



HAL
open science

Exploration de l'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* en biofilm : rôle dans l'échec des traitements antibiotiques

Anaïs Soares

► To cite this version:

Anaïs Soares. Exploration de l'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* en biofilm : rôle dans l'échec des traitements antibiotiques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR045 . tel-02324937

HAL Id: tel-02324937

<https://theses.hal.science/tel-02324937>

Submitted on 22 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Exploration de l'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* en biofilm : rôle dans l'échec des traitements antibiotiques

**Présentée et soutenue par
Anaïs SOARES**

**Thèse soutenue publiquement le 4 octobre 2019
devant le jury composé de**

Madame Geneviève HERY-ARNAUD	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Madame Katy JEANNOT	Professeur, Université de Franche-Comté	Rapporteur
Monsieur David LEBEAUX	Maître de Conférence, Université Paris Descartes	Examinateur
Madame Fany REFFUVEILLE	Maître de Conférence, Université de Reims Champagne-Ardenne	Examinateur
Monsieur Manuel ETIENNE	Professeur, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Monsieur François CARON	Professeur, Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse co-dirigée par le Pr Manuel ETIENNE et le Pr François CARON
Laboratoire GRAM EA 2656



Remerciements

C'est non sans une certaine émotion que je m'apprête à rédiger ces remerciements. Que la route fut longue et semée d'embûches pour arriver jusqu'ici. Cette thèse est le fruit d'un long travail, de remises en question, de déceptions mais aussi d'espoir et de petites joies (oui quand même parfois). C'est non seulement l'aboutissement d'un projet professionnel mais plus encore la fin d'un chapitre de ma vie. Tout cela n'aurait été possible sans le soutien indéfectible de mon entourage qui a toujours cru en moi et m'a sans cesse soutenue.

J'adresse ma profonde gratitude,

Aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Au Professeur Geneviève Héry-Arnaud et au Professeur Katy Jeannot,
Pour avoir accepté la charge d'examiner ce travail. C'est un honneur de bénéficier de votre expertise.

Au Docteur Fany Reffuveille
Pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Recevez toute ma reconnaissance pour votre disponibilité et vos conseils bienveillants lors de nos échanges à l'occasion de mes CSI.

Au Docteur David Lebeaux,
Pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Vos travaux sur le biofilm ont grandement inspiré et contribué à la réalisation de cette thèse.

Au Professeur François Caron,
Pour m'avoir accueillie au sein du GRAM, pour avoir suivi mes différents travaux durant ces années de près ou de loin. Je vous en suis très sincèrement reconnaissante. Travailler à vos côtés a été une grande source d'enseignements. Merci de tout cela.

Au Professeur Manuel Etienne,
Manuel, nous y voilà, les mots me manquent pour résumer ces années à tes côtés. Nous nous sommes lancés dans cette aventure sans trop savoir à quoi nous attendre. Cette collaboration « infectio-bactério » était inédite, enrichissante mais aussi parfois tellement difficile (j'ai tant râlé après ton emploi du temps surchargé...). Mais malgré les hauts et les bas, tu as su m'écouter, accepter mes critiques, entendre mes doutes, me rassurer et me mener jusqu'ici. Merci de ta patience, ta persévérance, ton enthousiasme, ta gentillesse. Je sais la pression qu'a représenté ce travail et surtout le souhait que tu avais d'essayer de me garantir un avenir plus serein. Sois rassuré, tu as fait le maximum.

Je souhaiterais exprimer mes plus sincères remerciements,

À tous ceux qui ont fait, aussi bien au CHU que côté recherche, que ce travail puisse aboutir.

Mes premiers remerciements vont au Professeur Martine Pestel-Caron. Merci de la confiance que vous m'avez accordée depuis mes études de pharmacie jusqu'à mon assistantat. Je sais que vous avez eu à cœur de me faire évoluer et grandir. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Soyez assurée de mon profond respect.

Ah Ludo, sans toi j'aurais flanché c'est certain. Tu m'as tellement aidée et encouragée, je t'en suis extrêmement reconnaissante. Merci d'avoir partagé tes grandes connaissances de la bactériologie avec moi. Nos discussions en tout genre (ah ça tu es bavard), bon d'accord très axées course à pied, un peu moins ciné (☺), ont contribué à ce que j'arrive jusque-là. Garde le cap et retourne sur un iron man !

Noëlle, Sophie, Sandrine, Soumaya, un grand merci d'avoir allégé mon quotidien au labo ces derniers mois pour me permettre de franchir les différentes étapes !

J'adresse des remerciements extrêmement émus à toute l'équipe de techniciens de bactériologie. Votre investissement pour le labo, votre rigueur, votre bienveillance et votre gentillesse à mon égard ont enrichi mes années passées à vos côtés. Vous allez me manquer toutes et tous. Pour n'en citer qu'une (ne m'en voulez pas), Danièle, tu as été d'un soutien inconditionnel, toujours à prendre soin de moi, j'ai beaucoup de chance de te connaître.

A Kévin Alexandre, bravo pour ton parcours exemplaire et merci de l'aide que tu nous as apportée dans ce travail, avec toujours beaucoup d'humilité à notre égard.

À l'équipe du GRAM, merci de m'avoir accueillie pour la réalisation de ce projet de recherche. Agnès, Marie, Stéphanie, merci pour vos encouragements.

Au laboratoire de virologie, des biologistes aux techniciens.

Au professeur Jean-Christophe Plantier, pour votre soutien tout au long de mon parcours.

Élodie, Guillemette, merci de tout cœur. Toujours un mot gentil, toujours un sourire.

Au Professeur Sylvie Chevalier et à Magalie. Merci pour votre optimisme, votre expertise et votre aide dans ce travail.

À l'équipe de Pharmaco-toxico, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous !

À tous ceux croisés pendant ces années au CHU qui m'ont tellement apporté professionnellement et humainement. Biologistes, techniciens, internes, étudiants, cliniciens.

Enfin, merci au Pr Alain Lozniewski et au Dr Corentine Alauzet de m'accueillir à Nancy pour cette nouvelle aventure.

Et puis à la frontière de cette vie professionnelle, des amitiés sont nées.

Élise, Anaïs qu'aurais-je fait sans vous ? Au-delà de notre histoire commune avec le « pyo » pour toi Élise et de nos échanges « infectio-bactério » toujours enrichissants, vous avez été d'un soutien sans faille, toujours à l'écoute de mes (nombreuses ?!) plaintes, toujours bienveillantes. J'espère vous garder à mes côtés.

Mathilde, tu es la gentillesse incarnée. Valentin, ta bonne humeur et ton humour n'ont d'égal (☺). Nos moments partagés m'ont aidée à maintenir le cap. Merci.

Gaëtan, Caro, ces sorties course à pied ont tellement été salvatrices. Merci pour votre soutien. Soyez assurés de mon affection.

Lucie, comment t'oublier ? On a ri, on a pleuré, on a dansé ensemble. Merci d'avoir rendu mon quotidien au labo plus léger.

Charline, je ne saurai jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci de ton écoute pendant ces longues heures à courir. Quel souvenir cette Saintélyon ! Merci de ton amitié fidèle.

Et enfin à ceux qui me sont fidèles depuis si longtemps,

Qui m'accompagnent, me soutiennent, croient en moi, donnent du sens à ma vie.

Papa, Maman, les mots ne suffisent pas pour exprimer tout l'amour que j'ai pour vous. Vous êtes mon repère, tellement solides, vous m'avez tout donnée. Je ne serais pas là où j'en suis sans vous, je vous aime tant.

Tata, Thierry, Nico, Guigui, et maintenant Perrine et Louane, vous comptez tellement pour moi. Les moments à vos côtés me sont si précieux. Merci.

Marie-Anne et Jacques, j'affectionne tous les instants partagés avec vous depuis mon enfance. Trouvez ici l'expression de mon profond attachement.

À mes amis, si essentiels à mon équilibre.

Édouard, Louis, Juliette dont la sérénité est tellement réconfortante, Céline dont l'enthousiasme est si contagieux, les copines du tennis (promis je vais revenir sur un court de tennis après « tout ça »), Séverine et tant d'autres...

Ma sœur, tu es si loin mais tu as toujours veillé sur moi du mieux que tu le pouvais. Sans toi je ne serais rien. Je t'aime si fort ❤️❤️❤️. Sandro, tu pourras toujours compter sur moi. Vincent, merci.

À toi ma mamie tant aimée, tu me manques tellement. J'espère tenir ma promesse et que tu es fière de nous.

À vous tous, ma vie rouennaise s'achève, un mélange d'enthousiasme et de tristesse m'anime, je garderai un souvenir ému de toutes ces années, merci d'avoir rendu la vie plus douce.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	1
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	2
I. LES INFECTIONS EN BIOFILM A <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	2
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2. Formes cliniques d'infections à <i>P. aeruginosa</i> en biofilm	3
2.1 La mucoviscidose	4
2.2 Autres formes cliniques	6
3. Épidémiologie.....	7
4. Diagnostic microbiologique.....	8
5. Approche thérapeutique	10
5.1 Monothérapie ou association d'antibiotiques ?.....	11
5.2 Molécules antibiotiques préférentielles.....	12
5.3 Traitements associés et/ou complémentaires	20
II. ÉTUDE D'UN BIOFILM DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	22
1. Transition d'un mode de vie planctonique à un mode de vie en biofilm	22
2. Biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	23
2.1 Composition	23
2.2 Formation.....	24
2.3 Régulation du biofilm	26
3. Modèles de biofilm <i>in vitro</i>	28
3.1 Modèles statiques	28
3.2 Modèles dynamiques.....	34
3.3 Intérêts / limites des modèles expérimentaux.....	35
4. Évaluation des traitements antibiotiques dans des modèles de biofilm <i>in vitro</i> à <i>P. aeruginosa</i>	36
4.1 Monothérapies d'antibiotique	36
4.2 Associations d'antibiotiques	39
III. BIOFILM ET RECALCITRANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	45
1. Impact de la matrice extracellulaire sur l'échappement de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques en biofilm.....	46
1.1 Diffusion des antibiotiques en biofilm	46
1.2 Rôle de l'ADN extracellulaire.....	47
1.3 Rôle des exopolysaccharides dans la tolérance en biofilm	49

1.4	Production de β -lactamase.....	49
1.5	Rôle des systèmes d'efflux.....	50
2.	Environnement physico-chimique et réponses aux stress en biofilm.....	51
2.1	Limitation en oxygène.....	52
2.2	Carence nutritionnelle.....	54
3.	Adaptations phénotypiques et récalcitrance aux antibiotiques.....	57
3.1	Small Colony Variant.....	57
3.2	Souches hypermutatrices.....	58
3.1	Cellules viables non cultivables.....	59
4.	Cellules persistantes.....	60
4.1	Définition.....	60
4.2	Mécanismes à l'origine de la persistance bactérienne.....	64
IV.	CONCLUSIONS DES RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69
	Objectifs de la recherche.....	70
	TRAVAIL PERSONNEL.....	71
I.	INTERET D'UNE BITHERAPIE DE CIPROFLOXACINE ET AMIKACINE VIS-A-VIS D'UN BIOFILM DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	71
1.	Contexte.....	71
2.	Publication 1.....	74
3.	Discussion.....	75
II.	ADAPTATION DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> A UNE EXPOSITION DE CIPROFLOXACINE EN BIOFILM.....	79
1.	Analyse structurelle et fonctionnelle de l'adaptation de <i>P. aeruginosa</i> en biofilm.....	80
1.1	Contexte.....	80
1.2	Publication 2.....	82
1.3	Discussion.....	83
2.	Rôle de la diversité phénotypique en biofilm.....	87
2.1	Contexte.....	87
2.2	Publication 3.....	88
2.3	Discussion.....	89
	DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	92
	CONCLUSION.....	97
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	98

Index des figures

Figure 1 : Les différentes voies de régulation impliquées dans la pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i> ...	3
Figure 2 : Conséquences au niveau des voies aériennes respiratoires en cas de canal CFTR défectueux chez les patients atteints de mucoviscidose	4
Figure 3 : Pourcentages de prévalence des espèces bactériennes isolées en cas d'infection respiratoire selon l'âge des patients atteints de mucoviscidose	5
Figure 4 : Principales infections en biofilm décrites chez l'Homme : infections sur matériel et infections de tissus	7
Figure 5 : Structure chimique des aminosides	13
Figure 6 : Mécanisme d'action des aminosides	14
Figure 7 : Résistance enzymatique aux aminosides : phénotypes de résistance et incidences associés aux différents types d'enzymes	15
Figure 8 : Mécanisme d'action des quinolones.....	17
Figure 9 : Distribution des valeurs de CMI de la ciprofloxacine et de la lévofloxacine pour des souches de <i>P. aeruginosa</i> d'après les données de l'EUCAST	17
Figure 10 : Pourcentages de souches invasives de <i>P. aeruginosa</i> résistantes aux fluoroquinolones pour les différents pays européens d'après le rapport de 2017 de l'European Center for Disease Prevention and Control	18
Figure 11 : Cycle de vie d'un biofilm, de la formation (A) à la dispersion du biofilm (B)	24
Figure 12 : Voies de régulation impliquées dans la formation du biofilm en lien avec les variations de la concentration intracellulaire de c-di-GMP (A) et les étapes de développement du biofilm (B)	27
Figure 13 : Voies de régulation impliquant RetS/GacS	28
Figure 14 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques en biofilm avec la méthode du « Calgary Biofilm Device »	31
Figure 15 : Étude de la cinétique de formation du biofilm avec la méthode du Biofilm Ring Test	33
Figure 16 : Modèles de biofilm <i>in vitro</i> dynamiques en flux	34
Figure 17 : Survie de larves de <i>Galleria mellonella</i> infectées par une culture planctonique ou un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> après exposition à de l'amikacine	36
Figure 18 : Traitement par tobramycine d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	37
Figure 19 : Biofilms de <i>P. aeruginosa</i> exposés à des concentrations croissantes de ciprofloxacine..	38
Figure 20 : Biofilms de <i>P. aeruginosa</i> exposés à l'aztréonam, la tobramycine et à une association d'aztréonam et de tobramycine	39
Figure 21 : Biofilms de <i>P. aeruginosa</i> exposés à la ciprofloxacine et à l'association de ciprofloxacine et de colistine, à la tétracycline et à l'association de tétracycline et de colistine.....	40

Figure 22 : Paramètres bactériologiques définissant la résistance et la tolérance à un antibiotique	46
Figure 23 : Biofilms de <i>P. aeruginosa</i> exposés à la tobramycine, en l'absence et en présence d'ADN exogène.....	48
Figure 24 : Distribution des bactéries vivantes et mortes au sein d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> exposé à de la colistine, pour des souches déficientes en efflux MexAB-OprM (images supérieures) et exprimant MexAB-OprM (images inférieures).....	51
Figure 25 : Effet de la tobramycine et de la ciprofloxacine sur la morphologie des bactéries situées respectivement à la surface, au milieu et au contact avec le support d'un biofilm <i>P. aeruginosa</i>	53
Figure 26 : Effet de la supplémentation en arginine dans des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> de 48 h formés sur des membranes (A) et de 72 h formés dans un système en flux continu (drip flow reactor) (B) et exposés ou non à de la ciprofloxacine ou tobramycine.....	55
Figure 27 : Schéma de l'hétérogénéité des teneurs en oxygène et en nutriments au sein d'un biofilm selon son stade de développement.....	56
Figure 28 : Schéma de la survie et re-croissance de cellules résistantes et persistantes après exposition antibiotique	61
Figure 29 : Courbe de réduction bactérienne en biofilm après exposition antibiotique : survie d'une sous-population persistante	62
Figure 30 : Courbes de réductions bactériennes en condition de phase stationnaire en fonction de concentrations d'antibiotiques croissantes (1) et de la durée d'exposition aux antibiotiques (2) ...	63
Figure 31 : Proportion de cellules persistantes après des expositions antibiotiques successives....	63
Figure 32 : Effet d'un traitement par ofloxacine sur la survie de souris infectées par une souche sauvage de <i>P. aeruginosa</i> et par une souche double mutant $\Delta relA \Delta spoT$	65
Figure 33 : Formation de cellules persistantes en lien avec l'augmentation de la concentration de (p)ppGpp, l'activation de la protéase Lon, puis de la toxine HipA pour aboutir à l'inhibition de la traduction	66
Figure 34 : Évolution de la population bactérienne après exposition antibiotique	68

Index des tableaux

Tableau 1 : Paramètres microbiologiques d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques en biofilm déterminés par la méthode du « Calgary Biofilm Device »	31
Tableau 2 : Comparaison des paramètres microbiologiques évaluant l'activité antimicrobienne de certains antibiotiques vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> en culture planctonique et en biofilm	32
Tableau 3 : Activité des différents traitements antibiotiques, à concentrations supra-inhibitrices, vis-à-vis de biofilms <i>in vitro</i> de <i>P. aeruginosa</i>	42

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNe : ADN extracellulaire

ADNr 16S : ADN codant pour l'ARNr 16S

AHLs : N-Acyl-L-homosérine lactones

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

AUC_{24h} : Aire sous la courbe des 24h

c-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique

CDC : Center for Disease Control and Prevention

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy

C_{max} : Concentration maximale mesurée au pic

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DDAO : 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyl-2(9H)-acridinone

ECDC : European Center for Disease Prevention and Control

EUCAST : The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GDP : Guanosine diphosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

GTP : Guanosine triphosphate

HSL : Homosérine lactone

MBBC : Minimal Biofilm Bactericidal Concentration (concentration minimale bactéricide en biofilm)

MBIC : Minimal Biofilm Inhibitory Concentration (concentration minimale inhibitrice en biofilm)

Mbp : Million de paires de bases

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

PAVM : Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

PCR : Polymerase chain reaction

PK/PD : Paramètres pharmacocinétiques/pharmacodynamiques

PPi : Pyrophosphate

(p)ppGpp : guanosine (penta-)tetraphosphate

Q_S : *Pseudomonas* quinolone signal

PeI : Pellicul extracellular matrix

PsI : Polysaccharide synthesis locus

PvrR : Phenotype variant regulator

QRDR : Quinolone resistance-determining region

Q_S : Quorum sensing

RND : Resistance-Nodulation-cell Division

RT-qPCR : Quantitative real-time PCR

SCV : Small Colony Variant

SST3 : Système de sécrétion de type III

TA : Système toxine-antitoxine

UFC : Unité formant colonie

VBNC : Viable but non-culturable cells

AVANT-PROPOS

Parmi les situations d'échec microbiologique, les infections en biofilm ont une prévalence croissante au cours des dernières années (1). Le recours toujours plus fréquent aux dispositifs médicaux implantables (pace-maker, prothèses, cathéters...) et pour des patients de plus en plus fragiles favorise le développement des infections en biofilm.

Les infections sur cathéter, les infections ostéo-articulaires sur matériel, les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM), principalement lorsque la respiration est assistée par une sonde endotrachéale, les surinfections de plaies chroniques, les infections pulmonaires chroniques des patients atteints de mucoviscidose sont autant de situations cliniques dans lesquelles la constitution d'un biofilm peut compliquer la prise en charge des patients (2, 3).

Bien que relativement peu pathogène pour le sujet en bonne santé, *Pseudomonas aeruginosa* est fréquemment impliqué dans les infections associées aux soins et notamment les infections de dispositifs implantables (4-6) et joue un rôle essentiel dans les complications de la mucoviscidose (7). Doté d'un pouvoir d'adaptation important à son environnement et capable de se développer en biofilm, *P. aeruginosa* s'est imposé au cours des dernières décennies comme le pathogène représentatif des infections en biofilm difficiles à éradiquer. Les traitements antibiotiques ne permettent souvent pas de guérir les infections en biofilm et imposent dans de nombreux cas le retrait du dispositif médical.

Dans le but d'améliorer la compréhension de l'échec des traitements en biofilm et afin d'envisager l'élaboration de stratégies thérapeutiques plus efficaces, l'objectif de nos travaux a donc été d'évaluer des traitements antibiotiques dans un biofilm *in vitro* de *P. aeruginosa* puis d'explorer les mécanismes de l'échec microbiologique de ces traitements en biofilm.

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les infections en biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*

1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa appartient à la classe des *Gammaproteobacteria* et la famille des *Pseudomonadaceae*. Communément appelé « bacille pyocyanique », il s'agit d'un bacille à Gram négatif non fermentant. Les bactéries se présentent sous la forme de bacilles droits, fins, et très mobiles grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche). Elles produisent des pigments dont la pyocyanine (pigment bleu/vert) et la pyoverdine (pigment jaune/vert) et possèdent un métabolisme aérobie strict. Le génome complet de *P. aeruginosa*, publié en 2000, est un des plus grands génomes bactériens séquencés (6,3 Mbp). *P. aeruginosa* a la capacité d'acquérir des éléments mobiles et possède une grande proportion de gènes de régulation témoignant de sa très grande versatilité métabolique et son adaptabilité exceptionnelle (8, 9). *P. aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire, qui vit à l'état saprophyte dans l'environnement. On la trouve dans les milieux humides, l'eau, le sol et à la surface des végétaux. La culture de la bactérie est aisée sur milieux ordinaires à 37°C ou 41°C en aérobiose. Une odeur caractéristique de seringua se dégage des cultures. Les colonies apparaissent de couleur bleu-vert sur milieu gélosé ordinaire et présentent un aspect métallique sur gélose au sang. *P. aeruginosa* peut survivre sur des surfaces abiotiques et biotiques telles que le matériel médical et résister aux méthodes de désinfection conduisant à un risque de transmission de patient à patient (10, 11). Peu virulent pour l'individu sain, *P. aeruginosa* est un micro-organisme opportuniste dont la pathogénicité est multifactorielle et de régulation complexe (**Figure 1**). *P. aeruginosa* est un important pathogène nosocomial et hospitalier (12), responsable d'infections aiguës et chroniques de localisations diverses (11) et fréquemment impliqué dans les infections en biofilm.



Figure 1 : Les différentes voies de régulation impliquées dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* (13)

2. Formes cliniques d'infections à *P. aeruginosa* en biofilm

Les infections à *P. aeruginosa* peuvent être : 1) superficielles, aiguës et non invasives, chez les patients immunocompétents, 2) aiguës et invasives chez les patients présentant des comorbidités ou immunodéprimés, et 3) chroniques. Les infections aiguës, d'apparition rapide, induisent généralement une réponse intense de l'hôte (érythème, douleur, chaleur), et répondent à un traitement topique ou systémique. Les infections chroniques à *P. aeruginosa*, parfois émaillée d'exacerbations, sont fréquemment associées à la constitution d'un biofilm. Ces formes chroniques peuvent être caractérisées par des signes secondaires, tels que la présence de tissus friables, de zones de nécrose, la survenue d'un exsudat, et par une évolution plus lentement favorable à l'introduction du traitement antibiotique (14). Après une réponse clinique initiale aux traitements antibiotiques, la rechute est fréquente, survenant une fois le traitement antibiotique arrêté (1).

2.1 La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive touchant près de 70 000 enfants et jeunes adultes dans le monde (principalement recensés en Amérique du Nord et Europe) avec environ 1000 nouveaux cas par an (15–17). Son incidence est évaluée à 1 enfant sur 2000 à 3000 en Europe. Le gène responsable de la mucoviscidose code pour une protéine appelée Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) dont la fonction de canal ionique est essentielle à l'organisme. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire qui régule les flux hydro-électrolytiques transmembranaires. Sa structure de canal chlorure conduit à une sortie équilibrée d'ions chlorures hors de la cellule épithéliale, selon un gradient électrochimique. Lorsque le canal CFTR est défectueux (plus de 2000 mutations sont recensées dans la Cystic Fibrosis Mutation Database à ce jour <http://www.genet.sickkids.on.ca>), la rétention intracellulaire des ions empêche la sortie passive d'eau et entraîne notamment une réduction du liquide de surface bronchique qui augmente la viscosité des sécrétions (**Figure 2**). La production d'un mucus épais et abondant ralentit la clairance mucociliaire et favorise la colonisation bactérienne.

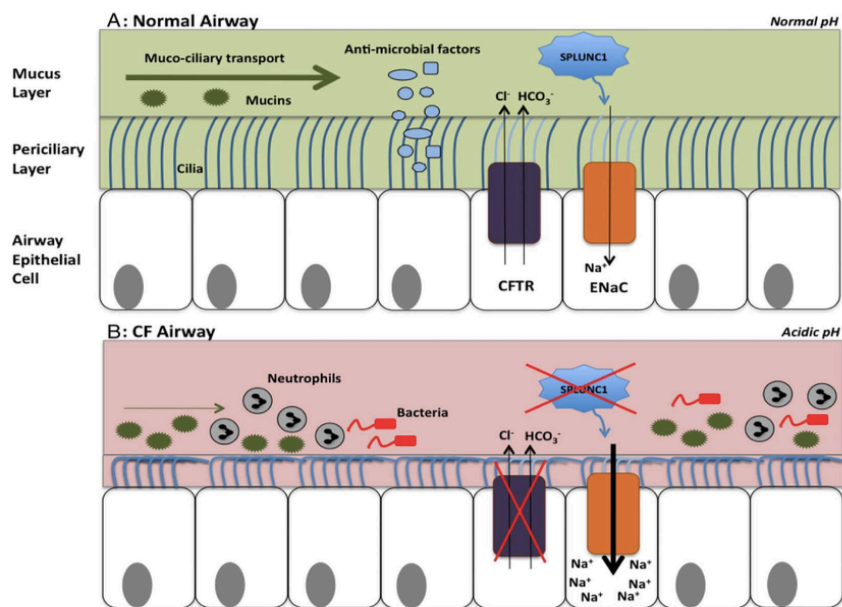


Figure 2 : Conséquences au niveau des voies aériennes respiratoires en cas de canal CFTR défectueux chez les patients atteints de mucoviscidose (18)

Après quelques années d'évolution, l'apparition d'infections respiratoires est une étape importante dans l'évolution et le pronostic de la maladie. D'abord principalement dues à *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* dans l'enfance, elles sont, dans un second temps, associées à *P. aeruginosa* (**Figure 3**) (7, 19). Initialement intermittente, la colonisation de l'arbre respiratoire par *P. aeruginosa* devient permanente et associée à une altération de la fonction respiratoire (20).

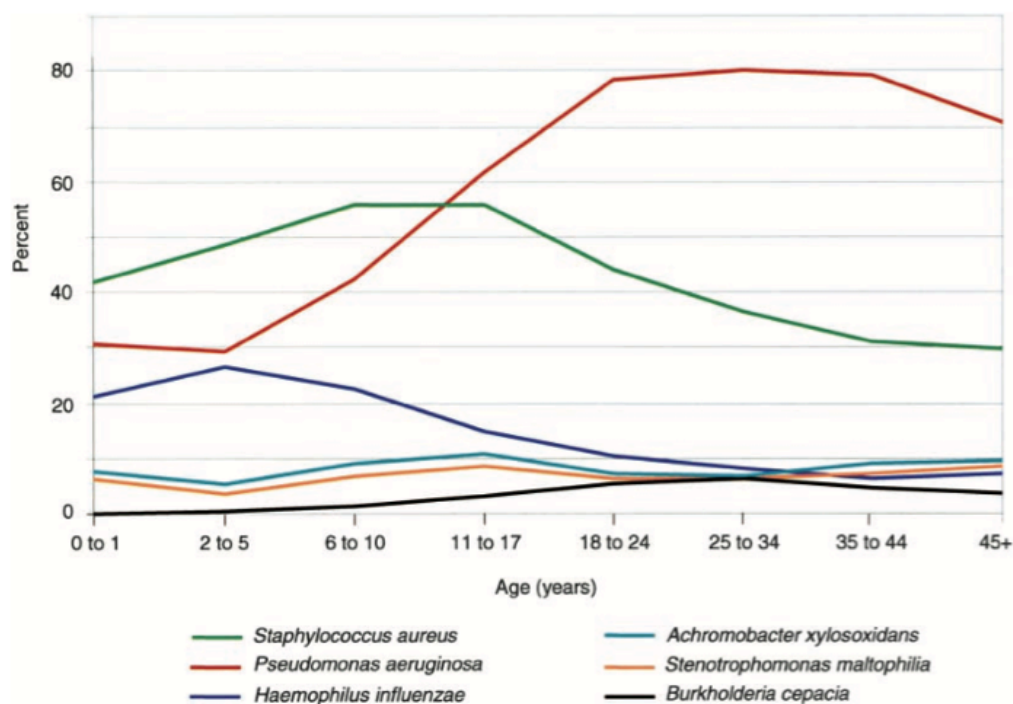


Figure 3 : Pourcentages de prévalence des espèces bactériennes isolées en cas d'infection respiratoire selon l'âge des patients atteints de mucoviscidose (19)

La présence d'agrégats de bactéries au sein d'une matrice extracellulaire dense et la physiologie des bactéries témoignent d'un développement bactérien en biofilm, notamment pour *P. aeruginosa*, à l'origine des importantes difficultés thérapeutiques rencontrées dans le traitement des infections respiratoires (3, 21-24). Malgré des avancées thérapeutiques, et des progrès dans les prises en charge, l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose reste altérée (17, 25).

2.2 Autres formes cliniques

Parmi les infections en biofilm autres que la mucoviscidose, peuvent être distinguées les infections liées à un dispositif médical implanté et les infections chroniques de tissus (**Figure 4**) (26). Les infections aiguës à *P. aeruginosa* en biofilm les plus fréquemment rapportées sont les otites externes (ou otites du baigneur), et les infections oculaires, notamment les kératites associées à l'utilisation de lentilles de contact (27).

Une grande partie des infections à *P. aeruginosa* en biofilm sont associées à la présence de corps étrangers ou de dispositifs médicaux : PAVM liées à une colonisation de la sonde endotrachéale, infections urinaires sur sonde (28, 29) et infections de cathéter (30). Jones *et al.* (31) ont mis en évidence, par microscopie électronique, la présence d'un biofilm bactérien au niveau du cathéter urinaire lors d'une infection urinaire sur cathéter à *P. aeruginosa*. Les biofilms peuvent se développer sur les surfaces internes et externes du cathéter urinaire. Les infections en biofilm à *P. aeruginosa* peuvent également concerner les infections orthopédiques sur matériel prothétique ou d'ostéosynthèse (32, 33), par contamination pré-opératoire ou post-opératoire précoce dans les premières heures qui suivent l'implantation du matériel ou plus tardivement par voie hématogène ou par contact avec l'environnement extérieur pour les dispositifs à émergence cutanée (34, 35).

D'autres infections chroniques à *P. aeruginosa* en biofilm non liées à des dispositifs médicaux implantés, également caractérisées par une faible efficacité des traitements antibiotiques et un risque élevé de récurrence sont décrites : surinfections de plaies chroniques (36), ou infections urinaires chroniques chez des patients présentant des comorbidités (diabète, cancer) par exemple (37-39).

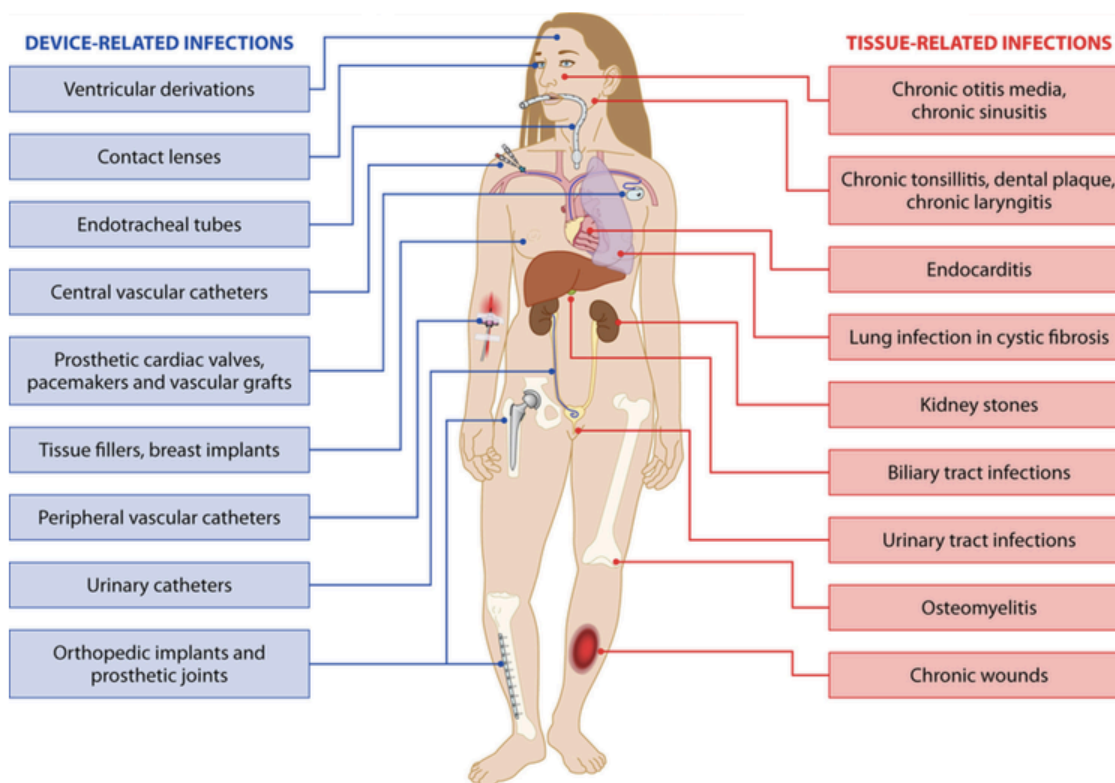


Figure 4 : Principales infections en biofilm décrites chez l'Homme : infections sur matériel et infections de tissus (40)

3. Épidémiologie

Il est désormais admis qu'il existe un lien entre la capacité des bactéries à se développer et à persister sur des surfaces et la survenue d'infections. Ainsi, il a été estimé que 65% des infections étaient associées à la formation d'un biofilm (41).

P. aeruginosa figure parmi les bactéries les plus retrouvées dans les infections nosocomiales et associées aux soins, notamment dans les unités de soins intensifs (42, 43). Dans les unités de soins intensifs européennes, *P. aeruginosa* est retrouvé dans environ 20% des pneumopathies associées aux soins suivi par *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. *P. aeruginosa* est par ailleurs isolé dans près de 15% des infections urinaires associées aux soins après *E. coli* et *Enterococcus sp.* (44). En France, *P. aeruginosa* est également l'espèce bactérienne la plus souvent retrouvée (19,9%) dans les infections nosocomiales en réanimation adulte (d'après les données du réseau REA-Raisin, 2016) (45).

D'après d'autres séries, *P. aeruginosa* est responsable de près de 15% des infections sur matériel, 20 à 40% des PAVM (46), 10 à 20% des infections urinaires sur cathéter urinaire (47), et un peu plus de 5% des infections sur cathéter (6, 48, 49). C'est également le bacille à Gram négatif le plus souvent isolé dans les infections ostéo-articulaires sur matériel (environ 7% des infections documentées), loin derrière *S. aureus* qui reste la bactérie la plus largement retrouvée dans ce type d'infection (50).

Les endocardites infectieuses à *P. aeruginosa* comptent pour moins de 5% des cas (51). Pour $\frac{3}{4}$ des situations (20/27 patients dans la revue de la littérature de Lin *et al.*), les endocardites étaient associées aux soins et se développaient sur valve native.

P. aeruginosa représente également 3 à 7% des espèces bactériennes isolées en cas de bactériémie (42, 52, 53), principalement d'origine pulmonaire, urinaire, ou liée à la présence d'un cathéter veineux central (54, 55). La mortalité associée à une infection à *P. aeruginosa* est élevée, entre 20 et 40% dans les bactériémies (53, 55–58) et jusqu'à 44% dans les PAVM (59).

Concernant les infections chroniques de tissus, Gjodsbol *et al.* (60) ont constaté que plus de la moitié des plaies chroniques étaient colonisées à *P. aeruginosa*, et plus de $\frac{3}{4}$ des patients seront concernés par le développement d'un biofilm au niveau de ces plaies (61). De 0,5 à 2% des patients porteurs de matériel prothétique orthopédique développeront une infection au cours des deux premières années post-opératoires (62, 63). Pour 9 à près de 30% des patients intubés, la survenue d'une PAVM sera associée à la formation de biofilm à la surface de la sonde endotrachéale (64, 65). Pour les patients qui ont des cathéters urinaires à demeure, plus de 50% des cathéters seront colonisés et dans la majorité des cas cette colonisation sera associée à la formation d'un biofilm (66, 67).

Bien que la prévalence des infections en biofilm à *P. aeruginosa* soit difficile à estimer avec précision, ces données révèlent néanmoins leur importance et la nécessité de mieux comprendre leurs spécificités afin d'adapter la stratégie thérapeutique.

4. Diagnostic microbiologique

Le diagnostic des infections en biofilm est complexe et ne fait l'objet que de rares recommandations spécifiques. La nature du prélèvement à analyser pour mettre en évidence ces infections peut être extrêmement variée si l'on considère que les infections en biofilm peuvent à la fois concerner des dispositifs médicaux implantables et des tissus.

En cas de suspicion de bactériémie liée au cathéter, lorsque le matériel est en place, des hémocultures pourront être réalisées. Un prélèvement de sang par ponction veineuse périphérique et un à partir du dispositif seront effectués afin de comparer le différentiel du délai de positivité entre les flacons d'hémocultures. En cas du retrait du cathéter, une culture de la partie distale du cathéter, selon la méthode semi-quantitative de Maki ou la méthode quantitative de Cleri pourra aider au diagnostic (68). La culture de l'extrémité d'une sonde urinaire est en revanche peu pratiquée en routine, notamment du fait qu'un recueil d'urine est plus simple à réaliser (69). En cas de suspicion d'infection sur matériel orthopédique, lorsqu'un geste chirurgical est envisagé mais que le matériel est maintenu en place, un débridement des tissus (c'est-à-dire le retrait des tissus infectés, nécrotiques ou morts) pourra permettre de mettre en évidence les germes responsables de l'infection. Un broyage de ces tissus, avant mise en culture, favorise la libération des bactéries adhérentes en biofilm et augmente la sensibilité de la culture (70). L'utilisation de la sonication pour dissocier le biofilm a également montré des résultats intéressants dans la littérature permettant d'augmenter la sensibilité de la culture et du diagnostic par PCR à partir de matériels prothétiques et de cathéters urinaires, mais entraînant toutefois l'isolement de bactéries dont la pathogénicité reste incertaine dans certains cas (66, 69, 71-73).

Concernant l'observation par microscopie directement à partir des prélèvements, l'examen direct par coloration de Gram permet parfois d'observer des agrégats de bactéries suggérant une organisation des bactéries en biofilm mais la technique n'est pour autant pas assez sensible pour signaler la présence d'un biofilm sur la seule donnée de cet examen. Les techniques de microscopie électronique et confocale, plus adaptées à la visualisation des biofilms, ne sont pas accessibles pour le diagnostic microbiologique des infections en biofilm en routine au laboratoire (23, 74).

Les conditions de culture des prélèvements (milieux de culture, durées et atmosphères d'incubation) à mettre en œuvre en cas de suspicion d'infection en biofilm sont peu décrites dans la littérature. Seules des spécificités sont décrites dans le cadre de la mucoviscidose. En effet, les prélèvements respiratoires doivent êtreensemencés sur des milieux de culture enrichis en facteur de croissance et sélectifs et l'incubation de ces milieux prolongée afin de permettre l'isolement des bactéries qui deviennent plus exigeantes lorsqu'elles se développent en biofilm (19, 75, 76).

En culture, certains éléments peuvent orienter de façon indirecte vers le diagnostic d'une infection en biofilm ; par exemple, pour les infections chroniques, et plus particulièrement les infections sur matériel orthopédique et les infections pulmonaires chez

les patients atteints de mucoviscidose, la présence de variants à petites colonies est une indication d'un probable mode de vie en biofilm.

La place de la biologie moléculaire en contexte d'infection en biofilm est discutée dans la littérature, notamment du fait que certaines sous-populations bactériennes viables mais non cultivables pourraient être identifiées par des techniques d'amplification des acides nucléiques (77). Pour autant, les sensibilités et spécificités de détection des pathogènes rapportées sont très variables pour la PCR ADNr 16S (acide désoxyribonucléique codant pour l'ARNr 16S) selon les études (73, 78-80). Dans l'étude de Bémer *et al.* (79), même si la PCR ADNr 16S, réalisée à partir de prélèvements ostéo-articulaires initialement broyés, était spécifique, elle manquait de sensibilité et était non contributive pour 40 cas sur 215 pour lesquels la culture était positive.

Enfin, en routine, les tests évaluant l'efficacité des antibiotiques, méthodes d'antibiogramme et méthodes de détermination des CMI, en milieu gélosé ou en milieu liquide, sont standardisés et réalisés sur des cultures planctoniques homogènes constituées de cellules répliquatives. Ces techniques ne permettent pas de prédire le succès d'une antibiothérapie en cas d'infection associée à un biofilm (81). Non encore utilisés en pratique courante au laboratoire, des tests de sensibilité *in vitro* ont été mis au point pour déterminer l'impact d'une croissance en biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques, détaillés dans le chapitre II de ce manuscrit.

À l'heure actuelle, le diagnostic microbiologique des infections en biofilm, à l'exception de rares situations où les dispositifs implantables peuvent être retirés et directement analysés et des infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose, ne bénéficie ni de recommandations, ni de techniques spécifiques par rapport aux situations d'infections non liées au développement d'un biofilm.

5. Approche thérapeutique

Indépendamment de tout impact du biofilm sur l'efficacité des antibiotiques, *P. aeruginosa* se caractérise par une résistance intrinsèque à de nombreuses classes d'antibiotiques, liée à l'expression d'une céphalosporinase chromosomique AmpC inductible et à l'expression de pompes d'efflux constitutives (27). Outre cette résistance intrinsèque, *P. aeruginosa* possède une extraordinaire capacité à développer des résistances acquises parfois

simultanément à plusieurs classes d'antibiotiques, ce qui a incité l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à le classer dans le groupe d'agents pathogènes prioritaires, ESKAPE, pour la lutte contre l'antibiorésistance, aux côtés d'*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Enterobacter spp* (82).

S'il est désormais admis et connu que le traitement antibiotique des infections à *P. aeruginosa* est rendu moins efficace par la présence d'un biofilm (83), il n'existe pas, à l'heure actuelle, de recommandation thérapeutique spécifique concernant les modalités de traitement antibiotique des infections en biofilm. Une recommandation européenne a bien établi que les infections associées à un biofilm devaient requérir des prises en charge spécifiques (84) mais évoque essentiellement la nécessité de retirer le dispositif médical dès lors que le biofilm est constitué pour permettre le succès des traitements antibiotiques. En sus des adaptations usuelles de l'antibiothérapie devant tenir compte du site de l'infection, de la diffusion de l'antibiotique, des paramètres physiologiques individuels, la présence d'un biofilm interroge sur les modalités optimales des traitements antibiotiques.

En 2018, la société espagnole de chimiothérapie anti-infectieuse a rédigé des recommandations de prise en charge des infections invasives à *P. aeruginosa* (85). L'importance de la présence d'un biofilm y est évoquée à trois reprises mais sans que cela se traduise par une spécificité de prise en charge.

5.1 Monothérapie ou association d'antibiotiques ?

L'administration d'une association d'antibiotiques plutôt qu'une monothérapie reste discutée pour la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* d'une façon générale. De nombreuses études et méta-analyses concernant le traitement d'infections à *P. aeruginosa* n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les patients traités par une monothérapie de β -lactamine et ceux recevant une association de β -lactamine et aminoside (86-90). Dans les recommandations de prise en charge des infections invasives à *P. aeruginosa* de la société espagnole de chimiothérapie anti-infectieuse (85), l'usage d'une association d'antibiotiques est proposé au cours des premières 48 à 72 h, en usage probabiliste, afin de diminuer rapidement la densité bactérienne et d'éviter la sélection des mutants résistants. La poursuite d'une bithérapie est également recommandée après documentation microbiologique, si l'infection est sévère, concerne le système nerveux central, en cas d'endocardite, en cas de neutropénie et lorsque la souche de *P. aeruginosa* est résistante aux β -lactamines. De rares études, menées dans

des modèles expérimentaux ou *in vitro*, ont pu retrouver des arguments en faveur du bénéfice d'une telle bithérapie à la phase initiale des infections à *P. aeruginosa* en biofilm, notamment pour prévenir la sélection de mutants résistants (91–93). Mais, aucune série clinique ne permet à ce jour de valider cette hypothèse.

5.2 Molécules antibiotiques préférentielles

Dans ces recommandations, les β -lactamines ont une place de choix. Mais si l'on considère les spécificités des infections en biofilm, leur intérêt paraît plus contrasté. La ceftazidime ou encore l'association récemment développée ceftolozane/tazobactam semblent être peu efficaces en biofilm (94, 95). En effet, dans l'étude de Velez Perez *et al.*, toutes les souches de *P. aeruginosa* testées étaient sensibles à l'association ceftolozane/tazobactam en conditions planctoniques (concentrations minimales inhibitrices [CMI] ≤ 4 mg/L) tandis que pour 51 des 54 souches, les concentrations minimales inhibitrices mesurées en biofilm (Minimal Biofilm Inhibitory Concentration [MBIC]) étaient nettement augmentées (≥ 16 mg/L) (94). Dans un autre travail, des cellules de *P. aeruginosa*, isolées de biofilms *in vitro*, exposées pendant 24 h, respectivement, à la ciprofloxacine ou à la gentamicine, gardaient, après exposition antibiotique, des CMI de la ciprofloxacine et de la gentamicine inchangées. À l'inverse, lorsque ces biofilms étaient traités par ceftazidime, les CMI de la ceftazidime se trouvaient multipliées jusqu'à un facteur 1000, en lien avec une augmentation de la production de β -lactamase (95). Ainsi, les β -lactamines ne semblaient dans l'ensemble pas constituer l'option thérapeutique de choix pour le traitement des infections en biofilm à *P. aeruginosa*.

Aminosides et ciprofloxacine figurent également parmi les molécules proposées dans les recommandations espagnoles pour le traitement des infections invasives à *P. aeruginosa* après documentation microbiologique. Parmi les aminosides, la tobramycine a été particulièrement étudiée, et est largement utilisée en nébulisation pour le traitement des infections respiratoires à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (96, 97). À l'exception de cette indication, c'est l'amikacine qui est positionnée au premier plan de ces recommandations pour le traitement systémique des infections à *P. aeruginosa*, notamment du fait d'une prévalence de la résistance moins élevée, de l'ordre de 5 à 10% contre 15% pour la tobramycine (98).

La ciprofloxacine, présente les avantages d'être le seul anti-*Pseudomonas* disponible par voie orale et de particulièrement bien diffuser jusqu'au site de l'infection (99–101), et en

biofilm (102). De ce fait, par exemple, parmi les stratégies de traitement antibiotique des infections ostéo-articulaires sur matériel à *P. aeruginosa*, la ciprofloxacine occupe une place de choix dans la littérature (50, 103, 104).

(a) Propriétés générales des aminosides

Les aminosides sont des composés formés par un noyau central aminocyclitol (appelé streptidine pour la streptomycine et 2-désoxystreptamine pour les autres aminosides) relié par des liaisons glycosidiques à un ou plusieurs sucres (**Figure 5**) (105).

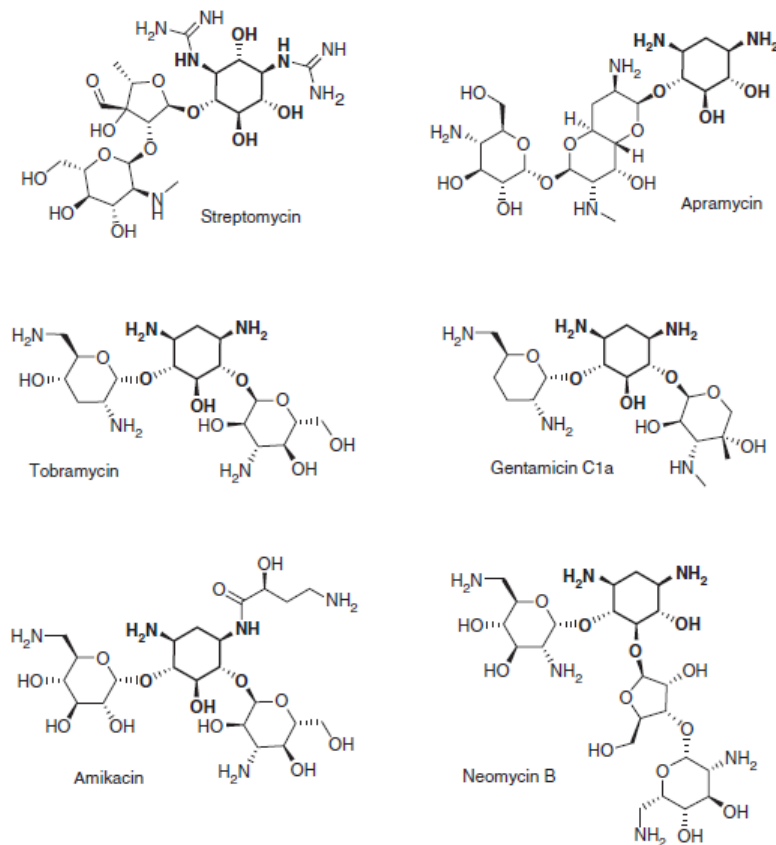


Figure 5 : Structure chimique des aminosides (105)

Les aminosides perturbent la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30S du ribosome et plus particulièrement à l'ARN 16S. Les aminosides induisent des erreurs de codage par des interactions entre l'ARNm (codon) et l'ARNt transportant un acide aminé (anti-codon) qui se produisent au niveau du site A de l'ARN 16S. L'accumulation d'erreurs

aboutit à la synthèse de protéines défectueuses. L'insertion de ces protéines anormales dans la membrane cellulaire accroît la perméabilité membranaire et le transport des aminosides jusqu'à leur cible ribosomale (**Figure 6**).

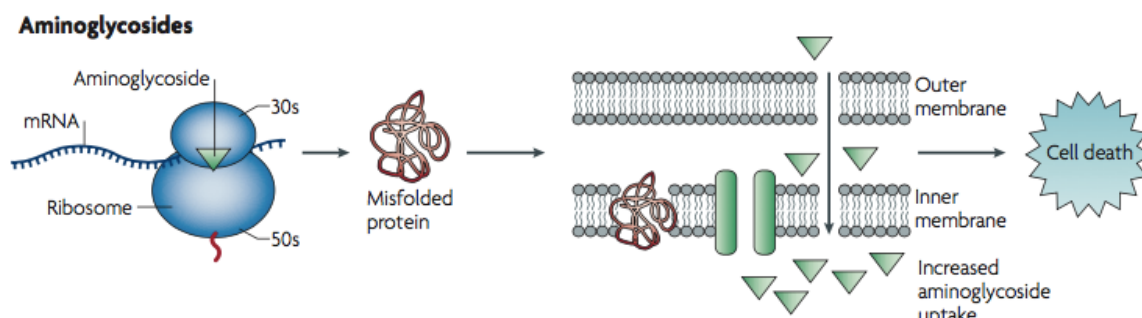


Figure 6 : Mécanisme d'action des aminosides
La liaison des aminosides à la sous-unité 30S du ribosome perturbe la synthèse protéique pour aboutir à la mort des bactéries (106)

La tobramycine et l'amikacine sont les aminosides les plus constamment actifs sur *P. aeruginosa*. En Europe, le pourcentage moyen de souches de *P. aeruginosa* isolées d'hémocultures résistantes aux aminosides est estimé à 13,2% en 2017 avec des taux très variables selon les pays. En France, ce pourcentage est évalué à 10,9% en 2017 avec une diminution significative de la résistance ces dernières années (-4,8% par rapport au pourcentage de résistance en 2014) (44, 107). Selon le rapport de l'Observatoire National de l'Épidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) de 2017 (108), toutes souches de *P. aeruginosa* confondues (c'est-à-dire isolées de différents sites), les résistances à la gentamicine, tobramycine et amikacine sont estimées à 11,4%, 7,4% et 9% respectivement. Le pourcentage de souches de *P. aeruginosa* sensibles aux aminosides n'a cessé d'augmenter depuis 2000 en France, passant respectivement pour la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine de 45% à 89%, de 74% à 93%, et de 79% à 91%.

La résistance acquise aux aminosides est principalement liée à la présence d'enzymes catalytiques (**Figure 7**), réparties en 3 groupes principaux, chacun comportant des sous-classes :

- phosphorylation d'un groupement hydroxyle [O-phosphotransférase (APH)]
- nucléotidylation d'un groupement hydroxyle [O-nucléotidyltransférases (ANT)]
- acétylation d'un groupement aminé [N-acétyltransférase (AAC)].

Le support génétique de ces enzymes peut être plasmidique, ou sur un transposon, ce qui favorise le transfert de ce mécanisme de résistance au sein d'une même espèce et entre les différentes espèces bactériennes (109). Le phénotype de résistance aux aminosides varie selon la classe et la sous-classe d'enzyme. L'enzyme AAC(6') de type II, mécanisme de résistance acquise enzymatique le plus fréquemment retrouvé chez *P. aeruginosa*, confère une résistance à la gentamicine et à la tobramycine mais pas à l'amikacine. A l'inverse, l'AAC(6') de type I épargne la gentamicine mais hydrolyse l'amikacine. L'ANT(2') de type I, confère à *P. aeruginosa* une résistance à la tobramycine et à la gentamicine (110, 111). Compte-tenu du nombre élevé d'enzymes modificatrices, de l'existence de différents types pour une même enzyme, de la présence fréquente de plusieurs enzymes pour une même souche et de leur association possible avec un autre type de mécanisme de résistance, la déduction du génotype d'une bactérie résistante aux aminosides à partir du phénotype observé est difficile.

Aminoglycoside resistance mechanism	Resistance to ^b :	Incidence (%) ^c	
		Miller et al. (98) ^d	Miller et al. (99)
AAC(6')-I	T, N, A	1.1–18.8 (6.2)	1.25
AAC(6')-II	G, T, N	2.1–70.3 (32.5)	18.39
AAC(3)-I	G	0.6–31.9 (8.3)	2.05
AAC(3)-II	G, T, N	1.1–55.3 (4.5) ^e	2.20
AAC(3)-III	G, T	0.1–7.1 (3.2)	0.10
AAC(3)-VI	G, T, N	0.2–6.3 (2.6)	0.15
AAC(3)-?	G, N	0.7–11.7 (4.5)	0.60
ANT(2'')-I	G, T	1.7–45.2 (16.9)	11.87
ANT(4')-II	T, A, I		0.05
APH(3')-VI	A, I		0.20
Impermeability	G, T, N, A, I	4.3–23.7 (14.0)	26.15

Figure 7 : Résistance enzymatique aux aminosides : phénotypes de résistance et incidences associés aux différents types d'enzymes (110)

Parmi les systèmes d'efflux, le système MexXY-OprM est fréquemment retrouvé chez *P. aeruginosa* (112, 113), et peut être responsable d'une résistance faible ou modérée aux aminosides (113). Ces systèmes d'efflux transmembranaires, exprimés de façon constitutive ou inductibles, de type Resistance-Nodulation-cell Division (RND) sont constitués d'un transporteur qui fonctionne en association avec deux autres constituants protéiques : une protéine de fusion membranaire au niveau périplasmique et une protéine de membrane externe. Ces trois éléments sont codés par des gènes regroupés en opéron, contrôlé en amont par un gène régulateur. L'activation d'une ou plusieurs de ces pompes d'efflux induit une

réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotiques, dont l'importance est corrélée au niveau d'expression du système d'efflux.

Des mutations dans le gène régulateur *mexZ* de MexXY-OprM ont été identifiées mais la corrélation entre la nature des mutations dans *mexZ*, le niveau d'expression de MexXY-OprM et les niveaux de résistance aux aminosides n'a été établie (114). Par ailleurs, des études ont suggéré le rôle du système d'efflux MexXY-OprM dans le mécanisme d'imperméabilité et de résistance adaptative aux aminosides chez *P. aeruginosa* (115, 116).

La résistance par réduction de la perméabilité membranaire, en limitant l'entrée des aminosides, peut conférer à *P. aeruginosa* une résistance à l'amikacine et/ou la gentamicine et/ou la tobramycine. Les hypothèses concernant ce mécanisme de résistance restent mal connues. La perte de porines (117), des modifications du lipopolysaccharide (118), une altération de la chaîne respiratoire qui inhiberait le transport énergie-dépendant des aminosides (119) pourraient expliquer le défaut d'accumulation des aminosides.

Enfin, la résistance adaptative, caractérisée par une réduction bactérienne précoce, rapide et concentration-dépendante suivie d'une phase où l'élimination est plus lente et concentration-indépendante, pourrait être observée lors de l'exposition de *P. aeruginosa* aux aminosides (120).

L'administration de doses de l'ordre de 25 mg/kg/24h par voie intraveineuse d'amikacine permet d'atteindre des concentrations sériques de l'ordre de 60 mg/L au pic (121) pour des valeurs résiduelles très variables selon l'âge, les individus et la fonction rénale. Le paramètre pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) le plus pertinent pour prédire l'efficacité des aminosides est le rapport de la concentration sérique maximale mesurée au pic (C_{max}) sur la CMI pour l'isolat testé. Une valeur C_{max}/CMI >10 permettrait de prédire une efficacité thérapeutique des aminosides. La tobramycine peut être utilisée par voie locale respiratoire, administrée par aérosol, permettant alors d'atteindre des concentrations dans l'arbre respiratoire pouvant atteindre 1000 mg/L (122).

(a) Propriétés générales des fluoroquinolones

Les quinolones inhibent la réplication et la transcription bactériennes en empêchant le fonctionnement des topo-isomérases de type II : l'ADN gyrase (cible principale chez les bactéries Gram négatif) et la topo-isomérase IV (cible principale chez les bactéries Gram positif) (123). Les quinolones bloquent ainsi la progression de la fourche de réplication de l'ADN, ce qui active la réponse SOS, et provoque la libération de cassures double brin de

l'ADN pour aboutir à la mort cellulaire (**Figure 8**). Elles empêchent également la progression de l'ARN-polymérase, bloquant ainsi la synthèse de l'ARN, la transcription et la synthèse des protéines (106, 124).

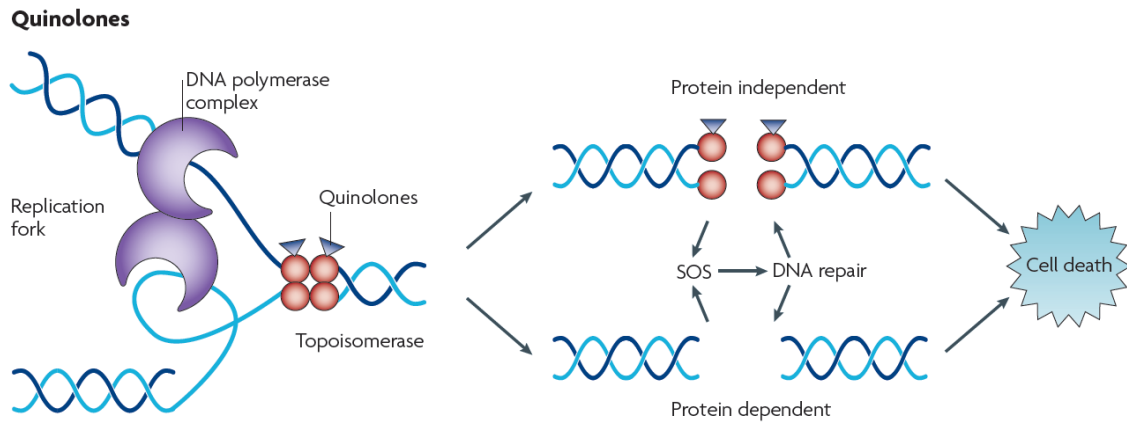


Figure 8 : Mécanisme d'action des quinolones
La liaison des quinolones au complexe ADN-topo-isomérase active la réponse SOS pour aboutir à la mort des bactéries (106)

Seules la ciprofloxacine et la lévofloxacine sont actives vis-à-vis de *P. aeruginosa* (**Figure 9**) (101). D'après les données de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), les CMI₅₀ de la ciprofloxacine et de la lévofloxacine sont égales à 0,25 et 0,5 mg/L respectivement.

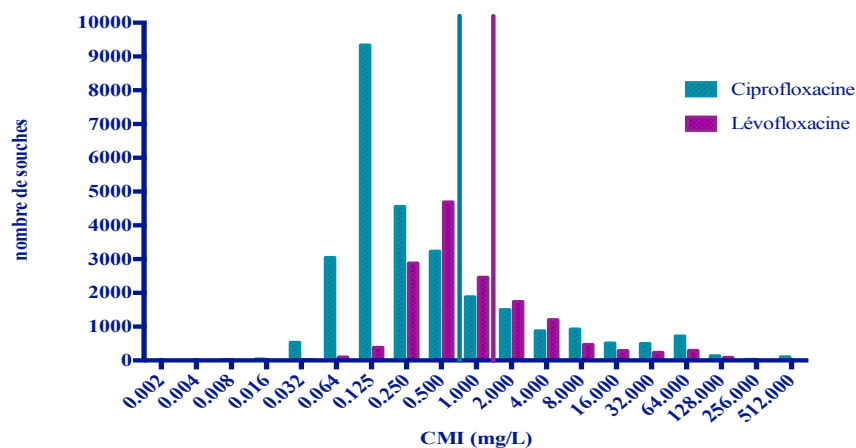


Figure 9 : Distribution des valeurs de CMI de la ciprofloxacine et de la lévofloxacine pour des souches de *P. aeruginosa* d'après les données de l'EUCAST (<https://mic.eucast.org>)
Les concentrations critiques supérieures de la ciprofloxacine et de la lévofloxacine sont respectivement : 0,5 mg/L (barre verte sur l'histogramme) et 1 mg/L (barre violette).

En Europe, le pourcentage moyen de souches de *P. aeruginosa* isolées d'hémocultures résistantes aux fluoroquinolones est estimé à 20,3% en 2017 avec des pourcentages très variables selon les pays (**Figure 10**). En France, ce pourcentage est évalué à 15,3% en 2017 avec une nette diminution de la résistance aux fluoroquinolones ces dernières années (-5,5% par rapport au pourcentage de résistance de 2014) (44, 107). Cette même tendance est décrite dans le rapport de l'ONERBA de 2017 (108). Toutes souches de *P. aeruginosa* confondues (c'est-à-dire isolées de différents sites), la résistance à la ciprofloxacine est évaluée entre 12,6 et 16,8% en 2017 (en tenant compte des données des réseaux REUSSIR, OSCAR et des Microbiologistes du Nord-Pas-de-Calais) contre environ 30% en 2000.

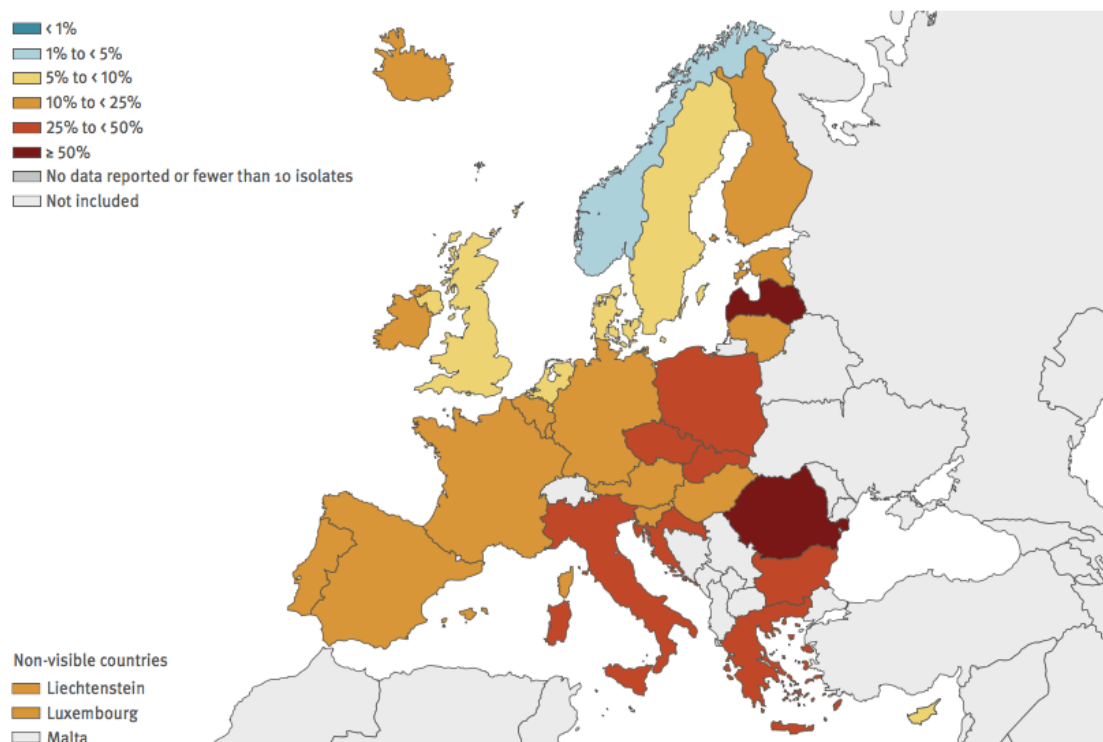


Figure 10 : Pourcentages de souches invasives de *P. aeruginosa* résistantes aux fluoroquinolones pour les différents pays européens d'après le rapport de 2017 de l'European Center for Disease Prevention and Control (44)

Les résistances acquises sont essentiellement liées à des mutations dans les cibles des fluoroquinolones, les topo-isomérases, le plus souvent dans les gènes *gyrA* et *parC*, parfois *gyrB* et plus rarement *parE* (125, 126). Ces mutations peuvent se cumuler et aboutir à une résistance de haut niveau. L'ensemble de ces mutations décrit dans la littérature, est détecté dans une région définie des gènes cibles appelée QRDR (quinolone resistance-determining

region) et entraîne une baisse d'affinité des fluoroquinolones pour les topo-isomérase. La mutation la plus prévalente chez *P. aeruginosa* et codant pour une résistance (de bas ou haut niveau) aux fluoroquinolones est le remplacement de la thréonine par l'isoleucine en position 83 de la séquence d'acides aminés de GyrA (127, 128), devant la substitution de la sérine par la leucine en position 87 de ParC associée à la substitution de la thréonine par l'isoleucine en position 83 de GyrA. La combinaison de ces deux mutations entraîne une résistance à haut niveau aux fluoroquinolones (CMI de la ciprofloxacine ≥ 8 mg/L) (129). D'autres mutations (substitutions de l'acide aspartique par l'asparagine ou la tyrosine) en position 87 de GyrA sont également associées à une résistance aux fluoroquinolones. Les niveaux de CMI de la ciprofloxacine pour les isolats mutés varient alors entre 16 et 64 mg/L (129). Les mutations de GyrB, moins fréquentes, interviennent en position 466 ou 468, et confèrent des niveaux de résistance moindres (CMI de la ciprofloxacine ≤ 2 mg/L).

Quatre des 12 systèmes d'efflux décrits chez *P. aeruginosa* sont susceptibles d'exporter les fluoroquinolones hors de la cellule (130) : MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN (131-133). Certains, comme MexCD-OprJ, sont plus particulièrement prévalents chez les patients atteints de mucoviscidose (134, 135). Les souches surexprimant les systèmes MexEF-OprN et MexCD-OprJ en l'absence d'autres mutations associées dans le QRDR sont le plus souvent résistantes à bas niveau aux fluoroquinolones (CMI de la ciprofloxacine majoritairement ≤ 2 mg/L) (133, 134, 136). Mais la surexpression des efflux pourrait favoriser la sélection de mutations dans le QRDR et ainsi l'émergence de mutants résistants à haut niveau aux fluoroquinolones (117, 128). A l'inverse, l'inhibition de l'expression des pompes d'efflux permettrait de réduire le risque de sélection de mutants résistants à haut niveau aux fluoroquinolones (137).

Après administration de la dose usuelle de 400 mg/8h par voie intraveineuse, les concentrations sériques usuelles de ciprofloxacine sont de l'ordre de 3 mg/L au pic et de 0,5 mg/L pour la valeur résiduelle (121). Le paramètre PK/PD le plus pertinent pour prédire l'efficacité des fluoroquinolones et prévenir la sélection de mutants résistants est le rapport de l'aire sous la courbe des concentrations sériques des 24 h (AUC_{24h}) sur la CMI pour l'isolat testé. Pour les infections sévères à *P. aeruginosa*, des valeurs $AUC_{24h}/CMI > 125$ sont décrites pour être associées à un succès thérapeutique (138, 139).

Cependant, l'usage en monothérapie d'une fluoroquinolone pourrait favoriser la sélection rapide de mutants résistants, comme l'ont démontré plusieurs études (140-143). Chez des patients ayant reçu différents traitements antibiotiques pour des infections à *P. aeruginosa*, la ciprofloxacine était associée à un risque supérieur d'émergence de résistance

par rapport à la ceftazidime, quoiqu'inférieur par rapport à celui de l'imipénème (141). La sélection d'un mutant résistant à haut niveau à la ciprofloxacine a également été rapportée, après seulement 4 jours d'une monothérapie de ciprofloxacine pour une infection post-opératoire au niveau mandibulaire à *P. aeruginosa*, initialement sensible à la ciprofloxacine. L'infection a finalement été traitée avec succès par l'association de ceftazidime et d'amikacine (142). D'après l'étude *in vitro* de Jørgensen *et al.*, l'émergence de mutants résistants à la ciprofloxacine serait favorisée par l'utilisation de concentrations sub-inhibitrices de l'antibiotique (143). Cette sélection de mutants résistants pourrait être prévenue par l'ajout d'amikacine inhibant la réponse SOS activée par les fluoroquinolones, comme l'ont démontré Valencia *et al.*, *in vitro*, en conditions planctoniques (140).

5.3 Traitements associés et/ou complémentaires

Dans le contexte spécifique des infections en biofilm, et possiblement du fait de l'efficacité réduite des traitements antibiotiques, des traitements complémentaires, ou des alternatives thérapeutiques (antibiotiques ou non) ont été proposés pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* en biofilm.

Le taux d'échec par débridement chirurgical, lavage, et antibiothérapie du traitement des infections ostéo-articulaires sur prothèses articulaires à bacille Gram négatif (parmi lesquelles *P. aeruginosa* représente près de 30% des causes d'infection) (144), étant nettement supérieur à celui des infections à Gram positif, le retrait de la prothèse est particulièrement recommandé (50). De même, pour le traitement des infections urinaires sur cathéter, si l'antibiothérapie seule permet dans un premier temps de diminuer les symptômes, le risque de rechute dès la fin du traitement antibiotique est majeur, avec un risque de bactériémie (145). Aussi, le retrait des cathéters urinaires est recommandé, précocement en cas de critères de gravité du sepsis, ou après le début de l'antibiothérapie (145).

Pour les infections de cathéters centraux, l'utilisation d'un « verrou » antibiotique est proposée dans la littérature, permettant d'atteindre au site de l'infection des concentrations locales de 100 à plus de 1000 fois la CMI de l'antibiotique. Cette stratégie n'est jusqu'alors envisageable que si le patient n'est ni transplanté ni immunodéprimé, n'a pas de matériel intravasculaire, est stable sur le plan hémodynamique et qu'il n'y a pas de suppuration ou d'inflammation au site d'insertion du cathéter (146). Néanmoins, des échecs de cette alternative sont décrits lorsque *P. aeruginosa* est à l'origine de l'infection (147), et le retrait du cathéter

central est recommandé dès lors qu'une bactériémie à *P. aeruginosa* est associée (30, 148). Dans le traitement des PAVM à *P. aeruginosa*, l'ajout d'un antibiotique en aérosol a été étudié dans la littérature mais avec des résultats contradictoires, notamment concernant la colistine (149, 150).

Des approches préventives, ayant recours à des matériels imprégnés d'antibiotiques (prothèses articulaires, sondes urinaires) ou recouverts d'argent (sondes endotrachéales), pourraient contribuer à empêcher, réduire ou retarder la formation de biofilm (151, 152). Néanmoins, les données sont insuffisantes pour recommander leur utilisation (84, 145).

Les soins locaux sont particulièrement recommandés pour le traitement de patients ayant des plaies chroniques de tissus associées à la formation d'un biofilm, tandis que le recours à un traitement antibiotique est plus discuté. Le débridement pourrait, outre son efficacité intrinsèque, permettre aux agents antimicrobiens d'être plus efficaces et de limiter le développement du biofilm (1), mais peu de données cliniques sont disponibles à ce sujet (153).

Enfin, dans le contexte très spécifique de la mucoviscidose, les antibiotiques par voie inhalée sont très largement utilisés, notamment la tobramycine et l'aztréonam, au long cours, et associés à une amélioration de la fonction respiratoire et à une réduction des exacerbations (97, 154). Les antibiothérapies préventives et/ou suppressives et les associations d'antibiotiques font également partie de la prise en charge thérapeutique afin de diminuer la densité bactérienne au niveau pulmonaire, ou pour des propriétés présumées anti-inflammatoires (spécificité de l'azithromycine) (97, 155).

Ainsi, les modalités optimales de traitement des infections à *P. aeruginosa* en biofilm restent fort peu codifiées et sujettes à de nombreux questionnements.

II. Étude d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*

1. *Transition d'un mode de vie planctonique à un mode de vie en biofilm*

Le passage d'un mode de vie planctonique où les bactéries vivent de façon libre et isolée à un mode de vie en biofilm où elles s'organisent en une communauté bactérienne sous forme d'agrégats, requiert un certain nombre de différenciations physiologiques, métaboliques et phénotypiques complexes (156, 157). Des modifications de la régulation des protéines (jusqu'à 50% du protéome), en particulier celles impliquées dans la réponse au stress oxydatif, la réponse stringente, la production des exopolysaccharides et le transport membranaire ont été observées (158). Dans un biofilm mature de *P. aeruginosa*, 1% de l'expression des gènes varierait en comparaison au mode de vie planctonique ; pour une moitié dans le sens de la surexpression et pour l'autre dans le sens de la sous-expression (159). Les gènes codant pour les flagelles et les pili, ou encore le gène codant pour le facteur sigma RpoS seraient ainsi réprimés dans un biofilm mature tandis que des gènes codant pour diverses fonctions métaboliques seraient activés (157). L'expression génique semble varier au cours du développement du biofilm, suggérant qu'il existerait des profils d'expression génique temporels et spatiaux propres aux différentes étapes de formation et maturation du biofilm.

Tandis que la population planctonique apparaît globalement homogène, en matière de phénotype, de résistance aux antibiotiques, et d'activité métabolique, la population en biofilm est caractérisée par une extrême diversité, variabilité et hétérogénéité (160). Différentes sous-populations coexistent au sein d'un biofilm (161, 162) : population située au niveau des couches superficielles du biofilm dont les caractéristiques sont proches de la population planctonique ; et population sessile au niveau des couches les plus profondes de la structure (163, 164).

Si les modes de vie planctonique et en biofilm sont schématiquement opposés à des fins pédagogiques et d'étude, il existe en réalité un continuum, constamment évolutif entre les deux modes de vie, permettant une adaptation rapide et réversible aux différentes conditions environnementales (5).

2. Biofilm de *P. aeruginosa*

2.1 Composition

Les biofilms constituent un mode de vie très répandu au sein de la communauté bactérienne, et se différencient du mode de vie planctonique par une stratégie d'adaptation qui permet aux micro-organismes d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et à l'action des antibiotiques (5). Un biofilm microbien se définit comme une communauté structurée de micro-organismes (bactéries, fungi, protozoaires) qui peut se développer aussi bien sur une surface biotique qu'abiotique en réponse à des signaux extracellulaires. Les biofilms sont retrouvés dans des environnements naturels et artificiels. Les bactéries s'organisent au sein d'une matrice extracellulaire polymérique composée principalement d'eau (jusqu'à 97%), polysaccharides, protéines, ADN extracellulaire (ADNe) (2, 165).

Trois exopolysaccharides entrent dans la composition de la matrice extracellulaire de *P. aeruginosa* et contribuent particulièrement au développement et au maintien de la structure tridimensionnelle du biofilm en favorisant les interactions cellule-cellule. L'exopolysaccharide Psl, qui est constitué de motifs répétés de mannose, glucose et rhamnose. Pel, qui est composé de N-acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine, reliés entre eux par des liaisons β -1,4. Enfin, l'alginate qui est un polysaccharide acétylé, d'acides L-guluronique et D-mannuronique reliés entre eux par des liaisons β -1,4 (12, 166). L'alginate est particulièrement produit par les souches de *P. aeruginosa* isolées des infections pulmonaires chroniques des patients atteints de mucoviscidose : il contribue au caractère muqueux des colonies, en retenant l'eau et les nutriments, confère une architecture très structurée à la matrice, et participerait à la tolérance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques (167).

L'ADNe est un autre composant essentiel du biofilm. Son origine génomique a été confirmée (168). Il peut alors provenir de la lyse d'une fraction de la population bactérienne sessile, d'une excrétion active par des cellules vivantes via des vésicules de transport membranaire (169). Les exopolysaccharides Pel et Psl interagissent avec l'ADNe pour renforcer la cohésion intercellulaire au sein du biofilm (170).

La structure du biofilm évolue en fonction de son stade de maturation. Présent en moindre quantité dans un biofilm de 6 jours, l'ADNe était retrouvé à la jonction entre la base et la partie supérieure des structures en forme de champignon ; dans un biofilm de 4 jours il était localisé dans la partie externe de la monocouche (168).

La composition du biofilm dépend également de la souche bactérienne considérée et de l'environnement dans lequel le biofilm se développe. Par exemple, *P. aeruginosa* PA14, qui

est une souche de laboratoire initialement isolée d'une surinfection de brûlure d'un patient et dont le génome est entièrement séquencé, ne synthétise pas Psl, l'exopolysaccharide majoritaire constituant la matrice extracellulaire du biofilm est Pel (165, 171, 172).

Le biofilm est ainsi un environnement structuré, d'architecture variable, complexe, hétérogène et dynamique.

2.2 Formation

La constitution du biofilm se déroule en plusieurs étapes qui incluent une adhésion réversible puis irréversible avec la formation de microcolonies, une étape de maturation du biofilm, puis, sous l'effet de stress ou de carences nutritives la dispersion du biofilm (**Figure 11**) (173).

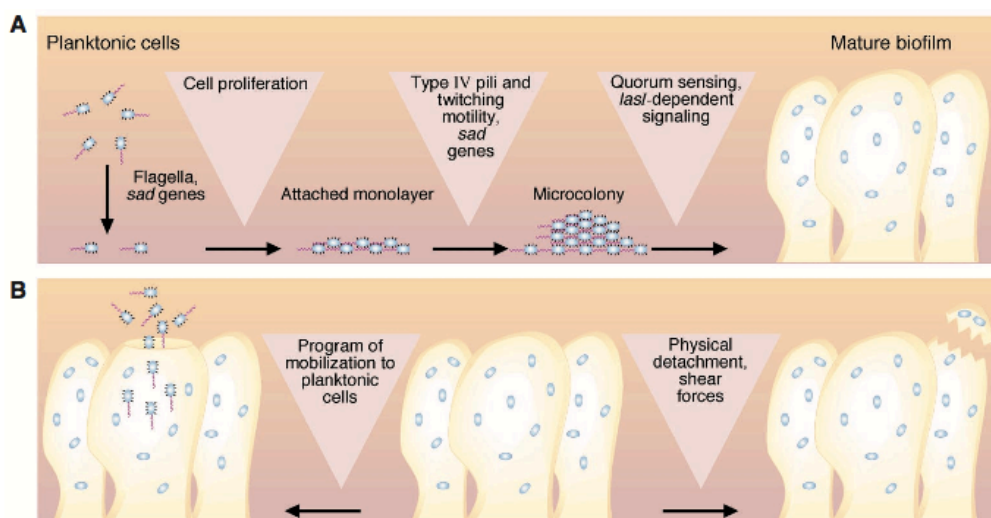


Figure 11 : Cycle de vie d'un biofilm, de la formation (A) à la dispersion du biofilm (B) (5)

L'initiation de la formation du biofilm dépend de structures bactériennes qui sont impliquées dans la mobilité des bactéries, les pili, flagelles et fimbriae. À proximité d'un support, la mobilité bactérienne est réduite et l'adhésion à la surface se produit par l'intermédiaire des flagelles. Il se forme alors une monocouche bactérienne au niveau de la surface. Ces cellules constituent le pied des futures structures en champignon. À ce stade, l'adhésion est réversible. Une deuxième phase permet ensuite aux bactéries de se multiplier et, par l'intermédiaire de pili de type IV, de former des microcolonies. L'attachement devient

alors irréversible. L'agrégation des bactéries sous forme de microcolonies met en jeu une forme particulière de motilité, associant des mouvements d'élongation/rétraction et médiée par les pili, appelée « twitching ». Des structures en forme de champignon se constituent alors, dont les cellules situées à la base sont de mobilité réduite, et celles à la partie supérieure du champignon sont davantage mobiles. Il a été montré que des mutants défectueux pour les pili de type IV pouvaient adhérer à une surface et former une monocouche de cellules mais n'étaient pas capables de s'agglomérer en microcolonies (174). Ceci confirme les rôles essentiels des flagelles dans l'étape initiale d'attachement puis des pili de type IV dans l'agrégation sous forme de microcolonies.

Par ailleurs, les pili de type IV se lient avec une forte affinité à l'ADNe. Un traitement par DNase permettait de détruire les biofilms jeunes de *P. aeruginosa* alors que les biofilms consolidés n'étaient que partiellement altérés (175). Ces données suggèrent que l'ADNe joue un rôle important dans la formation des microcolonies et participe à la structure du biofilm principalement lors des étapes initiales.

Après la formation des microcolonies, s'ensuit une étape de maturation du biofilm où les exopolysaccharides s'accumulent en périphérie (176) et contribuent au maintien de la structure du biofilm qui devient plus résistant aux stress environnementaux. Le biofilm pourra acquérir une forme caractéristique de champignon constituée par un socle de cellules immobiles et une partie supérieure dans laquelle circulent des bactéries mobiles, le tout englobé dans la matrice extracellulaire.

Enfin, la dernière étape pour compléter le cycle est la dispersion du biofilm. Elle résulte de modifications des apports en nutriments, des concentrations en oxygène ou encore de variations du pH. Par exemple, des conditions d'anaérobiose en favorisant la production de monoxyde d'azote pourraient induire une diminution des concentrations intracellulaires d'une molécule signal, le di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP), et un retour vers un mode de vie planctonique (177, 178). Les bactéries de surface ainsi relarguées retrouvent alors un état planctonique, pouvant dès lors coloniser une nouvelle surface puis générer un nouveau biofilm. Le relargage peut concerner des bactéries mobiles dans le cadre d'une dispersion active (« seeding »), ou des agrégats de bactéries recouverts de matrice, auquel cas on parlera de dispersion passive (179).

2.3 Régulation du biofilm

La formation du biofilm est un processus régulé par des mécanismes complexes et interconnectés. Son développement est étroitement lié à un système de régulation appelé le quorum-sensing (QS). Le QS est un système de communication entre les bactéries, médié chez *P. aeruginosa* par des molécules de signalisation diffusibles : les N-Acyl-L-homosérine lactones (AHLs). Ce mécanisme de communication intercellulaire permet une coordination rapide du comportement bactérien au sein d'un agrégat bactérien. Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes de QS ont été décrits : le système LasI/LasR, médié par la N-(3-oxododecanoyl) homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL) et le système RhII/RhIR, médié par la N-butyryl homosérine lactone (C4-HSL). Chaque système se définit par un couple composé d'une protéine régulatrice (LasR, RhIR) et d'une enzyme auto-inductrice (LasI, RhII) qui contribue à la synthèse des AHLs (180). Les systèmes LasI/LasR et RhII/RhIR semblent contribuer à l'élaboration de la structure du biofilm (181). Dans un travail comparant une souche sauvage de *P. aeruginosa* et son mutant pour le gène *lasI*, le biofilm formé par la souche mutée était plus plat et moins structuré. L'ajout de 3-oxo-C12-HSL permettait de restaurer la structure initiale du biofilm (182). Hentzer *et al.* ont également démontré que des analogues structuraux des AHLs, comme les furanones, entraînaient une réduction de la biomasse du biofilm de *P. aeruginosa* (183). Un troisième système, le PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), sous le contrôle des deux précédents systèmes LasI/LasR et RhII/RhIR et qui a pour molécule auto-inductrice la 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, semble intervenir dans la formation du biofilm. Une souche de *P. aeruginosa* dotée d'un système PQS déficient, semble produire moins d'ADNe au sein du biofilm par ailleurs moins structuré (168). Enfin, toujours en interaction avec le système RhII/RhIR, le facteur sigma (sous-unité de l'ARN polymérase bactérienne qui permet d'initier la transcription) RpoS, présent chez *P. aeruginosa*, interviendrait également dans la formation de biofilm à travers la régulation de gènes exprimés en phase stationnaire (182, 184, 185).

Outre les mécanismes de régulation en lien avec le QS, des études récentes ont démontré le rôle central du c-di-GMP, un messager secondaire, dans l'initiation de la formation du biofilm (186). En réponse aux variations de concentrations de c-di-GMP, de multiples voies de régulation peuvent être activées (**Figure 12**). La protéine FleQ, en présence de faibles concentrations de c-di-GMP, est impliquée dans l'activation des gènes qui codent pour les flagelles tandis qu'elle réprime l'expression des gènes codant pour les exopolysaccharides. En revanche, des concentrations élevées de c-di-GMP inhibent la répression exercée par FleQ vis-à-vis des gènes *pel* et *psl* qui codent pour les exopolysaccharides Pel et Psl de la matrice extracellulaire (187, 188). En effet, l'augmentation

des concentrations de c-di-GMP lève l'inhibition de FleQ vis-à-vis d'une protéine nommée CdrA, activant ainsi la synthèse et l'excrétion de CdrA hors de la cellule. CdrA pourra alors se lier aux polysaccharides pour favoriser l'auto-agrégation des bactéries, la formation du biofilm et le maintien de la structure du biofilm (189).

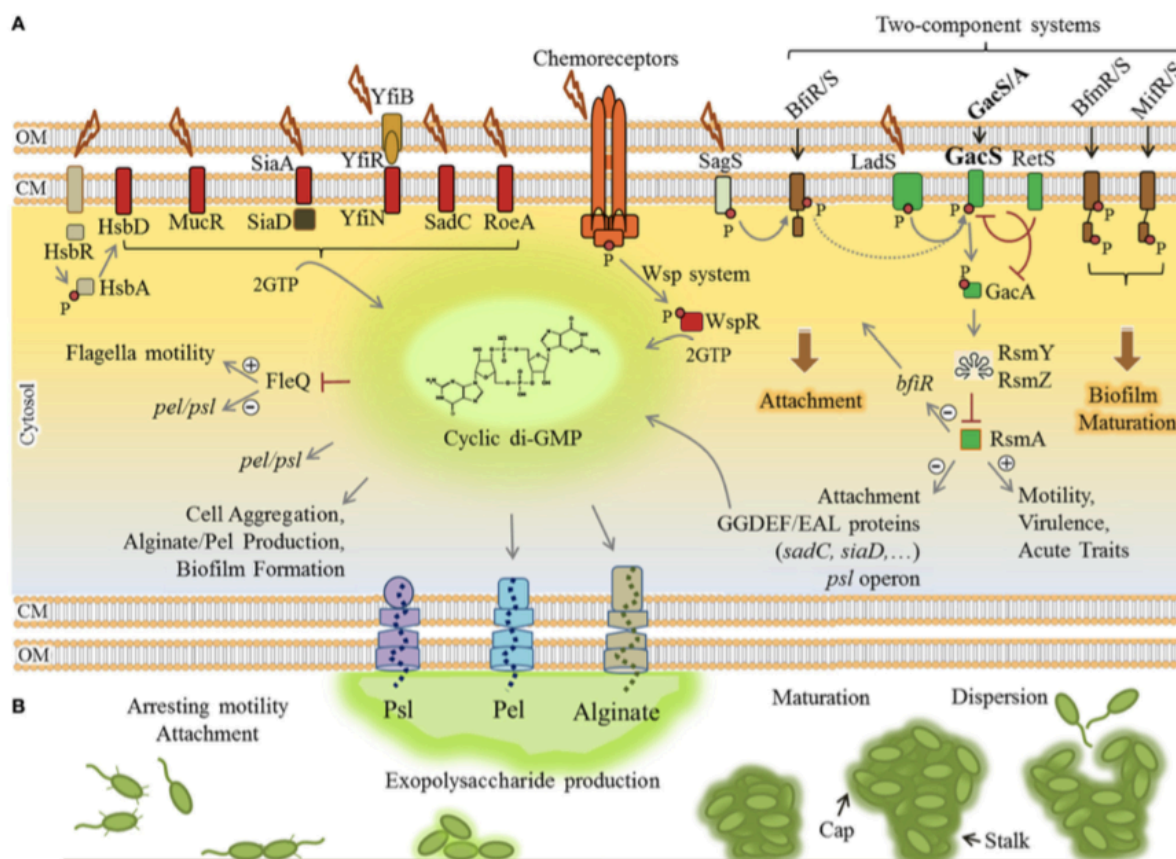


Figure 12 : Voies de régulation impliquées dans la formation du biofilm en lien avec les variations de la concentration intracellulaire de c-di-GMP (A) et les étapes de développement du biofilm (B) (12)

L'expression de l'exopolysaccharide Psl peut également être régulée par LadS et RetS, deux senseurs, qui sont des histidines kinases possédant un domaine de détection spécifique pour un signal, et un domaine qui s'auto-phosphoryle suite à la détection du signal correspondant. LadS et RetS semblent avoir des fonctionnements opposés. Ils interviennent dans une voie de régulation complexe, LadS/RetS/GacS/GacA/RsmA, impliquant des systèmes à deux composants et contrôlant de nombreuses réponses physiologiques chez *P. aeruginosa*. La cascade de régulation faisant intervenir LadS entraîne la traduction des gènes codant pour la synthèse des exopolysaccharides et la répression des gènes du système de sécrétion de type III (SST3) et d'autres facteurs impliqués dans la cytotoxicité et la virulence.

La cascade RetS contrôlerait ces mêmes gènes de façon strictement opposée (**Figure 13**) (12, 190, 191).

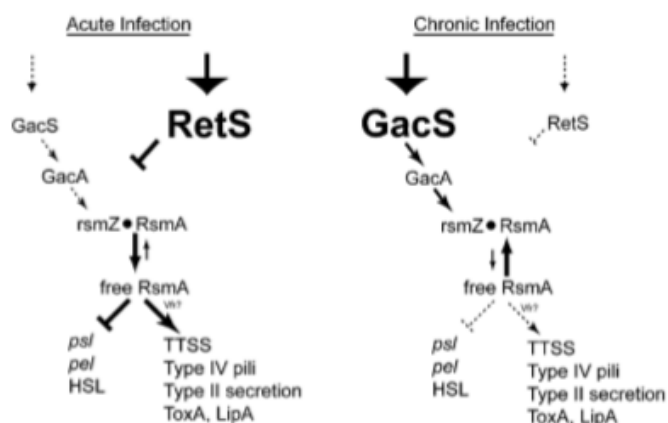


Figure 13 : Voies de régulation impliquant RetS/GacS

Les signaux environnementaux lors d'une infection aiguë favoriseraient l'activation de RetS, l'inhibition consécutive de la voie de signalisation GacS/GacA/rsmZ, l'augmentation de la concentration de RsmA pour aboutir à la synthèse de facteurs de virulence. En situation d'infection chronique, la voie de signalisation GacS/GacA/rsmZ est activée, les facteurs de virulence moins exprimés et la synthèse des exopolysaccharides augmentée (190).

3. Modèles de biofilm *in vitro*

3.1 Modèles statiques

(a) Le modèle en microplaque

Le modèle statique le plus fréquemment utilisé dans la littérature est le modèle de biofilm formé sur microplaque. Ce modèle consiste à inoculer une suspension calibrée, de 10^7 à 10^8 bactéries/mL, dans une microplaque (de 6 à 96 puits). Une première étape de 1 h à 4 h est nécessaire pour permettre l'adhésion des bactéries au support. Le milieu surnageant est ensuite retiré délicatement afin d'enlever les bactéries planctoniques. Du milieu de culture est ensuite ajouté dans les puits de la microplaque pendant une durée minimum de 24 h jusqu'à quelques jours afin de permettre la formation d'un biofilm (192). L'atmosphère pour incuber les bactéries sera choisie selon l'espèce bactérienne étudiée. À l'issue de cette étape ou après une période supplémentaire d'exposition antibiotique, les biofilms pourront être quantifiés

par numération des colonies sur gélose ou marqués par différents colorants ou sondes fluorescentes.

En 2018, une nouvelle méthode de rinçage pour les modèles de biofilm *in vitro* en microplaques utilisant la vapeur d'eau a été développée. Cette approche permettrait d'améliorer la reproductibilité des résultats tout en préservant l'intégrité structurelle des biofilms. Cette méthode a été validée pour les espèces de *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* et *E. coli* (193).

(b) Estimation des concentrations bactériennes en biofilm par culture

Pour estimer quantitativement la concentration des bactéries viables (et cultivables) en biofilm, les biofilms seront récupérés après pipetage, vortex ou sonication pour détacher les cellules du support. Des dilutions en séries sont réalisées, puis un volume de 100 μL est déposé et étalé sur des géloses. Après une incubation de 24 à 48 h (la croissance des colonies isolées de biofilm est parfois plus lente), le nombre de colonies sur chacune des géloses est déterminé et la concentration moyenne de cellules bactériennes adhérentes et cultivables ainsi estimée en \log_{10} unité formant colonie (UFC)/mL, avec une limite de détection d'1 \log_{10} UFC/mL (2, 194).

(c) Quantification de la biomasse, de la matrice et de la viabilité en biofilm par des tests colorimétriques

Différentes techniques permettent de révéler la présence d'un biofilm. La méthode de marquage au Cristal Violet, à partir d'un biofilm formé sur une microplaque, est la technique la plus répandue pour quantifier la biomasse du biofilm (à la fois la matrice extracellulaire, les cellules vivantes et mortes). Après un rinçage délicat des puits, le biofilm est mis en contact avec le Cristal Violet puis lavé avec un mélange acétone-éthanol et enfin l'absorbance est mesurée (195). L'absorbance mesurée reflète la capacité des cellules à adhérer et donc à former un biofilm au fond des puits de la microplaque. D'autres colorants peuvent être utilisés sur le même principe ; tel que le Rouge Congo, pour quantifier la biomasse formée par les exopolysaccharides de la matrice extracellulaire du biofilm (196).

Des tests colorimétriques peuvent également être utilisés pour quantifier la viabilité et l'activité des cellules à partir de biofilms formés en plaques, il s'agit des méthodes utilisant le FDA (diacétate de fluorescéine) et le XTT (un sel de tétrazolium). Les cellules viables sont capables de convertir le FDA, qui est un composé non coloré, en fluorescéine jaune par l'action

des estérases, et de réduire le XTT, qui est un composé jaune en formazan, un colorant orange (192). Ces techniques permettent ainsi de quantifier directement les cellules viables dans la totalité du biofilm fixé à son support (197).

(d) *Visualisation de la structure du biofilm par microscopie*

Les techniques de microscopie électronique permettent une bonne visualisation du biofilm, mais exigent des matériels très spécifiques, et d'usage encore restreint.

À partir d'un biofilm formé sur des plaques de 6, 12 ou 24 puits, la microscopie confocale (Confocal Laser Scanning Microscopy [CLSM]), via l'utilisation de différentes sondes fluorescentes, permet d'analyser la structure du biofilm (198). Le Syto-9 permet de marquer l'ensemble des cellules du biofilm (vivantes et mortes), qui apparaîtront en vert. L'épaisseur du biofilm pourra être estimée et son architecture visualisée (199). L'utilisation d'un marquage Live/Dead composé de Syto-9 et d'iodure de propidium (se fixant sur les bactéries dont la membrane est altérée et chassant le Syto-9 de la cellule) permet de distinguer au sein du biofilm les cellules vivantes des cellules mortes (qui apparaîtront en jaune/rouge). D'autres sondes fluorescentes telles que le white calcofluor ou le 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyl-2(9H)-acridinone (DDAO) permettront de distinguer des composants de la matrice extracellulaire, respectivement, les exopolysaccharides et l'ADNe (200, 201). Il est également possible de modifier génétiquement des souches afin qu'elles expriment un fluorophore comme la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette technique consiste à fusionner le gène de la GFP à celui de la protéine que l'on désire étudier. La protéine recombinante obtenue possède les propriétés de fluorescence de la GFP et peut ainsi être détectée. Cette technique permet par exemple de suivre la formation d'un biofilm au cours du temps.

(e) *Évaluation de l'activité des antibiotiques par les méthodes du « Calgary Biofilm Device » et Biofilm Ring Test™*

Un autre modèle de biofilm *in vitro* est largement utilisé, il s'agit du « Calgary Biofilm Device » (**Figure 14**). Cette méthode est spécifiquement employée pour évaluer l'activité des antibiotiques en biofilm. Cette technique nécessite de former un biofilm dans une microplaque de 96 puits comme précédemment décrit au début de ce chapitre. Cette microplaque sera recouverte d'un couvercle constitué de 96 petits « picots » sur lesquels le biofilm se formera. Les « picots » sont ensuite rincés pour éliminer les bactéries non adhérentes, puis plongés dans

une autre microplaque qui contient des concentrations croissantes d'antibiotiques. Après exposition aux antibiotiques pendant la durée souhaitée, le couvercle est retiré, rincé, puis les cellules en biofilm, adhérentes aux picots, sont détachées de leur support par sonication. Le dénombrement des bactéries qui ont survécu en biofilm après exposition antibiotique, permet alors, soit par la mesure de la densité optique, soit par la numération des colonies sur gélose, de déterminer des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides en biofilm (MBIC et Minimal Biofilm Bactericidal Concentration [MBBC]) (**Tableau 1**) (202–204).

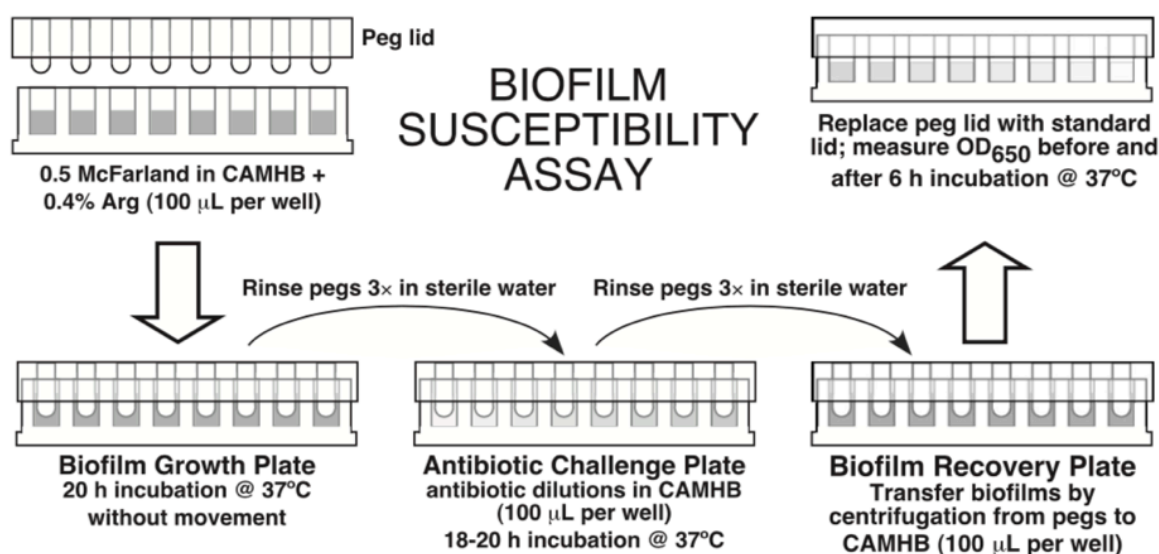


Figure 14 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques en biofilm avec la méthode du « Calgary Biofilm Device » (203)

Tableau 1 : Paramètres microbiologiques d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques en biofilm déterminés par la méthode du « Calgary Biofilm Device » (204)

Parameter	Definition
MIC	The lowest concentration of an antibiotic that inhibits the visible growth of a planktonic culture after overnight incubation
MBIC	The lowest concentration of an antibiotic that resulted in an OD _{650 nm} difference of ≤10% (1 log difference in growth after 6 h of incubation) of the mean of two positive control well readings
MBC	The lowest concentration of an antibiotic producing a 99.9% CFU reduction of the initial inoculum of a planktonic culture
BBC	The lowest concentration of an antibiotic producing a 99.9% reduction of the CFUs recovered from a biofilm culture as compared to the growth control
MBEC	The lowest concentration of an antibiotic that prevents visible growth in the recovery medium used to collect biofilm cells
BPC	Same as the MBIC, but bacterial inoculation and antibiotic exposure occur simultaneously

BBC, biofilm bactericidal concentration; BPC, biofilm-prevention concentration; MBC, minimal bactericidal concentration; MBEC, minimal biofilm-eradication concentration; MBIC, minimal biofilm inhibitory concentration; OD, optical density.

A titre d'exemple, des valeurs obtenues dans un biofilm de *P. aeruginosa* par la méthode du « Calgary Biofilm Device » sont présentées dans le **Tableau 2** (204).

Tableau 2 : Comparaison des paramètres microbiologiques évaluant l'activité antimicrobienne de certains antibiotiques vis-à-vis de *P. aeruginosa* en culture planctonique et en biofilm (204)

Antibiotic	MIC (mg/L)	MBIC (mg/L)	MBC (mg/L)	MBEC (mg/L)	BBC (mg/L)	BPC (mg/L)	Biofilm model
AZT	4 ^a	>128 ^a	8	>1024 ^b	–	–	Calgary device
CAZ	2 ³ /1 ⁵ /2 ^d	128 ³ /128 ^d	2 ⁵ /4 ^d	>1024 ^b	16 ⁵ /1024 ^d	16 ^d	Calgary device
MER	≤1 ³ /0.5 ^c	4 ^a	1 ^c	–	8 ^c	–	Calgary device
IMP	2 ³ /1 ^e	64 ³ /32 ^e	4 ^d /4 ^e	1024 ³ />1024 ^b	256 ^d	32 ^d	Calgary device
CIP	0.5 ³ /0.125 ⁵ /1 ^d	1 ³ /1 ^d	0.25 ⁵ /1 ^d	4 ^b	2 ⁵ /64 ^d	1 ^d	Calgary device
TOB	2 ³ /2 ^d	4 ³ /8 ^d	2 ^d	2 ^b	64 ^d	4 ^d	Calgary device
COL	2 ³ /2 ^e	16 ⁵ /16 ^e	1 ^d /8 ^e	128 ^e	64 ^d	2 ^d	Calgary device
AZM	128 ³ /128 ^d	2 ³ /16 ^d	>128 ^d	–	512 ^d	8 ^d	Calgary device
CXA-101	0.5 ^c	–	0.5 ^c	–	0.5 ^c	–	Calgary device

AZM, azithromycin; AZT, aztreonam; BBC, biofilm bactericidal concentration; BPC, biofilm-prevention concentration; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; IMP, imipenem; MBC, minimal bactericidal concentration; MBEC, minimal biofilm-eradication concentration; MBIC, minimal biofilm inhibitory concentration; MER, meropenem; TOB, tobramycin.

Le Biofilm Ring Test® (BioFilm Control, Saint-Beauzire, France), développé récemment, permet l'étude de la cinétique de formation du biofilm. Son principe repose sur le déplacement de microbilles magnétisables le long d'une surface sous l'action d'un aimant. Ce déplacement est modulé par la présence des bactéries et par la viscosité à proximité de la surface (modifiée par les macromolécules incluses dans le biofilm). Lorsque les bactéries seront en culture « libre », les billes seront attirées par le champ magnétique au centre du puits ce qui va se traduire par la présence d'un spot visible à l'œil nu. En cas de formation d'un biofilm, les bactéries auront adhéré au fond du puits entraînant ainsi l'immobilisation des billes et aucun spot ne sera visible (**Figure 15**) (205).

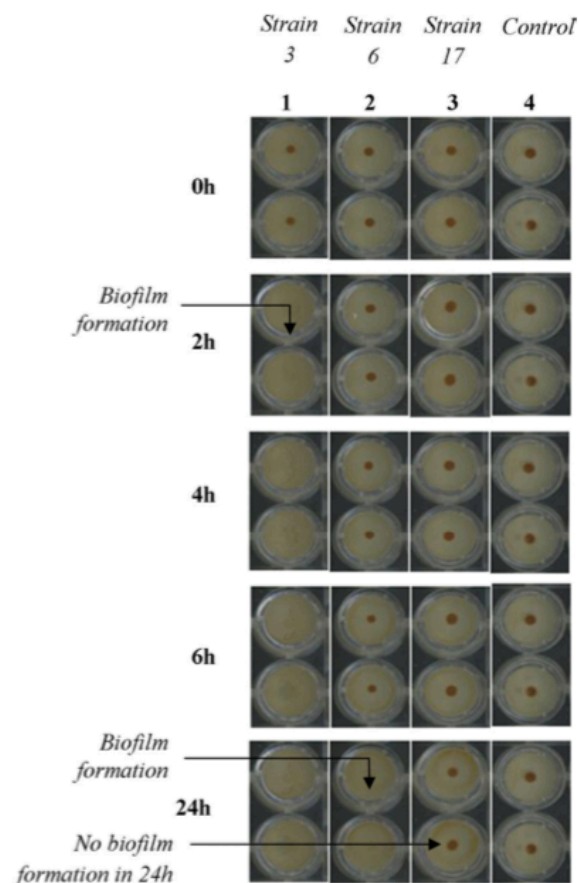


Figure 15 : Étude de la cinétique de formation du biofilm avec la méthode du Biofilm Ring Test (205)

Un test de sensibilité aux antibiotiques, appelé Antibiofilmogramme®, a été mis au point à partir du Biofilm Ring Test® dans le but d'évaluer la capacité des antibiotiques à prévenir la formation d'un biofilm (206, 207).

De très nombreux autres modèles de biofilm *in vitro* statiques ont été décrits dans la littérature. Il s'agissait, entre autres, de biofilms formés sur des billes d'alginate, sur des disques de verre à base de borosilicate, sur des membranes en polycarbonate (208–210), ou encore parfois directement formés sur des dispositifs médicaux implantables (211, 212).

3.2 Modèles dynamiques

Dans le cadre de recherches expérimentales, des modèles *in vitro* dynamiques ont été développés permettant de se rapprocher des conditions auxquelles seraient exposés les biofilms dans leur environnement naturel, en tenant compte notamment des forces de flux qui interviennent lors du procédé de formation du biofilm (**Figure 16**) (213). Un système à flux continu (« flow cell ») est constitué de petites chambres qui permettent la formation d'un biofilm à l'interface solide-liquide en présence d'une force de cisaillement et d'un apport continu d'éléments nutritifs (204). Un autre système (« drip flow biofilm reactor ») également composé de chambres indépendantes permet la formation de biofilm en condition d'écoulement et de cisaillement plus faibles (214). Une autre approche, le CDC biofilm reactor, a été développée. Ce modèle est composé de huit portoirs contenant chacun trois disques sur lesquels le biofilm va se former. Les forces de cisaillement seront alors produites par une barre d'agitation au centre du dispositif (215). Enfin, plus récemment encore, des systèmes de microfluidiques ont été développés, permettant l'analyse de la structure et de la composition des biofilms par microscopie confocale, ainsi que l'évaluation de l'activité des antibiotiques en biofilm par numération des colonies sur gélose.

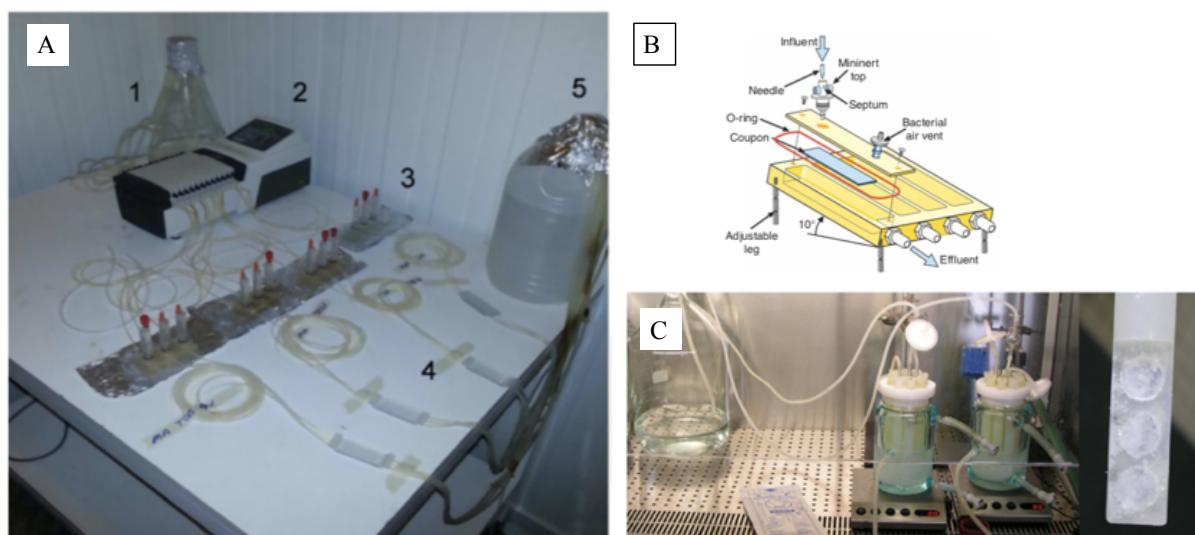


Figure 16 : Modèles de biofilm *in vitro* dynamiques en flux
 (A) « flow cell » (204); (B) « drip flow biofilm reactor » (214); (C) « CDC biofilm reactor » (213)

3.3 Intérêts / limites des modèles expérimentaux

Les modèles *in vitro* statiques, bien que d'usage encore relativement complexe pour une utilisation au quotidien pour le diagnostic microbiologique, apportent nombre d'informations complémentaires de celles obtenues par les techniques de routine réalisées avec des cultures en phase planctonique. La quantification de la biomasse du biofilm par le Cristal Violet sur microplaque nécessite peu de matériel et est peu coûteuse. Elle est particulièrement appropriée pour effectuer le screening d'un grand nombre souches. Les modèles sur microplaque sont adaptés à la réalisation de différentes techniques (Cristal Violet, microscopie confocale...) et permettent d'obtenir à la fois des données de biomasse, de concentrations bactériennes ou encore des images de la structure du biofilm. Les modèles *in vitro* dynamiques permettent la constitution de biofilm dans un contexte de forces de cisaillements, potentiellement plus proche de la réalité *in vivo*, l'analyse de points intermédiaires, et des variations au cours du temps des conditions de culture.

Néanmoins, ces différents modèles comportent d'importantes limites de caractérisation des biofilms formés. La méthode de quantification du biofilm par Cristal Violet permet une quantification globale de la biomasse du biofilm (bactéries et matrice extracellulaire) mais ne distingue pas les cellules vivantes des cellules mortes. L'étape de détachement du biofilm, que ce soit par pipetage, vortex ou sonication, est peu reproductible. Les étapes de lavage préalables visant à éliminer les cellules planctoniques peuvent entraîner l'élimination d'une partie du biofilm, ou à l'inverse laisser des bactéries en biofilm fixées sur le support. La mesure de la viabilité des cellules en biofilm par des colorants tels que le FDA ou le XTT permettent de s'affranchir de l'étape de détachement du biofilm, obligatoire avec la technique de dénombrement sur milieu gélosé, mais sont peu précises quant aux voies enzymatiques explorées. Quant au « Calgary Biofilm Device », il ne permet d'évaluer que des concentrations fixes d'antibiotiques, par des mesures en point final.

L'analyse par microscopie confocale des biofilms requiert des équipements extrêmement coûteux, n'est possible que sur certains supports, et nécessite un processus complexe de traitement et d'analyse d'images.

D'une façon plus générale, ces méthodes d'évaluation sont longues, requièrent des équipements spécifiques, des volumes importants de milieux de culture et des techniques complexes encore peu partagées. Ces techniques apportent néanmoins des informations utiles à visée de recherche, permettant notamment des comparaisons entre souches et entre antibiotiques.

4. Évaluation des traitements antibiotiques dans des modèles de biofilm *in vitro* à *P. aeruginosa*

Certains travaux ont évalué l'activité de traitements antibiotiques pour prévenir la formation du biofilm ou l'effet de concentrations sub-inhibitrices sur le biofilm. Dans une perspective thérapeutique clinique, seules seront détaillées ici les études *in vitro* qui ont évalué l'impact de traitements antibiotiques à doses présumées efficaces sur un biofilm formé. Là encore, les modèles de biofilm choisis, les souches de *P. aeruginosa* utilisées, les concentrations antibiotiques testées sont très divers.

4.1 Monothérapies d'antibiotique

Que les biofilms soient formés sur des billes d'alginate ou qu'ils soient évalués dans un modèle de *Galleria mellonella*, la tobramycine, montrait en biofilm une bien moindre efficacité qu'en culture planctonique (**Figure 17**) (208, 216). Dans l'étude de Cao *et al.* (208), plus de 99% des cellules planctoniques étaient tuées par un traitement de tobramycine, tandis qu'en biofilm, la réduction bactérienne n'était que de 25%.

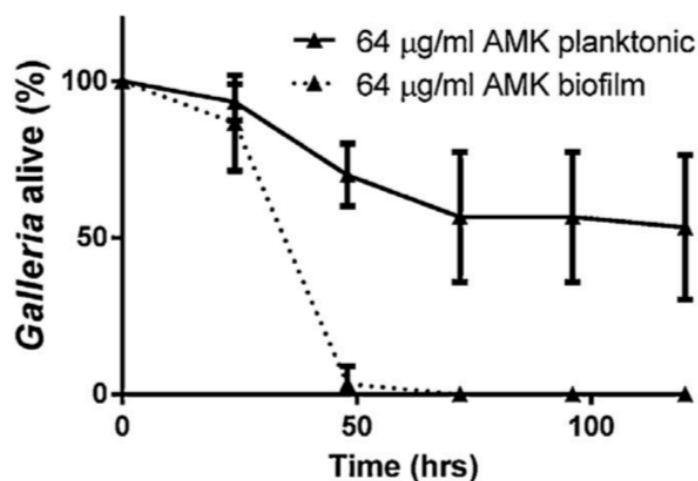


Figure 17 : Survie de larves de *Galleria mellonella* infectées par une culture planctonique ou un biofilm de *P. aeruginosa* après exposition à de l'amikacine (216)

Dans différents travaux, malgré une réduction bactérienne initiale importante et un effet sur la biomasse du biofilm, la tobramycine ne permettait pas d'éliminer le biofilm bactérien dans sa totalité (208, 217, 218). Lors d'utilisation de concentrations de tobramycine

15 fois plus élevées que les concentrations sériques usuelles, et correspondant aux concentrations locales obtenues après administration par aérosols, une réduction importante des concentrations bactériennes (jusqu'à atteindre la limite de détection des cellules viables) était notée. Néanmoins, dans cette même étude, les analyses par microscopie confocale montraient une persistance de la structure du biofilm et de cellules vivantes dans les couches inférieures du biofilm (**Figure 18**).

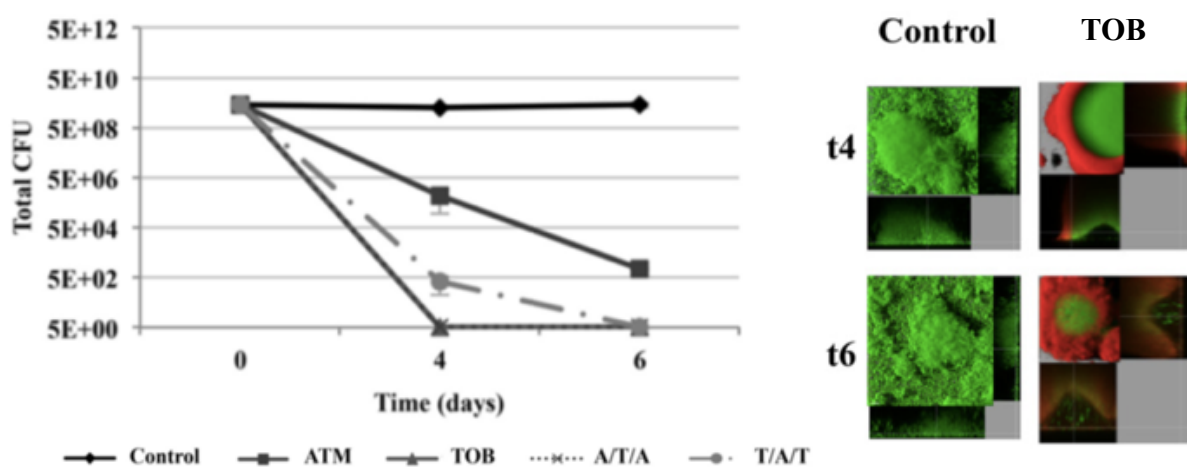


Figure 18 : Traitement par tobramycine d'un biofilm de *P. aeruginosa*
 À gauche, les courbes de réduction bactérienne en fonction du temps après exposition à des concentrations élevées de tobramycine ou d'aztréonam. À droite, les analyses par microscopie confocale après exposition à des concentrations élevées de tobramycine (les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules mortes en rouge). ATM : aztreonam ; TOB : tobramycine ; A/T/A et T/A/T : traitements séquentiels par tobramycine et aztréonam (217)

Aucun mutant résistant n'était isolé des biofilms après exposition à des concentrations de 100 et 1000 mg/L de tobramycine, même pour des souches hypermutatrices (217). Il a été décrit que les faibles concentrations en oxygène dans les couches les plus profondes du biofilm pouvaient limiter la diffusion de la tobramycine et ainsi diminuer son efficacité (102, 219).

Comme pour les aminosides, une moindre efficacité de la ciprofloxacine était observée en biofilm par rapport à une culture planctonique (216, 220). Les fluoroquinolones entraînaient une réduction des concentrations bactériennes mais ne permettait pas une éradication bactérienne complète du biofilm de *P. aeruginosa* (164, 221). Dans le travail de Pamp *et al.* (164), comprenant des analyses par microscopie confocale, l'efficacité de la ciprofloxacine n'était observée que vis-à-vis des cellules en périphérie du biofilm, métaboliquement actives.

Les bactéries qui étaient dans les couches les plus profondes du biofilm demeuraient vivantes après exposition à la ciprofloxacine. Même l'utilisation de concentrations très élevées de ciprofloxacine, jusqu'à 100 fois la CMI de la souche, ne permettait pas d'éradiquer un biofilm de *P. aeruginosa in vitro* (Figure 19) (222).

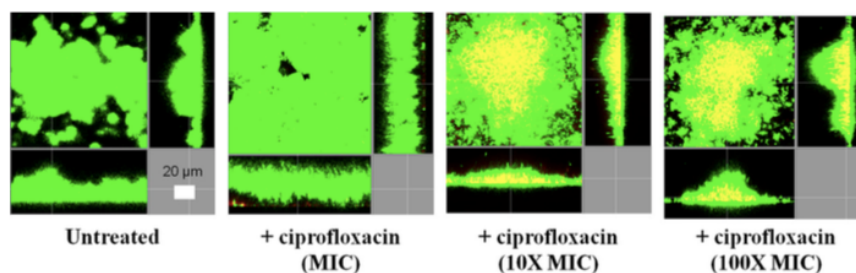


Figure 19 : Biofilms de *P. aeruginosa* exposés à des concentrations croissantes de ciprofloxacine. Les biofilms ont été formés dans un modèle dynamique *in vitro* pendant 48 h puis exposés à de la ciprofloxacine pendant 24 h. Les images ont été obtenues par microscopie confocale après marquage des biofilms par du Syto-9 et de l'iodure de propidium. Les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules altérées en jaune/rouge (222)

Dans un autre modèle expérimental, l'exposition d'un biofilm formé de souches sensibles à la ciprofloxacine mais hypermutatrices à des concentrations de ciprofloxacine permettant d'atteindre un rapport $AUC_{24h}/CMI >125$, conduisait à la sélection de mutants résistants à la ciprofloxacine (223). La colistine, utilisée seule, ne semblait pas beaucoup plus efficace que des monothérapies d'aminoside ou de ciprofloxacine en biofilm. À la différence de la ciprofloxacine, la colistine semblait agir sur les cellules des couches profondes du biofilm qui montraient une activité métabolique réduite (164). Vis-à-vis de souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes, son activité était inconstante en biofilm et l'émergence de mutants résistants était observée pour certaines souches (92).

Les β -lactamines ont été relativement peu évaluées dans des modèles de biofilm de *P. aeruginosa*. D'une façon générale, hormis le mérépénème, les β -lactamines présentent une faible activité vis-à-vis de *P. aeruginosa* en biofilm. Dans l'étude de Fernandez-Olmos *et al.* (224), les MBIC évaluées dans un modèle de « Calgary Biofilm Device » étaient les plus élevées pour la ceftazidime et l'imipénème, comparativement à d'autres antibiotiques tels que la ciprofloxacine et la tobramycine. Les MBIC étaient jusqu'à 1000 fois supérieures aux CMI usuelles. Le ralentissement de l'activité des cellules en biofilm semble limiter l'efficacité des

β -lactamines dont le mécanisme d'action cible la synthèse du peptidoglycane des cellules répliquatives (225).

L'aztréonam, utilisé seul, montrait une faible activité antibactérienne avec une réduction limitée de l'inoculum bactérien. En revanche, une modification de la structure du biofilm et une filamentation des bactéries étaient observées (217, 218). Le méropénème produisait un effet rapide et bactéricide vis-à-vis de *P. aeruginosa* en biofilm en agissant notamment sur les parties supérieures des structures en champignon du biofilm. Cependant, des doses répétées de méropénème entraînaient l'apparition d'une tolérance de *P. aeruginosa* à l'antibiotique (226).

4.2 Associations d'antibiotiques

Dans un modèle de biofilm *in vitro* de *P. aeruginosa* formé en chambre à flux continu, le méropénème, en association avec la tobramycine, permettait une réduction de la biomasse et une éradication du biofilm presque complète (226) tandis que dans un modèle de biofilm formé sur des cellules épithéliales bronchiques, l'association de la tobramycine et de l'aztréonam ne faisait pas mieux qu'une monothérapie de tobramycine (**Figure 20**) (218).

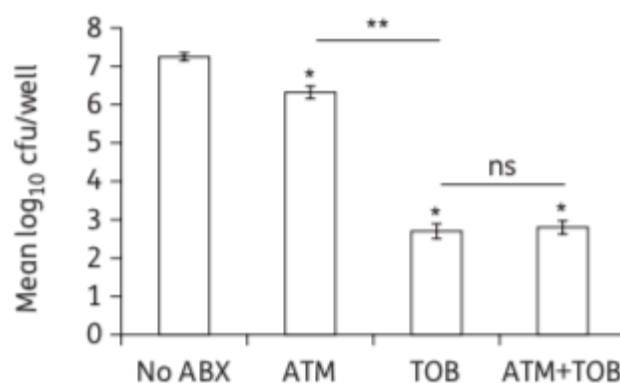


Figure 20 : Biofilms de *P. aeruginosa* exposés à l'aztréonam, la tobramycine et à une association d'aztréonam et de tobramycine

Les biofilms ont été formés *in vitro* sur des cellules épithéliales bronchiques humaines pendant 6 h puis exposés aux antibiotiques pendant 16 h. **, $p < 0,05$; ns, non significatif
 ABX : antibiotic ; ATM : aztréonam ; TOB : tobramycine (218)

En association avec des β -lactamines, la colistine semblait augmenter l'activité du doripénème, mais sans pourtant permettre l'éradication complète du biofilm (92). L'ajout de méropénème ou de ceftolozane/tazobactam à la colistine ne semblait pas nettement plus efficace, mais prévenait l'émergence de la résistance à la colistine, pour des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes (93).

L'étude de Pamp *et al.* (164) mettait en évidence des activités complémentaires, de la ciprofloxacine et la tétracycline d'une part qui permettaient de tuer les bactéries métaboliquement actives à la périphérie du biofilm, et de la colistine d'autre part qui avait une action sur les cellules des couches plus profondes du biofilm dont l'activité métabolique était réduite (**Figure 21**). Cependant, ces résultats n'ont pas été comparés dans d'autres modèles de biofilms *in vitro* ni *in vivo*.

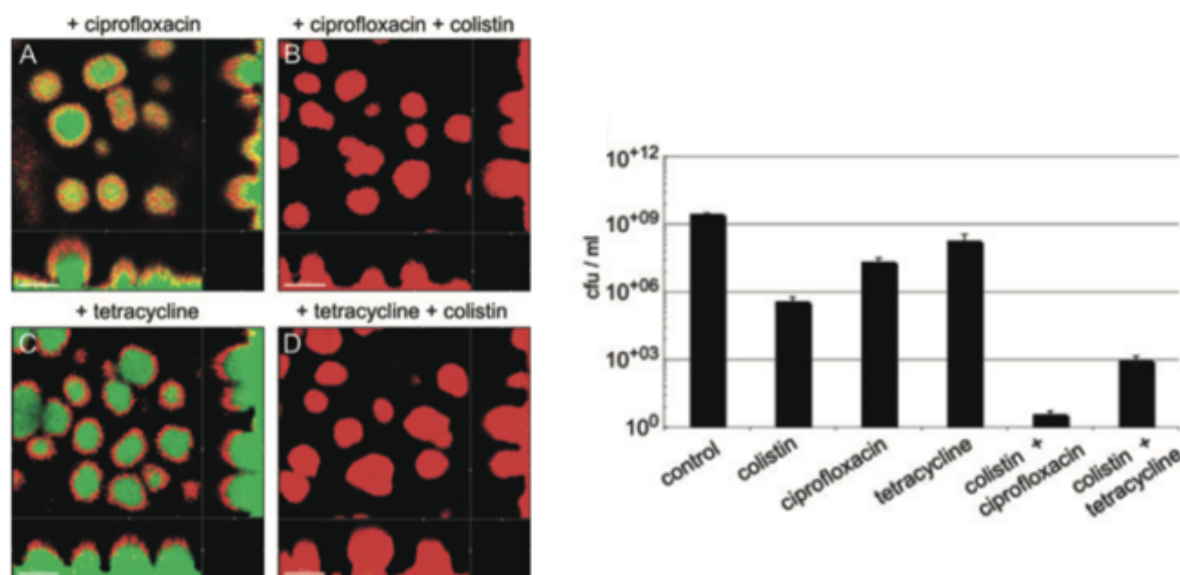


Figure 21 : Biofilms de *P. aeruginosa* exposés à la ciprofloxacine et à l'association de ciprofloxacine et de colistine, à la tétracycline et à l'association de tétracycline et de colistine
 Les biofilms ont été formés dans un modèle dynamique *in vitro* pendant 4 j puis exposés aux antibiotiques pendant 24 h. À gauche, les images ont été obtenues par microscopie confocale. Les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules altérées en jaune/rouge. À droite, les concentrations bactériennes en biofilm avant et après exposition aux antibiotiques (164).

L'azithromycine, quoique dépourvue *a priori* d'activité intrinsèque vis-à-vis de *P. aeruginosa*, semblait accroître l'activité d'autres molécules par son action anti-QS. L'efficacité de la ceftazidime était notamment augmentée en association avec l'azithromycine, par

diminution de la production des rhamnolipides, sous contrôle du système RhII/RhIR du QS (227, 228).

Enfin, un traitement séquentiel par aztréonam et tobramycine a été évalué dans un modèle dynamique de biofilm de *P. aeruginosa* dans la mesure où la tobramycine peut favoriser la surexpression de la pompe d'efflux MexXY-OprM mais aussi dans le même temps inactiver la pompe d'efflux MexAB-OprM et donc conférer une augmentation relative de la sensibilité à l'aztréonam, substrat de cette dernière pompe d'efflux (229). Une réduction significative des concentrations bactériennes et de la biomasse n'était observée que lorsque les biofilms étaient exposées à des concentrations d'antibiotiques de l'ordre de 250 à 1000 fois la CMI (217).

L'ensemble de ces études, résumées dans le **Tableau 3**, particulièrement hétérogènes dans les modalités expérimentales, les thérapeutiques évaluées, les critères d'évaluation, et ne démontrant pas de tendance nettement reproductible en faveur d'une modalité thérapeutique, atteste néanmoins de la capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* en biofilm et de la difficulté à l'éradiquer dans ces conditions malgré le recours à des concentrations élevées d'antibiotiques ou à des associations d'antibiotiques initialement efficaces vis-à-vis de bactéries en culture planctonique.

Tableau 3 : Activité des différents traitements antibiotiques, à concentrations supra-inhibitrices, vis-à-vis de biofilms *in vitro* de *P. aeruginosa*

Modèle de biofilm et techniques d'analyse du biofilm	Souches utilisées	Exposition antibiotique	Résultats principaux	Références
Support : système à flux Durée : 4 jours Dénombrement sur géloses Microscopie confocale	PAO1 et 2 souches cliniques non mucosidées de <i>P. aeruginosa</i>	Colistine (25 mg/L) + Ciprofloxacine (60 mg/L) Colistine + Tétracycline (200 mg/L) 24h d'exposition	Ciprofloxacine et tétracycline : mort cellulaire à la périphérie de la structure du biofilm Colistine : mort cellulaire au centre de la structure du biofilm Les associations de ciprofloxacine ou tétracycline et colistine : mort cellulaire dans l'ensemble de la structure du biofilm (cellules viables toujours isolées en culture - en faible proportion)	Pamp, Mol Microbiol, 2008 (164)
Support : système à flux Durée : 2 jours formé Dénombrement sur géloses Microscopie confocale	PAO1 et une souche hypermutatrice dérivée de PAO1	Ciprofloxacine (2 mg/L) Pendant 4 jours	Recroissance bactérienne après 2 jours de traitement par ciprofloxacine Régénération de la structure du biofilm après 2 jours de traitement par ciprofloxacine (qualitatif, variations des biomasses non significatives) Isolement de mutants résistants à la ciprofloxacine	Macia, Antimicrob Agents Chemother, 2011 (223)
Support : calgary biofilm device Durée : 20 h	57 souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées chez des patients atteints de mucoviscidose (souches non mucosidées)	Lévofloxacine, Ciprofloxacine , Ceftazidime, Imipénème, Tobramycine , Colistine, Azithromycine	Ceftazidime et imipénème : concentrations minimales inhibitrices mesurées en biofilm les plus élevées	Fernández-Olmos, Int J Antimicrob Agents, 2012 (224)

Support : cellules épithéliales bronchiques humaines Durée : 6 h Dénombrement sur géloses Microscopie confocale	PAO1 et des souches cliniques (mucoïdes et non mucoïdes) isolées chez des patients atteints de mucoviscidose	Aztréonam (700 mg/L) Tobramycine (1000 mg/L) Monothérapie et Bithérapie 16 h d'exposition	Tolérance vis-à-vis de l'aztréonam (réduction bactérienne ~ 1 log ₁₀ ufc) Réduction bactérienne supérieure avec la tobramycine (réduction bactérienne ~ 4 log ₁₀ ufc) Efficacité de l'association de la tobramycine et de l'aztréonam identique à celle de la tobramycine seule	Yu, J Antimicrob Chemother, 2012 (218)
Support : système à flux Durée : 24 h Dénombrement sur géloses Microscopie confocale	PAO1 et 2 souches cliniques résistantes vis-à-vis des carbapénèmes	Colistine (1,25 et 3,50 mg/L) Doripénème (25 mg/L) Monothérapie et Bithérapie	Émergence de mutants résistants après exposition à la colistine Bithérapie : prévention de la sélection de mutants résistants à la colistine et éradication du biofilm pour certaines souches (inconstante)	Lora-Tamayo, J Antimicrob Chemother, 2014 (92)
Support : système à flux Durée : 2 jours Microscopie confocale	PA14	Ciprofloxacine de 1xCMI à 100xCMI pendant 24 h	Observation majoritairement de cellules vivantes et en proportion moindre de cellules altérées/mortes au centre de la structure du biofilm, uniquement pour les concentrations de ciprofloxacine de 10 et 100xCMI (qualitatif)	Reffuveille, Antimicrob Agents Chemother, 2014 (222)
Support : larves de <i>Galleria mellonella</i> infectées par un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> Durée : 24 h	PAO1	Amikacine 64 mg/L Ciprofloxacine 16 mg/L 100 h d'exposition antibiotique	Survie d'environ 50% des larves de <i>Galleria mellonella</i> après traitement par ciprofloxacine ou amikacine (Éradication des larves après une infection par une culture planctonique de <i>P. aeruginosa</i>)	Benthall, Int J Antimicrob Agents, 2015 (216)
Support : billes d'alginate Durée : 1, 3, 5, 7 jours Dénombrement sur géloses Microscopie confocale	PAO1	Tobramycine Concentration au pic (42,9 mg/L) pendant 30 min	Réduction bactérienne de l'ordre de 25% pour un biofilm de 24h Peu de différences entre le biofilm non traité et le biofilm traité, et observation de cellules vivantes après le traitement antibiotique par microscopie confocale (qualitatif)	Cao, J Antimicrob Chemother, 2015 (208)

Support : système à flux Durée : 2 à 4 jours Dénombrement sur gélouses Microscopie confocale	PAO1 et 5 souches hypermutatrices (dérivées de PAO1 et cliniques)	Aztréonam et Tobramycine Exposition séquentielle Concentrations au pic : 1000 mg/L de tobramycine - 700 mg/L d'aztréonam Concentrations au 1/10 ^{ème} du pic : 100 mg/L de tobramycine - 70 mg/L d'aztréonam	Tobramycine : réduction des concentrations bactériennes, mais cellules vivantes observées par microscopie confocale au centre de la structure du biofilm Aztréonam : faible réduction bactérienne, mais effet sur la biomasse du biofilm et filamentation des cellules Tobramycine/ Aztréonam : activité antibactérienne supérieure uniquement pour les concentrations au pic Mutants résistants inconstants et en faibles proportions (uniquement pour les concentrations au 1/10 ^{ème} du pic)	Rojo-Moliner, Antimicrob Agents Chemother, 2016 (217)
Support : système à flux Durée : 24 h et 72 h Microscopie confocale	PAO1	Méropénème Tobramycine Simulation des concentrations humanisées	Méropénème : effet rapide et bactéricide, action sur les cellules situées à la partie supérieure des structures en champignon Mort cellulaire obtenue plus rapidement avec le méropénème que la tobramycine Association du méropénème et de la tobramycine : éradication presque complète du biofilm	Haagensen, J Antimicrob Chemother, 2017 (226)
Support : système à flux Durée : 2 jours Dénombrement sur gélouses	3 souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i> (sensibles à la colistine, résistantes à la ceftazidime)	Ceftazidime, Méropénème, Cefotiozane-tazobactam (Cmax) Monothérapie ou association avec la colistine (3,5 mg/L)	Réduction bactérienne faible avec les monothérapies Émergence de mutants résistants avec la colistine Ajout du méropénème ou de ceftiozane/tazobactam à la colistine : prévention de l'émergence de la résistance à la colistine	Gómez-Junyent, Int J Antimicrob Agents, 2019 (93)

III. Biofilm et récalcitrance aux antibiotiques

Le phénomène de survie des bactéries en biofilm à un traitement antibiotique peut être regroupé sous le terme de « récalcitrance ». Ce phénomène multifactoriel est dû à plusieurs mécanismes, à la fois de résistance et de tolérance (40).

La résistance est définie, dans des conditions de cultures planctoniques, comme la capacité d'une bactérie à se multiplier en présence d'un antibiotique, qu'il soit bactériostatique ou bactéricide. La résistance aux antibiotiques est généralement causée par des mutations héréditaires, transmissibles de la cellule mère aux cellules filles ou est acquise par transfert horizontal de gène. Elle est associée à de nombreux mécanismes moléculaires. La résistance est caractérisée par une augmentation de la CMI, là encore évaluée en conditions de cultures planctoniques, qui définit la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance bactérienne visible après 18 h d'incubation à 37°C (**Figure 22**) (12, 230, 231).

Les mécanismes bien décrits qui sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques, tels que la diminution de la perméabilité membranaire mettant en jeu les pompes d'efflux et porines, l'inactivation des antibiotiques par des enzymes, ne joueraient qu'un rôle marginal dans la capacité d'une population bactérienne à échapper aux traitements antibiotiques en biofilm. Dans les conditions de vie particulières du biofilm, les bactéries sont capables de survivre à de fortes concentrations d'antibiotiques bactéricides, alors même qu'elles sont parfaitement sensibles à l'antibiotique dans les conditions planctoniques *in vitro* de détermination de la sensibilité (232).

La tolérance, initialement définie en conditions planctoniques, ne s'applique que pour les antibiotiques bactéricides. Elle peut être définie comme la capacité de la bactérie à survivre à un antibiotique bactéricide, sans croissance bactérienne, même à des concentrations d'antibiotiques largement supérieures à la CMI de l'antibiotique. La CMI est inchangée mais une durée d'exposition plus longue à l'antibiotique, pour une population tolérante par rapport à une population sensible, sera nécessaire pour obtenir la mort de 99,99% de la population bactérienne (**Figure 22**) (230). Dans le contexte spécifique de la croissance bactérienne en biofilm, des phénomènes de tolérance sont décrits, rapportés à plusieurs mécanismes potentiels. Le phénomène de tolérance, peut conduire à une survie au long cours de la population bactérienne et l'absence d'éradication bactérienne. Le terme de persistance bactérienne sera alors retenu, concernant une sous-population de bactéries survivant en biofilm, et pouvant être sous-tendu par des mécanismes moléculaires spécifiques (40). Les spécificités de la croissance en biofilm de *P. aeruginosa* et leur impact sur les phénomènes

de résistance, tolérance et de persistance ont ainsi été analysés à partir des données de la littérature.

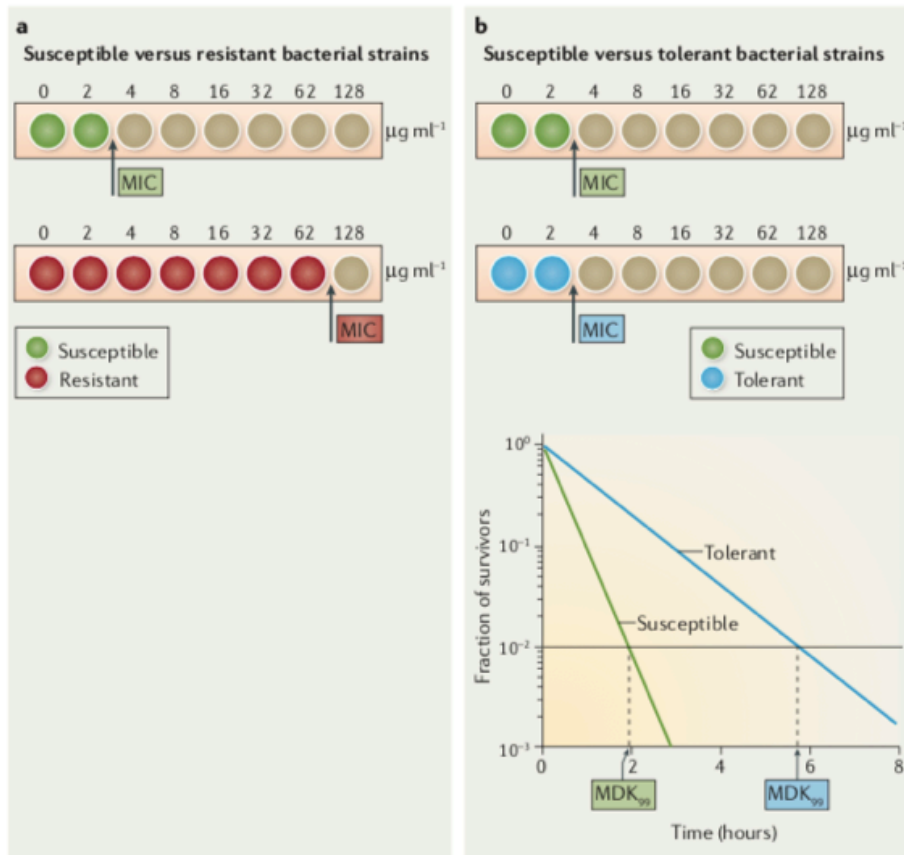


Figure 22 : Paramètres bactériologiques définissant la résistance et la tolérance à un antibiotique (A) La résistance est caractérisée par une augmentation de la CMI par rapport à celle mesurée pour la souche initiale sensible. (B) La tolérance est caractérisée par une CMI inchangée mais une augmentation de la durée d'exposition à l'antibiotique pour obtenir un effet bactéricide (230)

1. Impact de la matrice extracellulaire sur l'échappement de *P. aeruginosa* aux antibiotiques en biofilm

1.1 Diffusion des antibiotiques en biofilm

La diffusion des antibiotiques en biofilm dépend de l'espèce bactérienne, de l'antibiotique choisi, et des conditions de croissance du biofilm. Ainsi, les données de diffusion d'un antibiotique à travers la matrice d'un biofilm ne semblent pas pouvoir être extrapolées d'une espèce bactérienne à une autre et d'un antibiotique à un autre.

Dans un biofilm de *P. aeruginosa*, une évaluation de la vitesse de diffusion de la tobramycine et de la ciprofloxacine mettait en évidence une diffusion supérieure de la ciprofloxacine, quoique légèrement retardée par rapport à une diffusion en culture planctonique (102, 233). L'impact d'une moindre pénétration des antibiotiques dans le mécanisme de la tolérance en biofilm reste mal compris car même pour des antibiotiques qui diffusent assez rapidement en biofilm tels que les fluoroquinolones, l'éradication complète du biofilm bactérien n'est pas obtenue. Ainsi, Walters *et al.* (102) ont montré que malgré une diffusion correcte de la tobramycine et de la ciprofloxacine au sein d'un biofilm de *P. aeruginosa* formé sur des membranes pendant 48 h, et une exposition prolongée (jusqu'à 100 h) à des concentrations supra-inhibitrices de ces antibiotiques, les réductions bactériennes mesurées n'étaient que de l'ordre de 0,5 et 1,4 \log_{10} UFC/mL respectivement. Dans un modèle de biofilm de *P. aeruginosa* en flux continu, tandis que la ciprofloxacine diffusait dans l'ensemble de la structure du biofilm, la diffusion de la tobramycine était limitée à la périphérie du biofilm. Parallèlement, les cellules bactériennes à la périphérie du biofilm étaient tuées tandis que les cellules bactériennes au centre du biofilm survivaient à la tobramycine. La diffusion de la tobramycine augmentait avec l'allongement de la durée d'exposition, des concentrations de tobramycine plus élevées (de l'ordre de 50 à 100 mg/L) et en présence de cations (233). Plus que par l'exposition à des concentrations sub-inhibitrices à l'origine de sélection de mutants résistants, la diffusion plus lente des antibiotiques en biofilm pourrait ainsi laisser le temps nécessaire au développement d'une réponse phénotypique adaptative susceptible d'accroître la tolérance.

1.2 Rôle de l'ADN extracellulaire

L'ADNe, composant majeur de la matrice du biofilm, pourrait également jouer un rôle dans la tolérance aux antibiotiques en biofilm. Chargé négativement, l'ADNe, abondant dans la matrice, pourrait ainsi interagir avec la tobramycine, chargée positivement. C'est l'hypothèse formulée par Chiang *et al.* (234) (**Figure 23**).

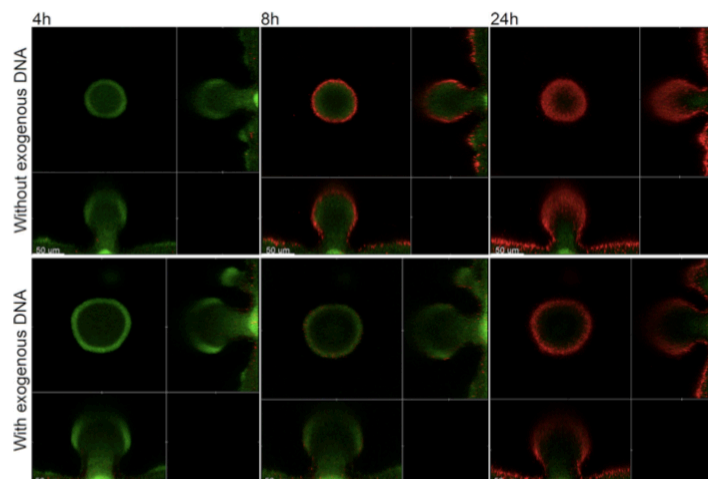


Figure 23 : Biofilms de *P. aeruginosa* exposés à la tobramycine, en l'absence et en présence d'ADN exogène
 Sur les images obtenues par microscopie confocale, les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules mortes en rouge (234)

Une souche de *P. aeruginosa* mutée dans les gènes du QS, *lasR* *rhIR*, formant en conséquence un biofilm moins structuré davantage sujet à la dispersion de l'ADNe, était ainsi plus sensible à l'action de la tobramycine que la souche sauvage. En revanche, lorsque de l'ADN exogène était ajouté, dans les mêmes conditions de culture, une tolérance de la souche mutée vis-à-vis de la tobramycine était observée. De même, la tobramycine était moins efficace lorsque des polynucléaires lysés, libérant ainsi de l'ADN dans le milieu, était introduits dans un biofilm de *P. aeruginosa* (234). Ces résultats suggèrent que l'ADNe de la matrice du biofilm pourrait en partie protéger les bactéries de l'action de la tobramycine.

L'ADNe pourrait également jouer un rôle dans la tolérance en biofilm de *P. aeruginosa* vis-à-vis de la colistine, qui est un polypeptide cationique qui a pour mécanisme d'action de désorganiser la membrane externe des bacilles Gram négatif, augmenter la perméabilité membranaire et ainsi aboutir à la mort de la cellule (235). L'ADNe de la matrice du biofilm, chargé négativement, pourrait interagir avec les cations Mg^{2+} , entraînant une diminution de leur concentration dans l'environnement. Des systèmes à deux composants, PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ, seraient alors activés favorisant l'expression de la protéine de membrane OprH, ce qui augmenterait la stabilité de la membrane, limitant l'action de la colistine pour aboutir à la tolérance de *P. aeruginosa* vis-à-vis du peptide cationique en biofilm (236, 237). Également les systèmes PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ pourraient également se trouver activés suite à l'acidification du milieu que provoquerait l'ADNe au sein du biofilm et ainsi conférer une résistance vis-à-vis des aminosides par modification du lipopolysaccharide de la membrane

externe des bacilles Gram négatif, limitant la pénétration intracellulaire des aminosides et donc leur action (238).

1.3 Rôle des exopolysaccharides dans la tolérance en biofilm

Le rôle des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire du biofilm dans la tolérance aux antibiotiques est moins décrit et reste controversé. D'après Billings *et al.* (239), l'exopolysaccharide Psl pourrait jouer un rôle dans la tolérance à la colistine, la tobramycine et la ciprofloxacine lors des premières étapes du développement du biofilm. Mais ces résultats n'étaient pas retrouvés par une autre équipe dans un modèle de biofilm utilisant une souche de *P. aeruginosa* surexprimant Psl (171). Dans cette même étude de Colvin *et al.* (171), un biofilm formé avec une souche de *P. aeruginosa* PA14, naturellement déficiente en l'exopolysaccharide Pel, était plus sensible à la tobramycine et à la gentamicine. Mais dans un autre travail, le biofilm formé par une souche déficiente en l'exopolysaccharide Pel, dans un « Calgary Biofilm Device », était plus résistant à ces deux mêmes antibiotiques que le biofilm constitué avec la souche isogénique sauvage (240). Dans ces différents travaux, aucune modification de la sensibilité à la ciprofloxacine n'était observée en biofilm pour des souches déficientes pour l'exopolysaccharide Pel. Les mécanismes par lesquels les exopolysaccharides interagiraient avec les antibiotiques sont encore méconnus.

1.4 Production de β -lactamase

La β -lactamase chromosomique et inductible AmpC est un déterminant majeur de la résistance aux β -lactamines chez *P. aeruginosa* (241). Bagge *et al.* (241) ont démontré, dans un biofilm de *P. aeruginosa*, qu'en l'absence de ceftazidime et d'imipénème, l'expression d'AmpC était négligeable. En présence d'une faible concentration d'imipénème, l'expression d'AmpC était limitée à la périphérie du biofilm, tandis que pour des concentrations plus élevées d'imipénème, l'expression d'AmpC était généralisée à l'ensemble du biofilm. La ceftazidime induisait l'expression de l'enzyme AmpC seulement à la périphérie du biofilm et après exposition à des concentrations élevées (241). Par ailleurs, un biofilm mature de *P. aeruginosa* était plus résistant à la ceftazidime qu'un biofilm jeune. En effet, plus le biofilm avait bénéficié

d'un temps de formation et d'une durée d'exposition aux β -lactamines accrues, plus la production de β -lactamase était augmentée favorisant la résistance à la ceftazidime (95).

1.5 Rôle des systèmes d'efflux

Le rôle des pompes d'efflux dans la tolérance du biofilm vis-à-vis de l'action des antibiotiques est également controversé dans la littérature.

Dans un biofilm *in vitro* de *P. aeruginosa* formé en chambre à flux continu, l'expression des gènes des pompes d'efflux MexAB-*oprM* et MexCD-*oprJ*, marqués par la protéine fluorescente GFP, diminuait au cours du temps. Elle était supérieure dans un biofilm âgé de 4 jours plutôt que de 8 jours. Des différences dans les niveaux d'expression des gènes des pompes d'efflux MexAB-*oprM* et MexCD-*oprJ* au sein de la structure du biofilm étaient observées, l'expression maximale étant détectée en surface du biofilm. Néanmoins, dans un « Calgary Biofilm Device », l'impact de ces variations d'expression des pompes d'efflux MexAB-*OprM*, MexCD-*OprJ*, MexEF-*OprN* et MexXY-*OprM* sur la tolérance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques semblait mineur. Que les souches soient délétées pour les gènes codant les pompes d'efflux ou qu'elles surexpriment les pompes d'efflux, les valeurs des concentrations minimales d'éradication du biofilm après 6 h d'exposition à différents antibiotiques (pipéracilline, gentamicine, aztréonam entre autres) restaient stables (242). Une analyse transcriptomique, menée sur un biofilm *in vitro* de 72 h de *P. aeruginosa*, ne mettait pas en évidence de variations des niveaux d'expression des pompes d'efflux après 12 h d'exposition à 10 mg/L de tobramycine ou 1 mg/L de ciprofloxacine (243). Dans un autre travail, une souche mutée dans le répresseur *mexZ* de la pompe d'efflux MexXY-*OprM* entraînant sa surexpression, et cette même souche délétée pour la pompe d'efflux elle-même, montraient la même proportion de cellules survivantes en biofilm, soit 100 fois plus que la souche parente sauvage. La survie des cellules de *P. aeruginosa* en biofilm après exposition à l'ofloxacine était, dans ce travail, principalement attribuée à la présence de cellules persistantes et non à la résistance induite par l'expression de pompes d'efflux (221).

La colistine semblait pouvoir être réellement impactée par les variations d'expression des pompes d'efflux en biofilm. Des biofilms formés par des souches mutées pour les pompes d'efflux MexAB-*OprM* ou MexCD-*OprJ* étaient éliminés par la colistine tandis qu'en cas d'expression de MexAB-*oprM* ou MexCD-*oprJ*, des cellules survivaient au traitement par colistine. L'analyse par microscopie confocale montrait que ces populations survivantes se

trouvaient à la périphérie du biofilm (**Figure 24**). En revanche, les bactéries de la sous-population inactive se trouvant plus en profondeur dans le biofilm, n'étaient pas capables d'induire ces pompes d'efflux et étaient donc éradiquées par la colistine (164, 244).

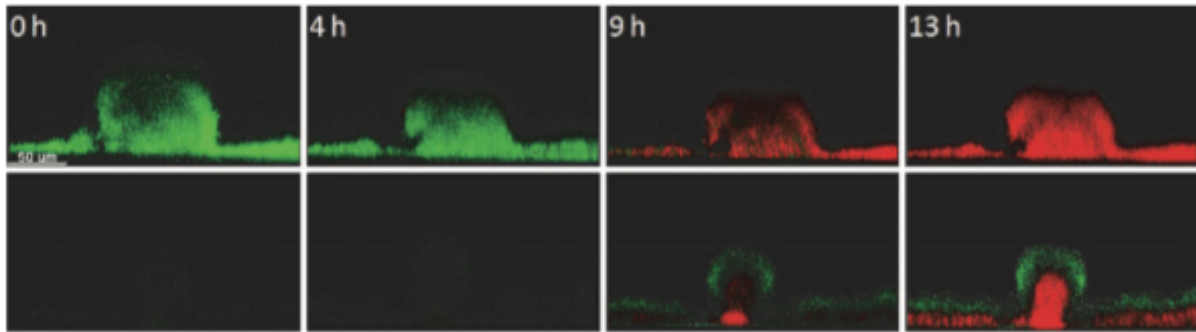


Figure 24 : Distribution des bactéries vivantes et mortes au sein d'un biofilm de *P. aeruginosa* exposé à de la colistine, pour des souches déficientes en efflux MexAB-OprM (images supérieures) et exprimant MexAB-OprM (images inférieures)
 Les cellules vivantes apparaissent en vert (expression de la protéine GFP) et les cellules mortes en rouge (marquage par du iodure de propidium) (244)

L'expression de pompes d'efflux semblait favoriser la tolérance de *P. aeruginosa* en biofilm vis-à-vis de la colistine, qui agit sur les membranes cellulaires, tandis que cet effet n'était pas retrouvé pour d'autres familles d'antibiotiques, aux mécanismes d'actions différents, telles que les aminosides ou les fluoroquinolones.

L'ensemble de ces résultats témoigne tout à la fois de la dynamique et de l'hétérogénéité des populations bactériennes en biofilm, ainsi que de la multiplicité des mécanismes de récalcitrance aux antibiotiques pouvant y être exprimés.

2. Environnement physico-chimique et réponses aux stress en biofilm

Le biofilm est caractérisé par un environnement physico-chimique hétérogène dans les différentes zones du biofilm, mais constamment source de stress bactérien. Cette hétérogénéité au sein de la structure du biofilm induit une disparité entre les différentes populations bactériennes qui y coexistent, concernant l'expression des gènes, l'activité métabolique, les caractéristiques phénotypiques, la tolérance aux antimicrobiens (161, 219, 245, 246).

2.1 Limitation en oxygène

Plusieurs études ont mesuré les concentrations en oxygène au sein du biofilm à l'aide de microélectrodes. Il a été démontré que la concentration en oxygène était supérieure dans les couches superficielles du biofilm. Les zones riches en oxygène se situaient de la surface du biofilm jusqu'à quelques dizaines de μm plus en profondeur selon l'épaisseur initiale du biofilm (102). Dans un biofilm mature de 48 h, il a été estimé que, seulement environ un quart du biofilm bénéficiait d'oxygène, le restant de la biomasse, qui concernait les couches inférieures, étant majoritairement privé d'oxygène (219). Au niveau des zones riches en oxygène, les bactéries paraissaient être actives métaboliquement. Il existait par ailleurs des niches où des bactéries étaient moins actives, se trouvant même en phase stationnaire de croissance pour certaines (219, 243). Le mode d'action de la plupart des antibiotiques cible des processus comme la réplication, la transcription, la traduction ou la synthèse de la paroi cellulaire qui se déroulent lorsque les bactéries sont en phase répliative. Le métabolisme ralenti de certaines sous-populations bactériennes en biofilm mais aussi les conditions d'anaérobiose qui se créent en biofilm rendent certains antibiotiques moins actifs. Lorsque des biofilms de *P. aeruginosa* (formés pendant 4 h) étaient exposés à de la ciprofloxacine ou tobramycine, une réduction bactérienne d'environ $5 \log_{10}$ CFU/mL était observée. Dans le même modèle de biofilm mais en conditions de croissance en anaérobiose, la réduction bactérienne était significativement réduite, de l'ordre de $2 \log_{10}$ CFU/mL (219).

Des observations en microscopie électronique ont montré la présence de cellules altérées (lysées, vacuolées, allongées) uniquement à la surface de biofilms traités par tobramycine et ciprofloxacine (**Figure 25**). Ces résultats suggèrent que la teneur limitée en l'oxygène pourrait ainsi jouer un rôle dans la protection des bactéries en biofilm vis-à-vis de l'action de certains antibiotiques.

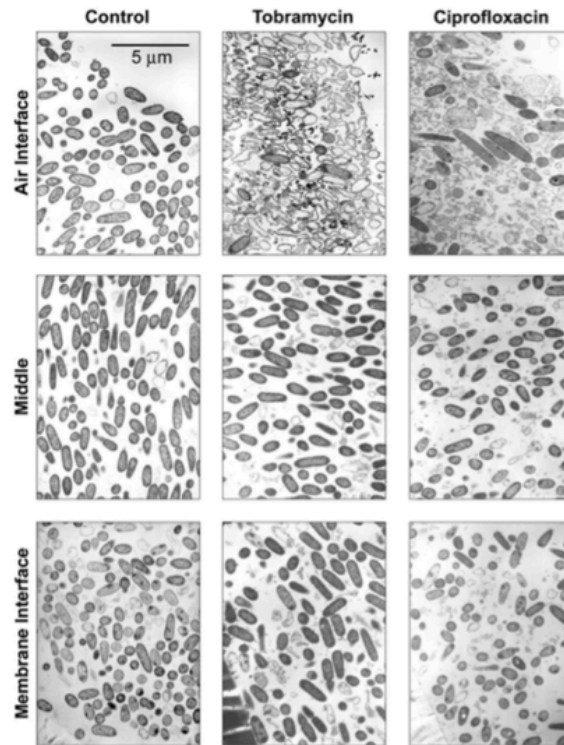


Figure 25 : Effet de la tobramycine et de la ciprofloxacine sur la morphologie des bactéries situées respectivement à la surface, au milieu et au contact avec le support d'un biofilm *P. aeruginosa*
Images obtenues par microscopie électronique (102)

Il a été récemment proposé par Stewart *et al.*, que la teneur réduite en oxygène pourrait réduire le potentiel de membrane externe et conférer une tolérance vis-à-vis de certains antibiotiques, tels que les aminosides, dont le transport transmembranaire, énergie-dépendant, repose sur le potentiel de membrane (243). Une exception semble exister à nouveau pour la colistine vis-à-vis de laquelle *P. aeruginosa* semblait sensible en biofilm dans des conditions d'anaérobiose, voire même davantage efficace vis-à-vis des bactéries dont les membranes étaient altérées et la croissance ralentie (244, 247).

Une hypothèse suggérerait un lien entre la concentration faible en oxygène en biofilm et la réponse au stress oxydatif. Le stress oxydatif participe à la mort cellulaire des bactéries exposées à un traitement antibiotique (248). Les radicaux libres qui sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif sont dérivés de l'oxygène moléculaire. Dans les zones privées d'oxygène, la réponse au stress oxydatif pourrait être limitée et ainsi favoriser la tolérance des bactéries aux antibiotiques en biofilm. Cependant, Jensen *et al.* (249) ont décrit une action de la réponse oxydative après exposition à la ciprofloxacine en biofilm. En effet, dans des biofilms de *P. aeruginosa* de 1 et 3 jours, en présence de concentrations sub-inhibitrices et plus élevées de ciprofloxacine, une production de radicaux libres oxygénés était mesurée corrélée à une

diminution de la viabilité des bactéries. Un mutant de la catalase KatA, qui ne pouvait plus opérer la détoxification vis-à-vis des radicaux libres, entraînait la potentialisation de l'action de la ciprofloxacine, tandis que l'ajout de thiourée permettant de complexer les radicaux libres oxygénés, en réduisait l'efficacité. Cette étude décrivait la réponse au stress oxydatif en biofilm dans son ensemble. Il pourrait néanmoins exister des zones où ce mécanisme est plus ou moins mis en jeu, pouvant expliquer la tolérance de certaines sous-populations en biofilm, sous l'effet d'un traitement antibiotique. Enfin, dans un travail mené par Van Acker *et al.* (250), dans un biofilm de *Burkholderia cepacia complex* exposé à de la tobramycine, la production de radicaux libres oxygénés était observée tandis qu'environ 0,1% des cellules survivaient. L'analyse transcriptomique réalisée à partir d'un biofilm exposé à 4 fois la CMI de la tobramycine montrait que les gènes impliqués dans le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons étaient sous-exprimés par rapport à un biofilm non traité, limitant la production excessive de radicaux libres oxygénés par ces voies métaboliques et permettant aux bactéries en biofilm, traitées par tobramycine, de s'adapter et survivre.

2.2 Carence nutritionnelle

Suivant un gradient de la surface vers la profondeur du biofilm, la quantité en nutriments diminue, la quantité de métabolites augmente, et le pH devient acide (160). La carence en nutriments favoriserait la tolérance aux antibiotiques en biofilm (251). En effet, il a été montré que la supplémentation en nutriments (arginine ou nitrate) dans un biofilm mature, augmentait l'action de la tobramycine et de la ciprofloxacine, réduisant les concentrations bactériennes d'un facteur 10 à 100 par rapport à un biofilm exposé aux antibiotiques mais sans ajout de nutriments (**Figure 26**) (252).

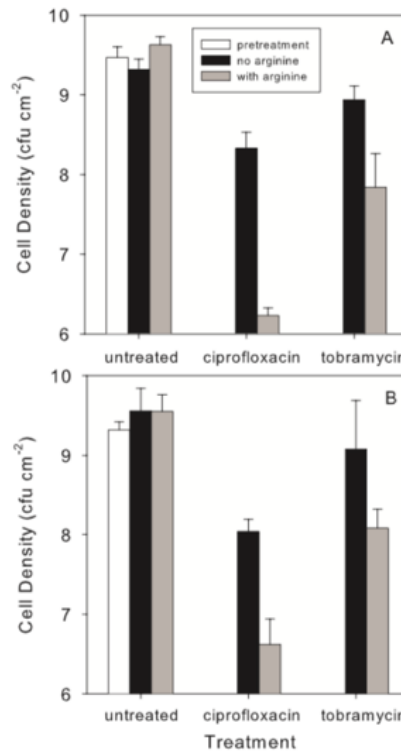


Figure 26 : Effet de la supplémentation en arginine dans des biofilms de *P. aeruginosa* de 48 h formés sur des membranes (A) et de 72 h formés dans un système en flux continu (drip flow reactor) (B) et exposés ou non à de la ciprofloxacine ou tobramycine (252)

La carence en nutriments dans le biofilm induit la production de l'alarmone guanosine (penta-)tetra-phosphate ou (p)ppGpp qui est une molécule jouant le rôle de second messager capable de moduler l'expression de plusieurs gènes (253). Le (p)ppGpp est synthétisé à partir d'ATP et de GDP ou de GTP et son hydrolyse produit du pyrophosphate (PPi) et du GDP ou GTP. Le stress nutritionnel en biofilm entraîne l'augmentation des concentrations de (p)ppGpp qui induit une réponse appelée « réponse stringente ». Lors d'une carence en nutriments, la quantité d'ARNt non chargé augmente et la synthèse de (p)ppGpp est stimulée. Le (p)ppGpp va alors interagir avec l'ARN polymérase, induire une surexpression des gènes de synthèse des acides aminés au détriment des gènes des protéines ribosomales, pour permettre la survie de la bactérie à ces conditions de stress.

Deux protéines sont impliquées dans le métabolisme du (p)ppGpp, RelA et SpoT. Alors que RelA, qui est une (p)ppGpp synthase, répond à une carence en acides aminés, SpoT, qui est une enzyme bi-fonctionnelle, pouvant à la fois être une synthase et une hydrolase vis-à-vis du (p)ppGpp, répond à une carence en acides gras ou en carbone. Plusieurs études ont montré que dans un biofilm *in vitro*, un double mutant $\Delta relA \Delta spoT$, qui est donc incapable de

synthétiser du (p)ppGpp et d'activer la réponse stringente, était davantage sensible à l'action de plusieurs antibiotiques aux mécanismes d'action différents tels que la ciprofloxacine, le méropénème et la colistine qu'une souche sauvage de *P. aeruginosa* (243, 254).

Stewart *et al.* (243), qui ont démontré une activation des réponses liées aux stress en biofilm après exposition à la ciprofloxacine et à la tobramycine, proposent un modèle afin d'expliquer la tolérance aux antibiotiques qui se met en place en biofilm. Ainsi, il est suggéré que les niveaux d'expression des gènes obtenus en biofilm après exposition antibiotique seraient le reflet de l'activité des cellules se situant au niveau de la zone supérieure du biofilm, en présence d'oxygène et de nutriments. En effet, dans les zones inférieures du biofilm, où les teneurs en oxygène et en nutriment sont réduites, il serait possible que l'ensemble des réactions de synthèse, y compris l'étape de transcription, soit considérablement diminuée et contribue peu au transcriptome du biofilm. Les cellules en périphérie du biofilm se prépareraient ainsi à se retrouver dans les couches les plus profondes au fur et à mesure du développement du biofilm où elles seront privées d'oxygène et de nutriments et à se mettre en état de dormance métabolique.

À mesure que les cellules se développent, des environnements extrêmement variables se créent au sein du biofilm (**Figure 27**). En conséquence, les activités physiologiques, l'expression génique, les caractéristiques phénotypiques des bactéries sont susceptibles de varier, aussi bien au sein de la structure du biofilm, qu'au cours du temps.

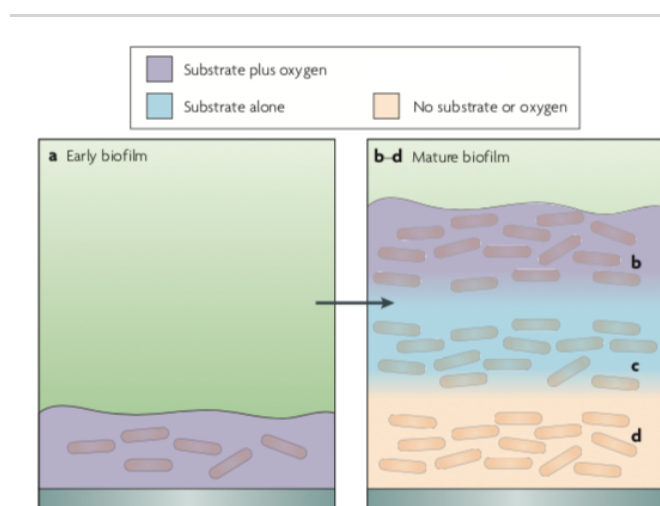


Figure 27 : Schéma de l'hétérogénéité des teneurs en oxygène et en nutriments au sein d'un biofilm selon son stade de développement (160)

3. Adaptations phénotypiques et récalcitrance aux antibiotiques

Des variations phénotypiques ont été spécifiquement observées en biofilm.

3.1 Small Colony Variant

Les « Small Colony Variant » (SCV) constituent une sous-population de bactéries qui présentent des caractéristiques phénotypiques qui leurs sont propres et qui diffèrent de la souche parentale. Ils sont caractérisés par une taille de colonies réduite (de 1 à 3 mm après 24 à 48 h d'incubation), un métabolisme et une croissance ralentis, une perte de certains caractères biochimiques distinctifs initialement présents chez la souche parentale, une absence de pigmentation pour certaines espèces bactériennes, une plus grande adhérence, une capacité augmentée à former du biofilm, ou encore une sensibilité diminuée vis-à-vis de certains antibiotiques (255). Ces SCV ont été particulièrement bien caractérisés chez *S. aureus* mais ont également été décrits pour d'autres espèces bactériennes comme *P. aeruginosa*. Ces SCV sont fréquemment isolés des prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose (256) mais ont aussi été décrits dans des infections chroniques ou récurrentes en biofilm, telles que les infections de dispositif médical (76). Les SCV présentent un phénotype pléiotrope qui peut être stable ou transitoire.

Ces variants phénotypiques résultent de l'auxotrophie pour la ménadione et l'hémine. Cela entraîne un certain nombre d'altérations dont une diminution du potentiel de membrane et des concentrations en ATP qui altère la synthèse de la paroi des cellules favorisant l'émergence de colonies de petite taille (76).

Peu d'études ont par ailleurs directement évalué le rôle des SCV dans la persistance en biofilm (257, 258). Chez *P. aeruginosa*, dans une étude de Drenkard et Ausubel (256), des SCV étaient isolés de géloses additionnées de kanamycine. Les biofilms qui étaient constitués avec les SCV étaient plus denses que les biofilms formés avec la souche sauvage après une exposition à la tobramycine. Remis en culture en l'absence d'antibiotique, les SCV reprenaient un phénotype identique à celui de la souche sauvage suggérant que le phénotype des SCV était transitoire, dépendant des conditions environnementales. Une protéine régulatrice, PvrR (phenotype variant regulator) du système à deux composants Pvr semblait jouer un rôle dans la transition d'un « phénotype SCV » à un phénotype sauvage en dégradant le c-di-GMP par l'intermédiaire d'une phosphodiesterase (188, 259). La surexpression de *pvrR* réduisait le nombre de SCV et l'adhérence à la surface tandis que la souche mutée au niveau de *pvrR* était

associée à une augmentation du nombre de SCV isolés. L'inactivation de la protéine régulatrice PvrR empêcherait la conversion du « phénotype SCV » vers le phénotype sauvage. Il a également été montré que le gène *cupA* qui code pour des fimbriae serait impliqué dans les propriétés d'auto-agrégation des SCV. Des concentrations élevées de c-di-GMP, décrit pour avoir un rôle clé dans la transition vers un mode de vie en biofilm, activeraient l'expression du gène *cupA*.

Dans une autre étude, les SCV isolés d'un biofilm *in vitro* de *P. aeruginosa* présentaient une augmentation de l'expression des gènes *psl* et *pel*, décrits pour être impliqués dans l'adhérence de *P. aeruginosa* aux surfaces. En présence d'un gène *psl* muté, le morphotype des SCV n'était que partiellement affecté mais les capacités initiales d'hyper-adhérence et d'auto-agrégation des SCV diminuaient. Ainsi, les SCV pourraient être liées à la fois à des modifications environnementales et génétiques.

Les SCV isolés de biofilms développés *in vitro* présentaient globalement des caractéristiques phénotypiques similaires à celles des SCV retrouvés dans les prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (260).

3.2 Souches hypermutatrices

Des variants phénotypiques de *P. aeruginosa* dont la fréquence de mutation spontanée était augmentée ont été décrits, définissant dans la littérature des souches dites hypermutatrices (261). La plupart de ces mutations affecte des régulateurs transcriptionnels, notamment les systèmes de réparation de l'ADN. Ces souches de *P. aeruginosa* sont capables d'accumuler des mutations pouvant être à l'origine de résistance aux antibiotiques (262). Elles sont majoritairement isolées de prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, concernant jusqu'à 1/3 des patients colonisés à *P. aeruginosa* de façon chronique (263, 264). Les conditions de stress rencontrées dans l'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose sembleraient favoriser l'émergence et la pérennisation de souches hypermutatrices, dont l'adaptation serait de ce fait facilitée (265). Les souches hypermutatrices semblent être moins fréquentes dans les autres situations cliniques associées au biofilm. Le mode de vie en biofilm pourrait faciliter le développement de souches hypermutatrices par rapport au mode de vie planctonique (266). Cette hypothèse reste controversée dans la littérature puisque d'autres résultats ont montré que la fréquence de mutations n'augmentait

pas en biofilm, suggérant que ce processus pourrait être coûteux en énergie pour les bactéries et donc non indispensable à leur survie en biofilm (267).

3.1 Cellules viables non cultivables

Le biofilm est constitué d'une population bactérienne hétérogène comprenant des cellules mortes, des cellules métaboliquement actives, et des cellules dont l'activité métabolique est réduite. Parmi cette dernière sous-population bactérienne, certains auteurs distinguent les cellules viables non cultivables (VBNC pour « viable but non-culturable cells ») et les cellules persistantes (251). À la différence des cellules persistantes, les VBNC ne cultivent pas sur milieu de culture ordinaire. Par ailleurs, ces VBNC semblent partager des caractéristiques communes avec les cellules persistantes rendant complexe la distinction entre ces deux sous-populations et suggérant qu'il pourrait également exister un lien entre les VBNC et les cellules persistantes (268). Dans les deux cas, il s'agit d'un mode de survie, en réponse à un environnement hostile et défavorable, comme par exemple une situation de carence en nutriments. Ces variations phénotypiques semblent être le résultat de changements physiologiques stochastiques induits en situation de stress. Lorsque les conditions de croissance redeviennent plus favorables, les VBNC commenceraient à modifier leur physiologie et, après une période de latence, supérieure à celle requise pour permettre la reprise de croissance des cellules persistantes, retrouveraient leur capacité à se développer sur un milieu de culture (269). Des auteurs suggèrent donc que les VBNC seraient dans un état de dormance plus important que les cellules persistantes. Les VBNC sembleraient être une étape dans le continuum entre les cellules actives et répliquatives et les cellules mortes (270, 271).

Ces cellules sont difficiles à isoler au sein d'une population hétérogène. Le recours à la microscopie confocale ou à la transcriptomique afin de mesurer l'expression des gènes peuvent aider à l'analyse des VBNC (272). De nombreuses questions restent à l'heure actuelle sans réponse : les VBNC doivent-elles être considérées comme des cellules persistantes ? Quel est leur rôle dans l'échec des traitements en biofilm ? Sont-elles impliquées dans les infections humaines ?

Davantage de données existent concernant les cellules persistantes capables de survivre à des concentrations d'antibiotiques élevées et de cultiver sur des milieux de culture.

4. Cellules persistantes

Bien que les mécanismes décrits ci-dessus jouent un rôle important dans la tolérance aux antibiotiques en biofilm, ils n'expliquent toutefois pas complètement la survie à long terme des bactéries en biofilm exposées durablement à un stress antibiotique. Cela est particulièrement le cas pour la ciprofloxacine qui est capable de diffuser à travers la matrice du biofilm (102), de tuer des cellules qui ne se divisent pas mais sans pour autant parvenir à éradiquer complètement la population bactérienne en biofilm (273).

4.1 Définition

Décrites pour la première fois par Bigger en 1944 (274) au sein d'une population de *Staphylococcus* exposée aux pénicillines, les bactéries persistantes ou « persister cells », correspondent à une sous-population bactérienne capable de survivre à de très fortes concentrations d'antibiotiques sans avoir acquis ni développé de mécanisme de résistance. Dans le travail de Bigger, après 6 h de traitement par pénicilline, une faible proportion de bactéries survivait (0,04%). Il a ensuite démontré que cette sous-population reprenait sa croissance après arrêt de l'exposition à la pénicilline et qu'il ne s'agissait pas de mutants résistants dans la mesure notamment où ces cellules présentaient le même schéma de survie après une nouvelle exposition à la pénicilline. Bigger proposa un traitement « intermittent » au cours duquel la pénicilline est administrée puis arrêtée puis à nouveau administrée, supposant ainsi que les bactéries persistantes reprendront leur division après arrêt du traitement par pénicilline et pourront être plus facilement tuées lors de la nouvelle administration de pénicilline.

Le lien entre l'échec des traitements antibiotiques en biofilm et la chronicisation et la récurrence des infections n'a été introduit que plus tardivement en médecine humaine par Costerton (5).

A l'inverse des bactéries résistantes qui se multiplient en présence d'antibiotique, les bactéries persistantes se caractérisent par un haut niveau de tolérance aux antibiotiques leur permettant de survivre sans croître malgré des concentrations d'antibiotiques létales pour ces mêmes souches en culture planctonique. À l'arrêt du traitement antibiotique, les cellules persistantes sont capables de reprendre leur multiplication (**Figure 28**).

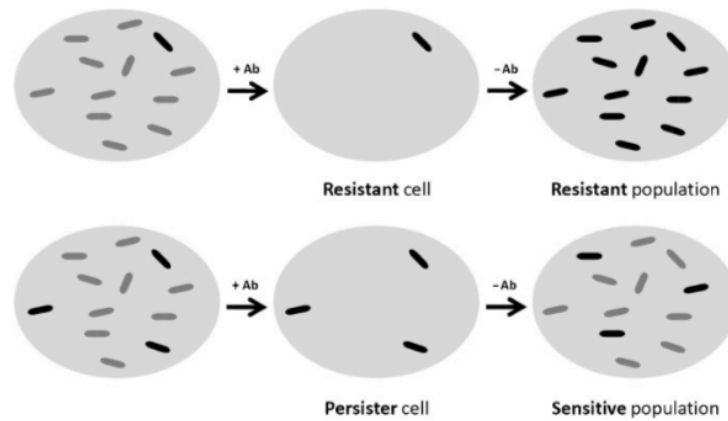


Figure 28 : Schéma de la survie et re-croissance de cellules résistantes et persistantes après exposition antibiotique (275)

Dans la littérature, après exposition antibiotique, les cellules persistantes représentent moins de 1% de la population initiale. Dans une étude de Mulcahy *et al.* (221), dans un biofilm de *P. aeruginosa in vitro*, la majeure partie de la population bactérienne était tuée par 5 mg/L d'ofloxacine tandis que 0,001 à 0,0001% des cellules survivaient, même après exposition à des concentrations antibiotiques plus élevées (100 mg/L soit 200 fois la CMI de l'ofloxacine pour la souche testée). Pour trois souches cliniques de *P. aeruginosa* initialement sensibles à l'amikacine, dans un biofilm *in vitro* de 48 h, environ 0,0001 à 0,01% des bactéries étaient viables après exposition pendant 24 h à de fortes doses d'amikacine (5000 mg/L) (194).

Après exposition antibiotique, une phase initiale de décroissance rapide des concentrations bactériennes puis un plateau de survie étaient observés, décrivant ainsi une courbe de réduction bactérienne biphasique (**Figure 29**). Cette cinétique de réduction bactérienne illustre dans un premier temps la mort cellulaire rapide d'une grande partie de la population bactérienne sensible à l'antibiotique puis une seconde phase d'élimination plus lente des cellules, et enfin la survie de cellules persistantes (40, 230, 276–278).

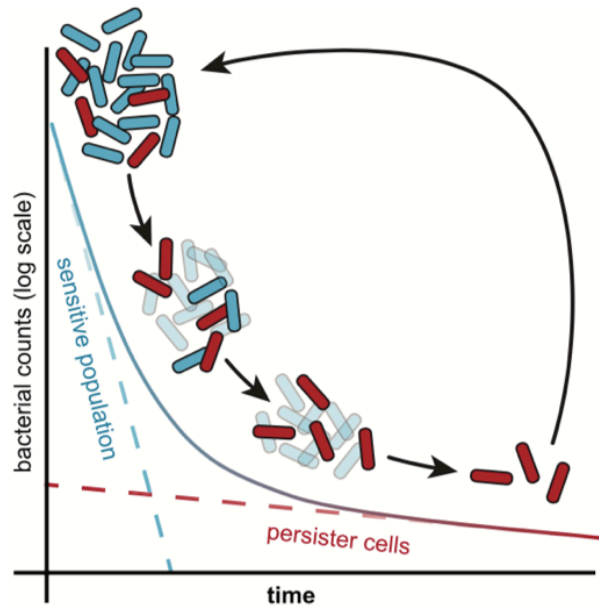


Figure 29 : Courbe de réduction bactérienne en biofilm après exposition antibiotique : survie d'une sous-population persistante (276)

La survie de cellules bactériennes persistantes après exposition à des concentrations létales d'antibiotiques bactéricides peut être observée en conditions de biofilm mais aussi en phase stationnaire de cultures planctoniques, pour *P. aeruginosa* et d'autres espèces bactériennes. C'est ce qui est décrit par Michiels *et al.* (279), pour des souches de *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *S. aureus* et *E. faecium*. Des cinétiques de réductions bactériennes biphasiques étaient observées, en conditions de phase stationnaire, à la fois pour les bacilles Gram négatif exposés à de l'amikacine et les cocci Gram positif à de la gentamicine, que ce soit en fonction du temps (24 h de traitement antibiotique) ou de concentrations antibiotiques croissantes (**Figure 30**).

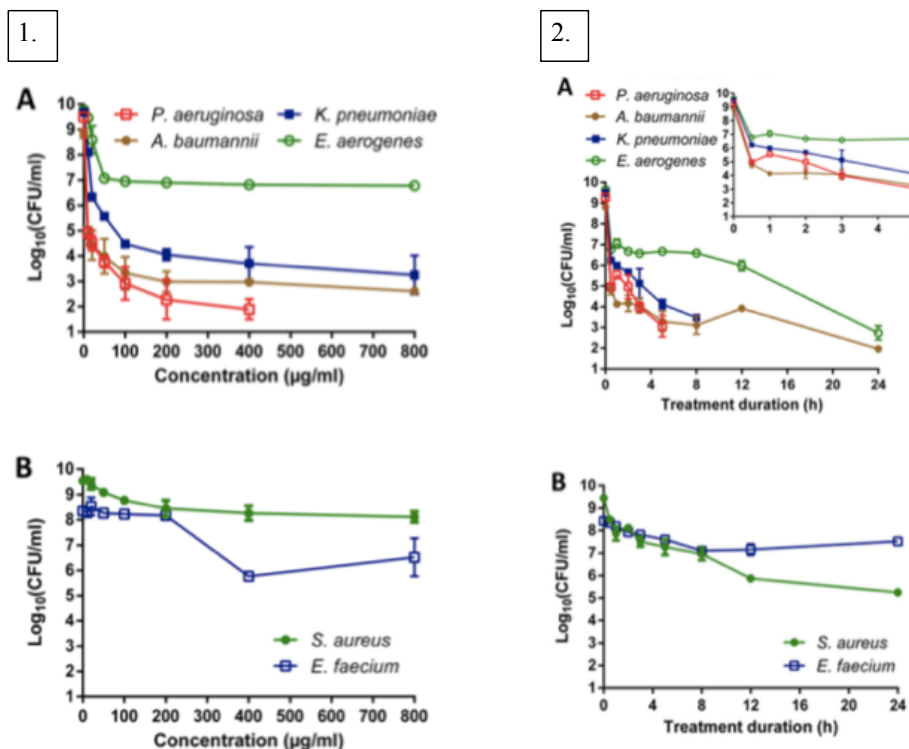


Figure 30 : Courbes de réductions bactériennes en condition de phase stationnaire en fonction de concentrations d’antibiotiques croissantes (1) et de la durée d’exposition aux antibiotiques (2) Les bacilles Gram négatif sont exposés à l’amikacine (A), les cocci Gram positif à la gentamicine (B) (279)

Par ailleurs, les expositions antibiotiques successives génèrent une proportion croissante de cellules persistantes, pouvant même devenir tolérantes à des familles d’antibiotiques supplémentaires, en conditions de phase stationnaire et de biofilm (**Figure 31**) (279, 280).

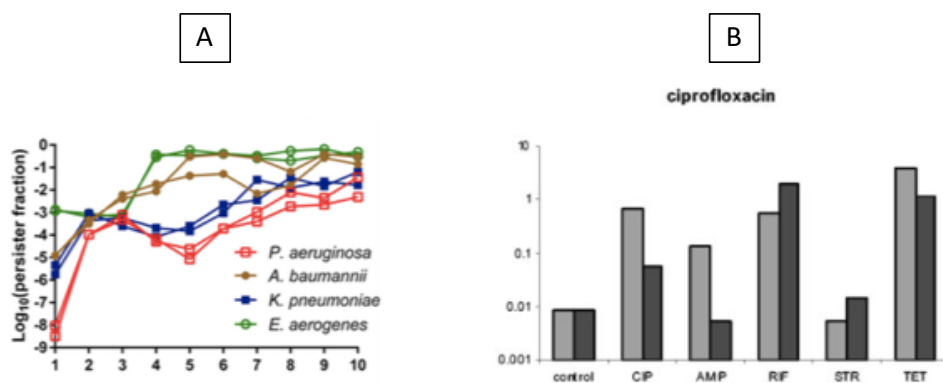


Figure 31 : Proportion de cellules persistantes après des expositions antibiotiques successives (A) Après plusieurs cycles d’exposition à l’amikacine (279) (B) Après exposition préalable aux cinq antibiotiques identifiés sur l’axe des abscisses (barres en gris clair) puis à la ciprofloxacin (barres en gris foncé) (280)

Les bactéries persistantes sont des variants phénotypiques transitoires, réversibles et non héréditaires. Dans le cas de la tolérance phénotypique, un environnement peu favorable à l'action des antibiotiques réduit leur efficacité et permet la survie des bactéries malgré une CMI de l'antibiotique inchangée. Après interruption de l'exposition antibiotique, la reprise de la croissance bactérienne dans un milieu de culture sans antibiotique est rapide.

Les cellules persistantes sont dites isogéniques et leur apparition serait liée à un « switch phénotypique » plutôt qu'à des modifications génétiques. À l'aide de systèmes de microfluidiques, il a été démontré que des sous-populations d'*E. coli*, dont la croissance était ralentie, étaient présentes en culture avant le début de l'exposition antibiotique. Cette même étude avait conduit à la définition de différents types de cellules persistantes : les « persisters » de type I générés pendant la phase stationnaire et caractérisés par une phase de latence prolongée avant la reprise de la croissance après transfert dans un milieu de culture riche ; et les « persisters » de type II continuellement produits de façon indépendante de la phase de croissance (277). D'après Brauner *et al.* (230), il serait possible de différencier une persistance « temps-dépendante » et une persistance « concentration-dépendante ».

Dans la littérature, la persistance est généralement présentée comme un processus global associé à une croissance et un métabolisme ralentis (251). L'ensemble de ces concepts met en exergue la complexité de la tolérance en biofilm et de l'étude des cellules persistantes. L'hétérogénéité des populations bactériennes en biofilm joue un rôle important dans l'adaptation aux stress environnementaux et dans la persistance des infections bactériennes.

4.2 Mécanismes à l'origine de la persistance bactérienne

(a) *La réponse stringente*

Comme il a été décrit précédemment, la réponse stringente, qui est activée en situation de carence en nutriments en biofilm, favorise la survie bactérienne. Chez *P. aeruginosa*, il a été montré qu'une augmentation de la synthèse du (p)ppGpp en lien avec l'activation de la réponse stringente favorisait la survie des cellules après exposition à la ciprofloxacine (281). Dans le travail de Nguyen *et al.*, lorsque des souris étaient infectées avec une souche sauvage de *P. aeruginosa* et le double mutant $\Delta relA \Delta spoT$, seules 20% des souris survivaient au bout de 2 jours dans les deux cas. Lorsque les souris infectées par les deux mêmes souches étaient traitées par de l'ofloxacine, 30% des souris infectées par la souche sauvage versus 70% des

souris infectées par le double mutant $\Delta relA \Delta spoT$ survivaient (**Figure 32**). Ces résultats *in vivo* confirment un lien direct entre l'activation de la réponse stringente et la tolérance aux fluoroquinolones en biofilm (254).

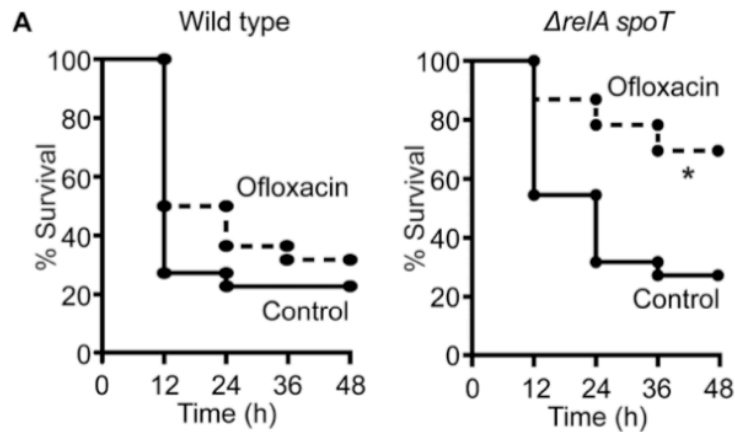


Figure 32 : Effet d'un traitement par ofloxacine sur la survie de souris infectées par une souche sauvage de *P. aeruginosa* et par une souche double mutant $\Delta relA \Delta spoT$ (254)

Le mécanisme d'action évoqué serait, sous l'effet de concentrations élevées de (p)ppGpp, une inhibition de l'activité de l'ARN polymérase, du surenroulement de l'ADN et donc de l'activité de l'ADN gyrase compromettant l'efficacité des fluoroquinolones. Ce mécanisme d'action affecterait alors spécifiquement des fluoroquinolones, comme semblaient le confirmer d'autres travaux ne mettant pas en évidence d'augmentation de la réduction bactérienne en biofilm pour une souche doublement mutée $\Delta relA \Delta spoT$ après exposition à la tobramycine (243). L'augmentation des concentrations de (p)ppGpp pourrait également avoir une action sur les systèmes toxine-antitoxine (TA) de type II et favoriser la persistance aux antibiotiques.

(b) Les systèmes toxine-antitoxine

L'activité des toxines appartenant aux systèmes TA de type II est neutralisée par la formation de complexes étroits avec leurs antitoxines correspondantes. En conditions de stress, l'antitoxine est dégradée, libérant ainsi la toxine active qui peut alors cibler des processus cellulaires vitaux.

Le système TA HipAB a été identifié chez *E. coli* (282). Deux mutations dans le gène *hipA* du système TA de type II HipAB ont été mises en évidence conduisant à la formation d'un plus grand nombre de cellules persistantes après exposition antibiotique. Les mutants *hipA7* génèrent 20 fois plus de cellules persistantes que leurs cellules isogéniques non mutées, en phase stationnaire de croissance où la densité cellulaire était supérieure (283, 284).

Korch *et al.* (283) ont proposé qu'en présence du mutant *hipA7*, il y avait une augmentation de la synthèse de (p)ppGpp et que des mutations dans les gènes *relA* et *spoT* des mutants *hipA7* réduisaient l'apparition de cellules persistantes démontrant ainsi le possible lien entre la réponse stringente qui stimule la synthèse de (p)ppGpp et les systèmes TA pour la formation de cellules persistantes (283).

Il avait été proposé, chez *E. coli*, par Maisonneuve *et al.*, que la protéase Lon, dont l'activité est induite par l'activation de la réponse stringente et l'augmentation de la concentration de (p)ppGpp, joue un rôle dans la persistance en inactivant l'antitoxine HipB et favorisant ainsi l'activité de la toxine HipA (**Figure 33**) (285). Une délétion dans le gène codant pour la protéase Lon entraînait une diminution des cellules persistantes après exposition à différents antibiotiques bactéricides. À l'inverse, une surexpression de la protéase Lon augmentait significativement la fraction de cellules persistantes survivantes (286).

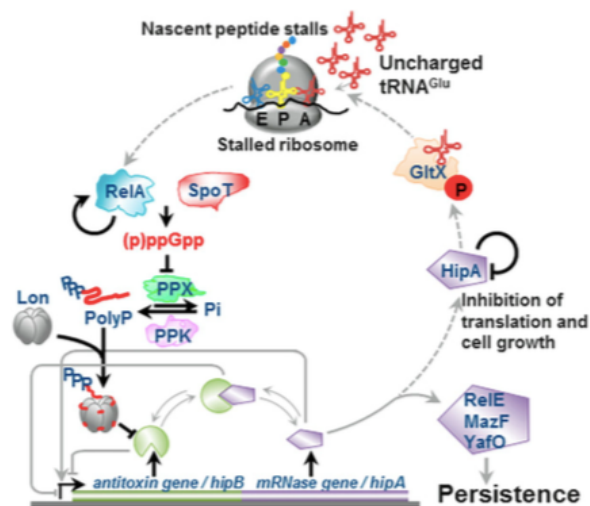


Figure 33 : Formation de cellules persistantes en lien avec l'augmentation de la concentration de (p)ppGpp, l'activation de la protéase Lon, puis de la toxine HipA pour aboutir à l'inhibition de la traduction (287)

Cependant, des études plus récentes ont montré que les souches délétées pour les systèmes TA qui ont été utilisées dans le travail précédent, étaient en réalité infectées par le bactériophage $\phi 80$, contaminant de laboratoire. Les expériences réalisées avec des souches non infectées par ce phage ne confirmaient plus le rôle des systèmes TA dans la persistance d'*E. coli*. L'importance de la protéase Lon dans la persistance bactérienne n'était, elle, en revanche, pas remise en cause (288). Ces travaux montrent à quel point l'étude des systèmes TA est complexe et que leur rôle dans la persistance bactérienne est controversé et encore non élucidé.

D'autres toxines de type II dégradent sélectivement les ARNm associés aux ribosomes afin de réguler la traduction et la croissance bactérienne et de faciliter la survie en conditions de stress. Dans une étude récente menée chez *P. aeruginosa*, il a été montré que la protéase Lon contribuerait à la dégradation de l'antitoxine HigA au profit de l'augmentation du ratio HigB/HigA. La surexpression de *higB* chez *P. aeruginosa* PA14 augmentait la proportion de cellules bactériennes survivantes d'environ 1000 fois après exposition à des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine. HigB pourrait également modifier l'expression des gènes régulant le SST3, notamment *exsA* et *exsC*, deux régulateurs positifs du SST3, *pcrV*, codant pour la translocation des protéines effectrices, et *exoU*, qui code pour une protéine effectrice. L'exposition pendant 30 min, de cellules de *P. aeruginosa* mutées pour *higA* et surexprimant *higB*, à des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine, entraînait une augmentation de la cytotoxicité vis-à-vis des macrophages par l'intermédiaire d'une surexpression de *pcrV*. Après 6 h de traitement par ciprofloxacine, la cytotoxicité vis-à-vis des macrophages diminuait, faisant suspecter un rôle moins important du SST3 lorsque l'exposition à la ciprofloxacine était prolongée (289).

Les systèmes TA ont principalement été décrits chez *E. coli* en culture planctonique et n'ont, à notre connaissance, pas été étudiés dans la persistance bactérienne en biofilm de *P. aeruginosa*, sous pression antibiotique.

(c) La réponse SOS

La réponse SOS, régulée par deux acteurs principaux, le répresseur LexA et l'activateur RecA, regroupe l'ensemble des mécanismes moléculaires intervenant en réponse aux altérations de l'ADN. La réponse SOS pourrait jouer un rôle dans la persistance bactérienne (290). Un système TA TisAB/IstR identifié chez *E. coli* semble être induit par le système SOS en réponse aux altérations de l'ADN induites par de faibles concentrations de ciprofloxacine

en conditions planctoniques. La toxine TisB perturberait la force proton motrice qui induirait une diminution de l'ATP, un arrêt des processus cellulaires et donc la génération de cellules persistantes (291). Bernier *et al.* (292) ont démontré que la tolérance d'*E. coli* à des concentrations létales d'ofloxacine dépendait de la réponse SOS, spécifiquement en biofilm et en situations de carence en acides aminés et en sources de carbone, tandis que les systèmes TA « réponse SOS-dépendant » n'étaient pas induits dans ces conditions. Cette tolérance augmentait avec l'âge du biofilm, toujours en corrélation avec l'activation de la réponse SOS.

La réponse stringente et la réponse SOS semblent ainsi être les deux principales voies mises en jeu lors de la survie des bactéries après exposition antibiotique en l'absence d'acquisition de mécanisme de résistance.

L'ensemble de ces processus moléculaires pourrait aboutir à un ralentissement cellulaire. Les cellules survivantes aux antibiotiques pourraient entrer dans un état de dormance, secondairement à l'activation de différentes voies de régulation, afin d'échapper aux antibiotiques, et notamment ceux qui ciblent les cellules en état de division. Lors du retrait de l'antibiotique, les cellules persistantes quitteraient leur état de tolérance pour donner à nouveau naissance à une population bactérienne identique à la population d'origine (**Figure 34**) (251).

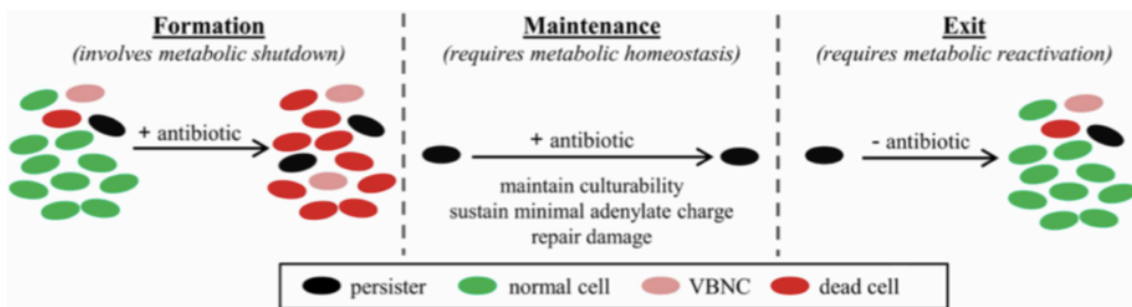


Figure 34 : Évolution de la population bactérienne après exposition antibiotique (251)

IV. Conclusions des recherches bibliographiques

Quoique relativement rares, les infections de dispositifs médicaux implantables sont de mauvais pronostic, la formation d'un biofilm bactérien ne permettant pas la guérison par le seul traitement antibiotique et imposant le plus souvent le retrait du matériel. Parmi les pathogènes à l'origine de telles infections en biofilm, *P. aeruginosa* est fréquemment impliqué et représente un pathogène d'intérêt particulier pour comprendre les mécanismes de l'échappement aux antibiotiques en biofilm.

Le traitement des infections à *P. aeruginosa* est complexe, en raison de résistances intrinsèques et acquises limitant les possibilités antibiotiques et du fait d'une capacité d'adaptation rapide. Il n'existe à l'heure actuelle pas de recommandation diagnostique ni thérapeutique spécifique pour le traitement des infections en biofilm à *P. aeruginosa*, et le recours à la bithérapie plutôt qu'à la monothérapie est débattu.

L'échec des traitements des infections en biofilm à *P. aeruginosa* semble dépendre de nombreux facteurs. Même si la diffusion ralentie de certains antibiotiques en biofilm, les carences en oxygène et nutritionnelles, l'expression de mécanismes d'efflux participent à ce phénomène, la sélection de cellules persistantes en présence d'antibiotiques semble être le mécanisme prépondérant à l'origine de ces échecs.

Bien que des progrès aient été faits pour caractériser les cellules persistantes, leur faible abondance dans les populations bactériennes et la réversibilité de leur phénotype, après leur réintroduction dans un milieu de culture favorable à la reprise de la croissance bactérienne, rendent leur analyse difficile. L'apparition de cellules persistantes en biofilm, en présence d'antibiotique, est multifactorielle, complexe et liée à différents systèmes de régulation. La réponse SOS et la réponse stringente semblent être les deux voies métaboliques majoritairement mises en jeu dans la persistance, notamment *via* un « ralentissement » de l'activité métabolique.

Bien que certains mécanismes moléculaires aient été identifiés comme potentiellement impliqués dans l'émergence de cellules persistantes en biofilm après exposition antibiotique, peu d'études se sont intéressées à l'impact global, en biofilm, de concentrations létales d'antibiotiques sur la survie bactérienne, pour ce qui est à la fois des caractéristiques phénotypiques, de l'activité métaboliques et de l'expression génique des cellules survivantes.

Objectifs de la recherche

Dans le but d'améliorer la compréhension de l'échec des traitements en biofilm et d'envisager des alternatives thérapeutiques plus efficaces, l'objectif de nos travaux a été d'évaluer des stratégies thérapeutiques, *in vitro*, en biofilm, vis-à-vis de *P. aeruginosa* et d'explorer les mécanismes de l'échec microbiologique de ces traitements.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de la ciprofloxacine et de l'amikacine, seules, en association ou en traitement séquentiel sur un biofilm de *P. aeruginosa*. Nous avons comparé, en condition planctonique et en biofilm, l'activité de ces traitements vis-à-vis de souches sauvages et de sensibilité diminuée par surexpression d'un efflux. Ce travail nous a permis de caractériser les cellules survivantes et de déterminer si l'échappement au traitement était en lien avec des mécanismes de résistance ou de persistance en biofilm.

Dans un second temps, nous avons exploré l'adaptation de *P. aeruginosa* en biofilm après exposition à la ciprofloxacine en :

- analysant la structure et la composition du biofilm, l'activité cellulaire en biofilm ainsi que l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la persistance en biofilm
- discutant le rôle de la diversité phénotypique en biofilm dans l'échappement aux antibiotiques.

TRAVAIL PERSONNEL

I. Intérêt d'une bithérapie de ciprofloxacine et amikacine vis-à-vis d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*

1. Contexte

Le recours à des bithérapies, couramment utilisées en pratique clinique pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*, est préconisé dans les recommandations espagnoles publiées en 2018, particulièrement pour prévenir la sélection de mutants résistants (85). Cette indication repose notamment sur des résultats d'études *in vitro* qui ont montré une activité bactéricide de l'association d'une β -lactamine ou d'une fluoroquinolone à un aminoside (293). Pour autant, la question de la bithérapie dans la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* fait toujours débat comme en témoignent plusieurs méta-analyses qui n'ont pas mis en évidence de bénéfice des bithérapies sur le taux de mortalité (86-90). Au cours d'infections à *P. aeruginosa* en biofilm, l'intérêt des bithérapies n'a été que très peu étudié (164, 216, 218).

Se pose dès lors, pour une infection en biofilm, la question de la bithérapie potentiellement la plus pertinente, et utilisable en pratique clinique. Comme présenté précédemment dans ce mémoire, parmi les molécules actives vis-à-vis de *P. aeruginosa*, les β -lactamines sont peu efficaces en biofilm (204). La colistine, même si elle a montré une activité intéressante en biofilm (164) et que l'optimisation des modalités d'administrations en a réduit sa toxicité, reste néphrotoxique et un traitement de dernier recours. La ciprofloxacine a de nombreux atouts : disponible *per os*, diffusant au sein du biofilm, active sur des cellules en phase stationnaire (273), associée à un pronostic plus favorable lorsqu'elle est utilisée pour le traitement d'infections en biofilm à bacilles Gram négatif (294), qui en font l'une des molécules de choix de la bithérapie. Parmi les aminosides, la tobramycine a été largement étudiée en biofilm et est utilisée à de fortes posologies dans les infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (96, 218) tandis que l'amikacine, vis-à-vis de laquelle le pourcentage de résistance de *P. aeruginosa* est un peu moins élevé que pour la tobramycine (98), a été moins analysée en biofilm ; l'association de la ciprofloxacine à l'amikacine, pourrait dès lors être une alternative intéressante pour le traitement d'infections en biofilm à *P. aeruginosa* notamment sur matériel mais n'a jusqu'alors pas été évaluée en biofilm.

En biofilm, les échecs des traitements antibiotiques sont multifactoriels (163, 276). Les mécanismes de résistance peuvent émerger pour des souches hypermutatrices (223), mais le phénomène de persistance semble être prépondérant. L'association de ciprofloxacine et d'amikacine pourrait dès lors prévenir l'émergence de mutants résistants qui a été décrite avec une monothérapie de ciprofloxacine (210, 223), y compris pour le traitement des rares souches hypermutatrices isolées principalement chez des patients atteints de mucoviscidose (263). L'intérêt de la bithérapie reste également à évaluer pour le traitement de souches exprimant des mécanismes d'efflux. En effet, l'impact et le niveau d'expression en biofilm de ce mécanisme de résistance, généralement à l'origine de résistances de bas niveau aux antibiotiques en culture planctonique, restent assez méconnus en biofilm.

L'objectif de ce travail a ainsi été de comparer en condition planctonique et en biofilm l'activité de monothérapies de ciprofloxacine et amikacine, à celle d'une association de ciprofloxacine et amikacine, simultanée ou séquentielle, vis-à-vis de souches de *P. aeruginosa* sensibles et de sensibilité diminuée par surexpression de pompes d'efflux.

Les souches ont été obtenues à partir d'une collection de souches de *P. aeruginosa* isolées de prélèvements urinaires, constituée entre juin 2016 et août 2018 au CHU de Rouen. Une sélection a été effectuée selon leur profil de sensibilité, déterminé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, vis-à-vis des β -lactamines, fluoroquinolones et aminosides. Des souches étaient sélectionnées lorsque le phénotype de résistance était évocateur d'une surexpression d'efflux de type MexAB-OprM, MexXY-OprM et MexCD-OprJ. Puis, les profils de sensibilité ont été vérifiés par détermination des CMI, par méthode Etest, de l'association ticarcilline/acide clavulanique, de la ciprofloxacine, de la lévofloxacine et de l'amikacine, par mesure de l'expression des pompes d'efflux MexAB-OprM, MexXY-OprM et MexCD-OprJ et par recherche de mutations des gènes cibles du QRDR. Les souches qui étaient associées à un tableau clinique d'infection urinaire ont été privilégiées. Pour compléter cette sélection, la recherche de souches hypermutatrices a été menée en vain, sur 14 souches de phénotype sauvage.

Des cultures planctoniques et des biofilms *in vitro* de 48 h de *P. aeruginosa* ont été exposés à des concentrations de ciprofloxacine et d'amikacine de 4 mg/L et 40 mg/L respectivement. Ces concentrations d'antibiotiques correspondaient aux Cmax sériques mesurées au pic pour une administration par voie intraveineuse de ciprofloxacine et d'amikacine (121) et permettant d'atteindre les objectifs PK/PD pour les souches sensibles à la ciprofloxacine et à l'amikacine dans notre travail.

Les concentrations bactériennes en conditions planctoniques et en biofilm ont été déterminées au cours de l'exposition antibiotique. La recherche de mutants résistants a été effectuée sur gélose additionnée d'antibiotique (4 fois la CMI de la ciprofloxacine ou amikacine pour la souche testée). Cette stratégie de screening, qui ne permettait d'identifier que les isolats ayant acquis un haut niveau de résistance, n'était pas adaptée pour l'identification de faibles variations de sensibilité aux antibiotiques. Or, de telles variations sont possibles, en lien notamment avec des modifications des niveaux d'expression des pompes d'efflux. Une technique dite de « CMI de population » a donc été utilisée pour identifier de faibles variations de CMI de la ciprofloxacine et de l'amikacine. Les mutants résistants ont été caractérisés en déterminant leur profil de sensibilité aux antibiotiques, par la recherche de mutations des gènes cibles du QRDR et par la mesure de l'expression des gènes des pompes d'efflux étudiées. Enfin, la ciprofloxacine étant notamment dégradée par la lumière, et non renouvelée pendant la durée de notre expérience en biofilm, les concentrations de ciprofloxacine et amikacine ont été mesurées en fin d'exposition, afin de garantir que les deux antibiotiques n'étaient pas dégradés au cours du temps dans notre modèle de biofilm *in vitro*.



2. *Publication 1*

Efficacy of a ciprofloxacin/amikacin combination against planktonic and biofilm cultures of susceptible and low-level resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Auteurs : Anaïs Soares, Kévin Alexandre, Fabien Lamoureux, Ludovic Lemée, François Caron, Martine Pestel-Caron, Manuel Etienne

Publié dans Journal of Antimicrobial Agents

Efficacy of a ciprofloxacin/amikacin combination against planktonic and biofilm cultures of susceptible and low-level resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Anaïs Soares^{1,2}, Kévin Alexandre ^{1,3}, Fabien Lamoureux⁴, Ludovic Lemée^{1,2}, François Caron^{1,3},
Martine Pestel-Caron^{1,2} and Manuel Etienne ^{1,3*}

¹EA 2656 (GRAM), Normandie Univ, Unirouen, Rouen, France; ²Microbiology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France; ³Infectious Diseases Department, Rouen University Hospital, Rouen, France; ⁴Laboratory of Pharmacology, Toxicology and Pharmacogenetics, Rouen University Hospital, Rouen, France

*Corresponding author. E-mail: manuel.etienne@chu-rouen.fr

Received 7 March 2019; returned 30 May 2019; revised 21 June 2019; accepted 17 July 2019

Background: Eradicating bacterial biofilm without mechanical dispersion remains a challenge. Combination therapy has been suggested as a suitable strategy to eradicate biofilm.

Objectives: To evaluate the efficacy of a ciprofloxacin/amikacin combination in a model of *in vitro* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm.

Methods: The antibacterial activity of ciprofloxacin and amikacin (alone, in combination and successively) was evaluated by planktonic and biofilm time-kill assays against five *P. aeruginosa* strains: PAO1, a WT clinical strain and three clinical strains overexpressing the efflux pumps MexAB-OprM (AB), MexXY-OprM (XY) and MexCD-OprJ (CD), respectively. Amikacin MIC was 16 mg/L for XY and ciprofloxacin MIC was 0.5 mg/L for CD. The other strains were fully susceptible to ciprofloxacin and amikacin. The numbers of total and resistant cells were determined.

Results: In planktonic cultures, regrowth of high-level resistant mutants was observed when CD was exposed to ciprofloxacin alone and XY to amikacin alone. Eradication was obtained with ciprofloxacin or amikacin in the other strains, or with the combination in XY and CD strains. In biofilm, bactericidal reduction after 8 h followed by a mean 4 log₁₀ cfu/mL plateau in all strains and for all regimens was noticed. No regrowth of resistant mutants was observed whatever the antibiotic regimen. The bacterial reduction obtained with a second antibiotic used simultaneously or consecutively was not significant.

Conclusions: The ciprofloxacin/amikacin combination prevented the emergence of resistant mutants in low-level resistant strains in planktonic cultures. Biofilm persister cells were not eradicated, either with monotherapy or with the combination.

Introduction

Routine methods have demonstrated *in vitro* that antibiotic combinations, such as a β -lactam or fluoroquinolone with an aminoglycoside, were synergic and prevented emergence of resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*.¹ However, to date, clinical studies have still not demonstrated a significant improvement in the prognosis of *P. aeruginosa* infections treated with antibiotic combinations.^{2,3} Part of the explanation might be that *in vitro* methods usually study planktonic, exponentially growing, low-concentration bacterial cultures, whereas most difficult-to-treat infections such as device-related infections are biofilm-embedded, composed of high bacterial densities with reduced metabolic activity.^{4,5} In such biofilm infections, the causative agents might

be drug-susceptible yet impossible to eradicate, and a subset of highly tolerant biofilm bacteria frequently survives the treatment and may cause infection recurrence.⁶⁻⁹

Moreover, low-level resistant strains, mainly related to the overexpression of energy-dependent efflux systems,¹⁰ have long been considered as having no significant impact on biofilm tolerance.¹¹ However, more recently, it was suggested that efflux pumps might contribute to antibiotic tolerance in biofilms.¹²⁻¹⁴ Combination therapies are still considered to be a promising approach to enhance killing of biofilm-embedded cells and minimize the emergence of resistance,^{14,15} even though little is known concerning the activity of such combinations in the treatment of biofilm infections. Among antibiotic combinations active against *P. aeruginosa*,

the combination of ciprofloxacin and amikacin seems to be of particular interest in the treatment of device-related medical infections: ciprofloxacin has excellent bioavailability and diffuses into the deepest layers of the biofilm;^{16,17} amikacin is the least nephrotoxic and most commonly active aminoglycoside against *P. aeruginosa*,¹⁸ and is recommended to treat *P. aeruginosa* in the most recent guidelines on *P. aeruginosa* acute infections.²

Therefore, we aimed to compare *in vitro* the efficacy of ciprofloxacin and amikacin, used separately and in combination, against planktonic and biofilm cultures of fully susceptible and low-level resistant *P. aeruginosa* strains.

Materials and methods

Bacterial strains

Five *P. aeruginosa* strains were used. The reference strain PAO1 and four clinical strains were selected according to their resistance profiles to β -lactams, fluoroquinolones and aminoglycosides, suggesting a wild phenotype or the overproduction of efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-OprM, respectively. Accordingly, they were named PAO1, WT, AB, CD and XY. PAO1 and WT were both non-overproducers of efflux pumps. As PAO1 is a strain isolated in the 1950s,¹⁹ another clinical strain (WT) that does not overproduce any efflux pump was selected, following the same selection criteria as the other strains in our study.

Antibiotic susceptibility testing

The MICs of ticarcillin/clavulanate, ciprofloxacin, levofloxacin and amikacin were determined by Etest (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), following the manufacturer's recommendations. Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich) and amikacin (Sigma-Aldrich) MICs were confirmed by the broth microdilution method, in triplicate, using the EUCAST recommendations.^{20,21} *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as reference strain. Susceptibility categories were assessed according to EUCAST 2018 breakpoints.²¹

Mutation frequency measurement

The frequency of spontaneous mutation to rifampicin (Sigma-Aldrich) was estimated in triplicate as previously described.²² Briefly, cultures grown overnight were collected and serial dilutions were plated on Mueller-Hinton 2 (MH2) without and with rifampicin (300 mg/L). A strain was considered as a mutator when the mutation frequency was at least 20-fold higher than that observed for PAO1.

Quantification of efflux gene expression by real-time RT-PCR

The expression of the genes encoding the efflux pumps [MexAB-OprM (*mexB*), MexCD-OprJ (*mexC*) and MexXY-OprM (*mexY*)] was determined by real-time RT-PCR from at least two independent biological replicates according to a protocol adapted from Llanes et al.²³ Previously described primers (Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online) and conditions were chosen.^{24,25} Overexpression of efflux pumps was considered for isolates showing expression values 3-fold (*mexB*) and 10-fold (*mexY* and *mexC*) higher than those of PAO1.²⁶

QRDR sequencing

Mutations in the QRDRs of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* were detected as previously described.^{27,28}

Planktonic time-kill assay

Overnight cultures in Mueller-Hinton broth (MHB) were diluted to an OD₆₀₀ of 0.01 in 100 mL of MHB ($\sim 1 \times 10^7$ cfu/mL) and incubated for 2 h at 37°C

without antibiotics. Ciprofloxacin (4 mg/L), amikacin (40 mg/L) or the combination of these two antibiotics was then added. Antibiotic concentrations were chosen in order to achieve the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) objectives associated with clinical efficacy: AUC₀₋₂₄/MIC ≥ 125 for ciprofloxacin and C_{max}/MIC ≥ 10 for amikacin.²⁹ The cultures were then incubated at 37°C, with shaking at 150 rpm, and sampled to estimate cfu/mL at 1, 4, 8 and 24 h of ciprofloxacin exposure and at 30 min, 1, 2, 4, 8 and 24 h of amikacin and combination exposures. Controls without antibiotic were conducted simultaneously. Serial dilutions were spread onto MH2 plates without antibiotic and with ciprofloxacin or amikacin to detect 4-fold MIC resistant mutants. Time-kill assays were performed in triplicate. The resistant mutants were characterized regarding antibiotic susceptibility, QRDR sequencing and the expression of genes encoding for the efflux pumps, which were determined as described above.

Biofilm time-kill assay

Overnight cultures in MHB were diluted to an OD₆₀₀ of 0.01 in MHB. Three millilitres of this bacterial suspension was inoculated in 6-well culture plates and incubated under static conditions at 37°C for 1 h to allow bacterial adherence.³⁰ MHB medium was then removed and replaced by 3 mL of fresh MHB medium. After 48 h of incubation, biofilms were rinsed twice with 1 mL of 0.9% NaCl and challenged for 72 h with 4 mg/L ciprofloxacin, 40 mg/L amikacin or with the combination of ciprofloxacin and amikacin. Viable cell numbers were measured before antibiotic challenge and after 1, 4, 8, 24, 48 and 72 h of antibiotic exposure. Viable cell numbers were determined by washing the biofilms twice with 1 mL of 0.9% NaCl, dislodging adherent cells by vortexing and gentle sonication (8 min). Suspensions and serial 1/10 dilutions were plated on MH2 without antibiotic to determine the number of viable cells, and on MH2 supplemented with 4-fold MIC of ciprofloxacin or amikacin to determine the number of resistant mutants. The detection limit was 10 cfu/mL. Control experiments without antibiotic challenge were conducted simultaneously. All studies were performed in triplicate. The resistant mutants were characterized regarding antibiotic susceptibility, QRDR sequencing and the expression of genes encoding the efflux pumps, which were determined as described above.

Sequential antibiotic exposure

To explore whether a second antibiotic exposure could overcome the persistence mechanisms induced by a first antibiotic exposure, biofilms were exposed successively to ciprofloxacin and amikacin. The biofilm was exposed to a first antibiotic for 24 h (ciprofloxacin or amikacin) as described previously in the biofilm time-kill assay. The biofilm was washed once to remove the first antibiotic and then exposed to the other antibiotic for 24 h. The density of viable cells was determined successively after the first antibiotic exposure and after the second antibiotic exposure. Control experiments without antibiotic were conducted simultaneously. The assays were performed in triplicate.

Determination of group MICs

In order to detect low-level increases in MICs related to variations in the expression of efflux pumps, group MICs were determined for the overall culturable biofilm bacterial subpopulation surviving after antibiotic exposure, as previously described.³¹ Briefly, the ciprofloxacin and amikacin group MICs were determined by recovering surviving cells from biofilms on MH2 plates before antibiotic challenge and after 1 h and 72 h of exposure. Several colonies were inoculated into sterile saline and adjusted to a turbidity equivalent to that of a 0.5 McFarland standard. Five suspensions at a turbidity equivalent to that of a 0.5 McFarland standard, per strain and per timepoint, were used then mixed and plated on MH2 agar onto which an Etest strip was placed. The group MIC was obtained the next day using the Etest criteria, with special attention to resistant mutant subpopulations within the inhibition zones.

Measurement of ciprofloxacin and amikacin concentrations

Antibiotic stability in the medium was assessed: 1 mL samples of biofilm cultures of each strain were collected in triplicate at the end of the ciprofloxacin and amikacin treatments and immediately stored at -80°C until analysis. Ciprofloxacin measurement was performed by HPLC-MS/MS as described previously³² and amikacin measurement by kinetic interaction of microparticles in solution using the Online TDM Amikacin assay on cobas c502, according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Continuous variables were compared using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test or the analysis of variance (ANOVA). A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Characteristics of the strains used

The main characteristics of the five strains are described in Table 1. PAO1, WT, AB and CD were susceptible to ciprofloxacin and amikacin. The XY strain was intermediately susceptible to amikacin with an MIC of 16 mg/L. None of the five strains had a quinolone resistance-associated mutation in the QRDR. None of the strains was hypermutable. AB, CD and XY significantly overexpressed the efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-OprM, respectively.

Planktonic time-kill assays

The activity of ciprofloxacin and amikacin (Figure 1) on $\sim 8 \log_{10}$ cfu/mL planktonic cells was evaluated. Ciprofloxacin and amikacin resulted in a bactericidal reduction of $\geq 3 \log_{10}$ cfu/mL after 4 h in all strains. Bacterial killing rates were significantly slower after 1 h of antibiotic exposure ($P < 0.05$) in CD after ciprofloxacin exposure, and in XY after amikacin exposure. Ciprofloxacin eradicated planktonic viable cells in PAO1, WT, AB and XY, but re-growth was observed in the CD strain after 8 h. The isolates recovered were high-level ciprofloxacin-resistant mutants (MIC > 32 mg/L) (Table S2), related to mutations in the QRDR of GyrA (Thr-83→Ile) and ParC (Ser-80→Leu). In addition, an ~ 4 -fold increase in the expression of the MexCD-OprJ efflux pump was noticed as compared with that of the parent CD strain. Amikacin eradicated planktonic viable cells in PAO1, WT, AB and CD, but re-growth was observed in the XY strain after 8 h. The isolates recovered were

amikacin high-level resistant mutants (MIC > 256 mg/L) (Table S2). This increase in the amikacin MIC was not associated with a significant increase in the level of expression of MexXY-OprM. A 2 h exposure to the combination of ciprofloxacin and amikacin eradicated planktonic viable cells in CD and XY with no regrowth and no resistant mutant selection (Figure 1).

Biofilm time-kill assays

The efficacy of ciprofloxacin, amikacin and the ciprofloxacin/amikacin combination was evaluated in a biofilm time-kill assay (Figure 2). Starting from an $\sim 8 \log_{10}$ cfu/mL mean biofilm bacterial load, ciprofloxacin and amikacin, alone as well as combined, resulted in a bactericidal reduction of $\geq 3 \log_{10}$ cfu/mL in all strains after 8 h of antibiotic exposure (Table 2). Bacterial killing rates after 8 h of antibiotic exposure were similar in all strains and for all regimens ($P > 0.05$), except for a slightly lower killing rate in WT as compared with other strains after amikacin exposure. After the initial decrease in the bacterial load, a mean (range) 4.00 (3.62–4.17) \log_{10} cfu/mL plateau was observed in all strains and for all regimens from 8 to 72 h of antibiotic exposure. No significant difference in the bacterial counts at 72 h was noticed between the isolates and the regimens ($P > 0.05$).

The group MICs for the surviving cells were unchanged after 72 h of antibiotic exposure (≤ 2 -fold increase). As presented in Figure 3, erratically at different timepoints during antibiotic exposure, 4-fold MIC ciprofloxacin- or amikacin-resistant mutants were isolated from detached biofilm. Ciprofloxacin selected mutants only in CD and after 72 h of exposure, whereas the ciprofloxacin/amikacin combination selected ciprofloxacin-resistant mutants in four of the five strains and at several timepoints. The ciprofloxacin/amikacin combination did not result in a reduction in the occurrence of ciprofloxacin-resistant mutant isolates. Whenever ciprofloxacin-resistant mutants were isolated, their ciprofloxacin MICs ranged from 0.5 to 2 mg/L. No mutation in the QRDR was detected but as compared with the parent strain an ~ 3 - to 8-fold overexpression of the MexCD-OprJ efflux pump was measured (Table S3). Whenever amikacin-resistant mutants were isolated (only after amikacin exposure), their amikacin MICs ranged from 2 to > 256 mg/L. As compared with the parent strain, no significant increase was noticed in the level of expression of MexXY-OprM (Table S3). Any time such resistant mutants were detected, they accounted for a small subset of the surviving population, were not always found at the following timepoints and were never responsible for any bacterial regrowth after 72 h.

Table 1. Main characteristics of the strains used

	MIC (mg/L)					Mean relative gene expression		
	TIM (S ≤ 16 , R > 16)	CIP (S ≤ 0.5 , R > 0.5)	LVX (S ≤ 1 , R > 1)	AMK (S ≤ 8 , R > 16)	Mutation frequency	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexC</i>
PAO1	16	0.125	0.25	2	1.8×10^{-8}	1.0	1.0	1.0
WT	16	0.06	0.25	2	3.4×10^{-9}	1.7	1.1	0.3
AB	> 256	0.06	1	2	8.1×10^{-9}	3.6	5.3	0.7
CD	4	0.5	4	0.5	3.5×10^{-8}	1.3	1.7	14.6
XY	32	0.125	1	16	2.9×10^{-9}	1.3	10.1	4.1

S, susceptible; R, resistant; TIM, ticarcillin/clavulanate; CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin; AMK, amikacin.

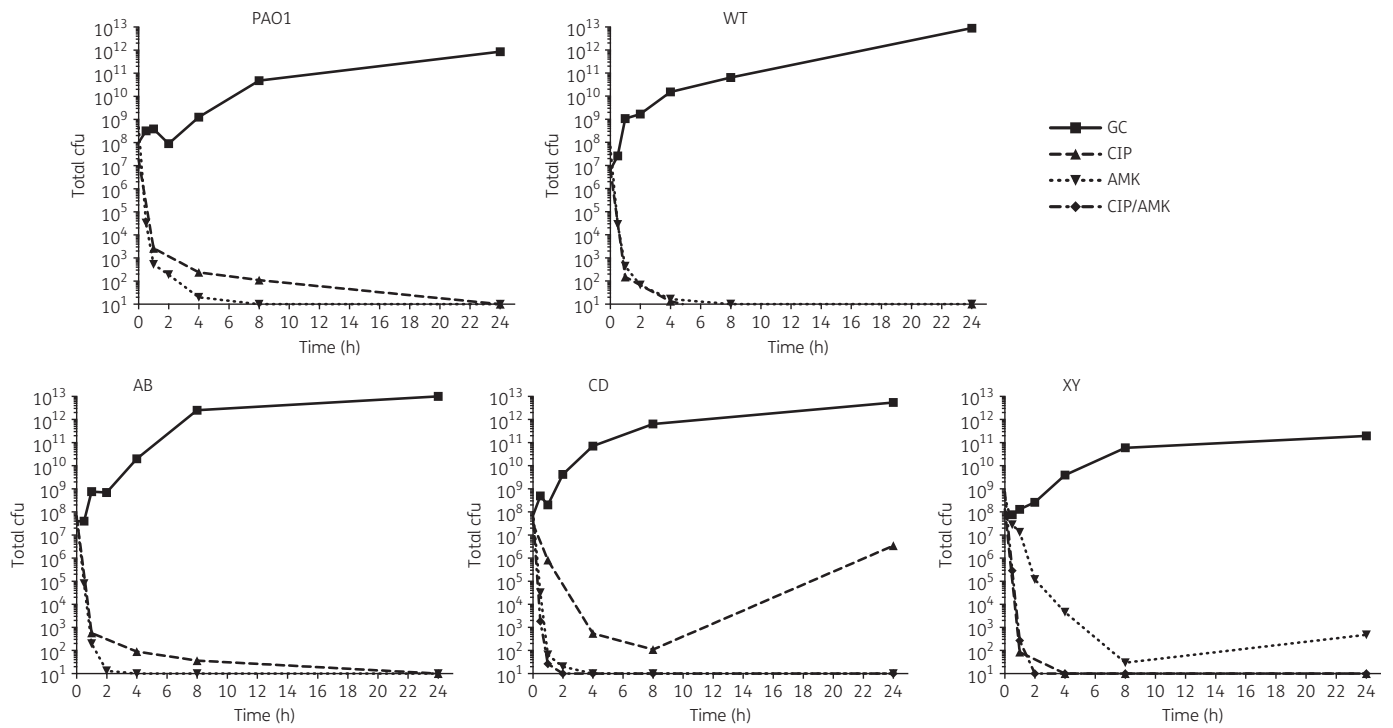


Figure 1. Planktonic time-kill assays with ciprofloxacin, amikacin and the combination of ciprofloxacin and amikacin. The total cfu numbers are the mean value for three different experiments. GC, growth control; CIP, ciprofloxacin; AMK, amikacin.

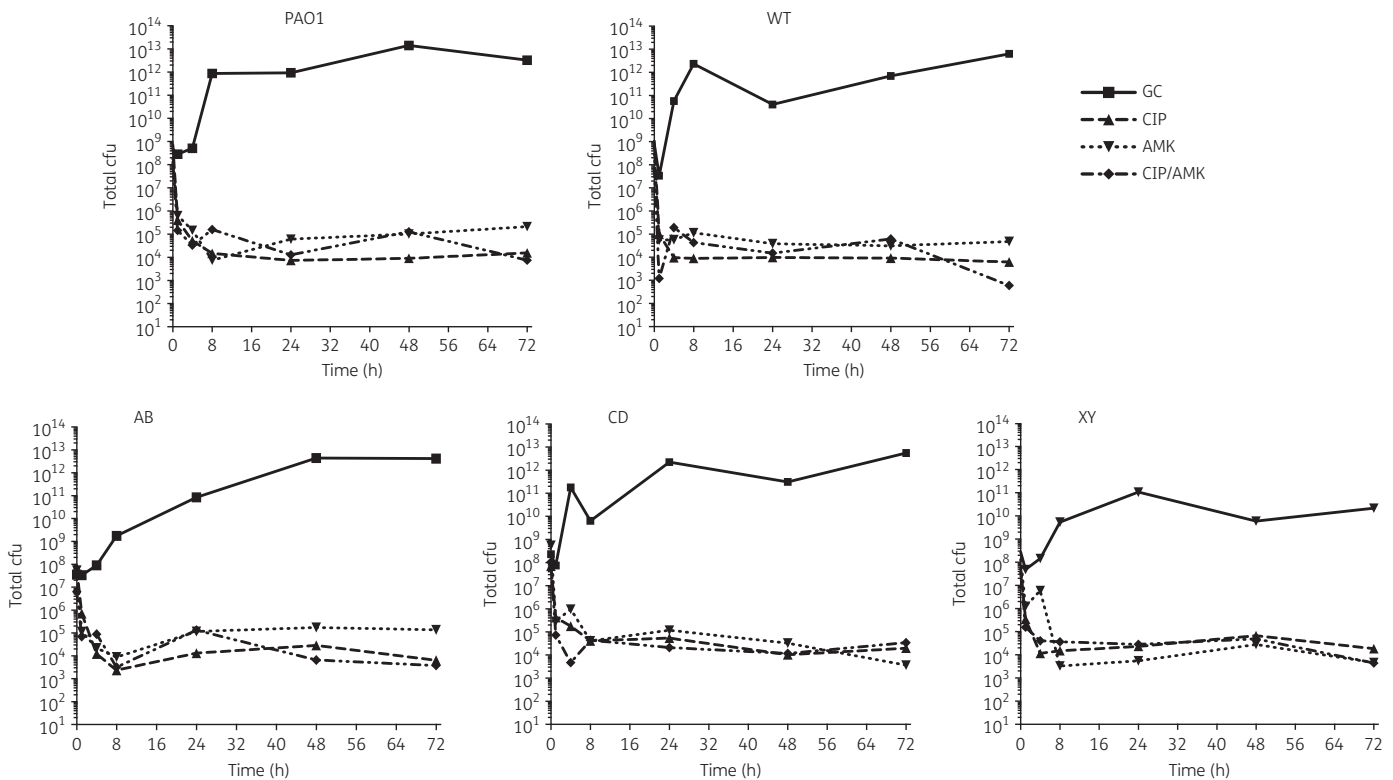
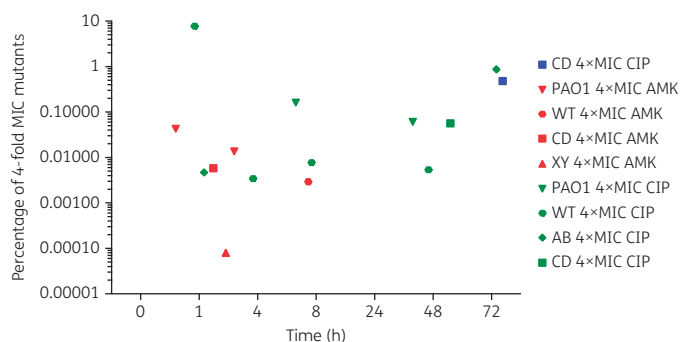


Figure 2. Biofilm time-kill assays with ciprofloxacin, amikacin and the combination of ciprofloxacin and amikacin. The total cfu numbers are the mean value for three different experiments. GC, growth control; CIP, ciprofloxacin; AMK, amikacin.

Table 2. Bacterial reduction in biofilm after 8 and 72 h of antibiotic exposure

Strain (CIP/AMK MIC ^a)	Bacterial reduction (log ₁₀ cfu/mL)					
	CIP		AMK		CIP/AMK	
	8 h	72 h	8 h	72 h	8 h	72 h
PAO1 (0.125/2)	4.69±0.04	5.51±1.83	5.19±0.78	4.22±1.79	2.96±0.18	4.14±0.02
WT (0.06/2)	4.49±1.46	5.42±0.34	3.34±0.42	4.01±1.18	3.54±1.22	5.40±1.16
AB (0.06/2)	4.48±0.98	3.76±0.93	3.91±0.48	2.93±0.71	3.34±0.38	3.35±0.59
CD (0.5/0.5)	3.28±0.32	3.56±0.11	4.26±0.51	5.19±0.01	3.44±0.24	4.63±2.22
XY (0.125/16)	3.58±0.49	3.82±0.63	5.00±0.73	5.67±1.33	4.55±1.80	4.42±1.00

CIP, ciprofloxacin; AMK, amikacin.

^aMIC expressed in mg/L.**Figure 3.** Dynamics over time of 4-fold MIC mutants recovered from biofilms exposed to ciprofloxacin, amikacin or the combination of ciprofloxacin and amikacin. One symbol represents one strain (PAO1, WT, AB, CD, XY); mutants selected after ciprofloxacin exposure are in blue, mutants selected after amikacin exposure are in red and mutants selected after ciprofloxacin/amikacin exposure are in green. CIP, ciprofloxacin; AMK, amikacin.

Sequential antibiotic exposure

The mean bacterial counts in the growth controls remained stable at $\sim 9 \log_{10}$ cfu/mL during the experiment. The first 24 h of antibiotic exposure resulted in a mean $3.07 \pm 0.27 \log_{10}$ cfu/mL bacterial reduction with ciprofloxacin and in a mean $2.56 \pm 0.24 \log_{10}$ cfu/mL reduction with amikacin. The 24 h exposure with the second antibiotic resulted in a reduced bacterial concentration of only $0.92 \pm 0.61 \log_{10}$ cfu/mL for ciprofloxacin and of $1.03 \pm 0.85 \log_{10}$ cfu/mL for amikacin. The bacterial reduction observed after the first antibiotic exposure was significantly higher than after the second antibiotic exposure ($P < 0.05$). As compared with the first antibiotic exposure, the efficacy of the second antibiotic exposure was significantly reduced for all strains and all antibiotic sequences, except for AB, which displayed a similar bacterial reduction after a successive exposure to amikacin ($2.68 \pm 0.67 \log_{10}$ cfu/mL) and then to ciprofloxacin ($2.54 \pm 0.69 \log_{10}$ cfu/mL).

Ciprofloxacin and amikacin concentrations in the biofilm model

No antibiotic degradation was noticed in this biofilm model. The mean measured concentrations of antibiotics after 72 h of

antibiotic exposure were mean (range) 6.5 (5.3–7.5) mg/L for ciprofloxacin and 48.8 (44.9–52.7) mg/L for amikacin.

Discussion

Combination therapy against *P. aeruginosa* infections seeks to improve efficacy and prevent emergence of resistance.² Our study demonstrates that the ciprofloxacin/amikacin combination enhances killing and prevents emergence of resistance for low-level resistant strains in planktonic cultures, but not in biofilm.

Indeed, bactericidal effect was observed in the planktonic time-kill assay for ciprofloxacin and amikacin monotherapies above MIC concentrations against all *P. aeruginosa* strains used but regrowth due to high-level resistant mutants after 8 h of antibiotic exposure was noticed for strains that exhibited overexpression of MexCD-OrpJ and MexXY-OprM efflux pumps (CD and XY strains). Such a finding was surprising for the CD strain, as the ciprofloxacin AUC_{0–24}/MIC ratio in our model (196) was above the threshold usually predictive of fluoroquinolone efficacy (≥ 125).³³ Nevertheless, several PK/PD simulations *in vitro* and animal studies demonstrated clinical significance of borderline MIC strains due to an overexpressing efflux pump and suggested a higher ciprofloxacin AUC_{0–24}/MIC threshold (≥ 250) against such strains, particularly if they were used as single therapy in high-inoculum infections.^{34,35} More expected results were found in our study for the XY strain after amikacin exposure, as C_{max} /MIC ratio in our experiment was 2.5, far below the value of 10 predictive of amikacin efficacy.^{36,37} The low-level resistance conferred by Resistance-Nodulation-Division family efflux pumps^{38–40} may reduce intracellular antibiotic concentrations and hence facilitate the selection of high-level resistant mutants by target site mutations.^{41,42} Interestingly, in this planktonic experiment, the combination therapy (ciprofloxacin and amikacin) prevented high-level resistant mutant selection in strains overexpressing efflux pumps.

Conversely, in our biofilm model no regrowth due to high-level resistant mutants was detected, whatever the antibiotic/strain pair studied. A biphasic time-kill curve was, however, observed with a stable $4 \log_{10}$ cfu/mL bacterial load of surviving cells. Moreover, the ciprofloxacin/amikacin combination failed to eradicate the biofilms. Understanding the mechanisms involved in the remaining bacterial population surviving such prolonged high-dose antibiotic exposure is challenging. As attested by the

antibiotic concentration at the end of the experiment, treatment failure was not related to ciprofloxacin and amikacin degradation. A lack of efficacy due to reduced penetration in the biofilm is unlikely for ciprofloxacin since previous data suggest that ciprofloxacin penetrates the deepest layers of the biofilm.^{17,43} However, reduced diffusion of amikacin related to interactions with matrix components of the biofilm cannot be excluded,^{17,43,44} a lack of antibiotic efficacy was noticed even for the combination therapy, and it is likely that an infra-MIC exposure would result in the selection of resistant mutants. Our results using clinical strains suggest that the lack of bacterial eradication was not related to the selection of a resistant subpopulation, but to an antibiotic-recalcitrant population composed of persister cells, refractory to antibiotics. Indeed, no rise in ciprofloxacin or amikacin group MICs was noticed and low-level resistant mutants were always a minority of surviving cells.

Persisters are a heterogenic population evolving towards reduced metabolic activity⁴⁵ through activation of stringent response, SOS response or toxin-antitoxin modules distinct from resistance mechanisms.⁴⁶⁻⁴⁹ New strategies are needed to fight biofilm-associated infections due to persister cells. Some authors have suggested that sequential exposure to antibiotics (colistin then amikacin) may eradicate persister cells in an *Acinetobacter baumannii* planktonic model.⁵⁰

In our biofilm model, a few hours after ciprofloxacin or amikacin monotherapy, exhaustion of the efficacy of the antibiotics was observed, as attested by the biphasic bacterial reduction. Thus, we hypothesized, as suggested by Chung and Ko⁵⁰ for *A. baumannii*, that replacing the initial antibiotic by a new one of another class once the plateau was reached could succeed in eradicating the bacterial biofilm. However, in our biofilm model of persister selection, no additional bacterial reduction was observed for most strains with sequential exposure (regardless of the order), suggesting that the initial antibiotic induced the switch towards a persister phenotype that renders the bacterial population recalcitrant to any further antibiotic activity.

Changes in the expression of genes involved in metabolic and stress response pathways and cell division after antibiotic exposure might be responsible for persister cell selection.^{51,52} These cells overexpress toxins, which, at high concentrations, could shut down the function of multiple drug targets (such as protein synthesis and DNA replication) and thereby prevent antibiotics from corrupting the function of the target molecules. Further molecular analysis could now be performed in our model of persister selection to explore the underlying mechanisms of antibiotic failure in biofilm.

Finally, reduced bacterial division in biofilm could explain the fact that no high-level resistant mutant emerged from our biofilm model. A low-metabolism environment might impair target mutation, a costly mechanism providing no survival benefit in biofilm. Therefore, such findings could explain the lack of additive effect of combination therapy compared with single therapy in biofilm, unlike planktonic conditions.

Despite the use of the well-known laboratory strain (PAO1), in association with clinical strains, the achievement of PK/PD parameters concordant with the literature, and the selection of persister cells as expected, our results should be considered cautiously since they may differ between the biofilm model used and human

biofilm-related infections. In fact, *in vitro* biofilm susceptibility assays are not standardized to date.^{5,53} Hence, the biofilm eradication concentrations obtained in a biofilm model cannot be extrapolated to other biofilm models nor to clinical care. Nevertheless, results close to ours were obtained in the study performed by Benthall *et al.*,⁵⁴ with ciprofloxacin or amikacin monotherapy against planktonic and biofilm cultures of *P. aeruginosa* (PAO1) in a *Galleria mellonella* model. The authors noticed that ciprofloxacin and amikacin were less effective at clearing a *P. aeruginosa* biofilm infection compared with a planktonic infection. Biofilm eradication failure might also be related to resistant mutant selection in some specific conditions, as demonstrated by Macià *et al.*²⁶ in a model using hypermutator strains. However, hypermutator strains are a very specific subpopulation encountered in cystic fibrosis but not in other models of biofilm-related infections.^{22,55}

Furthermore, to our knowledge, no other *in vitro* study has evaluated either the activity of the ciprofloxacin/amikacin combination in *P. aeruginosa* biofilm nor the direct impact of efflux on the efficacy of antibiotics in biofilm.

In conclusion, in this model, the efficacy of a ciprofloxacin/amikacin combination was demonstrated in planktonic cultures against low-level resistant strains overexpressing efflux. We suggest that the MIC value of ciprofloxacin should be determined, and levofloxacin evaluated, in order to detect MexCD-OprJ overexpression so that clinicians have the possibility to prescribe a combination therapy if fluoroquinolones are an option. Conversely, this combination therapy has no benefit over monotherapy in biofilm, regarding efficacy and persister eradication. Lastly, specific anti-persister strategies completing the antibiotic arsenal are now awaited to expect success in treating biofilm-related infections without mechanical dispersion.

Acknowledgements

We thank Dr A. Lesourd, a native English speaker, for improving our article.

Funding

This study was supported by internal funding and carried out as part of our routine work.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 to S3 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- 1 Drago L, De Vecchi E, Nicola L *et al.* Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* spp. *Chemotherapy* 2004; **50**: 202-10.

- 2 Mensa J, Barberán J, Soriano A *et al.* Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter* 2018; **31**: 78–100.
- 3 Vardakas KZ, Tansarli GS, Bliziotis IA *et al.* β -Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus β -lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2013; **41**: 301–10.
- 4 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**: 1318–22.
- 5 Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**: S1–25.
- 6 Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014; **78**: 510–43.
- 7 Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR *et al.* Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1483–94.
- 8 Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo J-M *et al.* *In vitro* activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1704–12.
- 9 Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; **64**: 357–72.
- 10 Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 337–418.
- 11 De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ *et al.* Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1761–70.
- 12 Gillis RJ, White KG, Choi K-H *et al.* Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3858–67.
- 13 Chiang W-C, Pamp SJ, Nilsson M *et al.* The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; **65**: 245–56.
- 14 Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK *et al.* Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 2008; **68**: 223–40.
- 15 Lora-Tamayo J, Murillo O, Bergen PJ *et al.* Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* dynamic biofilm model. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 2434–42.
- 16 Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1818–24.
- 17 Walters MC, Roe F, Bugnicourt A *et al.* Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 317–23.
- 18 Shortridge D, Gales AC, Streit JM *et al.* Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. *Open Forum Infect Dis* 2019; **6**: S63–8.
- 19 Holloway BW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1955; **13**: 572–81.
- 20 Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008; **3**: 163–75.
- 21 EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 8.1*, 2018. <http://www.eucast.org>.
- 22 Oliver A. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; **288**: 1251–3.
- 23 Llanes C, Hocquet D, Vogne C *et al.* Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1797–802.
- 24 Dumas J-L, Delden C, Perron K *et al.* Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **254**: 217–25.
- 25 Singh M, Yau YCW, Wang S *et al.* MexXY efflux pump overexpression and aminoglycoside resistance in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic infections. *Can J Microbiol* 2017; **63**: 929–38.
- 26 Macià MD, Pérez JL, Molin S *et al.* Dynamics of mutator and antibiotic-resistant populations in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5230–7.
- 27 Jalal S, Wretling B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Drug Resist* 1998; **4**: 257–61.
- 28 Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A *et al.* Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2263–8.
- 29 Monogue ML, Nicolau DP. Antibacterial activity of ceftolozane/tazobactam alone and in combination with other antimicrobial agents against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 942–52.
- 30 Hassan A, Usman J, Kaleem F *et al.* Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011; **15**: 305–11.
- 31 Lee HH, Molla MN, Cantor CR *et al.* Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 2010; **467**: 82–5.
- 32 Schrapp A, Mory C, Duflot T *et al.* The right blood collection tube for therapeutic drug monitoring and toxicology screening procedures: standard tubes, gel or mechanical separator? *Clin Chim Acta* 2019; **488**: 196–201.
- 33 Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM *et al.* Antimicrobial resistance: pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 79–86.
- 34 Dupont P, Hocquet D, Jeannot K *et al.* Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 518–22.
- 35 Schentag JJ, Meagher AK, Forrest A. Fluoroquinolone AUC break points and the link to bacterial killing rates. Part 2: human trials. *Ann Pharmacother* 2003; **37**: 1478–88.
- 36 Krause KM, Serio AW, Kane TR *et al.* Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; **6**: a027029.
- 37 Yao JDC, Moellering RC. Antibacterial agents. In: J Versalovic, JH Jorgensen, G Funke, DW Warnock, ML Landry, KC Carroll, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edn. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2011; 1043–81.
- 38 Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA *et al.* Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and intensive care unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Public Health* 2018; **11**: 364–72.
- 39 Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA *et al.* Contribution of *mexAB-oprM* and *mexXY (-oprA)* efflux operons in antibiotic resistance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tabriz, Iran. *Infect Genet Evol* 2016; **45**: 75–82.
- 40 Vogne C, Aires JR, Bailly C *et al.* Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1676–80.

- 41** Singh R, Swick MC, Ledesma KR et al. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1680–5.
- 42** Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1340–6.
- 43** Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol* 2013; **15**: 2865–78.
- 44** Chiang W-C, Nilsson M, Jensen PØ et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2352–61.
- 45** Balaban NQ. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004; **305**: 1622–5.
- 46** Wu Y, Vulić M, Keren I et al. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4922–6.
- 47** Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**: 39.
- 48** Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol* 2016; **12**: 208–14.
- 49** Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2017; **41**: 276–301.
- 50** Chung ES, Ko KS. Eradication of persister cells of *Acinetobacter baumannii* through combination of colistin and amikacin antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2019; **75**: 1277–83.
- 51** Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS et al. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 3838–47.
- 52** Keren I, Shah D, Spoering A et al. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 8172–80.
- 53** Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 981–90.
- 54** Benthall G, Touzel RE, Hind CK et al. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 538–45.
- 55** Kovacs B, Le Gall-David S, Vincent P et al. Is biofilm formation related to the hypermutator phenotype in clinical *Enterobacteriaceae* isolates? *FEMS Microbiol Lett* 2013; **347**: 116–22.

Table S1. Primers used for efflux quantification and QRDR sequencing.

Target gene	Primer	5'-Sequence-3'	Purpose
<i>mexB</i>	mexB_RT_F1	TTCAACCGGATGTTCCCTTC	mRNA detection
	mexB_RT_R1	CGATCACACACGTAGATCAGC	
<i>mexC</i>	mexC3	GTACCGCGTCATGCAGGGTTC	mRNA detection
	mexC4	TTACTGTTGGCGCAGGTGACT	
<i>mexY</i>	mexY_RT_F1	TAATGGTCCTGGCCACCT	mRNA detection
	mexY_RT_R1	GCCCAACGACATCTACTTCAA	
<i>rpsL</i>	rpsL-1	GCTGCAAAACTGCCCGCAACG	mRNA detection
	rpsL-2	ACCCGAGGTGTCCAGCGAACCC	
<i>gyrA</i>	gyrA-F	AGTCTATCTCGACTACGGGAT	Sequencing
	gyrA-R	AGTCGACGGTTTCCCTTTCCAG	
<i>gyrB</i>	gyrB-F	TGCGGTGGAACACAGGAGATGGGCAAAGTAC	Sequencing
	gyrB-R	CTGGCGGAAGAAGAAGGTCAACAGCAGGGGT	
<i>parC</i>	parC-F	CGAGCAGGCCTATCTGAACTAT	Sequencing
	parC-R	GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA	
<i>parE</i>	parE-F	CGGCGTTCGTCTCGGCGTGGTGAAGGA	Sequencing
	parE-R	TCGAGGGCGTAGTAGATGTCCTTGCCGA	

Table S2. Resistant mutants recovered from planktonic cultures treated with ciprofloxacin (a) or amikacin (b): susceptibility profiles and mean gene expressions of efflux pumps.

Strain and antibiotic exposure	MIC (mg/L)							Mean relative gene expression		
	TIM	FEP	ATM	AMK	TOB	CIP	LVX	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexC</i>
CD	4	8	1	0.5	0.125	0.5	4			
CIP 24 h ^a	8	8	1	1	0.125	>32	>32	0.6	1.2	63.8

^aMutations in the QRDR of GyrA (Thr-83->Ile) and ParC (Ser-80->Leu)

Strain and antibiotic exposure	MIC (mg/L)							Mean relative gene expression		
	TIM	FEP	ATM	AMK	TOB	CIP	LVX	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexC</i>
XY	32	16	0.5	16	1	0.25	1			
AMK 24 h	32	32	0.5	>256	4	0.25	2	2.7	9.9	12.4

TIM, ticarcillin/clavulanate; FEP, cefepim; ATM, aztreonam; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin

Bold data are related to the parent strain. The colored values indicate a ≥ 2 -fold MIC deviation compared to the parent strain.

Table S3. Mutants recovered from biofilms treated with ciprofloxacin (a) or amikacin (b) or ciprofloxacin and amikacin combined (c): susceptibility profiles and mean gene expressions of efflux pumps.

Strain and antibiotic exposure	MIC (mg/L)								Mean relative gene expression								
	TIM		FEP		ATM		AMK		TOB		CIP		LVX		<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexC</i>
CD	4	8	1	1	0.5	0.125	0.5	0.125	0.5	4	4	4	4	2.0	1.1	109.8	
CIP 72 h ^a	8	8	1	1	1	0.125	2	4	4	4	4	4	4	2.0	1.1	109.8	
^a No mutation in the QRDR																	
Strain and antibiotic exposure	MIC (mg/L)								Mean relative gene expression								
	TIM		FEP		ATM		AMK		TOB		CIP		LVX		<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexC</i>
PAO1	16	1	2	2	4	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.7	1.2	2.8	
AMK 1 h	16	1	1	1	16	1	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.7	1.2	2.8	
AMK 4 h	2	2	0.25	0.25	32	2	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.9	7.0	3.6	
WT	16	2	2	2	2	2	0.25	0.06	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.8	1.4	1.0	
AMK 8 h	32	4	2	2	8	2	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.8	1.4	1.0	
CD	4	8	1	1	0.5	0.125	0.5	0.5	4	4	4	4	4	0.7	1.2	47.4	
AMK 1 h	8	4	0.5	0.5	2	2	0.25	1	2	2	2	2	2	0.7	1.2	47.4	
XY	32	16	0.5	0.5	16	1	0.25	1	0.25	1	0.25	1	1	1.0	26.6	15.9	
AMK 1 h	16	16	0.5	0.5	>256	8	0.25	1	0.25	1	0.25	1	1	1.0	26.6	15.9	

c.

Strain and antibiotic exposure	MIC (mg/L)							Mean relative gene expression		
	TIM	FEP	ATM	AMK	TOB	CIP	LVX	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexC</i>
PAO1	16	1	2	4	0.25	0.125	0.25	1.6	9.3	59.7
CIP/AMK 8 h ^a	8	8	1	2	0.25	0.5	4	0.6	1.8	83.5
CIP/AMK 48 h	8	8	1	1	0.03	1	4			
WT	16	2	2	2	0.25	0.06	0.25			
CIP/AMK 1 h	8	8	1	1	0.06	1	4	0.7	1.3	92.6
CIP/AMK 4 h	32	4	2	4	0.5	2	4	1.2	1.3	178.9
CIP/AMK 8 h	8	4	1	4	0.25	1	2	1.5	1.2	42.5
CIP/AMK 48 h	8	8	1	2	0.06	0.5	2	0.7	2.5	82.2
AB	>256	2	8	4	0.5	0.125	1			
CIP/AMK 1 h	8	8	1	2	0.06	1	4	1.8	18.6	54.1
CIP/AMK 72 h	4	8	1	1	0.125	1	4	1.0	1.1	71.2
CD	4	8	1	0.5	0.125	0.5	4			
CIP/AMK 48 h	8	8	1	1	0.125	2	4	1.3	2.2	67.6

^aFor all mutants: no mutation in the QRDR

TIM, ticarcillin/clavulanate; FEP, cefepim; ATM, aztreonam; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin

Bold data are related to the parent strain. The colored values indicate a \geq or ≤ 2 -fold MIC deviation compared to the parent strain.

3. Discussion

En culture planctonique, notre étude confirmait l'impact de l'expression des pompes d'efflux MexCD-OprJ et MexXY-OprM sur la sélection de mutants résistants vis-à-vis de la ciprofloxacine et de l'amikacine après exposition à une monothérapie de ciprofloxacine et amikacine respectivement, et l'efficacité d'une bithérapie de ciprofloxacine et d'amikacine pour prévenir l'émergence de ces mutants résistants.

La sélection de mutants résistants à haut niveau aux fluoroquinolones pour la souche surexprimant l'efflux MexCD-OprJ, par mutations dans la région du QRDR, était observée après exposition à la ciprofloxacine en culture planctonique, malgré un rapport $AUC_{24h}/CMI >125$ prédictif, dans les séries cliniques et expérimentales, d'un succès thérapeutique (138, 139). Comme il a déjà été précédemment décrit, l'expression d'un mécanisme d'efflux réduit la concentration intracellulaire de l'antibiotique et pourrait ainsi favoriser la survenue de mutations dans les cibles des antibiotiques, responsable d'une résistance de haut niveau (137, 295). Dans notre travail, l'expression de la pompe d'efflux MexCD-OprJ (qui a pour substrat principal les fluoroquinolones) semblait faciliter l'émergence de mutations dans les topoisomérases, cibles des fluoroquinolones. Pour la souche surexprimant l'efflux MexCD-OprJ, la CMI de la ciprofloxacine était égale à 0,5 mg/L catégorisant la souche sensible à l'antibiotique tandis que la CMI de la lévofloxacine était de 4 mg/L classant la souche comme résistante à cet antibiotique. Dans un précédent travail, il a été suggéré qu'une diminution de sensibilité à la ciprofloxacine, indiquée par une CMI de la ciprofloxacine $\geq 0,25$ mg/L, liée à une surexpression d'une pompe d'efflux, pourrait entraîner un échec thérapeutique (296). La sélection de mutants résistants, dans notre travail, pour la souche surexprimant l'efflux MexCD-OprJ était peu surprenante mais permet néanmoins de souligner l'importance de déterminer la CMI de la ciprofloxacine lors d'une infection sévère à *P. aeruginosa* et de tester la sensibilité de la souche vis-à-vis de la lévofloxacine, dont l'activité est diminuée avant celle de la ciprofloxacine, lors de la surexpression de l'efflux MexCD-OprJ. Ce d'autant que la lévofloxacine n'apparaît pas dans la liste standard des molécules à tester lors de la réalisation d'un antibiogramme de *P. aeruginosa* d'après les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2019 (297).

L'émergence de mutants résistants à haut niveau à l'amikacine pour la souche surexprimant l'efflux MexXY-OprM après exposition à l'amikacine était davantage attendue puisque le rapport $C_{max}/CMI >10$ permettant de prédire une efficacité thérapeutique des aminosides n'était pas atteint (105).

La bithérapie de ciprofloxacine et amikacine permettait une éradication bactérienne sans sélection de mutants résistants à la fois pour la souche MexCD-OprJ et MexXY-OprM. Ce travail suggère la possibilité d'utiliser une bithérapie de ciprofloxacine et d'amikacine même lorsque la souche est de sensibilité diminuée vis-à-vis de l'une des deux molécules ; cette alternative thérapeutique pouvant s'avérer utile en cas de résistance acquise aux β -lactamines ou de contre-indication à l'utilisation des β -lactamines.

En biofilm, la bithérapie ne présentait pas d'avantages par rapport à la monothérapie que ce soit vis-à-vis des souches sauvages et des souches de sensibilité diminuée par surexpression d'un mécanisme d'efflux. L'échec des traitements en biofilm n'était pas dû à la sélection de cellules résistantes. Quels que soient la souche et le régime antibiotique testés, une réduction bactérienne biphasique était observée indiquant une activité bactéricide initiale intense, puis une survie bactérienne prolongée. L'isolement de mutants résistants pouvait être qualifié d'erratique et anecdotique. En effet, des mutants résistants étaient isolés en faible proportion par rapport à la population survivante et non constamment retrouvés au cours de l'exposition antibiotique. Des faibles variations de CMI étaient observées pour les molécules testées (ticarcilline/clavulanate, céfépime, aztréonam, amikacine, tobramycine, ciprofloxacine, lévofloxacine) par rapport aux CMI initiales. Une augmentation de l'expression de la pompe d'efflux MexCD-OprJ était constatée, par rapport au niveau d'expression mesuré pour la souche parentale, pour les mutants résistant à la ciprofloxacine. Aucun lien évident entre la résistance à l'amikacine et l'expression de MexXY-OprM n'était retrouvé. Dans aucun cas, une re-croissance progressive de mutants résistants n'était observée.

Nos résultats sont en faveur d'une sélection de cellules persistantes en biofilm et non de l'émergence de cellules résistantes comme en culture planctonique. En effet, la cinétique de réduction bactérienne biphasique en biofilm après exposition à des concentrations efficaces de ciprofloxacine et amikacine suggère la mort cellulaire rapide d'une grande partie de la population bactérienne sensible puis la survie de cellules persistantes qui échappent au traitement antibiotique. La population survivante aux antibiotiques en biofilm représentait moins de 1% de la population initiale. Enfin, les CMI de la ciprofloxacine et de l'amikacine étaient inchangées pour les cellules survivantes après exposition antibiotique en biofilm (40, 232). L'ensemble de ces éléments correspondait aux caractéristiques communément admises des cellules persistantes (232).

Dans la littérature, il est suggéré que les cellules persistantes en biofilm auraient une activité métabolique ralentie (251). Le ralentissement de l'activité cellulaire en biofilm et de la réplication des cellules, pourrait ainsi limiter, y compris pour de fortes concentrations

bactériennes, l'apparition de mutations dans les cibles des antibiotiques. Le nombre limité d'opportunités de mutations, rendrait alors négligeable l'impact des variations de concentration intracellulaire de l'antibiotique, induites par l'expression des mécanismes d'efflux. L'acquisition de mutations de résistance, potentiellement coûteuse en énergie, ne représenterait dès lors pas un avantage sélectif en biofilm, si bien que les mutants résistants ne pourraient pas se multiplier au cours du temps, et les cellules exprimant d'autres mécanismes adaptatifs en biofilm resteraient majoritaires.

L'adaptation en biofilm paraît en effet être différente de celle observée en mode de vie planctonique. En biofilm, quel que soit le mécanisme d'efflux, les mêmes cinétiques de réduction bactérienne étaient observées. Contrairement à ce que nous avons décrit en culture planctonique, les mécanismes d'efflux semblaient avoir un rôle secondaire dans l'échec des traitements antibiotiques dans notre modèle de biofilm.

Dans notre travail, comme dans la littérature, même si certains antibiotiques ou associations d'antibiotiques montrent une activité vis-à-vis *P. aeruginosa* en biofilm, ils ne permettent souvent pas l'éradication complète du biofilm (218, 226, 298). D'autres stratégies thérapeutiques doivent être envisagées pour le traitement des infections en biofilm.

Certains auteurs ont suggéré qu'une exposition séquentielle à deux ou plusieurs antibiotiques pourrait éradiquer les cellules persistantes. Par exemple, la thérapie séquentielle de colistine et amikacine, quel que soit l'ordre choisi, permettait d'éliminer les cellules persistantes d'*A. baumannii* en culture planctonique (299). En biofilm, dans un travail de Rojo-Molinero *et al.* (217), un traitement séquentiel par tobramycine puis aztréonam à des concentrations très élevées (correspondant aux concentrations obtenues chez les patients atteints de mucoviscidose en cas d'administration de ces antibiotiques en aérosols) était plus efficace que les monothérapies de tobramycine et d'aztréonam. Dans notre travail, les expositions séquentielles à la ciprofloxacine puis à l'amikacine ou à l'amikacine puis à la ciprofloxacine ne permettaient pas l'éradication du biofilm de *P. aeruginosa*. Ces résultats suggéraient que la première exposition antibiotique pourrait déclencher la transition vers un phénotype persistant rendant la population bactérienne tolérante à tout autre traitement antibiotique secondaire, comme cela a déjà été démontré en phase stationnaire d'une culture planctonique dans des travaux précédents (279, 280).

Bien évidemment, dans notre modèle de biofilm *in vitro*, les conditions environnementales diffèrent des conditions *in vivo*. Par ailleurs, hormis la souche de laboratoire PAO1 qui est bien connue, des souches cliniques non isogéniques ont été utilisées ce qui peut limiter la comparaison des résultats obtenus entre eux. De plus, malgré des

paramètres pharmacocinétiques en accord avec les données de la littérature, et la sélection de cellules persistantes dans notre modèle, comme attendue et déjà décrite dans la littérature, la grande variabilité qui existe en biofilm nous amène à considérer nos résultats avec prudence. Le biofilm est en effet un environnement extrêmement dynamique et hétérogène. La mise en place d'un modèle de biofilm dynamique *in vitro* aurait pu être intéressante pour comparer l'adaptation de *P. aeruginosa*, en réponse à la ciprofloxacine, dans des environnements différents. Enfin, alors que la résistance à la ciprofloxacine a été caractérisée, la résistance à l'amikacine reste non élucidée dans notre travail. En effet, compte-tenu de la diversité des mécanismes de résistance et de l'association possible de plusieurs mécanismes, la résistance vis-à-vis des aminosides n'a pas été explorée.

Malgré les limites que comporte ce travail, l'ensemble des résultats obtenus dans notre modèle de biofilm de *P. aeruginosa* conforte l'hypothèse d'un rôle majeur des mécanismes de persistance, plutôt que de résistance. Induits par un stress, notamment antibiotique, des mécanismes moléculaires spécifiques s'expriment probablement en biofilm, permettant une adaptation phénotypique vers des mécanismes de tolérance. Finalement possiblement indépendants du mode d'action des antibiotiques, ces mécanismes induisent une tolérance croisée à diverses -si ce n'est à la totalité des- familles antibiotiques. Aussi, l'association, ou la succession des traitements antibiotiques est possiblement vaine pour le traitement d'infections associées à des biofilms matures. Indispensables pour traiter les infections planctoniques ou la composante planctonique des infections en biofilm, ou en complément d'autres méthodes d'éradication du biofilm, les antibiotiques ne permettront sans doute pas à eux-seuls d'éradiquer les biofilms. Afin d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques, il apparaissait nécessaire de mieux de comprendre les mécanismes impliqués dans l'échec des traitements antibiotiques en biofilm.

II. Adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* à une exposition de ciprofloxacine en biofilm

Dans notre premier travail, nous avons décrit que différentes séquences et associations de ciprofloxacine et d'amikacine en biofilm n'apportaient comparativement pas d'avantage en biofilm, ni pour l'éradication du biofilm ni pour la prévention de l'émergence de mutants résistants. Pour mieux comprendre les modalités d'échappement de *P. aeruginosa* aux traitements antibiotiques en biofilm, nous avons cherché à en explorer les mécanismes.

Dans notre modèle, comme dans d'autres travaux, la ciprofloxacine, pourtant réputée diffuser dans les couches profondes du biofilm (102, 233), échouait à éliminer un biofilm de *P. aeruginosa* (216, 298). L'échec des traitements en biofilm est majoritairement attribué à la sélection de cellules persistantes (232), en lien avec des adaptations métaboliques (281). Les hypothèses de la persistance en biofilm reposent principalement sur l'activation de la réponse stringente, de la réponse SOS et possiblement de systèmes TA, pour aboutir à un ralentissement métabolique et à un échappement vis-à-vis du traitement antibiotique (276). Il a été montré un rôle direct des fluoroquinolones dans l'activation de la réponse stringente (254). Une efficacité ciblée de la ciprofloxacine vis-à-vis des cellules métaboliquement actives se situant à la périphérie du biofilm a également été décrite (164).

Pour explorer les mécanismes d'échappement de *P. aeruginosa* à la ciprofloxacine en biofilm, nous avons donc étudié l'effet de la ciprofloxacine sur la structure et la composition du biofilm, l'activité cellulaire en biofilm et les cinétiques d'expression, au cours du processus d'adaptation conduisant à la persistance, de certains gènes potentiellement impliqués dans la persistance.

Une forme spécifique d'adaptation à la vie en biofilm étant l'évolution d'une sous-population bactérienne vers un phénotype « variant à petite colonie » ou SCV, associé dans des travaux antérieurs à l'échec des traitements antibiotiques en biofilm (76, 256), nous avons ensuite discuté de la place spécifique des SCV dans la récalcitrance aux antibiotiques en biofilm.

1. Analyse structurelle et fonctionnelle de l'adaptation de *P. aeruginosa* en biofilm

1.1 Contexte

Les exopolysaccharides et l'ADNe sont des constituants majeurs de la matrice extracellulaire du biofilm (12). Ils contribuent au maintien de la structure du biofilm, aux interactions cellule-cellule, à la protection des bactéries en biofilm (166). La ciprofloxacine est décrite pour avoir la capacité de diffuser en biofilm (102, 233), mais ses effets sur la composition d'un biofilm mature, constitué préalablement à l'exposition antibiotique, n'ont pas été explorés. Dans ce travail, des analyses par microscopie confocale ont été effectuées afin de comparer la structure et la matrice extracellulaire du biofilm de *P. aeruginosa* avant et après exposition à la ciprofloxacine. Ces analyses ont été réalisées à partir d'un biofilm mature de *P. aeruginosa* PA14, souche bien décrite initialement isolée d'une surinfection de brûlure d'un patient et dont le génome est entièrement séquencé. Le biofilm a été formé sur des plaques 6 puits pendant 48 h, puis exposé ou non à de la ciprofloxacine à 4 mg/L, concentration bien supérieure à la CMI (32 fois la CMI), pendant 24 h et marqué par des sondes fluorescentes, afin de visualiser l'architecture du biofilm, quantifier la biomasse constituée par les exopolysaccharides et par l'ADNe et déterminer la proportion de cellules vivantes et mortes.

La sélection de bactéries persistantes, manifestement impliquées dans les échecs de traitement en biofilm, fait l'objet de diverses hypothèses dans la littérature : sélection génétique ou phénomène stochastique, protection des bactéries par la matrice extracellulaire ou ralentissement métabolique, entre autres (40, 277). L'émergence de bactéries persistantes ne semble pas exclusivement dépendre de la pression antibiotique puisque les conditions de carence nutritionnelle qui existent en biofilm peuvent aussi favoriser leur apparition (252). L'exposition à des stress, comme par exemple les antibiotiques tels que les fluoroquinolones qui induisent des altérations de l'ADN, pourrait amplifier ce phénomène (254). Plusieurs mécanismes sont évoqués chez *P. aeruginosa* en biofilm pour expliquer la persistance. Le (p)ppGpp, un messager secondaire synthétisé lorsque la réponse stringente est activée, semble jouer un rôle important dans la transition vers la tolérance aux antibiotiques en biofilm (251). En cas de diminution de la concentration intracellulaire de (p)ppGpp, les bactéries présentaient une sensibilité accrue aux antibiotiques (254). Lorsqu'un biofilm était formé avec une souche de *P. aeruginosa* chez qui les gènes *relA* et *spoT* étaient défectueux, les concentrations de (p)ppGpp étaient diminuées et la sensibilité à des antibiotiques comme la ciprofloxacine et la tobramycine était augmentée (222). L'activation de cette voie métabolique

se ferait au détriment de l'activation de facteurs de virulence en biofilm. La mesure de l'expression de ces gènes dans les conditions de sélection de cellules persistantes pourrait dès lors apporter des éléments de confirmation du rôle de cette voie métabolique dans la persistance.

Ainsi, pour explorer les mécanismes mis en jeu dans la persistance de *P. aeruginosa* en biofilm traité par ciprofloxacine, nous avons tout d'abord démontré que l'échec des traitements était bien lié à la sélection de cellules persistantes, avant d'étudier la structure du biofilm et la cinétique d'expression en biofilm de gènes d'intérêt dans les conditions de persistance.

1.2 Publication 2

Ciprofloxacin failure in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: matrix disruption does not prevent from early persister selection

Auteurs : Anaïs Soares, Valérie Roussel, Martine Pestel-Caron, Magalie Barreau, François Caron, Emeline Bouffartigues, Sylvie Chevalier, Manuel Etienne

En révision dans Frontiers in Microbiology

CIPROFLOXACIN FAILURE IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA BIOFILM: MATRIX DISRUPTION DOES NOT PREVENT FROM EARLY PERSISTENT SELECTION

Anaïs Soares^{1,2}, Valérie Roussel¹, Martine Pestel-Caron^{1,2}, Magalie BARREAU³, François Caron^{1,4}, Emeline Bouffartigues³, Sylvie Chevalier³, Manuel ETIENNE^{1,4*}

¹GRAM 2.0, EA 2656, Normandie Univ, UNIROUEN,, France, ²Département de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen, France, ³EA4312 Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Université de Rouen, France, ⁴Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
485739

Received on:
18 Jul 2019

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

1 **CIPROFLOXACIN FAILURE IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA BIOFILM: MATRIX**
2 **DISRUPTION DOES NOT PREVENT FROM EARLY PERSISTENT SELECTION**

3
4 **Authors:** Anaïs Soares^{1,2}, Valérie Roussel¹, Martine Pestel-Caron^{1,2}, Magalie Barreau⁴, François
5 Caron^{1,3}, Emeline Bouffartigues⁴, Sylvie Chevalier⁴, Manuel Etienne^{1,3*}

6
7
8 **Affiliations:**

9 1: GRAM 2.0, EA 2656, Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen, France

10 2: Microbiology Department, Rouen University hospital, Rouen, France

11 3: Infectious Diseases Department, Rouen University hospital, Rouen, France

12 4: EA 4312 (LMSM), Normandie Univ, Unirouen, Evreux, France

13
14
15 ***: Correspondence:**

16 Pr Manuel Etienne, mail: manuel.etienne@chu-rouen.fr

17
18
19 **Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, persistence, extracellular matrix, ciprofloxacin,
20 stringent response

21
22
23 **Running title:** Ciprofloxacin tolerance in biofilm

24
25
26
27 **Abstract**

28 Biofilms are commonly recalcitrant to antibiotics, through incompletely elucidated mechanisms
29 such as tolerance and persistence. We aimed at investigating how a *P. aeruginosa* biofilm escapes
30 ciprofloxacin.

31 *P. aeruginosa* PA14 *in vitro* mature biofilms were challenged with supra-MIC ciprofloxacin
32 concentrations. Cell metabolic activity was quantified by fluorescein diacetate assay. Population
33 dynamics were determined by viable cells count. Biofilms were analysed using confocal laser
34 scanning microscopy (CLSM). The expression of genes involved in stringent response (*spoT*, *relA*,
35 and *lon*), toxin-antitoxin HigB/HigA, and type III secretion system (T3SS) was quantified in the
36 biofilms by RT-qPCR.

37 Ciprofloxacin exposure resulted in an initial reduction of bacterial counts following a biphasic
38 time-kill curve, and in reduced metabolic activity. No resistant mutant was isolated among the <1%
39 surviving cells. A contingent of biofilm-embedded persister cells survived ciprofloxacin despite a
40 deep alteration in the matrix structure that became thinner and lost mushroom-like aggregates, in
41 relation with reduced biovolumes of exopolysaccharides and extracellular DNA. Phenotypic
42 adaptation towards persistence started after only 1 h of antibiotic exposure, by an overexpression
43 of the genes involved in stringent response and in the toxin-antitoxin system, whereas the
44 expression of genes encoding for the T3SS remained unchanged. After 4 h of ciprofloxacin
45 exposure, stringent response genes returned to their basal level of expression.

46 These results support that ciprofloxacin initially induces a major disruption of the biofilm matrix,
47 bacterial killing and slowdown of biofilm cell activity. But surviving cells rapidly adopt a persister
48 phenotype tolerant to antibiotics, through an early activation of stringent response.

49

50

51

52

53 **Introduction**

54 *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with indwelling medical devices are particularly
55 difficult to treat because of *P. aeruginosa* ability to produce biofilm protecting from host defenses
56 and chemotherapy. Thus, treating such infections without mechanical biofilm dispersion remains
57 challenging (Høiby et al., 2015; Mulcahy et al., 2014). Among the antibiotics required to treat *P.*
58 *aeruginosa* biofilm infections, ciprofloxacin is widely used (Masadeh et al., 2019; Mensa et al.,
59 2018), being the sole oral anti-*P. aeruginosa* antibiotic, and diffusing in the biofilm deepest layers
60 (Anderl et al., 2000; Walters et al., 2003). Despite these properties, previous studies demonstrated
61 that ciprofloxacin failed to eradicate *P. aeruginosa* biofilms, even in experimental conditions where

62 no resistant mutants were selected (Benthall et al., 2015; Pamp et al., 2008; Pawar et al., 2015;
63 Spoering and Lewis, 2001). Indeed, the treatment failure frequently resulted from the selection of
64 persister cells. Such persisters derive from fully susceptible strains (Balaban, 2004) that become
65 recalcitrant to antibiotics after a phenotypic and reversible switch, induced by environmental
66 factors, starvation, and several other active or passive mechanisms (Ciofu and Tolker-Nielsen,
67 2019; Lebeaux et al., 2014; Lewis, 2010). Though not fully elucidated, it is suggested that
68 persistence may result from a reduced metabolic activity of cells in biofilm after the induction of
69 stringent response, SOS response, toxin-antitoxin modules or even other unknown mechanisms
70 (Amato et al., 2014; Harms et al., 2016; Mah and O'Toole, 2001; Viducic et al., 2006).
71 Because the mechanisms and kinetics of *P. aeruginosa* biofilm tolerance to ciprofloxacin are still
72 incompletely unraveled, we investigated the impact of ciprofloxacin on biofilm structure and the
73 switch phenomenon towards persistence of biofilm-embedded cells by confocal laser scanning
74 microscopy (CLSM) and transcriptomic analysis.

75
76

77 **Materials and methods**

78 **Bacterial strain and biofilm model**

79 The experiments were performed with the wild-type PA14 reference strain. The ciprofloxacin MIC
80 and mutant prevention concentration for PA14 were respectively 0.125 mg/L and 4 mg/L,
81 determined as previously described (Díez-Aguilar et al., 2015; Wiegand et al., 2008). Overnight
82 cultures of *P. aeruginosa* PA14 strain in Mueller-Hinton broth (MHB) were diluted to an optical
83 density of 600 nm of 0.01 in MHB. Three mL of the bacterial suspension were inoculated in 6-well
84 polystyrene culture plates and incubated under static conditions at 37°C for 1 h. Then, the
85 suspension was removed and replaced by 3 mL of MHB. After 48 h of biofilm formation, wells
86 were washed twice with 1 mL 0.9% NaCl to remove planktonic cells, and challenged with
87 ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, France) during 24 h.

88

89 **Evaluation of cell viability in biofilms by fluorescein diacetate assay**

90 The fluorescein diacetate (FDA) assay relies on the cleavage of non-colored FDA by esterases of
91 metabolically active bacteria into yellow fluorescein. FDA (Sigma-Aldrich, France) was dissolved
92 in acetone at a concentration of 1 mg/mL. A 1:5 FDA (v/v) working solution in 0.9% NaCl was

93 freshly prepared before each assay. Biofilms were formed as previously described. Then, 2-day-
94 old biofilms unexposed and exposed to ciprofloxacin (4 to 256 mg/L) during 24 h were rinsed with
95 1.5 mL of 0.9 % NaCl, before addition of 1.5 mL FDA working solution. Plates were incubated in
96 the dark at 37 °C and absorbance was measured at 490 nm after 30, 60, 90, 120, 180 and 240 min.
97 Controls consisting of MHB without bacterial suspension and of 0.9% NaCl were performed. Data
98 were obtained from three independent biological replicates (Peeters et al., 2008; Wanandy et al.,
99 2005).

100

101 **Biofilm Time-kill curve**

102 *P. aeruginosa* PA14 biofilms were prepared as described above for colony counts. The 2-day-old
103 biofilms unexposed and exposed to ciprofloxacin (4 mg/L) during 24 h were then dispersed
104 mechanically by vortex and gentle sonication. Cells were numbered at 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h of
105 ciprofloxacin exposure onto MH2 plates without antibiotic or with ciprofloxacin at 0.5 mg/L to
106 detect 4-fold MIC resistant mutants. The ciprofloxacin MICs for surviving sessile cells recovered
107 from MH2 plates after 24 h of ciprofloxacin exposure were determined by Etest according to the
108 manufacturer's recommendations.

109

110 **Biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy**

111 Two-day-old *P. aeruginosa* PA14 biofilms were prepared as described above on 6-well glass-
112 bottomed microplates (NEST, Grosseron, France), exposed or not to 4 mg/L of ciprofloxacin for
113 further 24 hours and analysed by CLSM. After ciprofloxacin treatment, biofilms were washed
114 twice with 1 mL 0.9% NaCl. The remaining surface-attached biofilm biomass was then stained by
115 adding (i) 50 nM of Syto-9 (Invitrogen™ Molecular Probes™), a green fluorescent dye for total
116 cells, and 1 µg/mL of white calcofluor (Sigma-Aldrich), a blue fluorescent probe labelling cellulose
117 and other exopolysaccharides with β-1,4 linkages, (ii) 50 nM of Syto-9 and 1 µM of 1,3-dichloro-
118 7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO) (Invitrogen™ Molecular Probes™), a red
119 fluorescent probe labelling extracellular DNA (eDNA) and (iii) the Live/Dead BacLight Bacterial
120 Viability Kit® for microscopy (Thermo Fisher Scientific) differentiating viable and dead bacteria.
121 A 2-day-old unexposed biofilm was also compared to the 3-day-old unexposed biofilm for
122 exopolysaccharides biomass. Biofilms were visualized with a Zeiss LSM710 microscope (Carl
123 Zeiss Microscopy). The biofilms thicknesses (µm) and biovolumes (µm³/µm²) were measured

124 using the COMSTAT software. Data were obtained from at least three independent biological
125 replicates.

126

127 **RNA extraction from biofilm for transcriptomic analysis**

128 *P. aeruginosa* PA14 biofilms were prepared for RNA isolation as described above. After 1 and 4
129 h of ciprofloxacin exposure, the biofilm was removed from wells by gentle sonication during 90 s
130 and scrapping with a sterile pipette tip. The scraped biofilm was centrifuged for 5 min at 8000g.
131 Cells from 6 wells of a 6-well culture plate were pooled. Finally, the pellet was resuspended in 1
132 mL 0.9% NaCl for two washing steps. For the unexposed biofilm, only one of the 6-well plate was
133 used according the same protocol previously described. Total RNAs were extracted using the
134 Nucleospin RNA kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) and further treated with DNase (TURBO
135 DNase free Ambion, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. RNA
136 was quantified and analyzed for its quality using a BioDrop μ LITE (BioDrop Ltd, Cambridge,
137 United Kingdom), and absence of contaminating DNA was checked by qPCR using RsmZ RNAs
138 as matrix.

139

140 **Quantification of gene expression in biofilms by reverse transcription-quantitative PCR**

141 The levels of expression of nine genes listed in the result section were analysed in 2-day-old
142 biofilms exposed to ciprofloxacin (at 4 mg/L) for 1 h or 4 h and compared to untreated biofilms.
143 First-strand cDNA synthesis was performed with OMNISCRIPT reverse transcription kit
144 (Qiagen®) using standard laboratory protocols. Purified RNAs were used for one-step reverse
145 transcription (RT) and real-time PCR amplification. Primers are listed in supplementary Table S1.
146 The PCR cycling conditions were as follows: 95°C for 5 min and 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at
147 55°C. A melt curve was run at the end to evaluate primer dimers and other artifacts. Relative
148 quantification was carried out from three independent biological replicates. Data were normalized
149 to 16S gene expression and fold changes were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Guyard-
150 Nicodème et al., 2008). A gene was considered as overexpressed when the fold change was at least
151 2-times higher in treated biofilms, than in untreated biofilms. The stability of the 16S gene under
152 different conditions was confirmed by comparing the respective cycle thresholds (CTs):
153 22.06 ± 0.09 for untreated biofilm and 23.03 ± 0.48 for ciprofloxacin-treated biofilm ($p > 0.05$).

154

155 **Statistical analysis**

156 Results were analysed using the unpaired Student's *t test*. Statistical significance was accepted
157 when p values were <0.05.

158

159

160 **Results**

161 **Cell viability in biofilm**

162 Ciprofloxacin at supra-MIC concentrations reduced the cell viability of biofilm-embedded cells as
163 demonstrated by the FDA assay. Whereas absorbance linearly increased from 1.49 ± 0.15 after 30
164 min to 6.28 ± 1.25 after 240 min in unexposed biofilm ($p < 0.05$), the signal significantly decreased
165 for ciprofloxacin concentrations ≥ 8 mg/L ($p < 0.05$) (details in supplementary Figure 1). The
166 ciprofloxacin concentration of 4 mg/L, corresponding to the mutant prevention concentration, the
167 through concentration in adults treated orally with 500 mg twice daily, and achieving in human the
168 pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) objectives associated with clinical efficacy for
169 ciprofloxacin ($AUC_{0-24}/MIC \geq 125$), resulted in inhibition of cell multiplication, as attested by a
170 stable absorbance signal over time.

171 These FDA assay results were in accordance with time-kill curves of 2-day-old biofilms exposed
172 to 4 mg/L of ciprofloxacin. Starting from a $7.9 \log_{10}$ cfu/mL mean inoculum, a $3.0 \log_{10}$ cfu/mL
173 bacterial reduction was achieved as soon after 1 h, followed by a $2.0 \log_{10}$ cfu/mL progressive
174 reduction from 1 h to 12 h and lastly a $3.0 \log_{10}$ cfu/mL plateau until 24 h (details in supplementary
175 Figure S2). Of note, no resistant mutant was detected among surviving bacteria (neither on plates
176 supplemented with 4-fold ciprofloxacin MIC nor by measurement of ciprofloxacin MIC for
177 surviving sessile cells).

178

179 **Biofilm architecture**

180 As ciprofloxacin had a deleterious effect on cell viability, we therefore investigated the effect of
181 the antibiotic exposure on biofilm architecture. Before ciprofloxacin exposure, the 3-day-old
182 biofilm was largely spread on the glass surface, was robust and compact with maximum and
183 average thicknesses of 50.2 and 33.2 μm respectively and mushroom-like aggregates of materials
184 (**Figures 1A, 2A, 3A**). Ciprofloxacin exposure led to a sparser biofilm with a deep reduction in the
185 biofilm thicknesses (maximum and average of 21.0 and 18.5 μm respectively) and a disruption of

186 the mushroom-like structures (**Figure 1B, 2B, 3B**). Since the biofilm architecture seemed to be
187 affected after ciprofloxacin exposure, the two major matrix components, *i.e.* exopolysaccharides
188 (**Figure 1**) and eDNA (**Figure 2**), were explored as well as the ratio of live cells and dead cells
189 (**Figure 3**) by specific staining. As shown **Figure 1**, the blue fluorescence was significantly less
190 visible after ciprofloxacin exposure suggesting alterations in the exopolysaccharides of the matrix.
191 COMSTAT analyses revealed that the biovolume of β -polysaccharides decreased markedly from
192 $0.91 \pm 0.10 \mu\text{m}^3$ in the untreated biofilm to $0.06 \pm 0.01 \mu\text{m}^3$ ($p < 0.05$) and the ratio
193 exopolysaccharides/total bacterial density declined from 1.43 ± 0.04 to 0.13 ± 0.03 ($p < 0.05$). These
194 results indicated that the production of exopolysaccharides by the cells was reduced by
195 ciprofloxacin exposure. Of note, no significant difference was noticed between the untreated 2-
196 day-old and 3-day-old biofilms regarding the biovolumes of β -polysaccharides and of total cells
197 ($p > 0.05$) (data not shown). As shown **Figure 2**, the red fluorescence labelling eDNA was less
198 intense after ciprofloxacin exposure and holes in the biofilm structure were observed. COMSTAT
199 analyses showed that the biovolume of eDNA decreased from $2.91 \pm 0.96 \mu\text{m}^3$ to $0.88 \pm 0.34 \mu\text{m}^3$
200 ($p = 0.05$) whereas the ratio eDNA/total bacterial density remained stable (0.84 ± 1.12 versus 0.96
201 ± 0.14 , $p = 0.7$). The analysis of cell viability using the Live/Dead staining kit (**Figure 3**), showed
202 that the red fluorescence corresponding to dead cells was more intense in biofilms exposed to
203 ciprofloxacin than in controls. Indeed, COMSTAT analyses quantified a 1.8-fold decrease in the
204 percentage of live cells after ciprofloxacin exposure (live cells decline from $45.5 \pm 4.1\%$ to $25.0 \pm$
205 4.3% , $p < 0.05$) and a 1.4-fold increase in the percentage of dead cells, indicating the ciprofloxacin
206 deleterious effect, in accordance with our previous results obtained with FDA assay and cell counts.
207 However, though ciprofloxacin resulted in major bacterial killing and structural disruption of the
208 biofilm matrix, susceptible cells still survived in biofilm after antibiotic exposure.

209

210 **Gene expression in biofilm**

211 To gain further insights into the adaptive mechanisms underlying *P. aeruginosa* persistence in
212 biofilm upon ciprofloxacin exposure, we measured the dynamics in the expression of genes
213 potentially involved in antibiotic tolerance (i) three stringent response genes (*spoT*, *relA* and *lon*)
214 known to be involved in biofilm tolerance to antibiotics, (ii) the two genes of the HigB-HigA toxin-
215 antitoxin system (*higB* and *higA*) potentially involved in persister formation and the four genes
216 involved in the type III secretion system (T3SS, *exsA*, *exsC*, *exoU* and *pcrV*) a key virulence factor

217 of *P. aeruginosa*. All these genes were quantified directly from the biofilm, before antibiotic
218 exposure, and after 1 h and 4 h of ciprofloxacin exposure at 4 mg/L.

219 As presented in **Figure 4**, and as compared to untreated biofilms, ciprofloxacin markedly changed
220 the gene expression in biofilm as soon as after one hour of exposure. A high increase in the
221 expression of the three stringent response genes was measured, respectively a 2.8-, 6.4- and 9.1-
222 fold increase for *spoT*, *relA* and *lon*. The two toxin-antitoxin system genes *higB* and *higA* were also
223 both up-regulated with respectively a 4.1- and 4.6-fold increase, whereas the level of expression of
224 T3SS-related genes remained stable.

225 After 4 h of ciprofloxacin exposure, the T3SS genes were still not affected and the toxin-antitoxin
226 genes expression remained overexpressed at the same level (~4-fold), whereas the genes involved
227 in the stringent response were no longer significantly up-regulated (from 1.4 to 2.4-fold). Thus, the
228 dynamic of genes expression revealed a very rapid adaptation after ciprofloxacin exposure as
229 stringent response related-genes being overexpressed as early as 1 h of antibiotic.

230

231

232 **Discussion**

233 Whilst it is now known that biofilm infections are difficult to eradicate because of their enhanced
234 tolerance to antimicrobials (Costerton et al., 1999; Donlan, 2001), the switch towards a persistent
235 phenotype is still incompletely elucidated. In our work, and as expected, CLSM analyses performed
236 before any antibiotic exposure, portrayed a biofilm composed of bacterial cells entrapped in a
237 cohesive and structurally robust matrix made of eDNA and exopolysaccharides (Limoli et al.,
238 2015; Moradali et al., 2017). Consistent with other works, ciprofloxacin induced a rapid decrease
239 in the bacterial density, followed by a survival of a subpopulation not eradicated despite prolonged
240 antibiotic exposure (Mulcahy et al., 2010; Pamp et al., 2008; Pawar et al., 2015; Reffuveille et al.,
241 2014). Noticeably, ciprofloxacin exposure induced a deep disruption of the biofilm matrix. It was
242 recently described that the β -lactam ceftazidime may weaken the polysaccharide matrix synthesis
243 of *P. aeruginosa* PAO1 through a reduction in the production of Pel and Psl exopolysaccharides
244 (Otani et al., 2018). The mechanism of biofilm matrix disruption by ciprofloxacin remains
245 unknown. Pel, the unique exopolysaccharide produced by *P. aeruginosa* PA14 (Colvin et al.,
246 2011), is known to cross-link eDNA in the biofilm and is instrumental in its ability to interact with
247 other key biofilm matrix components. Thus, reducing Pel amount would lead to disrupt the biofilm

248 matrix. In our study, both the biovolume of exopolysaccharides and the ratio
249 exopolysaccharides/total bacterial density markedly decreased after ciprofloxacin exposure. We
250 therefore propose that the decrease of the mushroom-like structures that we have noticed herein
251 might come from a lower exopolysaccharides production upon ciprofloxacin exposure. It would be
252 interesting to further explore the effects of ciprofloxacin on the regulatory cascade leading to Pel
253 production.

254 In our model, an important release of DNA was expected after the lysis of biofilm cells induced by
255 ciprofloxacin exposure according to a previous study (Jakubovics et al., 2013), but a decrease in
256 the biovolume of eDNA was here observed, together with a reduction in the biovolume of
257 exopolysaccharides as reported above. Since Pel colocalizes and physically interacts with eDNA
258 in biofilm (Jennings et al., 2015), it can be suggested that the DNA released could not be retained
259 and entrapped in the biofilm related to the deep decline in the β -polysaccharides.

260 Despite such a disruption of the biofilm structure, ciprofloxacin failed to eradicate biofilm as
261 evidenced by colony counts and live/dead staining. The fluorescence assay, used to evaluate cell
262 viability (Peeters et al., 2008) and performed on the whole attached biofilm, revealed an intense
263 cell activity in unexposed biofilm, dramatically reduced after ciprofloxacin exposure. Accordingly,
264 antibiotic-induced dormancy has been previously shown as presumably one of the mechanisms
265 involved in the antibiotic tolerance of biofilms (Amato et al., 2014). To further investigate the
266 molecular mechanisms involved in the switch towards such a reduced metabolic activity after
267 antibiotic exposure, the expression of stringent response genes was measured directly from biofilm.
268 As soon as 1 h after the onset of ciprofloxacin exposure, stringent response genes *spoT*, *relA* and
269 *lon* were largely overexpressed, while expression of virulence genes such as *exsA*, *exsC*, *exoU* and
270 *pcrV* encoding for the T3SS was largely unchanged. Stringent response can induce reduced
271 metabolic activity particularly in biofilm and hence contribute to biofilm tolerance. Indeed,
272 previous works have demonstrated that a deficient *P. aeruginosa* double mutant $\Delta relA \Delta spoT$
273 impaired in its ability to produce the stringent response signaling compound (p)ppGpp
274 demonstrated a lower tolerance to ofloxacin (Nguyen et al., 2011; Stewart et al., 2015). Conversely,
275 the *P. aeruginosa* T3SS has been shown to essentially act as a pathogenetic and virulence factor
276 (Diaz and Hauser, 2010). Recently, Li *et al.* (Li et al., 2016) demonstrated that sub-inhibitory
277 ciprofloxacin concentrations displayed increased cytotoxicity, depending on the up-regulation of
278 the T3SS in planktonic cultures. In our biofilm experiment, and after exposure to higher and

279 effective ciprofloxacin concentrations, T3SS was not up-regulated. Hence, T3SS didn't seem to
280 play a role in antibiotic tolerance in biofilm. In line with these results, it can be suggested that sub-
281 inhibitory antibiotic concentrations might trigger defense mechanisms in which virulence pathways
282 such as T3SS might be involved, whereas presumably lethal antibiotic concentrations would lead
283 to a general stress response activation in which starvation strategies such as stringent response
284 might be “the last hope” for bacterial survival (Andersson and Hughes, 2014; Fajardo and Martínez,
285 2008; Harms et al., 2016).

286 Regarding the toxin-antitoxin systems, their role in *P. aeruginosa* biofilm persistence still remains
287 elusive (Maisonneuve et al., 2018). Recently, Guo *et al.* (Guo et al., 2019) demonstrated that HigA,
288 when produced at a higher level than HigB, repressed virulence gene expression such as *mvfR*
289 which controls the synthesis of pyocyanin. Moreover, in the presence of gentamycin or
290 ciprofloxacin, the Lon protease was activated, leading to the degradation of HigA and the
291 derepression of *higB* transcription. During the first stages of ciprofloxacin exposure in our biofilm
292 model, *higA* and *higB* genes were overexpressed all along the experiment and each other at a
293 comparable level. This result suggests that the antitoxin protein might inhibit her cognate toxin and
294 act as a transcriptional repressor to control the production of virulence factors. Our results differed
295 from those of reported by Li *et al.* (Li et al., 2016) and Guo *et al.* (Guo et al., 2019) since *higA* was
296 upregulated in our work despite a *lon* overexpression. This difference in the transcriptomic profiles
297 of toxin-antitoxin system might depend on the experimental conditions retained in the studies. Our
298 transcriptomic analysis was performed directly from biofilm after exposure to supra-MIC
299 ciprofloxacin concentrations whereas the studies reported above were achieved in planktonic
300 cultures after exposure to sub-inhibitory antibiotic concentrations. We therefore assume that either
301 the HigA degradation will occur after a longer antibiotic exposure in biofilm or that the toxin HigB
302 does not contribute to biofilm persistence.

303 An important finding of this study was the change in the gene expression profile that happened
304 very early after antibiotic exposure, particularly for the stringent response, and that could be
305 involved in a phenotypic switch towards antibiotic recalcitrance and reduced cell activity. After the
306 initiation of stringent response, the switch for persistence and then dormancy might be completed,
307 and stringent response might no longer be essential, as indicated by the decrease of the stringent
308 response genes expression after an extended ciprofloxacin exposure in our study. Thus, our data
309 highlighted that the general stress response seemed to be triggered very rapidly after the antibiotic

310 treatment. To our knowledge, no other study has reported the dynamic adaptation of *P. aeruginosa*
311 over time in biofilm in the presence of ciprofloxacin.

312 Although this study provides new findings regarding the impact of ciprofloxacin in antibiotic
313 recalcitrance in biofilm, results should be interpreted with caution. Mimicking the biofilm-life style
314 of bacteria remains an arduous task (Lebeaux et al., 2013). The results obtained in biofilm models
315 might largely vary, depending on strain, antibiotic, medium used, and many other experimental
316 conditions (Macia et al., 2014). Moreover, the *P. aeruginosa* metabolism depends on numerous,
317 highly regulated pathways. Thus, a complete transcriptomic profile would have been more
318 informative. Unfortunately, and like other authors (Jahns et al., 2016), despite repeated attempts
319 we were not able to extract enough RNA to perform RNAseq analysis.

320 In summary, the current study demonstrated that ciprofloxacin may be responsible of initial
321 bacterial killing and disruption of the biofilm matrix. But, concurrently, ciprofloxacin might rapidly
322 induce an activation of stringent response, a switch towards reduced cell activity and dormancy,
323 finally driving to antibiotic recalcitrance. Even if this study still does not provide a definitive
324 mechanistic explanation for the biofilm-related tolerance to antibiotics, it might contribute to a
325 better understanding of the bacterial phenotypic switch towards persistence during biofilm-related
326 infections.

327

328

329 **Transparency declarations:** None

330

331

332 **Author contributions:** AS, ME and SC designed the study. AS, VR, EB and MB performed the
333 experiments. AS, ME, EB and SC analysed the data. AS and ME wrote the manuscript. FC
334 reviewed the manuscript and figures. All authors amended and approved the final version of the
335 manuscript.

336

337

338 **Funding:** This study was supported by internal funding and carried out as part of our routine work.

339

340

341 **References:**

- 342 Amato, S. M., Fazen, C. H., Henry, T. C., Mok, W. W. K., Orman, M. A., Sandvik, E. L., et al.
343 (2014). The role of metabolism in bacterial persistence. *Front Microbiol* 5.
344 doi:10.3389/fmicb.2014.00070.
- 345 Anderl, J. N., Franklin, M. J., and Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation
346 in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents*
347 *Chemother.* 44, 1818–1824. doi:10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000.
- 348 Andersson, D. I., and Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of
349 antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12, 465–478. doi:10.1038/nrmicro3270.
- 350 Balaban, N. Q. (2004). Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* 305, 1622–1625.
351 doi:10.1126/science.1099390.
- 352 Benthall, G., Touzel, R. E., Hind, C. K., Titball, R. W., Sutton, J. M., Thomas, R. J., et al. (2015).
353 Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of
354 *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob*
355 *Agents* 46, 538–545. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.014.
- 356 Ciofu, O., and Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*
357 Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol*
358 10, 913. doi:10.3389/fmicb.2019.00913.
- 359 Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C. L., et
360 al. (2011). The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm
361 Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 7, e1001264.
362 doi:10.1371/journal.ppat.1001264.
- 363 Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause
364 of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- 365 Diaz, M. H., and Hauser, A. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU Is Injected
366 into Phagocytic Cells during Acute Pneumonia. *Infect Immun* 78, 1447–1456.
367 doi:10.1128/IAI.01134-09.
- 368 Díez-Aguilar, M., Morosini, M. I., Tedim, A. P., Rodríguez, I., Aktaş, Z., and Cantón, R. (2015).
369 Antimicrobial Activity of Fosfomycin-Tobramycin Combination against *Pseudomonas*
370 *aeruginosa* Isolates Assessed by Time-Kill Assays and Mutant Prevention Concentrations.
371 *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6039–6045. doi:10.1128/AAC.00822-15.
- 372 Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin.*
373 *Infect. Dis.* 33, 1387–1392. doi:10.1086/322972.
- 374 Fajardo, A., and Martínez, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial
375 responses. *Curr Opin Microbiol* 11, 161–167. doi:10.1016/j.mib.2008.02.006.
- 376 Guo, Y., Sun, C., Li, Y., Tang, K., Ni, S., and Wang, X. (2019). Antitoxin HigA inhibits
377 virulence gene *mvfR* expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.*
378 doi:10.1111/1462-2920.14595.
- 379 Guyard-Nicodème, M., Bazire, A., Hémerly, G., Meylheuc, T., Mollé, D., Orange, N., et al.
380 (2008). Outer membrane modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to
381 hyperosmolarity. *J. Proteome Res.* 7, 1218–1225. doi:10.1021/pr070539x.
- 382 Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during
383 stress and antibiotic exposure. *Science* 354, aaf4268. doi:10.1126/science.aaf4268.
- 384 Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., et al. (2015).
385 ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol*
386 *Infect* 21, S1–S25. doi:10.1016/j.cmi.2014.10.024.

387 Jahns, A. C., Eilers, H., and Alexeyev, O. A. (2016). Transcriptomic analysis of
388 *Propionibacterium acnes* biofilms *in vitro*. *Anaerobe* 42, 111–118.
389 doi:10.1016/j.anaerobe.2016.10.001.

390 Jakubovics, N. S., Shields, R. C., Rajarajan, N., and Burgess, J. G. (2013). Life after death: the
391 critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol* 57, 467–475.
392 doi:10.1111/lam.12134.

393 Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., et al.
394 (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the
395 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci* 112, 11353–11358.
396 doi:10.1073/pnas.1503058112.

397 Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., and Beloin, C. (2013). From *in vitro* to *in vivo* Models
398 of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2, 288–356. doi:10.3390/pathogens2020288.

399 Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap
400 between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics.
401 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543. doi:10.1128/MMBR.00013-14.

402 Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
403 doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306.

404 Li, M., Long, Y., Liu, Y., Liu, Y., Chen, R., Shi, J., et al. (2016). HigB of *Pseudomonas*
405 *aeruginosa* Enhances Killing of Phagocytes by Up-Regulating the Type III Secretion System in
406 Ciprofloxacin Induced Persister Cells. *Front Cell Infect Microbiol* 6.
407 doi:10.3389/fcimb.2016.00125.

408 Limoli, D. H., Jones, C. J., and Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in
409 Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr* 3. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.

410 Macia, M. D., Rojo-Molinero, E., and Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in
411 biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 20, 981–990. doi:10.1111/1469-0691.12651.

412 Mah, T. F., and O’Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.
413 *Trends Microbiol.* 9, 34–39.

414 Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., and Gerdes, K. (2018). Retraction Notice to: (p)ppGpp
415 Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* 172,
416 1135. doi:10.1016/j.cell.2018.02.023.

417 Masadeh, M., Alzoubi, K., Ahmed, W., and Magaji, A. (2019). *In Vitro* Comparison of
418 Antibacterial and Antibiofilm Activities of Selected Fluoroquinolones against *Pseudomonas*
419 *aeruginosa* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 8, 12.
420 doi:10.3390/pathogens8010012.

421 Mensa, J., Barberán, J., Soriano, A., Llinares, P., Marco, F., Cantón, R., et al. (2018). Antibiotic
422 selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines
423 by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter* 31, 78–100.

424 Moradali, M. F., Ghods, S., and Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A
425 Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7.
426 doi:10.3389/fcimb.2017.00039.

427 Mulcahy, L. R., Burns, J. L., Lory, S., and Lewis, K. (2010). Emergence of *Pseudomonas*
428 *aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J.*
429 *Bacteriol.* 192, 6191–6199. doi:10.1128/JB.01651-09.

430 Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., and Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in
431 Disease. *Microb Ecol* 68, 1–12. doi:10.1007/s00248-013-0297-x.

432 Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., et al. (2011). Active
433 Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria.

434 *Science* 334, 982–986. doi:10.1126/science.1211037.

435 Otani, S., Hiramatsu, K., Hashinaga, K., Komiya, K., Umeki, K., Kishi, K., et al. (2018). Sub-
436 minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm
437 formation. *J Infect Chemother* 24, 428–433. doi:10.1016/j.jiac.2018.01.007.

438 Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K., and Tolker-Nielsen, T. (2008). Tolerance to the
439 antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically
440 active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 68, 223–240.
441 doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x.

442 Pawar, V., Komor, U., Kasnitz, N., Bielecki, P., Pils, M. C., Gocht, B., et al. (2015). *In Vivo*
443 Efficacy of Antimicrobials against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob*
444 *Agents Chemother* 59, 4974–4981. doi:10.1128/AAC.00194-15.

445 Peeters, E., Nelis, H. J., and Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for
446 quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72, 157–
447 165. doi:10.1016/j.mimet.2007.11.010.

448 Reffuveille, F., de la Fuente-Núñez, C., Mansour, S., and Hancock, R. E. W. (2014). A Broad-
449 Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms. *Antimicrob*
450 *Agents Chemother* 58, 5363–5371. doi:10.1128/AAC.03163-14.

451 Spoering, A. L., and Lewis, K. (2001). Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas*
452 *aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *J Bacteriol* 183, 6746–6751.
453 doi:10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001.

454 Stewart, P. S., Franklin, M. J., Williamson, K. S., Folsom, J. P., Boegli, L., and James, G. A.
455 (2015). Contribution of Stress Responses to Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*
456 Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 3838–3847. doi:10.1128/AAC.00433-15.

457 Viducic, D., Ono, T., Murakami, K., Susilowati, H., Kayama, S., Hirota, K., et al. (2006).
458 Functional analysis of *spoT*, *relA* and *dksA* genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas*
459 *aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiol. Immunol.* 50, 349–357.

460 Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., and Stewart, P. S. (2003). Contributions
461 of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of
462 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents*
463 *Chemother.* 47, 317–323.

464 Wanandy, S., Brouwer, N., Liu, Q., Mahon, A., Cork, S., Karuso, P., et al. (2005). Optimisation
465 of the fluorescein diacetate antibacterial assay. *J Microbiol Methods* 60, 21–30.
466 doi:10.1016/j.mimet.2004.08.010.




467 Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to
468 determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3,
469 163–175. doi:10.1038/nprot.2007.521.

470

471

472 **Figure 1. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis of *Pseudomonas aeruginosa***
473 **cells and β -polysaccharides in biofilm unexposed (A) or exposed to ciprofloxacin during 24**
474 **h (B).**

475 CLSM imaging: total cells in green and β -polysaccharides in blue after staining with Syto-9 and
476 white calcofluor

477 CLSM analyses:  total cells,  β -polysaccharides,  β -polysaccharides/total bacterial
478 density ratio




479 *p<0.05

480

481

482 **Figure 2. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis of *Pseudomonas aeruginosa***
483 **cells and extracellular DNA in biofilm unexposed (A) or exposed to ciprofloxacin during 24**
484 **h (B).**

485 CLSM imaging: total cells in green and extracellular DNA in red after staining with Syto-9 and
486 DDAO (1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone)

487 CLSM analyses:  total cells,  extracellular DNA,  extracellular DNA/total bacterial
488 density ratio

489 *p<0.05

490

491

492 **Figure 3. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis of live cells and dead cells in**
493 ***Pseudomonas aeruginosa* biofilm unexposed (A) or exposed to ciprofloxacin during 24 h (B).**

494 CLSM imaging: live cells in green and dead cells in red after staining with the Live/Dead BacLight
495 Bacterial Viability Kit[®]

496 CLSM analyses:  live cells,  dead cells,  live/dead ratio

497 *p<0.05

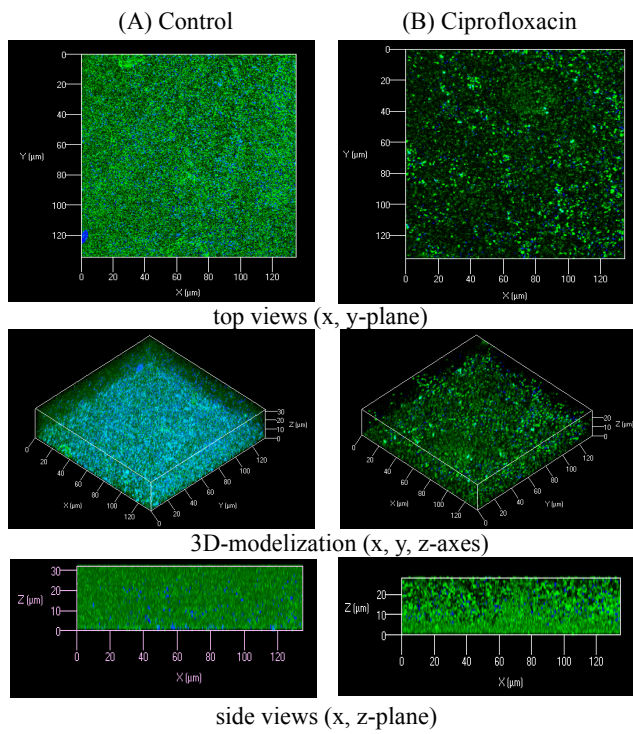
498

499

500 **Figure 4. Levels of expression of stringent response, toxin-antitoxin and type III secretion**
501 **system genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after 1 h and 4 h of ciprofloxacin exposure,**
502 **compared with unexposed biofilm**

503 Results represent the means from three independent experiments

CLSM imaging



CLSM analyses

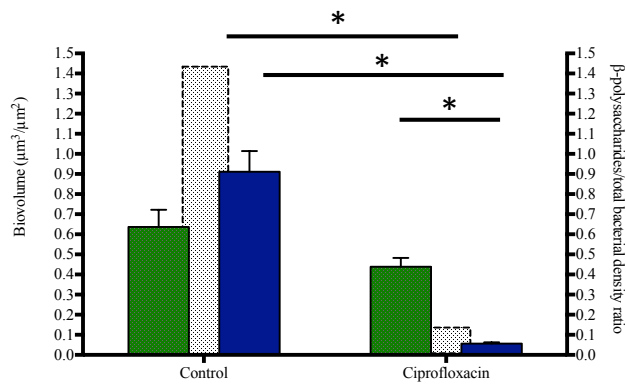
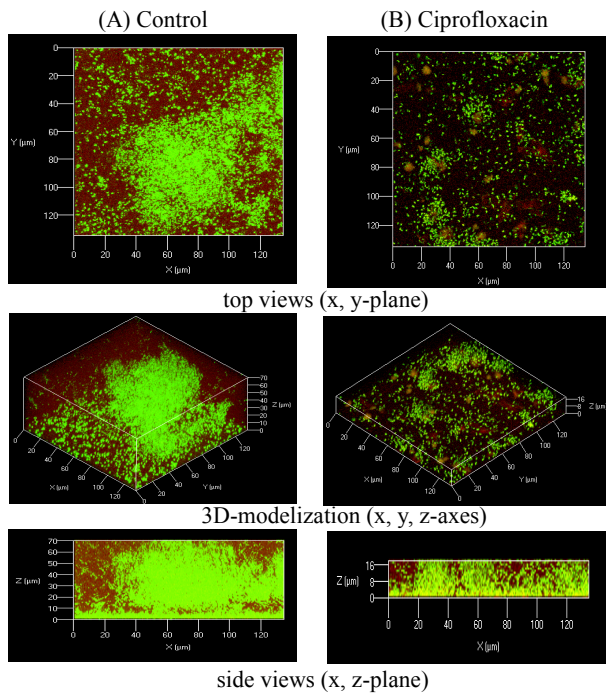


Figure 1.

CLSM imaging



CLSM analyses

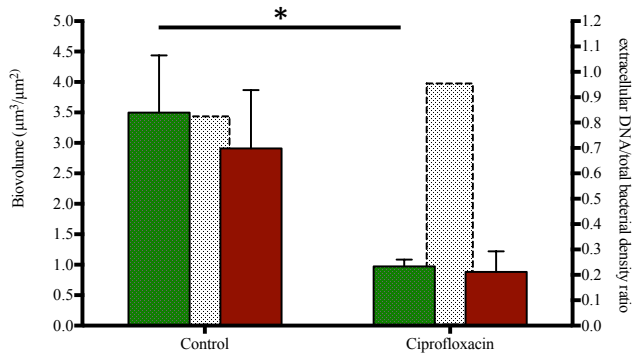
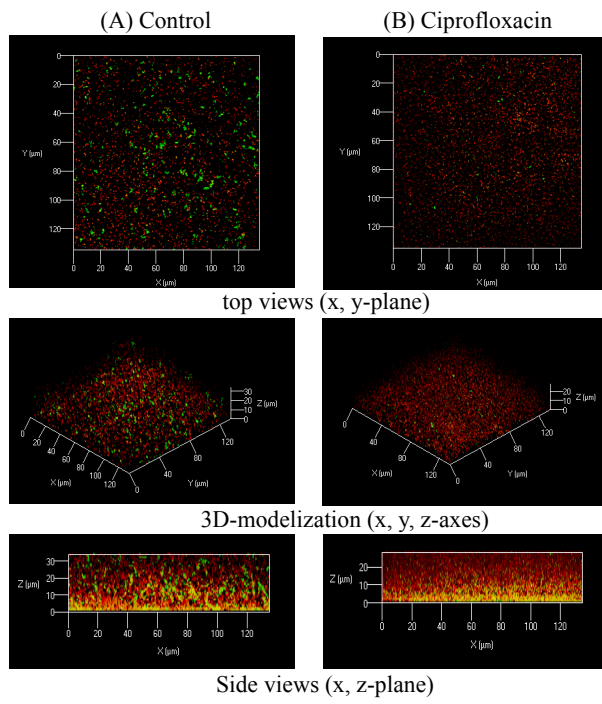


Figure 2.

CLSM imaging



CLSM analyses

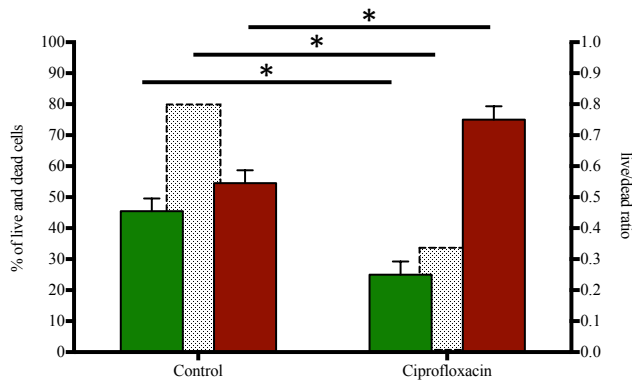


Figure 3.

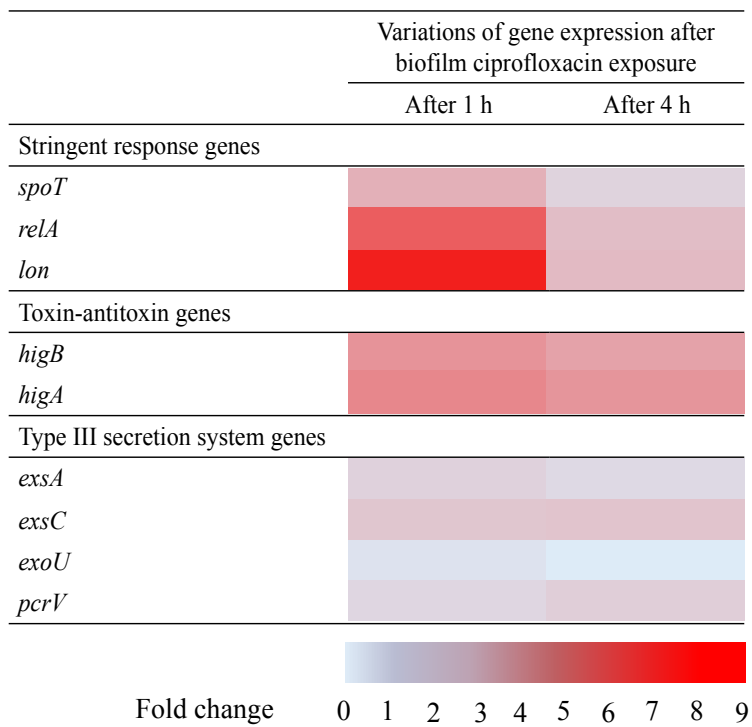


Figure 4.

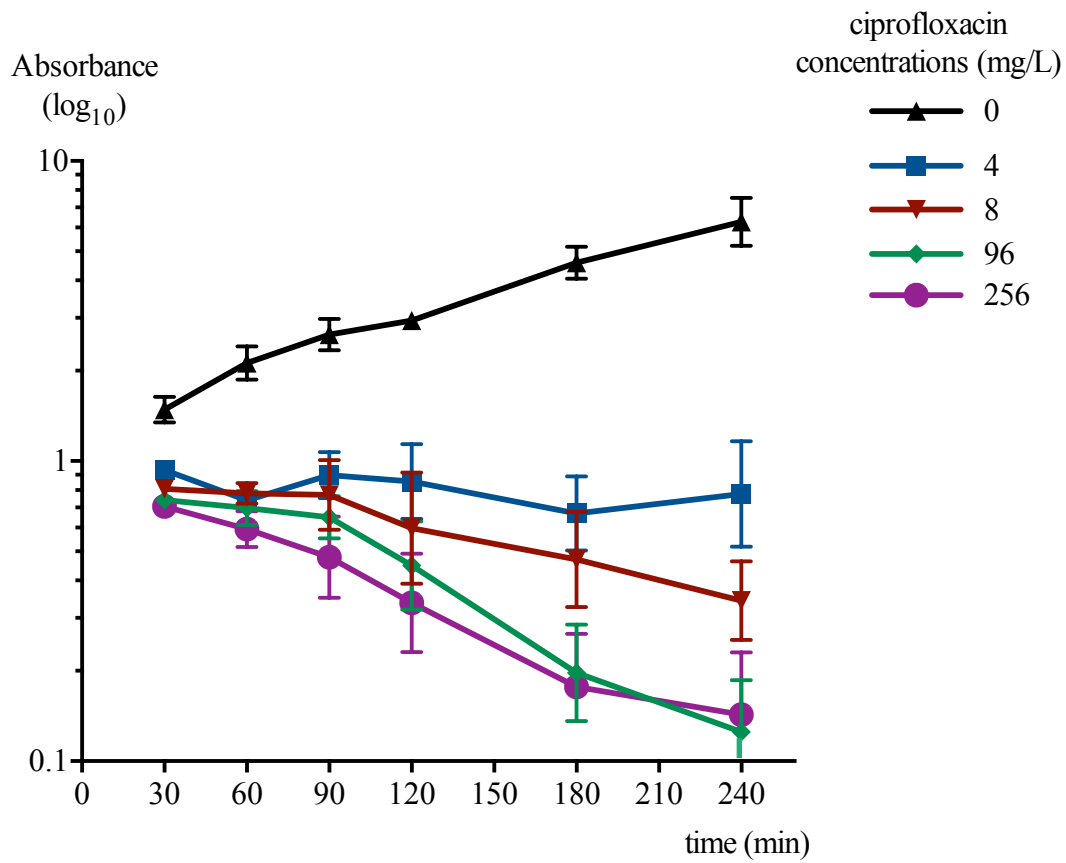


Figure S1. Fluorescein production over time in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, unexposed or exposed to ciprofloxacin
Error bars represent the standard deviation of the data set (n = 3)

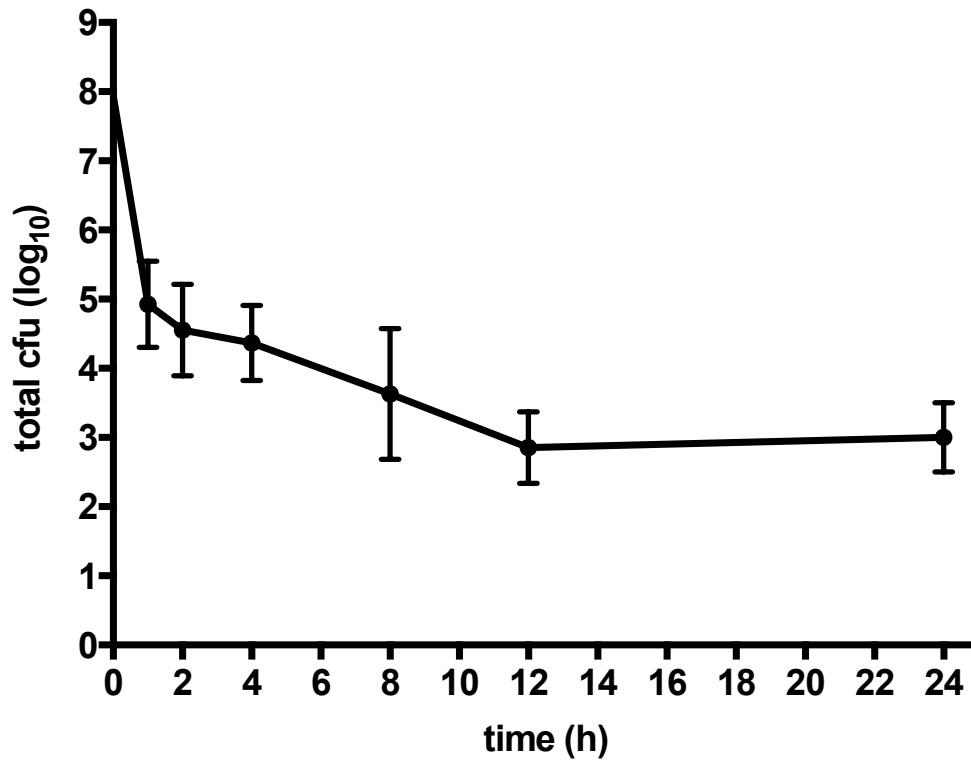


Figure S2. Biofilm time-kill curve with ciprofloxacin

The total cfu numbers (log₁₀) are the mean value for three different experiments.

1.3 Discussion

Dans ce travail, l'effet de la ciprofloxacine vis-à-vis de différents paramètres structurels et fonctionnels d'un biofilm consolidé de *P. aeruginosa* a été évalué. Une concentration présumée efficace de ciprofloxacine a été utilisée, compatible avec les concentrations atteintes en pratique clinique et permettant d'atteindre un rapport $AUC_{24h}/CMI >125$ usuellement considéré comme prédictif d'un succès thérapeutique (138, 139).

La quantification de l'activité cellulaire par FDA mettait en évidence une nette réduction de la viabilité cellulaire dès une exposition à 4 mg/L de ciprofloxacine, ce qui confortait l'utilisation de cette concentration de ciprofloxacine pour la suite des travaux.

Comme attendu, et avec une bonne reproductibilité par rapport aux résultats précédemment présentés, une réduction bactérienne majeure et rapide était obtenue, suivie par la survie de moins de 0,1% de la population bactérienne initiale dès 4 h d'exposition à 4 mg/L de ciprofloxacine. Là encore conformément à nos résultats antérieurs, aucun mutant résistant à la ciprofloxacine n'était isolé, l'ensemble des bactéries survivantes étant associé à une CMI de la ciprofloxacine inchangée de 0,125 mg/L. La population bactérienne survivante présentait donc les critères de persistance retenus dans la littérature (232).

Les analyses par microscopie confocale confortaient les résultats obtenus par culture des biofilms en ce qui concerne l'activité bactéricide initiale de la ciprofloxacine vis-à-vis des bactéries. Mais, de manière bien plus surprenante et, à notre connaissance encore jamais décrite, la ciprofloxacine altérait également significativement la structure de la matrice du biofilm : les biomasses constituées par les β -polysaccharides et l'ADNe, composants majeurs de l'environnement du biofilm, étaient significativement réduites et le biofilm était moins dense et moins structuré. La lyse des cellules bactériennes du biofilm est associée à une libération d'ADN (169). La réduction de la biomasse constituée par l'ADNe dans notre modèle de biofilm, après le traitement par ciprofloxacine qui entraînait une destruction de cellules vivantes, était donc inattendue, une augmentation de la biomasse composée par l'ADNe étant plutôt anticipée. Au sein du biofilm l'ADNe est lié aux exopolysaccharides (170), ainsi, la dégradation accrue des exopolysaccharides après exposition à la ciprofloxacine dans notre modèle pourrait empêcher que l'ADN libéré de la lyse des cellules bactériennes ne soit retenu au sein de la matrice et favoriser ainsi son élimination. Concernant l'effet de la ciprofloxacine sur les exopolysaccharides de la matrice, il pourrait s'agir d'une diminution de la production des exopolysaccharides par les cellules du biofilm.

Cependant, malgré la déstructuration considérable de la matrice du biofilm, facilitant probablement davantage la diffusion de la ciprofloxacine au sein des couches profondes du biofilm, des bactéries survivaient toujours. Au vu de ces résultats, « l'effet barrière » de la matrice extracellulaire, possiblement profondément altéré par la ciprofloxacine, ne permettait pas d'expliquer la persistance des bactéries au sein du biofilm après un traitement par ciprofloxacine.

La régulation du biofilm en réponse à un stress antibiotique semble impliquer de multiples voies de régulation, encore incomplètement décrites, et impliquant notamment la réponse stringente, la réponse SOS, et possiblement des systèmes TA (163, 276, 278). Dans notre travail, l'étude transcriptomique de certains déterminants de la persistance suggérait un ralentissement métabolique après exposition à la ciprofloxacine. L'expression génique en biofilm variait au cours de l'exposition à la ciprofloxacine. La surexpression des gènes de la réponse stringente était observée dès 1 h d'exposition antibiotique suggérant une activation très précoce des gènes de cette voie métabolique dont l'expression diminuait après 4 h d'exposition à la ciprofloxacine. L'activation très rapide des gènes *spoT* et *relA* favoriserait ainsi la synthèse de (p)ppGpp, second messenger impliqué dans la persistance en biofilm, pour aboutir à l'activation de la protéase Lon, qui pourrait jouer un rôle central vis-à-vis des systèmes TA.

Chez *P. aeruginosa* PA14, l'activation du système TA HigB/HigA a été décrite favorisant l'activité du SST3 et son action cytotoxique, après exposition à des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine pendant 30 min en culture planctonique (289). Dans notre modèle de biofilm, après une exposition à des concentrations létales de ciprofloxacine pendant 1 h et 4 h, les gènes *higB* et *higA* étaient tous deux surexprimés, à un niveau équivalent, tandis qu'aucune variation significative des gènes du SST3 n'était observée. Nos résultats suggèrent que l'antitoxine, pourrait ainsi continuer d'inhiber l'action de la toxine, comme à l'état de base, dans nos conditions d'expérimentation. Ainsi, soit la dégradation de HigA pourrait intervenir pour une exposition plus prolongée de ciprofloxacine soit la toxine HigB pourrait être peu impliquée dans la persistance en biofilm dans ce modèle. Le rôle du système TA HigB/HigA au sein du biofilm semblait ainsi encore incertain.

Le SST3, facteur de virulence majeur responsable de l'effet cytotoxique de *P. aeruginosa*, n'était exprimé ni après 1 h ni après 4 h d'exposition à la ciprofloxacine tandis que la réponse stringente, voie de régulation déterminante de la persistance bactérienne, était précocement activée après exposition à la ciprofloxacine. Néanmoins, l'expression des gènes de la réponse stringente diminuait après un traitement plus prolongé par ciprofloxacine nous laissant penser

que l'activation de la réponse stringente permettait d'initier le ralentissement métabolique des cellules qui pourraient se trouver ensuite dans un état de dormance.

Il a été choisi d'étudier le SST3 en raison de la description récente de son possible lien avec le système TA HigB/HigA dont le rôle dans la persistance en biofilm reste à élucider. De plus, le SST3 étant avant tout un facteur de virulence chez *P. aeruginosa*, il n'était pas attendu de surexpression dans les conditions de stress du mode de vie en biofilm, et encore moins dans les conditions de la persistance sous ciprofloxacine. Comme seules trois voies métaboliques ont pu être explorées, le SST3 permettait dans le même temps de valider l'augmentation sélective, en biofilm, de l'expression des autres voies métaboliques. Le nombre de gènes étudiés était en effet limité. Car si l'approche transcriptomique paraît intéressante pour l'analyse des processus dynamiques et réversibles qui ont lieu en biofilm, la forte réduction des concentrations bactériennes secondaire à l'exposition à des concentrations supra-CMI de ciprofloxacine limitait les quantités d'ARN qui pouvaient être extraites. Ainsi, dans notre travail et pour ces raisons techniques, il ne nous a pas été possible d'analyser ces mêmes voies de régulation pour des expositions plus prolongées de ciprofloxacine, ni d'explorer d'autres systèmes de régulations. Néanmoins, l'analyse de l'expression génique directement en biofilm, sans étape de subculture, permettait d'émettre des hypothèses quant au processus d'adaptation qui pourrait conduire à la persistance bactérienne en réponse à un stress antibiotique.

D'autres réserves peuvent être apportées aux résultats de ce travail. En effet, les marquages utilisés pour les analyses par microscopie confocale peuvent être aspécifiques, entraînant un bruit de fond important qui peut fausser la quantification des composants. Le DDAO, notamment, qui a été utilisé dans notre travail pour marquer l'ADNe, ne serait pas totalement spécifique et pourrait également se fixer sur l'ADN intracellulaire (300). Par ailleurs, la proportion de cellules altérées dans le biofilm avant exposition à la ciprofloxacine était relativement élevée. Cela peut être dû à plusieurs paramètres. Tout d'abord, il s'agissait dans notre modèle d'un biofilm mature au sein duquel il existait probablement un processus continu de renouvellement du biofilm générant des cellules mortes. Ensuite, l'iodure de propidium pourrait avoir une affinité plus importante que le Syto-9 pour l'ADN, et entraîner une légère surestimation de la proportion des cellules mortes (301). Enfin, le recours au marquage des bactéries nécessite des étapes de lavages pouvant conduire au détachement et à la perte d'une partie du biofilm.

Néanmoins, la synthèse de l'ensemble de ces résultats, obtenus par l'intermédiaire de tests *in vitro* fondamentalement différents, et cohérents entre eux, montre la capacité initiale

de la ciprofloxacine à agir sur différents paramètres d'un biofilm consolidé de *P. aeruginosa*. Malgré la déstructuration considérable de la matrice extracellulaire du biofilm après exposition à la ciprofloxacine, celle-ci ne permet pas à elle seule d'éradiquer le biofilm. Ces résultats continuent de conforter l'hypothèse de la persistance bactérienne en biofilm comme mécanisme prédominant d'échappement à la ciprofloxacine, en lien avec une activation de la réponse stringente. D'autres stratégies thérapeutiques doivent être envisagées. L'association de la ciprofloxacine à des molécules qui cibleraient la réponse stringente pourrait être une alternative intéressante.

2. Rôle de la diversité phénotypique en biofilm

2.1 Contexte

La majorité des revues de la littérature portant sur la population en biofilm évoque la préexistence d'une fraction de la population bactérienne génétiquement identique aux autres, mais capable d'évoluer sous pression environnementale vers des cellules persistantes. Il apparaît également que le métabolisme des bactéries en surface du biofilm diffère notablement de celui des cellules plus en profondeur. Ainsi, comme affirmé par Allison et *al.* (302), la population au sein d'un biofilm ne peut-elle être considérée comme une entité homogène mais plutôt comme un ensemble de sous-populations issues de différents mécanismes. Relativement pathognomoniques des populations bactériennes en biofilm, les SCV, observés à de multiples reprises dans nos travaux, représentent une de ces sous-populations bactériennes, identifiable en culture, et qui a parfois été incriminée, dans des travaux antérieurs portant sur d'autres espèces bactériennes, comme responsable de l'échec des traitements, sans que le lien entre SCV et persistance ne soit jamais fait. Dans une publication récente, Ciofu et Tolker-Nielsen (225) dressent un large panorama des mécanismes de tolérance et de résistance qui sont impliqués dans l'adaptation, la survie, et l'échappement de *P. aeruginosa* vis-à-vis des traitements antibiotiques en biofilm. Cependant, aucun élément de discussion sur la diversité phénotypique et plus spécifiquement sur la contribution éventuelle des SCV à la persistance et à l'échec des traitements antibiotiques en biofilm chez *P. aeruginosa* n'apparaît dans ce travail. A la lumière d'une analyse de la littérature, des observations menées lors de nos travaux précédemment présentés et de travaux non encore publiés, nous avons souhaité apporter un complément de discussion à la revue de la littérature de ces auteurs.

2.2 [Publication 3](#)

Commentary: Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents – how *P. aeruginosa* can escape antibiotics

Auteurs : Anaïs Soares, François Caron, Manuel Etienne

Accepté pour publication dans Frontiers in Microbiology



Commentary: Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics

Anaïs Soares^{1,2}, François Caron^{1,3} and Manuel Etienne^{1,3*}

¹ GRAM 2.0, EA 2656, Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen, France, ² Microbiology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France, ³ Infectious Diseases Department, Rouen University Hospital, Rouen, France

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, antibiotic failure, tolerance, resistance, phenotypic diversity, small colony variants

A Commentary on

Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics by Ciofu, O., and Tolker-Nielsen, T. (2019). *Front. Microbiol.* 10:913. doi: 10.3389/fmicb.2019.00913

In a recent article published in *Frontiers in Microbiology*, Ciofu and Tolker-Nielsen (2019), offered a comprehensive and didactic review on how *Pseudomonas aeruginosa* escapes antibiotic therapy in biofilms through tolerance and resistance mechanisms. Though their paper provided a wide panorama of the current knowledge in this field, we assume that the role of small colony variants (SCV) regarding antibiotic failure could have been discussed.

SCV are a phenotypic subset of the bacterial population surviving in biofilms. They have been described in chronic, persistent and recurrent biofilm-based infections, particularly in cystic fibrosis but also in chronic wound or device-related infections (Häussler et al., 2003; Proctor et al., 2006; Tielen et al., 2014; Johns et al., 2015). They were particularly well-described in *Staphylococcus aureus* (Proctor et al., 1995, 2006; von Eiff et al., 2006; Masoud-Landgraf et al., 2016), but were also identified in other species such as *Pseudomonas aeruginosa* (Häussler, 2004). *P. aeruginosa* SCV have a high biofilm-forming capacity and reduced swimming, swarming and twitching motilities (Déziel et al., 2001). They also have an increased expression of the *psl* and *pel* loci, encoding for Psl and Pel exopolysaccharides, that together with extracellular DNA form the biofilm matrix (Kirisits et al., 2005). Other studies reported that SCV emerged in biofilm cultures before any antibiotic exposure, and were not the sole bacterial population surviving antibiotic treatment (Déziel et al., 2001; Drenkard and Ausubel, 2002; Gloag et al., 2019). Because SCV constitute an adaptation of the parental strain to biofilm growth, contribute to biofilm production, and are encountered in situations where *P. aeruginosa* escapes antibiotics, their role in antibiotic failure through resistance mechanisms, tolerance mechanisms, or both can be questioned.

Recently, Balaban et al. (2019) recalled the definitions of antibiotic resistance and antibiotic tolerance in a consensus statement. Resistance is the ability of bacteria to replicate in the presence of antibiotic, whereas tolerance is the capability of a population to survive exposure to a bactericidal antibiotic without an increase in the MIC. The combination of both mechanisms in biofilms, has been named “recalcitrance” by Lebeaux et al. (2014).

OPEN ACCESS

Edited by:

Rustam Aminov,
University of Aberdeen,
United Kingdom

Reviewed by:

César de la Fuente,
Massachusetts Institute of
Technology, United States

*Correspondence:

Manuel Etienne
manuel.etienne@chu-rouen.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance and
Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 15 July 2019

Accepted: 03 September 2019

Published: xx September 2019

Citation:

Soares A, Caron F and Etienne M
(2019) Commentary: Tolerance and
Resistance of *Pseudomonas
aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial
Agents-How *P. aeruginosa* Can
Escape Antibiotics.
Front. Microbiol. 10:2164.
doi: 10.3389/fmicb.2019.02164

In specific situations, the biofilm growth might favor the selection of resistant mutants. As a fact, the exopolysaccharide matrix might reduce the diffusion in the deepest layers of the biofilm of some antibiotics such as aminoglycosides (Tseng et al., 2013). Bacterial cells entrapped into the matrix might hence be exposed to sub-inhibitory antibiotic concentrations, and resistant mutants might emerge (Kohanski et al., 2010; Jørgensen et al., 2013). In a study by Drenkard and Ausubel (2002), *P. aeruginosa* SCV with higher MICs toward aminoglycosides were recovered in sputum samples of cystic fibrosis patients treated with aminoglycoside-based antibiotic regimen. The mechanism of such increase in the MIC for SCV was not elucidated. As compared to the parent strain, the reduced susceptibility of SCV to aminoglycosides might result from increased interactions between positively charged aminoglycosides and negatively charged matrix components such as extracellular DNA (Chiang et al., 2013). But in this study as well as in others, the MICs increased only for aminoglycosides and not for fluoroquinolones or β -lactams (Singh et al., 2009; Wei et al., 2011).

However, the environmental conditions associated with biofilm growth (oxygen and nutrients limitations) mostly favor the expression of tolerance mechanisms (Walters et al., 2003; Borriello et al., 2004). Among the tolerant cells encountered in biofilms, persister cells are of particular interest (Lewis, 2010; Fauvart et al., 2011; Lebeaux et al., 2014). In various time-kill assays in *P. aeruginosa* biofilm models, a biphasic killing curve, the hallmark of persistence, was observed after antibiotic exposure (Mulcahy et al., 2010; Benthall et al., 2015; Rojo-Molinero et al., 2016). Despite prolonged exposure at high antibiotic doses, viable, and culturable cells were still present in the biofilm while no resistant mutant was detected. Using high doses of antibiotic known to diffuse in the depth of the biofilm, such as ciprofloxacin (Walters et al., 2003; Rodríguez-Martínez et al., 2007), it is likely that antibiotic concentrations rapidly exceeded the mutation prevention concentration, so that pre-existing spontaneous resistant mutants might be eradicated. Regarding tolerance, the role of SCV in biofilm has not been specifically studied even for *S. aureus*. Singh et al. (2009), in a membrane-supported biofilm model, observed the emergence of *S. aureus* SCV among persister cells after treatment with ciprofloxacin, but not after treatment with amikacin, cefotaxime,

oxacillin, or vancomycin. To what extent SCV contribute to biofilm persistence remains unelucidated.

From this analysis of the literature, we assume, in accordance with Ciofu and Tolker-Nielsen (2019) that resistance and tolerance mechanisms can both be expressed in biofilm infections. Those two ways for *P. aeruginosa* to escape antibiotics depend on different triggers. Sub-inhibitory antibiotic concentrations and active cell division favor the selection of genetically divergent resistant mutants. Conversely, lethal antibiotic concentrations trigger tolerance mechanisms, through a phenotypic adaptation, toward what could be called the “last hope bacterial response for survival” (Fajardo and Martínez, 2008; Andersson and Hughes, 2014). This phenotypic adaptation combines stress response activation depending on starvation strategies such as stringent response, SOS response or other metabolic pathways (Harms et al., 2016). SCV are part of these antibiotic-recalcitrant biofilm and for sure have specific metabolic characteristics, the increased exopolysaccharide matrix production being at the forefront (Harmsen et al., 2010; Moradali et al., 2017). Whether SCV behave differently than their parental strain regarding resistant mutants or persister cells emergence can to date not be ensured and needs further investigation. However, SCV might play a key role in the expression of persistence mechanisms, through their part in the biofilm structure, and may largely contribute to the environmental conditions associated with antibiotic recalcitrance.

In a daily practice, *P. aeruginosa* SCV can be detected on plate cultures. In most cases, they attest the presence of biofilm-related infection. SCV testing with usual antimicrobial susceptibility testing methods is also feasible, but little difference is expected regarding antimicrobial susceptibility between SCV and other bacterial populations entrapped in the biofilm. Nevertheless, informing clinicians of the presence of SCV seems crucial, as a signal that conditions are gathered for *P. aeruginosa* to escape antibiotics.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FC suggested the general commentary and reviewed the manuscript. AS and ME reviewed the literature and wrote the manuscript. All authors listed approved the work for publication.

REFERENCES

- Andersson, D. I., and Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465–478. doi: 10.1038/nrmicro3270
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., et al. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 441–448. doi: 10.1038/s41579-019-0196-3
- Benthall, G., Touzel, R. E., Hind, C. K., Titball, R. W., Sutton, J. M., Thomas, R. J., et al. (2015). Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 538–545. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.014
- Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A. M., Ehrlich, G. D., and Stewart, P. S. (2004). Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas*

- aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2659–2664. doi: 10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P. Ø., Høiby, N., Nielsen, T. E., Givskov, M., et al. (2013). Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2352–2361. doi: 10.1128/AAC.00001-13
- Ciofu, O., and Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Front. Microbiol.* 10:913. doi: 10.3389/fmicb.2019.00913
- Déziel, E., Comeau, Y., and Villemur, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* 183, 1195–1204. doi: 10.1128/JB.183.4.1195-1204.2001

- 229 Drenkard, E., and Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and
230 antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740–743.
231 doi: 10.1038/416740a
- 232 Fajardo, A., and Martínez, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger
233 specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 161–167.
234 doi: 10.1016/j.mib.2008.02.006
- 235 Fauvart, M., De Groot, V. N., and Michiels, J. (2011). Role of persister cells
236 in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister
237 therapies. *J. Med. Microbiol.* 60, 699–709. doi: 10.1099/jmm.0.030932-0
- 238 Gloag, E. S., Marshall, C. W., Snyder, D., Lewin, G. R., Harris, J. S., Santos-
239 Lopez, A., et al. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* interstrain dynamics and
240 selection of hyperbiofilm mutants during a chronic infection. *Mbio* 10:e01698-
241 19. doi: 10.1128/mBio.01698-19
- 242 Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial
243 persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354:aaf4268.
244 doi: 10.1126/science.aaf4268
- 245 Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J., and Tolker-Nielsen, T. (2010). An update
246 on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS*
247 *Immunol. Med. Microbiol.* 59, 253–268. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x
- 248 Häussler, S. (2004). Biofilm formation by the small colony variant
249 phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 6, 546–551.
250 doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00618.x
- 251 Häussler, S., Ziegler, I., Löttel, A., von Götz, F., Rohde, M., Wehmhöner,
252 D., et al. (2003). Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas*
253 *aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J. Med. Microbiol.* 52, 295–301.
254 doi: 10.1099/jmm.0.05069-0
- 255 Johns, B. E., Purdy, K. J., Tucker, N. P., and Maddocks, S. E. (2015). Phenotypic
256 and genotypic characteristics of small colony variants and their role in chronic
257 infection. *Microbiol. Insights* 8, 15–23. doi: 10.4137/MBI.S25800
- 258 Jørgensen, K. M., Wassermann, T., Jensen, P. Ø., Hengzuang, W., Molin, S., Høiby,
259 N., et al. (2013). Sublethal ciprofloxacin treatment leads to rapid development
260 of high-level ciprofloxacin resistance during long-term experimental evolution
261 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4215–4221.
262 doi: 10.1128/AAC.00493-13
- 263 Kirisits, M. J., Prost, L., Starkey, M., and Parsek, M. R. (2005).
264 Characterization of colony morphology variants isolated from
265 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4809–4821.
266 doi: 10.1128/AEM.71.8.4809-4821.2005
- 267 Kohanski, M. A., DePristo, M. A., and Collins, J. J. (2010). Sublethal antibiotic
268 treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol.*
269 *Cell* 37, 311–320. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.003
- 270 Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections:
271 bridging the gap between clinical management and fundamental aspects
272 of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543.
273 doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- 274 Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
275 doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
- 276 Masoud-Landgraf, L., Zarfel, G., Kaschnigg, T., Friedl, S., Feierl, G., Wagner-Eibel,
277 U., et al. (2016). Analysis and characterization of *Staphylococcus aureus* small
278 colony variants isolated from cystic fibrosis patients in Austria. *Curr. Microbiol.*
279 72, 606–611. doi: 10.1007/s00284-016-0994-z
- 280 Moradali, M. F., Ghods, S., and Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*
281 lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect.*
282 *Microbiol.* 7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039
- 283 Mulcahy, L. R., Burns, J. L., Lory, S., and Lewis, K. (2010). Emergence
284 of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister
285 cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 192, 6191–6199.
286 doi: 10.1128/JB.01651-09
- 287 Proctor, R. A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J. N., and Arbeit,
288 R. D. (1995). Persistent and relapsing infections associated with small-colony
289 variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc.*
290 *Am.* 20, 95–102. doi: 10.1093/clinids/20.1.95
- 291 Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann,
292 M., et al. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that
293 facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 295–305.
294 doi: 10.1038/nrmicro1384
- 295 Rodríguez-Martínez, J. M., Ballesta, S., and Pascual, A. (2007). Activity and
296 penetration of fosfomicin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-
297 trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J.*
298 *Antimicrob. Agents* 30, 366–368. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.05.005
- 299 Rojo-Moliner, E., Macià, M. D., Rubio, R., Moyà, B., Cabot, G., López-
300 Causapé, C., et al. (2016). Sequential treatment of biofilms with aztreonam
301 and tobramycin is a novel strategy for combating *Pseudomonas aeruginosa*
302 chronic respiratory infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2912–2922.
303 doi: 10.1128/AAC.00196-16
- 304 Singh, R., Ray, P., Das, A., and Sharma, M. (2009). Role of persisters and small-
305 colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated
306 *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. *J. Med. Microbiol.* 58, 1067–1073.
307 doi: 10.1099/jmm.0.009720-0
- 308 Tielen, P., Wibberg, D., Blom, J., Rosin, N., Meyer, A.-K., Bunk, B., et al. (2014).
309 Genome sequence of the small-colony variant *Pseudomonas aeruginosa* MH27,
310 isolated from a chronic urethral catheter infection. *Genome Announc.* 2:e01174-
311 13. doi: 10.1128/genomeA.01174-13
- 312 Tseng, B. S., Zhang, W., Harrison, J. J., Quach, T. P., Song, J. L.,
313 Penterman, J., et al. (2013). The extracellular matrix protects *Pseudomonas*
314 *aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin: limited
315 tobramycin penetration protects biofilms. *Environ. Microbiol.* :2865–2878.
316 doi: 10.1111/1462-2920.12155
- 317 von Eiff, C., Peters, G., and Becker, K. (2006). The small colony variant (SCV)
318 concept – the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*
319 37(Suppl. 2), S26–S33. doi: 10.1016/j.injury.2006.04.006
- 320 Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., and Stewart, P.
321 S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and
322 low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to
323 ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 317–323.
324 doi: 10.1128/AAC.47.1.317-323.2003
- 325 Wei, Q., Tarighi, S., Dötsch, A., Häussler, S., Müsken, M., Wright, V. J.,
326 et al. (2011). Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant
327 small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 6:e29276.
328 doi: 10.1371/journal.pone.0029276
- 329 **Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was
330 conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could
331 be construed as a potential conflict of interest.
- 332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342

2.3 Discussion

Des variations phénotypiques sont décrites dans des situations d'infections chroniques telles que les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections ostéo-articulaires persistantes, les surinfections de plaies chroniques ou encore les infections sur matériel (303–307).

Les SCV ont été davantage étudiés chez *S. aureus*. Pour *P. aeruginosa*, ces variants phénotypiques ont surtout été associés aux infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose, corrélés à une évolution clinique moins favorable (308). Le développement d'un biofilm pour *P. aeruginosa* pourrait favoriser l'émergence de SCV (260, 309) qui ne représenteraient pour autant pas la totalité de la population bactérienne survivant en biofilm (256).

Les caractéristiques phénotypiques des SCV sont bien décrites dans la littérature (310). Les dimensions des colonies sont réduites par rapport à la souche parentale initiale, et leur capacité à former un biofilm ainsi qu'à produire de la matrice exopolysaccharidique est accrue (255, 309). Starkey *et al.* (311) ont rapporté l'activation des gènes *pel* et *psl* codant pour les polysaccharides Pel et Psl, constitutifs de la matrice extracellulaire du biofilm de *P. aeruginosa*, pour les SCV. Dans l'étude de Kirisits *et al.* (260) les motilités de type swarming, swimming et twitching étaient également diminuées pour les SCV. Les motilités de type swarming et swimming sont associées aux flagelles qui interviennent dans les étapes précoces de formation du biofilm et notamment l'adhésion à la surface tandis que le twitching est lié aux pili de type IV qui ont un rôle dans l'adhésion irréversible et la formation de microcolonies (12, 174). Starkey *et al.* (311) ont décrit une sous-expression, pour les SCV, des gènes codant pour les pili et flagelles.

Dans un travail personnel dont les données ne sont pas encore publiées, des SCV et des colonies plus larges ont été isolés d'un biofilm *in vitro* de *P. aeruginosa* formé sur cathéter urinaire. La formation de biofilm et la production de matrice exopolysaccharidique des SCV étaient augmentées, et les trois types de motilité (swarming, swimming et twitching) étaient réduites par rapport à la souche parentale initiale et aux autres colonies isolées du biofilm. Compte-tenu des caractéristiques phénotypiques décrites, à la fois les larges colonies et les SCV participeraient ainsi à la constitution du biofilm, les larges colonies permettant la colonisation et l'adhésion à de nouvelles surfaces et les SCV contribuant sans doute pour une large part à la formation de la matrice extracellulaire du biofilm.

Dans notre modèle, les SCV étaient présent au sein du biofilm avant toute exposition antibiotique. La variation phénotypique semblait ainsi être davantage liée à l'adaptation des bactéries au mode de vie en biofilm plutôt qu'à la pression antibiotique.

Dans notre biofilm *in vitro* de *P. aeruginosa* sur cathéter urinaire qui était exposé à de fortes concentrations de ciprofloxacine, de 100 à 1000 fois la CMI de la ciprofloxacine pour la souche étudiée (0,125 mg/L), à nouveau, l'éradication de *P. aeruginosa* n'était pas obtenue et une population de cellules persistantes survivait, pour laquelle la CMI de la ciprofloxacine était inchangée. Parmi les cellules survivantes, la même dissociation de colonies en deux morphotypes, SCV et des colonies plus larges identiques à celles de la souche parentale PA14, était notée, avec des caractéristiques phénotypiques semblables à celles observées avant exposition antibiotique. Les CMI de la ciprofloxacine pour les SCV étaient également inchangées après exposition antibiotique. Dans des travaux antérieurs (308, 312), des augmentations de CMI pour les SCV étaient rapportées pour les aminosides tandis que les CMI des fluoroquinolones et de certaines β -lactamines n'étaient que peu modifiées. Comme discuté dans notre proposition de publication, une hypothèse pourrait donc être que la capacité de ces variants à former davantage de biofilm favoriserait les interactions entre des composés de la matrice du biofilm chargés négativement (comme l'ADNe) et les aminosides chargés positivement, limitant ainsi leur action. Les SCV participeraient ainsi à l'échec des traitements en biofilm davantage du fait de leur capacité accrue à former du biofilm que d'une résistance antibiotique acquise à proprement parler. Ainsi, si les SCV font partie de la sous-population persistante en biofilm, l'échec des traitements en biofilm ne semble pas pouvoir être entièrement attribué aux seuls SCV.

Des analyses transcriptomiques ont été effectuées à partir des SCV isolés de biofilm dans des travaux précédents. Comme décrit plus haut, les gènes qui codent pour les exopolysaccharides Pel et Psl étaient surexprimés tandis que les gènes qui codent pour les flagelles étaient eux sous-exprimés (311). De façon plus surprenante, le SST3, ainsi que ses effecteurs étaient surexprimés dans le travail de Von Gotz *et al.* Cette surexpression était associée à une cytotoxicité accrue vis-à-vis des macrophages et une augmentation de la virulence dans un modèle *in vivo* d'infection respiratoire chez la souris (313). Ce résultat peut paraître étonnant dans la mesure où les SCV sont décrits pour être associés à des infections chroniques, persistantes et récurrentes ; situations dans lesquelles les voies métaboliques qui favorisent le ralentissement des activités cellulaires seraient plutôt activées au détriment des facteurs de virulence.

De nombreuses interrogations subsistent concernant la contribution des SCV dans l'échec des traitements antibiotiques en biofilm. Si les travaux s'accordent sur leur capacité accrue à former davantage de biofilm, moins de données existent concernant leurs mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux, leur activité métabolique, et leur rôle dans la résistance et la tolérance aux antibiotiques.

La population persistante est une entité hétérogène constituée de bactéries issues de différents mécanismes, en réponse aux stress environnementaux et antibiotiques en biofilm. Même si Ciofu et Tolker-Nielsen (225), ainsi que d'autres auteurs (40, 163, 276, 278), ont décrit de façon détaillée, dans des revues de la littérature, les mécanismes de résistance et de tolérance qui existent en biofilm pour permettre aux bactéries d'échapper aux traitements antibiotiques, des travaux expérimentaux, directement réalisés à partir du biofilm, manquent encore. Des études doivent en effet être menées sur un plus grand nombre de souches, dans divers modèles de biofilm standardisés, en réponse à plusieurs familles d'antibiotiques, s'intéressant à la fois à la population persistante dans son ensemble et aux différentes sous-populations afin de mieux décrire l'adaptation bactérienne en biofilm.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les progrès considérables réalisés au cours des dernières décennies n'ont pas encore permis le traitement efficace et conservateur des infections en biofilm, et notamment des infections de dispositifs médicaux. Le diagnostic des infections en biofilm reste difficile et peu adapté, les alternatives thérapeutiques peu nombreuses et les recommandations de prise en charge des infections en biofilm peu détaillées dans la littérature (84). L'objectif de nos travaux a donc été d'évaluer différentes stratégies thérapeutiques dans un modèle *in vitro* de biofilm de *P. aeruginosa*, et d'explorer les mécanismes de l'échec microbiologique de ces traitements en biofilm.

Nos travaux ont confirmé la complexité à traiter les infections en biofilm à *P. aeruginosa*. Malgré une exposition prolongée, à des antibiotiques diffusant largement en biofilm, bactéricides, utilisés seuls ou en association (simultanément ou de manière séquentielle), à des doses permettant d'atteindre des objectifs PK/PD optimaux, des bactéries survivaient toujours en biofilm. L'acquisition de résistance par mutation des cibles des antibiotiques ou par surexpression de mécanismes d'efflux ne semblait pas expliquer cet échec en biofilm.

La tolérance des bactéries qui se développe vis-à-vis des antibiotiques, en biofilm, est désormais bien admise (225). Les bactéries survivantes isolées dans notre modèle de biofilm *in vitro* après exposition antibiotique répondaient aux caractéristiques des cellules persistantes récemment rappelées par Balaban *et al.* (314): capables de survivre sans se multiplier malgré des concentrations d'antibiotiques létales en culture planctonique, représentant une faible proportion de la population bactérienne initiale (généralement moins de 0,1%), et pouvant se multiplier à nouveau après arrêt du traitement antibiotique.

L'environnement au sein d'un biofilm est dynamique, hétérogène et variable, dépendant des conditions environnementales. L'hétérogénéité physico-chimique au sein du biofilm contribue à l'hétérogénéité phénotypique et métabolique des populations bactériennes en biofilm. La coexistence de sous-populations issues de différents mécanismes au sein d'un biofilm est décrite dans la majorité des revues de la littérature. Néanmoins, les déterminants qui aboutissent à l'état de persistance de certaines sous-populations bactériennes du biofilm, tandis que d'autres seront rapidement tuées par un antibiotique bactéricide, restent incomplètement élucidés à l'heure actuelle, notamment pour *P. aeruginosa*. La capacité pour une bactérie d'évoluer vers un état de persistance fait l'objet de diverses hypothèses dans la

littérature : sélection génétique ou variations phénotypiques transitoires. Chez *E. coli*, deux mutations dans le gène *hipA* du système TA de type II HipA/HipB ont été identifiées et conduisaient à la formation d'un plus grand nombre de cellules persistantes après exposition antibiotique (283). Ce constat soutiendrait l'hypothèse que seule une fraction des populations bactériennes, dotée d'un équipement génétique spécifique, pourrait, sous l'influence d'un environnement hostile, activer des voies génétiques spécifiques, pour persister et survivre, les autres bactéries étant éradiquées. À l'inverse, chez *P. aeruginosa*, aucun support génétique spécifique associé à la persistance n'a jusqu'alors été mis en évidence. L'hypothèse serait alors que toutes les souches de *P. aeruginosa* aurait la capacité, sous l'effet d'une pression environnementale très particulière, d'évoluer vers des cellules persistantes. Ce sont alors les conditions environnementales qui seraient très spécifiquement à l'origine de l'activation des voies métaboliques de la persistance. Nos travaux semblent orienter davantage vers cette hypothèse, puisque le phénomène était observé pour des souches cliniques différentes, non spécifiquement sélectionnées pour leur capacité à persister. Les sous-populations répliquatives, actives métaboliquement, préférentiellement situées à la surface du biofilm, ou le long de canaux permettant la pénétration de l'oxygène et des nutriments, seraient alors éradiquées. Les sous-populations, génétiquement identiques, enchâssées plus profondément dans le biofilm, dont le métabolisme serait de ce fait différent, seraient réfractaires à l'activité antibiotique.

L'exposition antibiotique pourrait dès lors être un « révélateur », éradiquant les bactéries restées sensibles, et permettant alors d'isoler la sous-population persistante existant préalablement à l'exposition antibiotique. Nos travaux laissent à penser que l'exposition antibiotique est un facteur déterminant de l'exposition environnementale hostile qui pourrait amplifier les voies métaboliques de la persistance. L'activation précoce, dès 1 h d'exposition aux antibiotiques, de voies métaboliques spécifiques et tout particulièrement de la réponse stringente, soutient cette hypothèse.

L'exploration de voies métaboliques spécifiques, et leur cinétique au cours de l'exposition antibiotique a été réalisée par qRT-PCR directement à partir du biofilm, dans les conditions spécifiques de sélection de cellules persistantes et sans culture intermédiaire. Il s'agissait là d'une expérimentation qui a été jusqu'alors peu décrite dans la littérature pour des expositions à des concentrations antibiotiques supra-inhibitrices vis-à-vis de biofilms constitués. L'analyse transcriptomique paraît être un outil adapté à l'étude des populations persistantes en biofilm pour lesquelles les mécanismes mis en jeu semblent être dynamiques et réversibles. Dans nos travaux, les profils d'expression génique, en biofilm, après une

exposition à la ciprofloxacine, qui étaient en faveur d'une activation de la réponse stringente, variaient au cours de l'exposition à la ciprofloxacine. Il pourrait ainsi exister une expression temporelle des gènes en réponse à un stress antibiotique, qui, au-delà d'un seuil de pression antibiotique, pour une partie de la population bactérienne, pourrait favoriser le « switch phénotypique » permettant aux bactéries de survivre et de persister en présence de concentrations létales d'antibiotiques. L'étude de plusieurs mutants dans différents travaux ont montré qu'un certain nombre de gènes (tels que *rpoS*, *spoT*, *relA*, *dksA*, *algR*, *pilH*) et donc de multiples voies de régulation, seraient impliqués dans la persistance de *P. aeruginosa* (281, 315, 316).

Notre travail n'a malheureusement pu cibler qu'un nombre limité de voies potentiellement impliquées dans la persistance en biofilm. En effet, la forte réduction des concentrations bactériennes, secondaire à l'exposition à des concentrations supra-inhibitrices, limitait fortement les quantités d'ARN extraites et donc le nombre de gènes potentiellement analysés. Dans ce domaine, de nombreux efforts restent à fournir pour améliorer les procédés d'extraction de l'ARN en biofilm et envisager des analyses par RNA sequencing dans ces conditions de stress antibiotique, particulièrement exigeantes. Les méthodes de protéomique sont confrontées aux mêmes limites techniques lorsqu'il s'agit d'analyser la persistance en biofilm après exposition à des concentrations létales d'antibiotiques. Les techniques de séquençage haut débit qui se sont développées de façon exponentielle ces dernières années ne semblent pas être adaptées à l'étude de la tolérance en biofilm où les mécanismes d'échappement aux traitements antibiotiques semblent être versatiles et non liés à des modifications géniques.

L'approche transcriptomique, contribue à la compréhension des mécanismes qui se déroulent au sein du biofilm, mais, utilisée isolément, analyse le biofilm dans son ensemble, sans prendre en compte la diversité des populations au sein du biofilm, susceptibles d'avoir des profils d'expression génique radicalement différents. Des techniques permettant de prendre en compte l'hétérogénéité des populations dans le biofilm apporteraient sans doute des informations complémentaires précieuses, permettant de n'analyser qu'une fraction de la population en biofilm (populations en surface ou en profondeur du biofilm, populations actives métaboliquement ou non...). En l'absence de technique parfaitement adaptée à l'étude des traitements antibiotiques en biofilm, il paraît indispensable de confronter différentes techniques d'analyses, à la fois phénotypiques, moléculaires et microscopiques permettant ainsi d'obtenir des données complémentaires s'agissant d'un environnement variable et

hétérogène. L'apparition de nouvelles techniques, telles que la spectroscopie infra-rouge ou la PCR digitale, pourraient ouvrir de nouvelles perspectives dans l'étude du biofilm.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de recommandation thérapeutique spécifique concernant les modalités de traitement antibiotique des infections en biofilm. L'analyse de la littérature et de nos résultats, dans la grande limite de l'extrapolation à partir d'un unique modèle *in vitro* et d'un nombre limité de souches, permettent de suggérer quelques d'orientations. Dans les travaux de recherche, conditions de vie planctoniques et en biofilm sont schématiquement opposées, tandis qu'il existe probablement dans la pratique clinique un continuum entre une composante planctonique et une composante en biofilm au cours des infections de dispositifs médicaux. Le recours à une bithérapie paraît alors utile, à la phase initiale des infections à *P. aeruginosa*, afin notamment de limiter la sélection de mutants résistants, et notamment en probabiliste, tant que les profils de sensibilité aux antibiotiques des souches ne sont pas définis et donc la présence d'éventuels efflux ignorés. Dans un second temps, nous observions à la fois un épuisement de l'activité des antibiotiques au cours du temps en biofilm comme en témoignait les courbes de réduction bactérienne biphasiques et cela même avec des bithérapies d'antibiotiques, mais aussi une diminution importante de la biomasse constituée des exopolysaccharides et de l'ADNe après un traitement par ciprofloxacine. La poursuite par une monothérapie de ciprofloxacine pour le traitement d'une infection en biofilm à *P. aeruginosa*, limitant les effets toxiques liés à l'usage d'un second antibiotique tels que les aminosides, paraît dès lors théoriquement être une option envisageable, sans que cela occasionne de sélection de mutants résistants.

Pour autant, malgré l'optimisation de leur administration, la ciprofloxacine et plus largement l'ensemble des antibiotiques actuellement disponibles ne semblent pas permettre à eux seuls de traiter efficacement une infection constituée en biofilm à *P. aeruginosa*. Dans nos travaux, de manière inattendue, la ciprofloxacine induisait une altération de la matrice exopolysaccharidique, déstructurant le biofilm. Si un tel effet était reproductible, pour d'autres pathogènes, et d'autres biofilms, il pourrait contribuer à expliquer l'avantage à utiliser des fluoroquinolones pour le traitement de certaines infections de matériel étranger à bacille Gram négatif. Par cette altération de la structure du biofilm, il eut été possible d'espérer supprimer l'effet « barrière » du biofilm, que les conditions environnementales en soient modifiées, que les populations bactériennes survivantes adoptent de ce fait un mode de vie plus proche du mode de vie planctonique, et retrouvent ainsi un certain niveau de sensibilité aux antibiotiques. Pourtant, l'exposition secondairement à de la tobramycine n'améliorait pas l'efficacité du traitement. Il peut ainsi être suggéré que la première exposition antibiotique

pourrait favoriser l'adaptation des bactéries en biofilm, induire le ralentissement de l'activité cellulaire, et entraîner l'inhibition de plusieurs cibles antibiotiques telles que la synthèse des protéines, la réplication de l'ADN, pour finalement empêcher l'action des différentes familles d'antibiotiques. De ce fait, les pistes de recherche non antibiotiques, qui ciblent les voies métaboliques de la persistance en biofilm, semblent davantage prometteuses, potentiellement en association aux antibiotiques (317). Ainsi, dans l'étude de Reffuveille *et al.*, un peptide antimicrobien, qui agit en se liant au messenger secondaire (p)ppGpp et provoque sa dégradation (318), pouvait, en association avec la ciprofloxacine, à la fois inhiber la formation de biofilm et tuer les cellules vivantes au sein d'un biofilm organisé de *P. aeruginosa* (222). La complexité des systèmes de régulation de *P. aeruginosa* imposera sans doute encore de nombreuses étapes dans les processus de découverte et de validation de nouvelles thérapies anti-biofilm avant que puissent être laissés en place les dispositifs médicaux infectés, mais elle offre également de nombreuses pistes thérapeutiques.

CONCLUSION

L'analyse de la littérature et les travaux présentés dans ce mémoire incitent à accorder une place prépondérante à la persistance bactérienne comme mécanisme majeur de l'échappement aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en biofilm. Dans ce modèle, l'intérêt de la bithérapie d'antibiotiques au cours d'une infection en biofilm semblait limité à la prévention de l'émergence de mutants résistants dans la fraction planctonique de l'infection. Le traitement antibiotique, quelles qu'en soient les modalités étudiées, en mono- ou bithérapie, et que les souches expriment un efflux ou non, permettait la réduction des concentrations bactériennes en biofilm, mais pas l'éradication complète du biofilm. La ciprofloxacine, malgré un effet inattendu de déstructuration du biofilm, induisait des modifications métaboliques rendant les cellules survivantes tolérantes aux antibiotiques. L'activation précoce de la réponse stringente semblait être une des voies métaboliques impliquées dans l'induction de ce mécanisme de persistance. Si d'autres combinaisons et modalités d'administration des antibiotiques pourraient encore être évaluées, des pistes thérapeutiques ciblant sélectivement les voies de la persistance semblent plus prometteuses.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, Dowd SE. 2010. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care* 19:45–46, 48–50, 52–53.
2. Donlan RM. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 33:1387–1392.
3. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407:762–764.
4. Peleg AY, Hooper DC. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med* 362:1804–1813.
5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.
6. Álvarez-Lerma F, Olaechea-Astigarraga P, Palomar-Martínez M, Catalan M, Nuvials X, Gimeno R, Gracia-Arnillas MP, Seijas-Betolaza I. 2018. Invasive device-associated infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients: evolution over 10 years. *J Hosp Infect* 100:e204–e208.
7. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SEH, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. 2005. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 293:581–588.
8. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959–964.
9. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35:652–680.
10. Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. 2015. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care* 3.
11. Kerr KG, Snelling AM. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 73:338–344.
12. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7.
13. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K. 2013. A dynamic and intricate

regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* 41:1–20.

14. Gardner SE, Frantz RA, Doebbeling BN. 2001. The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 9:178–186.
15. Rafeeq MM, Murad HAS. 2017. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med* 15.
16. Farrell PM. 2008. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros* 7:450–453.
17. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2017 Annual Data Report. Bethesda, Maryland. ©2018 Cystic Fibrosis Foundation.
18. Haq IJ, Gray MA, Garnett JP, Ward C, Brodli M. 2016. Airway surface liquid homeostasis in cystic fibrosis: pathophysiology and therapeutic targets. *Thorax* 71:284–287.
19. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. 2003. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:918–951.
20. Parsek MR, Singh PK. 2003. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57:677–701.
21. Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N. 2005. Occurrence of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients Is Associated with the Oxidative Stress Caused by Chronic Lung Inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2276–2282.
22. Lee B, Schjerling CK, Kirkby N, Hoffmann N, Borup R, Molin S, Høiby N, Ciofu O. 2011. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates maintain the biofilm formation capacity and the gene expression profiles during the chronic lung infection of CF patients: biofilm formation and gene expression of CF *P. aeruginosa*. *APMIS* 119:263–274.
23. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 44:547–558.
24. Sousa A, Pereira M. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs – A Review. *Pathogens* 3:680–703.
25. Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2016. Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d'études démographiques (Ined) Paris, décembre 2017.
26. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. 2013. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2:288–356.
27. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13:560–578.

28. Stickler DJ. 2008. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol* 5:598–608.
29. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. 2009. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *J Infect Public Health* 2:101–111.
30. Bouza E, Burillo A, Muñoz P. 2002. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 8:265–274.
31. Jones GLL, Muller CT, O'Reilly M, Stickler DJ. 2006. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J Antimicrob Chemother* 57:266–272.
32. Zimmerli W. 2014. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med* 276:111–119.
33. Zimmerli W, Moser C. 2012. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:158–168.
34. Rodrigues LR. 2011. Inhibition of Bacterial Adhesion on Medical Devices, p. 351–367. *In* Linke, D, Goldman, A (eds.), *Bacterial Adhesion*. Springer Netherlands, Dordrecht.
35. Poelstra KA, Barekzi NA, Rediske AM, Felts AG, Slunt JB, Grainger DW. 2002. Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *J Biomed Mater Res* 60:206–215.
36. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. 2012. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds: Biofilms in wounds. *Wound Repair Regen* 20:647–657.
37. Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *J Mol Biol* 427:3628–3645.
38. Brown EM, Morris R, Stephenson TP. 1986. The efficacy and safety of ciprofloxacin in the treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. *J Antimicrob Chemother* 18 Suppl D:123–127.
39. Lamas Ferreiro JL, Álvarez Otero J, González González L, Novoa Lamazares L, Arca Blanco A, Bermúdez Sanjurjo JR, Rodríguez Conde I, Fernández Soneira M, de la Fuente Aguado J. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. *PloS One* 12:e0178178.
40. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 78:510–543.
41. Potera C. 1999. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 283:1837, 1839.
42. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R,

- Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK. 2014. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. *N Engl J Med* 370:1198-1208.
43. Lambert M-L, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, Agodi A, Frank U, Mertens K, Schumacher M, Wolkewitz M. 2011. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis* 11:30-38.
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018.
45. Raisin. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Réseau REA-Raisin, France, résultats 2016. *Santé publique France*, 2018, 69 p. Disponible sur: www.invs.santepubliquefrance.fr.
46. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O'Grady NP, Bartlett JG, Carratalà J, El Solh AA, Ewig S, Fey PD, File TM, Restrepo MI, Roberts JA, Waterer GW, Cruse P, Knight SL, Brozek JL. 2016. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 63:e61-e111.
47. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, Pitart C, Mensa J. 2013. Epidemiology and prognostic determinants of bacteraemic catheter-acquired urinary tract infection in a single institution from 1991 to 2010. *J Infect* 67:282-287.
48. Chitnis AS, Edwards JR, Ricks PM, Sievert DM, Fridkin SK, Gould CV. 2012. Device-Associated Infection Rates, Device Utilization, and Antimicrobial Resistance in Long-Term Acute Care Hospitals Reporting to the National Healthcare Safety Network, 2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 33:993-1000.
49. Maki DG, Tambyah PA. 2001. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis* 7:342-347.
50. Hsieh P, Lee MS, Hsu K, Chang Y, Shih H, Ueng SW. 2009. Gram-Negative Prosthetic Joint Infections: Risk Factors and Outcome of Treatment. *Clin Infect Dis* 49:1036-1043.
51. Lin T-I, Huang Y-F, Liu P-Y, Chou C-A, Chen Y-S, Chen Y-Y, Hsieh K-S, Chen Y-S. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* infective endocarditis in patients who do not use intravenous drugs: Analysis of risk factors and treatment outcomes. *J Microbiol Immunol Infect* 49:516-522.
52. Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 41:848-854.

53. Kang C-I, Kim S-H, Kim H-B, Park S-W, Choe Y-J, Oh M-D, Kim E-C, Choe K-W. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 37:745–751.
54. Hattemer A, Hauser A, Diaz M, Scheetz M, Shah N, Allen JP, Porhomayon J, El-Solh AA. 2013. Bacterial and Clinical Characteristics of Health Care- and Community-Acquired Bloodstream Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3969–3975.
55. Paulsson M, Granrot A, Ahl J, Tham J, Resman F, Riesbeck K, Månsson F. 2017. Antimicrobial combination treatment including ciprofloxacin decreased the mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:1187–1196.
56. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1306–1311.
57. Cheong HS, Kang C-I, Wi YM, Kim ES, Lee JS, Ko KS, Chung DR, Lee NY, Song J-H, Peck KR. 2008. Clinical Significance and Predictors of Community-Onset *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Am J Med* 121:709–714.
58. Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D. 2017. Results from a 13-Year Prospective Cohort Study Show Increased Mortality Associated with Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
59. Tumbarello M, De Pascale G, Trecarichi EM, Spanu T, Antonicelli F, Maviglia R, Pennisi MA, Bello G, Antonelli M. 2013. Clinical outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in intensive care unit patients. *Intensive Care Med* 39:682–692.
60. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA. 2006. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 3:225–231.
61. Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ, James GA, Stoodley P, Leaper D, Tachi M, Schultz G, Swanson T, Wolcott RD. 2017. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care* 26:20–25.
62. Kurtz SM, Lau E, Schmier J, Ong KL, Zhao K, Parvizi J. 2008. Infection Burden for Hip and Knee Arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty* 23:984–991.
63. Cataldo MA, Petrosillo N, Cipriani M, Cauda R, Tacconelli E. 2010. Prosthetic joint infection: Recent developments in diagnosis and management. *J Infect* 61:443–448.
64. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, Kollef MH, VAP Outcomes Scientific Advisory Group. 2002. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 122:2115–2121.

65. Chastre J, Fagon J-Y. 2002. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165:867–903.
66. Holá V, Ruzicka F, Horka M. 2010. Microbial diversity in biofilm infections of the urinary tract with the use of sonication techniques: Table 1. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:525–528.
67. Tenke P, Köves B, Nagy K, Hultgren SJ, Mendling W, Wullt B, Grabe M, Wagenlehner FME, Cek M, Pickard R, Botto H, Naber KG, Bjerklund Johansen TE. 2012. Update on biofilm infections in the urinary tract. *World J Urol* 30:51–57.
68. Société Française de Microbiologie. Dispositifs intra-vasculaires (cathéter, chambre implantable). In : *REMIC : Société Française de Microbiologie 6ème Ed ; 2018 : p.159-170.*
69. Bonkat G, Rieken M, Rentsch CA, Wyler S, Feike A, Schäfer J, Gasser T, Trampuz A, Bachmann A, Widmer AF. 2011. Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication. *World J Urol* 29:133–138.
70. Roux A-L, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Lortat-Jacob A, Herrmann J-L, Gaillard J-L, Rottman M. 2011. Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen. *Clin Microbiol Infect* 17:447–450.
71. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R. 2007. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 357:654–663.
72. Portillo ME, Salvadó M, Sorli L, Alier A, Martínez S, Trampuz A, Gómez J, Puig L, Horcajada JP. 2012. Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure. *J Infect* 65:541–548.
73. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Gomez Urena EO, Mandrekar JN, Osmon DR, Lough LE, Pritt BS, Steckelberg JM, Patel R. 2013. Rapid Molecular Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol* 51:2280–2287.
74. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, Wackym PA, Stoodley P, Post JC, Ehrlich GD, Kerschner JE. 2006. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 296:202–211.
75. Saiman L. 2004. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A:S367-369.
76. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4:295–305.
77. Penterman J, Nguyen D, Anderson E, Staudinger BJ, Greenberg EP, Lam JS, Singh PK. 2014. Rapid Evolution of Culture-Impaired Bacteria during Adaptation to Biofilm Growth. *Cell Rep* 6:293–300.

78. Marin M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcalá L, Gimeno M, Cercenado E, Sanchez-Somolinos M, Radice C, Bouza E. 2012. Role of Universal 16S rRNA Gene PCR and Sequencing in Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol* 50:583–589.
79. Bémer P, Léger J, Tandé D, Plouzeau C, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A, Lemarié C, Kempf M, Héry-Arnaud G, Bret L, Juvin ME, Giraudeau B, Corvec S, Burucoa C, the Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team. 2016. How Many Samples and How Many Culture Media To Diagnose a Prosthetic Joint Infection: a Clinical and Microbiological Prospective Multicenter Study. *J Clin Microbiol* 54:385–391.
80. Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Steckelberg JM, Uhl JR, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Osmon DR, Berbari EF, Mandrekar J, Patel R. 2012. Prosthetic Joint Infection Diagnosis Using Broad-Range PCR of Biofilms Dislodged from Knee and Hip Arthroplasty Surfaces Using Sonication. *J Clin Microbiol* 50:3501–3508.
81. Gilligan PH. 2006. Is there value in susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* causing chronic infection in patients with cystic fibrosis? *Expert Rev Anti Infect Ther* 4:711–715.
82. Rice LB. 2008. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis* 197:1079–1081.
83. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb Ecol* 68:1–12.
84. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Holá V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann AJ, Williams C. 2015. ESCMID * guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 21:S1–S25.
85. Mensa J, Barberán J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Cantón R, Bou G, González Del Castillo J, Maseda E, Azanza JR, Pasquau J, García-Vidal C, Reguera JM, Sousa D, Gómez J, Montejo M, Borges M, Torres A, Alvarez-Lerma F, Salavert M, Zaragoza R, Oliver A. 2018. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter* 31:78–100.
86. Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez F, Tubau F, Oliver A, Martínez-Martínez L, for the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2013. Effect of Adequate Single-Drug vs Combination Antimicrobial Therapy on Mortality in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: A Post Hoc Analysis of a Prospective Cohort. *Clin Infect Dis* 57:208–216.
87. Kim YJ, Jun YH, Kim YR, Park KG, Park YJ, Kang JY, Kim SI. 2014. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. *BMC Infect Dis* 14:161.

88. Vardakas KZ, Tansarli GS, Bliziotis IA, Falagas ME. 2013. β -Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus β -lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: A meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents* 41:301–310.
89. Hu Y, Li L, Li W, Xu H, He P, Yan X, Dai H. 2013. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: A meta-analysis of retrospective and prospective studies. *Int J Antimicrob Agents* 42:492–496.
90. Paul M, Leibovici L. 2013. Editorial Commentary: Combination Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Where Do We Stand? *Clin Infect Dis* 57:217–220.
91. Fantin B, Farinotti R, Thabaut A, Carbon C. 1994. Conditions for the emergence of resistance to ceftipime and ceftazidime in experimental endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 33:563–569.
92. Lora-Tamayo J, Murillo O, Bergen PJ, Nation RL, Poudyal A, Luo X, Yu HY, Ariza J, Li J. 2014. Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* dynamic biofilm model. *J Antimicrob Chemother* 69:2434–2442.
93. Gómez-Junyent J, Benavent E, Sierra Y, El Haj C, Soldevila L, Torrejón B, Rigo-Bonnin R, Tubau F, Ariza J, Murillo O. 2019. Efficacy of ceftolozane/tazobactam, alone and in combination with colistin, against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* biofilm pharmacodynamic model. *Int J Antimicrob Agents* 53:612–619.
94. Velez Perez AL, Schmidt-Malan SM, Kohner PC, Karau MJ, Greenwood-Quaintance KE, Patel R. 2016. *In vitro* activity of ceftolozane/tazobactam against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the planktonic and biofilm states. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85:356–359.
95. Bowler LL, Zhanel GG, Ball TB, Saward LL. 2012. Mature *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Prevail Compared to Young Biofilms in the Presence of Ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4976–4979.
96. Cantón R, Máiz L, Escibano A, Oliveira C, Oliver A, Asensio O, Gartner S, Roma E, Quintana-Gallego E, Salcedo A, Girón R, Barrio MI, Pastor MD, Prados C, Martínez-Martínez MT, Barberán J, Castón JJ, Martínez-Martínez L, Poveda JL, Vázquez C, de Gracia J, Solé A, en representación del Grupo Español de Consenso del Tratamiento Antimicrobiano en el Paciente con Fibrosis Quística. 2015. Spanish consensus on the prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* bronchial infections in cystic fibrosis patients. *Arch Bronconeumol* 51:140–150.
97. Mogayzel PJ, Naureckas ET, Robinson KA, Brady C, Guill M, Lahiri T, Lubsch L, Matsui J, Oermann CM, Ratjen F, Rosenfeld M, Simon RH, Hazle L, Sabadosa K, Marshall BC. 2014. Cystic Fibrosis Foundation Pulmonary Guideline. Pharmacologic Approaches to Prevention and Eradication of Initial *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Ann Am Thorac Soc* 11:1640–1650.
98. Shortridge D, Gales AC, Streit JM, Huband MD, Tsakris A, Jones RN. 2019. Geographic and

Temporal Patterns of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Over 20 Years From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. *Open Forum Infect Dis* 6:S63–S68.

99. Fabre D, Bressolle F, Gomeni R, Arich C, Lemesle F, Beziau H, Galtier M. 1991. Steady-state pharmacokinetics of ciprofloxacin in plasma from patients with nosocomial pneumonia: penetration of the bronchial mucosa. *Antimicrob Agents Chemother* 35:2521–2525.
100. Wise R, Honeybourne D. 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones in the respiratory tract. *Eur Respir J* 14:221–229.
101. Mise au point sur le bon usage des fluoroquinolones administrées par voie systémique chez l'adulte. Christian Chidiac pour le Groupe de Travail de la SPILF. 2015.
102. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47:317–323.
103. Legout L, Senneville E, Stern R, Yazdanpanah Y, Savage C, Roussel-Delvallez M, Rosele B, Migaud H, Mouton Y. 2006. Treatment of bone and joint infections caused by Gram-negative bacilli with a cefepime-fluoroquinolone combination. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 12:1030–1033.
104. Bernard L, Legout L, Zürcher-Pfund L, Stern R, Rohner P, Peter R, Assal M, Lew D, Hoffmeyer P, Uçkay I. 2010. Six weeks of antibiotic treatment is sufficient following surgery for septic arthroplasty. *J Infect* 61:125–132.
105. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a027029.
106. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8:423–435.
107. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2014. Stockholm: ECDC; 2015.
108. Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) : rapport d'activité 2017 / Annual Report 2017. www.onerba.org.
109. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43:727–737.
110. Poole K. 2005. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:479–487.
111. Vakulenko SB, Mobashery S. 2003. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clin Microbiol Rev* 16:430–450.
112. Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo J-D, Plesiat P. 2007. MexAB-OprM- and MexXY-Overproducing Mutants Are Very Prevalent among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* with

- Reduced Susceptibility to Ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1582–1583.
113. Hocquet D, Muller A, Blanc K, Plesiat P, Talon D, Monnet DL, Bertrand X. 2008. Relationship between Antibiotic Use and Incidence of MexXY-OprM Overproducers among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1173–1175.
114. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. 2004. Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1797–1802.
115. Westbrook-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrenner P, Nguyen LY, Shawar RM, Folger KR, Stover CK. 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2975–2983.
116. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plesiat P. 2003. MexXY-OprM Efflux Pump Is Necessary for Adaptive Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1371–1375.
117. Hancock RE. 1986. Intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 18:653–656.
118. Bryan LE, O'Hara K, Wong S. 1984. Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 26:250–255.
119. Parr TR, Bayer AS. 1988. Mechanisms of aminoglycoside resistance in variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated during treatment of experimental endocarditis in rabbits. *J Infect Dis* 158:1003–1010.
120. MacArthur RD, Lolans V, Zar FA, Jackson GG. 1984. Biphasic, Concentration-Dependent and Rate-Limited, Concentration-Independent Bacterial Killing by an Aminoglycoside Antibiotic. *J Infect Dis* 150:778–779.
121. Monogue ML, Nicolau DP. 2018. Antibacterial activity of ceftolozane/tazobactam alone and in combination with other antimicrobial agents against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 73:942–952.
122. Geller DE, Pitlick WH, Nardella PA, Tracewell WG, Ramsey BW. 2002. Pharmacokinetics and bioavailability of aerosolized tobramycin in cystic fibrosis. *Chest* 122:219–226.
123. Hooper DC. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 31 Suppl 2:S24–28.
124. de Lastours V, Fantin B. 2014. Résistance aux fluoroquinolones en 2013 : quel impact pour l'interniste ? *Rev Médecine Interne* 35:601–608.
125. Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. 2019. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *J Med Microbiol* 68:1–10.
126. Pasca MR, Dalla Valle C, De Jesus Lopes Ribeiro AL, Buroni S, Papaleo MC, Bazzini S,

- Udine C, Incandela ML, Daffara S, Fani R, Riccardi G, Marone P. 2012. Evaluation of Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistance Clinical Isolates. *Microb Drug Resist* 18:23–32.
127. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. 2005. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 25:290–295.
128. Higgins P. 2003. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 21:409–413.
129. Bruchmann S, Dötsch A, Nouri B, Chaberny IF, Häussler S. 2013. Quantitative Contributions of Target Alteration and Decreased Drug Accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* Fluoroquinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 57:1361–1368.
130. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. 2015. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 28:337–418.
131. Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretling B. 2003. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb Drug Resist* 9:323–328.
132. Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, Hasani A, Samadi Kafil H, Aghazadeh M, Sheikhalizadeh V. 2016. Contribution of mexAB-oprM and mexXY (-oprA) efflux operons in antibiotic resistance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tabriz, Iran. *Infect Genet Evol* 45:75–82.
133. Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P. 2011. Role of the MexEF-OprN Efflux System in Low-Level Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5676–5684.
134. Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B. 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 44:710–712.
135. Wong A, Kassen R. 2011. Parallel evolution and local differentiation in quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 157:937–944.
136. Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, Plesiat P. 2008. Resistance and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Overproducing the MexCD-OprJ Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2455–2462.
137. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS, Boyer E, Chamberland S, Lee VJ. 1999. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1340–1346.
138. Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A, Drusano GL. 2007. Antimicrobial Resistance: Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Antimicrobial Therapy: It's

Not Just for Mice Anymore. *Clin Infect Dis* 44:79–86.

139. Zelenitsky SA. 2003. Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. *J Antimicrob Chemother* 52:668–674.
140. Valencia EY, Esposito F, Spira B, Blázquez J, Galhardo RS. 2017. Ciprofloxacin-Mediated Mutagenesis Is Suppressed by Subinhibitory Concentrations of Amikacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
141. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1379–1382.
142. Le Thomas I, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plésiat P, Bingen E. 2001. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother* 48:553–555.
143. Jørgensen KM, Wassermann T, Jensen PØ, Hengzuang W, Molin S, Høiby N, Ciofu O. 2013. Sublethal Ciprofloxacin Treatment Leads to Rapid Development of High-Level Ciprofloxacin Resistance during Long-Term Experimental Evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4215–4221.
144. Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PFM. 2012. Microbiological Aetiology, Epidemiology, and Clinical Profile of Prosthetic Joint Infections: Are Current Antibiotic Prophylaxis Guidelines Effective? *Antimicrob Agents Chemother* 56:2386–2391.
145. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, Saint S, Schaeffer AJ, Tambayh PA, Tenke P, Nicolle LE. 2010. Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50:625–663.
146. Vascular Catheter Working Group of GTEIS/SEMICYUC, Lorente L, Martín MM, Vidal P, Rebollo S, Ostabal MI, Solé-Violán J. 2014. Should central venous catheter be systematically removed in patients with suspected catheter related infection? *Crit Care* 18.
147. Zanzwar S, Jain P, Gokarn A, Devadas SK, Punatar S, Khurana S, Bonda A, Pruthy R, Bhat V, Qureshi S, Khattry N. 2019. Antibiotic lock therapy for salvage of tunneled central venous catheters with catheter colonization and catheter-related bloodstream infection. *Transpl Infect Dis* 21:e13017.
148. Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE, Infectious Diseases Society of America, American College of Critical Care Medicine, Society for Healthcare Epidemiology of America. 2001. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 32:1249–1272.
149. Tumbarello M, De Pascale G, Trecarichi EM, De Martino S, Bello G, Maviglia R, Spanu T, Antonelli M. 2013. Effect of Aerosolized Colistin as Adjunctive Treatment on the Outcomes of

Microbiologically Documented Ventilator-Associated Pneumonia Caused by Colistin-Only Susceptible Gram-Negative Bacteria. *Chest* 144:1768-1775.

150. Kofteridis DP, Alexopoulou C, Valachis A, Maraki S, Dimopoulou D, Georgopoulos D, Samonis G. 2010. Aerosolized plus Intravenous Colistin versus Intravenous Colistin Alone for the Treatment of Ventilator-Associated Pneumonia: A Matched Case-Control Study. *Clin Infect Dis* 51:1238-1244.

151. Parvizi J, Saleh KJ, Ragland PS, Pour AE, Mont MA. 2008. Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement. *Acta Orthop* 79:335-341.

152. Singha P, Locklin J, Handa H. 2017. A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomater* 50:20-40.

153. Lebrun E, Tomic-Canic M, Kirsner RS. 2010. The role of surgical debridement in healing of diabetic foot ulcers: The role of surgical debridement in healing of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 18:433-438.

154. Assael BM, Pressler T, Bilton D, Fayon M, Fischer R, Chiron R, LaRosa M, Knoop C, McElvaney N, Lewis SA, Bresnik M, Montgomery AB, Oermann CM. 2013. Inhaled aztreonam lysine vs. inhaled tobramycin in cystic fibrosis: A comparative efficacy trial. *J Cyst Fibros* 12:130-140.

155. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Hoiby N. 2007. Azithromycin Blocks Quorum Sensing and Alginate Polymer Formation and Increases the Sensitivity to Serum and Stationary-Growth-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa* and Attenuates Chronic *P. aeruginosa* Lung Infection in Cftr / Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3677-3687.

156. Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA, Filloux A. 2018. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Opin Microbiol* 41:15-20.

157. Crousilles A, Maunders E, Bartlett S, Fan C, Ukor E-F, Abdelhamid Y, Baker Y, Floto A, Spring DR, Welch M. 2015. Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Future Microbiol* 10:1825-1836.

158. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *J Bacteriol* 184:1140-1154.

159. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860-864.

160. Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6:199-210.

161. Lenz AP, Williamson KS, Pitts B, Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Localized Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:4463-4471.

162. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. 2003. Involvement of bacterial

- migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Biofilm mushrooms with a twitch. *Mol Microbiol* 50:61–68.
163. Hall CW, Mah T-F. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 41:276–301.
164. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 68:223–240.
165. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. 2015. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr* 3.
166. Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:253–268.
167. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR. 2001. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *J Bacteriol* 183:5395–5401.
168. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59:1114–1128.
169. Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG. 2013. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol* 57:467–475.
170. Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ, Howell PL, Parsek MR. 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci* 112:11353–11358.
171. Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GCL, Parsek MR. 2011. The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 7:e1001264.
172. Friedman L, Kolter R. 2004. Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *J Bacteriol* 186:4457–4465.
173. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187–209.
174. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Givskov M, Whitchurch CB, Engel JN, Tolker-Nielsen T. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 10:2331–2343.
175. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487.

176. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. 2009. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. PLoS Pathog 5:e1000354.
177. Lee K, Yoon SS. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. J Microbiol Biotechnol 27:1053–1064.
178. Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, Kjelleberg S. 2009. Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. J Bacteriol 191:7333–7342.
179. Kaplan JB. 2010. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. J Dent Res 89:205–218.
180. Passos da Silva D, Schofield M, Parsek M, Tseng B. 2017. An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. Pathogens 6:51.
181. Parsek MR, Greenberg EP. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol 13:27–33.
182. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280:295–298.
183. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Høiby N, Kjelleberg S, Givskov M. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. Microbiol Read Engl 148:87–102.
184. Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC. 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev 32:38–55.
185. Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS, Greenberg EP. 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing: The *P. aeruginosa* RpoS regulon. Mol Microbiol 51:973–985.
186. Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, Miyata S, Lee DG, Neely AN, Hyodo M, Hayakawa Y, Ausubel FM, Lory S. 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. Proc Natl Acad Sci U S A 103:2839–2844.
187. Hickman JW, Harwood CS. 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. Mol Microbiol 69:376–389.
188. Valentini M, Filloux A. 2016. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. J Biol Chem 291:12547–12555.
189. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. Mol Microbiol 75:827–842.
190. Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in

Pseudomonas aeruginosa. Dev Cell 7:745–754.

191. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S, Filloux A. 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proc Natl Acad Sci U S A 103:171–176.
192. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods 72:157–165.
193. Tasse J, Cara A, Saglio M, Villet R, Laurent F. 2018. A steam-based method to investigate biofilm. Sci Rep 8.
194. Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo J-M, Beloin C. 2015. *In vitro* activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. J Antimicrob Chemother.
195. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. J Clin Microbiol 22:996–1006.
196. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis 15:305–311.
197. Lin S, Yang L, Chen G, Li B, Chen D, Li L, Xu Z. 2017. Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix. Microb Pathog 111:285–291.
198. Reichhardt C, Parsek MR. 2019. Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. Front Microbiol 10.
199. Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R. 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. J Microbiol Methods 82:64–70.
200. Chen M-Y, Lee D-J, Tay J-H, Show K-Y. 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. Appl Microbiol Biotechnol 75:467–474.
201. Schlafer S, Meyer RL. 2017. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. J Microbiol Methods 138:50–59.
202. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 37:1771–1776.
203. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. 2004. Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis. J Clin

Microbiol 42:1915–1922.

204. Macia MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. 2014. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 20:981–990.
205. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Jaulhac B, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. 2016. The BioFilm Ring Test: a Rapid Method for Routine Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation Kinetics. *J Clin Microbiol* 54:657–661.
206. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Jaulhac B, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. 2017. Tobramycin and Amikacin Delay Adhesion and Microcolony Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates. *Front Microbiol* 8:1289.
207. Tasse J, Croisier D, Badel-Berchoux S, Chavanet P, Bernardi T, Provot C, Laurent F. 2016. Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®. *Pathog Dis* 74.
208. Cao B, Christophersen L, Thomsen K, Sonderholm M, Bjarnsholt T, Jensen PO, Hoiby N, Moser C. 2015. Antibiotic penetration and bacterial killing in a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm model. *J Antimicrob Chemother*.
209. Van Laar TA, Chen T, You T, Leung KP. 2015. Sublethal Concentrations of Carbapenems Alter Cell Morphology and Genomic Expression of *Klebsiella pneumoniae* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1707–1717.
210. Ahmed MN, Porse A, Sommer MOA, Høiby N, Ciofu O. 2018. Evolution of Antibiotic Resistance in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa* Populations Exposed to Subinhibitory Levels of Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
211. Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193.
212. Cole SJ, Records AR, Orr MW, Linden SB, Lee VT. 2014. Catheter-Associated Urinary Tract Infection by *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Exopolysaccharide-Independent Biofilms. *Infect Immun* 82:2048–2058.
213. Coenye T, Nelis HJ. 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 83:89–105.
214. Goeres DM, Hamilton MA, Beck NA, Buckingham-Meyer K, Hilyard JD, Loetterle LR, Lorenz LA, Walker DK, Stewart PS. 2009. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat Protoc* 4:783–788.
215. Goeres DM. 2005. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* 151:757–762.
216. Benthall G, Touzel RE, Hind CK, Titball RW, Sutton JM, Thomas RJ, Wand ME. 2015. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob Agents*

46:538–545.

217. Rojo-Molinero E, Macià MD, Rubio R, Moyà B, Cabot G, López-Causapé C, Pérez JL, Cantón R, Oliver A. 2016. Sequential Treatment of Biofilms with Aztreonam and Tobramycin Is a Novel Strategy for Combating *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Respiratory Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2912–2922.
218. Yu Q, Griffin EF, Moreau-Marquis S, Schwartzman JD, Stanton BA, O'Toole GA. 2012. *In vitro* evaluation of tobramycin and aztreonam versus *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived human airway epithelial cells. *J Antimicrob Chemother* 67:2673–2681.
219. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. 2004. Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2659–2664.
220. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1818–1824.
221. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* 192:6191–6199.
222. Reffuveille F, de la Fuente-Núñez C, Mansour S, Hancock REW. 2014. A Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5363–5371.
223. Macià MD, Pérez JL, Molin S, Oliver A. 2011. Dynamics of mutator and antibiotic-resistant populations in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5230–5237.
224. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, Lamas A, Baquero F, Cantón R. 2012. *In vitro* prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents* 40:173–176.
225. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. 2019. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol* 10:913.
226. Haagen J, Verotta D, Huang L, Engel J, Spormann AM, Yang K. 2017. Spatiotemporal pharmacodynamics of meropenem- and tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 72:3357–3365.
227. Wang X, Cai Y, Xing H, Wu W, Wang G, Li L, Chen J. 2016. Increased therapeutic efficacy of combination of azithromycin and ceftazidime on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. *BMC Microbiol* 16.
228. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Jakobsen TH, Phipps R, Nielsen AK, Rybtke MT, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Høiby N, Ciofu O, the Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. 2010.

Quorum Sensing and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during Lung Infection of Cystic Fibrosis Patients. PLoS ONE 5:e10115.

229. Vettoretti L, Plesiat P, Muller C, El Garch F, Phan G, Attree I, Ducruix A, Llanes C. 2009. Efflux Unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. Antimicrob Agents Chemother 53:1987–1997.
230. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Nat Rev Microbiol 14:320–330.
231. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 13:42–51.
232. Lewis K. 2010. Persister cells. Annu Rev Microbiol 64:357–372.
233. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, Singh PK, Chopp DL, Packman AI, Parsek MR. 2013. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin: Limited tobramycin penetration protects biofilms. Environ Microbiol.
234. Chiang W-C, Nilsson M, Jensen PØ, Høiby N, Nielsen TE, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2013. Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrob Agents Chemother 57:2352–2361.
235. Karaiskos I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. 2017. Colistin: still a lifesaver for the 21st century? Expert Opin Drug Metab Toxicol 13:59–71.
236. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. 2008. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS Pathog 4:e1000213.
237. McPhee JB, Lewenza S, Hancock REW. 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 50:205–217.
238. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. 2016. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 60:544–553.
239. Billings N, Ramirez Millan M, Caldara M, Rusconi R, Tarasova Y, Stocker R, Ribbeck K. 2013. The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS Pathog 9:e1003526.
240. Khan W, Bernier SP, Kuchma SL, Hammond JH, Hasan F, O'Toole GA. 2010. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide. Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol 13:207–212.
241. Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Hoiby N. 2004. Dynamics and Spatial Distribution of β -Lactamase Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrob Agents Chemother 48:1168–1174.

242. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG. 2001. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1761–1770.
243. Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. 2015. Contribution of Stress Responses to Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3838–3847.
244. Chiang W-C, Pamp SJ, Nilsson M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2012. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:245–256.
245. Werner E, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Heydorn A, Molin S, Pitts B, Stewart PS. 2004. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70:6188–6196.
246. Williamson KS, Richards LA, Perez-Osorio AC, Pitts B, McInnerney K, Stewart PS, Franklin MJ. 2012. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Includes Expression of Ribosome Hibernation Factors in the Antibiotic-Tolerant Subpopulation and Hypoxia-Induced Stress Response in the Metabolically Active Population. *J Bacteriol* 194:2062–2073.
247. Kolpen M, Appendorff CF, Brandt S, Mousavi N, Kragh KN, Aydogan S, Uppal HA, Bjarnsholt T, Ciofu O, Høiby N, Jensen PØ. 2016. Increased bactericidal activity of colistin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in anaerobic conditions. *Pathog Dis* 74:ftv086.
248. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. 2007. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* 130:797–810.
249. Jensen PØ, Briales A, Brochmann RP, Wang H, Kragh KN, Kolpen M, Hempel C, Bjarnsholt T, Høiby N, Ciofu O. 2014. Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathog Dis* 70:440–443.
250. Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, Riccardi G, Boon N, Nelis HJ, Mahenthalingam E, Coenye T. 2013. Biofilm-Grown *Burkholderia cepacia* Complex Cells Survive Antibiotic Treatment by Avoiding Production of Reactive Oxygen Species. *PLoS ONE* 8:e58943.
251. Amato SM, Fazen CH, Henry TC, Mok WWK, Orman MA, Sandvik EL, Volzing KG, Brynildsen MP. 2014. The role of metabolism in bacterial persistence. *Front Microbiol* 5.
252. Borriello G, Richards L, Ehrlich GD, Stewart PS. 2006. Arginine or Nitrate Enhances Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 50:382–384.
253. Hauryliuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. 2015. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 13:298–309.
254. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, McKay G, Siehnel R, Schafhauser J, Wang Y, Britigan BE, Singh PK. 2011. Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria. *Science* 334:982–986.

255. Häussler S, Ziegler I, Löttel A, von Götz F, Rohde M, Wehmhöhner D, Saravanamuthu S, Tümmler B, Steinmetz I. 2003. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* 52:295–301.
256. Drenkard E, Ausubel FM. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416:740–743.
257. Chuard C, Vaudaux PE, Proctor RA, Lew DP. 1997. Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. *J Antimicrob Chemother* 39:603–608.
258. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. 2009. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. *J Med Microbiol* 58:1067–1073.
259. Meissner A, Wild V, Simm R, Rohde M, Erck C, Bredenbruch F, Morr M, Römling U, Häussler S. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* *cupA*-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate. *Environ Microbiol* 9:2475–2485.
260. Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, Parsek MR. 2005. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 71:4809–4821.
261. Rodríguez-Rojas A, Oliver A, Blázquez J. 2012. Intrinsic and Environmental Mutagenesis Drive Diversification and Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections. *J Infect Dis* 205:121–127.
262. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3382–3386.
263. Oliver A. 2000. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science* 288:1251–1253.
264. Auerbach A, Kerem E, Assous MV, Picard E, Bar-Meir M. 2015. Is infection with hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* clinically significant? *J Cyst Fibros* 14:347–352.
265. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8487–8492.
266. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. 2008. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 61:1053–1056.
267. García-Castillo M, del Campo R, Baquero F, Morosini M -I., Turrientes M -C., Zamora J, Cantón R. 2011. Stationary biofilm growth normalizes mutation frequencies and mutant prevention concentrations in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol*

Infect 17:704–711.

268. Gonçalves FDA, de Carvalho CCCR. 2016. Phenotypic Modifications in *Staphylococcus aureus* Cells Exposed to High Concentrations of Vancomycin and Teicoplanin. *Front Microbiol* 7.
269. Ayrapetyan M, Williams TC, Baxter R, Oliver JD. 2015. Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. *Infect Immun* 83:4194–4203.
270. Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD. 2018. Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *J Bacteriol* 200.
271. Oliver JD. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34:415–425.
272. Bamford RA, Smith A, Metz J, Glover G, Titball RW, Pagliara S. 2017. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biol* 15.
273. Spoering AL, Lewis K. 2001. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *J Bacteriol* 183:6746–6751.
274. Bigger Joseph W. 1944. Treatment of *Staphylococcal* infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet* 244:497–500.
275. Fauvart M, De Groot VN, Michiels J. 2011. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol* 60:699–709.
276. Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. 2016. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354:aaf4268.
277. Balaban NQ. 2004. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science* 305:1622–1625.
278. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 15:453–464.
279. Michiels JE, Van den Bergh B, Verstraeten N, Fauvart M, Michiels J. 2016. *In Vitro* Emergence of High Persistence upon Periodic Aminoglycoside Challenge in the ESKAPE Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4630–4637.
280. Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin BR. 2005. Phenotypic Tolerance: Antibiotic Enrichment of Noninherited Resistance in Bacterial Populations. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1483–1494.
281. Viducic D, Ono T, Murakami K, Susilowati H, Kayama S, Hirota K, Miyake Y. 2006. Functional analysis of *spoT*, *relA* and *dksA* genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiol Immunol* 50:349–357.
282. Schumacher MA, Piro KM, Xu W, Hansen S, Lewis K, Brennan RG. 2009. Molecular Mechanisms of HipA-Mediated Multidrug Tolerance and Its Neutralization by HipB. *Science* 323:396–401.

283. Korch SB, Henderson TA, Hill TM. 2003. Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis: Persistence and (p)ppGpp synthesis in *E. coli*. *Mol Microbiol* 50:1199–1213.
284. Moyed HS, Bertrand KP. 1983. hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155:768–775.
285. Hansen S, Vulić M, Min J, Yen T-J, Schumacher MA, Brennan RG, Lewis K. 2012. Regulation of the *Escherichia coli* HipBA Toxin-Antitoxin System by Proteolysis. *PLoS ONE* 7:e39185.
286. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. 2013. RETRACTED: (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* 154:1140–1150.
287. Germain E, Roghianian M, Gerdes K, Maisonneuve E. 2015. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:5171–5176.
288. Harms A, Fino C, Sørensen MA, Semsey S, Gerdes K. 2017. Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells. *mBio* 8.
289. Li M, Long Y, Liu Y, Liu Y, Chen R, Shi J, Zhang L, Jin Y, Yang L, Bai F, Jin S, Cheng Z, Wu W. 2016. HigB of *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Killing of Phagocytes by Up-Regulating the Type III Secretion System in Ciprofloxacin Induced Persister Cells. *Front Cell Infect Microbiol* 6.
290. Dörr T, Lewis K, Vulić M. 2009. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5:e1000760.
291. Dörr T, Vulić M, Lewis K. 2010. Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8:e1000317.
292. Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, Valomon A, Soubigou G, Coppée J-Y, Ghigo J-M, Beloin C. 2013. Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin. *PLoS Genet* 9:e1003144.
293. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Colombo A, Guerra A, Gismondo MR. 2004. Activity of Levofloxacin and Ciprofloxacin in Combination with Cefepime, Ceftazidime, Imipenem, Piperacillin-Tazobactam and Amikacin against Different *Pseudomonas aeruginosa* Phenotypes and *Acinetobacter* spp. *Chemotherapy* 50:202–210.
294. Jaén N, Martínez-Pastor JC, Muñoz-Mahamud E, García-Ramiro S, Bosch J, Mensa J, Soriano A. 2012. Long-term outcome of acute prosthetic joint infections due to gram-negative bacilli treated with retention of prosthesis. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter* 25:194–198.
295. Singh R, Swick MC, Ledesma KR, Yang Z, Hu M, Zechiedrich L, Tam VH. 2012. Temporal Interplay between Efflux Pumps and Target Mutations in Development of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1680–1685.
296. Dupont P, Hocquet D, Jeannot K, Chavanet P, Plésiat P. 2005. Bacteriostatic and bactericidal

- activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 55:518–522.
297. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Tableaux des concentrations critiques pour l'interprétation des CMI et des diamètres d'inhibition. 2019 ; 39-47.
298. Pawar V, Komor U, Kasnitz N, Bielecki P, Pils MC, Gocht B, Moter A, Rohde M, Weiss S, Häussler S. 2015. *In Vivo* Efficacy of Antimicrobials against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 59:4974–4981.
299. Chung ES, Ko KS. 2019. Eradication of persister cells of *Acinetobacter baumannii* through combination of colistin and amikacin antibiotics. J Antimicrob Chemother.
300. Okshevsky M, Meyer RL. 2014. Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. J Microbiol Methods 105:102–104.
301. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q. 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. BMC Microbiol 15:36.
302. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. 2011. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. Curr Opin Microbiol 14:593–598.
303. Mowat E, Paterson S, Fothergill JL, Wright EA, Ledson MJ, Walshaw MJ, Brockhurst MA, Winstanley C. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. Am J Respir Crit Care Med 183:1674–1679.
304. Schneider M, Muhlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S. 2008. Clinical Characteristics Associated with Isolation of Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol 46:1832–1834.
305. Tielen P, Wibberg D, Blom J, Rosin N, Meyer A-K, Bunk B, Schobert M, Tüpker R, Schatschneider S, Rückert C, Albersmeier A, Goesmann A, Vorhölter F-J, Jahn D, Pühler A. 2014. Genome Sequence of the Small-Colony Variant *Pseudomonas aeruginosa* MH27, Isolated from a Chronic Urethral Catheter Infection. Genome Announc 2.
306. Abele-Horn M, Schupfner B, Emmerling P, Waldner H, Göring H. 2000. Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Infection 28:53–54.
307. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. 2006. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 43:961–967.
308. Häussler S, Tümmler B, Weissbrodt H, Rohde M, Steinmetz I. 1999. Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 29:621–625.
309. Déziel E, Comeau Y, Villemur R. 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* 183:1195–1204.
310. Evans TJ. 2015. Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic bacterial infection of the lung in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 10:231–239.
311. Starkey M, Hickman JH, Ma L, Zhang N, De Long S, Hinz A, Palacios S, Manoil C, Kirisits MJ, Starner TD, Wozniak DJ, Harwood CS, Parsek MR. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Rugose Small-Colony Variants Have Adaptations That Likely Promote Persistence in the Cystic Fibrosis Lung. *J Bacteriol* 191:3492–3503.
312. Wei Q, Tarighi S, Dötsch A, Häussler S, Müsken M, Wright VJ, Cámara M, Williams P, Haenen S, Boerjan B, Bogaerts A, Vierstraete E, Verleyen P, Schoofs L, Willaert R, De Groote VN, Michiels J, Vercammen K, Crabbé A, Cornelis P. 2011. Phenotypic and Genome-Wide Analysis of an Antibiotic-Resistant Small Colony Variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 6:e29276.
313. von Gotz F, Haussler S, Jordan D, Saravanamuthu SS, Wehmhoner D, Strussmann A, Lauber J, Attree I, Buer J, Tumbler B, Steinmetz I. 2004. Expression Analysis of a Highly Adherent and Cytotoxic Small Colony Variant of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Lung of a Patient with Cystic Fibrosis. *J Bacteriol* 186:3837–3847.
314. Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, Brynildsen MP, Bumann D, Camilli A, Collins JJ, Dehio C, Fortune S, Ghigo J-M, Hardt W-D, Harms A, Heinemann M, Hung DT, Jenal U, Levin BR, Michiels J, Storz G, Tan M-W, Tenson T, Van Melderen L, Zinkernagel A. 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol* 17:441–448.
315. De Groote VN, Verstraeten N, Fauvart M, Kint CI, Verbeeck AM, Beullens S, Cornelis P, Michiels J. 2009. Novel persistence genes in *Pseudomonas aeruginosa* identified by high-throughput screening. *FEMS Microbiol Lett* 297:73–79.
316. Murakami K, Ono T, Viducic D, Kayama S, Mori M, Hirota K, Nemoto K, Miyake Y. 2005. Role for *rpoS* gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiol Lett* 242:161–167.
317. Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE. 2016. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol* 33:35–40.
318. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock REW. 2014. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog* 10:e1004152.

Exploration de l'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* en biofilm : rôle dans l'échec des traitements antibiotiques

Résumé

Les infections en biofilm, notamment de dispositifs médicaux, mettent fréquemment en échec les traitements antibiotiques, imposant le retrait du matériel. *Pseudomonas aeruginosa* s'est imposé comme le pathogène-type des infections en biofilm. Pour explorer les déterminants de l'échec du traitement antibiotique en biofilm, un modèle de biofilm *in vitro* à *P. aeruginosa* exposé à des doses supra-inhibitrices d'antibiotiques a été développé. En culture planctonique, une bithérapie de ciprofloxacine et d'amikacine permettait de prévenir la sélection de mutants résistants pour des souches de *P. aeruginosa* de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine ou à l'amikacine par surexpression d'efflux. En biofilm, l'association de la ciprofloxacine et de l'amikacine, administrées simultanément ou séquentiellement, n'était pas supérieure aux monothérapies, permettant une réduction bactérienne, mais pas d'éradication complète du biofilm. Quelles que soient les souches (sauvages ou exprimant un efflux) et l'antibiotique, l'échec microbiologique en biofilm était lié à la sélection de cellules persistantes, tolérantes aux antibiotiques. La ciprofloxacine induisait des modifications importantes de la structure du biofilm avec une réduction considérable des exopolysaccharides, composants majeurs de la matrice. L'étude transcriptomique de gènes potentiellement impliqués dans la persistance suggérait que l'activation précoce de la réponse stringente pourrait être une des voies principales de la tolérance en biofilm sous ciprofloxacine. Enfin, la présence de « small colony variants » au sein du biofilm, dotés d'une capacité accrue de formation de biofilm, témoignait de la diversité des populations en biofilm. Ces travaux participent ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes d'échappement aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en biofilm.

Mots-clés : Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, ciprofloxacine, persistance, réponse stringente, small colony variants

Abstract

Biofilm device-related infections can lead to antibiotic failure requiring frequent removal of medical device. *Pseudomonas aeruginosa* has emerged as the typical pathogen for biofilm infections. To explore the determinants of antibiotic failure in biofilm, an *in vitro* *P. aeruginosa* biofilm model exposed to supra-inhibitory antibiotic concentrations was developed. In planktonic culture, the ciprofloxacin and amikacin combination prevented the selection of resistant mutants in ciprofloxacin and amikacin low-level resistant *P. aeruginosa* strains overexpressing efflux. In biofilm, the ciprofloxacin and amikacin combination, used simultaneously or sequentially, didn't show superior effects compared to monotherapies. Despite an initial bacterial reduction, biofilm eradication was not obtained. Regardless of wild-type or efflux strains and antibiotic regimen used, antibiotic failure was related to the selection of antibiotic-tolerant cells named "persisters". Ciprofloxacin induced significant alterations in the biofilm structure, notably a considerable reduction in the exopolysaccharides of the matrix. The transcriptomic analysis of genes, potentially involved in persistence, suggested that early activation of the stringent response might be one of the main pathways for ciprofloxacin tolerance in biofilm. Finally, the emergence of "small colony variants" within the biofilm, characterized by enhanced ability to form biofilm, attested to biofilm heterogeneity. This work therefore contributes to a better understanding of how *P. aeruginosa* biofilms escape antibiotic.

Key words: Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, ciprofloxacin, persistence, stringent response, small colony variants