

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé..... | iii |
| Abstract..... | iv |
| Table des matières..... | v |
| Liste des tableaux..... | vii |
| Liste des figures..... | viii |
| Liste des abréviations..... | ix |
| Remerciements..... | xi |
| Avant-propos..... | xiii |
| Chapitre 1 : Introduction | 1 |
| 1.1 Introduction..... | 1 |
| 1.1.1 La vulnérabilité des personnes atteintes de fibrose kystique face aux microorganismes pathogènes opportunistes..... | 1 |
| 1.1.2 Le problème des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de fibrose kystique..... | 4 |
| 1.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , bactérie pathogène opportuniste..... | 5 |
| 1.1.4 Les facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6 |
| 1.1.5 L'adaptation de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux poumons des personnes atteintes de fibrose kystique..... | 7 |
| 1.1.6 LESB58, souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> adaptée à la fibrose kystique..... | 9 |
| 1.1.7 L'origine des infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez les personnes atteintes de fibrose kystique..... | 10 |
| 1.1.8 La nécessité de trouver de nouveaux moyens de lutte contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 13 |
| 1.1.9 Les biofilms et leur importance..... | 14 |
| 1.1.10 La formation de biofilm comme facteur de virulence..... | 15 |
| 1.1.11 Les biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 17 |
| 1.2 Hypothèse de recherche..... | 19 |
| 1.3 Objectifs spécifiques..... | 20 |
| Chapitre 2 : Identification à l'aide d'une approche multi-hôtes d'un mutant par transposon de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 ayant une virulence atténuée ... | 22 |
| 2.1.1 Résumé..... | 22 |
| 2.2 A multi-host approach to identify a transposon mutant of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 lacking full virulence..... | 23 |
| 2.2.1 Abstract..... | 24 |
| 2.2.2 Introduction..... | 25 |
| 2.2.3 Materials and methods..... | 26 |
| 2.2.3.1 Bacterial strains..... | 26 |
| 2.2.3.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> predation assay..... | 26 |
| 2.2.3.3 Fly pricking assay..... | 26 |
| 2.2.3.4 Competitive index in rat model..... | 27 |
| 2.2.4 Results and discussion..... | 27 |
| 2.2.4.1 Reduced virulence of LESB58 mutants in <i>Dictyostelium discoideum</i> | 27 |
| 2.2.4.2 Identification of the STM PALES_11731 mutant with the <i>Drosophila</i> systemic model..... | 28 |
| 2.2.4.3 The STM PALES_11731 mutant is strongly attenuated in the chronic lung infection model..... | 29 |
| 2.2.4.4 Potential consequences of the transposon insertion in the STM PALES_11731 mutant..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4.5 The highly reduced virulence of the STM PALES_11731 mutant is likely multifactorial | 32 |
| 2.2.5 Limitations | 32 |
| 2.2.6 References | 33 |
| 2.2.7 Additional material | 35 |
| Chapitre 3 : Une nouvelle approche pour l'étude des biofilms adhérents ou flottants produits par des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de différentes origines révèle un effet varié de la présence d'ions divalents sur ces structures | 50 |
| 3.1.1 Résumé | 50 |
| 3.2 A new approach to study attached and floating biofilms produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains of various origins reveals various effects of divalent ions on these structures | 51 |
| 3.2.1 Abstract | 52 |
| 3.2.2 Introduction | 53 |
| 3.2.3 Materials and methods | 54 |
| 3.2.3.1 Bacterial strains | 54 |
| 3.2.3.2 Growth curve establishment | 54 |
| 3.2.3.3 Crystal violet staining | 54 |
| 3.2.3.4 Biofilm quantification using imaging | 55 |
| 3.2.3.5 Biofilm-like structure quantification | 55 |
| 3.2.3.6 Scanning electron microscopy (SEM) of the biofilm-like structures | 56 |
| 3.2.4 Results and discussion | 56 |
| 3.2.4.1 Increased attached biofilm formation in the Urg-7 isolate | 58 |
| 3.2.4.2 High concentration of Zn ²⁺ greatly increases attached biofilm formation | 60 |
| 3.2.4.3 <i>P. aeruginosa</i> 's floating biofilm-like structures and their modulation by cations | 63 |
| 3.2.4.4 BLSs are heterogeneous structures formed of cells embedded in extracellular matrix | 65 |
| 3.2.4.5 Planktonic growth does not correlate with biofilm formation | 65 |
| 3.2.4.6 Conclusions and perspectives | 68 |
| 3.2.5 References | 68 |
| Chapitre 4 : Conclusion | 72 |
| 4.1 Discussion générale | 72 |
| 4.1.1 Étude du mutant STM PALES_11731 | 72 |
| 4.1.2 Étude de la diversité des biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 76 |
| 4.1.3 Comprendre la formation des <i>biofilm-like structures</i> (BLS) | 78 |
| 4.2 Conclusions et perspectives | 80 |
| Bibliographie | 83 |
| Annexes | 95 |
| Annexe 1 – Comparaison de la formation de biofilms adhérents et de BLS chez LESB58 et le mutant STM PALES_11731 | 95 |
| Annexe 2 – Live/Dead des BLS | 96 |
| Annexe 3 – Croissance de PAO1 | 98 |
| Annexe 4 – Microfluidique de PAO1, PPF-1 et LESB58 | 99 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Table 2.S1 List of non-virulent mutants in the amoeba predation assay and tested in the <i>Drosophila</i> model of infection..... | 36 |
| Table 2.S2 Bacterial growth after treatment at a low pH | 37 |
| Table 2.S3 List of primers..... | 40 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1.1 Impact de la mutation du gène <i>CFTR</i> sur les voies aériennes..... | 3 |
| Figure 1.2 Mutations fréquemment observées chez les souches de <i>P. aeruginosa</i> adaptées à la FK..... | 8 |
| Figure 1.3 Phylogénie moléculaire de 1394 isolats de <i>P. aeruginosa</i> | 12 |
| Figure 1.4 Mécanismes augmentant la résistance des bactéries à l'intérieur d'un biofilm. | 16 |
| Figure 1.5 Exemples de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> | 18 |
| Figure 2.1 Example of a non-virulent LESB58 STM mutant in the amoeba model..... | 28 |
| Figure 2.2 The STM PALES_11731 mutant has a very low virulence in the drosophila infection model..... | 29 |
| Figure 2.3 The STM PALES_11731 mutant is 20 times less virulent than the wild-type bacteria in a rat lung infection model..... | 30 |
| Figure 2.S1 Representation of the mini-Tn5- <i>tet</i> transposon insertion in the STM PALES_11731 mutant | 38 |
| Figure 2.S2 Structural analyses of the protein encoded by the gene PALES_11731..... | 39 |
| Figure 2.S3 Percentage of expression of the genes <i>hisS</i> , <i>yfgM</i> , <i>bamB</i> and <i>engA</i> in the STM PALES_11731 mutant relatively to the wild-type strain..... | 41 |
| Figure 2.S4 Protein contents of the wild-type strain LESB58 and the STM PALES_11731 mutant supernatant visualized by SDS-PAGE 12% | 43 |
| Figure 2.S5 The STM PALES_11731 mutant shows the same antibiotic and lysosyme resistance as the wild-type LESB58..... | 45 |
| Figure 2.S6 Similar growth of wild-type LESB58 and STM PALES_11731 mutant strains when BLSs are inhibited by magnesium ions..... | 46 |
| Figure 2.S7 Low nutrient medium does not hinder the mutant growth..... | 47 |
| Figure 2.S8 Similar adhered biofilm formation of wild-type LESB58 and STM PALES_11731 mutant strains..... | 48 |
| Figure 3.1 Side view of crystal violet (CV) stained wells..... | 57 |
| Figure 3.2 Quantification of adhered biofilm (blue) and measurement of growth curve (red) in 3 specific conditions..... | 59 |
| Figure 3.3 Attached biofilm quantification..... | 61 |
| Figure 3.4 Top view of wells after incubation and before crystal violet staining..... | 64 |
| Figure 3.5 Scanning electron microscopy of LESB58 and PPF-1 BLS..... | 66 |
| Figure 3.6 SEM enhanced view of the smooth and rough sections of the BLSs..... | 67 |
| Figure annexe 1. Quantification par ImageJ des biofilms adhérents et des BLS de LESB58 et du mutant STM PALES_11731..... | 95 |
| Figure annexe 2. Détermination de la viabilité cellulaire des bactéries dans les BLS de LESB58 et PPF-1..... | 96 |
| Figure annexe 3. Évaluation de la formation de BLS chez PAO1 après un temps d'incubation prolongé..... | 98 |
| Figure annexe 4. Formation de biofilm adhérent des souches PAO1, LESB58 et PPF-1 en microfluidique..... | 100 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------|---|
| 3D | 3 dimensions |
| ADN / DNA | Acide désoxyribonucléique / <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| ARN / RNA | Acide ribonucléique / <i>Ribonucleic acid</i> |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ASM | <i>Artificial sputum medium</i> |
| BLS | <i>Biofilm-like structure</i> (Structure ressemblant à du biofilm) |
| bp | <i>Base pair</i> (Paire de bases) |
| CC BY | <i>Creative Commons - Attribution</i> |
| cDNA | <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Acide désoxyribonucléique complémentaire) |
| CFTR | <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique) |
| CFU | <i>Colony-forming unit</i> (Unité formatrice de colonie) |
| CI | <i>Competitive index</i> (Indice de compétitivité) |
| C-score | <i>Checkerboard score</i> |
| CV | <i>Crystal violet</i> (Violet de cristal) |
| DLVO | Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek |
| DO / OD | Densité optique / <i>Optical density</i> |
| EGTA | <i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> (Acide éthylène glycol tétraacétique) |
| FEMS | <i>Federation of European Microbiological Societies</i> |
| FK / CF | Fibrose kystique / <i>Cystic fibrosis</i> |
| INRS | Institut national de la recherche scientifique |
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| LES | <i>Liverpool epidemic strain</i> (Souche épidémique de Liverpool) |
| LPS | Lipopolysaccharides |
| MHA | <i>Mueller-Hinton agar</i> |
| MHB | <i>Mueller-Hinton broth</i> |
| Mpb | Méga paire de bases |
| OUP | <i>Oxford University Press</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> (Tampon phosphate salin) |
| qPCR | <i>quantitative polymerase chain reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase, quantitative) |
| QS | <i>Quorum sensing</i> (Détection du quorum) |
| rpm | <i>Revolutions per minute</i> (Rotations par minute) |
| RT-qPCR | <i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase, quantitative, de la rétrotranscription) |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) |
| SEM | <i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopie électronique à balayage) |
| SM | <i>Standard medium</i> |
| STM | <i>Signature-tagged mutagenesis</i> (Mutagenèse à étiquette) |
| TEX | Tampon d'électrophorèse |
| TM-score | <i>Template Modeling score</i> |
| TSB | <i>Tryptic soy broth</i> |
| TTSS | <i>Type three secretion system</i> (Système de sécrétion de type trois) |

À mes parents,
qui n'ont jamais cessé de croire en moi.

Remerciements

Ce projet n'aurait jamais pu se réaliser si ça n'avait été des différents organismes subventionnaires qui l'ont soutenu financièrement. Je les remercie de la confiance qu'ils ont eue. J'aimerais tout particulièrement exprimer ma gratitude envers le Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec pour la bourse de maîtrise qui m'a été offerte, ainsi qu'au Réseau en santé respiratoire du FRQS pour la bourse de participation à un congrès qui m'a permis de rencontrer des experts en biofilms de partout dans le monde lors du congrès Biofilms7.

Au-delà du soutien financier, je dois également l'aboutissement de ma maîtrise à énormément de personnes qui m'ont soutenu sur le plan scientifique et/ou personnel.

Merci aux membres de mon comité d'encadrement. Yves Bourbonnais, merci pour les idées que vous avez apportées et les questions que vous avez soulevées lors de nos rencontres annuelles. Peut-être est-ce grâce au fait que vous aviez un peu plus de recul face au projet, mais chacun de vos commentaires a su me faire réfléchir à des aspects que je n'aurais jamais envisagés. Jean Barbeau, merci pour nos discussions et, entre autres, pour les pistes de réflexion que vous m'avez données lors de l'écriture de mon second article. Je me compte chanceuse d'avoir pu profiter de votre avis d'expert en biofilms. Roger Lévesque, merci de votre confiance en mes capacités et de votre enthousiasme malgré les embûches du projet. Merci également d'avoir accepté d'être mon co-directeur de recherche pendant les trois dernières années. Steve Charette, merci d'être le directeur de recherche que tu es. Je n'aurais certainement pas pu espérer un meilleur patron pour me chapeauter. Merci pour ta capacité à voir une opportunité se dessiner derrière chaque problème rencontré, ta motivation contagieuse et pour m'avoir permis de relever autant de défis intellectuels. Je partirai du Labo Charette avec une myriade de compétences que je n'aurais possiblement pas eu la chance de développer dans un autre laboratoire.

Merci aux co-auteurs du papier sur les mutants de LESB58. Cet article est l'aboutissement d'environ huit années de travail. Il y en a d'ailleurs certains d'entre vous que je n'ai jamais rencontré en personne. Cependant, c'est votre travail qui aura rendu mon projet possible. Merci d'avoir donné naissance à ce projet.

En plus des connaissances que mes années de maîtrise m'auront apportées, je garderai toujours en mémoire les gens merveilleux que j'ai pu côtoyer chaque jour. Parce qu'on aime pleinement ce qu'on fait quand on aime aussi les gens avec qui on travaille. Merci à tous les membres du Labo Charette, passés ou présents, que j'ai eu la chance de connaître et qui m'ont fait encore plus aimer mes années de maîtrise : Mélanie, Alix, Alicia, William, Katherine, Jade, Alex, Martin, Sabrina, Antony, Jean-Guillaume, Perrine, Morgane, François, Marie-Stéphanie et Marie-Ange. Un merci tout spécial à Valérie, « la maman du labo », qui m'aura servi de guide quand je commençais et sur qui on peut toujours compter.

Merci à mes parents, à qui je dédicace ce mémoire, parce qu'ils ont toujours cru en moi, même pendant les périodes plus difficiles de ma vie. Ils m'auront poussée à ne jamais abandonner et à donner le meilleur de moi-même. Merci mille fois d'être là, toujours prêts à me soutenir quand j'en ai besoin.

En terminant, merci à mon précieux JinHwan. Merci d'être avec moi, d'être un homme merveilleux qui me donne chaque jour de nouvelles raisons de l'aimer. Thank you for your support and your understanding. Whatever the distance, you're always by my side. Gomapseumnida !

Avant-propos

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres. Une introduction permettant la mise en contexte du sujet d'étude, suivie d'une explication des hypothèses et d'un exposé des deux objectifs du projet constituent le premier chapitre. Les deux chapitres suivants, rédigés sous la forme d'articles scientifiques, présentent la méthodologie et les résultats associés à chacun des objectifs du projet. Le quatrième chapitre est une discussion générale des résultats obtenus, des conclusions qui peuvent en être tirées et des perspectives possibles pour ce projet.

Article scientifique constituant le chapitre 2 :

L'article intitulé « *A multi-host approach to identify a transposon mutant of *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 lacking full virulence* » a été publié en libre accès dans le journal scientifique *BMC Research Notes* le 27 mars 2018 (<https://doi.org/10.1186/s13104-018-3308-7>). Les auteurs ayant participé à la réalisation de cet article sont, dans l'ordre : **Cynthia Gagné-Thivierge**, Irena Kukavica-Ibrulj, Geneviève Fillion, Valérie Dekimpe, Sok Gheck E Tan, Antony T. Vincent, Éric Déziel, Roger C. Levesque et Steve J. Charette. Mon rôle en tant que première auteure a été de rédiger cet article, à l'exception des parties de matériels et méthodes correspondant au criblage chez la drosophile (écrit par É. Déziel) et à la détermination de l'indice de compétitivité chez le rat (écrit par I. Kukavica-Ibrulj), ainsi que la partie du matériel supplémentaire correspondant à l'analyse structurale de la protéine YfgM (écrit par A.T. Vincent). Les résultats des criblages chez l'amibe et la drosophile, de même que la détermination de l'indice de compétitivité chez le rat ont été obtenus par G. Fillion et S.G.E. Tan, V. Dekimpe et I. Kukavica-Ibrulj respectivement, et ce, avant mon intégration à ce projet. J'ai cependant fait la confirmation des résultats du test de virulence chez l'amibe. Par ailleurs, exception faite de l'analyse structurale de la protéine YfgM, réalisée par A.T. Vincent, j'ai réalisé toutes les expérimentations d'écrites dans le matériel supplémentaire. J'ai également participé à leur conception, à l'analyse des résultats obtenus et à la création des figures de l'article. Cette étude a été réalisée grâce à la collaboration des laboratoires de É. Déziel, R.C. Levesque et S.J. Charette.

Le chapitre 2 contient donc une reproduction de cet article, conformément à la licence internationale *Creative Commons – Attribution* 4.0 (CC BY 4.0,

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Seuls les numéros des figures et des tableaux ont été modifiés pour uniformiser leur intégration dans ce mémoire.

Article scientifique constituant le chapitre 3 :

L'article intitulé « *A new approach to study attached and floating biofilms produced by Pseudomonas aeruginosa strains of various origins reveals various effects of divalent ions on these structures* » a été soumis au journal scientifique *FEMS Microbiology Letters* le 9 février 2018 (numéro de manuscrit : FEMSLE-18-02-0104). Les auteurs ayant participé à la réalisation de cet article sont, dans l'ordre : **Cynthia Gagné-Thivierge**, Jean Barbeau, Roger C. Levesque et Steve J. Charette. Étant première auteure, j'ai participé à la conception et j'ai réalisé l'ensemble des expériences et des analyses présentées dans ce manuscrit. J'ai, de plus, préparé les figures et fait la rédaction de l'article dans son entier. Cette étude a été réalisée sous la supervision de S.J. Charette, en collaboration avec les laboratoires de J. Barbeau et R.C. Levesque.

Le chapitre 3 contient une version prépublication du manuscrit, celui-ci étant présentement en processus de révision par les pairs. Seuls les numéros des figures ont été modifiés pour uniformiser leur intégration dans ce mémoire.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Introduction

Certains microorganismes sont directement associés au développement d'infections. Ces organismes dits pathogènes comptent, par exemple, *Yersinia pestis*, bactérie responsable de la peste, et *Mycobacterium tuberculosis*, bactérie causant la tuberculose. Ces microorganismes trouvent chez un hôte comme l'humain un environnement adéquat pour leur croissance et s'y multiplient, entraînant l'apparition d'une maladie spécifique.

Cependant, il existe également des microorganismes qui ne sont pas systématiquement infectieux. Souvent, nous cohabitons avec ces microorganismes sans qu'ils ne présentent de danger, mais ils ont la capacité, dans certaines circonstances, de rendre un individu malade. On dit de ces organismes qu'ils sont des microorganismes pathogènes opportunistes. En effet, ils deviennent pathogènes envers un hôte en profitant d'une opportunité qui leur est laissée, par exemple une diminution de la protection offerte par le microbiote de l'hôte contre l'invasion et la prolifération de microorganismes nuisibles, ou une altération des défenses immunitaires de cet hôte (Methot et Alizon, 2014).

La capacité de résistance de l'être humain aux infections par des microorganismes pathogènes opportunistes peut être affaiblie de bien des façons. Ainsi, le risque de maladies infectieuses peut augmenter dû à la simple fatigue ou au stress (Chandramathi *et al.*, 2014), à la préexistence d'une infection (par exemple chez une personne séropositive (Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents, 2018)) ou au fait de subir un traitement médical (telle la chimiothérapie (Khan et Wingard, 2001) et la prise d'antibiotiques (Modi *et al.*, 2014)). Différentes conditions médicales peuvent également accroître la sensibilité d'une personne aux agents pathogènes opportunistes. C'est notamment le cas de la fibrose kystique, maladie qui touche environ 4000 Canadiens (Stoltz *et al.*, 2015; Fibrose kystique Canada, 2017).

1.1.1 La vulnérabilité des personnes atteintes de fibrose kystique face aux microorganismes pathogènes opportunistes

La fibrose kystique (FK), aussi appelée mucoviscidose, est l'une des maladies génétiques humaines les plus fréquentes dans le monde, tout particulièrement chez les populations

d'origine européenne (O'Sullivan et Freedman, 2009; Fibrose kystique Canada, 2017). Elle est causée par des mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) (Cutting, 2015).

Il s'agit d'une maladie génétique récessive, c'est-à-dire que les deux allèles du gène doivent être mutés pour entraîner la maladie. Considérant qu'en moyenne, au Canada, une personne sur 25 possède un allèle muté pour le gène *CFTR*, il est relativement fréquent que deux parents soient porteurs d'une mutation, ayant alors une chance sur quatre de donner naissance à un enfant atteint de FK. Toujours au Canada, c'est le cas d'environ une naissance sur 3600 (Fibrose kystique Canada, 2017).

Il existe plus de 2000 mutations répertoriées susceptibles d'entraîner la FK (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 2018). La ou les mutations du gène *CFTR* entraînent, en fonction de l'endroit du gène qui est muté, un mal fonctionnement et/ou une diminution du nombre de protéines CFTR présentes dans la membrane des cellules épithéliales. Cette protéine est responsable du transport d'anions, principalement des ions chlorure, hors des cellules (Linsdell, 2014). La diminution du nombre de protéines CFTR fonctionnelles chez les personnes atteintes de FK cause un déséquilibre des échanges ioniques entre les cellules épithéliales et le milieu extracellulaire, altérant la concentration en ions du mucus présent dans la lumière de nombreux organes (**Figure 1.1**). La FK se manifeste ainsi par une déshydratation des mucus, ce qui augmente leur viscosité et entrave le fonctionnement normal des organes où il y a présence de ce mucus altéré (système digestif, voies respiratoires, système reproductif, etc.) (Davis *et al.*, 1996).

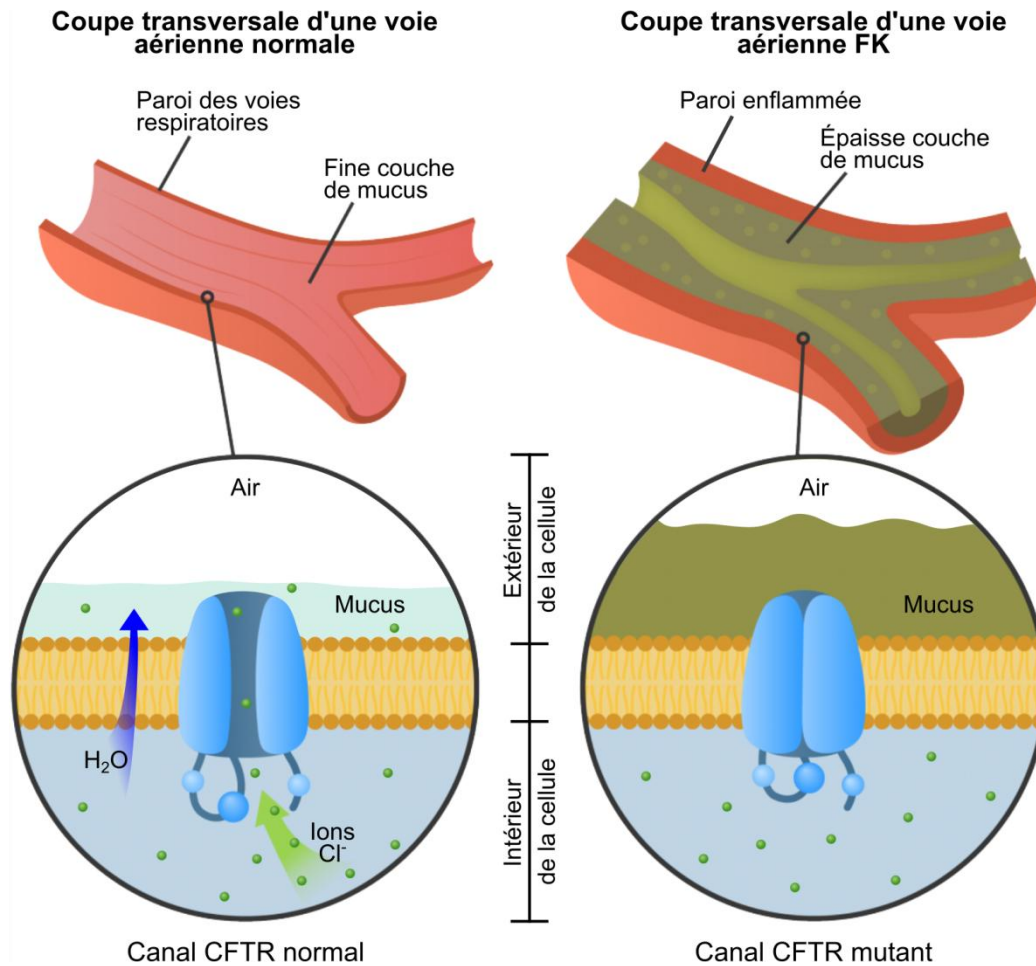


Figure 1.1 Impact de la mutation du gène *CFTR* sur les voies aériennes.

Chez les patients atteints de FK, les canaux formés par la protéine *CFTR* sont moins nombreux ou dysfonctionnels. La diminution de l'export d'ions chlorure entraîne une déshydratation du mucus pulmonaire et son accumulation dans les poumons.

Figure modifiée (traduction et édition d'image) d'après une figure originale de *Genome Research Limited* (Wellcome Sanger Institute, 2016), utilisée sous licence CC BY.

Les effets de cette maladie sont omniprésents dans la vie d'une personne atteinte, touchant différents organes à des intensités variables d'un individu à l'autre en fonction du type de mutation présente sur le gène *CFTR*. Le pancréas et les poumons sont les organes les plus souvent et fortement affectés, pouvant entraîner une malnutrition pour le premier et menant à un déclin de la fonction pulmonaire pour le second.

Bien que la malnutrition peut généralement être contrôlée par la prise orale de suppléments alimentaires et d'enzymes pancréatiques (Dodge et Turck, 2006), l'atteinte pulmonaire, elle, est tout particulièrement invalidante, car de nombreuses complications peuvent en découler. En effet, elle fragilise la capacité des poumons à résister aux agents

nuisibles présents dans l'air que nous respirons, incluant les microorganismes pathogènes opportunistes. La FK s'associe donc dans la majorité des cas à des infections pulmonaires pouvant devenir chroniques, entraînant une destruction progressive des poumons. Ces infections sont la première cause de morbidité et de mortalité des patients atteints de FK (Lyczak *et al.*, 2002; Courtney *et al.*, 2007).

1.1.2 Le problème des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de fibrose kystique

La fragilité des poumons FK aux infections s'explique par plusieurs mécanismes interreliés. Ainsi, la protéine CFTR serait nécessaire pour permettre l'acidification des lysosomes et donc la digestion des bactéries dans les phagolysosomes des macrophages alvéolaires (Di *et al.*, 2006). Dans un but similaire, elle permettrait le transport d'ions Cl⁻ dans le phagolysosome des neutrophiles sanguins, permettant l'élimination des bactéries ingérées, mais assurant aussi l'homéostasie ionique du cytosol des neutrophiles, une caractéristique nécessaire pour permettre la dégranulation chez ces cellules du système immunitaire (Painter *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2014). La protéine CFTR étant défectueuse chez les patients souffrant de FK, elle ne peut plus jouer ces rôles et les microorganismes atteignant les poumons sont donc libres de s'installer sans être rapidement éliminés par les défenses de l'hôte. Par ailleurs, la grande viscosité du mucus réduit la capacité des cellules ciliées à le faire circuler, diminuant donc l'élimination mécanique des microorganismes (Knowles et Boucher, 2002). Le mucus rendu hypertonique et acidifié a également un effet inhibiteur sur les molécules de l'immunité innée (lysozymes, lactoferrine, etc.) qui réduit la capacité des tissus à empêcher l'établissement et à éradiquer l'infection (Smith *et al.*, 1996; Pezzulo *et al.*, 2012). Une réaction inflammatoire sera tout de même initiée, mais elle sera inefficace à éliminer les agents pathogènes installés et, comme pour toute infection chronique, participera ironiquement à la destruction progressive des tissus (Nichols *et al.*, 2008; Stoltz *et al.*, 2015). Dans certains cas avancés de la maladie, les poumons deviennent si endommagés que la transplantation pulmonaire doit être envisagée.

Pour ces raisons, au cours de sa vie, une personne atteinte de FK sera confrontée à de nombreuses pneumonies. Un grand nombre de microorganismes peuvent coloniser les poumons de ces personnes, mais une évolution de la diversité et des genres microbiens prédominants est perceptible en fonction de l'âge des patients (Cox *et al.*, 2010). Dans

l'enfance, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* sont les bactéries les plus souvent isolées. En vieillissant, la colonisation par des bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* et, surtout, par *Pseudomonas aeruginosa* gagne en importance. D'autres microorganismes tels que *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, des mycobactéries et des moisissures peuvent également être retrouvés dans les poumons des patients souffrant de FK (Lyczak *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2011). Néanmoins, *P. aeruginosa* est le microorganisme le plus fréquemment responsable de pneumonies (Bhagirath *et al.*, 2016). Associé à un pronostic défavorable, car il accélère le déclin de la fonction respiratoire (Emerson *et al.*, 2002; Harun *et al.*, 2016), il est présent chez environ la moitié des personnes souffrant de FK qui atteignent le début de l'âge adulte (Yankaskas *et al.*, 2004; Fibrose kystique Canada, 2017).

1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie pathogène opportuniste

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif ubiquitaire connu principalement parce qu'il s'agit d'un microorganisme pathogène opportuniste. Cette bactérie est capable d'infecter toutes sortes d'animaux et même des plantes (Silby *et al.*, 2011). Chez l'être humain, elle peut infecter de façon sévère un grand nombre d'organes et de tissus tels que les yeux, les oreilles, le système urinaire, la peau et les poumons (Bodey *et al.*, 1983). Elle est ainsi responsable d'infections nosocomiales et de complications médicales, tout particulièrement chez les grands brûlés (infections de la peau) et les patients atteints de FK (pneumonies) (Lyczak *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* est par conséquent le sujet de nombreuses recherches biomédicales.

La souche de référence pour l'étude du métabolisme de *P. aeruginosa* est PAO1. Cette souche est le résultat d'une mutation spontanée de la souche originale PAO (isolée d'une blessure humaine en 1954 à Melbourne, en Australie) l'ayant rendue résistante au chloramphénicol (Klockgether *et al.*, 2010). Elle demeure encore aujourd'hui la souche la plus utilisée pour l'étude de *P. aeruginosa* dans les laboratoires à travers le monde. Son génome a d'ailleurs été le premier du genre *Pseudomonas* à être entièrement séquencé, en 2000, ce qui représentait, à l'époque, le plus gros génome bactérien jamais séquencé avec environ 6,3 Mpb (Stover *et al.*, 2000).

1.1.4 Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

La virulence de *P. aeruginosa* provient de plusieurs mécanismes différents. On peut citer, entre autres, la motilité procurée par la présence d'un flagelle, un facteur qui facilite la colonisation initiale d'un environnement par la bactérie (Feldman *et al.*, 1998). On compte également, de nombreux pili de type IV qui servent à l'adhérence de *P. aeruginosa*, que ce soit à d'autres cellules ou à des surfaces, permettant à la bactérie de s'accrocher aux tissus de l'hôte et de se disséminer dans les poumons (Hahn, 1997). Autre exemple important : la formation de biofilms, qui sera discutée plus loin, un phénomène largement observé dans les poumons infectés par *P. aeruginosa* des personnes atteintes de FK. Ce mécanisme à lui seul augmente grandement la résistance des bactéries aux antibiotiques et aux systèmes de défense de l'hôte, les rendant virtuellement impossibles à éliminer et favorisant donc la chronicité de l'infection (Costerton *et al.*, 1999; Mulcahy *et al.*, 2014).

Le simple fait que *P. aeruginosa* parvienne à s'installer et à persister dans les poumons compromis des patients souffrant de FK induit une activité ininterrompue, mais inefficace du système immunitaire défaillant du patient. Cela résulte en une inflammation continue des tissus, ce qui les endommage. Ce ne sont toutefois pas uniquement ces mécanismes passifs qui font de *P. aeruginosa* un agent pathogène à craindre. Cette bactérie possède également des moyens d'endommager directement son hôte. L'un des mieux connus est sa capacité à produire des protéases (élastase A (LasA) et B (LasB), protéase IV et protéase alcaline) et des enzymes lipolytiques extracellulaires (lipase (LipA) et estérase (EstA)) qui s'attaquent à son hôte (Rosenau et Jaeger, 2000; Caballero *et al.*, 2001; Kipnis *et al.*, 2006), diminuant l'efficacité de ses défenses et favorisant le développement de l'infection. De plus, *P. aeruginosa* peut sécréter d'autres types de toxines (exotoxine A, phospholipases C, pyocyanine, etc.) (Pollack, 1983; Ostroff *et al.*, 1990; Lau *et al.*, 2004) et des sidérophores (pyoverdine et pyochéline) (Takase *et al.*, 2000) destinés à endommager les cellules épithéliales pulmonaires et favoriser sa croissance au détriment de l'hôte.

Pour sécréter ces molécules toxiques, la bactérie doit utiliser des systèmes de sécrétion. Six systèmes de ce genre ont été répertoriés chez les bactéries à Gram négatif et *P. aeruginosa* possède cinq d'entre eux (Blevés *et al.*, 2010). L'un d'eux, agissant comme une aiguille, est utilisé par la bactérie pour injecter des facteurs de virulence directement dans le cytoplasme de cellules eucaryotes. Il s'agit du système de sécrétion de type trois

(TTSS pour « *type three secretion system* », en anglais). Chez *P. aeruginosa*, il existe jusqu'à quatre exotoxines empruntant ce système : ExoS, qui est cytotoxique, perturbe les filaments d'actine et inhibe la phagocytose (Frithz-Lindsten *et al.*, 1997), ExoT, qui agit également de ces trois façons en plus de perturber le cycle cellulaire (Garrity-Ryan *et al.*, 2000; Shafikhani et Engel, 2006), ExoU, qui cause une lyse cellulaire rapide (Finck-Barbancon *et al.*, 1997), et ExoY, qui, dans le poumon, induit la formation d'œdème en augmentant la perméabilité de l'endothélium pulmonaire (Sayner *et al.*, 2004). Il a par ailleurs été démontré qu'un TTSS très actif chez *P. aeruginosa* induit une plus grande mortalité chez son hôte, comparativement à une souche dont le TTSS est peu actif (Roy-Burman *et al.*, 2001; Hauser *et al.*, 2002).

1.1.5 L'adaptation de souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux poumons des personnes atteintes de fibrose kystique

Les poumons des gens atteints de FK sont un type d'environnement particulier qui, comme toute niche écologique, exerce une pression sélective sur les isolats de *P. aeruginosa* qu'on peut y retrouver. Cette sélection est également le résultat des traitements aux antibiotiques, parfois très nombreux, que le patient recevra au cours de sa vie (Ciofu *et al.*, 2012; Wright *et al.*, 2013; Andersson et Hughes, 2014). Les populations de *P. aeruginosa* qui causent des infections pulmonaires chez les gens souffrant de FK subissent ainsi une microévolution au fil du temps. Les souches retrouvées dans le cas d'infections chroniques sont adaptées au contexte infectieux de la FK et présentent des caractéristiques distinctives qui rendent cette chronicité possible, dont une accumulation de mutations (Smith *et al.*, 2006; Folkesson *et al.*, 2012; Sousa et Pereira, 2014) (**Figure 1.2**).

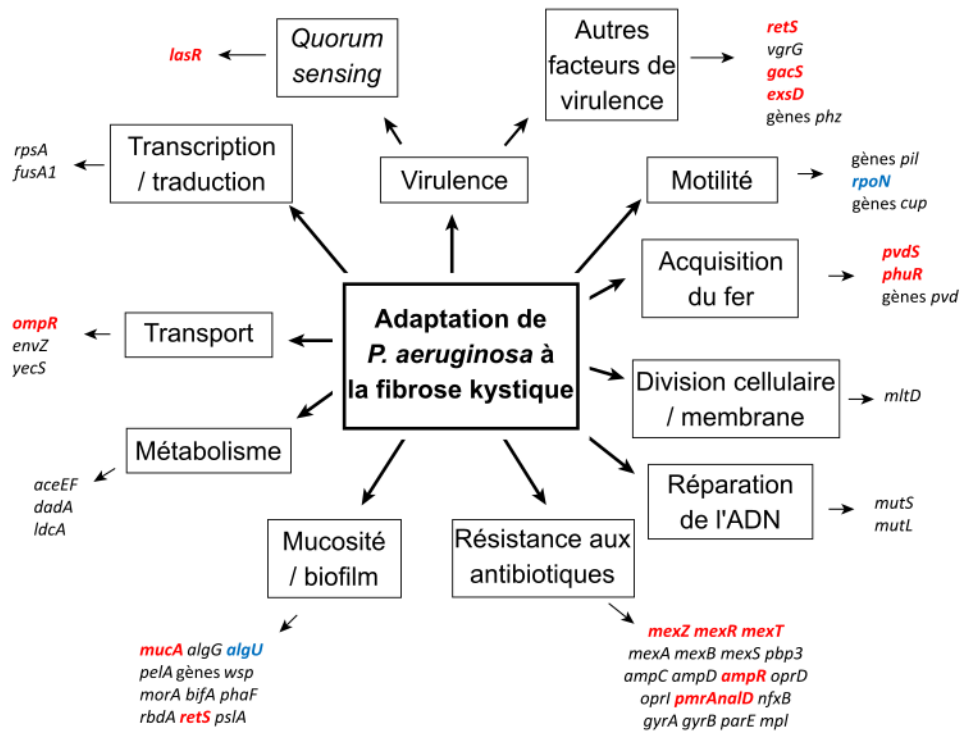


Figure 1.2 Mutations fréquemment observées chez les souches de *P. aeruginosa* adaptées à la FK.

Due, entre autres, à un taux élevé de mutations causé par des mécanismes défectueux de réparation de l'ADN, l'adaptation de *P. aeruginosa* à la FK implique l'altération de plusieurs protéines régulatrices (gènes en rouge) et facteurs sigma (gènes en bleu). Une diminution de la virulence de la bactérie et une augmentation de ses résistances en résultent.

Figure modifiée (traduction) d'après une figure originale de Winstanley *et al.* (Winstanley *et al.*, 2016), utilisée sous licence CC BY.

Ainsi, on dénote souvent une diminution de la virulence des souches provenant d'infections chroniques comparativement aux souches d'infections aiguës. Il est, par exemple, connu que le gène *lasR*, l'un des régulateurs importants du « quorum sensing » (QS) chez *P. aeruginosa*, est souvent muté (Hoffman *et al.*, 2009). Le QS est un système de communication intercellulaire permettant le contrôle de l'expression de nombreux gènes à l'intérieur d'une population de cellules, dont les facteurs de virulence (Rutherford et Bassler, 2012; Lee et Zhang, 2015). La perturbation du QS par l'inactivation de *lasR* diminue la production de facteurs de virulence sécrétés (Gambello et Iglewski, 1991; Gambello *et al.*, 1993) et favorise une plus grande croissance de *P. aeruginosa* dans un environnement riche en acides aminés, comme les poumons des personnes atteintes de FK (Barth et Pitt, 1996; D'Argenio *et al.*, 2007). Comme autres exemples d'adaptation se traduisant par une réduction de la virulence, on peut citer le phénomène de sélection pour

la persistance de souches exprimant peu le SSTT (Jain *et al.*, 2004) et de souches non motiles (Mahenthiralingam *et al.*, 1994).

En parallèle, les mécanismes de résistance de la bactérie sont favorisés. Celle-ci devient plus résistante aux antibiotiques (Breidenstein *et al.*, 2011), notamment grâce à l'augmentation du nombre de pompes à efflux, via la surexpression des systèmes *mex* et *opr* (Ziha-Zarifi *et al.*, 1999), et à une production accrue de β -lactamases inactivant les antibiotiques de la classe des β -lactames (Masuda *et al.*, 1999; Tomas *et al.*, 2010). Par ailleurs, la production de biofilm gagne en importance à la suite d'une diminution de la production de protéines MucA fonctionnelles, due à des mutations du gène *mucA* (Boucher *et al.*, 1997; Pulcrano *et al.*, 2012). MucA est un anti-facteur sigma ciblant le facteur σ^{22} , codé par *algU* et permettant, entre autres, la production d'alginate (Schurr *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004). L'alginate est l'un des composants majeurs des biofilms des souches de *P. aeruginosa* adaptées à la FK. Du fait de ces différents éléments, ces souches sont donc particulièrement pernicieuses et résistantes. La souche LESB58 est l'une de ces souches.

1.1.6 LESB58, souche de *Pseudomonas aeruginosa* adaptée à la fibrose kystique

Les premiers isolats des souches LES (*Liverpool Epidemic Strain*) de *P. aeruginosa* ont été isolés en 1988 dans une clinique médicale dédiée à la FK, à partir de l'expectoration de patients qui s'y faisaient soigner. La première publication sur ces souches remonte à 1996, dans un article démontrant la possibilité de transmission d'infections pulmonaires à *P. aeruginosa* entre patients souffrant de FK (Cheng *et al.*, 1996). En effet, non seulement les souches LES sont-elles adaptées à ce type d'infection, mais elles sont également épidémiques chez ces patients, un phénomène qui n'avait encore jamais été observé. On découvrit par la suite qu'il existe plusieurs souches de *P. aeruginosa* pouvant être épidémiques chez les gens atteints de FK (par exemple la *Manchester epidemic strain* et l'*Australian epidemic strain* (Fothergill *et al.*, 2012)), mais les souches LES furent les premières à être décrites. LESB58, l'une de ces souches, fut finalement séquencée en 2009 (Winstanley *et al.*, 2009) et devint un exemple des souches qui peuvent être retrouvées lors d'infections pulmonaires chroniques chez les personnes souffrant de FK. D'ailleurs, afin de pouvoir étudier plus en profondeur les mécanismes moléculaires de sa virulence particulière, une banque de mutants uniques de LESB58 a été créée par

mutagenèse par étiquette (STM pour « *signature-tagged mutagenesis* », en anglais) (Winstanley *et al.*, 2009).

Du point de vue génétique LESB58 possède six prophages (dont un défectueux) et plusieurs îlots génétiques qui pourraient être liés à sa virulence (Jani *et al.*, 2016; Lemieux *et al.*, 2016). Comme on peut s'y attendre d'une souche provenant d'infection chronique, elle est moins motile, mais produit plus de biofilm que PAO1, en plus d'être résistante à de nombreux antibiotiques (Salunkhe *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2010). Par ailleurs, des tests d'infectiosité pulmonaire chez le rat ont démontré que LESB58 tend à demeurer dans les bronches, au contraire de PAO1 qui parvient à coloniser les alvéoles pulmonaires (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008).

Les souches LES causent des infections chroniques et sont souvent qualifiées d'hypervirulentes. Capables de se propager entre les patients FK, la transmission à des personnes non-FK a également déjà été rapportée (McCallum *et al.*, 2002) et les souches LES sont associées à un plus haut taux de mortalité que les autres souches de *P. aeruginosa* (Al-Aloul *et al.*, 2004). De plus, leur QS semble s'exprimer tôt, faisant en sorte qu'elles produisent de façon abondante certains facteurs de virulence, dont la pyocyanine (Winstanley *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2010). LESB58 est donc une souche d'infection chronique FK singulière et inquiétante, capable de nous aider à comprendre la virulence de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de FK.

1.1.7 L'origine des infections à *Pseudomonas aeruginosa* chez les personnes atteintes de fibrose kystique

Avant même que la démonstration d'une transmission de souches épidémiques de *P. aeruginosa* entre personnes souffrant de FK ne soit rapportée, la possibilité d'une contamination directe ou indirecte entre patients a souvent été soulevée (Speert et Campbell, 1987; Hoogkampkorstanje *et al.*, 1995; Doring *et al.*, 1996). Cette présomption a d'ailleurs été à l'origine de modifications des précautions prises dans les cliniques de soins pour ces patients afin de limiter les risques de contagion (Zimakoff *et al.*, 1983). Cependant, encore aujourd'hui, les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* demeurent majoritairement acquises de source inconnue (Saiman et Siegel, 2004). L'acquisition à partir de l'environnement, dans les lieux de soins ou à l'extérieur de ceux-ci, demeure donc un sujet d'inquiétude.

P. aeruginosa est une bactérie très adaptable, capable de proliférer dans un nombre considérable d'environnements différents. Des souches ont été isolées à des endroits aussi divers que l'eau de mer (Manwar *et al.*, 2004), la rhizosphère de plants de cantaloup (Wu *et al.*, 2011), l'estomac d'un dauphin de delphinarium (Grosso-Becerra *et al.*, 2014) et des sols contaminés aux explosifs (Chien *et al.*, 2014). Dans notre environnement plus immédiat, il est également possible d'isoler cette bactérie à partir de notre nourriture et de l'eau potable (Hardalo et Edberg, 1997). Dans un but évident de comprendre les mécanismes importants de pathogénicité de *P. aeruginosa* chez l'humain, les souches d'origine clinique, provenant de patients atteints de FK ou d'autres types d'infections humaines, animales ou végétales, sont toutefois les plus représentées dans la littérature. En les comparant entre elles, il est possible de faire ressortir certaines caractéristiques génétiques ou phénotypiques particulières pour mettre à jour des phénomènes tels que l'adaptation à l'infection de patients souffrants de FK, discutée précédemment. Certaines études utilisent aussi des souches environnementales de *P. aeruginosa* dans un but de comparaison de ces souches avec des souches cliniques, mais la caractérisation comparative des souches environnementales entre elles est peu exhaustive.

Il a été démontré qu'il existe une grande diversité chez les souches de *P. aeruginosa* de toutes origines, avec, notamment, la détermination de trois grands groupes phylogénétiques (Freschi *et al.*, 2015). L'un de ces groupes (le groupe 2) comporte actuellement 374 isolats répertoriés de *P. aeruginosa* (A.T. Vincent, communication personnelle), dont 16 souches environnementales qui ont été isolées de canalisations d'eau d'unités dentaires de la faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal pour un projet collaboratif concomitant à l'étude présentée dans ce mémoire. Treize de ces isolats provenant d'unités dentaires ont été le sujet d'un article scientifique démontrant qu'ils peuvent être divisés en deux sous-groupes, nommés Cluster II et III. Dans cette même étude, une comparaison avec 16 isolats provenant de patients atteints de FK a révélé qu'ils étaient nettement distincts des 13 isolats environnementaux et ces isolats cliniques ont été classés dans un sous-groupe différent, le Cluster I, appartenant au groupe 1 (Ouellet *et al.*, 2014). Une seconde étude incorporant trois nouveaux isolats environnementaux de la même origine que les précédents et sept nouveaux isolats cliniques est venue renforcer cette investigation par une analyse génomique approfondie (Vincent *et al.*, 2017) (**Figure 1.3**).

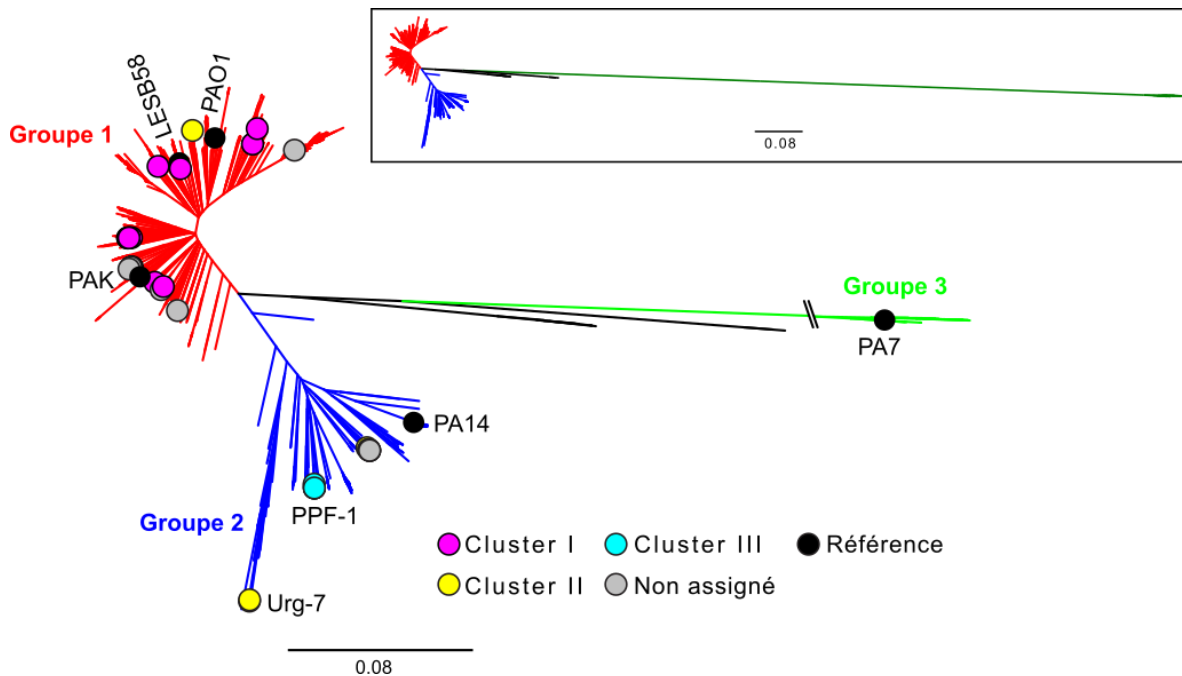


Figure 1.3 Phylogénie moléculaire de 1394 isolats de *P. aeruginosa*.

Tel que démontré par Freschi *et al.*, les souches de *P. aeruginosa* se partagent en trois grands groupes (Freschi *et al.*, 2015). PAO1 et LESB58 appartiennent au groupe 1. Les 13 souches environnementales (Cluster II et III) de Ouellet *et al.* (Ouellet *et al.*, 2014) se retrouvent toutes dans le groupe 2. Le cercle jaune présent dans le groupe 1 correspond à deux souches cliniques qui auraient été attribuées au Cluster II par erreur et devraient plutôt appartenir au Cluster I (cercles roses). Des cercles gris (souches non assignées par Ouellet *et al.*) permettent de distinguer les souches ajoutées dans l'étude de Vincent *et al.* (Vincent *et al.*, 2017) de celles de Ouellet *et al.* Les trois souches de Vincent *et al.* d'origine environnementale appartiennent au groupe 2 (deux s'associent au Cluster II et une au Cluster III). La souche Urg-7 est un exemple des dix souches comprises dans le Cluster II (cercles jaunes). La souche PPF-1 est un exemple des six souches comprises dans le Cluster III (cercles turquoise). La barre de mesure représente le nombre de substitutions par site. La distance entre le groupe 3 et les deux autres groupes a été tronquée, mais est illustrée à l'échelle dans le coin supérieur droit de l'image.

Figure modifiée (traduction et édition d'image) d'après une figure originale de Vincent *et al.* (Vincent *et al.*, 2017), utilisée sous licence RightsLink (#4283080286886) avec la permission d'Oxford University Press (OUP) au nom de la *Federation of European Microbiological Societies* (FEMS). OUP et FEMS ne sont pas légalement responsables de la fidélité de la traduction effectuée et du contenu des modifications apportées. C. Gagné-Thivierge en assume l'entière responsabilité.

Les souches du Cluster II sont génétiquement plus proches des souches du Cluster III que de celles du Cluster I, ce qui est probablement le reflet de l'appartenance à une niche écologique commune des souches des Clusters II et III. Par contre, le Cluster II partage plusieurs similitudes phénotypiques avec les souches cliniques du Cluster I. Les données disponibles sur l'état de santé des patients au moment de l'échantillonnage des souches

du Cluster I étant fragmentaires, il est possible que ces patients n'aient pas été infectés de façon chronique et que les souches isolées aient été encore en processus d'adaptation à l'infection pulmonaire. C'est possiblement parce qu'elles n'auraient pour la plupart pas encore développé les caractéristiques habituelles des souches chroniques que les souches cliniques du Cluster I seraient donc, d'un point de vue phénotypique, plutôt ressemblantes à celles environnementales du Cluster II (A.T. Vincent, communication personnelle).

Les souches du Cluster III, quant à elles, sont singulières. Elles possèdent des gènes codant pour des épimérasés (des enzymes impliquées dans la formation des lipopolysaccharides (LPS) et l'attribution du sérotype de la bactérie (Kneidinger *et al.*, 2003)) et produisent très peu d'élastase, mais beaucoup de biofilm (Ouellet *et al.*, 2014). De plus, leur QS est perturbé par l'insertion d'un élément d'ADN mobile à l'intérieur du gène *lasR* (Vincent *et al.*, 2017).

À la lumière des résultats de leur étude, Vincent *et al.* ont émis l'hypothèse que les isolats du Cluster III étaient peut-être le fruit d'une adaptation à la colonisation de canalisations d'eau potable (Vincent *et al.*, 2017). Cependant, cette adaptation semble partager plusieurs similarités avec l'adaptation de *P. aeruginosa* qui s'effectue lors de l'infection pulmonaire FK (diminution de la motilité, augmentation de la formation de biofilms, perturbation du QS, etc.). Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que certains environnements parviennent à induire un stress sur les bactéries qui entraîne une évolution similaire à celle menant au développement de la chronicité des infections dans les poumons des personnes atteintes de FK. Ils concluent en remarquant que, s'il est vrai que l'adaptation de *P. aeruginosa* à différents environnements peut converger vers un résultat évolutif équivalent, l'étude de *P. aeruginosa* ne devrait donc pas se restreindre à l'évaluation de souches cliniques. Il n'est, en effet, pas exclu que les souches environnementales ne soient pas toutes similaires et que certaines d'entre elles en viennent à représenter un risque important pour les patients souffrant de FK.

1.1.8 La nécessité de trouver de nouveaux moyens de lutte contre *Pseudomonas aeruginosa*

Considérant les caractéristiques particulières des souches de *P. aeruginosa* adaptées à la FK, il est actuellement très complexe de soigner les patients infectés. Des antibiotiques

peuvent être administrés par voie orale, par intraveineuse ou par inhalation (Cystic Fibrosis Foundation, 2018). Cependant, étant donné le développement fréquent de résistances aux antibiotiques lors de l'adaptation de *P. aeruginosa* à la FK, le type de traitement choisi doit être ajusté en fonction du patient et des souches de *P. aeruginosa* retrouvées et peut, malgré tout, éventuellement échouer. De façon presque inévitable, l'infection devient alors chronique et impossible à éliminer (Doring *et al.*, 2000; Folkesson *et al.*, 2012).

Une approche proposée pour contrer cette problématique serait d'altérer un ou plusieurs facteurs de virulence de *P. aeruginosa* nécessaire(s) à l'infection afin de limiter sa capacité infectieuse et augmenter l'efficacité des traitements déjà existants. Plusieurs chercheurs intéressés par cette démarche envisagent le QS et/ou le biofilm comme facteurs de virulence à cibler (Sharma *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014; O Muimhneachain *et al.*, 2018).

1.1.9 Les biofilms et leur importance

La formation de biofilm est intimement liée au QS (Fazli *et al.*, 2014). Il s'agit d'un mode de croissance microbien qui se caractérise par l'attachement à une surface et la production, par les microorganismes, d'exopolysaccharides. Ces polymères de sucres viennent entourer les cellules microbiennes qui les produisent, formant un manteau protecteur. En plus des exopolysaccharides produits par les microorganismes, le biofilm comprend toutes sortes de matériaux cellulaires (ADN, lipides, protéines) qui façonnent sa structure et ses propriétés physico-chimiques (Wei et Ma, 2013).

De façon simplifiée, la formation de biofilm peut être divisée en cinq étapes (Stoodley *et al.*, 2002; Toyofuku *et al.*, 2015). 1) Tout d'abord, des cellules planctoniques adhèrent de façon réversible à une surface. 2) Éventuellement, notamment grâce à un début de production d'exopolysaccharides qui permet de stabiliser l'attachement, une ou quelques cellules se fixent de façon irréversible à la surface. 3) Ensuite, il y a prolifération des cellules à l'intérieur du jeune biofilm, qui prend de l'expansion. 4) Puis, le biofilm mature, développant une structure influencée par l'environnement dans lequel il se trouve. Cela crée des microenvironnements au sein du biofilm et les phénotypes de la population bactérienne qui s'y trouve se diversifient, en fonction de ces microenvironnements. 5) Finalement, une partie des cellules microbiennes (sous forme planctonique ou dans un

morceau arraché au biofilm) va être libéré afin de permettre la colonisation d'un nouvel endroit.

Les biofilms se retrouvent partout. Bien que les débuts de la microbiologie en aient fait abstraction en se concentrant sur l'étude de cultures pures de microorganismes planctoniques, on considère aujourd'hui que c'est sous forme de biofilms que vit certainement la majorité des bactéries (Costerton *et al.*, 1978).

D'un point de vue humain, bien qu'ils puissent parfois être avantageux (ils peuvent, par exemple, être utilisés comme biofiltres pour le traitement de l'air et des eaux usées (Wani *et al.*, 1997; Cohen, 2001)), les biofilms sont le plus souvent perçus négativement. Dans l'industrie maritime, l'accumulation de biofilms sur la coque des navires diminue l'hydrodynamisme de ces derniers, entraînant une augmentation de la consommation en carburant (Townsin, 2003). Dans l'industrie alimentaire, la formation de biofilms sur les équipements peut présenter un risque pour la qualité et la sécurité des produits (Winkelströter *et al.*, 2014). Dans les canalisations d'eau potable, les biofilms peuvent présenter un risque sanitaire, en plus d'être impliqués dans la corrosion des tuyaux (Wingender et Flemming, 2011; Vargas *et al.*, 2017). Les biofilms sont également une cause d'inquiétude importante dans le domaine médical, où il est question de microorganismes pathogènes envers l'humain dans un environnement comptant de nombreuses personnes à la santé fragile (Costerton *et al.*, 1999).

Les biofilms de *P. aeruginosa* sont parmi les plus étudiés. Dans le domaine médical, ils ont d'ailleurs été documentés dès 1980 (Lam *et al.*, 1980), à la même époque où le terme « biofilm » fut popularisé par William J. Costerton (Costerton *et al.*, 1978; McCoy *et al.*, 1981). Cette observation provenait de poumons de patients atteints de FK et vint poser l'hypothèse que la formation de biofilms pourrait jouer un rôle important pour la virulence de *P. aeruginosa* dans ce contexte.

1.1.10 La formation de biofilm comme facteur de virulence

La capacité de *P. aeruginosa* à former un biofilm lui permet de persister de façon chronique dans le poumon FK, en augmentant grandement sa résistance aux traitements et au système immunitaire déjà déficient du patient (Wei et Ma, 2013; Mulcahy *et al.*, 2014). Bien qu'aucun consensus ne soit établi, il a été proposé que cette résistance accrue procurée par les biofilms provienne de multiples mécanismes potentiels agissant

conjointement (**Figure 1.4**) : pénétration possiblement diminuée des molécules de grande taille (comme les immunoglobulines) dans le biofilm (Baltimore et Mitchell, 1980) ; neutralisation des molécules chargées (tels certains antibiotiques) par les composantes de la matrice extracellulaire du biofilm (Chiang *et al.*, 2013) ; induction d'une réponse au stress (et donc d'une résistance adaptative) des bactéries situées en périphérie du biofilm (Giwerzman *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 2015) ; formation d'un microenvironnement offrant des conditions de croissance peu favorables en profondeur du biofilm, conduisant à une diminution de l'activité métabolique des bactéries s'y trouvant (Walters *et al.*, 2003) ; et présence de cellules persistantes, insensibles à certains agents bactéricides (Spoering et Lewis, 2001; Mulcahy *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2018).

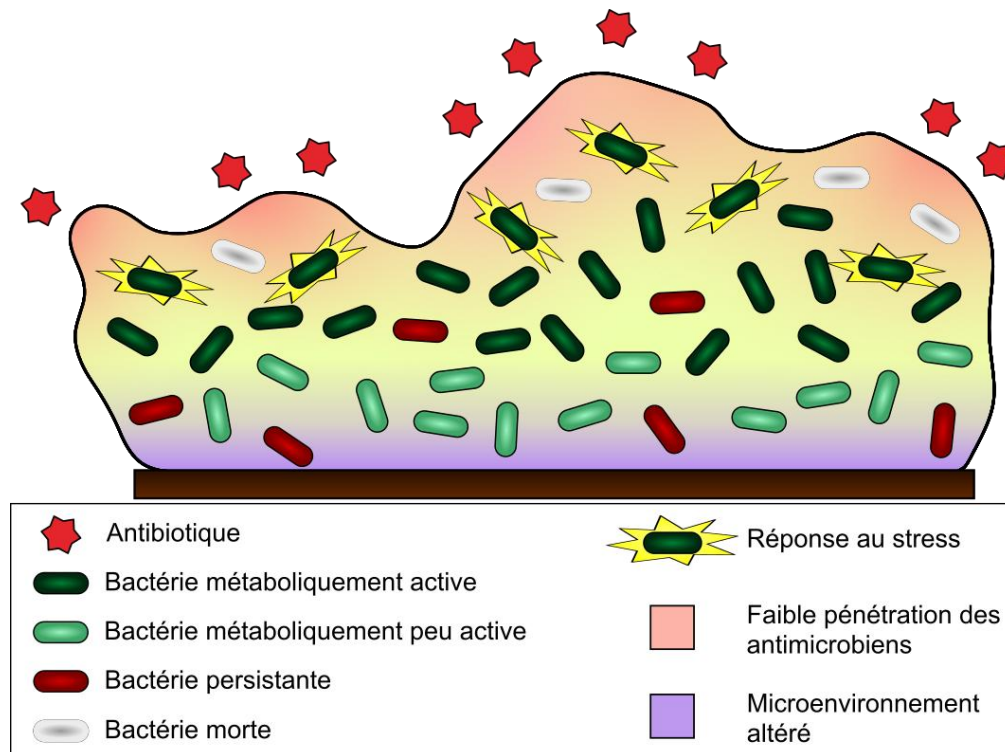


Figure 1.4 Mécanismes augmentant la résistance des bactéries à l'intérieur d'un biofilm.

Certaines bactéries présentes dans le biofilm sont naturellement persistantes, mais elles ne sont pas nécessairement les seules à survivre à un traitement antibiotique. Les antibiotiques peuvent être moins efficaces sur les bactéries enfouies dans le biofilm, entre autres, car elles ont peu accès aux nutriments et à l'oxygène de l'environnement et sont donc métaboliquement peu actives. De plus, les bactéries en périphérie, si elles produisent des molécules inhibant l'effet des antibiotiques (par exemple des β -lactamase), vont indirectement protéger les bactéries en profondeur. Par ailleurs, les substances extrapolymeriques composant la matrice du biofilm peuvent empêcher les antibiotiques d'atteindre ces bactéries. Même lorsqu'un

traitement parvient à tuer une partie de la population bactérienne du biofilm, la partie survivante pourra par la suite proliférer.

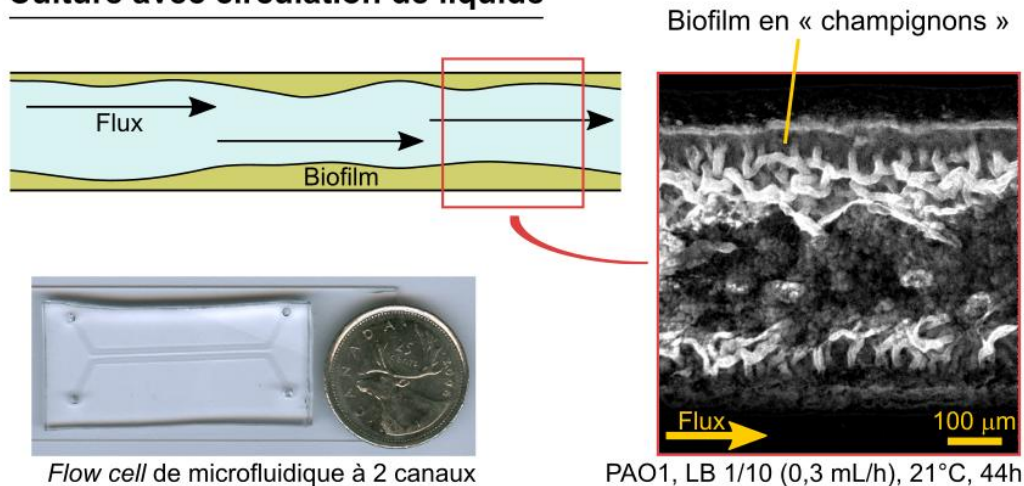
Actuellement, pour combattre les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez les gens atteints de FK, il convient d'agir avant la formation de biofilms. Lorsque des souches fortement productrices de biofilms s'installent, des souches adaptées à la FK et dites mucoïdes, l'infection devient généralement chronique et l'espérance de vie du patient diminue (Li *et al.*, 2005; Pressler *et al.*, 2006). Cela explique la grande importance accordée depuis plusieurs décennies à l'étude des biofilms de *P. aeruginosa*, si bien qu'aujourd'hui les sentiers métaboliques nécessaires à la production de biofilms par cette bactérie sont très bien connus.

1.1.11 Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*

Comme mentionné précédemment, l'alginate est le composant principal de la matrice des biofilms de *P. aeruginosa* dans le cas des souches mucoïdes, adaptées à la FK (Wozniak *et al.*, 2003). Cela est dû à une surexpression du facteur AlgU, due à la sous expression du régulateur MucA. Le facteur AlgU (également nommé AlgT ou σ^{22}) induit alors l'expression de nombreux gènes permettant la biosynthèse de l'alginate (Ramsey et Wozniak, 2005). Cependant, chez les souches non adaptées à la FK, comme PAO1, ce sont Pel et Psl qui sont les exopolysaccharides principalement produits pour former la matrice, et non l'alginate (Colvin *et al.*, 2012).

La morphologie des biofilms de la souche PAO1 est bien connue. Sur des surfaces immergées, dans un environnement où il y a circulation de liquide, cette bactérie est reconnue pour former des biofilms dont la structure finale s'élève, laissant la place à une circulation du liquide à la base du biofilm. Cela lui donne un peu l'apparence de champignons (Klausen *et al.*, 2003). Il est également connu que, en croissance liquide statique, c'est sur la partie de la surface à l'interface entre l'air et le liquide que le biofilm de *P. aeruginosa* se forme préférentiellement (O'Toole, 2011). Le biofilm peut également s'étendre à la surface du liquide. On parle alors de formation de pellicule (Friedman et Kolter, 2004) (**Figure 1.5**).

Culture avec circulation de liquide



Culture liquide statique

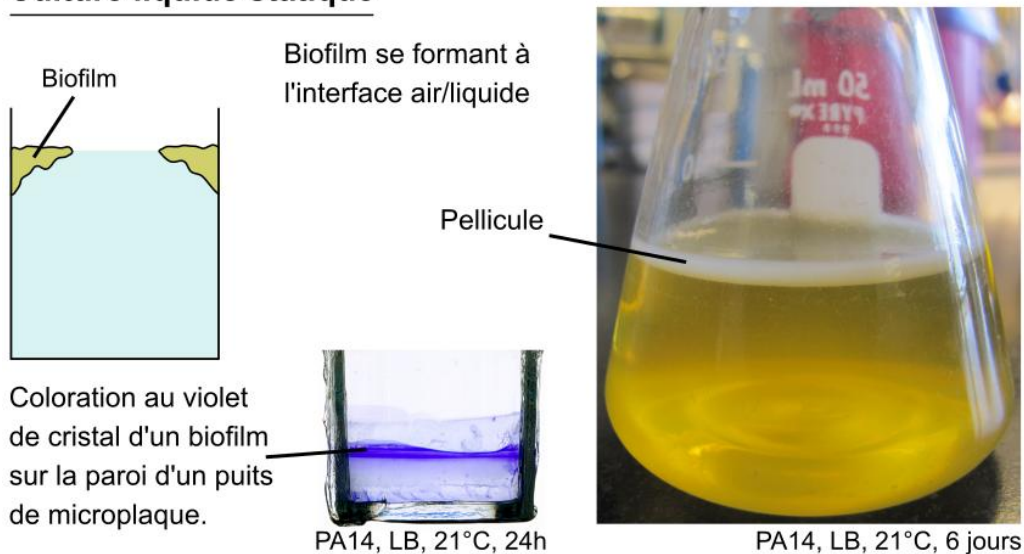


Figure 1.5 Exemples de biofilms de *P. aeruginosa*.

En faisant circuler du milieu de culture dans des canaux microscopiques inoculés avec la souche PAO1, il est possible d'y observer une structuration des biofilms qui leur donne une apparence rappelant celle de champignons. Dans un environnement stagnant, c'est à l'interface entre l'air et le milieu de culture qu'on retrouve la formation de biofilm de *P. aeruginosa*. La souche PA14, une grande productrice de pellicules, l'illustre bien.

Cependant, ces éléments ne permettent pas forcément une compréhension du processus infectieux dans les poumons des personnes atteintes de FK. En effet, dans ce cas, les biofilms retrouvés ne sont pas attachés aux cellules épithéliales, mais se forment plutôt dans l'épais mucus des poumons malades (Lam *et al.*, 1980; Bjarnsholt *et al.*, 2013). Ainsi, les structures en champignon ne sont pas observées. On parle plutôt de microcolonies ou d'agrégats (Sriramulu *et al.*, 2005; Bjarnsholt *et al.*, 2013). Le terme

« structure ressemblant à du biofilm » (BLS pour « *biofilm-like structure* », en anglais) a également été proposé pour les décrire (Haley *et al.*, 2012), puisque ces structures ne correspondent pas à la définition habituelle des biofilms, qui implique l'adhésion à une surface. Quel que soit le nom qu'on lui donne, ce type de formation ressemblant à du biofilm a été bien moins étudié que la formation de « biofilm traditionnel » (c'est-à-dire attaché à une surface). Il représente pourtant une réalité plus proche de ce qui est retrouvé dans les poumons des patients souffrant de FK et qui est si important pour la persistance de la bactérie.

Un milieu de culture reproduisant le mucus pulmonaire, le milieu ASM (*artificial sputum medium*), a été mis au point afin de rendre possible ce phénotype d'agrégation avec la souche PAO1 (Sriramulu *et al.*, 2005). Néanmoins, PAO1 n'est pas une souche adaptée à la FK et ne produit pas de fortes quantités d'alginate (Colvin *et al.*, 2012). Tout comme pour l'étude des mécanismes moléculaires de virulence de *P. aeruginosa* en contexte de FK, il est possible que l'utilisation de la souche de référence PAO1 comme modèle ne soit pas suffisante.

1.2 Hypothèse de recherche

L'adaptation de *P. aeruginosa* au contexte infectieux particulier de la FK a été le sujet de plusieurs études permettant d'en comprendre quelques éléments clefs. Ainsi, la prévalence de certaines mutations et phénotypes liés a été plusieurs fois démontrée. Cependant, nos connaissances sur la façon de lutter efficacement contre ces souches adaptées demeurent peu exhaustives. L'idée de brider un facteur de virulence particulier de la bactérie pour parvenir à diminuer sa capacité à persister dans les poumons a été proposée (Kipnis *et al.*, 2006; Clatworthy *et al.*, 2007).

Pour arriver tout d'abord à identifier une cible thérapeutique potentielle, en amont de ce projet, une banque d'environ 10 000 mutants uniques de la souche LESB58 a été créée par STM (Winstanley *et al.*, 2009). Cette méthode consiste à insérer à l'intérieur de la cellule cible un plasmide suicide porteur d'un transposon possédant un gène de résistance à un antibiotique flanqué d'une séquence « étiquette » qui permet de reconnaître le mutant. En identifiant, par criblage, un mutant significativement moins virulent que la souche sauvage LESB58, on peut ainsi supposer que le gène inactivé de ce mutant est nécessaire à la virulence de LESB58. Par la suite, l'étude des phénotypes altérés de ce

mutant devrait permettre de comprendre le rôle de ce gène. Ultiment, en reproduisant l'effet de la mutation sur la souche sauvage (en inhibant la transcription du gène identifié ou l'activité de la protéine qu'il encode, par exemple (Clatworthy *et al.*, 2007; Heras *et al.*, 2015)), il serait théoriquement possible de réduire sa capacité à se maintenir dans les poumons des gens souffrant de FK.

Par ailleurs, considérant que la formation de biofilms est déjà connue comme étant un facteur de virulence de première importance chez les souches de *P. aeruginosa* adaptées à la FK, il est supposé que l'inhibition de la formation de biofilms serait une façon efficace de lutter contre la persistance de ces souches dans les poumons des patients infectés. Plusieurs méthodes d'inhibition des biofilms ont déjà été proposées, telles que la séquestration des protéines d'adhésion produites par la bactérie, la modulation des molécules du QS et la lyse de la matrice du biofilm (Beloin *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014). Cependant, ces méthodes se basent généralement sur l'étude de biofilms de la souche PAO1 produits sur des surfaces. Ces biofilms ne représentent pas le type de biofilms qui est retrouvé dans les poumons des patients atteints de FK, ceux-ci étant riches en alginate et n'étant pas en contact avec les cellules épithéliales. Comparer la formation de biofilms, adhésés ou non, de différentes souches de *P. aeruginosa*, d'origine clinique ou provenant de l'environnement, devrait nous permettre d'avoir une vision plus globale et réaliste de la faisabilité d'inhiber la formation de biofilms pour lutter contre la chronicité des infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de FK.

1.3 Objectifs spécifiques

Deux objectifs spécifiques avaient été établis pour ce projet :

1) Identifier une ou des cibles thérapeutiques potentielles chez *P. aeruginosa* qui pourraient offrir une alternative aux traitements actuels des infections pulmonaires chroniques par cette bactérie chez les gens souffrants de FK. Cet objectif est une poursuite du projet de criblage génétique de mutants STM de LESB58. Il a consisté en la caractérisation phénotypique du mutant STM PALES_11731, incapable de maintenir une infection dans le poumon de rat, de provoquer une septicémie rapide chez la drosophile et de résister à la prédation par l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Les résultats liés à cet objectif sont présentés sous la forme d'un article scientifique publié dans *BMC Research Notes* et constituent le chapitre 2 du présent document.

2) Comparer la formation de biofilms entre différentes souches de *P. aeruginosa* et la variabilité de l'effet d'un ajout d'ions cationiques sur cette formation. Cet objectif avait pour but d'accroître nos connaissances sur la diversité phénotypique possible des biofilms de *P. aeruginosa*. Ainsi, la formation de biofilms et de BLS de LESB58 a été comparée à celle de PAO1 et de deux isolats environnementaux, PPF-1 et Urg-7. L'effet de la modification du milieu par l'ajout d'ions sur la formation de biofilms des quatre souches a également été comparé. Les résultats liés à cet objectif représentent le chapitre 3 de ce mémoire et sont également présentés sous la forme d'un article scientifique. Cet article a été soumis à *FEMS Microbiology Letters*.

Chapitre 2 : Identification à l'aide d'une approche multi-hôtes d'un mutant par transposon de *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 ayant une virulence atténuée

2.1.1 Résumé

Pseudomonas aeruginosa cause des infections pulmonaires chroniques chez les gens atteints de fibrose kystique (FK). Puisque certaines souches adaptées à cette niche montrent des phénotypes distincts, il est nécessaire d'étudier des isolats provenant de patients FK, comme les *Liverpool Epidemic Strains* (LES), pour acquérir une meilleure compréhension des gènes essentiels à l'infection pulmonaire FK. Une bibliothèque de mutants de la souche LESB58, générée par mutagenèse par étiquette (STM) et criblée dans un modèle murin d'infection pulmonaire chronique, a permis d'identifier 163 mutants incapables de persistance *in vivo*. Ces 163 mutants ont été successivement criblés dans deux autres hôtes modèles (l'amibe et la drosophile). Le mutant STM PALES_11731 a été le moins virulent dans les trois hôtes, étant même 20 fois moins virulent que LESB58 chez le rat. Cette étude démontre la pertinence d'une approche multi-hôte pour l'étude des déterminants génétiques des souches de *P. aeruginosa* infectant les patients FK.

2.2 A multi-host approach to identify a transposon mutant of *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 lacking full virulence

Cynthia Gagné-Thivierge^{1,2,3}, Irena Kukavica-Ibrulj^{1,4}, Geneviève Filion^{1,2,3}, Valérie Dekimpe⁵, Sok Gheck E Tan^{1,2,3}, Antony T. Vincent^{1,2,3}, Éric Déziel⁵, Roger C. Levesque^{1,4} and Steve J. Charette^{1,2,3}

¹Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

²Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

³Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Quebec City, Quebec, Canada

⁴Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec city, Quebec, Canada

⁵INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Quebec, Canada

2.2.1 Abstract

OBJECTIVE: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic bacterial pathogen well known to cause chronic lung infections in individuals with cystic fibrosis (CF). Some strains adapted to this particular niche show distinct phenotypes, such as biofilm hyperproduction. It is necessary to study CF clinical *P. aeruginosa* isolates, such as Liverpool Epidemic Strains (LES), to acquire a better understanding of the key genes essential for *in vivo* maintenance and the major virulence mechanisms involved in CF lung infections. Previously, a library of 9216 mutants of the LESB58 strain were generated by signature-tagged mutagenesis (STM) and screened in the rat model of chronic lung infection, allowing the identification of 163 STM mutants showing defects in *in vivo* maintenance.

RESULTS: In the present study, these 163 mutants were successively screened in two additional surrogate host models (the amoeba and the fruit fly). The STM PALES_11731 mutant was the unique non-virulent in the three hosts. A competitive index study in rat lungs confirmed that the mutant was 20-fold less virulent than the wild-type strain. This study demonstrated the pertinence to use a multi-host approach to study the genetic determinants of *P. aeruginosa* strains infecting CF patients.

2.2.2 Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common pathogenic bacteria causing lung infections among cystic fibrosis (CF) patients (Harun *et al.*, 2016). *P. aeruginosa* infecting CF patients undergo microevolution: mucoid strains, which also express lower levels of virulence factors such as type three secretion system (TTSS) effectors, are favored. Those are the CF-adapted *P. aeruginosa* strains (Smith *et al.*, 2006; Sousa and Pereira, 2014).

The Liverpool Epidemic Strain (LES) B58 (LESB58) is one of those strains found in chronic CF lung infections and one of the first *P. aeruginosa* strains identified as epidemic among CF patients (Cheng *et al.*, 1996). The phenotypic features of LES include biofilm hyperproduction and resistance to several clinically useful antibiotics (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008).

P. aeruginosa studies classically use the strain PAO1, originally isolated from a human wound (Stover *et al.*, 2000). However, knowing that CF-adapted strains have unique phenotypes, it is necessary to use CF-adapted strains such as LESB58 to explore genes involved in the virulence and the *in vivo* maintenance of *P. aeruginosa* in CF lungs.

To determine which genes are the most important for LESB58's pathogenicity, signature-tagged mutagenesis (STM) was used to create 9216 mutants. In a screening for the survival of the STM mutants in the rat model of chronic lung infection, 163 mutants had a growth defect *in vivo*, suggesting subdued virulence (Winstanley *et al.*, 2009).

In the present study, we performed additional screening of the 163 mutants, this time using successively the amoeba *Dictyostelium discoideum* and the fly *Drosophila melanogaster* as two other surrogate host models. The rat, the amoeba and the fly are three very different model hosts in the study of bacterial virulence and served respectively as a chronic lung infection model (Cash *et al.*, 1979), a phagocyte model (Lima *et al.*, 2011), and a systemic infection model (Haller *et al.*, 2014). We were able to identify that the STM PALES_11731 mutant was the only one that was defective in all three hosts.

MAIN TEXT

2.2.3 Materials and methods

2.2.3.1 Bacterial strains

The *P. aeruginosa* LESB58 strain was isolated from a chronic lung infection of a CF patient in Liverpool (United Kingdom), in 1996 (Cheng *et al.*, 1996). We later reported its STM PALES_11731 mutant, in 2009 (Winstanley *et al.*, 2009).

2.2.3.2 *Dictyostelium discoideum* predation assay

Bacterial lawns were prepared by suspending bacteria in lysogeny broth (LB) (OD₅₉₅ of 2) and spreading 300 µL of this suspension on a SM 1/5 Petri dish (Filion and Charette, 2014). *D. discoideum* DH1-10 cells routinely grown at 21°C in HL5 medium supplemented with 15 µg/mL of tetracycline were used as a host (Mercanti *et al.*, 2006). Cells were washed and resuspended in HL5 without tetracycline, counted using a haemocytometer, and serial dilutions were performed to obtain: 3000, 1000, 300, 100, 30 or 10 cells/5 µL. These dilutions were spotted (5 µL drops) on the dried bacterial lawn and the Petri dishes were incubated at room temperature (21–23°C) for 6 days.

2.2.3.3 Fly pricking assay

Adult female flies aged of 7 ± 2 days were pricked according to a modified previously published protocol (Castonguay-Vanier *et al.*, 2010). Bacterial cells were grown in tryptic soy broth (TSB) and diluted to an OD₆₀₀ of 0.2 in a sterile solution of 10 mM MgSO₄ supplemented with 100 µg/mL ampicillin. The flies were anesthetized using CO₂ and pricked in the dorsal thorax using a 23S gauge Hamilton needle dipped in the appropriate bacterial suspension. For each strain tested, at least 30 flies were infected. The flies were separated into groups of 10 in vials containing 5% sucrose solidified with 1.5% agar. At least 10 control flies were also pricked with a solution of 10 mM MgSO₄ supplemented with 100 µg/mL ampicillin. The flies were kept at 25°C and 65% humidity. Fly survival was recorded daily and survival data was compiled and analyzed with Kaplan-Meier survival curves. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to assess significance between the curves.

2.2.3.4 Competitive index in rat model

Agar beads were prepared according to a modification of a previously described method (Cash *et al.*, 1979; Kukavica-Ibrulj and Levesque, 2008). The STM PALES_11731 mutant (tagged with tetracycline resistance within mini-Tn5 transposon) and the wild-type LESB58 were grown separately in TSB. Overnight cultures were sedimented by centrifugation (3000 × *g*, 10 min), washed twice with 1 mL of phosphate buffered saline (PBS), and added to 9 mL of 2% agar, prewarmed to 48°C. A mixture of equal counts of wild-type and mutant cells was added to 200 mL heavy mineral oil at 48°C with rapid stirring on a magnetic stirrer in a water bath for 5 min at room temperature, followed by 10 min without stirring. The oil-agar mixture was centrifuged (3000 × *g*, 20 min) to sediment the beads and washed twice with PBS. The preparations, containing beads of 100 to 200 µm in diameter, were used as inocula for animal experiments. The number of bacteria in the beads was determined by homogenizing the bacterial bead suspension and plating 10-fold serial dilutions on Mueller-Hinton agar (MHA) and MHA supplemented with 45 µg/mL tetracycline.

Six Sprague–Dawley rats were anaesthetized using isoflurane (2% of respiratory volume) and inoculated by intubation using a venous catheter 18G and syringe (1-cc Tuberculin) with 120 µL of a suspension of agar beads-embedded bacteria containing approximately 2×10^7 colony-forming units (CFU)/injection. 7 days later, the bacteria were extracted from the infected rat lungs and counted using MHA for the total bacterial number of LESB58 wild-type cells and STM mutant cells or with MHA with 45 µg/mL tetracycline for STM mutant selection.

The *in vivo* competitive index (CI) was determined as the CFU output (*in vivo*) ratio of the STM PALES_11731 mutant in comparison to the wild-type strain, divided by the CFU input ratio of mutant to wild type (Beuzón and Holden, 2001; Hava and Camilli, 2002). The final CI was calculated as the geometric mean of the individual animals' CI.

2.2.4 Results and discussion

2.2.4.1 Reduced virulence of LESB58 mutants in *Dictyostelium discoideum*

We assessed the ability of the 163 STM mutants identified in the rat lung infection model (Winstanley *et al.*, 2009) to resist the predation of *D. discoideum* cells, a well-recognized

model to study the virulence of *P. aeruginosa* (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Fillion and Charette, 2014). The phagocytosis mechanism in *D. discoideum* highly resembles that of human macrophages (Bozzaro *et al.*, 2008). This host therefore allows the identification of bacteria able to kill phagocytes or to resist to their internalization or digestion (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2011). Among the 163 mutants, 45 mutants displayed sensitivity to amoeba predation. Fourteen of them were highly sensitive, as revealed specifically by the formation of large phagocytic plaques for any given concentration of *D. discoideum* cells on the lawn of these mutants, whereas only the highest amoeba concentrations could produce small phagocytic plaques when using the wild-type bacterium (**Figure 2.1**). Three of the mutants had a growth defect assessed with Bioscreen C (data not shown). Therefore, only the remaining 11 mutants, previously selected in the rat model and sensitive to predation in the amoeba model (**Additional file 1: Table 2.S1**), were kept for further analysis in the *Drosophila* host model.

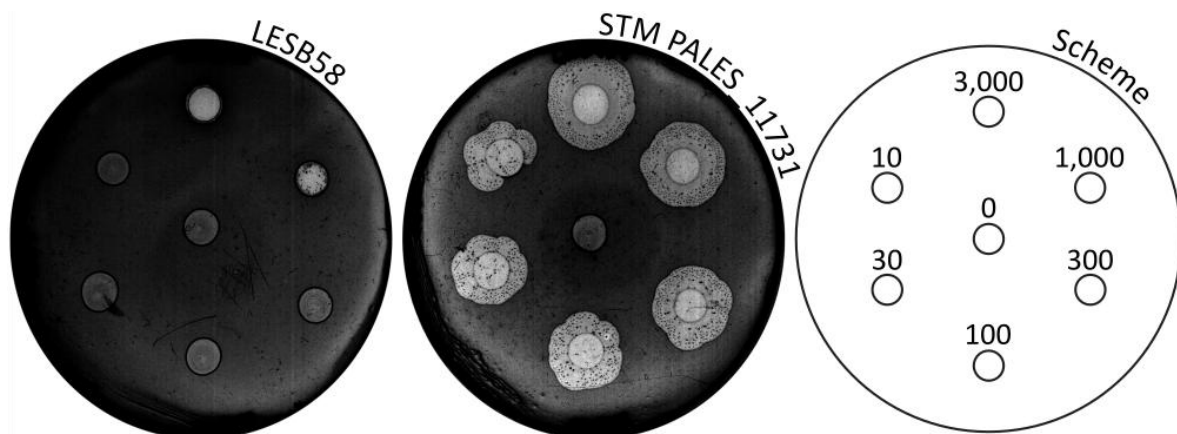


Figure 2.1 Example of a non-virulent LESB58 STM mutant in the amoeba model. Drops of determined amoeba concentrations were spotted on a bacterial lawn, allowing a semi-quantitative determination of the bacteria's predation resistance after 6 days of incubation at 21–23°C. Phagocytic plaques appear as light areas on the bacterial lawn. At least 1000 *D. discoideum* cells/5 μ L were required to pierce the wild-type bacterial lawn, whereas fewer amoeba cells were needed to form a phagocytic plaque for mutants with reduced virulence in this context. The results were later confirmed (n=3).

2.2.4.2 Identification of the STM PALES_11731 mutant with the *Drosophila* systemic model

Because the well-studied immune system of *D. melanogaster* shares similarities with that of mammals, this host provides an easy alternative model of infection for the study of human pathogens' virulence mechanisms (Vodovar *et al.*, 2004; Lemaitre and Hoffmann,

2007). *D. melanogaster* can serve as a model host for systemic *Pseudomonas* infections (Haller *et al.*, 2014) and was used as a third surrogate model to identify LESB58 mutants with a broad virulence defect, resulting in them being less able to cause systemic infections. The test was performed using the 11 remaining STM mutants. Four of these mutants were less virulent in this assay, as the flies' survival time was significantly longer when compared to the wild type (**Figure 2.2**). However, the STM PALES_11731 mutant was by far the most attenuated, with a survival time 80 h longer than LESB58, compared to only a delay of 1-5 h for the three other reduced mutants.

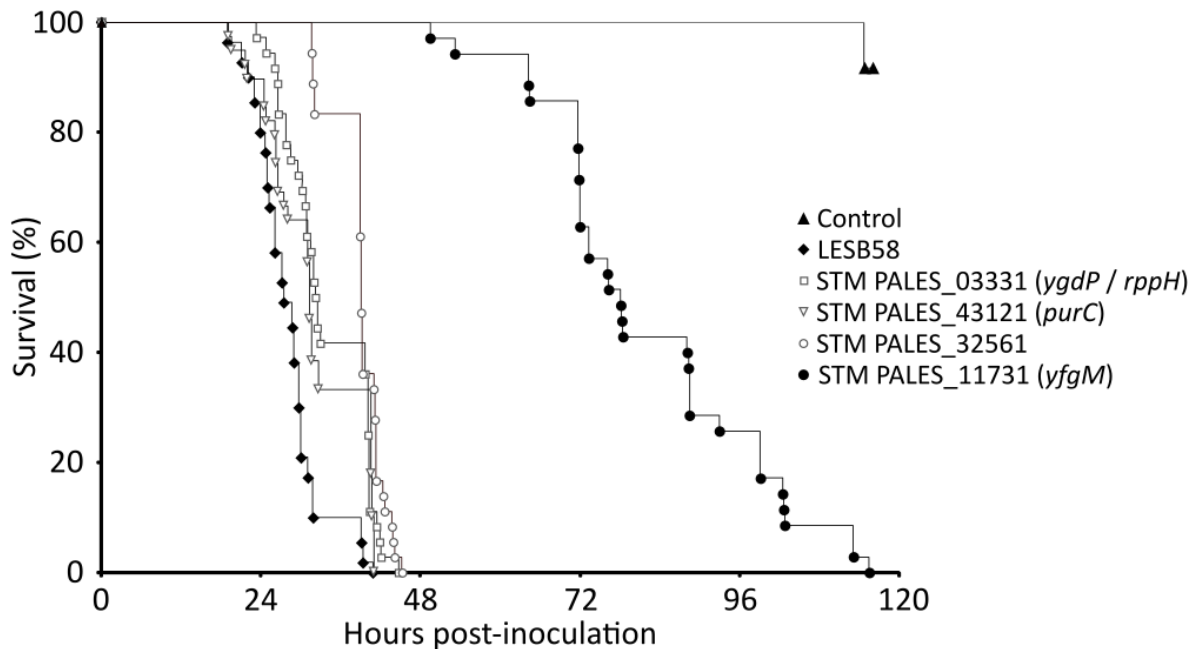


Figure 2.2 The STM PALES_11731 mutant has a very low virulence in the drosophila infection model.

At least 30 flies were pricked with a needle dipped in bacterial suspension and the insect survival rate was followed over time. By comparison with the wild-type strain (black diamonds), which caused the death of infected flies in less than 40 h, 4 of the 11 mutants were less virulent. One of them (STM PALES_11731 mutant, black circles) was particularly less virulent, with some flies surviving the infection until about 115 h. For the sake of clarity, the 7 mutants displaying virulence equivalent to the wild-type strain (LESB58) are not shown on the graph.

2.2.4.3 The STM PALES_11731 mutant is strongly attenuated in the chronic lung infection model

To estimate the defect in virulence of the STM PALES_11731 mutant, a CI in combination with the wild-type strain was performed in the rat lung model. The CI allows a quantitative evaluation of the defect for *in vivo* maintenance in a model of chronic lung infection

(Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2014). A CI of 0.05 was obtained for the STM PALES_11731 mutant (**Figure 2.3**), indicating that the mutant is 20-fold less capable of *in vivo* maintenance than the wild-type strain. Considering this, the STM PALES_11731 mutant was further characterized to identify the mutated gene and its potential role in the virulence of LESB58.

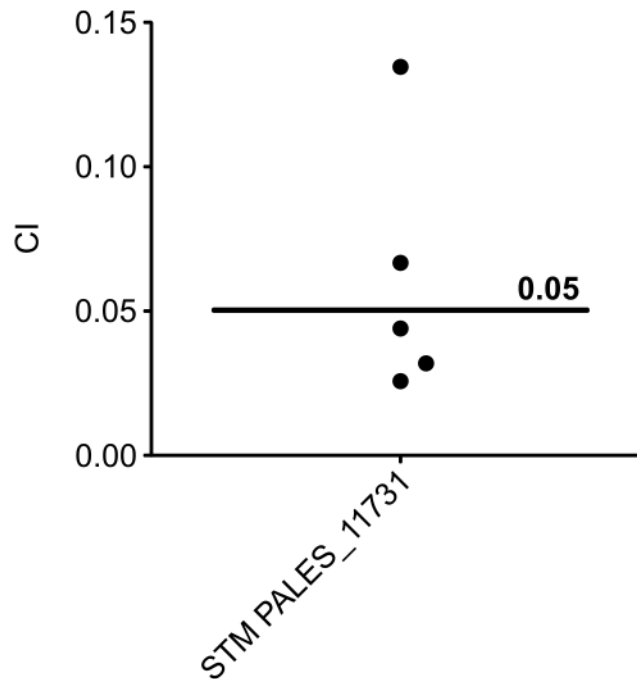


Figure 2.3 The STM PALES_11731 mutant is 20 times less virulent than the wild-type bacteria in a rat lung infection model.

Rats were infected with a mixture of mutant and wild-type cells in an equal ratio. After 7 days, CFU recovered for the mutant compared to the wild-type bacteria were calculated to obtain the competitive index (CI). Because one rat died before the end of the experiment, only the results for five of the six rats were analyzed. Each circle represents the CI determined in each rat. A CI < 0.4 indicates a highly attenuated persistence of the mutant (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2014). The mean CI for the STM PALES_11731 mutant is 0.05 and, knowing that it is not due to a growth defect (see **Additional file 1: Figures 2.S6 and 2.S7**), these results confirm that STM PALES_11731 mutant virulence is seriously compromised in this model.

2.2.4.4 Potential consequences of the transposon insertion in the STM PALES_11731 mutant

Genotyping (Winstanley *et al.*, 2009) of the STM PALES_11731 mutant revealed that the mini-Tn5-*tet* transposon was inserted in the 3' region of gene PALES_11731 (*yfgM*), 10 nucleotides before the end of the gene's sequence (**Additional file 1: Figure 2.S1**). PALES_11731 codes for YfgM, an ancillary SecYEG translocon subunit (Gotzke *et al.*,

2015) for which the exact function remains unclear. The insertion introduces a stop codon and the last 2 amino acids of the translated protein are missing (**Additional file 1: Figure 2.S2**). The predicted structure of the protein suggests that the mutation does not clearly affect the YfgM function. In *Escherichia coli*, an inactivation of *yfgM* increases the bacteria sensitivity to acidity (Gotzke *et al.*, 2015). The STM PALES_11731 mutant resistance to acid stress was, however, the same as for the wild-type strain (**Additional file 1: Table 2.S2**), supporting the idea that YfgM is still functional.

Polar effects are frequently observed in transposon mutagenesis. The mutated operon contains nine genes and the transposition in *yfgM*, the seventh, could have silenced the two downstream genes. RT-qPCR confirmed that there was no significant transcription defect of these genes (**Additional file 1: Figure 2.S3**). The following phenotypic tests were performed to confirm this result.

The eighth gene of the operon is PALES_11741 (*bamB*, previously named *yfgL*), coding for the outer membrane protein assembly factor BamB (YfgL). In *Salmonella enterica*, *bamB* was found to be necessary for the expression of the TTSS (Fardini *et al.*, 2007), a major virulence mechanism for many bacteria, including *P. aeruginosa* (Pukatzki *et al.*, 2002; Ader *et al.*, 2005; Büttner, 2012). We tested the TTSS expression of the STM PALES_11731 mutant but no significant difference with the wild type could be observed (**Additional file 1: Figure 2.S4**).

It was demonstrated that a *bamB* mutant in reference strain PAO1 is highly sensitive to antibiotics (especially those targeting cell wall synthesis) and lysozymes (Lee *et al.*, 2017). Therefore, we tested the resistance of the STM PALES_11731 mutant to piperacillin (a β -lactam antibiotic), tobramycin (an aminoglycoside antibiotic) and lysozymes. There was no significant difference with the wild type (**Additional file 1: Figure 2.S5**). This is an additional indication that *bamB* might not be affected by the transposition in the STM PALES_11731 mutant.

The ninth gene of the operon is *engA* (also known as *der*), coding for the GTP-binding protein EngA (GTPase Der). This protein plays an essential role in ribosome biogenesis and its inactivation causes growth defects, especially at cold temperatures (Bharat and Brown, 2014). Considering this, we compared the STM PALES_11731 mutant and the wild type growth in different conditions. LB medium, a not-restrictive medium, was chosen as it

is the most commonly used on *P. aeruginosa*. SM 1/5 medium, a diluted low-nutrient medium, was also tested. This medium was used for the amoeba predation assay at 21–23°C. In LB medium at 37°C, the wild-type strain, but not the STM PALES_11731 mutant, formed floating aggregates resembling biofilm. Since the usual biofilm definition implies an adhesion to a surface, we can refer to these unattached structures as biofilm-like structures (BLSs) (Haley *et al.*, 2012). This phenomenon caused variability in the growth curve measurements, but could be inhibited by the addition of Mg²⁺. Growth in LB medium supplemented with MgCl₂ confirmed the absence of a growth defect for the STM PALES_11731 mutant (**Additional file 1: Figure 2.S6**). The mutant growth was also comparable to the wild-type LESB58 in SM 1/5 medium at 21°C (**Additional file 1: Figure 2.S7**), which shows that *engA* is likely expressed in the mutant strain. These results also indicated that the STM PALES_11731 mutant defect in virulence is not due to an inherent growth defect.

2.2.4.5 The highly reduced virulence of the STM PALES_11731 mutant is likely multifactorial

The absence of a BLS formation for the STM PALES_11731 mutant, despite a similar-to-the-wild-type adhered biofilm formation (**Additional file 1: Figure 2.S8**), cannot itself completely explain the multi-host lack of virulence in the mutant. The amoeba predation assay was performed in a condition in which the wild-type strain does not form BLSs (**Additional file 1: Figure 2.S7**). However, there was a clear lack of resistance to phagocytosis of the mutant compared to the wild-type strain (**Figure 2.1**). Thus, there must be one or several other virulence mechanisms defective in the mutant to explain its weak resistance to amoeba predation.

Future studies will be necessary to fully understand the impact of the mini-Tn5-*tet* transposon insertion in the operon containing *yfgM*. Considering the broad virulence defect of the STM PALES_11731 mutant, this operon appears to play a key role in LESB58 virulence.

2.2.5 Limitations

Because the transposon did not appear to have an impact on the expression of any of the analyzed genes, it was not possible to link the lack of virulence of the STM PALES_11731 mutant with a specific gene.

2.2.6 References

- Ader, F., Le Berre, R., Faure, K., *et al.*, 2005. Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infect. Immun.* 73, 4263–4271.
- Beuzón, C.R., Holden, D.W., 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions *in vivo*. *Microbes Infect* 3, 1345–1352.
- Bharat, A., Brown, E.D., 2014. Phenotypic investigations of the depletion of EngA in *Escherichia coli* are consistent with a role in ribosome biogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 353, 26–32.
- Bozzaro, S., Bucci, C., Steinert, M., 2008. Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 271, 253–300.
- Büttner, D., 2012. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 262–310.
- Cash, H.A., Woods, D.E., McCullough, B., *et al.*, 1979. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis* 119, 453–459.
- Castonguay-Vanier, J., Vial, L., Tremblay, J., *et al.*, 2010. *Drosophila melanogaster* as a model host for the *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS One* 5, e11467.
- Cheng, K., Smyth, R.L., Govan, J.R., *et al.*, 1996. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 348, 639–642.
- Dallaire-Dufresne, S., Paquet, V.E., Charette, S.J., 2011. [*Dictyostelium discoideum*: a model for the study of bacterial virulence]. *Can J Microbiol* 57, 699–707.
- Fardini, Y., Chettab, K., Grépinet, O., *et al.*, 2007. The YfgL lipoprotein is essential for type III secretion system expression and virulence of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Infect Immun* 75, 358–370.
- Filion, G., Charette, S.J., 2014. Assessing *Pseudomonas aeruginosa* virulence using a nonmammalian host: *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol* 1149, 671–680.
- Gotzke, H., Muheim, C., Altelaar, A.F.M., *et al.*, 2015. Identification of putative substrates for the periplasmic chaperone YfgM in *Escherichia coli* using quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 216–226.
- Haley, C.L., Colmer-Hamood, J.A., Hamood, A.N., 2012. Characterization of biofilm-like structures formed by *Pseudomonas aeruginosa* in a synthetic mucus medium. *BMC Microbiol* 12, 181.
- Haller, S., Limmer, S., Ferrandon, D., 2014. Assessing *Pseudomonas* virulence with a nonmammalian host: *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol Biol* 1149, 723–740.
- Harun, S.N., Wainwright, C., Klein, K., *et al.*, 2016. A systematic review of studies examining the rate of lung function decline in patients with cystic fibrosis. *Paediatr*

Respir Rev 20, 55–66.

- Hava, D.L., Camilli, A., 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 45, 1389–1406.
- Kukavica-Ibrulj, I., Bragonzi, A., Paroni, M., *et al.*, 2008. *In vivo* growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *J. Bacteriol.* 190, 2804–2813.
- Kukavica-Ibrulj, I., Facchini, M., Cigana, C., *et al.*, 2014. Assessing *Pseudomonas aeruginosa* virulence and the host response using murine models of acute and chronic lung infection. *Methods Mol Biol* 1149, 757–771.
- Kukavica-Ibrulj, I., Levesque, R.C., 2008. Animal models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: useful tools for cystic fibrosis studies. *Lab Anim* 42, 389–412.
- Lee, K.-M., Lee, K., Go, J., *et al.*, 2017. A genetic screen reveals novel targets to render *Pseudomonas aeruginosa* sensitive to lysozyme and cell wall-targeting antibiotics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 59.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697–743.
- Lima, W.C., Lelong, E., Cosson, P., 2011. What can *Dictyostelium* bring to the study of *Pseudomonas* infections? *Semin Cell Dev Biol* 22, 77–81.
- Mercanti, V., Charette, S.J., Bennett, N., *et al.*, 2006. Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups. *J Cell Sci* 119, 4079–4087.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., Mekalanos, J.J., 2002. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3159–3164.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., *et al.*, 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8487–8492.
- Sousa, A.M., Pereira, M.O., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs-a review. *Pathogens* 3, 680–703.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., *et al.*, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B., *et al.*, 2004. *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 12, 235–242.
- Winstanley, C., Langille, M.G., Fothergill, J.L., *et al.*, 2009. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19, 12–23.

2.2.7 Additional material

Additional file 1, table of contents

| | |
|---|----|
| Table 2.S1 | 36 |
| Protocol for acid-stress assay | 37 |
| Table 2.S2..... | 37 |
| Figure 2.S1 | 38 |
| Figure 2.S2..... | 39 |
| Protocol for RT-qPCR..... | 40 |
| Table 2.S3..... | 40 |
| Figure 2.S3 | 41 |
| Protocol for induction of TTSS and secretome evaluation..... | 42 |
| Figure 2.S4 | 43 |
| Protocol for resistance of LESB58 and the STM PALES_11731 mutant to antibiotics and lysozyme..... | 44 |
| Figure 2.S5 | 45 |
| Figure 2.S6..... | 46 |
| Figure 2.S7 | 47 |
| Figure 2.S8 | 48 |
| References | 49 |

Table 2.S1 List of non-virulent mutants in the amoeba predation assay and tested in the *Drosophila* model of infection.

11 of the 14 mutants that are avirulent against *D. discoideum* were tested against *D. melanogaster*. These mutants and their corresponding inactivated gene are listed here.

| Mutants | STM insertion location | Reference in PAO1 | Corresponding altered protein |
|----------------|---------------------------------------|--------------------------|--|
| L52T5T | PALES_23991 | PA2705 | Hypothetical protein |
| L54T13T | PALES_43701 (<i>purM</i>) | PA0945 | Phosphoribosylformylglycinamide cycloligase |
| L70T18G | PALES_03331 (<i>ygdP / rppH</i>) | PA0336 | RNA pyrophosphohydrolase |
| L137T1G | PALES_43121 (<i>purC</i>) | PA1013 | Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase |
| L138T21T | PALES_32561 | PA2066 | Hypothetical protein |
| L149T6G | PALES_19521 (<i>purF</i>) | PA3108 | Amidophosphoribosyltransferase |
| L154T16G | PALES_11981 | PA3776 | Putative transcriptional regulator |
| L155T7T | PALES_11731 (<i>yfgM</i>) | PA3801 | Ancillary SecYEG translocon subunit |
| L162T19T | PALES_21911 (<i>tgpA</i>) | PA2873 | Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase |
| L166T22G | PALES_07851 | PA4142 | Putative secretion protein |
| L173T2G | PALES_31031 | None* | FadE36, putative aminoglycoside phosphotransferase |

*Not present in PAO1, but present in PA14 (PA14_35990).

Protocol for acid stress assay

We used a modified version of the protocol from Götzke *et al.* (Götzke *et al.*, 2015). Bacteria were suspended ($OD_{595} = 0.1$) in 5x3 mL of LB medium and incubated at 37°C, 200 rpm, for 4 h. The 5 cultures were pooled (15 mL total), then separated in 3 tubes (5 mL/tube), one for each of the tested pH. After centrifugation ($3220 \times g$, 10 min) to pellet the cells, the bacteria were resuspended in 5 mL of LB medium at pH 7 (control condition), pH 4 or pH 2. Following an incubation of 30 min at 37°C, 200 rpm, the cultures were centrifuged ($3220 \times g$, 10 min) and the bacteria were resuspended in sterile water ($DO_{595} = 0.2$). Serial dilutions (10^0 to 10^{-7}) were spotted as 5 μ L drops on LB agar. Results were obtained after 40 h of incubation at 37°C.

Table 2.S2 Bacterial growth after treatment at a low pH.

Following acid-stress treatment, the STM PALES_11731 mutant and the wild-type cells were grown on LB agar. There was no difference between the strains (n=3).

| | Dilutions | | | | | | | | pH |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| | 10^0 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | |
| LESB58 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | - | - | 7 |
| | +++ | +++ | +++ | ++ | + | + | - | - | 4 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| STM PALES_11731 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | - | - | 7 |
| | +++ | +++ | +++ | ++ | + | + | - | - | 4 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |

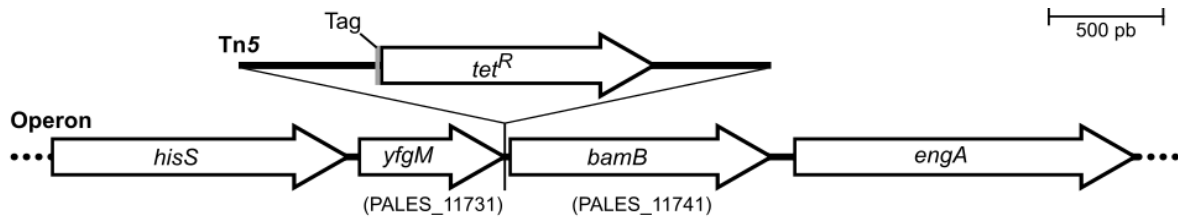


Figure 2.S1 Representation of the mini-Tn5-*tet* transposon insertion in the STM PALES_11731 mutant.

The transposon, containing a tetracycline resistance gene, is inserted 10 nucleotides before the end of the *yfgM* gene. For the sake of clarity, only the last 4 genes of the operon (also corresponding to the genes later on tested in RT-qPCR (**Additional file 1: Figure 2.S3**)) are shown.

A
MSRTEDEDLAQ KDWQRNGKPLVTGGI LALAVVFGVQAVQKYQINQAAQ
 ii
GAS I VYQQLI ETALNPAGQDP**AKVAELAGLKS** EFGGITHYAQYGS**LFVA**
 oo
KVAVDSGKLDDAVAELKAVMDKPADATLGELARQRLARVLA A**QGV**EEGL
 oo
KLLDGDADKAYVSTREELRGDLLVQLK**R**TD**E**ARAAYEKAKQS**LP**EDGAGD
 oo
ALQI KLDDLSKGEA
 oooooooooooooooooooooo

B
 [...] TCC AAG GGA GAG GCC TGA
 S K G E A *
 210 211 212 213 214
 [...] TCC AAG **GGC** TGA
 S K G *
 210 211 212

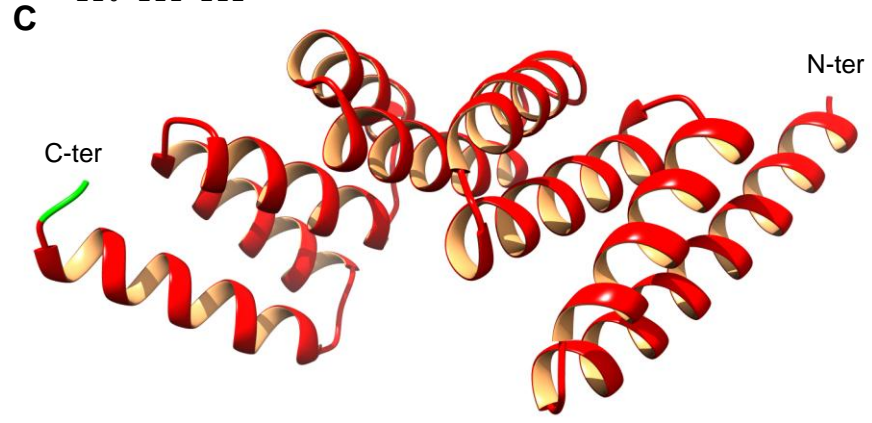


Figure 2.S2 Structural analyses of the protein encoded by the gene PALES_11731.

(A) The primary sequence of the protein is in bold and the predicted disordered residues are in blue. The topology with respect to the membrane, as predicted by TOPCONS (Tsirigos *et al.*, 2015), is indicated for each residue (i: inside the membrane, o: outside of the membrane, m: membrane region). (B) Region where the transposon mini-Tn5-*tet* is inserted. Precisely, it inserted between the second and third nucleotides of the codon for the glycine at position 212. The nucleotides from the mini-Tn5-*tet* are in red. (C) 3D structure predicted using I-TASSER 5.1 (Yang *et al.*, 2015) of the residues from the protein encoded by PALES_11731 that are predicted to be outside the membrane (42 to 214). The glutamic acid (position 213) and the alanine (position 214) that are missing due to the insertion of the transposon are in green. The best predicted model has a C-score of 0.02 and a TM-score of 0.72.

Protocol for RT-qPCR

Bacteria were suspended ($OD_{595} = 0.1$) in 3 mL of LB medium and incubated at 37°C, 200 rpm. To prevent BLS formation, which begins in the late exponential growth phase (see **Additional file 1: Figure 2.S6A**), bacterial growths were performed for a short period of time (4 h) in 4 tubes for each replicate. The 4 cultures were pooled (12 mL total) and bacteria concentrated by centrifugation ($3220 \times g$, 10 min) and resuspension in 1 mL of fresh medium. RNA extraction was performed using the RiboPure™ RNA Purification Kit for bacteria (ThermoFisher) as suggested by the manufacturer. Extracted RNA was treated with DNase I and purity was assessed by electrophoresis on 1% agarose gel. Retrotranscription was performed on the total extracted RNA using the iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad) according to the instructions of the manufacturer. qPCR was achieved in Rotor-Gene Q (Qiagen) with SYBR® Select Master Mix (ThermoFisher) using *gyrB* as the reference housekeeping gene. RNA extraction and retrotranscription were performed in independent duplicates for each bacteria and each sample obtained was tested in duplicates qPCR reactions. For each gene's standard curve, $R^2 > 0.99$.

Table 2.S3 List of primers.

Primers used for PCR amplification of genes templates and qPCR of the cDNA obtained to measure the expression of those genes.

| | Target | Primer | Sequence (5' -> 3') | Product length (bp) |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|---|---------------------|
| | <i>gyrB</i> | gyrB_FWD gyrB_REV | CATGAACTACGCCTGACCAT CTTCGGCCTCGATGTAGTTG | 520 |
| | <i>hisS</i> | hisS_FWD hisS_REV | AAACCGCAGAAAGGTCGCTA AAGCTTGTCGGTGACCCATT | 483 |
| Template amplification in PCR | <i>yfgM</i> (PALES_11731) | yfgM_FWD yfgM_REV | GCGTACCGAAGACGAAGA TGCCGTACTGGGCATAAT | 278 |
| | <i>bamB</i> (PALES_11741) | bamB_FWD bamB_REV | GGCAAGAAGAAGTGGACCAAG CACCACGTTGCTGGAGAACA | 600 |
| | <i>engA</i> | engA_FWD engA_REV | ACAGCATCTACATCCCGTTC GAGTTCTTCTTGCCCTCGTAG | 694 |
| Amplification in qPCR | <i>gyrB</i> | qPCRgyrB_FWD qPCRgyrB_REV | GAGCTGTCCTTCCTCAACTC TTCAGACCGCCTTCGTAATT | 92 |

| | | | |
|------------------------------|--|--|-----|
| <i>hisS</i> | qPCR <i>hisS</i> _FWD qPCR <i>hisS</i> _REV | AAGAATCGATCGCCCACTTC GTGCGGCAGTAATAGTCCAG | 109 |
| <i>yfgM</i> (PALES_11731) | qPCR <i>yfgM</i> _FWD qPCR <i>yfgM</i> _REV | CTACCAGCAACTGATCGAAACC CGAACTCGCTCTTCAGCTTG | 95 |
| <i>bamB</i> (PALES_11741) | qPCR <i>bamB</i> _FWD qPCR <i>bamB</i> _REV | GAAGGCTTCGGCAATATCTAC GTTGTTCCACAGCGAAGAAG | 87 |
| <i>engA</i> | qPCR <i>engA</i> _FWD qPCR <i>engA</i> _REV | GTCATTGCCCTGAACAAGTG GGGCCGAAATGAAATGGATG | 118 |

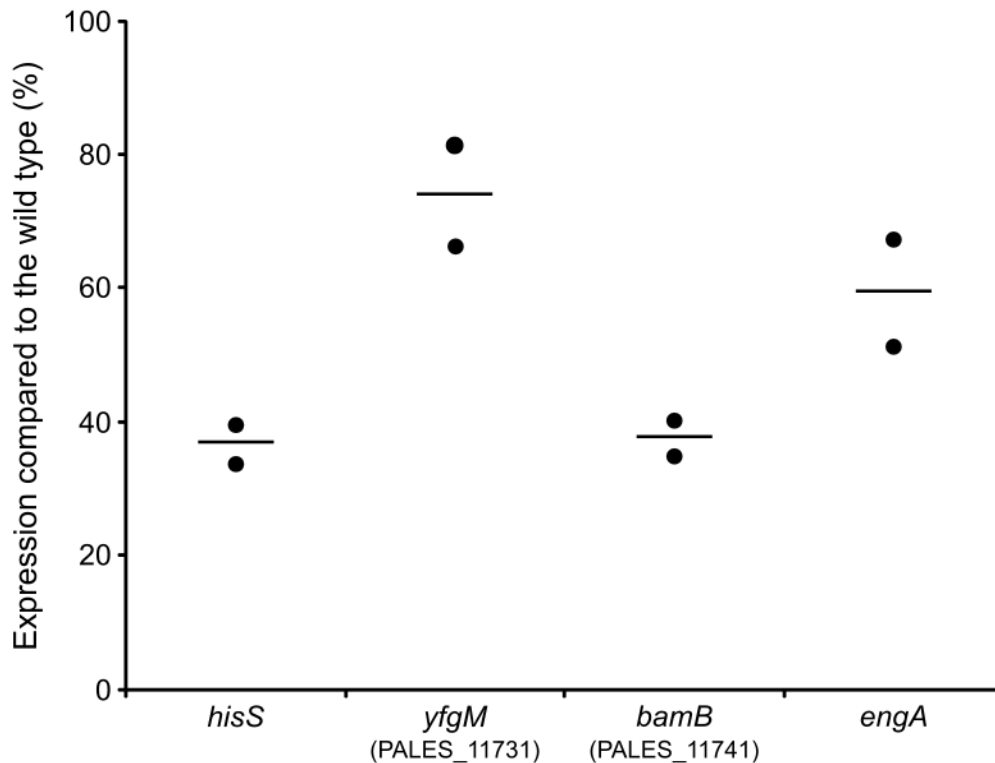


Figure 2.S3 Percentage of expression of the genes *hisS*, *yfgM*, *bamB* and *engA* in the STM PALES_11731 mutant relatively to the wild-type strain.

Quantification of the expression of the genes surrounding the mini-Tn5-*tet* transposon insertion site (see **Additional file 1: Figure 2.S1**) was performed using RT-qPCR and compared to the wild-type strain's expression of those genes. The housekeeping gene *gyrB* was used as a reference. The difference of expression in the STM PALES_11731 is illustrated as a percentage of expression relatively to the expression in the wild-type strain. Each circle represents the average result of two technical replicates on one biological replicate. The horizontal line is the mean for the two biological replicates for each gene.

Protocol for induction of TTSS and secretome evaluation

Protocol modified from Alibaud *et al.* (Alibaud *et al.*, 2008). Bacteria were suspended ($OD_{595} = 0.1$) in 4 mL of LB medium supplemented or not with 5 mM EGTA and 20 mM $MgCl_2$ to induce TTSS expression. After overnight (18 h) at 37°C, 200 rpm, the supernatant of each culture was recovered by two successive centrifugations ($10,000 \times g$, 10 min), followed by one filtration with a filter with 0.2 μm pores (Filtropur S 0.2, Sarstedt Canada). The proteins contained in the supernatant were then concentrated by about 60-fold by passing a total of 3 mL of supernatant through a Nanosep centrifugal device (Nanosep 3K Omega, Pall Life Sciences) as suggested by the manufacturer (centrifugations used : $14,000 \times g$, 17 min). About 50 μL of liquid was recovered and the volume adjusted with fresh medium, so that all samples had the same final volume. 30 μL of each concentrated sample was mixed with 15 μL of denaturation solution (TEX 3X + 15% β -Mercaptoethanol) and heated to 95°C for 5 min. Finally, 15 μL of each sample were analyzed on a 12% SDS-PAGE gel and visualized by Coomassie blue staining.

The proteins in the control or TTSS-inducing conditions were identified by mass spectrometry. The percentage of total spectra obtained that corresponded to identified TTSS related proteins (PopB, PcrV, YopN, PopD, ExoT, ExoY, PscF, PscP and HopJ) found in supernatant was calculated. To quantify the induction effect on the TTSS protein production, the percentage obtained in the TTSS-inducing conditions was divided by the percentage obtained in the control conditions for each strain. Because the percentage of total spectra corresponding to a protein is related to the total quantity of proteins present in the sample, the calculated induction was corrected by the ratio of [total number of proteins in TTSS-inducing conditions / total number of proteins in control conditions].

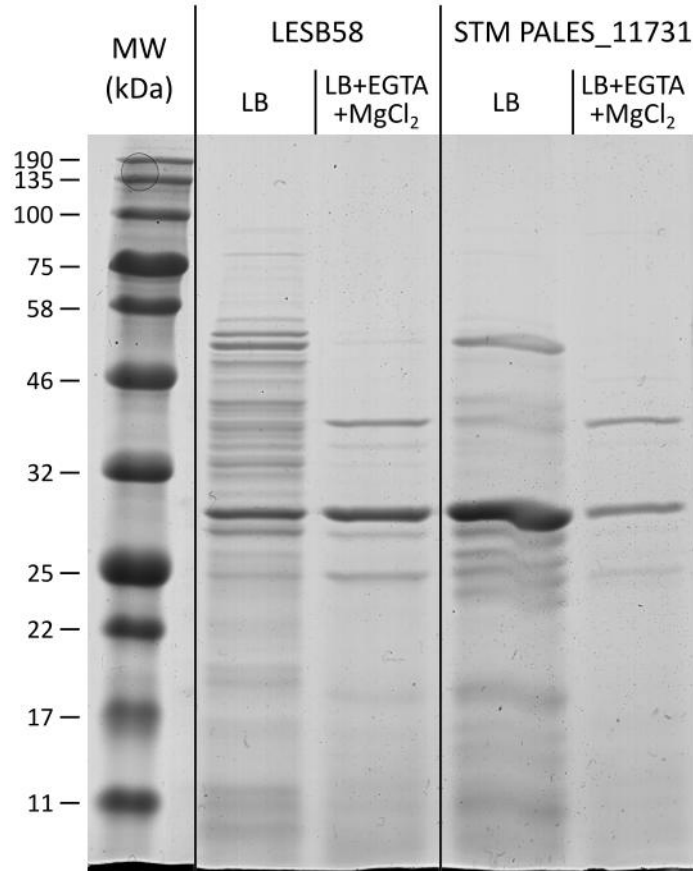


Figure 2.S4 Protein contents of the wild-type strain LEBS58 and the STM PALES_11731 mutant supernatant visualized by SDS-PAGE 12%.

The experiment has been performed 3 times with similar results, and one representative experiment is shown. Proteins obtained in both conditions were identified by mass spectrometry. For both the wild-type and the mutant, it was possible to observe a higher relative proportion of TTSS-related proteins under inducing conditions (a relative proportion of 4.31 in the mutant and 8.10 in the wild-type). Based on the results of the SDS-PAGE and mass spectrometry analyses for the TTSS proteins, induction of protein secretion was likely similar (in terms of which TTSS proteins were secreted and the relative proportion of all TTSS proteins found in the supernatant), indicating that the transposition in the STM PALES_11731 mutant did not significantly affect the TTSS expression.

Protocol for resistance of LESB58 and the STM PALES_11731 mutant to antibiotics and lysozyme

For the antibiotic sensitivity assay, bacteria suspended ($OD_{595} = 2$) in 300 μL of Müller-Hinton broth (MHB) were spread on a Müller-Hinton agar (MHA) Petri dish to form a bacterial lawn. Paper disks containing either piperacillin (30 or 100 μg) or tobramycin (10 or 30 μg) were gently placed on the dried bacterial lawn. Results were obtained after overnight growth at 37°C. Lysozyme from chicken egg white (Sigma-Aldrich) was used for the lysozyme sensitivity assay to the following concentrations: 0.5, 1 and 2 mg/mL. Bacteria were suspended ($OD_{595} = 0.1$) in 300 μL of LB medium in 48-well plates in triplicate and incubated in a microplate reader (Infinite 200Pro NanoQuant TECAN) at 37°C for 20 h.

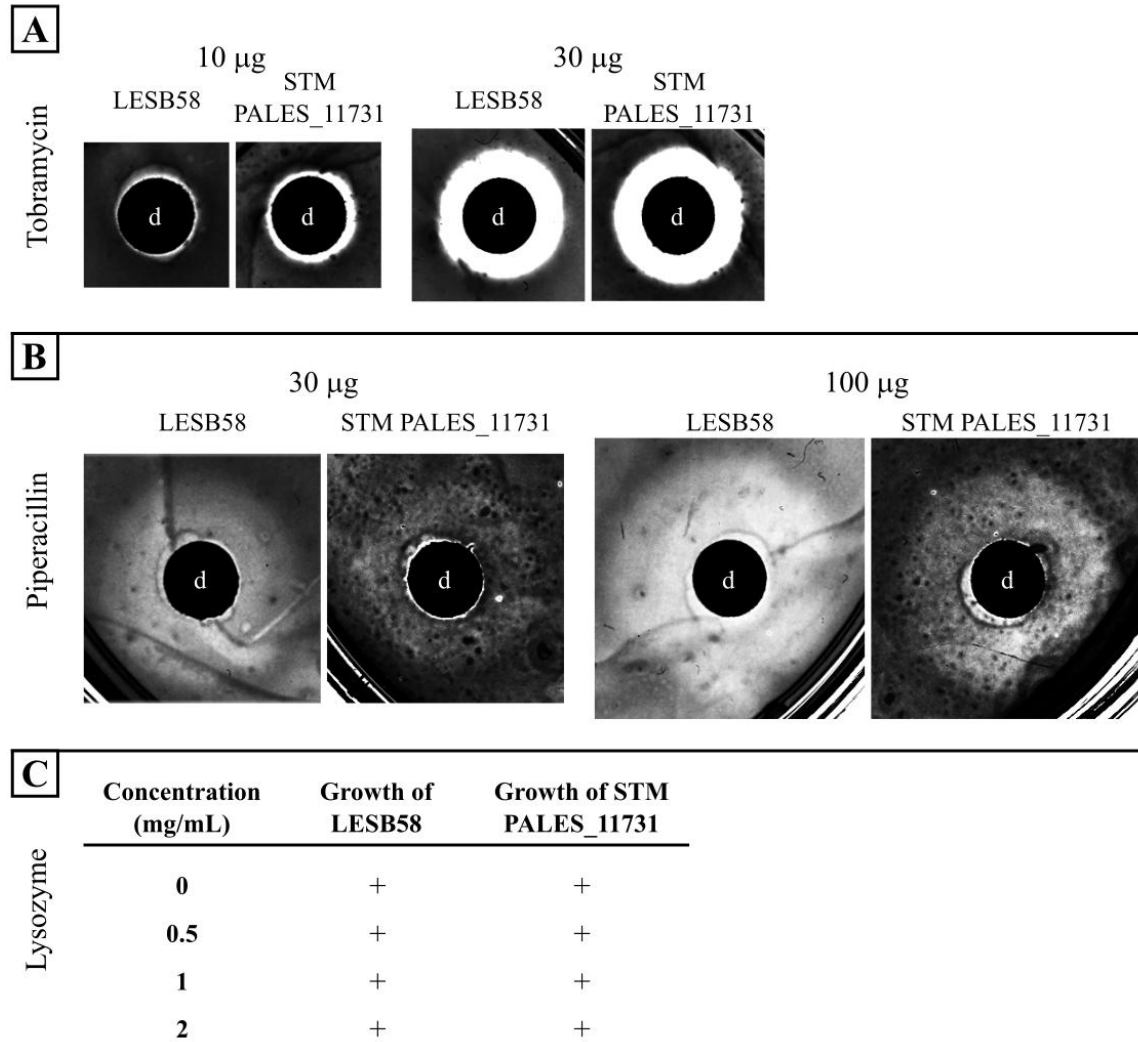


Figure 2.S5 The STM PALES_11731 mutant shows the same antibiotic and lysosyme resistance as the wild-type LESB58.

The sensitivity of the bacteria to (A) tobramycin and (B) piperacillin is represented by the zone of inhibition (clear zone) created on the bacterial lawn around the disks (d). There was no difference between the STM PALES_11731 mutant and the wild-type strain with the two antibiotics tested (n=3). In C, growth of the bacteria is shown by a plus (+) and a lack of growth is shown by a minus (-). The resistance to the lysozyme activity was similar for both strains (n=3).

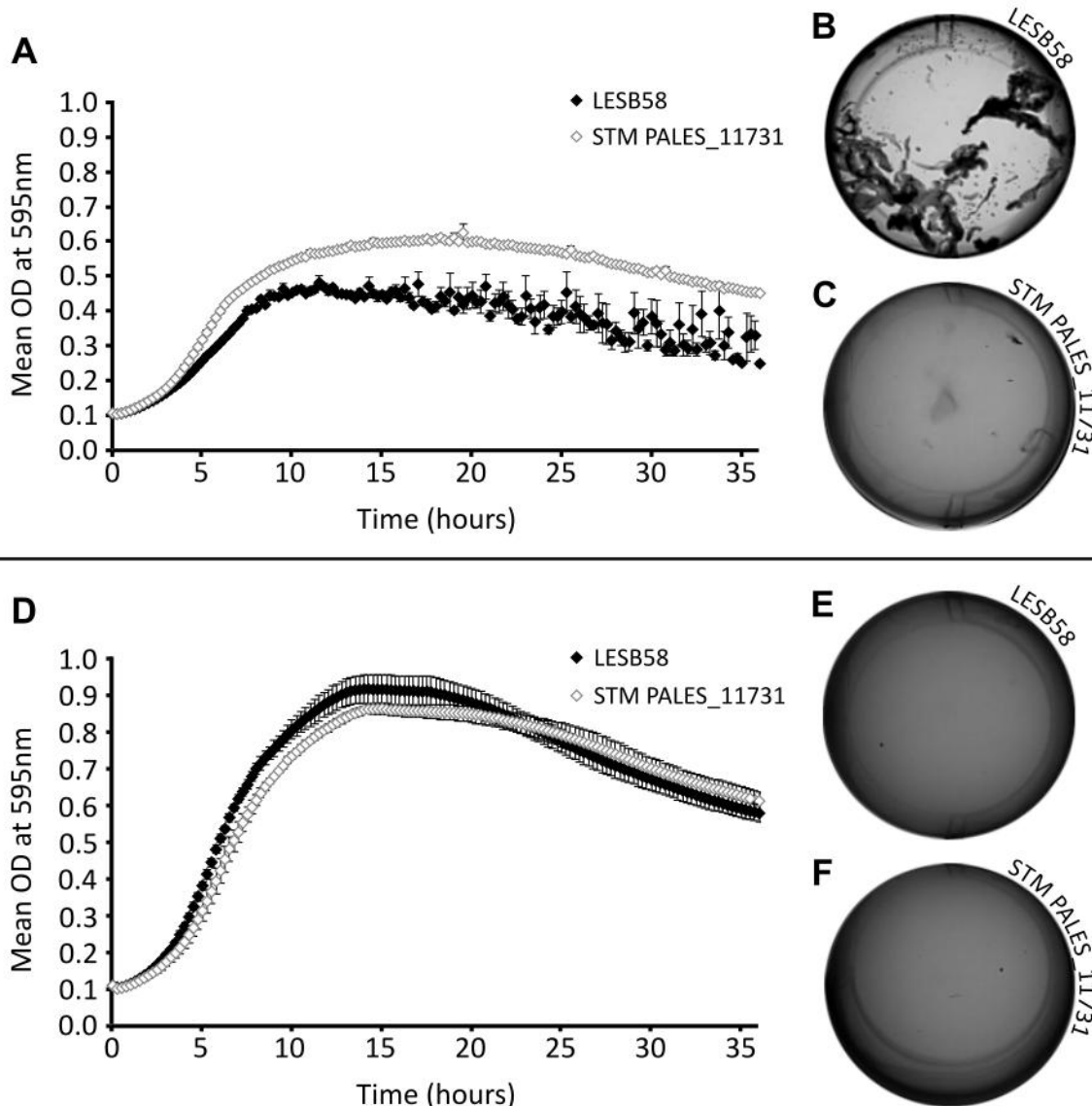


Figure 2.S6 Similar growth of wild-type LESB58 and STM PALES_11731 mutant strains when BLSs are inhibited by magnesium ions.

Growth curves of LESB58 (black) and the STM PALES_11731 mutant (white) were established in a microplate reader at 37°C in a 24-well plate. **A** In LB medium, the LESB58 strain forms biofilm-like structures (BLSs) (see **B**) whereas the STM PALES_11731 mutant does not (see **C**). The means were obtained from 9 separate experiments. **(D)** In a medium intended to inhibit the formation of BLSs (LB medium supplemented with 20 mM MgCl₂), no BLSs are formed (see **E** (LESB58) and **F** (STM PALES_11731 mutant)) and the growth was similar for both bacteria (p-value = 0.45). Means were obtained from the data of 3 separate experiments. Error bars show the calculated standard deviation of the mean. The growth curves were compared using the function compareGrowthCurves of the R package statmod (Giner and Smyth, 2016).

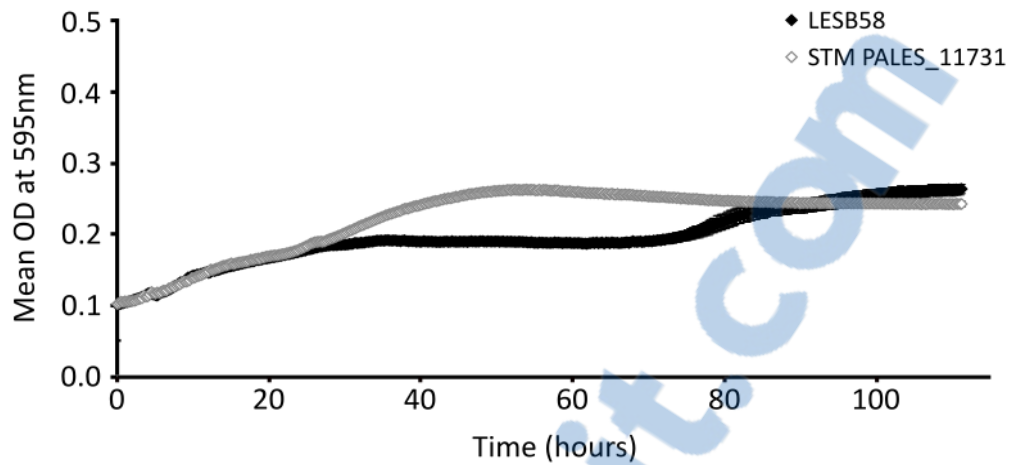


Figure 2.S7 Low nutrient medium does not hinder the mutant growth.

The growth curves of LESB58 (black) and the STM PALES_11731 mutant (white) in SM 1/5 medium at 21°C were established in a microplate reader for a 24-well plate. The mutant shows an initial growth better than the wild-type strain. The data was averaged over 4 separate experiments. Errors bars show the calculated standard deviation of the mean.

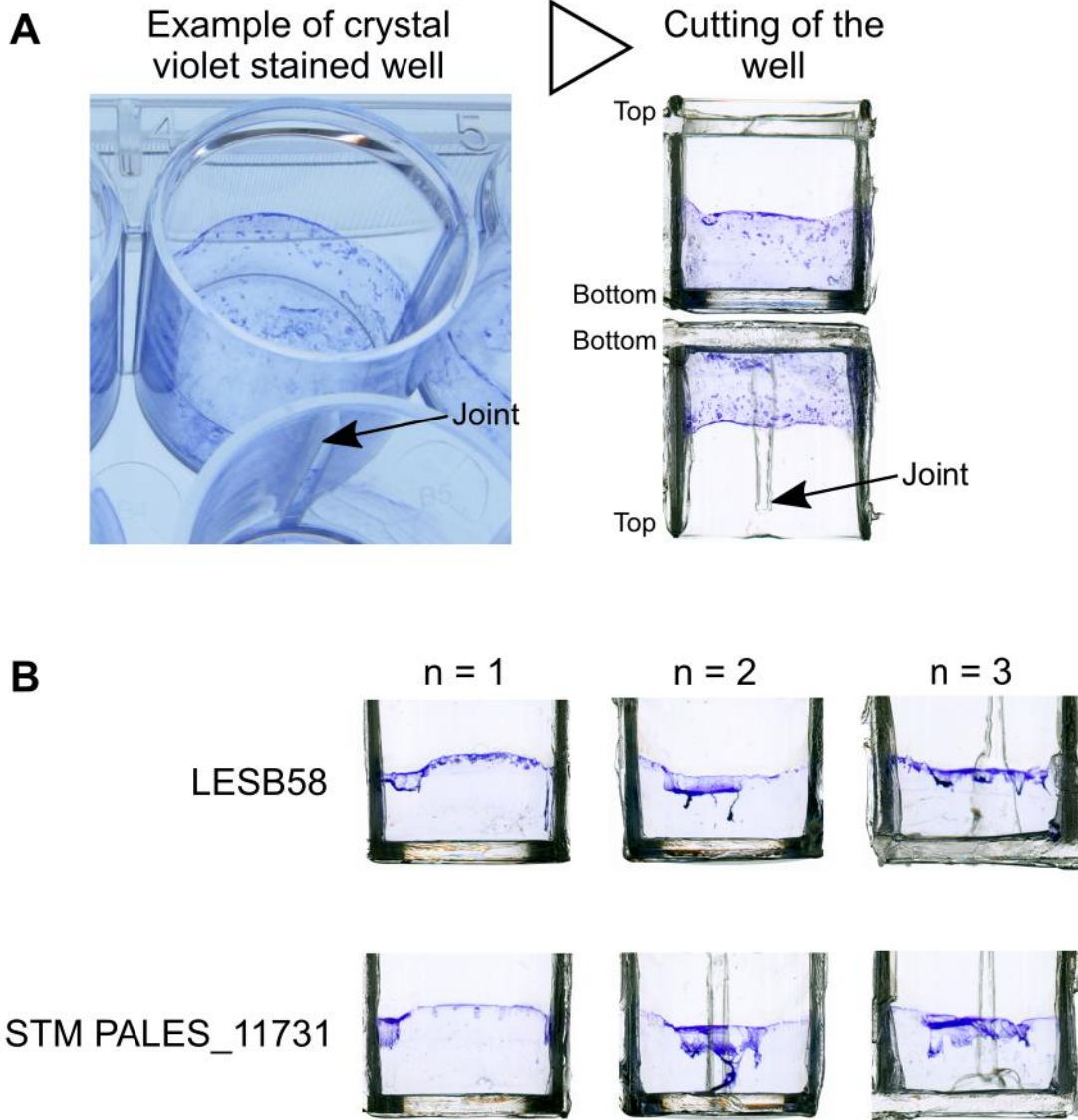


Figure 2.S8 Similar adhered biofilm formation of wild-type LESB58 and STM PALES_11731 mutant strains.

The bacteria were grown during 24 h at 37°C, 200 rpm, in a 24-well plate (600 μ L per well). (A) Modified from a previously published protocol (O'Toole, 2011), the wells were emptied, washed twice with 0.9% NaCl sterile saline, and the biofilms were stained with a crystal violet solution (0.1% in water). After two subsequent washings (0.9% NaCl sterile saline), the wells were dried at room temperature, cut in half and scanned (HP Scanjet G4050). (B) The amount of biofilm that formed on the well's wall is equivalent in the STM PALES_11731 mutant and the wild-type strain (n=3).

References

- Alibaud, L., Köhler, T., Coudray, A., *et al.*, 2008. *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes identified in a *Dictyostelium* host model. *Cell Microbiol* 10, 729–740.
- Giner, G., Smyth, G.K., 2016. statmod: Probability calculations for the inverse gaussian distribution. *R J.* 8, 339–351.
- Gotzke, H., Muheim, C., Altelaar, A.F.M., *et al.*, 2015. Identification of putative substrates for the periplasmic chaperone YfgM in *Escherichia coli* using quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 216–226.
- O'Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.*, 2437.
- Tsirigos, K.D., Peters, C., Shu, N., *et al.*, 2015. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res.* 43, W401-7.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., *et al.*, 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Meth* 12, 7–8.

Chapitre 3 : Une nouvelle approche pour l'étude des biofilms adhérents ou flottants produits par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* de différentes origines révèle un effet varié de la présence d'ions divalents sur ces structures

3.1.1 Résumé

Dans les poumons des gens atteints de fibrose kystique (FK), la formation de biofilms joue un rôle crucial dans la persistance de *P. aeruginosa*, une bactérie pathogène opportuniste. Certaines souches sont adaptées au microenvironnement pulmonaire FK, montrant des phénotypes distincts de formation de biofilms. Par une nouvelle approche d'analyse d'images, nous avons quantifié la formation de biofilms de quatre isolats différents de *P. aeruginosa* : PAO1, la souche de référence, LESB58, provenant de patients FK, PPF-1 et Urg-7, deux isolats provenant de canalisations d'eau. Nous avons aussi observé des *biofilm-like structures* (BLS) flottants dans le milieu et évalué la possibilité d'inhiber la formation de biofilms et de BLS par l'ajout d'ions. Les résultats obtenus démontrent une diversité dans la formation des biofilms de *P. aeruginosa* et indiquent que l'inhibition des biofilms adhérents ou des BLS d'une souche précise ne peut pas prédire le résultat pour d'autres souches ou BLSs.

3.2 A new approach to study attached and floating biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa* strains of various origins reveals various effects of divalent ions on these structures

Cynthia Gagné-Thivierge^{1,2,3}, Jean Barbeau⁴, Roger C. Levesque^{1,5} and Steve J. Charette^{1,2,3}

¹Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

²Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

³Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Quebec City, Quebec, Canada

⁴Faculté de Médecine Dentaire, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

⁵Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec city, Quebec, Canada

3.2.1 Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen associated with nosocomial infections and disease complications. In the lungs of cystic fibrosis (CF) individuals, biofilm growth plays a crucial role in the persistence and antibiotic resistance of *P. aeruginosa*. Some strains, adapted to the CF lung microenvironment, show distinguishable phenotypes linked to biofilm production when compared to other strains. Using a novel image analysis quantification approach with crystal violet-stained biofilms, we compared the biofilm formation of four different *P. aeruginosa* isolates in 24-well plates: PAO1, the reference strain, LESB58 from CF patients' lungs, and PPF-1 and Urg-7, two environmental isolates from dental unit waterlines. We also observed the formation of biofilm-like structures (BLSs) floating in the medium and investigated growth inhibition of the attached biofilm and BLS with Mg^{2+} or Zn^{2+} . Urg-7 produced the most attached biofilms, but not the most BLSs. Attached biofilms had different responses to cations than BLSs did, but the effect of the cations was similar for all strains. These results demonstrate some diversity of biofilm formation in *P. aeruginosa* and indicate that chemical inhibition of attached biofilm formation for a specific strain or isolate cannot be predicative of a result on other *P. aeruginosa* strains or on BLSs.

3.2.2 Introduction

Biofilm production is recognized as one of the main forms of lifestyle of microorganisms in nature. Biofilms are ubiquitous heterogeneous structures composed of microorganisms, especially bacteria, organized in a self-produced polymeric matrix of variable composition. Biofilms can cause serious challenges to humans, for example in drinking water treatment (Wingender and Flemming, 2011) and the food industry (Kumar and Anand, 1998). They are a major concern in medical settings since they increase the persistence of bacteria (Mulcahy *et al.*, 2014) and the resistance to antibiotic treatments (Costerton *et al.*, 1999).

Pseudomonas aeruginosa is a model organism for the study of biofilms. This bacterium, as an opportunistic pathogen, is also the principal cause of lung infections of people with cystic fibrosis (CF), where biofilm formation is associated with chronic infections and poor prognostic outcomes (Li *et al.*, 2005).

Many approaches, in static or continuous flow conditions, can be used to produce, quantify, and study biofilm formation and composition and their resistance to stresses (Branda *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2015). Some approaches, such as microfluidic imaging (Weiss Nielsen *et al.*, 2011), are informative about all the steps of biofilm formation, but can be complex and require technical materials. Other approaches, such as the microtiter plate assay (O'Toole, 2011), are easy and quick, but are mainly used just to detect biofilm formation. A common weakness of these methods is that they focus on biofilms attached to a surface, but *P. aeruginosa* can live in other aggregate forms, such as pellicles (Friedman and Kolter, 2004a, 2004b) and microcolonies (Worlitzsch *et al.*, 2002; Sriramulu *et al.*, 2005). These latter aggregations also increase bacterial resistance (Alhede *et al.*, 2011), but are discarded in traditional biofilm quantification assays because they float. In our study, we developed a method to independently quantify attached biofilms and other biofilm-like structure (BLS) formation. This approach is based on the simple microtiter assay for *P. aeruginosa* (O'Toole, 2011), with medium agitation and image analysis for quantification.

Most studies on *P. aeruginosa* biofilms use reference strain PAO1. However, as for any bacterial species, *P. aeruginosa* genomic and phenotypic features vary among strains. Comparative studies of clinical isolates from CF patients have shown that *P. aeruginosa* strains adapt, leading to chronic infections, and rendering them phenotypically divergent

from the isolates that cause acute infections (Folkesson *et al.*, 2012; Hogardt and Heesemann, 2013). To learn more about biofilm formation by *P. aeruginosa*, and hence develop anti-biofilm therapies, it is important to examine the diversity of biofilms formed by different strains.

It has already been demonstrated that modifying the environmental ion concentration influenced *in vitro* biofilm formation in strain PAO1 (Lee *et al.*, 2014). The goal of our study was to learn more about the variation of biofilm formation in *P. aeruginosa*, regarding both attached biofilms and BLSs produced by four strains of various origins. We also assessed if chemical inhibition of attached biofilm formation from PAO1 could be generalized to other *P. aeruginosa* strains and to other BLSs.

3.2.3 Materials and methods

3.2.3.1 Bacterial strains

Four different strains of *P. aeruginosa* were used in this study. The first two have a clinical origin: PAO1, isolated from a human wound (Stover *et al.*, 2000), and LESB58, an epidemic strain isolated from chronically infected CF patients (Winstanley *et al.*, 2009). The other two are from an environmental source: PPF-1 and Urg-7, both isolated in a dental unit waterline (Ouellet *et al.*, 2014).

3.2.3.2 Growth curve establishment

Bacteria were suspended to obtain an optical density at 595 nm (OD_{595}) of 0.1 in lysogeny broth (LB) supplemented or not with 2 mM or 20 mM $MgCl_2$, $MgSO_4$ and $ZnSO_4$. The stock solutions (1 M) were prepared by dissolving the salt in purified water and filter-sterilizing the solution (Filtropur S 0.2, Sarstedt). The incubation was performed in a flat-bottomed polystyrene 24-well plate (Costar) (600 μ L of bacterial culture per well) in a microplate reader (Infinite 200 PRO NanoQuant TECAN) at 37°C with an agitation at 200 rpm. The OD_{595} was automatically measured each 15 minutes for 24 hours.

3.2.3.3 Crystal violet staining

Crystal violet (CV) staining was performed according to a previously described method (O'Toole, 2011). After incubation to establish the growth curve, the wells were washed with 1 mL of 0.9% NaCl (sterile saline). The saline was then replaced with 1 mL of 0.1% CV in

water for at least 20 min. Then, the CV solution was removed and the wells were washed twice with 1 mL of sterile saline and dried at room temperature.

3.2.3.4 Biofilm quantification using imaging

We developed a method based on image analysis to quantify biofilms formation (see **Figure 3.1A** and **3.2A**). Once dried, the wells of the plate were vertically cut in half using a flame-heated scalpel. Then the resulting half wells were scanned (HP Scanjet G4050). The images thus obtained were analyzed using the scientific image analysis open platform ImageJ (Schindelin *et al.*, 2015). This software calculates the average pixel intensity for each row of pixels for a defined area of each well. The bottom and the top of each well were ignored on its image, to ensure that the analyzed area were all of the same height. An additional part was ignored for some wells that had a plastic joint on their wall. This precaution was inconsequential for the final results, considering that the height and position of the analyzed area were the determinative factors, not the width of the image. Each analyzed part was considered independently, giving $n \geq 2$ per well and a total of $n \geq 7$ per set of conditions.

The total amount of biofilm formed was estimated as the mean of the area under the curves. Statistical analysis of the various conditions was done using with the Mann–Whitney U test.

3.2.3.5 Biofilm-like structure quantification

After incubation, the 24-well plates were scanned (HP Scanjet G4050) to observe the presence of BLSs floating in the cultures. Using ImageJ, we measured the number of pixels (by intensity) in the central part of the wells. The borders of the wells were ignored to minimize the impact of the well position in the plate (which result in a slight variation of the view angle and shadow projection). Pixel intensities not corresponding to the background signal were considered as BLSs. All intensities obtained were multiplied by their respective number of pixels and the BLS quantity was correlated with the sum of the [intensities \times number of pixels] for the BLS part of the curve.

3.2.3.6 Scanning electron microscopy (SEM) of the biofilm-like structures

Before CV staining, the BLSs formed by LESB58 and PPF-1 were recovered and placed in 1.5 mL Eppendorf tubes. Following a gentle wash in 0.9% NaCl sterile saline to remove planktonic bacteria, the samples were prepared and visualized as described elsewhere (Denoncourt *et al.*, 2017).

3.2.4 Results and discussion

Many methods allow the study of biofilm formation *in vitro*. The growth in plastic cell culture plates is a common method due to its simplicity and because it enables high-throughput analysis. Optimized for *P. aeruginosa* (O'Toole *et al.*, 1999; O'Toole, 2011), a typical assay is performed in 96-well plates in static conditions. After incubation, biofilms can be stained with CV for visualization. Subsequent extraction of the CV and OD measurement at 550 nm provides a quantitative evaluation of the produced biofilms.

In our study, we modified this standard protocol and used 24-well plates instead of 96-well plates, with agitation at 200 rpm to promote oxygenation of the bacterial cultures and obtain growth curves in optimal conditions. Bacterial cultures grown with agitation is also more representative of the natural environment of the isolates PPF-1 and Urg-7, since they were found in waterlines, where water alternates between stagnation and rapid flow. Moreover, we performed the quantification of biofilms with image analysis instead of OD measurement (**Figure 3.1**). As *P. aeruginosa* is known to produce biofilms mostly at the air-liquid interface during growth, with CV staining, the biofilm can be seen on the wall of a cultured well. Our method allowed to ignore the wells' bottom, which could contain residual planktonic bacteria and BLSs, and focus only on the biofilm attached on the walls of the wells. Graphical representation of the biofilm on the walls has also the advantage of offering a quantification method linked to the precise position of the biofilm.

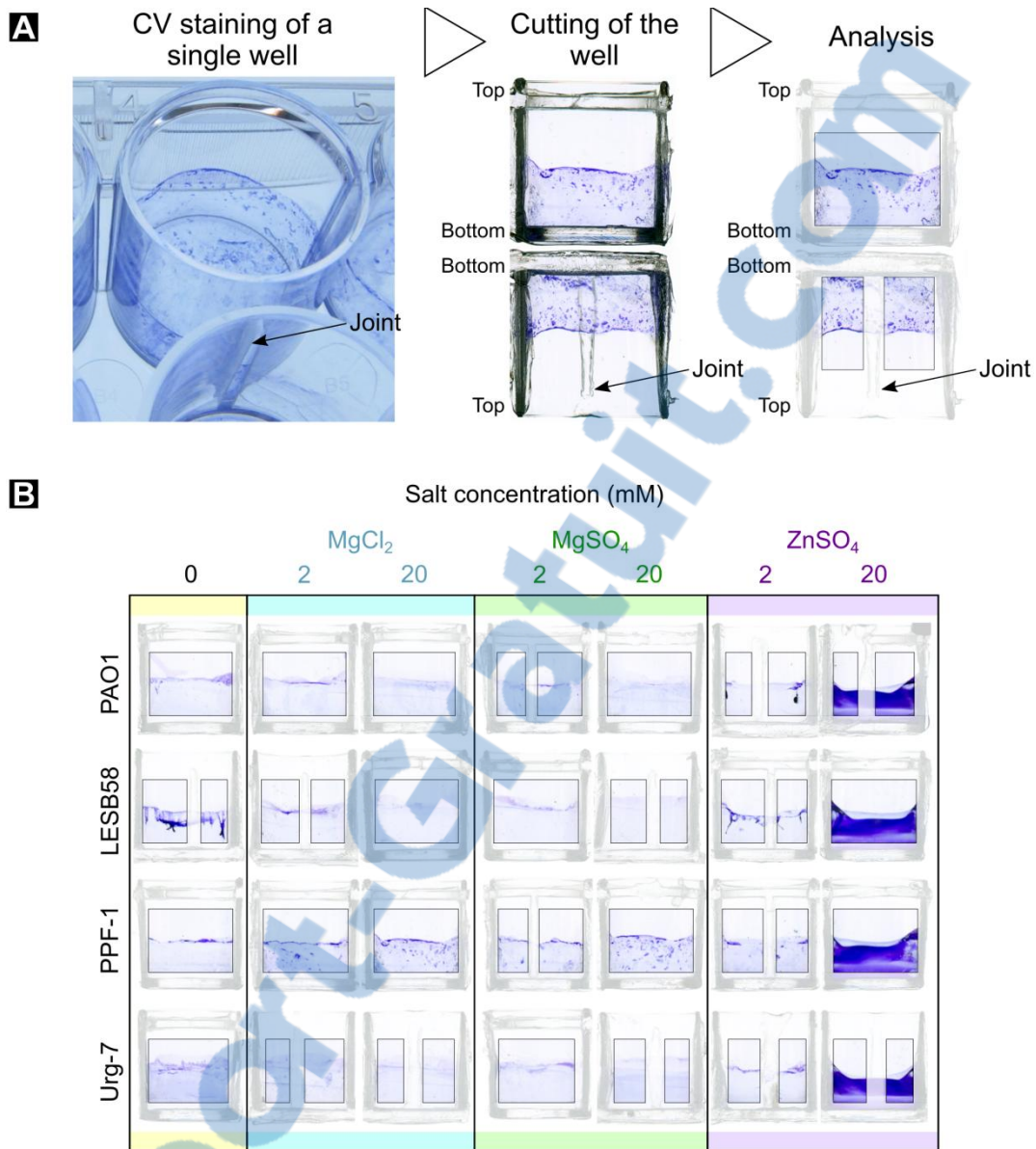


Figure 3.1 Side view of crystal violet (CV) stained wells.

(A) After incubation, 24-well plates were stained using CV and cut to allow the visualization of biofilm (in purple) on the walls' surface. The rectangles highlight the areas used for biofilm quantification with ImageJ. (B) A montage of representative wells for each set of conditions shows the effect of Mg^{2+} and Zn^{2+} on biofilm formation. A high concentration of Zn^{2+} significantly increased the biomass of the biofilm.

Four strains of *P. aeruginosa* were used to give an estimation of the diversity in biofilm production from *P. aeruginosa* strains of various origin. PAO1 and LESB58 are two reference strains, the first because it was the first *P. aeruginosa* isolate to be fully sequenced (Stover *et al.*, 2000), and the second as a representative of isolates found in chronic CF lung infections (Winstanley *et al.*, 2009). Although they are both clinical strains,

they have significant genomic and phenotypic divergence. For instance, LESB58 has many genomic islands and six prophages that play an important role in its virulence (Lemieux *et al.*, 2016; Jani *et al.*, 2016). This strain is highly resistant to many antibiotics (Cheng *et al.*, 1996) and is less motile but produces more biofilm matrix than PAO1 in the classic O'Toole protocol (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008). PPF-1 and Urg-7 are two environmental strains isolated from dental unit water lines (Ouellet *et al.*, 2014). However, whereas Urg-7 phenotypes resemble those of CF clinical strains, PPF-1 is fairly distinct. Its quorum sensing system is altered (Vincent *et al.*, 2017) and, according to the original O'Toole biofilm assay, it produces a high quantity of biofilm (Ouellet *et al.*, 2014).

3.2.4.1 Increased attached biofilm formation in the Urg-7 isolate

In previous studies using the O'Toole protocol, LESB58 and PPF-1 were identified as biofilm hyperproducers (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008; Ouellet *et al.*, 2014). In our case, only the Urg-7 isolate produced significantly more attached biofilm than the other strains (p-value < 0.02) (**Figure 3.2B**). Furthermore, the PPF-1 isolate formed significantly less attached biofilm than the reference strain PAO1 (p-value < 0.05). These differences with the literature may be due to growth conditions and a different method of analysis.

Previous studies have demonstrated that outer membrane components such as lipopolysaccharides (LPS), fimbriae, adhesins, and type IV pili modulate the adhesion of bacteria to surfaces (Jacques, 1996; Berne *et al.*, 2015). It is also known that cellular surface appendages vary between *P. aeruginosa* strains. For example, during the process of pathoadaptation to CF lungs, the O antigen part is lost and the lipid A portion of the LPS is altered (Hancock *et al.*, 1983; Ernst *et al.*, 1999). Mutations of genes responsible for flagella and type IV pili production are also often observed (Mahenthiralingam *et al.*, 1994; Kus *et al.*, 2004). It is possible that these structural differences between the four strains used could explain some of the variation observed regarding the attached biofilm to the polystyrene plate's surface.

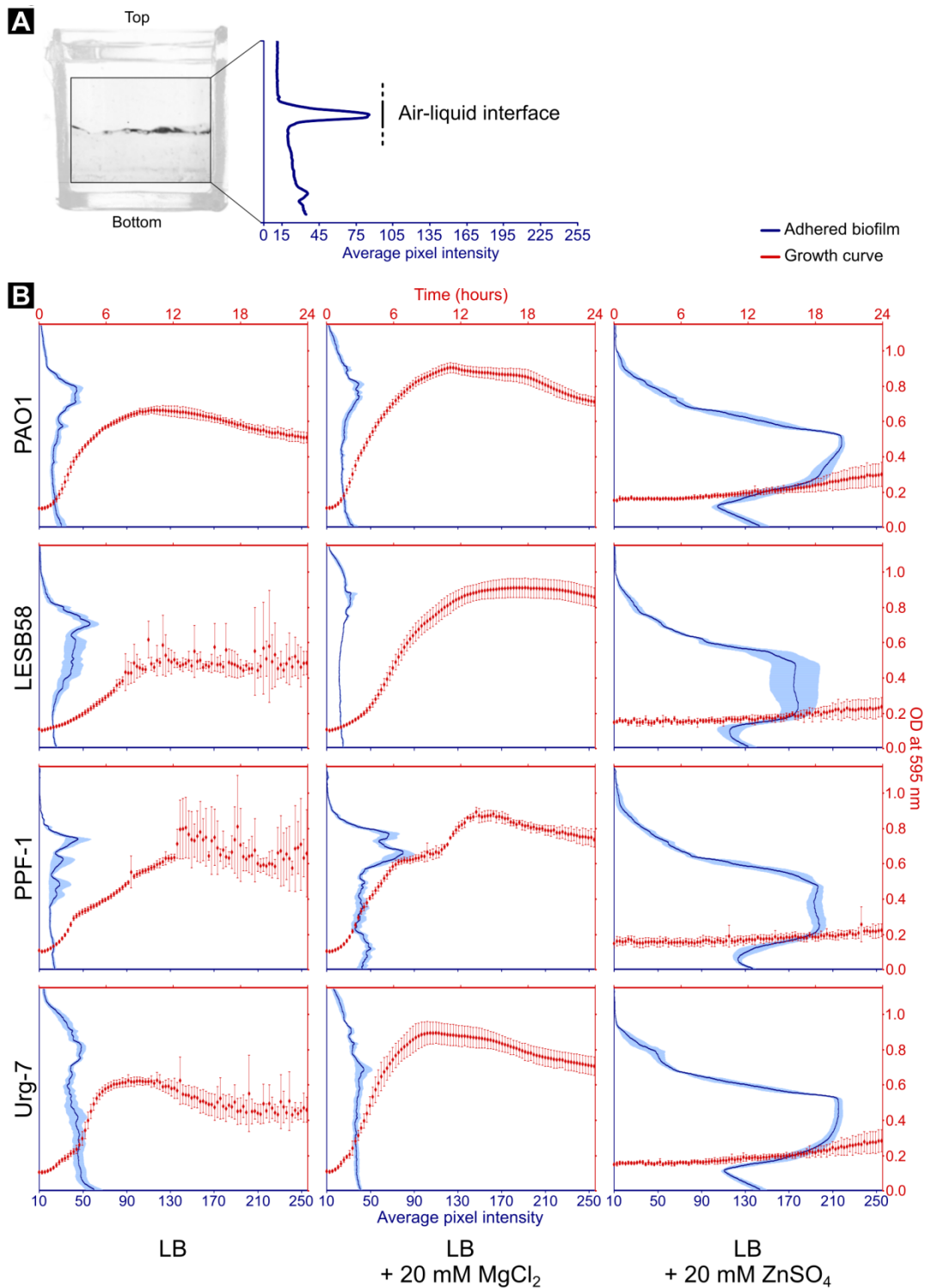


Figure 3.2 Quantification of adhered biofilm (blue) and measurement of growth curve (red) in 3 specific conditions.

(A) ImageJ allowed to determine the position and mass of biofilm produced by calculating the average pixel intensity for each row. In the graph, 0 (white) indicates no staining and 255 (black) indicates that the row is entirely covered by a thick biofilm.

(B) In the control conditions, Urg-7 is the strain that produces the most biofilm. The

addition of MgCl_2 , while increasing the maximal planktonic biomass for all the strains, does slightly increase the biofilm formation in the PPF-1 strain only (p-value = 0.00001). ZnSO_4 inhibits planktonic growth, but increases the biofilm production of all strains. Error bars are the standard deviation for growth curves (In control conditions, $n=6$. In added salt conditions, $n=3$) and the deviation of the mean for biofilm quantification ($n \geq 7$).

3.2.4.2 High concentration of Zn^{2+} greatly increases attached biofilm formation

Biofilm formation depends on many environmental signals (Karatan and Watnick, 2009). In *P. aeruginosa* PAO1, some cations have been described having anti-biofilm properties *in vitro* (Banin *et al.*, 2005; Loo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). The effects of Mg^{2+} and Zn^{2+} were tested on the growth and biofilm formation capacity of the strains included in this study, based on our experimental approach.

As Mg^{2+} has been reported to impact biofilm formation in various bacterial species (Song and Leff, 2006; Mulcahy and Lewenza, 2011; Oknin *et al.*, 2015), we supplemented the LB medium with MgCl_2 to assess its effect on the formation of attached biofilms. At a high concentration (20 mM), no significant effect on biofilm formation was observed, except for strain PPF-1, where attached biofilm increased (p-value < 0.0001) (**Figure 3.2B**). The use of MgSO_4 instead of MgCl_2 confirmed these results (**Figure 3.3**). The results were similar at a lower concentration of Mg^{2+} (2 mM), although, in these conditions, Urg-7's biofilm formation was slightly decreased (p-value < 0.05). However, the amount of attached biofilm formed by the Urg-7 strain was still equivalent or more important than in the other strains (**Figure 3.3**).

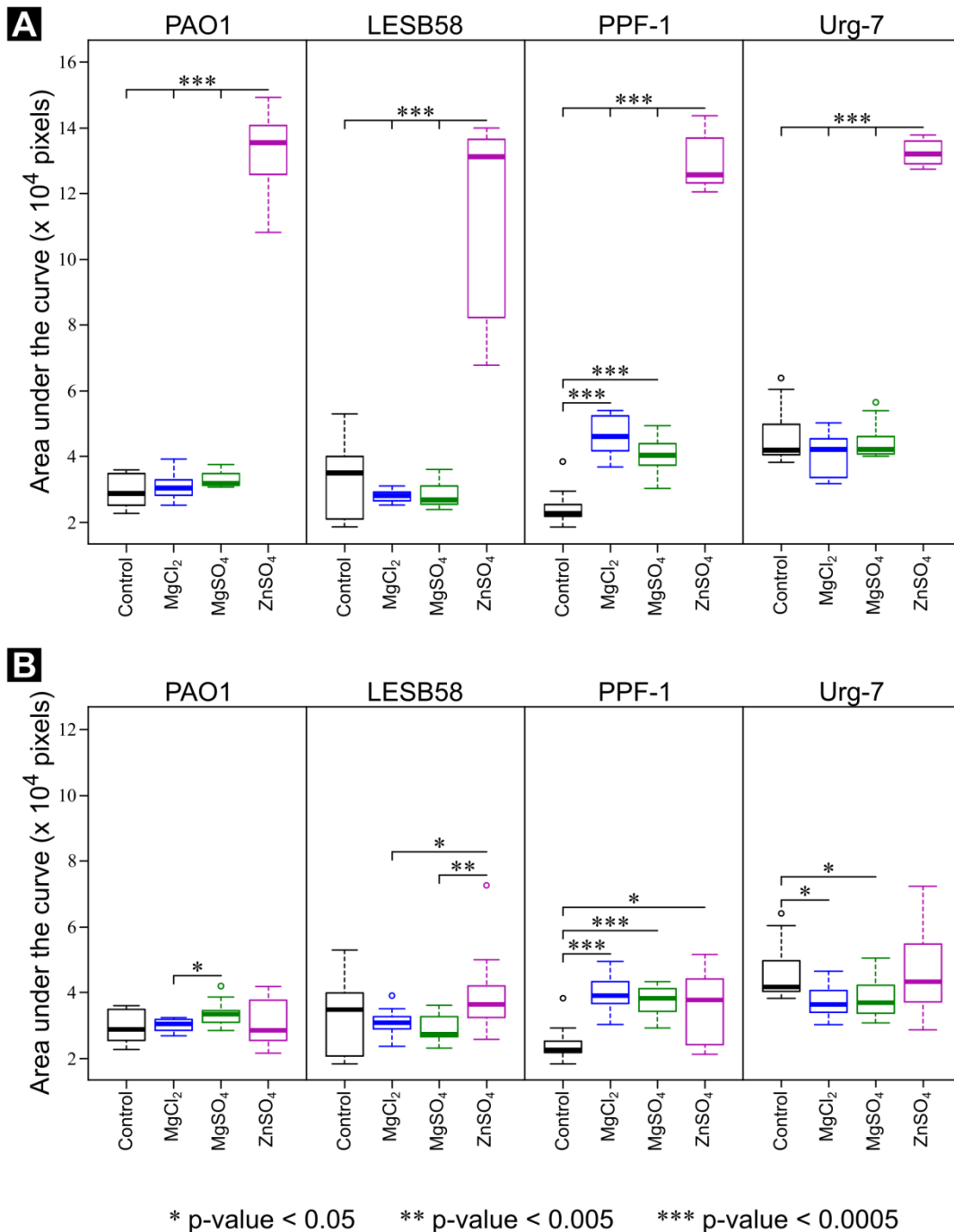


Figure 3.3 Attached biofilm quantification.

For each half of a well stained with CV, the average pixel intensity (per row of pixels) was obtained with ImageJ and represented in a graph (see **Figure 3.1A**). The amount of biofilm was calculated as the number of pixels under the curve. The Mann-Whitney U statistical test was used to assess the significance of the data obtained between the strains and the conditions of **(A)** 20 mM and **(B)** 2 mM of added ions. PPF-1 produced less biofilm than PAO1 (p-value = 0.041). Urg-7 produced more biofilm than all the other strains (p-value < 0.0005 in comparison with PAO1 or PPF-1 and p-value = 0.012 in comparison with LESB58) (not indicated on the graph). **(A)** With an

addition of 20 mM of Zn^{2+} , the biofilm formation increased in all the strains. An addition of 20 mM of Mg^{2+} increased the biofilm formation only for PPF-1. **(B)** The addition of only 2 mM of Mg^{2+} also increased the biofilm formation of PPF-1, but reduced it slightly in Urg-7 and had no significant effect in PAO1 and LESB58. The addition of 2 mM of Zn^{2+} was not sufficient to enhance the biofilm formation.

Contrary to what was observed previously (Lee *et al.*, 2014), the addition of Zn^{2+} did not prevent biofilm formation on the walls, even in PAO1. While 2 mM of Zn^{2+} did not affect the attached biofilm formation (**Figure 3.1B** and **3.3B**) the addition of 20 mM of Zn^{2+} promoted the attached biofilm formation considerably for all the strains (p-value < 0.0001) (**Figure 3.2B**), not only at the air-liquid interface, but on the total immersed area of the wells (**Figure 3.1B**). These results can probably be explained by the incubation conditions used, different to those used previously. The positive effects of Zn^{2+} on attached PAO1 biofilm formation was previously reported in artificial sputum medium (Marguerettaz *et al.*, 2014). Given that Zn^{2+} can decrease (Lee *et al.*, 2014) or increase (Marguerettaz *et al.*, 2014 and our study) the attached biofilm formation, the growth and culture conditions probably play a large role in how Zn^{2+} will impact biofilm formation and growth.

The Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory of colloid stability is often used in studies about bacterial adhesion as a way to explain the initial interaction between microorganisms and a substratum. According to this theory, the adhesion of bacteria to a surface is enhanced proportional to the ionic strength of the culture medium (Hermansson, 1999). However, our results with 20 mM of Mg^{2+} compared to 20 mM of Zn^{2+} are clearly different, so the lower adhesion with Mg^{2+} compared to Zn^{2+} is likely attributable to factors other than the ionic strength of the medium. The role of ion availability on enzymatic function and transcription regulation (Waldron and Robinson, 2009; Lee *et al.*, 2014; Subramani *et al.*, 2016) or the dose-dependent antimicrobial activity of certain metals (Lemire *et al.*, 2013) could affect the bacterial adhesion differently for each ion. This is not the first time that a divergence with the DLVO theory has been observed. It reflects the active nature of microorganisms, which are not inert particles (Hermansson, 1999).

It is interesting that the results were similar between the four strains. None of the tested salts clearly inhibited the attached biofilm formation.

3.2.4.3 *P. aeruginosa*'s floating biofilm-like structures and their modulation by cations

As commonly described in literature, to form a biofilm, by definition cells must first adhere to a surface and then produce an exopolymeric matrix (Dunne, 2002). In our study, in addition to adherent biofilms, floating BLSs were observed in some cultures (**Figure 3.4B**). This phenotype occurred reproducibly for strains LESB58 and PPF-1, and for strain Urg-7, though its aggregates were much smaller. PAO1 produced no BLS.

Our first hypothesis was that BLSs might be part of a biofilm that had detached due to the shaking. However, the presence of BLSs did not correlate to a higher or lower quantity of attached biofilm. Moreover, while the attached biofilm formation was generally not altered by the addition of 20 mM of Mg^{2+} to the LB medium (**Figure 3.2B**), the BLS formation could be inhibited (**Figure 3.4C**). This lack of correlation between BLS formation and the growth of the attached biofilm suggests that these two phenomena might not be directly related, and that BLS formation might occur by mechanisms other than attached biofilm formation.

In a study about the deposit of *Pseudomonas* sp. strain B13 cells in sand columns, Simoni *et al.* observed a heterogeneity of the cells' adhesion to the sand (Simoni *et al.*, 1998). They could divide the cell population in two groups that they qualified as "well-adhering" and "nonadhering" subpopulations. Based on their other findings supporting the role of LPS in bacterial adhesion, Simoni *et al.* hypothesized that there is a difference in the LPS coating of the cells. Similarly, structural or metabolic variations in a strain's population could explain the apparently independent formation of the BLSs and the attached biofilms.

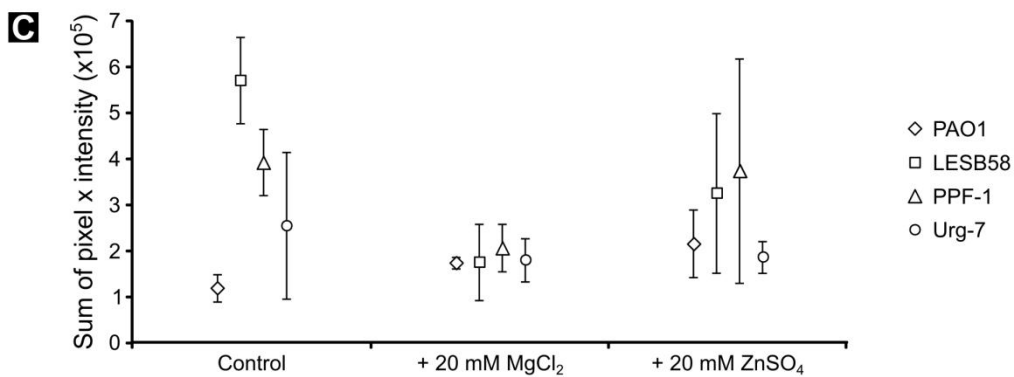
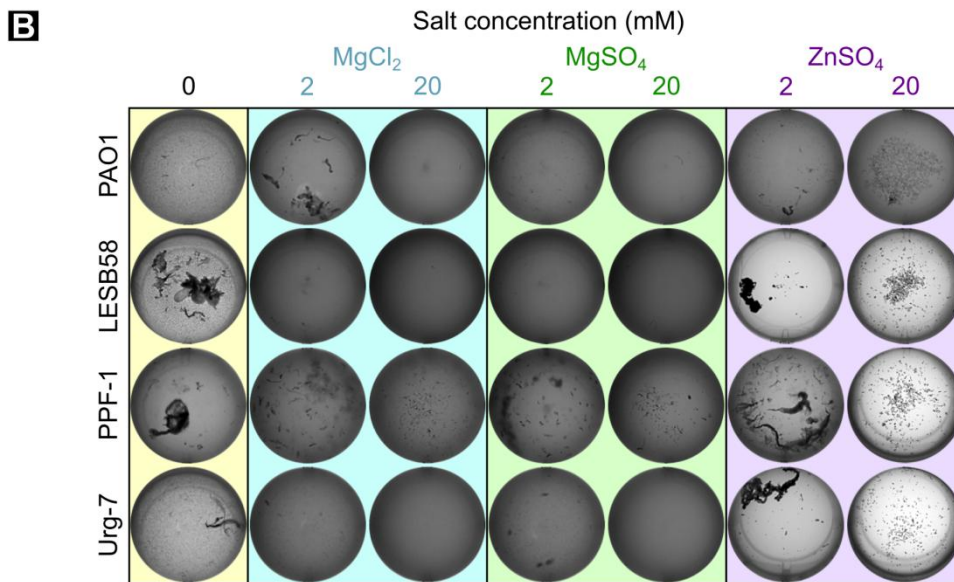
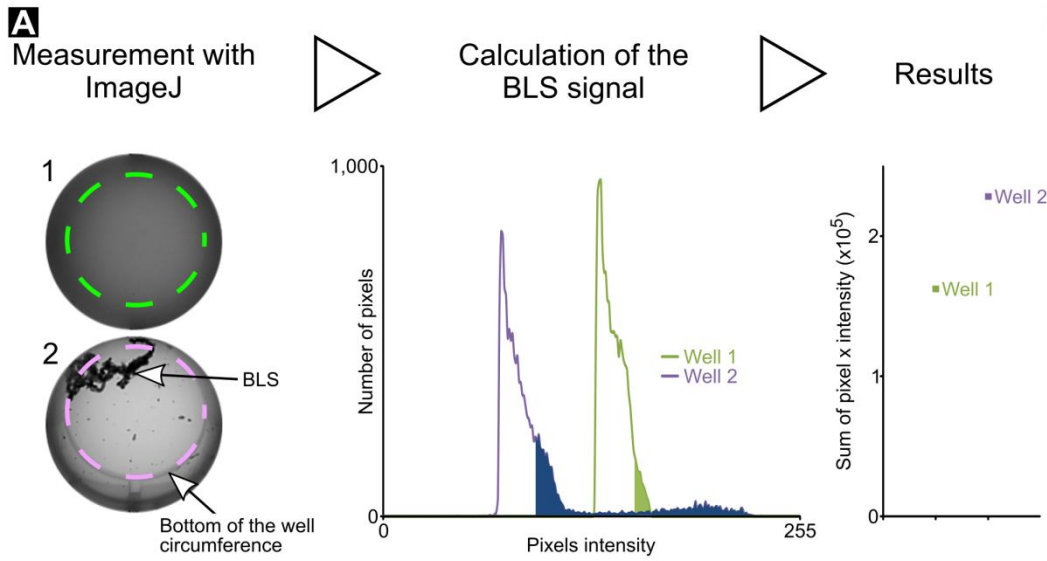


Figure 3.4 Top view of wells after incubation and before crystal violet staining. (A) Example of BLS quantification using ImageJ. The surrounding parts of the wells show the area used for quantification, which was the same size for each well and

aligned with the bottom of the well. The number of pixels was measured for each given intensity (between 0 (white) and 255 (black)). The amount of BLS is expressed as the sum of [intensities × number of pixels] in the highest intensity part of the graphic, corresponding to the BLS signal. **(B)** The formation of BLSs, floating in the medium, could be observed in the control for LESB58 and PPF-1, only slightly for Urg-7, and not at all for PAO1. **(C)** This phenomenon can be inhibited almost entirely by the addition of Mg^{2+} .

3.2.4.4 BLSs are heterogeneous structures formed of cells embedded in extracellular matrix

BLSs produced by LESB58 and PPF-1 in LB medium were imaged with scanning electron microscopy (SEM). Their composition was observed to be heterogenous, as some surface areas were smooth and others were rough (**Figure 3.5**). Both regions were mainly composed of bacteria cells. Abundant material was observed covering the cells, especially in the smooth parts of the BLSs (**Figure 3.6**). In that aspect, the biofilm-like structures display similarities with biofilms.

3.2.4.5 Planktonic growth does not correlate with biofilm formation

Our incubation conditions allowed us to monitor bacterial growth prior to biofilm quantification in the same experiment. As microbial growth is thought to be either planktonic or in biofilms, we tried to link the obtained growth curves to the amount of BLSs and the measured attached biofilms (**Figure 3.2B** and **3.4C**). With an addition of 20 mM Zn^{2+} , attached biofilm formation was greatly increased (but not the BLS formation) and almost no planktonic bacterial growth was monitored for any of the strains. However, conditions promoting planktonic bacterial growth (20 mM Mg^{2+}) did not hinder the attached biofilm formation (and even promoted it slightly in the case of PPF-1 strain), but did inhibit the BLS formation almost entirely. This information suggests that planktonic growth, attached biofilms and BLSs could represent three alternative lifestyles, each driven by their own mechanisms. In some cases, the presence of cations stimulates one lifestyle over one of the two others. For example, Zn^{2+} stimulated attached biofilms over BLSs and planktonic growth, and Mg^{2+} inhibited BLSs while favoring planktonic growth.

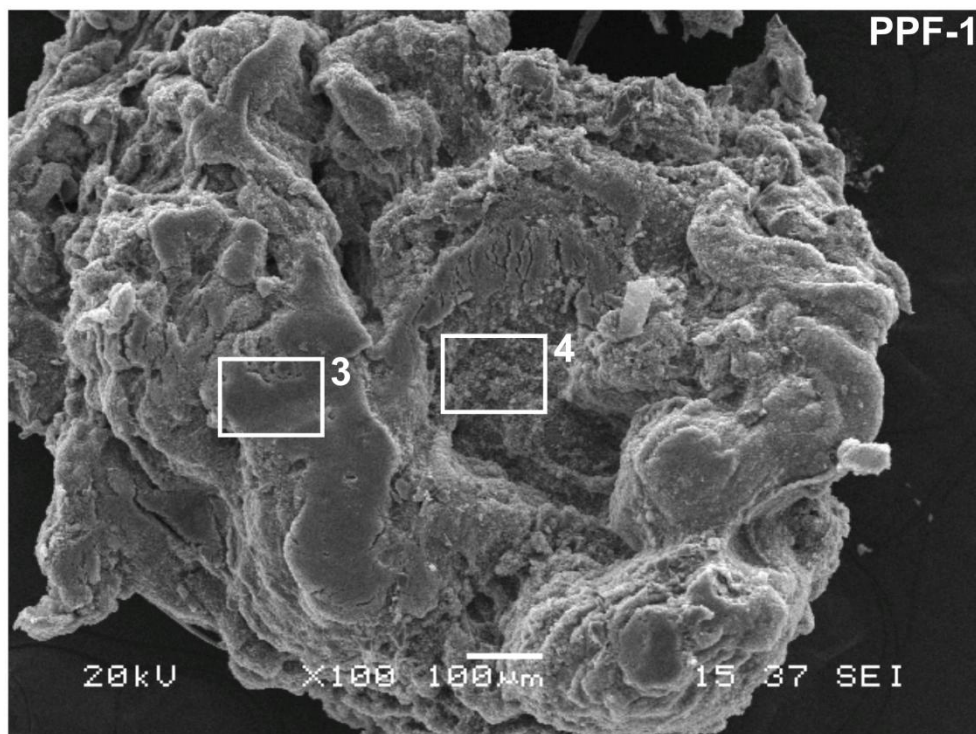
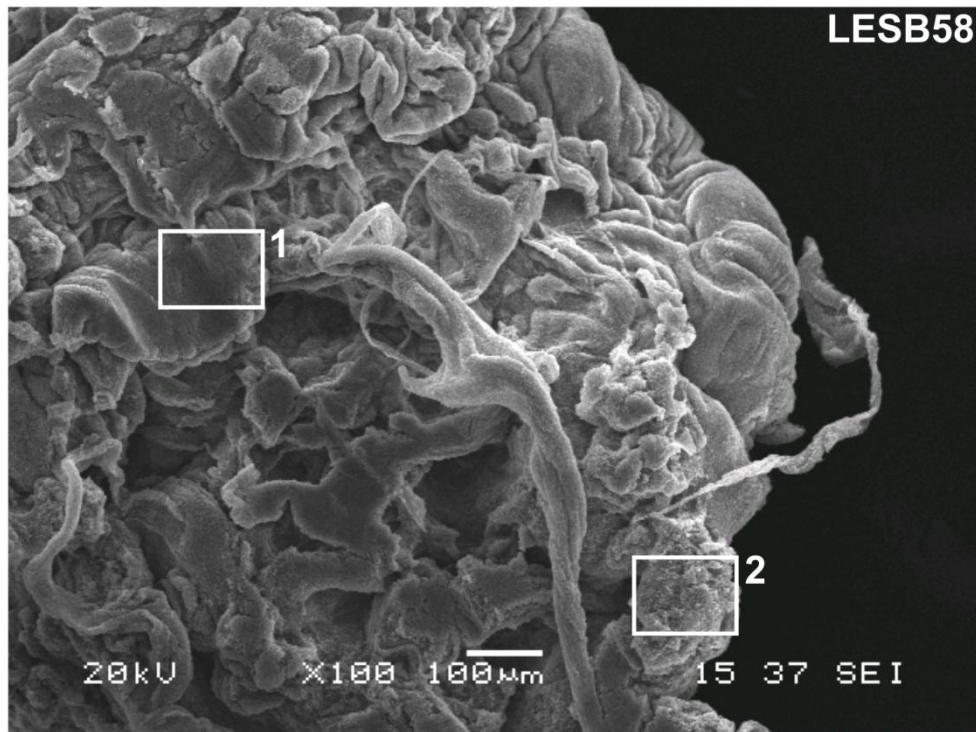


Figure 3.5 Scanning electron microscopy of LESB58 and PPF-1 BLS. BLSs were recovered from the wells before crystal violet staining and observed by SEM. Their composition was heterogeneous, with some defined area being smooth (1 and 3) and others having a rougher aspect (2 and 4). The BLSs of LESB58 appeared smoother overall than those of PPF-1.

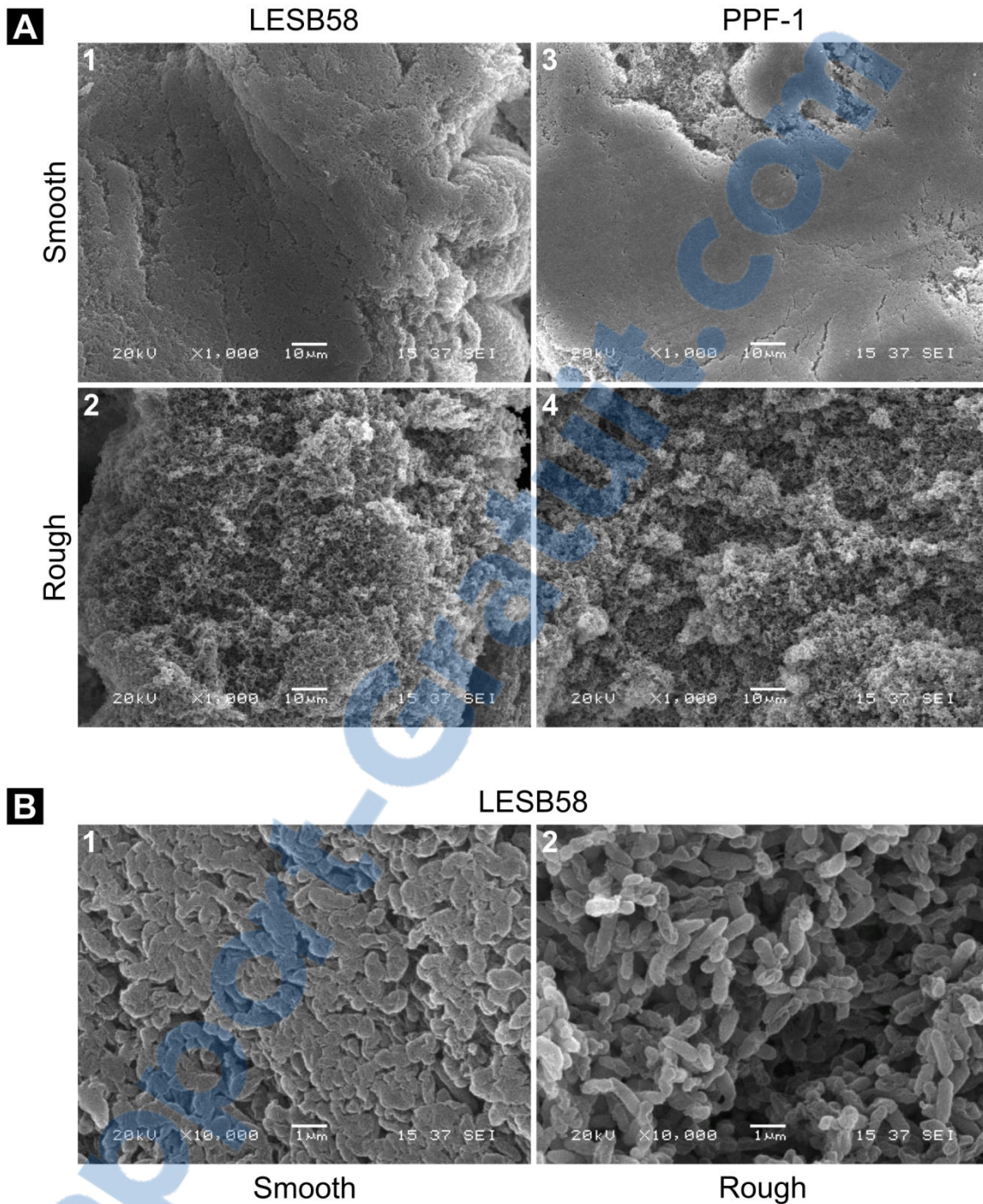


Figure 3.6 SEM enhanced view of the smooth and rough sections of the BLSs.

(A) The numbers correspond to the highlighted parts in **Figure 3.5**. Smooth and rough parts have a similar aspect for both strains. **(B)** The smooth parts are due to more biofilm matrix, while rougher parts contain less matrix.

One of the limits of the image analysis approach for the BLS quantification is that it did not take the aspect of the BLSs into account. Even though the Zn^{2+} did not reduce the overall amount of BLS material produced, the BLSs in these conditions had a very different shape

than the ones in the control conditions (**Figure 3.4B**). To fully understand the reasons for this, it will be necessary to study the difference in biochemical composition of BLSs in both the control and treated conditions. At this concentration, Zn²⁺ possibly represents a stress for the bacteria (Lemire *et al.*, 2013) that could also be investigated using transcriptomics.

3.2.4.6 Conclusions and perspectives

Using non-static growth conditions and a novel image analysis approach, we were able to quantify and compare the biofilm formation of four different strains of *P. aeruginosa*. We observed that strains varied more in the floating BLS formation, than in the attached biofilm formation. Both phenomena showed a distinct response to the addition of divalent cations in the medium and could not be directly linked to the amount of planktonic growth. The present study proposes that there are many types of independent biofilm growth, and demonstrates that factors inhibiting or stimulating adhered biofilm formation do not always affect BLS formation in the same way. As we do not fully understand BLS formation as yet, further studies on this topic are merited. For instance, it would be interesting to assess the capability for BLS formation of *P. aeruginosa* mutants with decreased production of specific exopolysaccharides such as the *pel* or *psl* gene mutants previously described in the PA14 and PAO1 strains (Jackson *et al.*, 2004; Friedman and Kolter, 2004b).

3.2.5 References

- Alhede, M., Kragh, K.N., Qvortrup, K., *et al.*, 2011. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. PLoS One 6, e27943.
- Banin, E., Vasil, M.L., Greenberg, E.P., 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 11076–11081.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G.G., *et al.*, 2015. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. Microbiol. Spectr. 3.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., *et al.*, 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 13, 20–26.
- Cheng, K., Smyth, R.L., Govan, J.R., *et al.*, 1996. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. Lancet 348, 639–642.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284, 1318–1322.
- Denoncourt, A.M., Paquet, V.E., Charette, S.J., 2017. Packaging of *Mycobacterium*

- smegmatis* bacteria into fecal pellets by the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. FEMS Microbiol. Lett. 364.
- Dunne, W.M.J., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin. Microbiol. Rev. 15, 155–166.
- Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., *et al.*, 1999. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. Science 286, 1561–1565.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., *et al.*, 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat. Rev. Microbiol. 10, 841–851.
- Franklin, M.J., Chang, C., Akiyama, T., *et al.*, 2015. New technologies for studying biofilms. Microbiol. Spectr. 3.
- Friedman, L., Kolter, R., 2004a. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. J. Bacteriol. 186, 4457–4465.
- Friedman, L., Kolter, R., 2004b. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. Mol. Microbiol. 51, 675–690.
- Hancock, R.E., Mutharia, L.M., Chan, L., *et al.*, 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. Infect. Immun. 42, 170–177.
- Hermansson, M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. Colloids and surface B: biointerfaces 14, 105–119.
- Hogardt, M., Heesemann, J., 2013. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 358, 91–118.
- Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., *et al.*, 2004. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. J. Bacteriol. 186, 4466–4475.
- Jacques, M., 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. Trends Microbiol. 4, 408–409.
- Jani, M., Mathee, K., Azad, R.K., 2016. Identification of novel genomic islands in Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* using segmentation and clustering. Front. Microbiol. 7, 1210.
- Karatan, E., Watnick, P., 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 310–347.
- Kukavica-Ibrulj, I., Bragonzi, A., Paroni, M., *et al.*, 2008. *In vivo* growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. J. Bacteriol. 190, 2804–2813.

- Kumar, C.G., Anand, S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 9–27.
- Kus, J. V, Tullis, E., Cvitkovitch, D.G., *et al.*, 2004. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* 150, 1315–1326.
- Lee, J.H., Kim, Y.G., Cho, M.H., *et al.*, 2014. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol Res* 169, 888–896.
- Lemieux, A.A., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., *et al.*, 2016. Genes required for free phage production are essential for *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infections. *J Infect Dis* 213, 395–402.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384.
- Li, Z., Kosorok, M.R., Farrell, P.M., *et al.*, 2005. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 293, 581–588.
- Loo, C.-Y., Young, P.M., Cavaliere, R., *et al.*, 2014. Silver nanoparticles enhance *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm detachment. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40, 719–729.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Speert, D.P., 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 62, 596–605.
- Marguerettaz, M., Dieppois, G., Que, Y.A., *et al.*, 2014. Sputum containing zinc enhances carbapenem resistance, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* 77, 36–41.
- Mulcahy, H., Lewenza, S., 2011. Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PLoS One* 6, e23307.
- Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., Lewis, K., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 68, 1–12.
- O'Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2437.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., *et al.*, 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310, 91–109.
- Oknin, H., Steinberg, D., Shemesh, M., 2015. Magnesium ions mitigate biofilm formation of *Bacillus* species via downregulation of matrix genes expression. *Front. Microbiol.* 6, 907.
- Ouellet, M.M., Leduc, A., Nadeau, C., *et al.*, 2014. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dental unit waterlines can be divided in two distinct groups, including one displaying

- phenotypes similar to isolates from cystic fibrosis patients. *Front. Microbiol.* 5, 802.
- Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., *et al.*, 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 518–529.
- Simoni, S.F., Harms, H., Bosma, T.N.P., *et al.*, 1998. Population heterogeneity affects transport of bacteria through sand columns at low flow rates. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2100–2105.
- Song, B., Leff, L.G., 2006. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Res.* 161, 355–361.
- Sriramulu, D.D., Lunsdorf, H., Lam, J.S., *et al.*, 2005. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* 54, 667–676.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., *et al.*, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Subramani, S., Perdreau-Dahl, H., Morth, J.P., 2016. The magnesium transporter A is activated by cardiolipin and is highly sensitive to free magnesium *in vitro*. *Elife* 5, e11407.
- Vincent, A.T., Freschi, L., Jeukens, J., *et al.*, 2017. Genomic characterisation of environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dental unit waterlines revealed the insertion sequence IS*Pa11* as a chaotropic element. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93.
- Waldron, K.J., Robinson, N.J., 2009. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 25–35.
- Weiss Nielsen, M., Sternberg, C., Molin, S., *et al.*, 2011. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *J. Vis. Exp.* 2383.
- Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 417–423.
- Winstanley, C., Langille, M.G., Fothergill, J.L., *et al.*, 2009. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19, 12–23.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., *et al.*, 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109, 317–325.

Chapitre 4 : Conclusion

4.1 Discussion générale

Puisqu'elle est responsable d'infections pulmonaires chroniques chez les gens atteints de FK, il est nécessaire de parvenir à combattre efficacement la bactérie *P. aeruginosa*. Cela demeure néanmoins un défi dû, entre autres, à l'adaptation des souches causant ces infections. Cela se traduit dans une utilisation modifiée des facteurs de virulence dont elles disposent et une augmentation de leur résistance aux traitements antibiotiques. Une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait, dans le futur, permettre le développement de traitements alternatifs spécifiques pour diminuer la virulence de *P. aeruginosa* et ainsi rendre cette bactérie plus facile à éliminer. Ce projet de maîtrise visait donc à approfondir notre compréhension de la virulence de *P. aeruginosa*. À cette fin, deux objectifs spécifiques avaient été formulés. 1) Comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'atténuation de la virulence du mutant STM PALES_11731 de la souche LESB58 afin de mettre à jour de nouvelles pistes de traitements possibles contre cette bactérie épidémique et adaptée à l'infection chronique de gens souffrant de FK. 2) Caractériser les différences au niveau de la formation du biofilm de différentes souches de *P. aeruginosa*, puisque le biofilm, jouant un rôle considérable dans la chronicité des infections, a déjà été proposé comme étant une cible thérapeutique potentielle.

4.1.1 Étude du mutant STM PALES_11731

Une banque de 9216 mutants de la souche épidémique LESB58 de *P. aeruginosa* a été créée par STM en 2009 (Winstanley *et al.*, 2009). Par sélection négative lors d'un criblage utilisant le rat comme modèle d'infection pulmonaire chronique, 163 de ces mutants ont démontré un défaut de leur capacité infectieuse. Ces 163 mutants ont ensuite été criblés successivement dans deux autres hôtes : l'amibe, qui représente un modèle d'hôte phagocytaire similaire aux macrophages (Lima *et al.*, 2011), et la drosophile, chez qui l'infection provoquée était systémique (Vodovar *et al.*, 2004). Au final, le mutant STM PALES_11731 a été identifié comme ayant la virulence la plus atténuée. Ainsi, en compétition avec la souche sauvage, ce mutant s'est avéré 20 fois moins apte que LESB58 à se maintenir dans le modèle pulmonaire murin (**Figure 2.3**).

Les différentes pistes explorées pour tenter d'expliquer la diminution de la virulence du mutant STM PALES_11731 n'ont pas permis de mettre en relation ce phénomène avec l'altération de l'expression d'un gène précis. Dans un contexte d'identification de facteurs de virulence par STM, il est espéré que l'insertion du transposon causera une inactivation du gène à l'intérieur duquel a lieu la transposition (Autret et Charbit, 2005). Cependant, dans le cas présent, l'insertion s'est produite dix nucléotides avant la fin du gène PALES_11731 (*yfgM*), permettant réalistement la transcription adéquate du gène dans sa quasi-totalité (**Figure 2.S1**). De plus, la transposition s'est effectuée de telle sorte qu'un codon de terminaison se retrouve inséré tout de suite après le début de la séquence appartenant au transposon. La traduction de l'ARNm produit par l'opéron contenant *yfgM* produit donc vraisemblablement une protéine YfgM non chimérique et seulement plus courte de deux acides aminés par rapport à la protéine non mutée (**Figure 2.S2**). Les résultats obtenus au chapitre 2 soutiennent l'idée que la transposition n'est pas parvenue à altérer la fonction de la protéine YfgM du mutant STM PALES_11731 (**Table 2.S2**). Par ailleurs, l'hypothèse d'un effet polaire du transposon sur les gènes en aval d'*yfgM* dans l'opéron (*bamB* et *engA*) a également été écartée par une analyse en RT-qPCR, mais aussi par différents tests phénotypiques. L'impact de l'insertion du transposon au point de vue moléculaire reste donc indéterminé.

Malgré tout, il est pertinent de mentionner que la fonction de la protéine YfgM n'est, à ce jour, pas bien comprise. Il subsiste donc un doute quant à l'absence d'impact de l'élimination de ses deux acides aminés terminaux. Ainsi, considérant que l'avant-dernier acide aminé (un acide glutamique) semble conservé y compris dans d'autres genres bactériens (résultat non montré), il n'est pas exclu qu'il soit critique pour la fonction de la protéine. Puisque YfgM interagit vraisemblablement avec d'autres protéines (notamment PpiD dans le périplasma, possiblement afin d'assister le chaperonnage de certaines protéines à la sortie du translocon SecYEG (Götzke *et al.*, 2014), et RcsB, un régulateur positif de la réponse au stress dont l'action serait normalement inhibée par YfgM (Westphal *et al.*, 2012; Bittner *et al.*, 2017), il est envisageable que cet acide aminé soit l'un de ceux qui participent à la formation ou la stabilisation de pareilles interactions. L'absence de formation de BLS chez le mutant STM PALES_11731 pourrait être le résultat indirect d'une incapacité de la protéine YfgM à interagir correctement avec d'autres protéines, causée par la perte des deux acides aminés en C-terminal.

Bien que l'étude se soit concentrée sur le mutant STM PALES_11731 parce qu'il était le moins virulent des mutants dans les trois hôtes testés, d'autres mutants ont démontré une diminution significative de leur capacité infectieuse. Après le troisième criblage (celui chez la drosophile), trois autres mutants s'étaient démarqués (**Figure 2.2**). Au moins deux de ces mutants mériteraient d'être analysés plus en profondeur dans une suite possible de ce projet.

Chez le mutant STM PALES_03331, le transposon s'est inséré dans le gène *ygdP* (également nommé *rppH*), gène codant pour une ARN pyrophosphohydrolase (Deana *et al.*, 2008). Chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*, ce gène joue un rôle dans la virulence bactérienne en contribuant à l'invasion des cellules eucaryotes (Badger *et al.*, 2000; Ismail *et al.*, 2003). Puisque l'insertion du transposon chez le mutant s'est faite près du début de la séquence nucléotidique du gène (après le 59^e nucléotide sur un total de 480), il est permis de croire qu'une protéine YgdP fonctionnelle ne peut pas être produite. Aucune étude n'a été faite pour déterminer si LESB58 est capable de virulence intracellulaire, *P. aeruginosa* étant généralement décrite comme une bactérie pathogène extracellulaire (Belon *et al.*, 2015). Le résultat du triple criblage indique toutefois que le gène *ygdP* pourrait être important pour la virulence de la bactérie, que ce soit par ce mécanisme ou par un autre, inconnu.

Chez le mutant STM PALES_32561, c'est dans un gène codant pour une protéine hypothétique que s'est inséré le transposon. Cela risque de représenter un travail ardu pour en comprendre le rôle dans la virulence de LESB58. Néanmoins, puisque le transposon se trouve en position 152 de la séquence nucléotidique du gène, soit 60 nucléotides avant la fin, on peut espérer que cette insertion parvient à perturber l'expression du gène ou l'activité de la protéine tronquée potentiellement produite.

En contrepartie, le mutant STM PALES_43121 risque de poser le même défi d'analyse que le mutant STM PALES_11731. En effet, c'est seulement 23 nucléotides avant la fin du gène *purC* que le transposon s'est inséré. La fonction de la protéine PurC, partie intégrante du métabolisme de synthèse des purines (Zhang *et al.*, 2008), pourrait tout de même être perturbée, entre autres, si la séquence correspondant au transposon entraîne l'ajout d'acides aminés supplémentaires. Cela ne représente néanmoins pas une situation idéale, où le gène serait simplement inactivé. De plus, *purC* et au moins un des quatre autres gènes de l'opéron (*dapA*) où s'est inséré le transposon jouent un rôle dans la

croissance bactérienne. Le gène *dapA* est, en effet, impliqué dans la biosynthèse de la lysine (Richaud *et al.*, 1986). Conséquemment, la diminution de la virulence observée lors des criblages pourrait être due à une croissance ralentie et non à un facteur de virulence déficient.

Des trois mutants autres que STM PALES_11731 retenus après les trois criblages, le mutant STM PALES_03331 aurait donc possiblement été un choix duquel il aurait été plus simple d'obtenir un résultat clair. À moins d'un effet polaire affectant aussi les gènes suivants *ygdP* dans l'opéron (*ptsP* et un gène codant pour une hypothétique *sensory box protein*) qui aurait compliqué l'analyse, il aurait peut-être été possible de prouver l'importance de ce gène spécifiquement sur la virulence de LESB58.

Il faut, en outre, garder à l'esprit que *P. aeruginosa* est capable d'infecter de différentes manières plusieurs types d'hôtes parce que la complexité génomique de cette bactérie lui procure un métabolisme très adaptable (Stover *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). Un hôte servant d'alternative à une étude chez l'Homme (éthiquement irréalisable) présente des singularités qui lui sont propres. Il ne sert donc que de modèle pour prédire un phénomène de virulence probable chez l'être humain également. En effet, comme démontré dans une étude testant la virulence de mutants par transposon de PAO1 dans quatre modèles d'hôtes, les facteurs de virulence principalement impliqués dans l'infection d'un hôte peuvent être de faible importance pour l'infection d'un hôte différent (Dubern *et al.*, 2015). Pour l'étude d'un mécanisme de virulence particulier, il convient donc de choisir adéquatement le modèle d'hôte utilisé.

La stratégie de triple criblage présentée au chapitre 2 du présent document avait pour but de détecter des facteurs de virulence généralistes et a donc utilisé trois organismes modèles très différents. Cela a rendu possible la discrimination d'un grand nombre de mutants pour n'en conserver que quatre. La probabilité est élevée que les facteurs de virulence altérés chez ces mutants soient absolument nécessaires pour que *P. aeruginosa* LESB58 puisse causer une infection de n'importe quel type, ce qui en fait des cibles de choix pour combattre cette bactérie. Néanmoins, des trois hôtes utilisés, le premier (le rat) était certainement celui qui se rapprochait le plus du type d'infection normalement causé par la souche LESB58 (une infection pulmonaire chronique). Les mutants peu virulents dans le poumon de rat, mais écartés lors des deux criblages suivants, étaient capables d'une virulence similaire à la souche sauvage chez l'amibe ou la drosophile. Ils n'en

demeurent pas moins potentiellement intéressants pour l'étude de facteurs de virulence moins généralistes, mais d'importance spécifiquement dans l'infection pulmonaire, comme c'est le cas chez les gens atteints de FK. Une attention particulière pourrait donc aussi être portée à chacun des 163 mutants identifiés lors du criblage chez le rat.

4.1.2 Étude de la diversité des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*

En mettant au point une nouvelle méthode inspirée du protocole de croissance de biofilms en microplaques (O'Toole, 2011) et mettant de l'avant l'analyse d'images, il a été possible de quantifier les biofilms adhérents et les BLS de plusieurs souches de *P. aeruginosa*. L'effet qu'a l'ajout de cations bivalents sur la production de ces structures a également pu être évalué. Il est apparu que la formation de BLS est plus variable entre les souches que la production de biofilms adhérents à une surface. Il a de plus été démontré que les effets des ions observés sur les biofilms attachés ne permettent pas de déduire quels seront les effets sur les BLS. Par conséquent, il a été proposé que les formations de biofilms adhérents et de BLS soient dirigées par des mécanismes qui sont, au moins en partie, différents.

Les quatre souches utilisées étaient éloignées phylogénétiquement afin d'offrir une certaine représentativité de la diversité des souches de *P. aeruginosa* (**Figure 1.3**). Ainsi, deux provenaient de contextes cliniques différents (PAO1 provenant d'une blessure de la peau et LESB58 de poumons FK) et deux ont été isolées des mêmes canalisations d'eau potable, mais présentaient des caractéristiques génétiques et phénotypiques qui leur sont propres (Urg-7 [Cluster II] et PPF-1 [Cluster III]) (Ouellet *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2017). Les résultats du chapitre 3 n'ont pas permis de tirer de conclusions sur les mécanismes expliquant les différences de formation de biofilms adhérents ou de BLS de ces quatre souches. Néanmoins, dans la discussion de ce chapitre, quelques hypothèses ont été avancées.

Il a été suggéré que la formation inégale de biofilms entre les souches puisse provenir de différences structurales de ces souches. Plus précisément, s'il existe des particularités au niveau de la membrane externe (LPS, fimbriae, adhésines, pili de type IV, etc.) en fonction des souches, cela serait susceptible de leur offrir une capacité d'adhérence distincte (voir chapitre 3, section 3.2.4.1). Il a également été évoqué que la formation de BLS puisse être liée à l'existence possible d'une hétérogénéité de la population chez une même souche.

Plusieurs méthodes permettant de confirmer, de quantifier ou d'analyser la formation de biofilms ont été publiées (Franklin *et al.*, 2015). En plus de sa simplicité, permettant de tester à haut débit un grand nombre de conditions (l'analyse des résultats étant l'étape limitante), l'approche utilisée au chapitre 3 offre l'avantage de permettre une quantification indépendante des BLS et des biofilms adhérents et d'obtenir une courbe de croissance des cellules planctoniques en même temps. Néanmoins, la profondeur de l'analyse subséquente pourrait être augmentée, entre autres, dans le cas de la quantification des biofilms adhérents. En effet, au chapitre 3, seule la quantité totale de biofilm (c'est-à-dire l'aire sous la courbe obtenue par ImageJ (**Figure 3.2A**)) a été mesurée, pas sa répartition sur la paroi. Il est toutefois possible que deux souches produisant la même quantité de biofilm au total ne le fassent pas au même endroit sur la paroi du puits, une information qui peut avoir son importance. Cela pourrait notamment indiquer une capacité d'adhérence au polystyrène différente entre les souches. Il en résulterait donc une répartition distincte des cellules dans le puits en réponse aux forces de cisaillement qui, comme cela a déjà été démontré (Salek *et al.*, 2012), sont inégalement appliquées sur la paroi par l'agitation du milieu de culture.

Par ailleurs, l'une des faiblesses de la méthode de culture utilisée est que le milieu de culture n'est pas renouvelé. Sa composition change donc au fil du temps, les bactéries épuisant progressivement les nutriments qui s'y trouvent et relâchant diverses molécules (déchets métaboliques, facteurs de virulence, composants cellulaires lors de leur mort, etc.). L'impact provoqué par cette évolution sur la maturation du biofilm ne peut pas être mesuré. En comparaison, un système d'étude des biofilms comme la microfluidique permet d'assurer un apport continu de milieu frais et donc un contrôle de cette variable dans la formation du biofilm. La microfluidique est un système permettant la visualisation de l'écoulement laminaire de fluides dans un canal dont au moins l'une des dimensions est de l'ordre du micromètre et qui est couramment utilisé pour étudier les biofilms (Kim *et al.*, 2012). Dans ce système, la formation des biofilms peut être observée en temps réel. Par contre, si la microfluidique avait été utilisée au départ, elle n'aurait vraisemblablement pas permis de quantifier les BLS (qui auraient été rejetés hors du système), si tant est que leur formation ait été possible.

4.1.3 Comprendre la formation des *biofilm-like structures* (BLS)

Parmi tous les phénotypes observés susceptibles d'expliquer la réduction de la virulence du mutant STM PALES_11731, un seul s'est avéré différent de la souche sauvage LESB58 : la formation de BLS est réduite chez le mutant. Après une évaluation détaillée faite selon la méthodologie décrite au chapitre 3 de ce mémoire, il apparaît que ce défaut se limite à la formation de BLS et que la quantité de biofilms attachés n'est pas affectée (**Annexe 1**). Comme expliqué au chapitre 2, cette défaillance participe possiblement à la diminution de la virulence du mutant, mais elle ne l'explique vraisemblablement pas entièrement. En effet, il est probable que les facteurs de virulence utilisés par la souche LESB58 soient combinatoires et différents en fonction de l'hôte qu'elle infecte (Lee *et al.*, 2006; Dubern *et al.*, 2015). Ainsi, en supposant que la formation de BLS participe effectivement à la virulence de cette bactérie, il se peut que ce mécanisme ne soit pas de première importance chez tous les hôtes. Par exemple, lors du criblage avec les amibes, les conditions de culture utilisées ne permettaient pas la production de BLS, même chez la souche sauvage (**Figure 2.S7**). Ce n'est donc logiquement pas par ce mécanisme que LESB58, contrairement au mutant, parvient à résister à la phagocytose par les amibes. Par ailleurs, lors de la détermination de l'indice de compétitivité (CI), le mutant et la souche sauvage ont cohabité dans les poumons des rats. Si c'est uniquement l'absence de formation de BLS qui a réduit la virulence du mutant, impliquant que la souche sauvage en aurait formé, cela indiquerait que le mutant, en plus d'être incapable de produire ses propres BLS, serait incapable d'être intégré aux BLS formés par la souche sauvage. Il apparaît plus réaliste que, en plus d'un défaut de formation de BLS, d'autres mécanismes non identifiés aient aussi été impliqués dans le manque de virulence du mutant.

La formation de biofilm adhérent est un sujet qui a déjà été abondamment documenté, mais les mécanismes responsables de la formation des BLS observés au chapitre 2 et au chapitre 3 demeurent indéterminés. À ce sujet, plusieurs hypothèses peuvent être avancées d'après les résultats présentés au chapitre 3, qui ont été obtenus en utilisant plusieurs souches. Par exemple, il est connu que la composition de la matrice produite n'est pas la même pour toutes les souches de *P. aeruginosa*. Chez PAO1, l'exopolysaccharide majoritairement produit est Psl (Colvin *et al.*, 2011), alors qu'il s'agit vraisemblablement de l'alginate chez LESB58 (Ramsey et Wozniak, 2005) et que cette

information n'est pas connue pour PPF-1 et Urg-7. Il a déjà été démontré que la quantité de Psl présente dans un biofilm de *P. aeruginosa* affecte sa structure (Ghafoor *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2013). Il est donc possible que l'absence de production de BLS chez PAO1, au contraire des trois autres souches testées, puisse être expliquée par le peu d'alginate contenu dans son biofilm. Une analyse de la production d'exopolysaccharides des souches PPF-1 et Urg-7 devra cependant être faite pour vérifier cette hypothèse. Il existe également une variation de l'expression du QS entre les quatre souches, le gène *lasR* de LESB58 et PPF-1 étant altéré (Salunkhe *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2017). Ces deux souches sont également celles produisant le plus de BLS. Puisque le QS joue un rôle important, entre autres, dans la formation de biofilm, c'est peut-être l'altération de ce mécanisme qui cause, via l'un ou plusieurs des nombreux processus métaboliques sous son contrôle, la formation de BLS chez une souche.

La formation de BLS pourrait aussi être une finalité due à la mortalité des cellules. En effet, la lyse des cellules mortes entraîne la libération du matériel cellulaire, dont les acides nucléiques qui sont très adhérents. Ils sont d'ailleurs connus pour participer à la structuration des biofilms (Whitchurch *et al.*, 2002). Or, une coloration différentielle des cellules mortes et vivantes à l'intérieur des BLS de LESB58 et de PPF-1 a démontré que des cellules vivantes s'y retrouvent, bien qu'il soit difficile d'en évaluer la proportion (**Annexe 2**). Avant de pouvoir en tirer une conclusion, ce résultat devra être comparé à une évaluation similaire faite sur les biofilms adhérents. Une proportion de viabilité des cellules plus grande dans les biofilms adhérents que dans les BLS pourrait soutenir l'hypothèse que les BLS ne sont pas une construction bactérienne, mais simplement un amas de débris. Néanmoins, même avec un temps d'incubation doublé (dépassant de plus de 30 heures l'atteinte de la phase stationnaire de croissance), la souche PAO1 ne forme pas de BLS (**Annexe 3**). Le fait que le mutant STM PALES_11731, au contraire de la souche sauvage LESB58, ne parvienne pas à former de BLS joue également en défaveur de cette hypothèse comme unique explication à la formation des BLS. Il semble en effet peu probable que l'insertion d'un transposon parvienne à empêcher la mortalité ou la lyse cellulaire. Il est donc tout aussi probable que, même s'il est prouvé que la mort des bactéries joue un rôle dans la formation des BLS, d'autres facteurs propres à chaque souche bactérienne doivent être pris en considération.

Au chapitre 3, l'hypothèse que les BLS puissent provenir du détachement de portions de biofilms adhérents a été écartée dû au fait que la quantité de biofilm adhérent n'a pas pu être corrélée à une quantité de BLS produits. Si l'on tente de soutenir cette hypothèse du point de vue de la physique uniquement, il est effectivement improbable de retrouver autant de biofilm adhérent en présence de 20 mM de Mg^{2+} qu'en condition contrôle considérant que la formation de BLS, elle, est complètement inhibée. Dans le même ordre d'idée, l'augmentation de la formation de biofilms adhérents (grâce à l'ajout de 20 mM de Zn^{2+}) n'a pas augmenté la quantité de BLS retrouvés dans les puits. Cependant, en y ajoutant un point de vue biologique, l'ajout d'ions a pu modifier la structure des biofilms adhérents (Safari *et al.*, 2014), leur composition (en modifiant l'expression de certains gènes (Wiens *et al.*, 2014)) et l'état physiologique des cellules qui s'y trouvent (Csonka, 1989). Ainsi, la formation de BLS est possiblement le fruit du détachement de portions de biofilms adhérents si toutes ces variables sont prises en compte. Ce détachement serait possiblement plus ou moins important en fonction de la souche cultivée et des conditions de culture, sans être proportionnellement lié à la quantité de biofilm adhérent uniquement.

Nonobstant la viabilité ou non des cellules retrouvées dans les BLS et l'origine de ces structures, la présence de tels agrégats dans les poumons d'une personne atteinte de FK représenterait vraisemblablement un problème, puisque cela s'ajouterait au fardeau du mucus très visqueux obstruant déjà les voies respiratoires. Conséquemment, le potentiel de certaines souches de *P. aeruginosa* à former des BLS, que ces constructions soient fortuites ou non, pourrait aggraver la morbidité des patients lors des infections qu'elles sont susceptibles d'engendrer.

4.2 Conclusions et perspectives

L'importance que peut prendre la formation de BLS en tant que facteur de virulence n'est pas connue. Il a toutefois été documenté que, dans les poumons des patients atteints de FK, ce sont des agrégats de ce type (ou qui, du moins, y ressemblent) qui se forment, pas des biofilms adhérents à une surface (Lam *et al.*, 1980; Worlitzsch *et al.*, 2002). Il a été démontré que, tels les biofilms, ce type d'agrégations augmente la résistance bactérienne aux antibiotiques (Alhede *et al.*, 2011). De plus, bien que cela n'ait pas été testé, les BLS, puisqu'ils sont, comme les biofilms, composés de matériel bactériologique, sont logiquement susceptibles d'entraîner une réponse immunitaire contribuant à une inflammation chronique (Dapunt *et al.*, 2016). En outre, le fait que le mutant STM

PALES_11731, peu virulent dans trois contextes infectieux très différents, ne forme pas de BLS (mais forme du biofilm adhérent), laisse supposer une participation de ces structures dans la virulence de *P. aeruginosa*. Parvenir à inhiber la formation non seulement de biofilms, mais aussi de BLS pourrait donc potentiellement aider à combattre le développement d'infections pulmonaires chroniques à *P. aeruginosa* chez les gens souffrants de FK. Pour y parvenir, les mécanismes de formation des BLS, qui semblent distincts de ceux des biofilms adhérents comme suggéré dans le chapitre 3 de ce mémoire, doivent être élucidés.

Pour comprendre comment la formation de BLS se produit, il apparaît important de tout d'abord confirmer s'il s'agit d'un phénomène distinct de la formation de biofilm adhérent ou non. Pour cela, il faudra poursuivre la caractérisation de la composition des BLS, notamment par rapport à la nature de la matrice. Cela pourra être fait en microscopie à fluorescence, à l'aide de fluorochromes liant de façon spécifique certains composants des biofilms (Neu et Lawrence, 2015). Les résultats obtenus devront être comparés à des analyses similaires faites sur les biofilms adhérents. De plus, l'état physiologique des cellules dans les BLS pourrait être étudié en transcriptomique afin de vérifier si les gènes exprimés sont les mêmes que pour les cellules retrouvées dans les biofilms adhérents (Dötsch *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'une des limitations principales de l'étude de la formation de biofilms en plaque de 24-puits est qu'elle ne permet pas de visualiser le développement desdits biofilms. Il n'est possible que de vérifier leur présence ou non, par quantification à la fin de la période d'incubation déterminée.

Au cours d'un projet effectué en parallèle à ce projet de maîtrise et en prévision d'une étude plus en profondeur des biofilms de *P. aeruginosa*, un protocole permettant l'étude de la formation de biofilms de *P. aeruginosa* dans un système de microfluidique a été mis au point. Comme expliqué précédemment, cette approche a l'avantage de permettre une analyse en microscopie, en temps réel, de la formation et de la maturation d'un biofilm. Les résultats préliminaires utilisant ce protocole montrent déjà qu'il existe des différences importantes dans la structure des biofilms adhérents de PAO1, LESB58 et PPF-1 (**Annexe 4**). Prochainement, il sera pertinent d'utiliser ce système pour comparer la formation de biofilms adhérents entre la souche LESB58 et le mutant STM PALES_11731. Cela pourrait nous permettre d'affirmer ou d'infirmer si un lien peut bel et bien être fait entre la structure

d'un biofilm adhérent et la formation de BLS, une absence de BLS s'expliquant alors par un biofilm adhérent moins friable ou par une structuration différente de la matrice ne permettant pas la formation d'agrégats flottants.

Il sera également intéressant d'analyser, par ce système, l'impact de l'ajout d'ions au niveau microscopique. Au chapitre 3, il a été déterminé qu'il n'y avait généralement aucune différence dans la quantité de biofilm adhérent produit dans la condition contrôle et la condition avec ajout de 20 mM de Mg^{2+} . Néanmoins, si le Mg^{2+} modifie la structuration du biofilm adhérent, cela pourrait, encore une fois, être l'une des causes de l'absence de formation de BLS qui a été observée. De plus, puisque ce système permet un renouvellement continu du milieu de culture, il sera possible d'évaluer l'effet de l'ajout d'ions à différents temps et non pas juste au début de l'expérience, avant que la formation de biofilm ne débute, comme cela a été fait au chapitre 3. Il sera également possible d'injecter dans le système différentes solutions de marquage pour analyser *in situ*, par exemple en microscopie confocale à balayage laser, la composition des biofilms et la répartition des cellules qui s'y trouvent, une méthode qui a déjà fait ses preuves (Pamp *et al.*, 2009).

Ce projet de maîtrise visait à accroître notre compréhension des éléments clés gouvernant la virulence de *P. aeruginosa*. Les résultats apportés soulèvent un grand nombre de questions par rapport à la formation de biofilms chez cette bactérie et rehaussent l'importance que prend l'utilisation de souches et de conditions variées pour étudier ce phénomène. Afin d'ultimement parvenir à diminuer la virulence de *P. aeruginosa* en lien avec sa capacité à produire des biofilms, il sera nécessaire de comprendre d'où viennent, que font et que sont les BLS.

Bibliographie

- Al-Aloul, M., Crawley, J., Winstanley, C., *et al.*, 2004. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax* 59, 334–336.
- Alhede, M., Kragh, K.N., Qvortrup, K., *et al.*, 2011. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PLoS One* 6, e27943.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465–478.
- Autret, N., Charbit, A., 2005. Lessons from signature-tagged mutagenesis on the infectious mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 703–717.
- Badger, J.L., Wass, C. a, Kim, K.S., 2000. Identification of *Escherichia coli* K1 genes contributing to human brain microvascular endothelial cell invasion by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* 36, 174–182.
- Baltimore, R.S., Mitchell, M., 1980. Immunologic investigations of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of susceptibility to opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains. *J. Infect. Dis.* 141, 238–247.
- Barth, A.L., Pitt, T.L., 1996. The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 45, 110–119.
- Beloin, C., Renard, S., Ghigo, J.M., *et al.*, 2014. Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr. Opin. Pharmacol.* 18, 61–68.
- Belon, C., Soscia, C., Bernut, A., *et al.*, 2015. A macrophage subversion factor is shared by intracellular and extracellular pathogens. *PLoS Pathog.* 11.
- Bhagirath, A.Y., Li, Y., Somayajula, D., *et al.*, 2016. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* 16, 174.
- Bittner, L.M., Arends, J., Narberhaus, F., 2017. When, how and why? Regulated proteolysis by the essential FtsH protease in *Escherichia coli*. *Biol Chem.* 398, 625–635.
- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., *et al.*, 2013. Applying insights from biofilm biology to drug development-can a new approach be developed? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 791–808.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., *et al.*, 2010. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 534–543.
- Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., *et al.*, 1983. Infections caused by *Pseudomonas*

aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 5, 279–313.

- Boucher, J.C., Yu, H., Mudd, M.H., *et al.*, 1997. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. Infect. Immun. 65, 3838–3846.
- Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Nunez, C., Hancock, R.E.W., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 19, 419–426.
- Caballero, A.R., Moreau, J.M., Engel, L.S., *et al.*, 2001. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. Anal. Biochem. 290, 330–337.
- Carter, M.E.K., Fothergill, J.L., Walshaw, M.J., *et al.*, 2010. A subtype of a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis epidemic strain exhibits enhanced virulence in a murine model of acute respiratory infection. J. Infect. Dis. 202, 935–942.
- Carvalho, G., Balestrino, D., Forestier, C., Mathias, J.D., 2018. How do environment-dependent switching rates between susceptible and persister cells affect the dynamics of biofilms faced with antibiotics? NPJ Biofilms Microbiomes 4, 6.
- Chandramathi, S., Suresh, K., Sivanandam, S., *et al.*, 2014. Stress exacerbates infectivity and pathogenicity of *Blastocystis hominis*: *in vitro* and *in vivo* evidences. PLoS One 9, e94567.
- Cheng, K., Smyth, R.L., Govan, J.R., *et al.*, 1996. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. Lancet 348, 639–642.
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P.Ø., *et al.*, 2013. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2352–61.
- Chien, C.-C., Kao, C.-M., Chen, D.-Y., *et al.*, 2014. Biotransformation of trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas* spp. isolated from a TNT-contaminated environment. Environ. Toxicol. Chem. 33, 1059–1063.
- Ciofu, O., Mandsberg, L.F., Wang, H., *et al.*, 2012. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 65, 215–225.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E., Hung, D.T., 2007. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. Nat. Chem. Biol. 3, 541–548.
- Cohen, Y., 2001. Biofiltration - The treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresour. Technol. 77, 257–274.
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., *et al.*, 2011. The *pel* polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog. 7, e1001264.

- Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., *et al.*, 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.* 14, 1913–1928.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Courtney, J.M., Bradley, J., Mccaughan, J., *et al.*, 2007. Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 42, 525–532.
- Cox, M.J., Allgaier, M., Taylor, B., *et al.*, 2010. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One* 5, e11044.
- Csonka, L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 121–47.
- Cutting, G.R., 2015. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat. Rev. Genet.* 16, 45–56.
- Cystic Fibrosis Foundation, 2018. Antibiotics. URL : <https://www.cff.org/Life-With-CF/Treatments-and-Therapies/Medications/Antibiotics/> (Consulté le 2.11.2018).
- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 2018. Cystic fibrosis mutation database. URL : <http://genet.sickkids.on.ca/Home.html> (Consulté le 2.11.2018).
- D'Argenio, D.A., Wu, M., Hoffman, L.R., *et al.*, 2007. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* 64, 512–533.
- Dapunt, U., Hänsch, G.M., Arciola, C.R., 2016. Innate immune response in implant-associated infections: Neutrophils against Biofilms. *Materials (Basel)*. 9, 387.
- Davis, P.B., Drumm, M., Konstan, M.W., 1996. Cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 1229–1256.
- Deana, A., Celesnik, H., Belasco, J.G., 2008. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* 451, 355–358.
- Di, A., Brown, M.E., Deriy, L. V, *et al.*, 2006. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat. Cell Biol.* 8, 933-U52.
- Dodge, J.A., Turck, D., 2006. Cystic fibrosis: Nutritional consequences and management. *Best Pract. Res. Clinial Gastroenterol.* 20, 531–546.
- Doring, G., Conway, S.P., Heijerman, H.G.M., *et al.*, 2000. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur. Respir. J.* 16, 749–767.

- Doring, G., Jansen, S., Noll, H., *et al.*, 1996. Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward. *Pediatr. Pulmonol.* 21, 90–100.
- Dötsch, A., Eckweiler, D., Schniederjans, M., *et al.*, 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *PLoS One* 7, e31092.
- Dubern, J.F., Cigana, C., De Simone, M., *et al.*, 2015. Integrated whole-genome screening for *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes using multiple disease models reveals that pathogenicity is host specific. *Environ. Microbiol.* 17, 4379–4393.
- Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., *et al.*, 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 34, 91–100.
- Fazli, M., Almlad, H., Rybtke, M.L., *et al.*, 2014. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ. Microbiol.* 16, 1961–1981.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., *et al.*, 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 66, 43–51.
- Fibrose kystique Canada, 2017. Registre canadien sur la fibrose kystique - Rapport de données annuel 2016. URL : <http://www.fibrosekystique.ca/nos-programmes/registre-canadien-sur-la-fibrose-kystique> (Consulté le 2.11.2018).
- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., *et al.*, 1997. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* 25, 547–557.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., *et al.*, 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 841–851.
- Fothergill, J.L., Walshaw, M.J., Winstanley, C., 2012. Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur. Respir. J.* 40, 227–238.
- Franklin, M.J., Chang, C., Akiyama, T., *et al.*, 2015. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiol. Spectr.* 3.
- Freschi, L., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., *et al.*, 2015. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front. Microbiol.* 6, 1036.
- Friedman, L., Kolter, R., 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51, 675–690.
- Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R., *et al.*, 1997. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol.*

Microbiol. 25, 1125–1139.

- Gambello, M.J., Iglewski, B.H., 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* 173, 3000–3009.
- Gambello, M.J., Kaye, S., Iglewski, B.H., 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.* 61, 1180–1184.
- Garrity-Ryan, L., Kazmierczak, B., Kowal, R., *et al.*, 2000. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect. Immun.* 68, 7100–7113.
- Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5238–5246.
- Giwerzman, B., Jensen, E.T., Høiby, N., *et al.*, 1991. Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1008–1010.
- Götzke, H., Palombo, I., Muheim, C., *et al.*, 2014. YfgM is an ancillary subunit of the SecYEG translocon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 289, 19089–97.
- Grosso-Becerra, M.-V., Santos-Medellin, C., Gonzalez-Valdez, A., *et al.*, 2014. *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 15, 318.
- Hahn, H.P., 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Gene* 192, 99–108.
- Haley, C.L., Colmer-Hamood, J.A., Hamood, A.N., 2012. Characterization of biofilm-like structures formed by *Pseudomonas aeruginosa* in a synthetic mucus medium. *BMC Microbiol* 12, 181.
- Hardalo, C., Edberg, S.C., 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23, 47–75.
- Harun, S.N., Wainwright, C., Klein, K., *et al.*, 2016. A systematic review of studies examining the rate of lung function decline in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 20, 55–66.
- Hauser, A.R., Cobb, E., Bodi, M., *et al.*, 2002. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Care Med.* 30, 521–528.
- Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., *et al.*, 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 29–70.

- Heras, B., Scanlon, M.J., Martin, J.L., 2015. Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 79, 208–215.
- Hoffman, L.R., Kulasekara, H.D., Emerson, J., *et al.*, 2009. *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 8, 66–70.
- Hoogkampkorstanje, J.A.A., Meis, J., Kissing, J., *et al.*, 1995. Risk of cross-colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a holiday camp for cystic-fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 572–575.
- Ismail, T.M., Hart, A.A., McLennan, A.G., 2003. Regulation of dinucleoside polyphosphate pools by the YgdP and ApaH hydrolases is essential for the ability of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* to invade cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 278, 32602–32607.
- Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., *et al.*, 2004. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5229–5237.
- Jani, M., Mathee, K., Azad, R.K., 2016. Identification of novel genomic islands in Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* using segmentation and clustering. *Front. Microbiol.* 7, 1210.
- Jones, C.J., Ryder, C.R., Mann, E.E., *et al.*, 2013. AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon. *J. Bacteriol.* 195, 1637–1644.
- Khan, S.A., Wingard, J.R., 2001. Infection and mucosal injury in cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31–36.
- Kim, J., Park, H.D., Chung, S., 2012. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules* 17, 9818–9834.
- Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.* 36, 78–91.
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., *et al.*, 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* 50, 61–68.
- Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., *et al.*, 2010. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J. Bacteriol.* 192, 1113–1121.
- Kneidinger, B., O’Riordan, K., Li, J., *et al.*, 2003. Three highly conserved proteins catalyze the conversion of UDP-N-acetyl-D-glucosamine to precursors for the biosynthesis of O antigen in *Pseudomonas aeruginosa* O11 and capsule in *Staphylococcus aureus* type 5. Implications for the UDP-N-acety. *J. Biol. Chem.* 278, 3615–3627.
- Knowles, M.R., Boucher, R.C., 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* 109, 571–577.

- Kukavica-Ibrulj, I., Bragonzi, A., Paroni, M., *et al.*, 2008. *In vivo* growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *J. Bacteriol.* 190, 2804–2813.
- Lam, J., Chan, R., Lam, K., *et al.*, 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 28, 546–556.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H.M., *et al.*, 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* 10, 599–606.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., *et al.*, 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7, R90.
- Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41.
- Lemieux, A.A., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., *et al.*, 2016. Genes required for free phage production are essential for *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infections. *J Infect Dis* 213, 395–402.
- Li, Z., Kosorok, M.R., Farrell, P.M., *et al.*, 2005. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 293, 581–588.
- Lima, W.C., Lelong, E., Cosson, P., 2011. What can *Dictyostelium* bring to the study of *Pseudomonas* infections? *Semin Cell Dev Biol* 22, 77–81.
- Linsdell, P., 2014. Functional architecture of the CFTR chloride channel. *Mol. Membr. Biol.* 31, 1–16.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 194–222.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2, 1051–1060.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Speert, D.P., 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 62, 596–605.
- Manwar, A. V, Khandelwal, S.R., Chaudhari, B.L., *et al.*, 2004. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118, 243–251.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., *et al.*, 1999. Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 400–402.
- McCallum, S.J., Gallagher, M.J., Corkill, J.E., *et al.*, 2002. Spread of an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain from a patient with cystic fibrosis (CF) to non-CF

- relatives. *Thorax* 57, 559–560.
- McCoy, W.F., Bryers, J.D., Robbins, J., *et al.*, 1981. Observations of fouling biofilm formation. *Can. J. Microbiol.* 27, 910–917.
- Methot, P.-O., Alizon, S., 2014. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* 5, 775–785.
- Modi, S.R., Collins, J.J., Relman, D.A., 2014. Antibiotics and the gut microbiota. *J. Clin. Invest.* 124, 4212–4218.
- Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., Lewis, K., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 68, 1–12.
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 2015. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol.* 23, 233–242.
- Nichols, D., Chmiel, J., Berger, M., 2008. Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: Alterations in inter- and intracellular signaling. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 34, 146–162.
- O’Sullivan, B.P., Freedman, S.D., 2009. Cystic fibrosis. *Lancet* (London, England) 373, 1891–1904.
- O’Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2437.
- O Muimhneachain, E., Reen, F.J., O’Gara, F., *et al.*, 2018. Analogues of *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecules to tackle infections. *Org. Biomol. Chem.* 16, 169–179.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172, 5915–5923.
- Ouellet, M.M., Leduc, A., Nadeau, C., *et al.*, 2014. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dental unit waterlines can be divided in two distinct groups, including one displaying phenotypes similar to isolates from cystic fibrosis patients. *Front. Microbiol.* 5, 802.
- Painter, R.G., Valentine, V.G., Lanson Jr., N.A., *et al.*, 2006. CFTR expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry* 45, 10260–10269.
- Pamp, S.J., Sternberg, C., Tolker-Nielsen, T., 2009. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytom. Part A* 75, 90–103.
- Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents, 2018. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. URL : <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/4/adult-and-adolescent-opportunistic->

infection/0 (Consulté le 2.11.2018).

- Pezzulo, A.A., Tang, X.X., Hoegger, M.J., *et al.*, 2012. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 487, 109–113.
- Pohl, K., Hayes, E., Keenan, J., *et al.*, 2014. A neutrophil intrinsic impairment affecting Rab27a and degranulation in cystic fibrosis is corrected by CFTR potentiator therapy. *Blood* 124, 999–1009.
- Pollack, M., 1983. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease and immunity. *Rev. Infect. Dis.* 5 Suppl 5, S979-84.
- Pressler, T., Frederiksen, B., Skov, M., *et al.*, 2006. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. *J. Cyst. Fibros.* 5, 9–15.
- Pulcrano, G., Iula, D.V., Raia, V., *et al.*, 2012. Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on *algU* gene expression. *New Microbiol.* 35, 295–305.
- Ramsey, D.M., Wozniak, D.J., 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 56, 309–322.
- Richaud, F., Richaud, C., Ratet, P., *et al.*, 1986. Chromosomal location and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dapA* gene. *J. Bacteriol.* 166, 297–300.
- Rosenau, F., Jaeger, K., 2000. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* 82, 1023–1032.
- Roy-Burman, A., Savel, R.H., Racine, S., *et al.*, 2001. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 183, 1767–1774.
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a012427.
- Safari, A., Habimana, O., Allen, A., *et al.*, 2014. The significance of calcium ions on *Pseudomonas fluorescens* biofilms - a structural and mechanical study. *Biofouling* 30, 859–869.
- Saiman, L., Siegel, J., 2004. Infection control in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 57–71.
- Salek, M.M., Sattari, P., Martinuzzi, R.J., 2012. Analysis of fluid flow and wall shear stress patterns inside partially filled agitated culture well plates. *Ann. Biomed. Eng.* 40, 707–728.
- Salunkhe, P., Smart, C.H.M., Morgan, J.A.W., *et al.*, 2005. A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J. Bacteriol.* 187, 4908–4920.

- Sayner, S.L., Frank, D.W., King, J., *et al.*, 2004. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ. Res.* 95, 196–203.
- Schurr, M.J., Yu, H., Martinez-Salazar, J.M., *et al.*, 1996. Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 178, 4997–5004.
- Shafikhani, S.H., Engel, J., 2006. *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15605–15610.
- Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., *et al.*, 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals* 42, 1–7.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., *et al.*, 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 652–680.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., *et al.*, 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8487–8492.
- Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., *et al.*, 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85, 229–236.
- Sousa, A.M., Pereira, M.O., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs-a review. *Pathogens* 3, 680–703.
- Speert, D.P., Campbell, M.E., 1987. Hospital epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic-fibrosis. *J. Hosp. Infect.* 9, 11–21.
- Spoering, A.L., Lewis, K., 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* 183, 6746–6751.
- Sriramulu, D.D., Lunsdorf, H., Lam, J.S., *et al.*, 2005. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* 54, 667–676.
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., Williamson, K.S., *et al.*, 2015. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3838–3847.
- Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Welsh, M.J., 2015. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* 372, 351–362.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., *et al.*, 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., *et al.*, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.

- Takase, H., Nitnai, H., Hoshino, K., *et al.*, 2000. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect. Immun.* 68, 1834–1839.
- Taylor, P.K., 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.
- Tomas, M., Doumith, M., Warner, M., *et al.*, 2010. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2219–2224.
- Townsin, R.L., 2003. The ship hull fouling penalty, in: *Biofouling*. pp. 9–15.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., *et al.*, 2015. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 8451, 1–6.
- Vargas, I.T., Fischer, D.A., Alsina, M.A., *et al.*, 2017. Copper corrosion and biocorrosion events in premise plumbing. *Materials (Basel)*. 10, 1036.
- Vincent, A.T., Freschi, L., Jeukens, J., *et al.*, 2017. Genomic characterisation of environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dental unit waterlines revealed the insertion sequence *ISPa11* as a chaotropic element. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93.
- Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B., *et al.*, 2004. *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 12, 235–242.
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., *et al.*, 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.
- Wani, A.H., Branion, R.M.R., Lau, A.K., 1997. Biofiltration: A promising and cost-effective control technology for odors, VOCs and air toxics. *J. Environ. Sci. Heal. . Part A Environ. Sci. Eng. Toxicol.* 32, 2027–2055.
- Wei, Q., Ma, L.Z., 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 20983–21005.
- Wellcome Sanger Institute, 2016. Genome Research Limited. URL : <http://www.sanger.ac.uk/> (Consulté le 2.11.2018).
- Westphal, K., Langklotz, S., Thomanek, N., Narberhaus, F. 2012. A trapping approach reveals novel substrates and physiological functions of the essential protease FtsH in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 287, 42962-71.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., *et al.*, 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (80-)*. 295, 1487.
- Wiens, J.R., Vasil, A.I., Schurr, M.J., *et al.*, 2014. Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*.

MBio 5, e01010-13.

- Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 417–423.
- Winkelströter, L.K., Teixeira, F.B. dos R., Silva, E.P., *et al.*, 2014. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microb. Ecol.* 68, 35–46.
- Winstanley, C., Langille, M.G., Fothergill, J.L., *et al.*, 2009. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19, 12–23.
- Winstanley, C., O'Brien, S., Brockhurst, M.A., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* 24, 327–337.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., *et al.*, 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109, 317–325.
- Wozniak, D., Wyckoff, T., Starkey, M., *et al.*, 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7907–12.
- Wright, E.A., Fothergill, J.L., Paterson, S., *et al.*, 2013. Sub-inhibitory concentrations of some antibiotics can drive diversification of *Pseudomonas aeruginosa* populations in artificial sputum medium. *BMC Microbiol.* 13, 170.
- Wu, D.-Q., Ye, J., Ou, H.-Y., *et al.*, 2011. Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC Genomics* 12, 438.
- Wu, W.H., Badrane, H., Arora, S., *et al.*, 2004. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 186, 7575–7585.
- Yankaskas, J.R., Marshall, B.C., Sufian, B., *et al.*, 2004. Cystic fibrosis adult care - Consensus conference report. *Chest* 125, 1S–39S.
- Zhang, Y., Morar, M., Ealick, S.E., 2008. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3699–3724.
- Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Kohler, T., *et al.*, 1999. *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 287–291.
- Zimakoff, J., Hoiby, N., Rosendal, K., *et al.*, 1983. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection and the role of contamination of the environment in a cystic-fibrosis clinic. *J. Hosp. Infect.* 4, 31–40.

Annexes

Annexe 1 – Comparaison de la formation de biofilms adhérents et de BLS chez LESB58 et le mutant STM PALES_11731

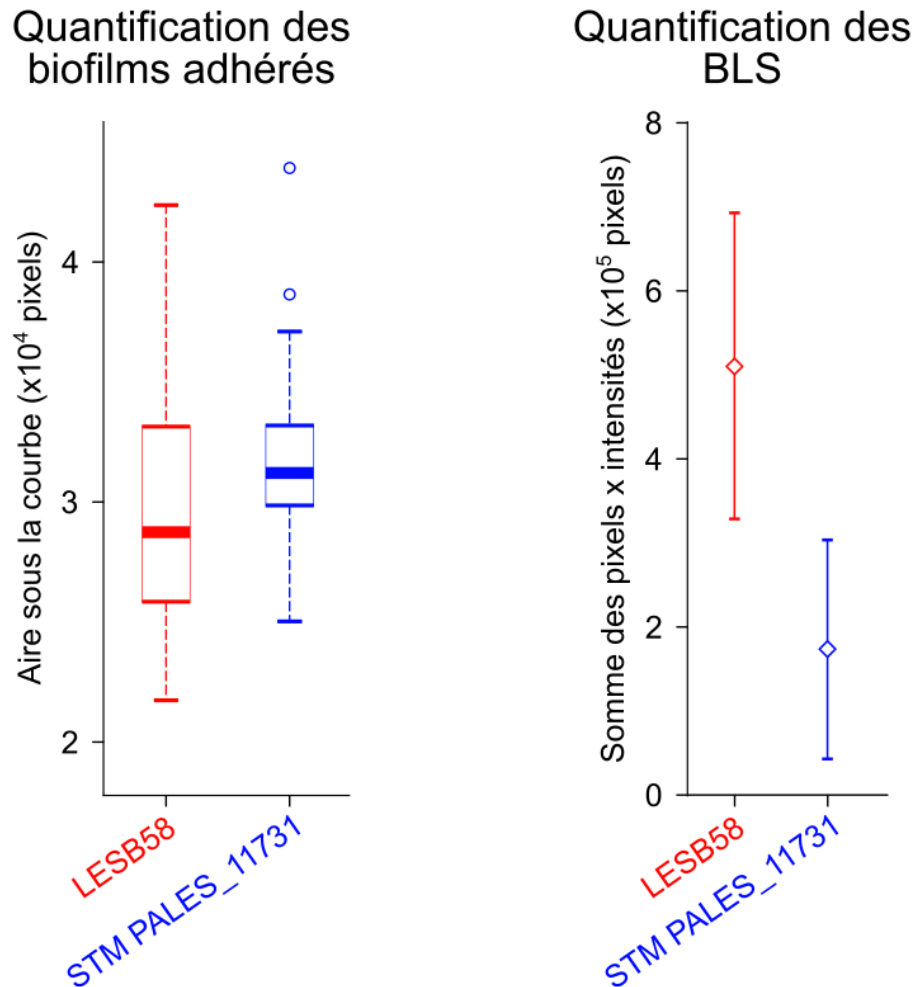


Figure annexe 1. Quantification par ImageJ des biofilms adhérents et des BLS de LESB58 et du mutant STM PALES_11731.

Les bactéries ont été mises en culture en milieu LB en plaque de 24-puits (600 μ L par puits, densité optique à 595nm (DO_{595}) de départ de 0,1, incubation à 37°C avec agitation de 200 rpm). Après 24 heures d'incubation, les plaques ont été numérisées (HP Scanjet G4050), puis les biofilms adhérents ont été colorés au violet de cristal et les puits ont été découpés pour être à leur tour numérisés (HP Scanjet G4050). Le logiciel d'analyse d'images ImageJ a été utilisé pour la quantification des BLS flottants dans les cultures bactériennes et des biofilms adhérents sur la paroi des puits. Alors que la quantité de biofilm adhérent produit est équivalente entre les deux souches, la souche sauvage LESB58 forme significativement plus de BLS que le mutant STM PALES_11731. Pour la quantification des biofilms adhérents, n=8. Pour la quantification des BLS, n=4.

Annexe 2 – Live/Dead des BLS

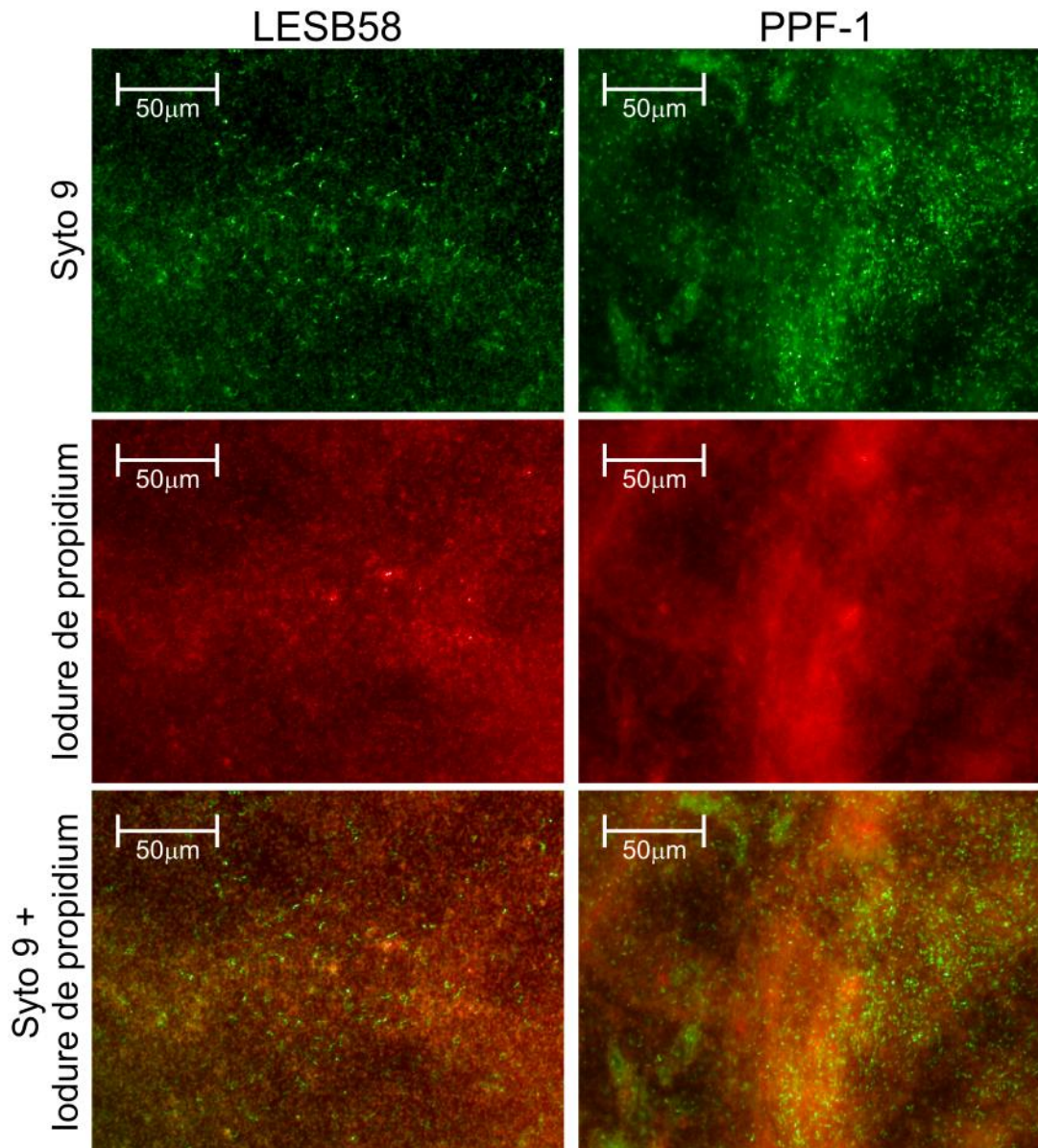


Figure annexe 2. Détermination de la viabilité cellulaire des bactéries dans les BLS de LESB58 et PPF-1.

Après 24 heures d'incubation des cultures bactériennes en milieu LB en plaques de 24-puits (600 µL par puits, DO_{595} de départ de 0,1, incubation à 37°C avec agitation de 200 rpm), les BLS de LESB58 et PPF-1 ont été récupérés. Les BLS ont été lavés trois fois avec de la saline stérile (0,9% NaCl) pour retirer les bactéries planctoniques ou faiblement associées aux BLS. L'ADN des bactéries mortes ou vivantes dans les BLS a été marqué de façon différentielle à l'aide du kit de détermination de la viabilité bactérienne LIVE/DEAD® BacLight™ (ThermoFisher). Les échantillons ont été lavés deux fois (saline stérile 0,9% NaCl) pour retirer l'excédent de solution de marquage avant d'être montés sur lame et observés à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence Axio Observer Z1 (Carl Zeiss). L'ADN des bactéries vivantes est

marqué par le Syto 9 (vert) alors que celui des bactéries mortes est marqué par l'iodure de propidium (rouge). Bien que les fluorochromes se lient également au matériel extracellulaire composant les BLS et non pas juste à l'ADN intracellulaire, il est possible de distinguer la présence de cellules vivantes dans les BLS formés par ces deux souches bactériennes.

Rapport-Gratuit.com

Annexe 3 – Croissance de PAO1

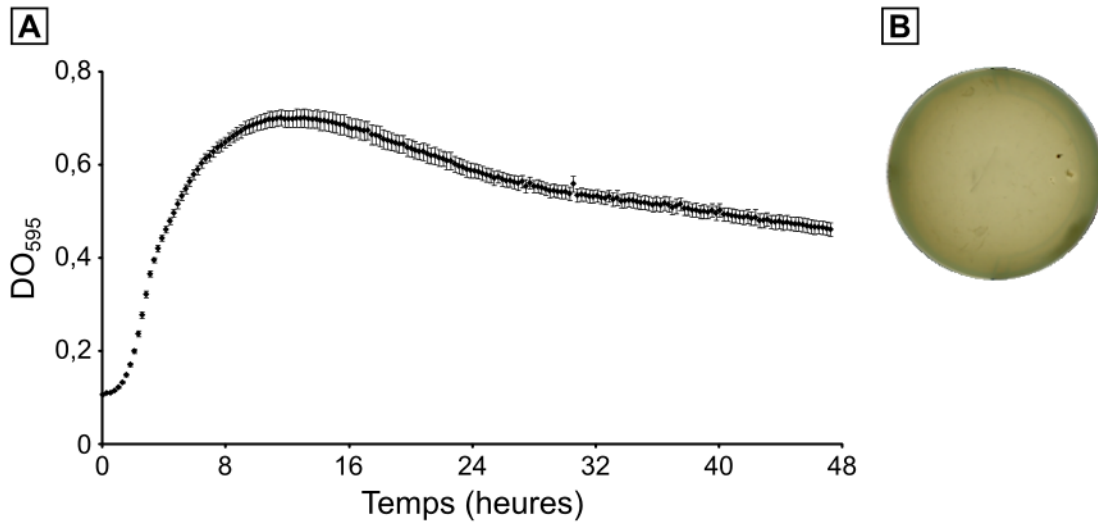


Figure annexe 3. Évaluation de la formation de BLS chez PAO1 après un temps d'incubation prolongé.

Les courbes de croissance de la souche PAO1 ont été établies dans 600 μ L de milieu LB (DO₅₉₅ de départ de 0,1) incubés à 37°C dans une plaque de 24-puits avec une agitation de 200 rpm. La DO₅₉₅ a été mesurée automatiquement toutes les 15 minutes par le lecteur de plaque incubateur (Infinite 200Pro NanoQuant TECAN). (A) Le début de la phase stationnaire de croissance de la bactérie est atteint après environ 12 heures. Lorsque cette phase s'achève, le nombre de cellules bactériennes qui meurent devient plus grand que le nombre de nouvelles cellules, un phénomène qui est perceptible par une diminution de la DO₅₉₅ de la culture. La courbe de croissance illustrée représente la moyenne de neuf expériences indépendantes (n=9). Les barres d'erreurs indiquent l'erreur type (écart-type divisé par la racine carrée de n). (B) Même après 48 heures d'incubation, c'est-à-dire après plus de 30 heures en phase de déclin de croissance, il n'y a toujours pas de formation de BLS dans les cultures de PAO1. L'image présentée illustre un résultat représentatif des neuf expériences.

Annexe 4 – Microfluidique de PAO1, PPF-1 et LESB58

Des biofilms des souches PAO1, LESB58 et PPF-1 ont pu être produits en microfluidique à l'aide d'un protocole adapté de Greener *et al.* (Greener *et al.*, 2016). Les biofilms ont été produits dans des *flow cell* (polydiméthylsiloxane sur lame de verre) comportant deux canaux (45 µm de haut, 600 µm de large et 4200 µm de long chacun), telle que celle illustrée à la **Figure 1.5**. Après stérilisation du système par passage d'éthanol 70% (0,35 mL/h pendant 1 heure) et lavage à l'eau stérile (0,35 mL/h pendant 1,5 heure), les canaux ont été inoculés (0,20 ou 0,25 mL/h pendant 1,5 heure) à l'aide d'une culture liquide de la souche bactérienne désirée. Du milieu de culture a, par la suite, été injecté dans le système (température pièce, 0,30 mL/h) et des photographies d'une partie des canaux ont été prises automatiquement toutes les heures en microscopie optique (modèle LS620 d'Etaluma).

Pour PAO1 et PPF-1, les cultures utilisées pour inoculer les canaux ont été préparées en repiquant une colonie dans 3 mL de milieu LB 1/10, puis en incubant à température pièce pendant 22 heures avec une agitation de 200 rpm. Considérant la croissance plus lente de LESB58, les cultures de cette souche ont été préparées en milieu LB au lieu de LB 1/10 et incubées à 37°C au lieu d'être laissées à température ambiante.

Le milieu de culture injecté dans le système de microfluidique correspond à celui utilisé pour la culture (LB ou LB 1/10, en fonction de la souche étudiée).

Des résultats préliminaires sont présentés ici (**Figure annexe 4**). Le protocole utilisé devra encore être optimisé pour permettre la formation de biofilms dans les mêmes conditions pour toutes les souches et pouvoir en comparer adéquatement les résultats.

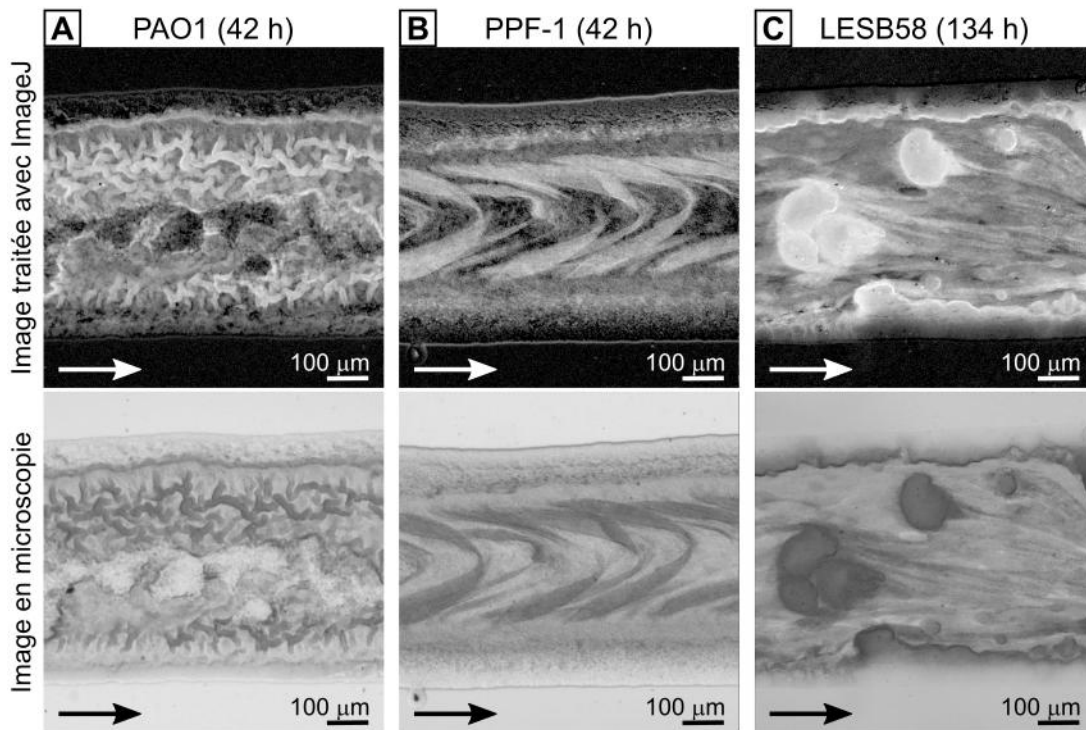


Figure annexe 4. Formation de biofilm adhérent des souches PAO1, LESB58 et PPF-1 en microfluidique.

Après traitement des images à l'aide d'ImageJ permettant de soustraire l'arrière-plan, les biofilms sont visibles en blanc sur fond noir. Les flèches indiquent la direction du flux de milieu. **(A)** Le biofilm de PAO1 forme des structures ressemblant à des champignons. **(B)** Le biofilm de PPF-1 est friable et résiste peu aux forces de cisaillement appliquées. **(C)** Le biofilm de LESB58 se structure en microcolonies qui tendent à se désagréger. Malgré l'utilisation de milieu LB non dilué pour la souche LESB58, un temps de fonctionnement beaucoup plus long du système est nécessaire dû à sa croissance lente à température pièce.

Référence du protocole original

Greener, J., Gashti, M.P., Eslami, A., *et al.*, 2016. A microfluidic method and custom model for continuous, non-intrusive biofilm viscosity measurements under different nutrient conditions. *Biomicrofluidics* 10, 064107.