



**HAL**  
open science

## La résistance des biofilms

Thierry Jouenne

► **To cite this version:**

| Thierry Jouenne. La résistance des biofilms. 2023, pp.15. <hal-04295053>

**HAL Id: hal-04295053**

**<https://hal.science/hal-04295053v1>**

Submitted on 27 Nov 2023

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.



HAL Authorization

# La résistance des biofilms



► Thierry Jouenne  
Laboratoire « Polymères,  
Biopolymères Surfaces »  
UMR CNRS 6270 Université  
de Rouen

## EN RÉSUMÉ

Les biofilms microbiens sont souvent très délétères du fait de leur exceptionnelle tolérance aux traitements, en particulier à l'antibiothérapie conventionnelle. Les processus impliqués dans cette faible efficacité des antimicrobiens sur les cellules adhérentes ont été largement étudiés ces dernières décennies. Il est aujourd'hui admis que cette tolérance des cellules sessiles est multiparamétrique. Elle implique différents mécanismes, physico-chimiques et biologiques. Une caractéristique majeure des microorganismes des biofilms est qu'ils sont soumis à des conditions environnementales très délétères qui induisent chez eux un grand nombre de mécanismes de réponse aux stress dont certains sont à l'évidence impliqués dans cette tolérance. Par contre, peu de systèmes de résistance spécifiquement exprimés par les cellules sessiles ont été décrits jusqu'à maintenant.

## Introduction

Il est bien connu que les infections à biofilm sont difficiles à éradiquer, les cellules adhérentes (bactéries et levures) présentant des augmentations de résistance aux agents antimicrobiens pouvant aller jusqu'à 200 [1, 2]. Ces biofilms sont ainsi la première cause des échecs des implantations des dispositifs médicaux qui engendrent une forte morbidité et mortalité [3]. Cette résistance est en fait plus une tolérance qu'une réelle résistance ; en effet, elle est essentiellement induite par une adaptation du microorganisme, phénotype réversible si celui-ci repasse en mode planctonique [4, 5]. La résistance, quant à elle, implique

généralement une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antimicrobien, due à un changement irréversible chez le microorganisme à travers une mutation, ou une résistance acquise via un transfert de gène horizontal.

La faible efficacité des antimicrobiens sur les biofilms est à l'évidence multiparamétrique [6] et implique à la fois une tolérance et une résistance des cellules adhérentes, en particulier du fait de la forte hétérogénéité de la physiologie des cellules au sein de ces structures [7].

## La Tolérance des biofilms aux inhibiteurs

Les mécanismes impliqués dans la tolérance des biofilms sont multiples [8, 9, 10] et incluent la faible diffusivité des antimicrobiens au sein de la matrice polymère [11], la moindre sensibilité à la phagocytose et autres mécanismes mis en place par le système immunitaire de l'hôte [12], le faible taux de croissance des microorganismes (dormance), des altérations du métabolisme, des gradients environnementaux au sein du biofilm et la présence de cellules « *persisters* » (Tableau 1).

### ■ La résistance diffusionnelle aux inhibiteurs

Par ses propriétés structurales et mécaniques, la gangue polymère constitue le premier rempart face aux agents antimicrobiens. Elle est constituée majoritairement d'eau, d'ions et d'ExoPolymèreS (EPS) aussi bien chez les biofilms fongiques [10] que bactériens [13]. Ces EPS sont essentiellement des exopolysaccharides, des lipides des protéines, mais aussi de l'ADN extracellulaire (eDNA). De par leurs propriétés

**Mots Clés :**  
*biofilm,*  
*résistance,*  
*antibiotique,*  
*mécanismes*

Tableau 1 :  
Principaux  
mécanismes  
impliqués dans  
la tolérance  
des biofilms  
fongiques et  
bactériens

Mécanisme impliqué	Effet	Références
Faible pénétration de l'inhibiteur	Diminution de la concentration locale en antimicrobien	[14, 15]
Faible taux de croissance	Réduction de l'efficacité de certains antimicrobiens (dormance)	[18, 19, 21]
Altération du métabolisme	Accumulation de protéines impliquées dans l'adaptation, modifications de cibles	[25]
Gradients d'oxygène	Réduction de l'efficacité de certains antimicrobiens (pénétration intracellulaire, dormance)	[29, 30, 31]
Présence de persisters	Réduction de l'efficacité de certains antimicrobiens (dormance)	[33, 34]
<i>Quorum sensing</i>	Activation de pompes d'efflux	[40]
Réponses aux stress	Résistance croisée aux inhibiteurs	[44]

physico-chimiques, les EPS jouent le rôle de barrière filtrante, soit par interaction avec le composé (du fait de la présence en leur sein de charges négatives), soit par piégeage. Des antibiotiques chargés positivement tels les aminosides se fixeront ainsi sur une matrice chargée négativement, ce qui limitera leur diffusion au sein du biofilm [14] alors que le chlore, couramment utilisé comme désinfectant, pénètre faiblement dans un biofilm mixte de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* [15]. Néanmoins, la limitation de la diffusion des inhibiteurs dans cette gangue ne peut pas expliquer à elle seule la formidable résistance des biofilms. Ainsi, par exemple, un antibiotique tel que la vancomycine, qui diffuse correctement au sein du biofilm, est tout aussi inefficace sur les bactéries sessiles [16].

#### ■ Un faible taux de croissance

Au sein des biofilms, existent aussi des microenvironnements correspondant à des zones carencées en nutriments, en oxygène ou présentant des valeurs locales de pH extrêmement basses [17]. De nombreuses études montrent que les microorganismes (levures [18] et bactéries [19]) affichent au sein des biofilms, un faible taux de croissance et un phénotype proche (mais différent [20]) des cellules en phase stationnaire de croissance [19]. Cette dormance explique partiellement l'inefficacité de certains antifongiques [18] et antibiotiques [19, 21] sur les cellules des biofilms.

#### ■ Altération du métabolisme

Il est aujourd'hui admis que le phénotype « biofilm » reflète des altérations de l'expression génique des cellules adhérentes conduisant à l'activation de certaines voies métaboliques, en particulier dans les zones profondes du biofilm alors que ces altérations sont plus faibles dans les régions plus périphériques [21, 22]. Ces modifications du métabolisme reflètent des adaptations des microorganismes aux conditions environnementales qu'ils rencontrent et expliquent certaines tolérances aux inhibiteurs. Ainsi les carences locales en certains acides aminés, comme la leucine, la cystéine et la lysine, ont été montrées comme responsable de la tolérance de biofilms d'*Escherichia coli* à l'ofloxacine [23]. Le développement des approches dites « post-génomiques », telles que la transcriptomique (consistant à identifier et à quantifier les ARNm exprimés) et la protéomique (consistant à identifier et à quantifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné), ont permis de dresser ces dernières années un inventaire des différences d'expression génique chez les bactéries organisées en biofilm et les bactéries en suspension [24, 25 et références citées].

Cependant, des différences significatives ont été observées au niveau quantitatif entre les approches protéomiques et transcriptomiques. Ainsi, alors que la protéomique suggère qu'un grand nombre de protéines sont différemment exprimées chez les bactéries des biofilms soit entre 15 et 50 % de modifications du protéome, les résultats obtenus par transcriptomique montrent qu'une faible proportion du génome (entre 1 et 15 %) présente des modifications significatives d'expression. Ces différences peuvent bien sûr s'expliquer par la faible corrélation

entre la quantité d'ARNm et de protéine, mais pourraient aussi indiquer l'existence de protéines clés qui ne seraient pas encore identifiées parce que modifiées qualitativement et non quantitativement, via des modifications post-traductionnelles comme les phosphorylations et/ou acétylations, par exemple [26]. Ainsi, Massier et al [27] ont montré des différences significatives dans les taux de phosphorylation des protéines extracellulaires chez des cellules d'*Acinetobacter baumannii* planctoniques et sessiles. Ces auteurs ont aussi mis en évidence que certains phosphosites étaient localisés

dans des régions clés de protéines impliquées dans la résistance aux antibiotiques, comme par exemple chez certaines bêta-lactamases [27].

#### ■ Gradients en oxygène

La tension en oxygène est faible dans certaines zones du biofilm bactérien situées en profondeur. Il a ainsi été montré que l'oxygène pénètre les 50 premiers microns des biofilms [28]. Ces zones carencées en oxygène contribuent à l'inefficacité de certains antibiotiques sur les biofilms [29, 30, 31]. Ces microenvironnements anaérobies impactent ainsi directement l'efficacité des aminosides dont le transport intracellulaire qui nécessite la présence d'une force protonotrice [32].

#### ■ Présence de cellules persistantes

Au sein des biofilms, on trouve également une forte proportion de cellules persistantes dites « *persisters* », correspondant à une sous-population de cellules dormantes, ne se divisant pas, et fortement adaptées pour résister à différents stress. On retrouve ces *persisters* aussi bien dans des biofilms bactériens [33] que fongiques [34]. Ces cellules représentent moins de 1 % de la population originale et leur génome est identique à celui de leurs congénères. Différents mécanismes sont impliqués dans leur formation [8 et références citées]. Le métabolisme ralenti de ces cellules les rend moins sensibles aux antibiotiques comparativement aux cellules en phase de croissance exponentielle voire stationnaire [35]. Ces cellules contribuent de façon significative à

AU SEIN DES  
BIOFILMS,  
ON TROUVE  
ÉGALEMENT  
UNE FORTE  
PROPORTION  
DE CELLULES  
PERSISTANTES  
DITES

« PERSISTERS »



la difficulté rencontrée pour éradiquer les infections à biofilm comme les infections urinaires et pulmonaires chroniques. Le biofilm constitue en fait une niche protectrice très favorable pour les persisters [36]. Lors de l'arrêt du traitement, la sortie de dormance de ces bactéries conduit à la reformation du biofilm et à la récurrence de l'infection [37].

Ces « persisters » diffèrent des « *small colony variants* » (SCVs) que l'on retrouve également en forte proportion au sein des biofilms bactériens [33]. Les SCVs sont des variants adaptés qui poussent difficilement sur les milieux de culture standard et qui produisent donc de très petites colonies. Les SCVs ont été impliqués dans la récurrence et la persistance des infections chroniques [33, 36] et présentent une plus grande capacité d'adhésion par rapport aux bactéries « sauvages » chez *Staphylococcus aureus* [33].

#### ■ **Quorum sensing**

Le *quorum sensing* (QS) est un système de communication entre microorganismes lié à la densité cellulaire. Il repose sur la synthèse et l'accumulation dans le milieu extracellulaire de petites molécules, appelées auto-inducteurs, jouant le rôle de phéromones. Le QS est fortement impliqué dans la formation et la dispersion des biofilms bactériens [38 et références citées] et fongiques [39 et références citées] mais moins dans leur résistance. Il a cependant été montré comme jouant un rôle dans la tolérance biofilm de *P. aeruginosa* à travers l'activation de pompes d'efflux [40]

#### ■ **Réponse au stress**

Il est connu que de nombreux stress environnementaux induisent chez les microorganismes une résistance aux antimicrobiens [41]. Les conditions environnementales défavorables prévalant au sein des biofilms vont engendrer d'importants stress sur les microorganismes. Il a été ainsi montré que de nombreux gènes impliqués dans la réponse aux stress étaient fortement sur-exprimés chez les bactéries [42] et levures [43] sessiles. Chez *Candida glabrata*, par exemple, la résistance des biofilms au stress oxydatif a été corrélée avec l'accumulation de protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif [44].

#### ■ **Surexpression des pompes d'efflux**

Les pompes d'efflux permettent aux cellules d'expulser les inhibiteurs hors de leur cytoplasme [45]. L'implication des pompes d'efflux dans la tolérance des microorganismes sessiles est relativement controversée. Ainsi, certains travaux ont mis en évidence aucune corrélation entre la tolérance des biofilms à *P. aeruginosa* et l'expression des pompes d'efflux [46, 47]. A l'inverse les travaux de Liao et al. suggèrent un possible lien entre l'expression des pompes d'efflux et la baisse de sensibilité des biofilms

de *P. aeruginosa* [48]. De même, la surexpression de pompes d'efflux a été décrite comme impliquée dans la tolérance de biofilms de *C. albicans* [8 et références citées]. Cependant cette implication pourrait être temporaire et ne pas concerner les biofilms matures [9], suggérant l'implication d'autres mécanismes.

#### ■ **Gènes et opérons spécifiquement impliqués dans la résistance des biofilms**

Peu de mécanismes de résistance spécifiquement mis en place par les bactéries adhérentes ont été décrits. Parmi ceux-ci, il a été mis en évidence chez *P. aeruginosa* la production et l'accumulation dans le périplasma des bactéries du biofilm, de petits polymères cycliques de sucre capables de piéger les aminosides [49]. La production de ces polymères est sous le contrôle du gène *ndvB* qui code une glucosyltransférase, et qui est spécifiquement sur-exprimé dès les premières minutes suivant l'adhésion des bactéries. Les protéines PAO756-PAO757 sont quant à elle les deux éléments du premier système à deux composants (TCS) décrit comme spécifiquement impliqué dans la résistance aux antibiotiques, en particulier la ciprofloxacine [50] alors que ces TCS étaient déjà fortement connus comme étant impliqués dans la formation du biofilm [51 et référence citées]. De même, toujours chez *P. aeruginosa*, il a été identifié un cluster de 4 gènes, dénommés *bac* pour *biofilm associated cluster*, codant des protéines de fonctions inconnues, qui est impliqué dans la formation du biofilm, la virulence mais également dans la résistance des bactéries sessiles à la tobramycine [52].

---

IL EST CONNU QUE DE NOMBREUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX INDUISENT CHEZ LES MICROORGANISMES UNE RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS

---

## CONCLUSION

La résistance des microorganismes des biofilms est à l'évidence complexe et multiparamétrique même si on peut considérer que l'existence de différents stress rencontrés par les cellules sessiles est un dénominateur commun. Les doses massives d'agents antimicrobiens qui seraient requises pour les éradiquer sont incompatibles avec l'exigence environnementale et la réalité médicale. La lutte contre les biofilms passe donc par de nouvelles stratégies de lutte antibactérienne. Parmi celles-ci, on peut citer la recherche de nouvelles molécules plus efficaces sur les bactéries adhérentes. Cette approche nécessite en amont de mieux connaître les mécanismes moléculaires spécifiquement mobilisés dans cette résistance, qui constitueraient de nouvelles cibles thérapeutiques.

**BIBLIOGRAPHIE**

[1] Naparstek L., Carmeli Y., Navon-Venezia S. et al. (2014) Biofilm formation and susceptibility to gentamycin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69, 1027-1034.

[2] Pereira R., Dos Santos Fontenelle R.O., de Brito E.H.S., de Morais S.M. (2021) Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol.*;131, 11-22.

[3] Singh A., Amod A., Pandey P. Pranay B. et al. (2022) Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. *Biomed Mater* 17, doi:10.1088/1748-605X/ac50f6.

[4] Lebeaux D., Ghigo J.M. (2012) Infections associées aux biofilms. Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Med/scie* 28 : 727-739.

[5] Mah T.-F. (2012) Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.*, 7, 1061-1072.

[6] Stewart P.S., Costerton J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138

[7] Mah T.F. (2012) Regulating antibiotic tolerance within biofilm microcolonies. *J. Bacteriol.* 194, 4791-4792.

[8] Ohlsen I. (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 877-886.

[9] Mathé L., Van Dijk P. (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr. Genet.* 59: 251-264.

[10] Kaur J., Nobile C.J. (2023) Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 71: 102237.

[11] Nickel J.C., Ruseska I., Wright J.B., Costerton J.W. (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:619-624.

[12] Hänsch G.M. (2012) Host defence against bacterial biofilms: "Mission impossible"? *ISRN Immunol.*, ID 853123, doi:10.5402/2012/853123.

[13] Branda S.S., Vilk A., Friedman L., Kolter R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13: 20-26.

[14] Meers P., Neville M., Malinin V., Scotto A.W., Sardaryan G. et al. (2008) Biofilm penetration, triggered release and *in vivo* activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 859-868.

[15] Stewart P.S., Rayner J., Roe F., Rees W.M. (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J. Appl. Microbiol.* 91: 525-532.

[16] Dunne W.M.Jr., Mason E.O., Kaplan S.L. (1993) Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2522-2526.

[17] De Beer D., Stoodley P., Lewandowski Z. (1997) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 151-158.

[18] Baillie G.S., Douglas L.J. (1998) Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1900-1905.

[19] Ander J.F., Zahler J., Roe F., Stewart P.S. (2003) Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1251-1256.

[20] Collet A., Cosette P., Beloin, C., Ghigo et al. (2008) Impact of *rpoS* deletion on the proteome of *Escherichia coli* grown as biofilm. *J. Prot. Res.* 7: 4659-4669.

[21] Walters M.C.3rd, Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J. et al. (2003) Contribution 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.

[22] Werner E., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., et al. (2004) Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6188-6196.

[23] Bernier S.P., Lebeaux D., DeFrancesco A.S., Valomon A. et al. (2013) Starvation, together with the SOS response mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *Plos Genet.* 9: e1003144.

[24] Folsom J.P., Richards L., Pitts(B, Roe F. et al. (2010) Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiology*, 10, p.294, doi:10.1186/1471-2180-10-294.

[25] Khemiri A), Jouenne T., Cosette P. (2016) Biofilmology and proteomics approaches : what have we learned from a decade of research. *Med. Microbiol. Immuno.* 205: 1-19.

[26] Seneviratne C.J., Wang Y., Jin L., Abiko Y. et al.(2010) Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics* 10: 1444-1454.

[27] Gaviard C., Jouenne T., Hardouin J. (2018) Proteomics of *Pseudomonas aeruginosa*: the increasing role of post-translational modification. *Exp. Rev Proteomics* 15: 757-772

[28] Massier S., Robin B., Mégroz M.,Wright A. et al. (2021) Phosphorylation of Extracellular Proteins in *Acinetobacter baumannii* in Sessile Mode of Growth. *Front Microbiol* 12:738780. doi: 10.3389.

[29] Stewart P.S., Zhang T., Xu R., Pitts B. (2016) Reaction-diffusion theory explains hypoxia and heterogeneous growth within microbial biofilms associated with chronic infections. *Npj Biofilms and Microbiomes* 2: 16012; doi:10.1038/npjbiofilms.2016.1.

[30] Tresse O., Jouenne T., Junter G.A. (1995) The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 36 : 521-526.

[31] Borriello G., Werner E., Roe F., Kim A.M. et al. (2004) Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*48:2659-2664.

[32] Webster C.M., Shepherd M. (2022). A mini review: environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy. *World J Microbiol Biotechnol.* 39:7. doi: 10.1007/s11274-022-03445-8.

[33] Taylor P., Yeung A.T.Y., Hancock R.E.W (2014) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J. Biotechnol.* 191: 121-130

[34] 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.

[35] LaFleur M.D., Kumamoto C.A., Lewis K. (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob. Agents Chemother* 50: 3839-3846.

[36] Miyae S., Suzuki E., Komiya Y., Kondo Y. et al. (2018) Bacterial memory of persisters bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Front. Microbiol.* 26 : 1396. doi :10.3389/fmicb.2018.01396.

[37] Lewis K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* : 48-56.

[38] Neut D., Van der Mei H.C., Bulstra S.K, Bussher H.J. (2007) The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *ACTA Orthop.*, 78, 299-308.

[39] Zhou L., Zhang Y., Ge Y., Zu X. et al. (2020) Regulatory mechanisms and promising applications of *quorum sensing*-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Front. Microbiol.*: 11 : 589640. |doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640

[40] Zhao X., Yu Z., Ding T. (2020) *Quorum sensing* regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms* 8: 425.

[41] Bjarnsholt T., Jensen PØ., Burmølle M., et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*, 151, 373-83.

[42] Dawan J., Ahn J. (2022) Bacterial resistance responses as potential targets in overcoming antibiotic resistance. *Microorganisms* 10: 1385.

[43] Rahman M.A., Amirkhani A., Chowdhury D., Mempo M. et al. (2022) Proteome of *Staphylococcus aureus* biofilm changes significantly with aging. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 6415.

[44] Seneviratne C.J. Wang Y., Jin L., Abiko Y. et al (2008) *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics* 8: 2936-2947.

[45] Van Acker H., Coenye T. (2016) The role of efflux and physiological adaptation in biofilm tolerance. *J. Biol. Chem.* 291: 12565-12572.

[46] Pitts L., Roe B., Ehrlich F., Parker G.D. et al. (2010) Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiol.* 10, 29436.

[47] Stewart P. S., Franklin M. J., Williamson K. S., Folsom J. P., Boegli L. et al. (2015) Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 3838 -3847.

[48] Lioa J., Schurr M.J., Sauer K. (2013) The MerR-like regulator BriR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* 195: 3352-3363.

[49] Mah T.F., Pitts B., Pellock B. et al. (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* 426, 306-310.

[50] Zhang L., Fritsch M., Hammond L., Landreville R. et al. (2013) Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *Plos One* 8: e61625.

[51] Sultan M., Arya R., Kim K.K. (2021) Role of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Int. J. Mol. Sci.* 22 : 12152

[52] Macé C., Seyer D., Chemani C. et al. (2008) Identification of biofilm-associated cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* involved in biofilm formation and virulence. *Plos One*, 3, 1-10 e3897.