) ont réalisé une étude visant à déterminer la variation de l'expression des gènes chez des bactéries organisées en biofilm par rapport à des bactéries planctoniques grâce à l'utilisation de puces à ADN du génome de *P. aeruginosa*. Cette étude montre, entre autres, que l'expression des gènes codant pour PilA, la sous-unité structurale du pilus de type IV, FliC, la sous-unité structurale du flagelle, et CupA1, une sous-unité de type fimbriae, diminue la structure du biofilm. Cela confirme que ces structures ne sont pas nécessaires au maintien du biofilm, une fois le développement débuté.

### **Maturation du biofilm**

Le biofilm grandit et mûrit, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en conditions optimale, c'est une étape déterminante dans la différenciation des biofilms. Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation. La maturation du biofilm est divisée en deux phases (Clutterbuck, 2007). La première phase est marquée par des régulations de gènes importantes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elle concerne essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support (Sauer, 2002). La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm. L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (Clutterbuck, 2007). Soixante-dix gènes subiraient des modifications au cours de la maturation d'un biofilm (Whiteley, 2001).

La communication inter-cellulaire (*quorum sensing*) est également indispensable pour la formation et la maturation du biofilm ((Davies, Parsek et al. 1998) (Juhas, Eberl et al. 2005)). La mise en évidence du système de communication inter-cellulaire à l'intérieur du biofilm illustre bien le niveau de complexité de ce micro-environnement qui le distingue du mode de croissance planctonique. Un exemple du système de communication inter-cellulaire basé sur le modèle de *P. aeruginosa* est présenté au paragraphe 4.5 (Miller and Bassler 2001).

### **Dispersion des bactéries**

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion : des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm. Cette dernière étape se produit lors du vieillissement du biofilm, ou de certains stress ou carences, les micro-organismes peuvent activement se séparer du biofilm, parfois consommant la matrice qui représente une source d'énergie. Les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités: on parle d'«érosion» du biofilm. Mais on peut assister aussi à un détachement massif et rapide, « en lambeaux », de quantités importantes de bactéries, appelé «sloughing». Cette étape du développement du biofilm a été relativement peu étudiée jusqu'à présent. Selon Stoodley *et al.* (2001), le détachement des cellules du biofilm peut survenir sous différentes conditions d'écoulement du fluide environnant. Pour *P. fluorescens*, la dispersion des cellules du biofilm mature serait aussi liée à la privation en certains nutriments et à la perte de polymère extracellulaire possiblement sous contrôle enzymatique (lyase) (Allison, Ruiz *et al.* 1998). Davey, Caiazza *et al.* (2003) rapportent également la production de biosurfactants (rhamnolipides) par *P. aeruginosa* qui pourraient favoriser la dispersion des cellules de la matrice du biofilm. Selon l'hypothèse de Stoodley, Sauer *et al.* (2002), la dispersion des cellules du biofilm mature pourrait aussi être sous l'influence du système de communication *inter-cellulaire* où une augmentation de la concentration en molécules inductrices serait responsable de la régulation de la production d'enzymes de dégradation de la matrice d'EPS.

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance. En effet, les bactéries planctoniques essaimant d'un biofilm sont capables de résister aux défenses immunes de l'hôte et être à l'origine d'une infection (Donlan 2002). Par exemple, les bactéries planctoniques qui essaient à partir de prothèses et d'implants médicaux sont capables de survivre à la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles et d'engendrer une infection systémique (Clutterbuck, Cochrane *et al.* 2007). Il a également été montré qu'une enzyme telle que la dispersine B était capable de défaire le biofilm chez *A. pleuropneumoniae* (Izano, Wang *et al.* 2007). Ces micro-organismes retournent à l'état de libre circulation et peuvent aller coloniser de

nouvelles surfaces ou fluides et causer différents problèmes tant au niveau médical que industriel, complétant ainsi le cycle de formation du biofilm.

#### **4.3 Facteurs favorisant la formation de Biofilm**

L'attachement des micro-organismes à une surface est un processus complexe, prenant en compte un grand nombre de variables (Donlan and Costerton 2002):

- ❖ Propriétés des surfaces : Texture, rugosité, présence d'aspérités, hydrophobicité et la présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface;
- ❖ Propriétés du milieu aqueux environant : Vitesse du flux, présence d'un flux laminaire ou non, pH, température, cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ...), le fer, les nutriments, sources de carbone disponibles, disponibilité du milieu en oxygène et la présence d'agents antimicrobiens;
- ❖ Propriétés des cellules : Hydrophobicité de la surface des cellules, présence de fimbriae, de flagelles et rôles des exopolysaccharides.

De manière générale, l'attachement a lieu préférentiellement sur des surfaces rugueuses (présence d'aspérités), hydrophobes et préalablement recouvertes d'un film protéique. Une augmentation de la vitesse du flux, de la température du liquide ou de la concentration en nutriments peut aussi entraîner une augmentation de la fixation des bactéries à une surface, à condition que ces facteurs n'excèdent pas une valeur critique (Donlan and Costerton 2002). De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes. Ainsi, le type de biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms (Clutterbuck, Woods et al. 2007).

#### **Propriétés des bactéries**

L'hydrophobicité de la surface de la bactérie, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae,

polysaccharides... Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan and Costerton 2002).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (il y a stimulation de la synthèse si s'il y a un déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*E. coli*) et par les conditions environnementales (il n'y a pas de synthèse si pH bas, température basse ou forte osmolarité) (Goller and Romeo 2008). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes: faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate et fer; microaérophilie et croissance ralentie (Goller and Romeo 2008).

#### **4.4 Les facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm**

Les mécanismes d'attachement et de détachement d'un biofilm sont étroitement liés puisque les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement (Spormann 2008). Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans le détachement du biofilm et la dispersion de bactéries sous forme planctonique. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- l'action mécanique exercée par un flux de liquide ;
- l'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple;
- la lyse de cellules du biofilm par l'EDTA, le NaCl, le CaCl<sub>2</sub>, ou encore des agents chélateurs (Spormann 2008);
- l'action de facteurs de détachements : surfactants ou enzymes dégradant la matrice (Otto 2008).

La dispersion d'un biofilm peut aussi être initiée par des changements environnementaux : limitation en oxygène ou en nutriments (Spormann, 2008), modification du pH ou présence de certains composés spécifiques (Gjermansen,



Ragas et al. 2005). La dispersion des biofilms de *P. aeruginosa* est la plus étudiée (Goller, 2008). Pour ces derniers, une augmentation de la concentration en carbone, citrate, glutamate ou glucose, entraîne un détachement massif de plus de 80% des cellules constituant le biofilm (Sauer, 2004). Les conditions environnementales, notamment la privation en oxygène, jouent un rôle très important dans le déclenchement de la dispersion des biofilms (Thormann, Duttler et al. 2006).

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes utilisent la communication intercellulaire par des signaux de cellules à cellules, indispensable à la formation de biofilm. La mise en évidence d'un tel système illustre bien la complexité de ce microenvironnement, jouent un rôle important dans le développement et la régulation des biofilms.

#### **4.5 Le Quorum Sensing : régulation de la formation des biofilms**

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing. Il s'agit de mécanismes de contrôle ayant lieu au sein des cellules, optimisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quorum. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (Costerton 1999) (Tomlin, Malott et al. 2005). Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (Costerton 1999) (Clutterbuck, Cochrane et al. 2007) (Irie and Parsek 2008). Des mutations de gènes impliqués dans les mécanismes de quorum sensing entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome et du protéome, avec un contrôle de l'expression de facteurs de virulence comme les protéases par exemple (Tomlin, Malott et al. 2005).

#### **Les molécules impliquées dans le quorum sensing**

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries (Parsek and Fuqua 2004) (Irie and Parsek 2008). En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram-négatives. La majorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides auto-inducteurs, dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du quorum sensing sont dégradées par des enzymes : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par

conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (Irie and Parsek 2008). Le système de communication inter-cellulaire, le plus connu est retrouvé, chez *P. aeruginosa* est utilisé afin de réguler une grande variété de gènes.

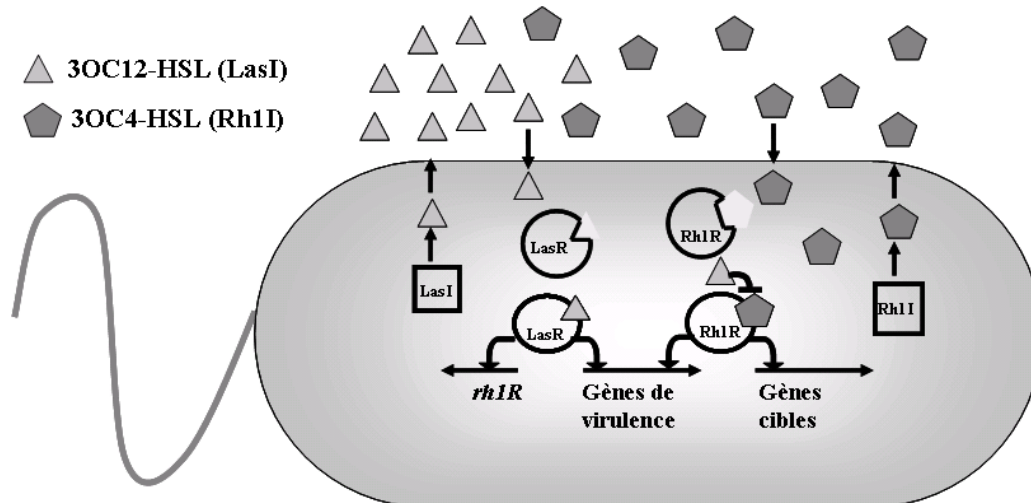


Figure 9. Le système fonctionne par paire auto-inducteur/détecteur chez *P. aeruginosa*. La protéine LasI produit la molécule auto-inductrice *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone [triangles] et la protéine RhII synthétise la molécule auto-inductrice *N*-(butyryl)-homoserine lactone [pentagones]. L'activateur transcriptionnel LasR se lie à l'auto-inducteur LasI dépendant quand cette molécule signal atteint une concentration critique. Le complexe LasR–auto-inducteur se fixe aux régions promotrices d'une variété de facteurs de virulence et stimule leur transcription. De plus, le complexe LasR–auto-inducteur induit la transcription de *rhIR* pour initier un 2ème circuit de *quorum sensing*. RhIR fixé à l'auto-inducteur RhII-dépendant active la transcription d'une partie des gènes de virulence aussi activé par LasR en plus d'autres gènes cibles non régulés par LasR. L'auto-inducteur LasI-dépendant interfère avec la fixation entre RhII et son autoinducteur. Sans doute, cette action assure que le circuit LasI/LasR est établi prioritairement au circuit RhII/RhIR. La quinolone signal de *Pseudomonas* (PQS) assure également la régulation entre les circuits Las et RhI.

### Rôle du quorum sensing

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm. Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie and Parsek 2008). Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm (Clutterbuck, Cochrane et al. 2007). Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (Clutterbuck, Cochrane et al. 2007) (Irie and Parsek 2008). Le quorum

sensing jouerait un rôle dans l'établissement d'antibiorésistances, mais cette hypothèse reste controversée. Les molécules du quorum sensing jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires (exemple de *Serratia marcescens*) (Queck, Weitere et al. 2006). Les biofilms composés de plusieurs communautés de bactéries d'espèces différentes ont de fortes concentrations en molécules du quorum sensing, compte-tenu de la densité élevée de cellules présentes (Bjarnsholt, Jensen et al. 2005).

### **L'altération du quorum sensing**

L'altération des mécanismes de quorum sensing peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (Irie and Parsek 2008). Les biofilms mutants pour les molécules du quorum sensing ont une structure tridimensionnelle déficiente (Tomlin, Malott et al. 2005). Des biofilms de *P. aeruginosa* mutantes pour les molécules du quorum sensing sont moins résistants à l'action de la tobramycine, du peroxyde d'hydrogène et des macrophages (Burmolle, Webb et al. 2006).

### **4.6 Les autres mécanismes régulateurs de la formation de biofilms par les polysaccharides, le GMP-c et par l'acétyl phosphate et l'alarmone**

Les polysaccharides présents à la surface des cellules jouent un rôle important dans les interactions entre bactéries et leur environnement immédiat. Par exemple, on trouve à la surface d'*E. coli* l'antigène du lipopolysaccharide O (LPS) et l'antigène polysaccharidique de capsule K. Les lipopolysaccharides, appelés aussi endotoxines, font partie de la paroi des bactéries Gram-négatives. Ils peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilms selon les cas. Les polysaccharides des capsules sont des facteurs de virulence; ils protègent les bactéries des défenses immunitaires de l'hôte (phagocytose et activation du complément) (Beloin, Roux et al. 2008). Trois polymères synthétisés par *E. coli* et faisant partie de la matrice ont un rôle important dans la formation d'un biofilm et dans l'expression de facteurs de virulence; il s'agit de la cellulose, de l'acide colanique (polymère chargé composé de glucose, galactose, fucose et acide glucuronique) et du PGA ( $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine). La synthèse d'acide colanique peut être induite par des concentrations d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, proches des concentrations létales ;

l'acide colanique forme une capsule. Il en résulte une exacerbation de la formation et de la persistance d'un biofilm face à des agents anti-microbiens (Sailer, Meberg et al. 2003).

Le c-di-GMP, est un régulateur central du mode de vie sous forme de biofilms et de l'expression de facteurs de virulence. Le c-di-GMP est un second messager, intervenant dans des cascades de phosphorylation et modulant l'expression de certains gènes des bactéries du biofilm, impliqués dans les mécanismes de formation du biofilm et dans l'expression de la virulence. La transformation du GTP en GMP-c par la diguanylate cyclase est activée par des signaux extracellulaires, différents selon les bactéries concernées. Lorsque la quantité de GMP-c augmente au sein de la cellule, la quantité de protéines jouant un rôle de facteurs de virulence augmente (Cotter and Stibitz 2007).

Récemment, de petites molécules intervenant dans la régulation de la formation d'un biofilm selon les conditions nutritionnelles du milieu ont été identifiées. Il s'agit de l'acétyl phosphate et de l'alarmone. L'acétyl phosphate s'accumule dans le milieu intracellulaire lorsque la concentration en source carbonée augmente et/ou lorsque la concentration en oxygène est basse (Wolfe, Chang et al. 2003). L'alarmone est molécule signal intracellulaire qui s'accumule lorsque les concentrations en nutriments sont très basses : elle induit une cascade enzymatique aboutissant à la régulation de l'expression de gènes, notamment de gènes codant pour des fimbriae de type I. L'action de cette molécule va permettre d'augmenter la probabilité de survie des bactéries dans des milieux stressants (Beloin, Roux et al. 2008).

Le mode de vie sous forme de biofilms protège les micro-organismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques, synergies entre micro-organismes, expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress...

#### **4.7 Les Biofilms dans leur environnement**

Les études menées sur les biofilms ces dernières années ont permis d'établir l'existence de changements radicaux dans l'expression génétique et les phénotypes entre les formes planctonique et individuelle, à fixe et communautaire. Ces changements permettent d'expliquer l'adaptation des biofilms à des conditions environnementales stressantes et l'acquisition d'avantages évolutifs (Clutterbuck,

Cochrane et al. 2007) (Goller and Romeo 2008). Par exemple, les micro-organismes au sein des biofilms sont plus résistants à la réponse immunitaire de l'hôte et aux agents antibactériens que leurs congénères vivant sous forme planctonique (Clutterbuck, Cochrane et al. 2007). Néanmoins, on commence tout juste à comprendre et à identifier les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie (Goller and Romeo 2008). On va s'intéresser dans la partie qui va suivre aux différents avantages conférés par le mode de vie sous forme de biofilms. On distingue tout d'abord des avantages métaboliques.

**Protection passive :** par sa simple présence cette matrice protège les cellules dans un rôle de simple barrière physique contre l'entrée des agents antimicrobiens, détergents et antibiotiques (Costerton 2001) (O'Toole, Pratt et al. 1999); la matrice extracellulaire dense et la couche externe de cellules protègent l'intérieur de la communauté.

**Protection métabolique :** autre facteur de résistance accrue: pour des raisons qui restent à déterminer les bactéries entourées de biofilm sont moins actives métaboliquement, donc moins réceptives aux agents antimicrobiens (Drenkard 2003) et aux perturbations environnementales (O'Toole, Pratt et al. 1999).

**Protection active :** la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques permet d'éliminer activement les composants antimicrobiens (Aeschlimann 2003) (De Kievit, Parkins et al. 2001) (De Kievit, Parkins et al. 2001). Certains biofilms contiennent des canaux aqueux permettant la distribution de nutriments et l'internalisation de molécules de signalisation, établissant la communication entre cellules par des signaux biochimiques. La formation de biofilm est contrôlée par des signaux de cellule-à-cellule, et des mécanismes de quorum sensing (Davies, Parsek et al. 1998) (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004) (Mah, Pitts et al. 2003) (Parsek and Singh 2003) (Smith and Iglewski 2003).

**Protection génétique :** la résistance aux antibiotiques peut être exponentiellement multipliée. En effet, lors de leur implantation dans un biofilm l'expression génétique des bactéries est modifiée.

### **Les biofilms et les conditions environnementales**

A partir d'isolats pulmonaires fortement muqueux de *P. aeruginosa*, il a été démontré que l'alginate, polysaccharide obtenu à partir des algues, joue également un rôle dans la formation de biofilm. Contrairement aux flagelles et aux pili,

l'expression de *algC* est augmentée d'un facteur quatre en présence d'un biofilm (Garrett, Perlegas et al. 1999). Il est également intéressant de constater que le facteur sigma alternatif  $\sigma$ , ou AlgT, contrôle positivement la production d'alginate alors qu'il contrôle négativement la synthèse du flagelle (Garrett, Perlegas et al. 1999). Dans le cas d'*E. coli*, c'est l'acide colanique qui constitue l'enveloppe muqueuse du biofilm et la production est augmentée lors de l'attachement. Des études menées sur des biofilms d'*E. coli*, de *Vibrio cholerae* et de *P. aeruginosa* ont permis de montrer l'importance du rôle d'un facteur, le facteur  $\sigma$  RpoS, dans la réponse des communautés microbiennes organisées en biofilms dans des situations de stress (Spormann 2008). Certaines conditions environnementales engendrant un stress pour les cellules (stress oxydatif, irradiation UV, hautes températures, hyper-osmolarité, baisse importante du pH, manque de source carbonée...) entraînent des modifications de l'expression du génome. Lors d'un stress, il y a activation du facteur  $\sigma$  RpoS, qui va stimuler la réponse au stress par un ensemble de modifications du métabolisme des cellules (Spormann 2008). L'intégration de l'ensemble des stress auxquels sont soumises les cellules par le facteur RpoS va ainsi engendrer des modifications phénotypiques importantes du biofilm, dont l'acquisition d'une antibiorésistance (Spormann 2008)..

D'autres facteurs sont certainement impliqués dans la formation du biofilm, notamment parce que la formation de ces structures peut répondre à de nombreux facteurs environnementaux et donc être spécifique dans des conditions de croissance déterminées. On sait maintenant que *Crc* (*catabolite repression control*) de *P. aeruginosa*, qui réprime le métabolisme des hydrates de carbone en présence d'intermédiaires du cycle de Krebs (pyruvate, succinate), semble appartenir à une voie de signalisation qui contrôle la formation du biofilm. Celle-ci est en effet déficiente chez les mutants *crc* (O'Toole, Gibbs et al. 2000). La mutation *crc* aboutit, entre autres, à un défaut de formation des pili de type IV qui peut expliquer l'incapacité à développer un biofilm.

La mise en évidence de réseaux de régulation complexes impliqués dans l'attachement des bactéries à une surface, et dans la différenciation en biofilm, pourrait contribuer à l'identification de nouveaux effecteurs essentiels à ces processus. Il a été évoqué le cas du *quorum sensing*, de *Crc*, mais d'autres études ont également montré que *GacA*, le régulateur de réponse du couple *GacA/GacS*, un système à deux composants, influe également sur la formation du biofilm (Parkins,

Ceri et al. 2001). Chez *E. coli*, les systèmes à deux composants EnvZ/OmpR et CpxA/CpxR, permettent de percevoir des stress au niveau de l'enveloppe bactérienne, et seraient impliqués conjointement dans la formation du biofilm (Prigent-Combaret, Brombacher et al. 2001) (Dorel, Vidal et al. 1999).

La variation ou le changement de phase est une stratégie qui permet à la bactérie de s'adapter rapidement à des changements de conditions environnementales. Cette variation est liée à une réorganisation génétique, qui va activer ou réprimer l'expression de gènes auxquels sont associés divers traits phénotypiques. Chez les bactéries à Gram négatif, l'expression de gènes codent pour de nombreuses structures de surface comme les fimbriae sont soumises à cette variation (Sauer, Barnhart et al. 2000). Récemment, des chercheurs (Deziel, Comeau et al. 2001) ont mis en évidence l'émergence spontanée de variants de *P. aeruginosa* formant des colonies rugueuses et de petite taille lorsque la bactérie est cultivée dans un milieu statique favorable à la formation d'un biofilm. Les bactéries formant ces colonies ont, à leur surface, d'abondants pili de type IV mais apparaissent dépourvues de *twitching motility* aussi bien que de mobilité flagellaire. Cependant, contrairement à la forme parentale, ces variants ont une forte capacité d'adhérence. Il semble que la diversité phénotypique déterminée par la variation de phase permet de maintenir, dans la population, des bactéries qui soient parfaitement adaptées à la formation de biofilm, formation qui est alors déclenchée dès que les conditions environnementales s'y prêtent.

#### **4.8 Importance des biofilms**

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. En effet, 65% des infections recensées dans les pays développés sont dues à des biofilms. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004).

Les biofilms sont à l'origine d'infections chroniques et d'infections contractées en milieu hospitalier, le plus souvent en rapport avec le port de prothèses médicales, on parle donc d'infections nosocomiales. Les infections à biofilms sont résistantes aux traitements antibiotiques, et posent de sérieux problèmes en matière de santé publique. Certaines maladies peuvent même favoriser la formation de biofilms, comme nous le verrons avec l'exemple de la mucoviscidose.

Le tableau 2 suivant, non exhaustif, regroupe les principales infections liées à la présence de biofilms (Lewis 2008) :

<b>Infections ou maladies :</b>	<b>Infections nosocomiales :</b>
Caries dentaires, Gingivites, Péritonite, Mucoviscidose, Otite moyenne (notamment chez l'enfant), Ostéomyélites, Prostatites	Sutures, Lentilles de contact, Port d'un implant médical : Sonde urinaire, Cathéter veineux central, Sonde endotrachéale, Sonde de gastrotomie, Valve cardiaque artificielle, Prothèse orthopédique, Broches (ostéomyélite).

Les catégories d'individus présentant le plus de risques de développer des infections dues à la présence de biofilms sont les individus immunodéprimés ou porteurs de prothèses médicales. Les agents bactériens les plus fréquemment rencontrés font partie de la flore commensale de l'organisme et sont organisés en biofilms (Costerton 1999). Certaines maladies favorisent l'invasion des bactéries et la formation de biofilms. C'est le cas, entre autres, de la mucoviscidose, qui est une affection héréditaire de l'appareil respiratoire profond caractérisée par la présence dans les poumons d'un mucus très visqueux (Clutterbuck, Cochrane et al. 2007). L'attachement à des surfaces recouvertes de mucus visqueux est plus rapide et plus massif et donne lieu à des agrégats bactériens plus importants que sur du verre ou sur des filaments d'actine. Un déséquilibre de charges ioniques favorise l'attachement de bactéries à une surface naïve. La plupart des composants extracellulaires des bactéries sont des molécules chargées négativement. Un excès de charges positives au niveau d'une surface va donc favoriser, par l'attraction exercée, l'attachement des bactéries au niveau de cette surface. Dans la mucoviscidose, un excès d'ions calcium



$\text{Ca}^{2+}$  dans le surfactant permet à *P. aeruginosa* de se fixer et d'être à l'origine d'une infection (Clutterbuck, Cochrane et al. 2007).

### Mécanismes et infections chroniques causées par les biofilms :

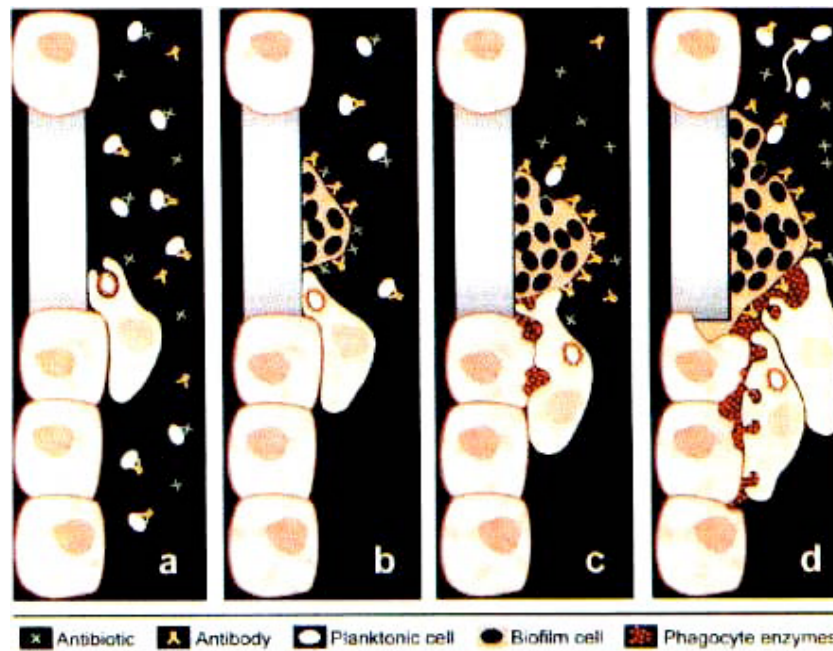


Figure 10 : Formation d'un biofilm et résistance à la réponse immunitaire de l'hôte (Costerton 1999).

Les bactéries planctoniques sont en général efficacement phagocytées et tuées par les phagocytes (PMN et macrophages). Lorsque les bactéries sont associées à des biofilms, elles donnent lieu à un phénomène de « phagocytose frustrée » au cours duquel la phagocytose est inefficace, y compris du fait de l'inaccessibilité des anticorps opsonisants. Les phagocytes sécrètent néanmoins leurs facteurs microbicides, y compris des enzymes qui sont délétères pour les tissus adjacents et en accélèrent la destruction (Costerton 1999). Une fois que les bactéries ont colonisé la sonde et l'uro-épithélium, elles doivent s'adapter à l'environnement formé par le tractus urinaire et se procurer des nutriments. La production bactérienne de toxines et d'enzymes dans l'environnement entraîne une dégradation des tissus avoisinants et une libération de nutriments (Jacobsen, Stickler et al. 2008).

#### 4.9 Les biofilms et les infections chez les animaux

Les infections bactériennes chez les animaux sont fréquentes avec ou non la présence de biofilm. Les biofilms sont impliqués dans diverses maladies animales :

pleuropneumonie, pneumonie, abcès hépatique, entérites, plaies infectés, mammites...(Clutterbuck et al 2007).

Des biofilms formés de micro-organismes pathogènes peuvent être transmis d'un individu à un autre par des vecteurs biologiques. Voici un exemple de la transmission par la puce de biofilms de *Yersinia pestis*, agent responsable de la peste bubonique. *Yersinia pestis* se transmet par des piqûres de puces, à partir d'animaux infectés, le plus souvent des rongeurs. Récemment, des études ont démontré que la puce jouait aussi le rôle de vecteur biologique dans la transmission de la peste, et n'était pas uniquement un hôte passif permettant une contamination purement mécanique (Jarrett, Deak et al. 2004), (Hinnebusch and Erickson 2008).

Les données concernant les infections nosocomiales liées à la présence de biofilms peuvent aussi s'étendre à la médecine vétérinaire, puisqu'on retrouve tous les éléments propices à leur formation.

Prenons l'exemple de biofilms de *S. aureus*. Il s'agit de l'une des causes les plus importantes de mammites subcliniques, cliniques et chroniques chez les animaux de rente. Cette bactérie fait partie de la flore cutanée du cheval et est rencontrée aussi au niveau des sabots. Lorsqu'elle est sous forme de biofilms, elle est responsable d'infections de plaies post-opératoires et de mammites chez le cheval (Clutterbuck, Woods et al. 2007). *Acinetobacter baumannii* est une bactérie commune rencontrée dans l'environnement et dans la flore cutanée et des muqueuses chez les animaux. Cette bactérie, lorsqu'elle est sous forme de biofilms, est impliquée dans des infections chez des chiens et des chats (Francey, Gaschen et al. 2000). Elle a été isolée dans des cathéters utilisés chez des chevaux (Vanechoutte, Devriese et al. 2000).

#### **4.10 Les biofilms et *A. pleuropneumoniae***

De plus en plus d'études montrent une association entre la formation de biofilm et la virulence bactérienne chez App, surtout dans le cas d'infections persistentes. Mon projet de recherche est d'étudier les biofilms retrouvés chez le porc lors d'une pleuropneumonie porcine afin de mieux comprendre les mécanismes qui permettent de réguler la formation de biofilm.

Il a été montré que les deux souches de référence du sérotype 5b et 11 et plus de la moitié des 77 souches ont été testées provenant des sérotypes 1, 5b et 11 sont capables de former des biofilms (Kaplan and Mulks 2005). Cette formation de

biofilm a été évaluée par les méthodes suivantes : en tubes et à l'aide d'un modèle *in vitro* en microplaques de 96 puits avec une coloration au cristal violet. La formation de biofilm est un phénotype très répandu chez les souches d'*A. pleuropneumoniae*. Néanmoins ces auteurs ont observé que le passage du phénotype biofilm «+» à biofilm «-» est irréversible. Ils suggèrent que la formation de biofilm peut avoir des répercussions sur la colonisation, la pathogénie et la transmission de la bactérie.

Un autre article suggère que les biofilms formés par *A. pleuropneumoniae* sont composés de bactéries incorporées dans une matrice extracellulaire de poly-N-acétylglucosamine PGA, qui est une chaîne linéaire de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et chacun des résidus sont liés en  $\beta(1,6)$  (c'est-à-dire le carbone 1 et 6 sont liés pour chaque résidus) (Kaplan, Velliyagounder et al. 2004). Après l'analyse des mutants altérés dans leur formation de biofilms, les auteurs ont observé que l'opéron *pgaABCD* est impliqué dans la biosynthèse du PGA chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *A. pleuropneumoniae*. Ce polymère est également retrouvé chez d'autres bactéries: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Yersinia*,...

D'après Itoh et al (Itoh, Rice et al. 2008), le complexe PgaABCD serait impliqué dans la synthèse et l'export de PGA :

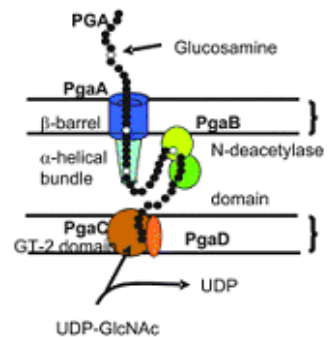


Figure 11: Extraite d'un article du Journal of Bacteriology: Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification and export biofilm adhesin Poly- $\beta$ -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine (Itoh, Rice et al. 2008).

Cette opéron est composé du gène *pgaA* impliqué dans la translocation ce qui permet de faciliter le transport de PGA, puis du gène *pgaB* qui est une N-déacétylase qui permet d'éliminer les groupements acétyl. Le gène *pgaC* est apparenté à une glycosyltransférase et le gène *pgaD* assiste le gène *pgaC* dans le transfert des glycosyls.

Une étude de Kaplan et Mulks (2005) a permis de montrer après une analyse PCR que les souches de référence (sérotypes 1-12) et 76/77 isolats d'*A. pleuropneumoniae* (sérotypes 1, 5 et 7), possédaient le gène *pgaC*. Un mutant *pgaC* a montré une déficience dans la formation de biofilms *in vitro*. Ils ont également montré que le traitement des biofilms d'une souche de sérotype 5 avec la dispersine B, une  $\beta$  hexosaminidase, permet de défaire les biofilms en clivant la liaison  $\beta$  (1-6) des polymères N-acétylglucosamine rendant ainsi les bactéries plus sensibles aux antibiotiques. Ils suggèrent donc que PGA est impliqué dans la formation de biofilms chez *A. pleuropneumoniae*.

Il a également été montré par Ganeshnaryan et al. (Ganeshnarayan K 2009), que la matrice de polysaccharide de PGA empêchait la convection des fluides et le transport de CPC (chloride de cétylpyridinium composé d'ammonium quaternaire) à travers les biofilms chez *A. pleuropneumoniae*. En effet le CPC se fixe de façon irréversible à la matrice des biofilms suggérant ainsi que PGA est capable de séquestrer le CPC dans la matrice du biofilm empêchant ainsi le contact avec les cellules du biofilm.

Au sein de notre laboratoire, il a été montré en utilisant différents milieux de culture tel que Luria Bertani (LB), Tryptica soy broth (TSB), Mueller Hinton (MH) et Brain Heart Infusion (manufacturiers A et B) que les souches d'*A. pleuropneumoniae* forment plus de biofilms dans le milieu BHI B (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010). La souche de référence de sérotype 1 (S4074) est capable de former un biofilm et il a été mis en évidence que cette propriété est réversible c'est-à-dire que si l'on dépose un inoculum de la souche 4074 dans le milieu BHI A, on n'observera aucune formation en biofilm et si on prélève un nouvel inoculum à partir de ce milieu et que l'on met cet inoculum dans un nouveau milieu BHI B il y aura une formation de biofilm. Si on fait l'inverse c'est-à-dire de BHI B à BHI A on observera le phénomène inverse. La propriété est donc réversible contrairement à ce qui avait été suggéré par les études de Kaplan (2004, 2005). Il serait intéressant de caractériser ces mutants par observation en microscopie confocale marqués à l'aide du conjugué WGA (wheat germ agglutinin) Oregon green 488, qui est une lectine qui se fixe de façon spécifique sur les sucres N acétyl glucosamine de PGA. Ceci pourrait nous permettre de classer les mutants selon la morphologie et l'épaisseur du biofilm.

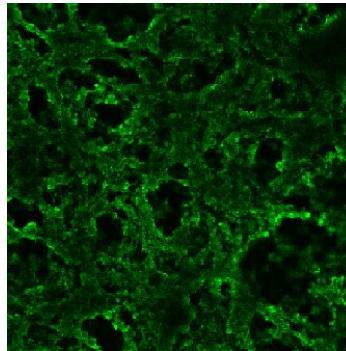


Figure 12: Observation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 en microscopie confocale (J.Labrie).

### Les gènes impliqués lors d'études précédentes dans la formation de biofilms

Récemment Buettner et al. (Buettner, Maas et al. 2008), ont montré que le gène *arcA* est essentiel dans la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*. Les mutants qui possédaient une délétion du gène *arcA* montrent une diminution dans la virulence. ArcAB est un régulateur impliqué dans le métabolisme anaérobie, dans la virulence et la colonisation d'*A. pleuropneumoniae* au niveau des voies respiratoires porcines. Une autre étude a montré qu'une délétion du gène *luxS* augmentait la formation de biofilm et réduisait la virulence d'*A. pleuropneumoniae* (Li, Zhou et al. 2008). Les auteurs suggèrent que *luxS* est peut-être impliqué dans le système de quorum sensing médié par l'auto inducteur 2 qui régule le comportement d'*A. pleuropneumoniae*.

Un nouvel élément d'insertion, ISAp11 a été identifié dans une région riche en A/T du gène *pgaC* de la souche d'*A. pleuropneumoniae* HB04 déficiente dans la formation de biofilm (Liu J 2008).

Dans une étude récente, des mutants de la souche 4074 d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 ont été générés par mutagenèse à l'aide du transposon mini-Tn10 (Dalai, Zhou et al. 2008). Deux mutants formant plus de biofilms ont été sélectionnés et un clonage a été réalisé. Par PCR inverse et analyse de séquences, ils ont démontré que chez ces deux mutants, le gène *hns* qui code pour une histone-like nucleoid (H-NS) a été inactivé. D'autres analyses ont révélé que H-NS joue un rôle important dans la régulation de la formation de biofilm et la virulence chez *A. pleuropneumoniae*. En réponse à un stress extracytoplasmique, il a été montré que la régulation de l'opéron *pga* par  $\sigma^E$  permet la formation de biofilm (Bossé, Sinha et al. 2010).

La régulation de la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* est affectée par ArcA, un régulateur impliqué dans la réponse aux conditions anaérobies (Buettner, Maas et al. 2008), LuxS, une protéine impliquée dans les phénomènes de « quorum-sensing » (Li, Zhou et al. 2008), H-NS, une protéine de type histone (Li, Zhou et al. 2008), ainsi que par AasP, une sérine protéase auto-transporteure (Tegetmeyer, Fricke et al. 2009).

Finalement, notre équipe a analysé le profil transcriptomique d'*A. pleuropneumoniae* après contact avec la ligné cellulaire SJPL et montré à l'aide de biopuces la surexpression des gènes *pgaBC* (Auger, Deslandes et al. 2009). Il a été également observé dans notre laboratoire que le zinc pouvait complètement inhiber la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* et *A. actinomycetemcomitans* qui synthétise le PGA. Sachant que le PGA fait partie de la matrice polysaccharidique des biofilms chez des espèces bactériennes phylogénétiquement diverses, il serait intéressant de vérifier si le zinc interférait dans la synthèse du PGA chez ces pathogènes (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010).

## V. APPROCHE ET DÉMARCHE SCIENTIFIQUE

Les biofilms sont généralement présents lors d'une infection chronique (Costerton 2001) et peuvent avoir d'importantes répercussions sur la colonisation, la pathogénie et la transmission de la bactérie. Il serait donc possible que *A. pleuropneumoniae* forme des biofilms lors d'une infection chronique chez le porc. Nous proposons dans ce travail d'identifier certains axes de recherche visant à mieux cerner les mécanismes de biosynthèse et de régulation des biofilms. Le but de ce projet de recherche est de réaliser le criblage d'une banque de mutants isogéniques d'*A. pleuropneumoniae*, nous permettant d'identifier des gènes impliqués dans la formation du biofilm et de mieux comprendre son rôle dans la pathogénèse.

L'objectif de cette étude consiste à générer une banque de mutants d'*A. pleuropneumoniae* 4074NaIR par mutagénèse à l'aide du transposon mini-*Tn10*. Cette banque sera criblée à l'aide du modèle *in vitro* en microplaques dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la formation de biofilms. Les mutants démontrant une formation de biofilm modifiée par rapport à la souche mère seront sélectionnés. Le séquençage de la région adjacente au transposon permettra de

déterminer dans quel gène s'est inséré le transposon. Au niveau phénotypique, il serait intéressant d'observer le biofilm des mutants en microscopie confocale et de réaliser un test d'adhérence à des cellules épithéliales des voies respiratoires du porc. Il serait intéressant dans le futur de réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques et des tests de virulence chez l'animal.

## **VI. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**



**Article**

**Novel Genes Associated with Biofilm Formation of  
*Actinobacillus pleuropneumoniae***

(Accepté)

Veterinary Microbiology

**Novel Genes Associated with Biofilm Formation  
of *Actinobacillus pleuropneumoniae***

Short title: Biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*

Alexandra Grasteau§, Yannick Tremblay§, Josée Labrie and Mario Jacques\*

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc  
et Centre de recherche en infectiologie porcine,  
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,  
St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

§These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Mario Jacques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de  
Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

**ABSTRACT**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium and is the causative agent of swine pleuropneumonia, a highly contagious respiratory disease. Biofilm formation is an important ability possessed by numerous bacterial pathogens. The purpose of this study was to identify and characterize biofilm mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain S4074 created using a mini *Tn-10* transposon. The transposon library was screened to identify mutants with a modified ability to form biofilms in polystyrene microtiter plates. A total of 1200 mutants were screened and the analysis identified 24 mutants that exhibited abnormal biofilm formation, at least 16 unique genes were identified. Most genes identified in the enhanced-biofilm mutants encoded proteins with unknown functions, whereas most genes identified in the biofilm-reduced mutants encoded proteins related to transport, protein synthesis and nucleic acid synthesis. Approximately 50% of genes, including *hns*, *potD2*, *ptsI*, *tig* and *rpmF*, identified in our screen have been previously associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* and other bacterial species, and thus validated the screening method. The rest of genes identified, such as APL\_0049, APL\_0637 and APL\_1572, have not been previously associated with biofilm formation. Interestingly, gene APL\_0049 was previously seen among the genes differentially expressed during a natural infection of pig lungs. Preliminary characterization of the mutants was also initiated by assessing their hydrophobicity, their biofilm matrix composition and their ability to adhere to a polystyrene surface or NPTr cells. Based on the preliminary characterization, some of the mutants identified appear to have deficiencies during the initial attachment or growth of the biofilm. In conclusion, transposon mutagenesis analysis allowed the identification of new genes associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*.

**Key words:** *Actinobacillus pleuropneumoniae* / biofilm / transposon mutagenesis / genes

## 1. INTRODUCTION

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium from the *Pasteurellaceae* family and is the causative agent of swine pleuropneumonia, a highly contagious respiratory disease. The virulence factors of this microorganism involved in colonization and induction of lung lesions have been thoroughly studied and some have been well characterized (for a recent review see Chiers, et al. 2010). Biofilm formation is involved in the virulence of numerous bacterial pathogens of human (Donlan and Costerton 2002) and veterinary (Jacques, et al., 2010) importance. It has been reported that *A. pleuropneumoniae* has the ability to form biofilms under certain static growth conditions (Kaplan and Mulks 2005; Labrie, et al. 2010). Additionally, many field isolates of *A. pleuropneumoniae* have the ability to form biofilms.

In *A. pleuropneumoniae*, biofilm formation on polystyrene microtiter plates depends on the production of a polymer of  $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA) (Izano, et al. 2007; Kaplan, et al. 2004). Biosynthesis of PGA is dependent of the proteins encoded by the *pgaABCD* operon (Kaplan, et al. 2004). H-NS regulates biofilm synthesis by repressing the *pga* operon (Bossé, et al. 2010) and *hns* mutants exhibit enhanced biofilm formation (Dalai, et al. 2008). The expression of the *pga* operon can also be positively regulated by the alternative sigma factor  $\sigma^E$ , indicating that biofilm formation is part of the extracytoplasmic stress response (Bossé, et al. 2010). Other genes are associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*. For example, enhanced biofilm formation was observed in a quorum sensing (*luxS*) mutant (Li, et al. 2008). On the other hand, an ArcAB two-component regulatory system mutant ( $\Delta$ *arcA*) (Buettner, et al. 2008) and an autotransporter serine protease mutant ( $\Delta$ *asP*) (Tegetmeyer, et al. 2009) were unable to form biofilms.

The objective of this study was to identify additional genes associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* using transposon mutagenesis and a microtiter plate screening assay.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

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

A nalidixic acid-resistant mutant derived from the *A. pleuropneumoniae* reference strain serotype 1 (4074NalR) was used as the recipient strain for transposon mutagenesis (Rioux, et al. 1999). *A. pleuropneumoniae* strains were routinely cultured on Brain Heart Infusion agar (BHI; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) supplemented with 15 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD); this medium is referred to as BHI-NAD. When necessary, 30 µg/mL of nalidixic acid (Nal), and 75 µg/mL of kanamycin (Km) were added to BHI-NAD. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18 to 24h. *Escherichia coli* S17.1 λpir (pLOF/Km) was used as donor strain (Tascon, et al. 1993) and was routinely cultured on LB agar supplemented with 50 µg/mL of Km.

### **2.2 Transposon mutagenesis**

Mutagenesis of *A. pleuropneumoniae* with a *Tn10* derivative was performed as described by Tascon et al. (1993). Briefly, overnight cultures of the donor and recipient strains were diluted to an OD<sub>650nm</sub> of 0.8 in 0.85% (w/v) NaCl. A volume (100 µL) of each suspension was removed and added to 5 mL of sterile 10 mM MgSO<sub>4</sub> solution. The resulting mixtures were then filtered through a 0.45 µm membrane (Millipore type HA, Millipore; Boston, MA, USA). Mating filters containing donor and recipient bacteria were placed onto BHI-NAD agar, bacteria side up, and incubated at 37°C for 4h. Membranes were transferred onto BHI-NAD agar containing 100 µM IPTG to induce expression of the transposase. After an overnight incubation at 37°C, the bacterial cells were resuspended in sterile NaCl (0.85% [w/v]), diluted and spread on solid counter-selection medium (BHI-NAD-Nal-Km).

### **2.3 Biofilm assays**

#### **2.3.1 Crystal violet staining**

The assay was performed as described by Labrie et al. (2010). Briefly, the wells of a sterile 96-well microtiter plate (Costar® 3599, Corning, NY, USA) were filled in triplicate with a dilution (1/100 in BHI-NAD) of an overnight culture of *A. pleuropneumoniae*. Following a 6h incubation at 37°C, the wells were washed by immersion in water. Excess water was removed by inverting plates onto a paper

towel. The wells were then filled with 100  $\mu\text{L}$  of crystal violet (0.1% [w/v]) and the plate was incubated for 2 minutes at room temperature. After removal of the crystal violet solution, the plate was washed and dried at 37°C for 30 minutes and 100  $\mu\text{L}$  of ethanol (70% [v/v]) were added to the wells to release the stain. The amount of stain released was quantified by measuring the absorbance at 590 nm using a microplate reader (Powerwave, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). To measure the optical density (OD) of the culture, bacteria in the wells were thoroughly mixed and the absorbance at 600 nm was measured using a microplate reader (Powerwave, BioTek Instruments).

In addition to the microtiter plate technique, biofilm formation was also assessed in glass tubes. Briefly, 2 mL of a dilution (1/100 in BHI-NAD) of an overnight culture were transferred to a glass tube and incubated for 6h at 37°C with shaking (160 rpm). After the incubation, the tubes were washed gently with water and were then filled with 3 mL of crystal violet (0.1% [w/v]). After 2 minutes of incubation at room temperature, the crystal violet solution was removed and the tubes were washed with water and dried at 37°C for 30 minutes. The amount of biofilm present was evaluated by comparing the thickness of ring stained with crystal violet.

### **2.3.2 Safranin staining**

The biofilm assay was carried as described in section 2.3.1 with some modifications. After the first wash, 96-well plates were air dried and stained with 0.1% (w/v) safranin for 10 min. After staining, the plates were rinsed with distilled water to remove excess dye and air dried for 1h and 100  $\mu\text{L}$  of ethanol (70%) was added to the wells. Biofilms were quantified by measuring the absorbance of stained biofilms at 490 nm using a microplate reader (Powerwave, BioTek Instruments).

### **2.3.3 Reduction of resazurin**

The ability of different mutants to reduce resazurin to resorufin was measured using the CellTiter-Blue<sup>®</sup> Reagent (Promega Corporation, Madison, MI, USA). The biofilm was prepared as described in section 2.3.1. Once the 100- $\mu\text{L}$  aliquots were added to wells, the recommended volume of CellTiter-Blue<sup>®</sup> Reagent (20  $\mu\text{L}$ ) was added to each well. After thorough mixing, the microplates were incubated at 37°C, and the absorbance ( $\lambda_{\text{ex}}$  570 nm  $\lambda_{\text{em}}$  600 nm) was measured at 1-h intervals for 6 hours using a microplate reader Synergy HT (BioTek, Instruments).

## 2.4 Cell surface hydrophobicity

Bacterial cell surface hydrophobicity was measured as described by Labrie et al. (2002). Cell surface hydrophobicity was estimated by calculating the percentage of turbidity associated with *n*-hexadecane using the following formula:  $100 - [(OD_{\text{final}}/OD_{\text{initial}}) \times 100]$ .

## 2.5 Surface attachment

To evaluate initial surface attachment, biofilms were prepared as described in section 2.3.1 except that the biofilms were incubated for 2 hours in BHI without NAD. After the incubation, the wells were then washed with distilled water and the cells were fixed with 100  $\mu$ L of fixing solution (10% (v/v) formaldehyde and 5% (v/v) acetic acid in PBS) for 1h at 60°C. After the incubation, the fixing solution was removed and the wells were washed once with water. The cells were then stained with 100  $\mu$ L of a crystal violet solution (2% (w/v) crystal violet in 20% (v/v) ethanol) for 5 min at room temperature. The excess dye was completely removed by washing 4 times with water and the microtiter plate was air dried at 37°C for 30 min. To visualize surface attachment, the microtiter wells were observed with a microscope (Leica, DMI 4000 B, Microsystems Inc., Richmond Hill, ON, Canada). The images were captured using a DFC490 digital camera (Leica) and documented using the associated software version 2.4.0.

## 2.6 DNA techniques

Genomic DNA was purified using the guanidium thiocyanate method of Pitcher et al. (1989). Briefly, cells were lysed with GES buffer (5 M guanidine thiocyanate, 100 mM EDTA [pH 8.0], 0.5% [w/v] sodium-lauryl-sarcosinate) and proteins were precipitated with 7.5 M ammonium acetate. Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1; Sigma) was used to remove the remaining exonucleases and lipoproteins from the DNA which was then precipitated with isopropanol. PCR amplification of the transposon mini-Tn10 was done using the oligonucleotide primers KMTN903-L and KMTN903-R (Table 1) at an annealing temperature of 53°C using standard conditions (Straus and Ausubel 1990). The oligonucleotides were synthesized by Biocorp ADN Inc. (Dollard-Des-Ormeaux, QC, Canada).

Identification of the interrupted gene was performed using a Y-linker PCR-based procedure described elsewhere (Kwon and Ricke, 2000). The oligonucleotide sequences used in this study are shown in Table 1. The PCR products were sequenced at the Plate-forme d'analyses biomoléculaires, Université Laval (QC, Canada).

### **2.7 Effects of dispersin B and DNase on biofilm formation**

Biofilms were prepared as described in section 2.3.1. Briefly, 6h biofilms were washed with water and then treated with 100  $\mu$ l of PBS containing 2  $\mu$ g/ml of dispersin B (Kane Biotech Inc, Winnipeg, MB, Canada) as described by Izano et al. (2007), or 200  $\mu$ l of DNase I (100  $\mu$ g/ml in 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Control wells were treated with 200  $\mu$ l of the appropriate buffer without the enzymes. Biofilms were incubated for 5-min at 37°C with dispersin B or for 1h at 37°C with DNase I. After treatment, the microtiter plates were processed as described in section 2.3.1.

### **2.8 Scanning laser confocal microscopy**

Biofilms were prepared as described in section 2.3.1 but were stained with the Film Tracer<sup>™</sup> FM<sup>®</sup> 1-43 fluorescent marker (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), which is specific for cells membrane. The stained biofilms were visualized by confocal laser scanning microscopy (Olympus FV1000 IX81, Markham, ON, Canada).

### **2.9 Adherence to epithelial cells**

Assessment of adherence to porcine respiratory epithelial cells was carried out as described before (Auger, et al. 2009). Briefly,  $2.5 \times 10^5$  newborn pig trachea (NPTr) cells (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italy; Ferrari, et al. 2003) were seeded into wells of 24-well tissue culture plates (Sarstedt, Numbrecht, Germany) and incubated overnight in Minimum Essential Media (MEM) (Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% sodium pyruvate (v/v) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Mid-exponential phase bacteria (OD<sub>600nm</sub> of 0.6) were resuspended in MEM to a concentration of  $2.5 \times 10^6$  CFU/ml. The resulting suspension was added to each well at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1, and the plates were incubated for 1, 2 or 3 h. Non-adherent bacteria were removed by washing four times



with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS). NPTr cells with adherent bacteria were released from the wells by adding 100  $\mu$ l of trypsin-EDTA (Gibco) and resuspended in 900  $\mu$ l of DPBS. Samples were serially-diluted and the resulting dilutions were spread on BHI-NAD agar. The colony forming units were used to determine the number of bacteria that adhered to the NPTr cells.

### **2.10 Statistical analysis**

Statistical significance was established by analysis of variance (ANOVA; 95% confidence interval) followed by a Tukey's post-hoc comparison ( $p < 0.05$ ) using the Graph Pad version 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## **3. RESULTS**

### **3.1 Isolation and characterization of biofilm mutants**

To identify genes associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*, a transposon library was created and 1200 mutants from this library were screened using a biofilm microtiter plate assay. Based on statistical analysis, 24 mutants were considered to have significant biofilm formation defects. After further analyses, the insertion sites of the transposon were identified in those mutants. The mutants were separated in 2 groups: mutants with enhanced or reduced biofilm formation compared to the parental strain (Fig. 1). The group with biofilm ODs ranging from 2.75 to 4 were labelled "enhanced-biofilm mutants". The other group with biofilm ODs  $< 1$  were labelled "reduced-biofilm mutants". Enhanced biofilm mutants had a significantly greater ability ( $p < 0.05$ ) to form biofilm when compared to the parental strain. Reduced biofilm mutants formed significantly less biofilm ( $p < 0.05$ ) than the parental strain.

To ensure that the dye used (crystal violet) did not introduce a bias during our screen, biofilms from the 24 mutants were stained with safranin. Similar patterns as those obtained with crystal violet staining were observed (data not shown). The biofilm phenotype of the selected mutants was then confirmed by a glass tube assay. A thicker ring was observed for the enhanced-biofilm mutants whereas a thinner ring or the absence of ring was observed for the reduced-biofilm mutants (data not shown). Taken together, these assays confirmed that our screen was effective at identifying mutants with a biofilm phenotype markedly different from the parental strain.

To ensure that the phenotype observed in reduced biofilm mutants was not due to a growth defect, the growth of the 24 mutants was measured and compared to their ability to form biofilm (Fig. 1). It is important to note that the transposon library was created in a strain with no measurable auto-aggregation to ensure that the reduced-biofilm mutants identified were not results of an additional spontaneous mutation resulting in an aggregation-negative phenotype. This type of mutation often results in biofilm-negative phenotype. Although differences were observed between the enhanced- and reduced-biofilm groups and the parental strain with respect to their final growth OD, no correlation was found between growth and biofilm formation of individual mutants. Furthermore, viability was measured using a resazurin assay which measures metabolism through the reduction of resazurin to resorufin. The same growth profile was observed for enhanced- and reduced-biofilm mutants, and the parental strain (data not shown). Taken together, these results demonstrate that growth is not affected in the reduced- or enhanced-biofilm mutants.

A Y-linker method was used to amplify the sequences flanking the transposon. The site of insertion was identified in the 24 mutants, this included 7 enhanced-biofilm mutants (Table 2) and 17 reduced-biofilm mutants (Table 3). Based on the genes identified, transposition appeared to be random and occurred around the entire genome of *A. pleuropneumoniae* (see Fig. 2A). Furthermore, the transposon disrupted genes encoding proteins with several different types of function (see Fig. 2B). For the enhanced-biofilm mutants, at least 5 unique genes appeared to be affected by insertion (Table 2). In 3 mutants (B22, M2 and C8), the transposon inserted in *hns*. This gene was previously associated with enhanced biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* (Dalai, et al. 2008). Interestingly, in 2 mutants (M4 and X34), the transposon inserted in intergenic regions. For mutant M4, the transposon inserted between APL\_0048, which encodes the response regulator ArcA, and APL\_0049 which encodes a hypothetical protein. APL\_0048 is 14 bp upstream of the insertion and APL\_0049 is 37 bp downstream of the insertion. Additionally, both genes are in the same transcriptional direction suggesting that the transposon inserted within the promoter region of APL\_0049. The insertion likely has a polar effect on APL\_0049 and disrupts its transcription. Therefore, mutant M4 is considered to be an APL\_0049 mutant. In the case of mutant X34, the transposon inserted between APL\_0650, a hypothetical protein, and APL\_0651, which encodes

for the LPS-associated enzyme GalU. Both genes face each other and the transposon inserted within the termination region of both genes. The transposon likely interferes with the transcriptional termination of both genes and therefore, it is difficult to identify the affected gene without further experiment and analysis. Consequently, we cannot assign the mutation to a functional class. In addition, most of the genes, with the exception of *hns*, associated with the enhanced-biofilm mutant have unknown functions (see Fig. 2B).

With respect to the reduced-biofilm mutants, at least 11 unique genes were affected by the transposon insertion (Table 3). In 3 mutants (320, 556 and 563), the transposon inserted within an intergenic region. In the case of mutants 556 and 563, the insertion of the transposon occurred at the same site for both mutants and is located upstream of APL\_1572, which encodes a hypothetical protein, and downstream of APL\_1573, which encodes a 2,3-diketo-L-gulonate reductase. The transposon probably inserted within the promoter region of APL\_1572 and likely disrupted its transcription. Mutants 556 and 563 are considered to be APL\_1572 mutants. For mutant 320, the transposon inserted between APL\_0383 (*ribE*) and APL\_384 (*ribA*), and both genes encode enzymes involved in riboflavin synthesis. Based on *in silico* analysis, *ribE* and *ribA* are likely part of an operon, and the transposon insertion likely disrupts *ribA* transcription. Mutant 320 is considered to be a *ribA* mutant, regardless of the mutated gene, riboflavin synthesis is likely affected in this mutant. With the exception of mutants 556 and 563, all the genes identified in reduced-biofilm mutants could be classified according to their protein function. The most common function attributed to the genes was protein synthesis followed by purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides synthesis, and transport (see Fig. 2B).

Based on the genes identified, the transposon mutagenesis and screening method allowed for a good coverage of the genome. Furthermore, the identification of *hns* disruption in the enhanced-biofilm mutant group partly validates our assay because the deletion of *hns* is known to result in enhanced biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* (Dalai, et al. 2008).

### 3.2 Cell surface hydrophobicity

A hydrocarbon adherence assay was used to determine the relative cell surface hydrophobicity of the 24 mutants and the parental strain. It was observed that there was no significant difference between the mutants and the parental strain (data not shown). It appears that the cellular surface of biofilm mutants and parental strain have the same hydrophobic properties.

### 3.3 Surface attachment

Differences in initial attachment to the plastic substrate was observed between the parental strain and some biofilm mutants after 2h of incubation (Fig. 3). A larger number of bacterial cells attached to the surface was noticeable for enhanced-biofilm mutants such as B22 and X34 when compared to the parental strain. Additionally, all the *hns* mutants had the largest amount of bacteria attached to the surface after 2h. For most of the reduced-biofilm mutants (320, T16, 739, and 112), the number of bacteria attached to the surface appeared to be similar to the parental strain. However, mutants 57, 169, and 556 appeared to have a reduced ability to bind to the surface. In the case of reduced-biofilm mutant T7, it appears that a larger amount of bacteria were able to attach to the surface.

### 3.4 Effect of dispersin B and DNase on biofilm formation

A brief enzymatic treatment with dispersin B was performed on biofilms of the mutants and the parental strain. The results indicate that this enzyme disperses the biofilm of all enhanced-biofilm mutants tested and of the parental strain (data not shown). For most of the reduced-biofilm mutants, the enzyme had a marginal effect on the biofilms and this was likely because the biofilms of these mutants were just above the limit of detection (data not shown). Therefore, this confirms the presence of PGA in the biofilm matrix of the parental strain and the enhanced-biofilm mutants tested. However, DNase treatment did not disperse the biofilm formed by the parental strain and biofilm mutants (data not shown).

### 3.5 Scanning laser confocal microscopy

Biofilms were visualized by confocal laser scanning microscopy using the fluorescent probe Film Tracer<sup>™</sup> FM<sup>®</sup> 1-43 (Fig. 4). The biofilm structures of both the enhanced-biofilm mutant and the reduced-biofilm mutant tested were different

when compared to the parental strain (Fig. 4). As expected, the enhanced-biofilm mutants exhibited a thicker and denser biofilm than the parental strain (Fig 4a and Fig. 4b mutant *hns*). Additionally, the enhanced-biofilm mutants covered a larger surface area than the parental strain. The biofilm of the reduced-biofilm mutants appeared thinner and sparser than the parental strain but both biofilms covered a similar surface area (Fig 4a and 4c mutant *rpmF*).

### 3.6 Adherence Assay

The ability of the parental strain and 3 mutants (X34, 112 and 563) to adhere to NPTr cells was also evaluated (data not shown). After 1, 2 and 3 hour of incubations, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the parental strain and the mutants tested.

## 4. DISCUSSION

A total of 1200 *A. pleuropneumoniae* transposon mutants were screened in a biofilm microtiter plate assay to identify new genes associated with biofilm formation. The preliminary screen identified 24 mutants with modified biofilm formation, and after further analyses, the transposon insertion site was identified in those mutants. At least 16 unique genes were affected by the transposon insertion which included *hns*, a gene previously associated with enhanced-biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* (Dalai, et al., 2008). The identification of *hns* partly validates this screen. Furthermore, several genes identified in our screen have been associated with biofilm formation in other bacteria. For example, mutants of *dus*, *potD2* or *rpmF* homologues in *Pseudomonas aeruginosa* had reduced biofilm formation (Müsken et al., 2010) and all three genes were classified as having reduced-biofilm formation in this study. Additionally, sensing of norspermidine, the predicted role of the polyamine/spermidine binding protein PotD2, is important for biofilm formation in *Vibrio cholera*. An *nspS* deletion mutant, a *potD2* homologue, had a reduced ability to form biofilm and had reduced expression of the genes associated with exopolysaccharide synthesis (Karatan et al., 2005). In addition to the three genes mentioned above, a *ribA* mutant was classified among the reduced-biofilm mutants and the expression of genes associated with riboflavin synthesis appeared to be up-regulated during biofilm formation of *Shewanella oneidensis* (De Vriendt et al., 2005). Up-regulation of *pyrF* during biofilm formation is observed in *Staphylococcus*

*aureus* (Beenken et al., 2004) and this genetic determinant was found in the reduced-biofilm mutants. Furthermore, a trigger factor deletion mutant in *Streptococcus mutans* had a reduced ability to form biofilm (Wen et al., 2005) and a trigger factor mutant was identified among the reduced-biofilm mutants in this study. The phosphotransferase (mutants 54 and 62) has also been associated with biofilm formation in several bacterial species including *V. cholerae* (Houot et al., 2010) and *Enterococcus faecalis* (Ballering et al., 2009). Taken together, the identification of genes previously associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* and other bacterial species validates our screening method which allowed for the identification new genes associated with biofilm formation.

Among the new genes identified, all of the genes associated with the reduced-biofilm mutants, with the exception of APL\_1572, could be classified according to the predicted protein function. The "protein synthesis", "purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides" and the "transport and binding proteins" classes were the largest group with 2 or 3 unique genes associated with each group. Genes involved in protein synthesis and transport tend to be the most commonly found functional type during a large screen for genetic determinants of biofilm formation (for examples see Ballering et al., 2009 and Puttamreddy et al., 2010). The "hypothetical, unknown, unclassified" group also tend to be one of the largest classes identified. In our study, this group represented 23% of the genes identified. In some studies, the group can represent from 22% (Ballering et al., 2009) to 67% of the total genes identified (Müsken et al., 2010). Another class of interest are the "purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides" group but this class is not often encountered during large screens. Genes, such as *rnr1* and *pyrF*, grouped in this class probably play a key role during the synthesis of precursors of cell-cell or stress signals such as alkyl-quinolones (Bredenbruch et al., 2005). At least three of the genes associated with the enhanced-biofilm mutants encoded protein with unknown functions. This fact is of particular interest because it may provide insight into new mechanisms of biofilm formation in the *Pasteurellaceae* and help characterize the function of these hypothetical proteins. Of further interest are the genes APL\_1387 and *rpmF* because both genes appear to be in the same operon and yet have different effect on biofilm formation. Mutant X34 is also interesting because the transposon insertion might interfere with *galU* expression and thus, with the biosynthesis and the

properties of the oligosaccharide of the LPS core. The impact of *galU* mutation on the structure and properties of LPS has been studied in *A.pleuropneumoniae* strain S4074 (Ramjeet et al., 2005; Ramjet et al., 2008). Furthermore, modification to the LPS core has been shown to influence the mechanical and structural properties of *P. aeruginosa* biofilms (Lau et al., 2009).

The functional classification is a good tool to help narrow the potential roles of the genetic determinants identified. However, it is hard to formulate hypotheses on the nature of the difference between the biofilm formation of the parental strain and the mutants. For example, dispersin B could fully disperse the biofilm of the enhanced-biofilm mutants indicating that the biofilm of these mutants is dependent on the polymer PGA. The enhanced-biofilm mutants also appear to have an improved ability to bind to the surface of the polystyrene microtiter plate but this increased adherence was not associated with a change in the hydrophobicity of the cell surface. This increased ability to adhere to polystyrene was also not associated with an increased attachment to NPTr cells. In the case of the *hns* mutants (B22, M2 and C8), it is known that the deletion of *hns* results in the over-expression of the *pga* operon (Bossé et al., 2010) and this likely results in over-production of the PGA polymer which could act as an additional adhesin for the *hns* mutants. This overproduction of PGA likely helps to achieve a biofilm with a higher cell density, which was observed by confocal microscopy in the present study. Some of the reduced biofilm mutants had an increased ability to adhere to the surface, some mutants poorly adhered and other mutants had the same ability as the parent. Again, these changes in adherence ability were not associated with a change in hydrophobicity or attachment to NPTr cells. For the reduced-biofilm mutants adhering less to the surface, it is clear that the attachment is a limiting factor during their biofilm formation. For the reduced-biofilm mutants adhering at the same or an increased rate, the limiting factors are likely occurring during the growth or maturation step of biofilm formation. This is supported by confocal microscopy analysis of the biofilm formed by *rpmF* mutant. This mutant attached to the surface but the biofilm appeared to lack a complex three-dimensional structure. Therefore, it is clear that each genetic determinant will have to be investigated to determine their exact role during biofilm formation.

To further analyze the data obtained, the set of genetic determinants were compared to genes flagged during microarray analysis performed by our laboratory specifically those obtained for *A. pleuropneumoniae* attached to St. Jude porcine lung (SJPL) cells (Auger et al., 2009) and those obtained during the acute phase of a natural infection (Deslandes et al., 2010). APL\_0049 was the only gene differentially regulated in *A. pleuropneumoniae* attached to SJPL and during a natural infection. In both cases, the gene was down-regulated and mutation was associated with an enhanced-biofilm phenotype. A negative relationship between the presence of APL\_0049 and attachment probably exists, since in the absence of APL\_0049, *A. pleuropneumoniae* adhesion improved in our microtiter plates. We can hypothesize that the expression APL\_0049 is detrimental to the attachment; however, further investigation is required. It is important to note that although the SJPL cell line was recently found by our group to be not of porcine origin (Silversides et al., 2010), it still remains an interesting *in vitro* model to study porcine respiratory pathogens as it is permissive to porcine reproduction and respiratory syndrome virus (Jacques M. And C.A. Gagnon, unpublished data).

To determine if the genes identified in our study were conserved among different field isolates and reference strains, our list of genes were compared to the list of divergent genes identified by Gouré et al. (2009). All the genes identified in our study are highly conserved among the reference strains representing the 15 serotypes and field isolates of *A. pleuropneumoniae*. This suggests that the genetic determinants identified in our study are likely involved in biofilm formation of other strains of *A. pleuropneumoniae* and is not limited to serotype 1.

Despite a good coverage of the genome and a screen that allowed for the identification of known and new genetic determinant of biofilm formation, the absence of several genes were noted. In addition to *hns*, 6 other genes have been associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*; *arcA*, *luxS*, *aasP*,  $\sigma^E$  or *pga* mutants were not isolated. Furthermore, adhesin mutants such as type IV fimbriae (*apfABCD*) mutants were also absent in our screen. This could be attributed to the fact that our mutant library represented a small set of genes and a larger number of mutants will need to be screened. However, screening a larger number of transposon mutants may not yield a larger amount of genes. For example, Loo et al



(2000) screened 25,000 *Streptococcus gordonii* transposon mutants to obtain 18 biofilm-negative mutants while Puttamreddy et al. (2010) screened 11,000 *E. coli* transposon mutants to identify 51 unique genes or intergenic regions. Furthermore, 3328 mutants of *Cronobacter sakazakii* were screened to obtain 21 biofilm mutants (Hartmann, et al., 2010). In addition, it is well known that transposons have insertion "hot spots" and thus, the transposon insertion is not a completely random process. Nonetheless, our study is the first to report a list of several genetic determinants associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*.

In conclusion, the screen of a transposon library was successfully used to identify genes involved in biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* and this analysis included a mix of new genes and genes previously associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae* and in other bacterial species. Future studies are needed to determine the exact role of these genes during biofilm formation. Furthermore, a larger screen of transposon mutants as well as a transcriptomic profile of cells within a biofilm are needed to generate a more exhaustive and complete list of genetic determinants associated with biofilm formation in *A. pleuropneumoniae*.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (0003428) to M. Jacques. We would also like to acknowledge Mathieu Lauvernier for his technical assistance and Jenny-Lee Thomassin for proofreading the manuscript.

#### **REFERENCES**

- Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J.H., Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M., Jacques, M. 2009. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infect. Immun.* 77, 1426-1441.
- Ballering, K.S., Kristich, C.J., Grindle, S.M., Oromendia, A., Beattie, D.T., Dunny, G.M. 2009. Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. *J. Bacteriol.* 191, 2806-2814.

Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. J. Bacteriol. 186, 4665-4684.

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.

Bredenbruch, F., Nimitz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R., Häussler, S. 2005. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. J. Bacteriol. 187, 3630-3635.

Buettner, F.F., Maas, A., Gerlach, G.F. 2008. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* *arcA* deletion mutant is attenuated and deficient in biofilm formation. Vet. Microbiol. 127, 106-115.

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

Dalai, B., Zhou, R., Wan, Y., Kang, M., Li, L., Li, T., Zhang, S., Chen, H. 2008. Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microb. Pathog. 46, 128-134 .

Deslandes, V., Denicourt, M., Girard, C., Harel, J., Nash, J.H., Jacques, M. 2010. Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the acute phase of a natural infection in pigs. BMC Genomics 11, 98.

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

Gouré, J., Findlay, W.A., Deslandes, V., Bouevitch, A., Foote, S.J., MacInnes, J.I., Coulton, J.W., Nash, J.H., Jacques, M. 2009. Microarray-based comparative genomic

profiling of reference strains and selected Canadian field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. BMC Genomics 10, 88.

Hartmann, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L., Riedel, K. 2010. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2251-2261.

Houot, L., Chang, S., Pickering, B.S., Absalon, C., Watnick, P.I. 2010. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. J. Bacteriol. 192, 3055-3067.

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.

Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y.D.N. 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Anim. Health Res. Rev. 11, 97-121.

Kaplan, J. B., Mulks, M. H. 2005. Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Microbiol. 108, 89-94.

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., Duncan, T.R., Watnick, P.I. 2005. NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. J. Bacteriol. 187, 7434-7443.

Kwon, Y. M., Ricke, S. C. 2000. Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences. J. Microbiol. Methods 41, 195-199.

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.

Labrie, J., Rioux, S., Wade, M.M., Champlin, F.R., Holman, S.C., Wilson, W.W., 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.

Lau, P.C.Y., Lindhout, T., Beveridge, T.J., Dutcher, J.R., Lam, J.S. 2009. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. J. Bacteriol 191, 6618-6631.

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

Loo, C.Y., Corliss, D.A., Ganeshkumar, N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J. Bacteriol. 182, 1374-1382.

Müsken, M., Di Fiore, S., Dötsch, A., Fischer, R., Häussler, S. 2010. Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. Microbiology 156, 431-41.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol. 8, 151-156.

Puttamreddy, S., Cornick, N.A., Minion, F.C. 2010. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. Infect. Immun. 78, 2377-2384.

Ramjeet, M., Deslandes, V., Michael, F.S., Cox, A.D., 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.

Ramjeet, M., Cox, A.D., Hancock, M.A., Mourez, M., Labrie, J., Gottschalk, M., Jacques, M. 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, 221-235.

Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, J.D., Jacques, M. 1999. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Can. J. Microbiol. 45, 1017-1026.

Silversides, D.W., Music, N., Jacques, M., Gagnon, C.A., Webby, R. 2010. Investigation of the species origin of the St. Jude porcine lung epithelial cell line (SJPL) made available to researchers. J. Virol. 84, 5454-5455.

Straus, D., Ausubel, F.M. 1990. Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1889-1893.

Tascon, R.I., Rodriguez-Ferri, E.F., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Barbosa, I., Berche, P., Vazquez-Boland, J.A. 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. J. Bacteriol. 175, 5717-5722.

Tegetmeyer, H.E., Fricke, K., Baltés, N. 2009. An isogenic *Actinobacillus pleuropneumoniae* AasP mutant exhibits altered biofilm formation but retains virulence. Vet. Microbiol. 137, 392-396.

De Vriendt, K., Theunissen, S., Carpentier, W., De Smet, L., Devreese, B., Van Beeumen, J. 2005. Proteomics of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm reveals differentially expressed proteins, including AggA and RibB. Proteomics 5, 1308-1316.

Wen, Z.T., Suntharaligham, P., Cvitkovitch, D.G., Burne, R.A. 2005. Trigger factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 73, 219-225.

**Table 1.** Oligonucleotide primers used in this study.

<b>Name</b>	<b>Sequence (5'→3')</b>
Linker 1	TTTCTGCTCGAATTCAAGCTTCTAACGATGTACGGGGACACATG
Linker 2	TGTCCCCGTACATCGTTAGAACTACTCGTACCATCCACAT
Y linker primer	CTGCTCGAATTCAAGCTTCT
Tn 10 primer	GTTGTAACACTGGCAGAG
KMTN903-L	AAGGGGTGTTATGAGCCATATT
KMTN903-R	CCAATTCTGATTAGAAAAAGTC

Table 2. *A. pleuropneumoniae* 4074NaIR enhanced-biofilm mutants identified and sequenced in the present study.

Letter <sup>1</sup>	Mutant id	APL <sup>3</sup>	Gene	Gene product	Functional Class <sup>4</sup>
A	M4	Intergenic (0048 & 0049)		APL_0049 <sup>5</sup> : Hypothetical protein	HUU
B	B22* <sup>2</sup>				
B	C8	0448	<i>hns</i>	DNA-binding protein	DNA
B	M2*				
C	427	0637		Hypothetical protein	HUU
D	X34	Intergenic (0650 & 0651)	<i>galU</i>	APL_0650: Hypothetical protein APL_0651: UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Intergenic
E	M1	1387		Hypothetical protein	HUU

<sup>1</sup> Refers to the letters used in Figure 1 and 2A.

<sup>2</sup>\* indicate similar insertion sites.

<sup>3</sup>NCBI: Locus tag.

<sup>4</sup>DNA: DNA metabolism; HUU: hypothetical proteins / unclassified / unknown

<sup>5</sup> Gene mostly likely affected by insertion



Table 3. *A. pleuropneumoniae* 4074 NaIR reduced-biofilm mutants identified and sequenced in the present study.

Number <sup>1</sup>	Mutant id	APL <sup>3</sup>	Gene	Gene product	Functional Class <sup>4</sup>
1	T7* <sup>2</sup>	0148	<i>rnr1</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase large chain	PPNN
1	T17*				
2	V44	0189	<i>dus</i>	tRNA-dihydrouridine synthase B	CIM
2	306				
2	454				
3	739	0368	<i>potD2</i>	spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	TBP
4	320	Intergenic (0383 & 0384)	<i>ribA</i> <sup>5</sup>	APL_0384 <sup>5</sup> : riboflavin biosynthesis protein	BCPC
5	T16	0736	<i>pyrF</i>	orotidine 5`-phosphate decarboxylase	PPNN
6	54*	1323	<i>ptsI</i>	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	TBP
6	62*				
7	589	1386	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	PS
8	112	1507	<i>tig</i>	Trigger factor	PF
9	556*	Intergenic (1572 & 1573)		APL_1572 <sup>5</sup> : Hypothetical protein	HUU
9	563*				
10	169			16S Ribosomal RNA	PS
11	57			23S Ribosomal RNA	PS
	102				

<sup>1</sup> Refers to the numbers used in Figure 1 and 2A.

<sup>2</sup>\* indicate similar insertion sites.

<sup>3</sup> NCBI Locus tag.

<sup>4</sup> BCPC: biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers; CIM: central intermediary metabolism; PF: protein fate; PS: protein synthesis; PPNN: purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides and TBP: transport and binding proteins.

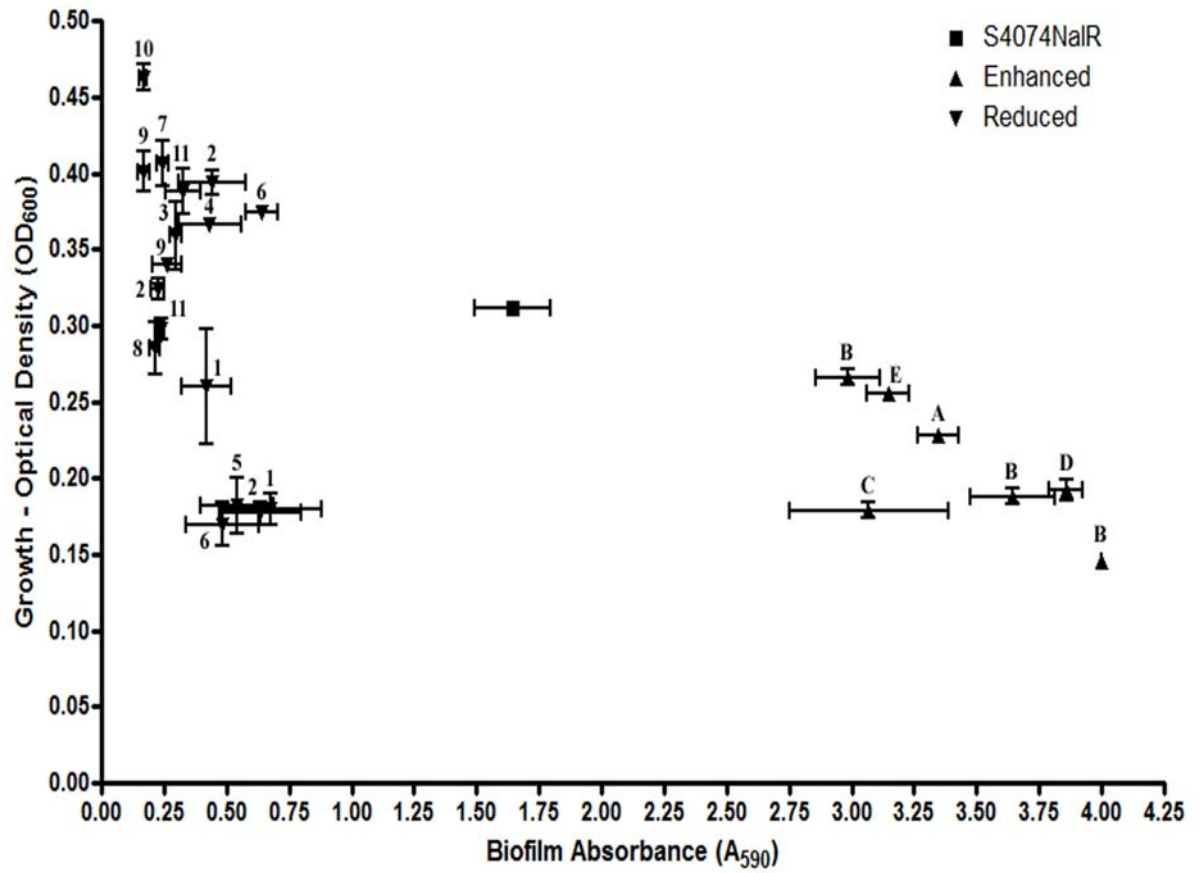
<sup>5</sup> Gene mostly likely affected by insertion

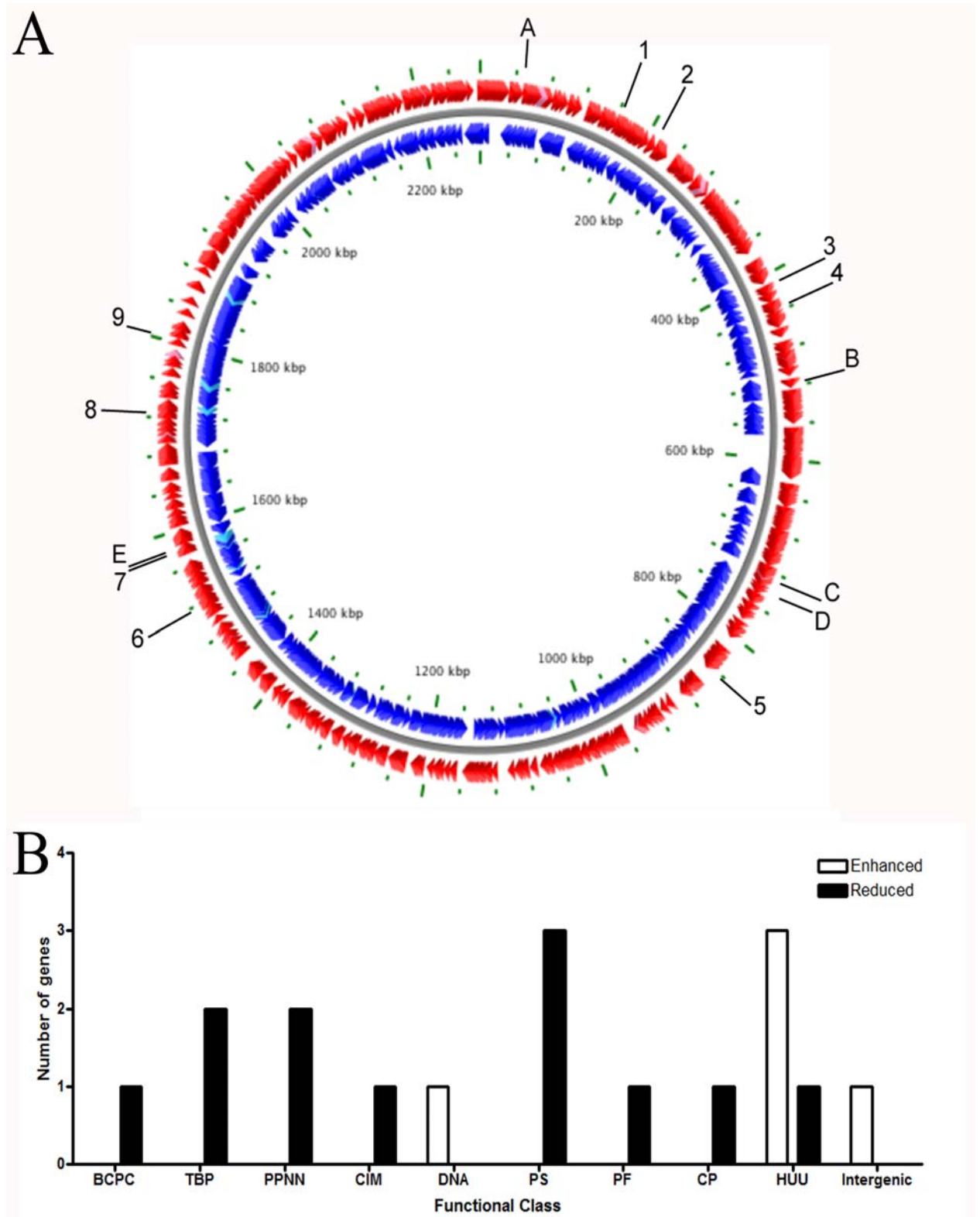
**Figure 1.** Comparison between the amount of biofilm and the growth of the 24 mutants sequenced *A. pleuropneumoniae* mutants after 6 h of incubation. The triangles represent biofilm-enhanced mutants, the up-side down triangles represent the reduced-biofilm mutants and the squares represents the parental strain 4074NaIR. The results presented are the means ( $\pm$ SE) of three or four independent experiments, each performed in triplicate. Letters and numbers refer to the description of the mutants in Tables 2 and 3.

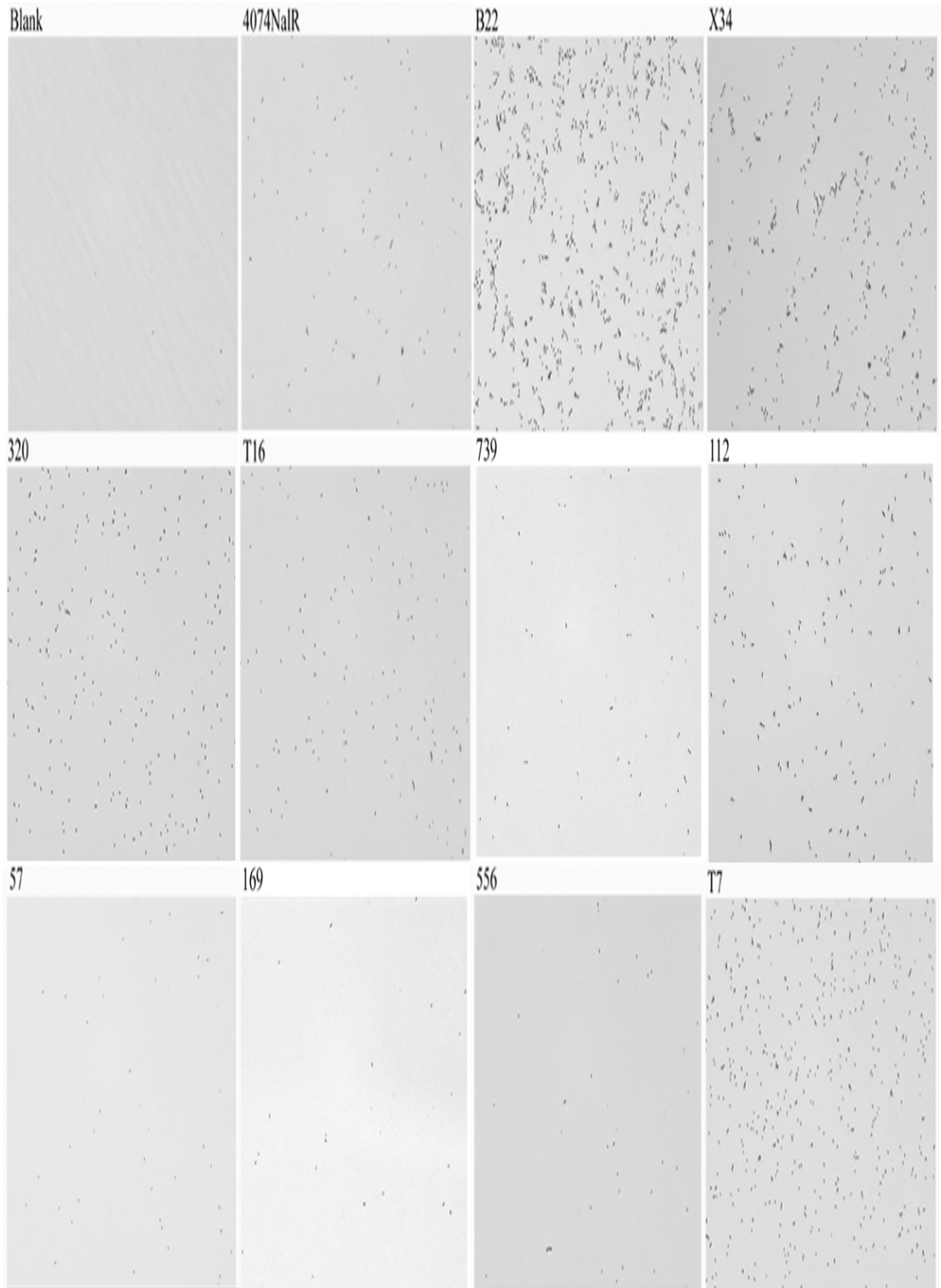
**Figure 2.** Genome distribution (A) and functional classification (B) of the different genes identified in *A. pleuropneumoniae* enhanced-biofilm mutants and reduced-biofilm mutants. BCPC: biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers; TBP: transport and binding proteins; PPNN: purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides; CIM: central intermediary metabolism; DNA: DNA metabolism; PS: protein synthesis; PF: protein fate; CP: cellular processes; and HUU: hypothetical proteins/unclassified/unknown.

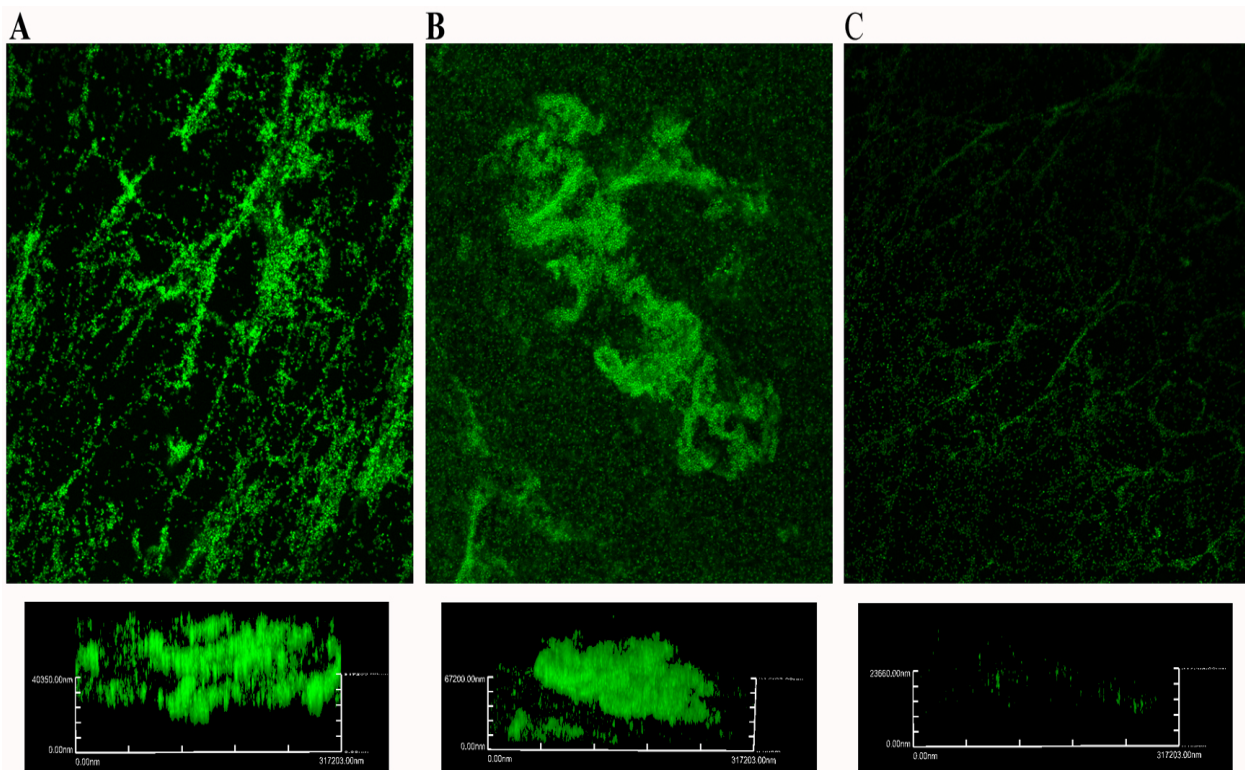
**Figure 3.** Initial attachment to the plastic substrate by *A. pleuropneumoniae* parental strain (4074NaIR), two enhanced-biofilm mutants (B22 and X34) and eight reduced-biofilm mutants (57, 112, 169, 320, 556, 739, T7 and T16). Bacteria were observed at 40X magnification.

**Figure 4.** Confocal scanning laser microscopy images of 6h-biofilms stained with Film Tracer<sup>™</sup> FM<sup>®</sup> 1-43 produced by the parental strain (A: 4074 NaIR), an enhanced biofilm mutant (B: *hns* mutant), and a reduced biofilm mutant (C: *rpmF* mutant) of *A. pleuroneumoniae*. Images of the X-Z plane of the biofilms are included below their corresponding top view images.









## **VII. DISCUSSION**

De nos jours, à travers le monde, de grandes quantités d'antibiotiques, de désinfectants et d'agents de conservation sont utilisés afin d'éliminer ou contrôler la croissance microbienne. Cette approche est efficace afin de contrôler la croissance des micro-organismes en suspension dans un liquide. Cette façon ancestrale de cultiver les micro-organismes fait ressortir la perception que les bactéries vivent en tant qu'organismes unicellulaires. Cependant, après une observation détaillée de multiples écosystèmes naturels et les avancées récentes en microbiologie, il est devenu évident que dans la nature, l'activité microbienne est majoritairement associée aux surfaces. Il apparaît maintenant que la capacité à former un biofilm coopératif et structuré de micro-organismes associés à une surface est une des caractéristiques les plus remarquables de ceux-ci. Cette nouvelle façon de voir la biomasse microbienne en tant que communauté organisée et dynamique, implique de reconsidérer les stratégies traditionnellement utilisées pour contrevenir aux effets néfastes du développement de ces communautés microbiennes.

Chez les bactéries pathogènes, la formation de biofilm est souvent considérée comme un important facteur de virulence pendant les infections persistantes. Récemment, il a été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* est capable de former des biofilms sous des conditions spécifiques (Kaplan et Mulks 2005) (Labrie, Pelletier-Jacques et al. 2010).

Le but de ce travail était de créer une banque de mutants à l'aide du transposon mini-*Tn10* afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* sur des surfaces abiotiques. Au préalable, il faut savoir que la mutagenèse par transposition est une approche complexe. Différentes études ont utilisé des banques de mutants par transposition pour identifier des gènes impliqués dans la formation de biofilm.

Un total de 1200 mutants par transposition d'*A. pleuropneumoniae* a été criblé pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la formation de biofilm. Le criblage préliminaire a identifié 24 mutants dont la formation de biofilm est modifiée et dont le site d'insertion de transposon a été identifié suite à des analyses poussées. Au moins 16 gènes uniques ont été affectés par l'insertion de transposons, incluant le



gène *hns*, un gène déjà associé à la formation de biofilm augmentée. Une étude de (Bossé 2010) a identifié deux régulateurs de l'opéron *pga*. Le premier nommé, HNS, régule la formation de biofilm en réprimant l'opéron PGA. Le deuxième,  $\sigma^E$ , régule positivement l'expression de l'opéron PGA et indiquerait que la formation de biofilm fait partie de la réponse au stress de l'enveloppe cellulaire chez *A. pleuropneumoniae* (Bossé 2010). De plus, plusieurs gènes identifiés dans notre criblage sont également impliqués dans la formation de biofilm chez d'autres bactéries. Par exemple, des mutants de *dus*, *potD2* ou des homologues de *rpmF* chez *P. aeruginosa* ont une capacité réduite à former des biofilms (Müsken et al 2010). Ces trois gènes ont été classés dans le groupe des mutants ayant une capacité réduite à former des biofilms dans cette étude. Le rôle prédit de PotD2, nommé norspermidine, une protéine qui lie la polyamine/spermidine, est important pour la formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* (Karatan et al 2005). La mutation du gène *npsS*, un homologue de *potD2*, a résulté à la capacité réduite à former des biofilms et à exprimer les gènes associés à la synthèse des exopolysaccharides. En plus des trois gènes mentionnés ci-dessus, le mutant *ribA* a été classifié parmi les mutants dont la formation de biofilm est réduite. Les gènes associés à la synthèse de la riboflavine semble être surexprimés pendant la formation de biofilm chez *Shewanella oneidensis* (De Vriendt et al 2005). La surexpression du gène *pyrF* pendant la formation de biofilm chez *S. aureus* et ce déterminant génétique a été retrouvé chez les mutants ayant une formation de biofilm réduite (Beenken et al 2004). La phosphotransférase (mutants 54 et 62) est aussi impliquée dans la formation de biofilm chez plusieurs espèces bactériennes dont *V. cholerae* (Houot et al 2010). L'identification de plusieurs gènes associés à la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* et d'autres espèces bactérienne permet la validation de notre méthode de criblage qui à son tour a permis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la formation de biofilm. Parmi les nouveaux gènes identifiés, tous les gènes, à l'exception d'APL-1572, pourraient être regroupés selon la fonction prédite de leurs protéines.

Les classes de 'protéines de synthèse', 'purines, pyrimidines, nucléosides, et nucléotides' et de 'protéines de transcription et de transport' ont été les plus grandes classes: 2 à 3 gènes ont été associés à chaque classe. Les gènes impliqués dans la synthèse des protéines et de transport tendent à être le type fonctionnel le plus fréquemment retrouvé dans un criblage de déterminants génétiques impliqués dans la

formation de biofilm (Ballering et al 2009 et Puttamreddy et al 2010). Le groupe des protéines ‘hypothétiques / non classifiées / non connues’ représente également une des plus grandes classes identifiées. Dans certaines études, ce groupe peut représenter 22% à 67% des gènes identifiés au total. Une autre classe d’intérêt est celle de ‘purines, pyrimidines, nucléosides, et nucléotides’ qui n’est pas très souvent détectées pendant de grands criblages (Ballering et al 2009, Müsken et al 2010).

Les gènes dont *rnr1* et *pyrF* sont retrouvés parmi cette classe et joueraient probablement un rôle-clé pendant la synthèse des précurseurs de signaux de type cellule-à-cellule ou de stress tel que les quinolones-alkyl (Brendenbruch et al 2005). Au moins trois gènes associés à la formation de biofilm augmentée codent pour des protéines dont les fonctions demeurent inconnues. Ce fait est d’un intérêt particulier puisque il pourrait mener à une meilleure compréhension de nouveaux mécanismes impliqués dans la formation de biofilm chez les *Pasteurellaceae* et pourrait aider à caractériser la fonction de ces protéins hypothétiques.

Les gènes APL-1387 et *rpmF* représentent un intérêt puisque les deux semblent être dans le même opéron mais ont des effets différents sur la formation de biofilm. Le mutant X34 est également intéressant puisque le site de d’insertion du transposon pourrait interférer avec l’expression de *galU*, et par conséquent, avec la biosynthèse et les propriétés des oligosaccharidiques au coeur du LPS. L’impact de la mutation du gène *galU* sur la structure et les propriétés du LPS a été étudié chez la souche S4074 d’*A. pleuropneumoniae* (Ramjeet et al 2005, 2008). De plus, la modification du LPS influx sur les propriétés mécaniques et structurales des biofilms de *P. aeruginosa* (Lau et al 2009).

La classification fonctionnelle est un bon outil pour cerner le rôle potentiel du déterminant génétique identifié. Par contre, il est difficile de formuler des hypothèses en se basant sur les différences de la formation de biofilms entre la souche parentale et les mutants. Par exemple, la dispersine B peut complètement disperser les biofilms produits par les mutants-augmentés ce qui nous indique que les biofilms de ces mutants sont dépendants du polymère PGA. Les mutants dont la capacité augmentée à former des biofilms semblent posséder une meilleure habilité à adhérer à la surface de polystyrène de la microplaque qui n’était pas associée à un changement

d'hydrophobicité de la surface cellulaire. Cette capacité augmentée à adhérer au support de polystyrène n'était pas associée à un attachement aux cellules NPTr augmenté.

Dans le cas des mutants *hns* (B22, M2 et C8), on sait qu'un mutant *hns* surexprime l'opéron *pga* (Bossé et al 2010) et que ceci résulterait dans la surproduction du polymère PGA qui pourrait agir comme une adhésine additionnelle pour ces mutants. La surproduction de PGA aiderait à atteindre un biofilm de haute densité cellulaire ce qui a été observé en microscopie confocale. Cette technique nous a permis de montrer que les mutants dont la formation de biofilm est augmentée possèdent une matrice d'exopolysaccharide plus épaisse que la souche parentale. De la même façon, les biofilms plus minces ont été observés chez les mutants diminués. Ces observations nous ont permis de caractériser et de confirmer encore une fois la présence de deux classes de mutants. Ces résultats correspondent à nos attentes puisque les mutants qui ont un biofilm plus épais produisent beaucoup plus de biofilms que les mutants diminués.

Nous avons utilisé un modèle d'adhérence *in vitro* qui a été développé dans notre laboratoire par Auger et al (2009) pour quantifier l'adhérence de nos mutants à une lignée cellulaire porcine. Parmi les mutants dont la capacité à former des biofilms est réduite, quelques uns de ces mutants adhèrent faiblement tandis que d'autres montrent les mêmes capacités d'adhérence que la souche parentale. Encore, ces changements dans la capacité à adhérer n'étaient pas associés à des changements d'hydrophobicité ni à l'attachement aux cellules NPTr.

En effet, chez les mutants déficients dans la formation de biofilm et dans l'adhérence à une surface, on sait que l'étape de l'attachement peut devenir un facteur limitant lorsqu'ils forment des biofilms. En revanche pour les mutants ayant une capacité à former des biofilms mais que la capacité est la même ou augmentée, les facteurs limitants se produisent pendant la phase de croissance ou pendant la maturation du biofilm. Cette idée est appuyée par l'analyse en microscopie confocale des biofilms formés par le mutant *rpmF*. Ce mutant s'est attaché à la surface mais le biofilm semblait manquer une structure tridimensionnelle complexe. Donc, il est clair

que chaque déterminant génétique devra être plus étudié pour déterminer leur rôle précis dans la formation de biofilm.

Afin de faire une analyse plus poussée des données obtenues, les déterminants génétiques ont été comparés aux gènes cibles pendant l'analyse biopuces de notre laboratoire, surtout pour ceux obtenus pour *A. pleuropneumoniae* attaché aux cellules SPJL (Auger et al 2009) et pendant la phase aiguë de l'infection naturelle (Deslandes et al 2010). Le gène APL\_0049 était le seul à être régulé différemment chez *A. pleuropneumoniae* attaché aux cellules SJPL et lors de l'infection naturelle. Dans les deux cas, le gène était non exprimé et la mutation fut associée au phénotype de formation de biofilm augmentée. Une relation négative existe entre la présence de l'APL\_0049 et l'attachement puisque l'absence de l'APL\_0049 entraîne une adhésion améliorée à la microplaque par *A. pleuropneumoniae*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'expression de l'APL\_0049 nuit à l'attachement par contre, des études plus poussées sont requises pour confirmer cela.

Afin de déterminer si les gènes identifiés par notre étude sont conservés parmi différents isolats et souches de champs, notre liste de gènes a été comparée à la liste des gènes identifiés par Gouré et al. (2009). Tous les gènes identifiés par notre étude sont hautement conservés parmi les souches de référence représentant les 15 sérotypes et les souches de champs d'*A. pleuropneumoniae*. Ceci suggère que les déterminants génétiques identifiés par notre étude sembleraient être impliqués dans la formation de biofilm chez d'autres souches d'*A. pleuropneumoniae* et ne seraient pas limités au sérotype 1.

Malgré un séquençage et une étude extensive du génome qui ont permis l'identification des gènes connus et de nouveaux déterminants génétiques de la formation de biofilm, l'absence de plusieurs gènes a été notée.

En plus de *hns*, 6 autres gènes ont été associés à la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*. Par contre, des mutants pour les gènes *arcA* (Buettner, Maas et al. 2008), *luxS* (Li, 2008), *aasP* (Tegetmeyer, Fricke et al. 2009),  $\sigma E$  (Bosse, Sinha et al. 2010) ou *pga* (Itoh, Rice et al. 2008) n'ont pas été isolés dans notre étude.

De plus, des mutants au niveau des adhésines dont le fimbriae de type IV (*apfABCD*) étaient également absents de notre criblage. Ceci pourrait être expliqué par le fait que notre banque de mutants représentait un petit nombre de gènes et qu'un plus grand nombre de mutants aurait besoin d'être criblé. Par contre, le criblage d'un plus grand nombre de mutants par transposition ne donnera pas forcément une plus grande quantité de gènes. Par exemple, Loo et al. (2000) ont criblé 25,000 mutants de *Streptococcus. gordonii* par transposition pour obtenir 18 mutants déficients dans la capacité à former des biofilms tandis que Puttamreddy et al. (2010) ont criblé 11,000 mutants d'*E. coli* pour identifier 51 gènes uniques ou des régions intergéniques. Dans une autre étude, Hartman et al 2010 (Hartmann, Carranza et al. 2010) ont criblé une banque de 3328 mutants chez *Cronobacter sakazakii* ; un total de 21 mutants a été sélectionné pour la formation de biofilm.

Il est aussi connu que les transposons ont des sites d'insertion préférentiels nommés 'hot spots' et donc, l'insertion de transposon n'est pas un processus complètement aléatoire. Néanmoins, notre étude est la première à établir une liste de plusieurs déterminants génétiques associés à la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*. Tel que mentionné ci-dessus, l'utilisation d'une banque de mutants combinée à un criblage employant un modèle défini permet l'identification de nouveaux gènes associés à la formation de biofilm.

Une autre étude effectuée en parallèle des tests de la formation de biofilms en présence de phospholipides a été fait pour voir si la restauration du phénotype biofilm diminué ou augmenté est possible (Annexe). Cette étude n'a pas permis de vérifier nos hypothèses. L'ajout de phospholipides devrait diminuer la formation de biofilm chez les mutants augmentés et augmenter la formation de biofilms chez les mutants diminués. Nos résultats sont difficilement explicables, nous n'avons pas poursuivi cette avenue. Néanmoins les voies métaboliques des acides gras et des phospholipides semblent être impliqué d'une quelconque façon dans la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*.

En résumé dans cette étude nous avons découvert des gènes impliqués dans les protéines de surface, le métabolisme et dans l'enveloppe cellulaire. Toutes ces fonctions sont essentielles à la formation de biofilm. Cependant, les gènes *ArcA* qui

est un facteur anaérobique, *LuxS* qui intervient dans le quorum sensing, *AasP* un autotransporteur et le *pga* n'ont pas été retrouvés dans notre criblage. Ceci peut être due au fait que notre banque de mutants cible un nombre trop restreint de gènes donc à l'avenir il serait plus judicieux de cribler un plus grand nombre de mutants. Néanmoins nous avons identifié le gène *hns* qui est impliqué dans la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* permettant ainsi de valider notre méthode de criblage.

En conclusion, le criblage d'une banque de transposons a été effectué avec succès pour identifier des nouveaux gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*. Cette analyse incluait un mélange de nouveaux gènes et de gènes déjà associés à la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae* et d'autres espèces bactériennes.

D'autres études sont requises pour déterminer le rôle précis de ces gènes pendant la formation de biofilm. De plus, un plus grand criblage de mutants par transposition ainsi qu'un profil transcriptomique des cellules à l'intérieur d'un biofilm sont nécessaires afin de générer une liste plus exhaustive et complète des déterminants génétiques associés à la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*.

## VIII. CONCLUSION

Le mode de vie en biofilm est prédominant chez les organismes unicellulaires. L'autre alternative est la flottaison libre qualifiée de "planctonique". Cette dernière a longtemps été considérée comme leur unique forme de vie. Ce n'est que récemment que les concepts à l'origine des problématiques de recherche en biologie ont été revus, comme le montre par exemple la prise en considération des biofilms dans les infections chroniques. Comme nous l'avons repris à divers niveaux du présent travail, l'importance des biofilms tient, entre autres, à leur capacité de résister à divers stress (rôle de la matrice d'exopolysaccharides). La présence de biofilms a un impact considérable, que ce soit dans l'agro-alimentaire (salubrité), l'industrie ou le milieu médical (biofilms et infections nosocomiales) et vétérinaire. La formation de biofilms est influencée par divers type de support. De façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité d'une surface et la présence préalable de films protéiques influencent l'attachement des micro-organismes à cette surface et favorisent la formation d'un biofilm. Les biofilms se fixent plus facilement sur des surfaces recouvertes de protéines ou de glucides que sur des surfaces recouvertes de lipides.

Ce travail nous a permis d'en apprendre davantage sur la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*. Notre criblage a permis d'identifier des gènes connus impliqués dans la formation de biofilms chez *A. pleuropneumoniae* (*hns*) ou chez d'autres pathogènes (*potD2*, *ptsI*, *tig* et *rpmF*) mais également des nouveaux gènes impliqués dans la formation de biofilm (*APL\_0049*, *APL\_0637* et *APL\_1573*) qui n'ont pas été identifiés chez d'autres pathogènes. Une caractérisation plus poussée de ces gènes nous permettra d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*.

Néanmoins ce projet ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étude du rôle du LPS dans la formation de biofilm. Il serait également intéressant de vérifier si la perte de la formation de biofilm ou l'hyperproduction de biofilm influencent la virulence *in vivo* de la bactérie. Les mécanismes de régulation de la formation de biofilm est un processus complexe et reste un sujet vaste à explorer.



## **IX. BIBLIOGRAPHIE**

- Aeschlimann, J. R. (2003). "The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists." Pharmacotherapy 23(7): 916-924.
- Allison, D. G., B. Ruiz, et al. (1998). "Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms." FEMS Microbiol Lett 167(2): 179-184.
- Altman, E., J. R. Brisson, et al. (1992). "Structure of the capsular polysaccharide of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5b." Eur J Biochem 204(1): 225-230.
- Arnold, J. W. and G. W. Bailey (2000). "Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study." Poult Sci 79(12): 1839-1845.
- Auger, E., V. Deslandes, et al. (2009). "Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells." Infect Immun 77(4): 1426-1441.
- Autret, N., I. Dubail, et al. (2001). "Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged transposon mutagenesis." Infect Immun 69(4): 2054-2065.
- Ballering, K.S., Kristich, C.J., Grindle, S.M., Oromendia, A., Beattie, D.T., Dunny, G.M. 2009. Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. J. Bacteriol. 191, 2806-2814.
- Baltes, N., F. F. Buettner, et al. (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., W. Tonpitak, et al. (2001). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response." Infect Immun 69(1): 472-478.
- Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. J. Bacteriol. 186, 4665-4684.

- Beloin, C., A. Roux, et al. (2008). "*Escherichia coli* biofilms." Curr Top Microbiol Immunol 322: 249-289.
- Bertschinger, H. U. a. S., P. (1978). "Isolation of *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pleuropneumoniae." Proc 5th International Congres Pig Vet Soc.
- Bjarnsholt, T., P. O. Jensen, et al. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent." Microbiology 151(Pt 2): 373-383.
- Blackall, P. J., H. L. Klaasen, et al. (2002). "Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15." Vet Microbiol 84(1-2): 47-52.
- Bossé, J. T., H. Janson, et al. (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., S. Sinha, et al. (2010). "Regulation of pga operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by sigmaE and H-NS." J Bacteriol 192(9): 2414-2423.
- Boyd, A., et A. M. Chakrabarty (1995). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide." J. Ind. Microbiol. 15: 162-168.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R., Häussler, S. 2005. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. J Bacteriol 187, 3630–3635.
- Brisson, J. R., E. Crawford, et al. (2002). "The core oligosaccharide component from *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotype A1 lipopolysaccharide contains L-glycero-D-manno- and D-glycero-D-manno-heptoses: Analysis of the structure and conformation by high-resolution NMR spectroscopy." Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie 80(8): 949-963.
- Buettner, F. F., A. Maas, et al. (2008). "An *Actinobacillus pleuropneumoniae* arcA deletion mutant is attenuated and deficient in biofilm formation." Vet Microbiol 127(1-2): 106-115.
- Burmolle, M., J. S. Webb, et al. (2006). "Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by

- synergistic interactions in multispecies biofilms." Appl Environ Microbiol 72(6): 3916-3923.
- Busalmen, J. P. and S. R. de Sanchez (2001). "Influence of pH and ionic strength on adhesion of a wild strain of *Pseudomonas sp.* to titanium." J Ind Microbiol Biotechnol 26(5): 303-308.
- Busscher, H. J., A. H. Weerkamp, et al. (1984). "Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion." Appl Environ Microbiol 48(5): 980-983.
- Carpentier, B. and O. Cerf (1993). "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry." J Appl Bacteriol 75(6): 499-511.
- Cho, S. H., K. Naber, et al. (2002). "Detection of the icaADBC gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections." Int J Antimicrob Agents 19(6): 570-575.
- Chung, J. W., C. Ng-Thow-Hing, et al. (2007). "Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions." Proteomics 7(11): 1854-1865.
- Clutterbuck, A. L., C. A. Cochrane, et al. (2007). "Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model." Ann Clin Microbiol Antimicrob 6: 2.
- Clutterbuck, A. L., E. J. Woods, et al. (2007). "Biofilms and their relevance to veterinary medicine." Vet Microbiol 121(1-2): 1-17.
- Costerton, J. W. (1999). "Introduction to biofilm." Int J Antimicrob Agents 11(3-4): 217-221; discussion 237-219.
- Costerton, J. W. (2001). "Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection." Trends Microbiol 9(2): 50-52.
- Cotter, P. A. and S. Stibitz (2007). "c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation." Curr Opin Microbiol 10(1): 17-23.
- Dalai, B., R. Zhou, et al. (2008). "Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microb Pathog 6: 6.
- Davey, M. E., N. C. Caiazza, et al. (2003). "Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J Bacteriol 185(3): 1027-1036.

- Davies, D. G. and G. G. Geesey (1995). "Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture." Appl Environ Microbiol 61(3): 860-867.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, et al. (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science 280(5361): 295-298.
- De Kievit, T. R., M. D. Parkins, et al. (2001). "Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother 45(6): 1761-1770.
- Deslandes, V., M. Denicourt, et al. (2010). "Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the acute phase of a natural infection in pigs." BMC Genomics 11: 98.
- Deslandes, V., J. H. Nash, et al. (2007). "Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions." BMC Genomics 8(72): 72.
- Deziel, E., Y. Comeau, et al. (2001). "Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities." J Bacteriol 183(4): 1195-1204.
- Diarra, M. S., J. A. Dolence, et al. (1996). "Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores." Appl Environ Microbiol 62(3): 853-859.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." Emerg Infect Dis 8(9): 881-890.
- 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, et al. (1999). "Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation." FEMS Microbiol Lett 178(1): 169-175.
- Drenkard, E. (2003). "Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Microbes Infect 5(13): 1213-1219.
- Dubreuil, J. D., M. Jacques, et al. (2000). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity." Anim Health Res Rev 1(2): 73-93.

- El-Azami-El-Idrissi, M., C. Bauche, et al. (2003). "Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain." J Biol Chem 278(40): 38514-38521.
- Fedoraka-Cray, P. J., D. L. Stine, et al. (1993). "The importance of secreted virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin preparation: a comparison." Vet Microbiol 37(1-2): 85-100.
- Fittipaldi, N., A. Broes, et al. (2003). "Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs." J Clin Microbiol 41(11): 5085-5093.
- Fletcher, M. (1988). "Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance." J. Bacteriol. 170: 2027-2030.
- Foote, S. J., J. T. Bosse, et al. (2008). "The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b)." J Bacteriol 190(4): 1495-1496.
- Francey, T., F. Gaschen, et al. (2000). "The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit." J Vet Intern Med 14(2): 177-183.
- Frey, J. (1995). "Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins." Trends Microbiol 3(7): 257-261.
- Frey, J., A. Haldimann, et al. (1994). "Sequence analysis and transcription of the *apxI* operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Gene 142(1): 97-102.
- Frey, J., R. Meier, et al. (1991). "Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Infect Immun 59(9): 3026-3032.
- Fuller, T. E., M. J. Kennedy, et al. (2000). "Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis." Microb Pathog 29(1): 25-38.
- Fuller, T. E., R. J. Shea, et al. (1999). "Identification of in vivo induced genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microb Pathog 27(5): 311-327.
- Fuller, T. E., B. J. Thacker, et al. (2000). "A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine." Vaccine 18(25): 2867-2877.

- Gagné, A., S. Lacouture, et al. (1998). "Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils." J Clin Microbiol 36(1): 251-254.
- Ganeshnarayan K, S. S., Libera MR, Santostefano A, and Kaplan JB (2009). "Poly-N-acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms. ." Applied and Environmental Microbiology 75: 1308-1314.
- Garcia Gonzalez, O., R. M. Garcia, et al. (2004). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expression." FEMS Microbiol Lett 234(1): 81-86.
- Garrett, E. S., D. Perlegas, et al. (1999). "Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU)." J Bacteriol 181(23): 7401-7404.
- Gelosia, A., L. Baldassarri, et al. (2001). "Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence." Clin Microbiol Infect 7(4): 193-199.
- Gjermansen, M., P. Ragas, et al. (2005). "Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms." Environ Microbiol 7(6): 894-906.
- Goller, C. C. and T. Romeo (2008). "Environmental influences on biofilm development." Curr Top Microbiol Immunol 322: 37-66.
- Gottschalk, M. (2007). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence." In American association of swine veterinarians (AASV) Orlando, Florida.: 381-384.
- Gotz, F. (2002). "*Staphylococcus* and biofilms." Mol Microbiol 43(6): 1367-1378.
- Gouré, J., W. A. Findlay, et al. (2009). "Microarray-based comparative genomic profiling of reference strains and selected Canadian field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." BMC Genomics 10(88): 88.
- Griffiths, P. G., T. S. Elliot, et al. (1989). "Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to intraocular lenses." Br J Ophthalmol 73(6): 402-406.
- Haesebrouck, F., K. Chiers, et al. (1997). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection." Vet Microbiol 58(2-4): 239-249.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, et al. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbiol 2(2): 95-108.

- Hartmann, I., P. Carranza, et al. (2010). "Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation." Appl Environ Microbiol 76(7): 2251-2261.
- Heilmann, C., M. Hussain, et al. (1997). "Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface." Mol Microbiol 24(5): 1013-1024.
- Hinnebusch, B. J. and D. L. Erickson (2008). "*Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague." Curr Top Microbiol Immunol 322: 229-248.
- Houot, L., Chang, S., Pickering, B.S., Absalon, C., Watnick, P.I. 2010. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. J. Bacteriol. 192, 3055-3067.
- Hunt, M. L., D. J. Boucher, et al. (2001). "In vivo-expressed genes of *Pasteurella multocida*." Infect Immun 69(5): 3004-3012.
- Hyland, C., L. Vuillard, et al. (2001). "Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles." J Bacteriol 183(18): 5364-5370.
- Inzana, T. J., J. Ma, et al. (1988). "Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5." Infect Immun 56(8): 1880-1889.
- Irie, Y. and M. R. Parsek (2008). "Quorum sensing and microbial biofilms." Curr Top Microbiol Immunol 322: 67-84.
- Itoh, Y., J. D. Rice, et al. (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. A., H. Wang, et al. (2007). "Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS." J Dent Res 86(7): 618-622.
- Jacobsen, S. M., D. J. Stickler, et al. (2008). "Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*." Clin Microbiol Rev 21(1): 26-59.
- Jacques, M. (1996). "Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence." Trends Microbiol 4(10): 408-409.



- Jacques, M. (2004). "Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Can J Vet Res 68(2): 81-85.
- Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y.D.N. 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Anim. Health Res. Rev. 11, 97-121.
- Jacques, M., B. Foiry, et al. (1988). "Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." J Bacteriol 170(7): 3314-3318.
- Jarrett, C. O., E. Deak, et al. (2004). "Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector." J Infect Dis 190(4): 783-792.
- Jones, S. M., M. Morgan, et al. (2001). "Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms." Lancet 357(9249): 40-41.
- Juhas, M., L. Eberl, et al. (2005). "Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*." Environ Microbiol 7(4): 459-471.
- 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, et al. (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., Duncan, T.R., Watnick, P.I. 2005. NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. J. Bacteriol. 187, 7434-7443.
- Kodjikian, L., C. Burillon, et al. (2003). "Biofilm formation on intraocular lenses by a clinical strain encoding the ica locus: a scanning electron microscopy study." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(10): 4382-4387.
- Koronakis, V., E. Koronakis, et al. (1989). "Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes." EMBO J 8(2): 595-605.
- Labrie, J., G. Pelletier-Jacques, et al. (2010). "Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Res 41(1): 3.

- Labrie, J., S. Rioux, et al. (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.
- Langford, P. R., B. M. Loynds, et al. (1996). "Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Infect Immun 64(12): 5035-5041.
- Lau, P.C.Y., Lindhout, T., Beveridge, T.J., Dutcher, J.R., Lam, J.S. 2009. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. J. Bacteriol. 191, 6618-6631.
- Leite, F., S. Gyles, et al. (2003). "Prior exposure to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin or LPS enhances beta(2)-integrin expression by bovine neutrophils and augments LKT cytotoxicity." Microb Pathog 34(6): 267-275.
- Lewis, K. (2008). "Multidrug tolerance of biofilms and persister cells." Curr Top Microbiol Immunol 322: 107-131.
- Li, L., R. Zhou, et al. (2008). "Enhanced biofilm formation and reduced virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* luxS mutant." Microb Pathog 45(3): 192-200.
- Liu J, T. C., Li J, Chen H, Xu P, He Q, Bei W, and Chen H (2008). "Characterization of ISAp11, an insertion element from *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolate in China." Vet Microbiol 132: 348-354.
- Mack, D. (1999). "Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation." J Hosp Infect 43 Suppl(25): S113-125.
- Mack, D., J. Riedewald, et al. (1999). "Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination." Infect Immun 67(2): 1004-1008.
- MacLean, L. L., M. B. Perry, et al. (2004). "Characterization of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13." Infect Immun 72(10): 5925-5930.
- Mah, T. F., B. Pitts, et al. (2003). "A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance." Nature 426(6964): 306-310.

- Maroncle, N., D. Balestrino, et al. (2002). "Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis." Infect Immun 70(8): 4729-4734.
- McKenney, D., J. Hubner, et al. (1998). "The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin." Infect Immun 66(10): 4711-4720.
- Merz, A. J., M. So, et al. (2000). "Pilus retraction powers bacterial twitching motility." Nature 407(6800): 98-102.
- Michael, F. S., J. R. Brisson, et al. (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, et al. (2002). "Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (fhu) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microbiology 148(Pt 9): 2869-2882.
- Mikael, L. G., R. Srikumar, et al. (2003). "fhuA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron." Infect Immun 71(5): 2911-2915.
- Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). "Quorum sensing in bacteria." Annu Rev Microbiol 55: 165-199.
- Mittal, K. R., R. Higgins, et al. (1983). "Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test." J Clin Microbiol 18(6): 1351-1354.
- Müsken, M., Di Fiore, S., Dötsch, A., Fischer, R., Häussler, S. 2010. Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. Microbiology. 156, 431-41.
- Nicolet, J. (1990). "Overview of the virulence attributes of the HAP-group of bacteria." Can J Vet Res 54 Suppl(5): S12-15.
- O'Toole, G. A., K. A. Gibbs, et al. (2000). "The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol 182(2): 425-431.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998 a). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Mol Microbiol 30(2): 295-304.

- O'Toole, G. A., L. A. Pratt, et al. (1999). "Genetic approaches to study of biofilms." Methods Enzymol 310: 91-109.
- O'toole, G. A., et Kolter. (1998 b). "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis." Mol. Microbiol. 28(449-461).
- Osbourn, A. E., C. E. Barber, et al. (1987). "Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid." EMBO J 6(1): 23-28.
- Otto, M. (2008). "Staphylococcal biofilms." Curr Top Microbiol Immunol 322: 207-228.
- Parkins, M. D., H. Ceri, et al. (2001). "*Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation." Mol Microbiol 40(5): 1215-1226.
- Parsek, M. R. and C. Fuqua (2004). "Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life." J Bacteriol 186(14): 4427-4440.
- Parsek, M. R. and P. K. Singh (2003). "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis." Annu Rev Microbiol 57: 677-701.
- Pattison, I. H., Howell, D. J. and Elliot, J (1957). "A *Haemophilus*-like organism isolated from pigs lung and associated pneumonic lesion." J. Comp. Pathol 67: 320-329.
- Perry, M. B. (1990). "Structural analysis of the lipopolysaccharide of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 10." Biochem Cell Biol 68(4): 808-810.
- Perry, M. B., L. L. MacLean, et al. (2005). "Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15." Biochem Cell Biol 83(1): 61-69.
- Pinna, A., L. A. Sechi, et al. (2000). "Adherence of ocular isolates of *staphylococcus epidermidis* to ACRYSOF intraocular lenses. A scanning electron microscopy and molecular biology study." Ophthalmology 107(12): 2162-2166.
- Pohl, S., Bertschinger, H. U., Frederiksen, W. and Mannheim, W. (1983). "Transfert oh *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella hemolitica*-like organism

- causing porcine necrotic pleuropneumoniae to the genus *Actinobacillus* on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness." Internat. J. Syst Bacteriol. 33: 510-514.
- Pratt, L. A. and R. Kolter (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." Mol Microbiol 30(2): 285-293.
- Prigent- Combaret C, V. O., Dorel C et al. (1999). "Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*." J. Bacteriol 181: 5993-6002.
- Prigent-Combaret, C., E. Brombacher, et al. (2001). "Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene." J Bacteriol 183(24): 7213-7223.
- Puttamreddy, S., Cornick, N.A., Minion, F.C. 2010. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for *pO157* genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect. Immun.* 78, 2377-2384.
- Queck, S. Y., M. Weitere, et al. (2006). "The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing." Environ Microbiol 8(6): 1017-1025.
- Raetz, C. R. and C. Whitfield (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins." Annu Rev Biochem 71: 635-700.
- Ramjeet, M., A. D. Cox, et al. (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, et al. (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.
- Rioux, S., C. Galarneau, et al. (1999). "Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1." Can J Microbiol 45(12): 1017-1026.
- Rosendal, S., D. A. Boyd, et al. (1985). "Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria." Can J Comp Med 49(1): 68-74.

- Rycroft, A. N., D. Williams, et al. (1991). "The cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide." J Gen Microbiol 137(3): 561-568.
- Sailer, F. C., B. M. Meberg, et al. (2003). "beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett 226(2): 245-249.
- Sauer, F. G., M. Barnhart, et al. (2000). "Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment." Curr Opin Struct Biol 10(5): 548-556.
- Sauer, K. and A. K. Camper (2001). "Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth." J Bacteriol 183(22): 6579-6589.
- Schaller, A., R. Kuhn, et al. (1999). "Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microbiology 145 ( Pt 8)(Pt 8): 2105-2116.
- Schembri, M. A., K. Kjaergaard, et al. (2003). "Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms." Mol Microbiol 48(1): 253-267.
- Schindel, C., A. Zitzer, et al. (2001). "Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes. A study using cysteine scanning mutagenesis." Eur J Biochem 268(3): 800-808.
- Schutte, H., S. Rosseau, et al. (1997). "Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs." Am J Respir Crit Care Med 156(3 Pt 1): 819-824.
- Swartz, K. J. (2004). "*Actinobacillus pleuropneumoniae*." Swine disease manual, Iowa USA Third edition: 192.
- Shakarji, L., L. G. Mikael, et al. (2006). "Fhva and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants." Can J Microbiol 52(4): 391-396.
- Sheehan, B. J., J. T. Bosse, et al. (2003). "Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host." Infect Immun 71(7): 3960-3970.
- Sheehan, B. J., P. R. Langford, et al. (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.

- Sidibe, M., S. Messier, et al. (1993). "Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests." Can J Vet Res 57(3): 204-208.
- Smith, R. S. and B. H. Iglewski (2003). "*P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence." Curr Opin Microbiol 6(1): 56-60.
- Spormann, A. M. (2008). "Physiology of microbes in biofilms." Curr Top Microbiol Immunol 322: 17-36.
- Srikumar, R., L. G. Mikael, et al. (2004). "Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microbiology 150(Pt 6): 1723-1734.
- Stanley, P., L. C. Packman, et al. (1994). "Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin." Science 266(5193): 1992-1996.
- Stevenson, A., J. Macdonald, et al. (2003). "Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Vet Microbiol 92(1-2): 121-134.
- Stoodley, P., K. Sauer, et al. (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." Annu Rev Microbiol 56: 187-209.
- Taylor DJ, Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Megeling (1999). "Diseases of Swine." Ames, IA, Iowa State University Press.
- Tegetmeyer, H. E., K. Fricke, et al. (2009). "An isogenic *Actinobacillus pleuropneumoniae* AasP mutant exhibits altered biofilm formation but retains virulence." Vet Microbiol 137(3-4): 392-396.
- Thormann, K. M., S. Duttler, et al. (2006). "Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP." J Bacteriol 188(7): 2681-2691.
- Tomlin, K. L., R. J. Malott, et al. (2005). "Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms." Appl Environ Microbiol 71(9): 5208-5218.
- Vallet, I., J. W. Olson, et al. (2001). "The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation." Proc Natl Acad Sci U S A 98(12): 6911-6916.

- Van der Mei, H. C., et H. J. Busscher. (2001). "Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations." Appl. Environ. Microbiol 67: 491-494.
- Van der Mei, H. C. R. B., et H. J. Busscher. (1998). "A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. ." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 11: 213-221.
- Vanechoutte, M., L. A. Devriese, et al. (2000). "*Acinetobacter baumannii*-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic." J Clin Microbiol 38(11): 4280-4281.
- Veenstra, G. J., F. F. Cremers, et al. (1996). "Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*." J Bacteriol 178(2): 537-541.
- De Vriendt, K., Theunissen, S., Carpentier, W., De Smet, L., Devreese, B., Van Beeumen, J. 2005. Proteomics of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm reveals differentially expressed proteins, including AggA and RibB. Proteomics. 5, 1308-1316.
- Wagner, T. K. and M. H. Mulks (2006). "A subset of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in vivo induced promoters respond to branched-chain amino acid limitation." FEMS Immunol Med Microbiol 48(2): 192-204.
- Wagner, T. K. and M. H. Mulks (2007). "Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* leucine-responsive regulatory protein and its involvement in the regulation of in vivo-induced genes." Infect Immun 75(1): 91-103.
- Wen, Z.T., Suntharaligham, P., Cvitkovitch, D.G., Burne, R.A. 2005. Trigger factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation. Infect. Immun. 73, 219-225.
- Whiteley, M., M. G. Banger, et al. (2001). "Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Nature 413(6858): 860-864.
- Wolfe, A. J., D. E. Chang, et al. (2003). "Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development." Mol Microbiol 48(4): 977-988.
- Xu, Z., Y. Zhou, et al. (2008). "Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China." PLoS ONE 3(1): e1450.
- Zhou, L., S. C. Jones, et al. (2008). "Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains." J Clin Microbiol 46(2): 800-803.



Ziebuhr, W., C. Heilmann, et al. (1997). "Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates." Infect Immun 65(3): 890-896.

**ANNEXE**

**Annexe :**

**Formation de biofilm en présence de phospholipides**

## Introduction

Comme mentionné dans l'article, certaines mutations affectent les gènes qui codent pour la synthèse de phospholipides (*plsX* biofilm + est dans le même opéron que *rpmF* biofilm -). Cette étude a pour but de réaliser une complémentation phénotypique par l'ajout d'un phospholipide.

## Matériel et méthodes

Nous avons réalisé le même protocole que précédemment (voir section 2.3.1 de l'article). Ensemencer la souche parentale (4074NalR) de même que les mutants à tester sur gélose BHI+NAD toute la nuit à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. À partir des colonies obtenues, prélever une colonie isolée et inoculer dans 5 mL de Brain Heart Infusion (BHI) OXOID avec NAD (15 µg/mL) et laisser croître toute la nuit à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> avec agitation. Faire une dilution décimale de chaque culture (1/100) dans son milieu respectif. Mettre 100 µL des inocula en triplicata dans les puits d'une microplaque de 96 puits (Corning # 3599). Incuber 5h à 37 °C ± 5% de CO<sub>2</sub>. Laver les puits trois fois en immergeant la plaque dans de l'eau distillée puis enlever toute trace d'eau en tapant sur du papier. Ajouter 100 µl de phospholipides (phosphatidylcholine dimyristoyl glycérol, phosphatidylcholine dipalmitoyl ) à 0.1% et incuber à nouveau pendant 1h à 37°C. Ajouter 100 µL de cristal violet à 0.1%. Incuber 2 minutes à température ambiante, puis enlever l'excès de cristal violet à la pipette. Laver les puits trois fois en immergeant la plaque dans de l'eau distillée puis enlever toute trace d'eau en tapant sur du papier absorbant. Laisser sécher 30 minutes à 37°C. Ajouter 100µL d'éthanol 70% et lire la plaque à 590 nm.

## Résultats et discussion

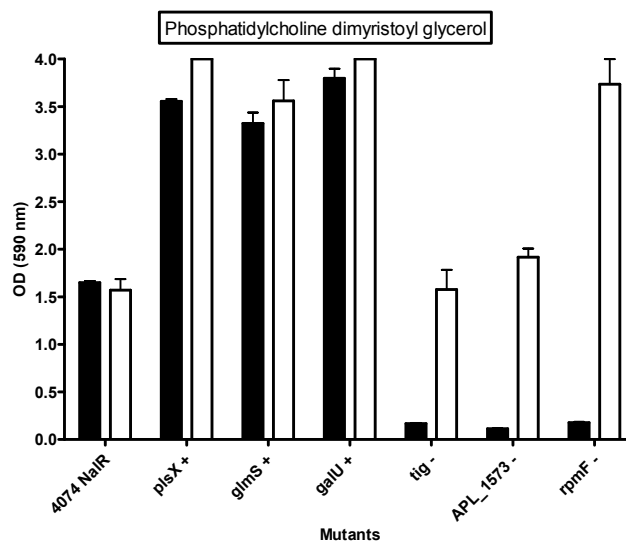


Figure 1 : Test en micoplaque de formation de biofilm de la souche parentale 4074NaIR et des mutants après ajout de phosphatidylcholine dimyristoyl glycérol pendant 1h à 37°C. (Bares noires: sans phospholipide, Bares blanches: avec phospholipide).

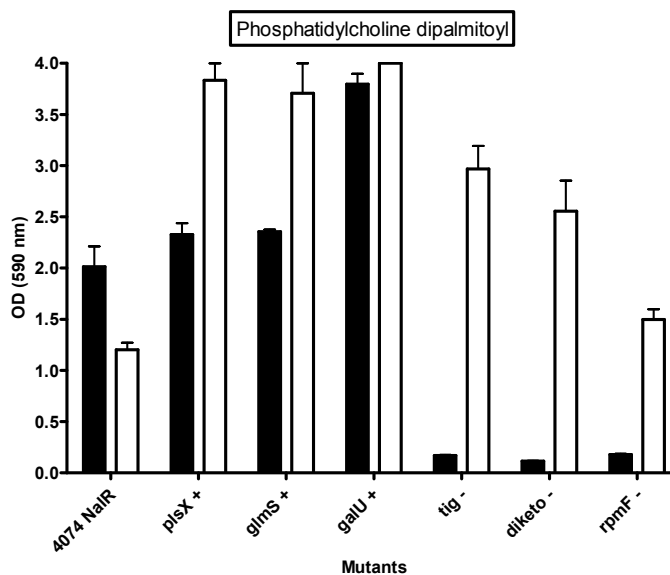


Figure 2 : Test en micoplaque de formation de biofilm de la souche parentale 4074NaIR et des mutants après ajout de phosphatidylcholine dipalmitoyl pendant 1h à 37°C. (Bares noires: sans phospholipide, Bares blanches: avec phospholipide)

L'ajout de phospholipides (Figures 1 et 2) permet l'augmentation de la formation de biofilm chez les mutants (*tig*, *rpmF* et *APL\_1573*), dont la formation est diminuée

par rapport à la souche mère. D'après notre hypothèse, cet effet devrait être observé que pour le mutant *rpmF*. Donc il est très probable que l'effet observé est non spécifique.

De plus, ces phospholipides n'ont aucun effet chez les mutants (*plsX*, *galU* et *glmS*) (Figures 1 et 2), dont la formation de biofilm est augmentée par rapport à la souche mère. D'après notre hypothèse, la formation de biofilm chez le mutant *plsX* aurait du être diminuée en présence de ces phospholipides.

Les résultats préliminaires étant difficilement explicables, nous n'avons pas poursuivi cette avenue. Il n'en demeure pas moins que les voies métaboliques des acides gras et des phospholipides semblent être impliquer d'une quelconque façon dans la formation de biofilm chez *A. pleuropneumoniae*.