

# **Élucidation de la fonction du module de translocation et d'assemblage (TAM) chez *Pseudomonas aeruginosa* PA14**

Par

Zeneba Hamid Adoum

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maîtrise (M. Sc.) en Microbiologie Appliquée

## **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
Examineur interne

Dr. Salim Timo Islam  
INRS—Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

Examineur externe

Dr. Dao Nguyen  
Département de médecine, division de  
médecine expérimentale  
Université McGill

Directeur de recherche

Dr. Charles Calmettes  
INRS—Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

Codirecteur de recherche

Dr. Éric Déziel  
INRS—Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

## REMERCIEMENTS

*Je voudrais tout d'abord remercier mes directeurs de recherches Charles Calmettes et Éric Déziel, de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet, de m'avoir appris beaucoup des choses et pour tous leurs conseils et leur partage de savoir tout au long de ma maîtrise.*

*Je tiens à remercier énormément Madame Marie-Christine Groleau de m'avoir assistée, guidée, conseillée, accordée du temps tout au long de ma maîtrise mais également pour sa gentillesse, sa sympathie et sa bienveillance en tant que personne. Merci beaucoup Marie-Christine.*

*Je tiens à remercier énormément Lekha Sleno de m'avoir expliquée les étapes de l'analyse protéomique, guidée, et de m'avoir accordée du temps. Merci beaucoup Marie-Christine*

*Je remercie également Nguyen Dao et Islam Salim Timo de m'avoir honorée en acceptant de juger mon travail, de m'avoir accordé du temps et pour leurs commentaires et conseils constructifs.*

*Un merci particulier à Alison Besse, pour son amour de partager ses connaissances, sa présence sans faille, ses conseils, son soutien dans les moments les plus durs et sa douceur. Un grand merci Lili.*

*Un grand merci à ces belles personnes Hélène Taillefer, Thays De Oliveira et Mylène Trottier, merci pour votre partage de connaissances, votre présence et votre soutien.*

*Merci à l'équipe des laboratoires Déziel et Calmettes, Samar hadj amor, Charles Morin, Arvin Nickzad, Sarah Martinez, Pauline Coulon, Sophie Robitaille, Ghizlane Gaougaou, Gabrielle Desaulniers, Mariem Chalbi, Michel Lê et Pablo Raul Armoa ortiz, des belles équipes dans lesquelles j'ai passé des moments formidables et qui m'ont aussi beaucoup appris et aidé. Merci à vous.*

## RÉSUMÉ

---

Les protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif participent à de nombreuses fonctions essentielles telles que l'adhésion, le transport des nutriments, et la virulence. Leur repliement et leur insertion dans la bicouche lipidique asymétrique nécessitent une machinerie d'assemblage. La « Machinerie d'Assemblage des Tonneaux-beta » (BAM) a longtemps été décrite comme l'unique machinerie d'assemblage et d'incorporation des protéines dans la membrane externe. Cependant, en 2012, un second complexe d'assemblage des protéines transmembranaires appelé « Module d'Assemblage et de translocation » (TAM) a été identifié chez les protéobactéries. La fonction précise du module TAM reste inconnue et peu étudiée. Les protéines dont le repliement et l'insertion sont dépendants du complexe TAM restent également inconnues. Cependant plusieurs études ont montré que l'absence du complexe TAM entraîne un défaut de colonisation des hôtes et une perte de virulence chez certaines bactéries à Gram négatif tels que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*. De façon surprenante, le complexe TAM n'a jamais été étudié chez le pathogène opportuniste *P. aeruginosa*. Pourtant, ce pathogène est responsable de nombreuses infections aiguës et chroniques chez des personnes immunodéprimées et son éradication est souvent difficile. D'où l'urgence de trouver des nouvelles perspectives thérapeutiques pour lutter contre la virulence de cette bactérie. La compréhension du fonctionnement du module TAM et l'identification des protéines qui utilisent TAM pour assurer leur bon repliement pourrait permettre d'identifier des facteurs impliqués dans la virulence chez *P. aeruginosa*. Au cours de ce projet, j'ai démontré que la délétion du gène *tamA* ou de l'opéron *tamAB* chez *P. aeruginosa* impacte la formation du biofilm et la résistance aux antibiotiques de la bactérie. Dans un second temps, l'analyse protéomique par spectrométrie de masse a permis de détecter 46 protéines dont leur abondance a été impactée par l'absence de TamAB. Parmi elles, 13 protéines se sont révélées intéressantes car elles sont impliquées dans le métabolisme des acides gras et des phospholipides ou encore dans le transport et la biosynthèse de lipopolysaccharides ou la formation de biofilm.

Mots clés : Complexe TAM, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms et résistance aux antibiotique

## ABSTRACT

---

Outer membrane proteins of Gram-negative bacteria participate in many essential functions such as adhesion, nutrient transport, and virulence. Their folding and insertion into the asymmetric lipid bilayer require assembly machinery. The "Beta-barrel Assembly Machinery" (BAM) has long been described as the sole machinery for protein assembly and incorporation into the outer membrane. However, in 2012, a second transmembrane protein assembly complex called the "Translocation and Assembly Module" (TAM) was identified in proteobacteria. The precise function of the TAM module remains unknown and understudied. The proteins whose folding and insertion are dependent on the TAM complex also remain unknown. However, numerous studies have shown that the absence of a TAM complex has a negative effect on host colonization and a loss of virulence in some Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. In *P. aeruginosa*, an opportunistic pathogen responsible for acute and chronic infections in immunocompromised individuals, the TAM complex has never been studied. *P. aeruginosa* is a multi-resistant bacterium and a major cause of nosocomial infections. Severe forms of *P. aeruginosa* infections are increasingly difficult to treat, hence the urgency to find new therapeutic perspectives to fight against the virulence of this bacterium. Understanding the function of the TAM module and identifying TAM-dependent proteins would allow the identification of new virulence factors in *P. aeruginosa*. During this project, I demonstrated that deletion of *tamA* gene or *tamAB* operon in *P. aeruginosa* impacted on biofilm formation and antibiotic resistance. Proteomic analysis by mass spectrometry revealed that the abundance of 46 proteins was impacted by the absence of TamAB. Among these proteins, 13 are involved in fatty acid and phospholipid metabolism as well as proteins PrpC, AtoB, SucD.

Key words: TAM complex, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms and antibiotic resistance.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>1</b>
1.1 LES ANTIBIOTIQUES.....	1
1.1.1 Généralités sur les antibiotiques.....	1
1.1.2 Les différentes classes et familles d'antibiotiques.....	1
1.1.3 Les modes d'action et cibles des antibiotiques.....	3
1.2 LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	4
1.2.1 Émergence et problème de la santé publique.....	4
1.2.2 Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	5
1.3 LES AMINOGLYCOSIDES.....	8
1.3.1 Généralités.....	8
1.3.2 Mode d'action des aminoglycosides.....	8
1.3.3 Le transport des aminoglycosides.....	9
1.3.4 La résistance bactérienne aux aminoglycosides.....	10
1.3.5 Exemple d'un aminoglycoside particulier : la spectinomycine.....	12
1.4 L'ENVELOPPE CELLULAIRE DES BACTÉRIES A GRAM NÉGATIF.....	12
1.4.1 La membrane interne.....	13
1.4.2 L'espace périplasmique.....	14
1.4.3 La membrane externe.....	14
1.4.4 Les protéines de la membrane externe (OMP).....	18
1.5 MODÈLE D'ÉTUDE, <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	23
1.5.1 Intérêt du modèle choisi.....	23
1.5.2 Les facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
1.5.3 Les Small Colony Variants (SCV).....	29
1.6 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	29
1.6.1 Problématique.....	29
1.6.2 Hypothèse.....	30
1.6.3 Objectif général.....	30
1.6.4 Objectifs spécifiques.....	30
<b>2 MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>31</b>
2.1 LES MILIEUX DE CULTURE.....	31
2.2 LES SOUCHES BACTÉRIENNES ET LES CONDITIONS DE CULTURE.....	32
2.3 LE PLASMIDES PEX18AP.....	34

2.4	CONSTRUCTION DES MUTANTS SIMPLES ET DOUBLES .....	35
2.4.1	Le principe de la technique d'échange allélique à deux étapes .....	35
2.4.2	Le choix de la méthode d'échange allélique à deux étapes .....	37
2.5	DELETION DES GENES <i>TAMA</i> ET <i>TAMAB</i> .....	38
2.5.1	Construction des allèles muté du gène <i>tamA</i> et <i>tamAB</i> .....	38
2.5.2	Extraction et purification des fragments UP et down du gène <i>tamA</i> .....	38
2.5.3	Fusion des deux allèles par extension par chevauchement ou « PCR-SOEing» .....	39
2.5.4	Préparation des cellules compétentes d' <i>E. coli</i> DH5α et SM10 .....	41
2.5.5	Transformations des cellules compétentes .....	42
2.5.6	Extraction des constructions pZH1 et 2 .....	42
2.5.7	Conjugaison entre <i>E. coli</i> SM10 et <i>P. aeruginosa</i> (évènement de la première recombinaison homologue) .....	42
2.5.8	Sélection des trans-conjuguants PA14 .....	43
2.5.9	Evènements de la deuxième recombinaison homologue .....	43
2.5.10	Sélections des mutants sur gélose .....	44
2.5.11	Confirmation des mutants par PCR .....	44
2.6	COURBES DE CROISSANCE DES BACTERIES DANS LES MILIEUX TSB ET LB .....	44
2.7	COMPARAISON MORPHOLOGIQUE DES BACTERIES PAR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION .....	45
2.8	TEST DE FORMATION DE BIOFILM .....	45
2.8.1	Test en plaques de polystyrène à 96 puits .....	45
2.8.2	Test dans des tubes en polystyrènes .....	46
2.8.3	Test de <i>swimming</i> .....	46
2.8.4	Test de <i>swarming</i> .....	47
2.8.5	Test d'apparition de SCV .....	47
2.9	TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES .....	48
2.9.1	Test de sensibilité aux antibiotiques en milieu liquide .....	48
2.9.2	Test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur disque .....	48
2.10	TEST DE VIRULENCE CHEZ LE MODELE DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> : INFECTION PAR INGESTION.....	49
2.11	METHODE D'ANALYSES STATISTIQUES.....	50
2.12	PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE PROTEOMIQUE .....	50
2.12.1	Extractions des protéines membranaires (interne et externe) .....	50
2.12.2	Dosage protéique Bradford .....	51
2.12.3	La digestion trypsique .....	52
2.12.4	Extraction sur surface solide : SPE (Waters Oasis HLB) .....	53
2.12.5	Méthode HPLC, MS/MS.....	53

2.12.6	Analyse Bio-informatique et statistique .....	54
<b>3</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>55</b>
3.1	TESTS PHENOTYPIQUES PRELIMINAIRES ET MORPHOLOGIE DES MUTANTS <i>TAMA</i> ET <i>TAMB</i> .....	55
3.1.1	Suivie de la croissance en milieu TSB des mutants par transposition .....	55
3.1.2	Comparaison morphologique de la souche WT avec la souche mutante <i>tamB::GmR</i> ....	56
3.1.3	Formation d'un biofilm par la souche WT et les mutants par transposition dans le gène <i>tamA</i> et <i>tamB</i> .....	57
3.1.4	Test de sensibilité à la spectinomycine par la méthode de diffusion sur disque .....	60
3.2	DELETIONS DU GENE <i>TAMA</i> ET DE L'OPERON <i>TAMAB</i> .....	62
3.3	SUIVIE DE LA CROISSANCE EN MILIEU TSB ET LB .....	65
3.4	FORMATION DE BIOFILM .....	67
3.4.1	Formation de biofilm en tubes de polystyrène .....	67
3.4.2	Formation de biofilm en plaques de 96 puits .....	68
3.4.3	Test de <i>swimming</i> en milieu semi-solide (0,3% agar) .....	71
3.4.4	Test de <i>swarming</i> .....	73
3.4.5	Proportion de <i>Small Colony Variants</i> (SCV) formée dans des conditions de biofilm .....	75
3.5	SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES .....	77
3.5.1	Validation de la croissance dans le milieu Mueller-Hinton .....	77
3.5.2	Sensibilité à la spectinomycine en milieu Mueller-Hinton .....	78
3.5.3	Sensibilité à la tobramycine en milieu Mueller-Hinton .....	80
3.5.4	Sensibilité à la spectinomycine en milieu Mueller-Hinton ajusté en Ca <sup>2+</sup> et Mg <sup>2+</sup> .....	81
3.6	TEST DE VIRULENCE CHEZ LE MODELE DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> : INFECTION PAR INGESTION.....	84
3.7	ÉTUDE PROTEOMIQUE.....	85
<b>4</b>	<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIFS.....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>ANNEXE.....</b>	<b>XV</b>
6.1	SENSIBILITE AUX AGENTS ANTIMICROBIENS .....	XV
6.2	TEST DE <i>TWITCHING</i> .....	XVII
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>XIX</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : CHRONOLOGIE DE L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES ET L'EMERGENCE DE LA RESISTANTE.....	5
FIGURE 1.2: MECANISMES DE RESISTANCE DES BACTERIES FACE A L'ACTION D'UN ANTIBIOTIQUE.....	7
FIGURE 1.3 : MODE DE FONCTIONNEMENT DES ANTIBIOTIQUES DE TYPE AMINOGLYCOSIDES.....	10
FIGURE 1.4 : ENVELOPPE CELLULAIRE DES BACTERIES A GRAM NEGATIF.....	13
FIGURE 1.5 : COMPOSITION STRUCTURALE DES LIPOPOLYSACCHARIDES DES BACTERIES A GRAM NEGATIF.....	16
FIGURE 1.6 : TRANSLOCATION DES LPS DU CYTOPLASME VERS LA ME PAR LA MACHINERIE MULTIPROTEIQUE LPT .....	17
FIGURE 1.7 : BIOGENESE DES OMP .....	22
FIGURE 1.8 : LES DIFFERENTS FACTEURS DE VIRULENCE UTILISES PAR <i>P. AERUGINOSA</i> .....	25
FIGURE 1.9 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA FORMATION D'UN BIOFILM CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i> .....	26
FIGURE 2.1 : CARTE GENOMIQUE DU VECTEUR DE CLONAGE PEX18AP .....	35
FIGURE 2.2 : ILLUSTRATION DE L'ECHANGE ALLELIQUE EN DEUX ETAPES .....	37
FIGURE 2.3 : PROTOCOLE DE PURIFICATION OU EXTRACTION SUR GEL DES PRODUITS PCR AVEC « FAVORPREP GEL EXTRACTION MINI KIT » .....	39
FIGURE 2.4 : ILLUSTRATION DE LA CONSTRUCTION DES FRAGMENTS DE DELETIONS PAR LA <<PCR-SOEING>>	40
FIGURE 3.1 : SUIVIE DE CROISSANCE EN TSB DES MUTANTS PAR TRANSPOSITION ET DE LA SOUCHE PA14 WT .	56
FIGURE 3.2 : MORPHOLOGIE DES SOUCHES PA14 WT ET PA14 <i>TAMB::GMR</i> .....	57
FIGURE 3.3 : FORMATION DE BIOFILM PAR LA SOUCHE PA14 WT ET DES MUTANTS PA14 <i>TAMA::GMR</i> ET PA14 <i>TAMB::GMR</i> .....	59
FIGURE 3.4 : TEST DE SENSIBILITE A LA SPECTINOMYCINE, NEOMYCINE ET STREPTOMYCINE.....	61
FIGURE 3.5 : AMPLIFICATIONS PAR PCR DE L'ADN DES PREMIERS RECOMBINANTS, PA14 <i>::PZH1</i> ET <i>PZH2</i> .....	64
FIGURE 3.6 : CONFIRMATION PAR PCR DES SOUCHES PA14 $\Delta$ <i>TAMA</i> ET PA14 $\Delta$ <i>TAMAB</i> .....	64
FIGURE 3.7 : SUIVIE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE EN MILIEU LB.....	66
FIGURE 3.8 : SUIVIE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE EN MILIEU TSB.....	66
FIGURE 3.9 : FORMATION DE BIOFILM DANS DU MILIEU LB EN TUBE DE POLYSTYRENE .....	68
FIGURE 3.10 : FORMATION DE BIOFILM PAR PA14 WT ET LES MUTANTS PA14 $\Delta$ <i>TAMA</i> ET PA14 $\Delta$ <i>TAMAB</i> .....	70
FIGURE 3.11 : TEST DE MOTILITE DE TYPE <i>SWIMMING</i> DE LA PA14 WT ET DES MUTANTS PA14 $\Delta$ <i>TAMA</i> ET PA14 $\Delta$ <i>TAMAB</i> .....	72

FIGURE 3.12 : TEST DE MOTILITE DE TYPE <i>SWARMING</i> .....	74
FIGURE 3.13 : APPARITION DE SCV DANS UNE CULTURE STATIQUE EN MILIEU TSB.....	76
FIGURE 3.14 : SUIVIE DE LA CROISSANCE EN MILIEU MH .....	78
FIGURE 3.15 : TEST DE SENSIBILITE EN MILIEU MH PLUS DE LA SPECTINOMYCINE .....	79
FIGURE 3.16 : TEST DE SENSIBILITE EN MILIEU MH PLUS LA TOBRAMYCINE.....	81
FIGURE 3.17 : SUIVIE DE LA CROISSANCE EN MILIEU MH-II .....	83
FIGURE 3.18 : SUIVIE DE LA CROISSANCE EN MILIEU MH-II PLUS DE LA SPECTINOMYCINE MH-II PLUS DE LA SPECTINOMYCINE .....	83
FIGURE 3.19 : SURVIE DES DROSOPHILES INFECTEES PAR LA SOUCHE PA14 WT OU LES MUTANTS <i>TAM</i> .....	84
FIGURE 6-1 : SUIVIE DE CROISSANCE EN MILIEU TSB PLUS EDTA .....	XV
FIGURE 6-2 : SUIVIE DE CROISSANCE EN MILIEU MH PLUS SPECTINOMYCINE 25 $\mu$ G/ML .....	XVI
FIGURE 6-3 : SUIVIE DE CROISSANCE EN MILIEU MH PLUS SPECTINOMYCINE 150 $\mu$ G/ML .....	XVI
FIGURE 6-4 : SUIVIE DE CROISSANCE EN MILIEU MH PLUS TOBRAMYCINE 0,5 $\mu$ G/ML .....	XVII
FIGURE 6-5 : TEST <i>TWITCHING</i> EN MILIEU LB AGAR 1% .....	XVIII

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 2-1 : SOUCHES ET PLASMIDES UTILISES DANS CETTE ETUDE.....	33
TABLEAU 2-2 : AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION ET LA VERIFICATION DES SEQUENCES INTERVENANT DANS LA CONSTRUCTION DES MUTANTS .....	41
TABLEAU 2-3 : COURBE STANDARD A PARTIR DE BSA POUR LE DOSAGE PROTEIQUE.....	52
TABLEAU 3-1 CLASSES FONCTIONNELLES DES PROTEINES DONT L'ABONDANCE EST SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LES SOUCHES <i>WT</i> ET LE DOUBLE MUTANT $\Delta$ <i>TAMAB</i> .....	88

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BAM	Machinerie d'Assemblage des Tonneaux-beta ( $\beta$ -barrel- <b>A</b> ssembly <b>M</b> achinery)
BSA	Albumine de sérum bovin ( <b>B</b> ovine <b>S</b> erum <b>A</b> lbumin)
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CV	Cristal Violet
DDM	Dodecylmaltoside ( <b>D</b> odecyl- <b>M</b> altoside <b>D</b> etergent)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DO	Densité optique
EPS	Exopolysaccharide
FK	Fibrose Kystique
HCl	Chlorure d'hydrogène (acide chlorhydrique)
LB	Bouillon lysogène ( <b>L</b> ysogeny <b>B</b> roth)
LPS	Lipopolysaccharide
LPT	Lipopolysaccharide transport
ME	Membrane Externe
MH	Mueller-Hinton
MH-II	Mueller-Hinton cation ajustés

MI	Membrane interne
Min	Minute
NQR	Na (+) -translocating NADH-quinone reductase subunit B
OMP	Outer membrane protein
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
pb	Paire de base
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SCV	<b><i>Small Colony Variant</i></b>
TAM	Module d'Assemblage et de translocation ( <b>T</b> ranslocation and <b>A</b> ssembly <b>M</b> odule)
TSB	Tryptic Soy Broth
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BAM	Machinerie d'Assemblage des Tonneaux-beta ( <b>β</b> -barrel- <b>A</b> ssembly <b>M</b> achinery)
BSA	Albumine de sérum bovin ( <b>B</b> ovine <b>S</b> erum <b>A</b> lbumin)
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CV	Cristal Violet

DDM	Dodecylmaltoside ( <b>D</b> odecyl- <b>M</b> altoside <b>D</b> etergent)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DO	Densité optique
EPS	Exopolysaccharide
FK	Fibrose Kystique
HCl	Chlorure d'hydrogène (acide chlorhydrique)
LB	Bouillon lysogène ( <b>L</b> ysogeny <b>B</b> roth)
LPS	Lipopolysaccharides
LPT	Lipopolysaccharide transport
ME	Membrane Externe
MH	Mueller-Hinton
MH-II	Mueller-Hinton cation ajustés
MI	Membrane interne
Min	Minute
NQR	Na (+) -translocating NADH-quinone reductase subunit B
OMP	Outer membrane protein
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
pb	Paire de base

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SCV	<i>Small Colony Variant</i>
TAM	Module d'Assemblage et de translocation ( <b>T</b> ranslocation and <b>A</b> ssembly <b>M</b> odule)
TSB	Tryptic Soy Broth

# 1 Synthèse bibliographique

---

## 1.1 Les antibiotiques

### 1.1.1 Généralités sur les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles synthétisées par les microorganismes afin de lutter contre des bactéries et les autres microorganismes concurrentes pour la colonisation d'une même niche écologique (Munita & Arias, 2016; Schatz *et al.*, 1944). L'action des antibiotiques a été décrite pour la première fois en 1928, lorsqu'Alexander Fleming a découvert que le champignon, *Penicillium notatum* avait la capacité d'inhiber le développement d'organismes bactériens. Plus précisément l'agent actif qu'il a extrait et isolé (la pénicilline) avait un effet antibactérien sur les staphylocoques et d'autres bactéries à Gram positif. Cette observation débouche sur la découverte de l'antibiotique le plus largement utilisé en clinique de 1941 jusqu'à nos jours (Fleming, 1929) qui a permis de révolutionner la médecine moderne (Katz & Baltz, 2016). Largement utilisée pour le traitement des maladies infectieuses, elle a permis de sauver des millions de vies. Environ 15 ans après l'introduction de la pénicilline, un deuxième antibiotique, la streptomycine produite par *Streptomyces griseus*, a été décrite (Gaynes, 2017; Schatz *et al.*, 1944). Entre 1940 et 1960, c'est l'âge d'or de la découverte et du développement de nombreux autres antibiotiques tels que : le chloramphénicol, l'érythromycine, la vancomycine, etc (Hutchings *et al.*, 2019).

À l'heure actuelle, il existe plus de 100 antibiotiques regroupés en familles selon leur cible et/ou mode d'action. Ils sont d'origine naturelle, semi-synthétique ou de synthèse et ciblent spécifiquement une bactérie ou un groupe de bactéries. L'utilisation des antibiotiques a permis de révolutionner la médecine moderne (Gould & Bal, 2013; Katz & Baltz, 2016) par le traitement de maladies infectieuses, sauvant ainsi des millions de vie et prolongeant l'espérance de la vie humaine moyenne de 23 ans (Hutchings *et al.*, 2019).

### 1.1.2 Les différentes classes et familles d'antibiotiques

Il existe cinq classes principales d'antibiotiques basées sur le mode d'action et leur cible (Stocco *et al.*, 2020) dont certaines sont divisées en sous-classes :

- Les bêta-lactamines sont une large classe d'antibiotiques à spectre plus ou moins large et dont l'activité bactéricide est temps dépendant (c'est-à-dire que leur effet bactéricide

dépend du temps d'exposition). La famille des bêta-lactamines comprend les pénicillines des groupes G/V, A et M. Cette famille inclut également, les carboxypénicillines, les uréidopénicillines, les amidinopénicillines, les carbapénèmes, les monobactames et les céphalosporines de première à la cinquième génération (Bui & Preuss, 2022; Donowitz & Mandell, 1988) ;

- Les aminoglycosides constituent une classe dans laquelle on trouve les antibiotiques tels que, la streptomycine, la spectinomycine, la tobramycine, la gentamicine et l'amikacine. Cette classe d'antibiotiques à un spectre d'activité large. De ce fait, ces antibiotiques peuvent être utilisés dans le traitement d'infections bactériennes, puisqu'ils sont efficaces contre plusieurs bactéries pathogènes à Gram négatif et quelques streptocoques, ainsi que certaines mycobactéries (Hermann, 2007; Jana & Deb, 2006) ;
- Les macrolides tels que l'azithromycine, clarithromycine, érythromycine, fidaxomicin et le telithromycin, sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre d'activité (Salimi *et al.*, 2016). Cette classe d'antibiotiques est caractérisée par un noyau à grand cycle lactone macrocyclique, dont la taille varie entre 14 à 16 atomes et un ou plusieurs fragments de sucres (Gaynor & Mankin, 2003). Ils agissent contre plusieurs bactéries à Gram négatif ainsi que *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, et plusieurs mycobactéries atypiques ;
- Les peptides antimicrobiens, encore appelés peptides de défense de l'hôte, constituent une grande classe de composés appartenant à la réponse immunitaire innée et sont largement présents dans la nature (Annunziato & Costantino, 2020). Les peptides antimicrobiens sont des oligopeptides avec un nombre variable d'acides aminés (Bahar & Ren, 2013). Ces composés possèdent un large spectre d'activité et sont capables de pénétrer dans la membrane interne (MI) en interagissant avec les acides lipoteichoïques des bactéries à Gram positif. Alors que chez les bactéries à Gram négatif ils pénètrent par une interaction électrostatique avec les groupements phosphates des molécules de lipopolysaccharide (LPS) chargés négativement (Kosikowska & Lesner, 2016).
- Les quinolones sont une classe d'antibiotique à effet bactéricide et à spectre d'activité large. L'acide nalidixique a été la première quinolone introduite en 1962. Depuis lors, des modifications structurelles ont donné lieu à des fluoroquinolones de deuxième, troisième et quatrième génération, qui ont permis d'élargir leur spectre d'activité aux organismes à Gram positif (Jacoby, 2005; Oliphant & Green, 2002).

Hormis ces cinq classes on retrouve également les glycopeptides ou lipo-glycopeptides (Vancomycine, teicoplanine, dalbavancin), la fosfomycine, le lipopeptide (daptomycine), les polymyxines, les phénicolés, l'acide fusidique, les oxazolidinones, les quinoléines, la mupirocine, les sulfamides et triméthoprim, les produits nitrés et les antituberculeux qui ne sont classés dans aucune famille.

### 1.1.3 Les modes d'action et cibles des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent avoir une activité bactériostatique et/ou bactéricide. Les antibiotiques bactériostatiques inhibent la croissance des bactéries mais ne les tuent pas, tandis que les antibiotiques bactéricides provoquent la mort cellulaire (Bernatová *et al.*, 2013). Il est souvent difficile de classer un antibiotique dans l'une de ces catégories car ils peuvent avoir à la fois une activité bactériostatique et bactéricide. La plupart des antibiotiques ciblent une de ces voies physiologiques :

- La synthèse des acides nucléiques (ADN/ARN) ; les antibiotiques ciblant cette voie provoquent une cassure de l'ADN double brin, généralement en inhibant l'ADN gyrase (Evans-Roberts *et al.*, 2016). Certains de ces antibiotiques bloquent l'ARN polymérase qui participe à la transcription de l'ADN en ARN (Yilancioglu, 2019). Les quinolones sont de exemples des antimicrobiens qui ciblent efficacement l'ADN gyrase (Khan *et al.*, 2018).
- La synthèse de la paroi cellulaire ; parmi ces agents on distingue notamment les beta-lactames. Le résultat de cette action est une altération de la paroi cellulaire et ainsi de la forme de l'organisme, conduisant éventuellement à la mort de la bactérie (Tomasz, 1979). Parmi les antibiotiques qu'inhibent la synthèse de la paroi cellulaire on peut citer les céphalosporines, les glycopeptides (incluant la vancomycine) et les carbapénèmes (Papp-Wallace *et al.*, 2011; Marshall, 1999 #456; Reynolds, 1989).
- La synthèse de l'acide folique (folate), qui est une étape préliminaire indispensable à la synthèse des acides nucléiques (la réplication/transcription de l'ADN). Les antibiotiques capables d'inhiber la synthèse de l'acide folique, ont une structure chimique similaire à l'acide para-aminobenzoïque, un composé intermédiaire converti par une enzyme en acide folique. La similitude de structure entre ces deux composés entraîne une compétition entre l'acide para-aminobenzoïque et le sulfamide l'enzyme responsable de la conversion de l'intermédiaire en acide folique (Fernández-Villa *et al.*, 2019; Maddison

*et al.*, 2008). Les sulfonamides et triméthoprimes possèdent cette habilité d'arrêter la prolifération bactérienne en interférant avec la cascade de synthèse de l'acide folique (Fair & Tor, 2014).

- La synthèse des protéines bactériennes ; les antibiotiques sont capables de lier les protéines ou/et d'inhiber leur fonction, empêchant ainsi la synthèse de nouvelles protéines et de nouvelles cellules bactériennes (Mühlberg *et al.*, 2020). La famille des aminosides et les macrolides détruisent généralement les bactéries en se liant au ribosome bactérien et en inhibant la synthèse des protéines (Kannan *et al.*, 2014)}.

À cause de l'émergence rapide de souches résistantes aux antibiotiques, leur efficacité est de nos jours menacée.

## **1.2 La résistance aux antibiotiques**

### **1.2.1 Émergence et problème de la sante publique**

La résistance aux antibiotiques est définie comme la capacité d'une bactérie à résister à un antibiotique auquel elle était autrefois sensible. En règle générale, la résistance bactérienne survient peu de temps après la première utilisation clinique des antibiotiques (Figure 1.1). L'utilisation incontrôlée et injustifiée des antibiotiques favorise l'émergence de plus en plus de bactéries résistantes et multirésistantes, ayant des conséquences dramatiques d'un point de vue médical, économique et social (Zahar & Lesprit, 2014). À l'heure actuelle, l'émergence et la propagation de bactéries résistantes aux antibiotiques atteint des niveaux dangereusement élevés dans toutes les régions du monde, compromettant ainsi la capacité à traiter les maladies infectieuses et devenant une menace sérieuse pour la santé publique (Ventola, 2015). D'après les analyses menées par Jim O'Neil, en 2050 c'est environ 10 millions de personnes par an qui pourraient mourir à la suite des infections résistantes aux antibiotique (O'Neill, 2014; Shallcross *et al.*, 2015). La résistance la plus problématique de nos jours concerne les bactéries pathogènes, notamment les bactéries à Gram négatif. Les plus rapportés parmi ces agents pathogènes sont entre autres, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques est à l'heure actuelle un problème auquel on se confronte. Chez les bactéries à Gram négatif, cela est dû en partie aux propriétés de la membrane externe (ME) des bactéries qui empêche une absorption

efficace des composés extracellulaires. En plus de cela, s'ajoute l'absence de la découverte des nouveaux antibiotiques. Ainsi, la recrudescence des bactéries résistantes aux antibiotiques met la communauté scientifique au défi d'identifier d'urgence de nouvelles cibles antimicrobiennes et de de nouveaux antibiotiques.

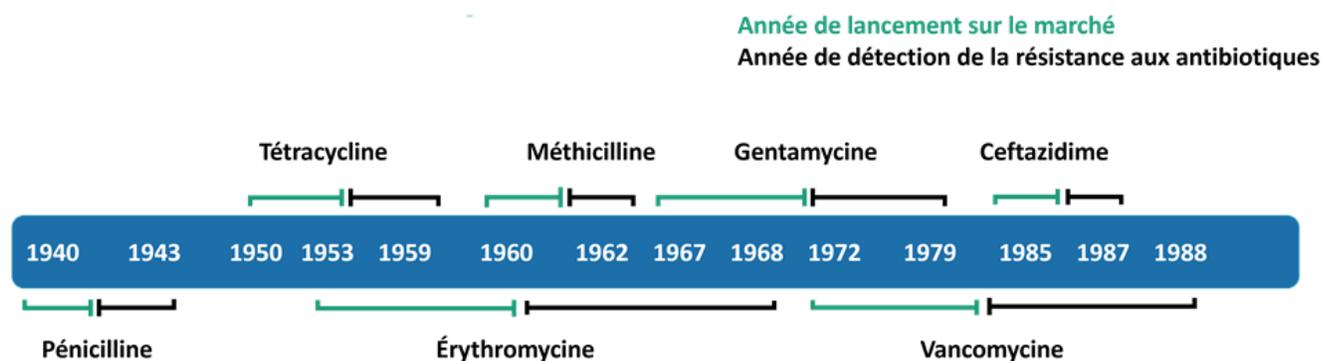


Figure 1.1 : Chronologie de l'utilisation des antibiotiques et l'émergence de la résistance

(Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. CDC Rep. 2013.)

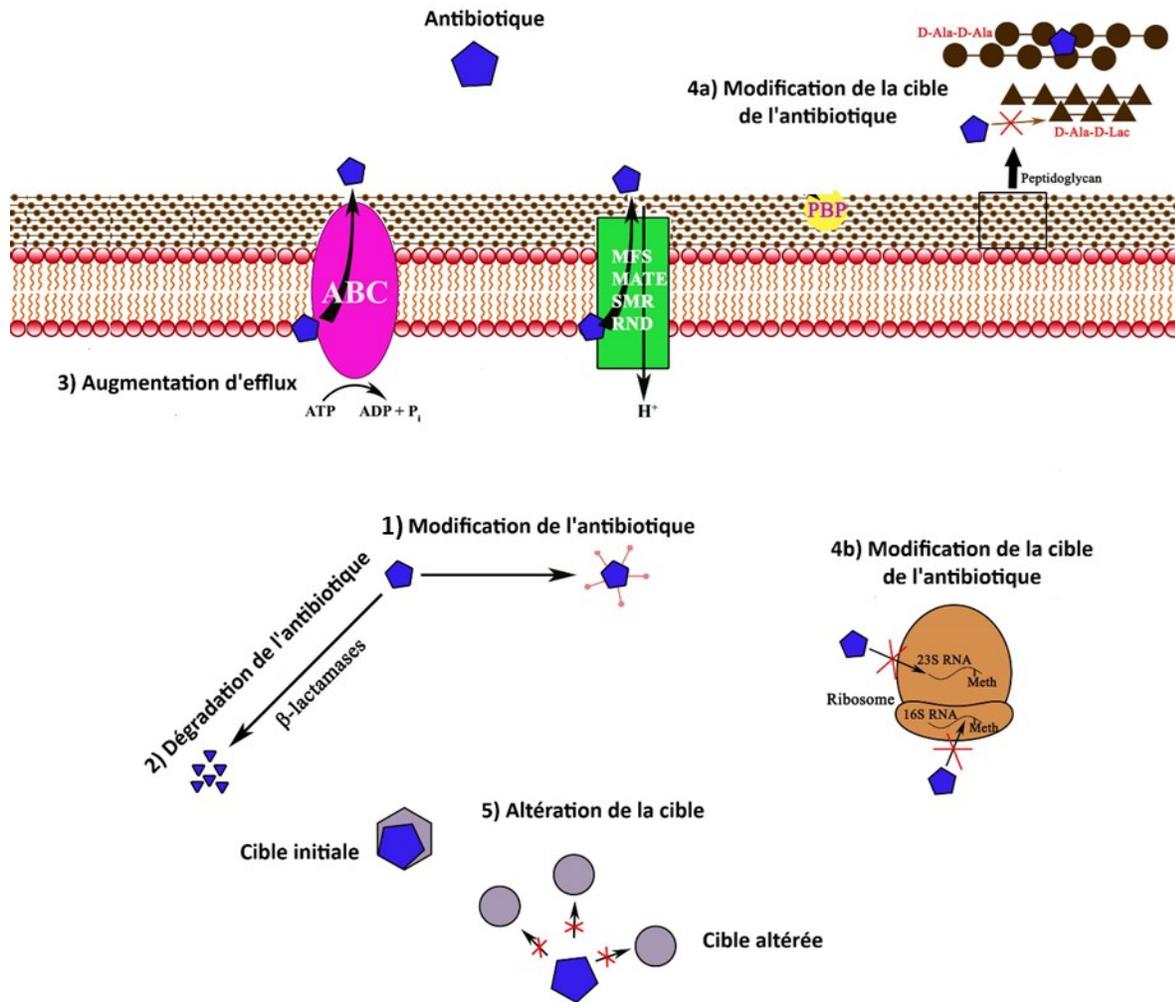
## 1.2.2 Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

Pour assurer leur survie et leur prolifération, les bactéries doivent développer des mécanismes de protection leur permettant de résister face aux antibiotiques et aux menaces de leur environnement naturel. Leur flexibilité génomique ainsi que leur diversité métabolique permettent de développer facilement et rapidement une résistance aux antibiotiques (Munita & Arias, 2016). C'est un phénomène naturel résultant de mutations aléatoires ou d'échanges de gènes de résistances (transfert horizontal) entre les bactéries. La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise (Reygaert, 2018). On parle d'une résistance naturelle, lorsque la mutation à l'origine de cette résistance est génomique, stable et transmise à la descendance (Cox & Wright, 2013; Martinez, 2014). La résistance naturelle est donc partagée par toutes les souches d'une même espèce bactérienne pour un antibiotique donné. Cette résistance naturelle peut résulter de mécanismes (Figure 1.2) tels que la surproduction de la cible, la production d'enzymes capables de modifier ou d'altérer les antibiotiques, l'élimination des antibiotiques par des pompes d'efflux (efflux actif) ou encore la diminution de la perméabilité de la ME qui conduit à une absorption réduite des antibiotiques (Coates *et al.*, 2002; Munita & Arias, 2016).

La résistance acquise apparaît subitement et confère à une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne une résistance à un antibiotique auquel elle(s) était naturellement sensible

(CloECKaert *et al.*, 2017). La résistance acquise résulte d'une mutation acquise ou d'un transfert horizontal des gènes de résistances entre les bactéries (van Hoek *et al.*, 2011).

Les mécanismes liés à cette résistance acquise sont entre autres la dégradation enzymatique des antibiotiques, l'altération ou la modification des cibles auxquelles se lient les antibiotiques (van Hoek *et al.*, 2011).



**Figure 1.2: Mécanismes de résistance des bactéries face à l'action d'un antibiotique**

Ces mécanismes comprennent : (1) la modification de l'antibiotique, rendu possible par ajout des groupes acétyle, phosphate ou adényle, aux aminosides par les N- acétyltransférases, les O- phosphotransférases et les O- adényltransférases ; (2) La dégradation des antibiotiques par les enzymes telles les  $\beta$ -lactamases ; (3) L'augmentation de l'efflux (expulsion de l'antibiotique) des antibiotiques vers l'extérieur par les différentes pompes bactériennes (4a) la modification ou (4b) l'altération de la cible de l'antibiotique par exemple via une méthylation de l'ARNr 23S ou de l'ARNr 16S dans le cas où la cible est le ribosome ou des altérations des précurseurs du peptidoglycane si la cible est la paroi. (Peterson & Kaur, 2018). Figure adaptée de (Peterson & Kaur, 2018).

Au cours de ce projet, je me suis particulièrement intéressée aux antibiotiques de la famille des aminoglycosides, notamment à leur mécanisme d'importation dans les cellules bactériennes.

## 1.3 Les aminoglycosides

### 1.3.1 Généralités

Le premier aminoglycoside décrit, de la streptomycine, isolé chez la bactérie *Streptomyces griseus* par Waksman, Schatz et Bugie en 1944 (Schatz et al., 1944). Les aminoglycosides sont une famille de molécules contenant un noyau moléculaire, appelé aminocyclitol relié par des liaisons glycosidiques à divers sucres aminés. Ce noyau peut être la streptidine ou la 2-désoxystreptamine (Spelman *et al.*, 1989). Ils sont hydrosolubles, chargés positivement donc de type cationique, très stable, à spectre large et dotés d'une activité bactéricide rapide (Krause *et al.*, 2016). Les aminoglycosides sont des polycations, car ils possèdent une bonne affinité de liaison pour les composants chargés négativement dans la ME des bacilles à Gram négatif ainsi que ceux des acides nucléiques (ADN/ARN) (Jana & Deb, 2006). L'action antimicrobienne des aminoglycosides est facilitée par leur structure chimique. Ils sont particulièrement actifs contre les bactéries aérobies à Gram négatif et agissent en synergie avec d'autres antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactamines ou la vancomycine contre certains organismes à Gram positif, d'où leur appartenance à la classe des antibiotiques à large spectre (Cai *et al.*, 2009). La grande majorité des aminoglycosides sont des substances naturelles produites par des actinomycètes du genre *Streptomyces* ou *Micromonospora*. Il existe également des antibiotiques semi-synthétiques tels que l'amikacine, la nétilmicine, la dibékacine, l'isépamicine et l'arbékacin (Giamerllou, 1986). Parmi les aminoglycosides produits par les bactéries du genre *Micromonospora*, on retrouve, la streptomycine de type IV/ IM, la gentamicine (garamycine) IV, la tobramycine (nebcine) IV et l'amikacine (amikine) IV (Becker & Cooper, 2013). Cette famille d'antibiotiques est généralement utilisée pour traiter les infections causées par les bactéries à Gram négatif, les infections causées par *Staphylococcus aureus* notamment (Krause *et al.*, 2016) et en synergie contre d'autres bactéries à Gram positif (Rybak & Whitworth, 2005; Scholar, 2007).

### 1.3.2 Mode d'action des aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides ciblant principalement le ribosome bactérien. Ils possèdent une grande affinité pour la sous-unité ribosomique 30S bactérienne, plus précisément pour le site A de l'ARN ribosomique 16S (Noller, 1991; Recht *et al.*, 1999). La liaison irréversible des aminoglycosides à la sous-unité ribosomique 30S perturbe la synthèse protéique (Figure 1.3A). En ciblant la synthèse des protéines, les

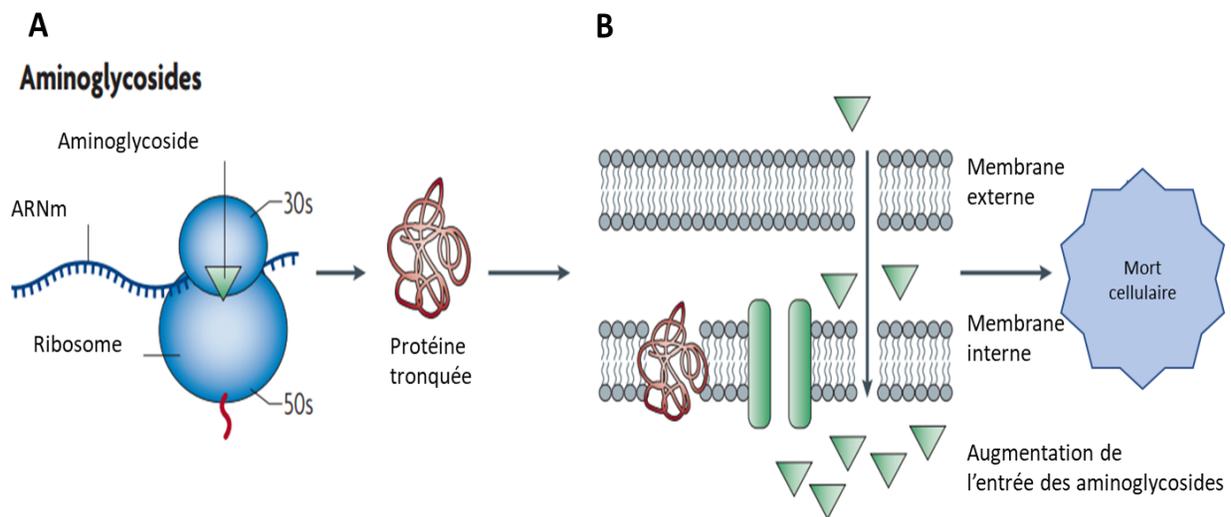
aminoglycosides perturbent également la perméabilité de la membrane. En effet, la liaison des aminoglycosides à la sous-unité ribosomique 30S, résulte en interruption de manière prématurée de la traduction et donne naissance à des protéines mal traduites ou protéines tronquées. Ces protéines seront tout de même assemblées et notamment insérées dans les membranes cellulaires (Kotra *et al.*, 2000). Ils peuvent également être la cause des perturbations métaboliques majeures, de dommages membranaires (composition et perméabilité membranaires altérées), de concentrations ioniques cellulaires altérées et de perturbations dans la synthèse de l'ADN et de l'ARN (Fourmy *et al.*, 1996).

### 1.3.3 Le transport des aminoglycosides

Le transport des aminoglycosides à l'intérieur des cellules cibles est un processus essentiel pour leur activité biologique. Ce mécanisme de transport est complexe et nécessite les ribosomes ainsi que la chaîne respiratoire. À fin de permettre l'accumulation des aminoglycosides dans les cellules bactériennes. Le transport des aminoglycosides se fait en trois étapes ; une première étape indépendante de l'énergie cellulaire, suivie de deux étapes dépendantes de l'énergie cellulaire (Figure 1.3B).

- La première est une étape passive et rapide. Lorsque les molécules d'aminoglycosides sont en contact avec des cellules bactériennes, elles se lient aux composés anioniques de surface cellulaire tels que le LPS, les phospholipides et les protéines de la ME chez les Gram-négatifs, ou alors les acides téichoïques et phospholipides chez les Gram-positifs (Davis, 1987; Taber *et al.*, 1987). Lors de leur liaison à la surface membranaire, les aminoglycosides entrent en compétition avec les cations, tels que le magnésium et le calcium. La liaison de ces derniers aux molécules de LPS, sont normalement responsables de la stabilité des composés lipidiques de la membrane bactérienne (Hancock, 1984). Ainsi, la compétition entre les ions cations et les aminoglycosides entraîne une déstabilisation de la ME, une augmentation accrue de la perméabilité membranaire et l'initiation d'une forte absorption des aminoglycosides (Hancock *et al.*, 1991a; Hancock *et al.*, 1981; Ramirez & Tolmasky, 2010).
- La deuxième étape, est une phase qui nécessite la force proton motrice et la chaîne respiratoire. C'est notamment un transport oxygène-dépendant. Pendant cette phase, seule une petite quantité des molécules rentre dans la cellule (Bryan & Kwan, 1983; Damper & Epstein, 1981).

- La troisième étape, toujours énergie dépendante, est celle de la liaison des aminoglycosides aux ribosomes (Bryan & Kwan, 1983). Cette liaison va perturber la synthèse des protéines membranaires et entraîner la formation des protéines anormales ou mal repliées. Les protéines mal traduites peuvent être insérées dans la membrane cytoplasmique, ainsi elles provoquent une altération de la perméabilité et une augmentation du transport des aminoglycosides (Busse *et al.*, 1992). À cette étape, la membrane cytoplasmique perd son intégrité, c'est qui conduit à une absorption rapide des aminoglycosides à travers le cytoplasme (Figure 1.3-A). À cette étape, la membrane cytoplasmique perd son intégrité, ce qui conduit à une absorption rapide des aminoglycosides à travers le cytoplasme (Figure 1.3-A). Ce phénomène augmente l'inhibition de la synthèse des protéines, amplifie la mauvaise traduction et conduit à une mort cellulaire accélérée (Busse *et al.*, 1992; Kohanski *et al.*, 2008).



**Figure 1.3 : Mode de fonctionnement des antibiotiques de type aminoglycosides**

(A) l'interaction des aminoglycosides avec le ribosome, empêche la translocation du peptide du site A vers le site P et cause une synthèse protéique incomplète. Ces protéines mal traduites sont insérées dans la MI et facilitent une absorption accrue des aminoglycosides ; B) Transport des aminoglycosides dans la cellule, : La première étape implique une liaison électrostatique d'un aminoglycoside polycationique aux composants chargés négativement de la membrane bactérienne (LPS, phospholipides et les protéines de la ME), déstabilisent ainsi la ME et facilite l'absorption d'un faible nombre de molécules dans le périplasma (Kohanski *et al.*, 2010).

### 1.3.4 La résistance bactérienne aux aminoglycosides

Comme la plupart des antibiotiques, l'émergence de bactéries résistantes aux aminoglycosides est apparue peu après le début de leur utilisation les rendant ainsi inefficaces.

Bien que la cible des aminoglycosides soit l'ARNr, les mécanismes principaux de résistance qui ont émergés ne sont pas directement liés à une altération ou modification de cette cible (Kotra *et al.*, 2000). En effet, l'ARNr est indispensable au processus de la biosynthèse des protéines et est codée plusieurs copies des gènes chez les organismes vivants (Uyttendaele & Debevere, 2003). La fonction de l'ARNr est si bien préservée à travers les genres bactériens, que l'ARNr est une cible difficilement modifiable. Les principaux mécanismes de résistances développées par les bactéries contre les aminoglycosides sont :

- Une diminution de la perméabilité membranaire, notamment celle de la ME des bactéries à Gram négatif par lequel l'antibiotique entre dans la bactérie ;
- Une résistance intrinsèque : étant donné que l'absorption des aminosides nécessite un potentiel énergétique généré par la membrane, un faible niveau de potentiel transmembranaire ou même son absence peut être responsable de cette résistance intrinsèque des bactéries. Miller et ses collègues ont démontré, que chez *Staphylococcus aureus* des mutations chromosomiques influençant le potentiel électrique transmembranaire procurant ainsi une résistance aux aminoglycosides (Miller *et al.*, 1980);
- Une résistance adaptative médiée par une augmentation de l'activité des pompes d'efflux dédiées ou générales : ces pompes permettent d'expulser les antibiotiques hors de la bactérie dès qu'ils y entrent. C'est ainsi que la concentration intracellulaire des aminoglycosides est diminuée, d'où la diminution de leur activité (Doi *et al.*, 2016; Ramirez & Tolmasky, 2010);
- Une modification ou inactivation enzymatique des antibiotiques (par N-acétylation, adénylation ou O-phosphorylation) (Llano-Sotelo *et al.*, 2002). Plusieurs modifications enzymatiques des aminoglycosides ont été rapportées mais les plus courantes comprennent l'acétylation du groupe amino semi-conservé 6' du cycle I et la phosphorylation du groupe hydroxyle 3' du même cycle (Kotra, 2000). Ces modifications changent chimiquement l'antibiotique, ce qui entraîne ainsi une diminution de l'affinité pour le site A du ribosome, conduisant à une perte d'activité antibactérienne (Llano-Sotelo *et al.*, 2002).
- La mutation au niveau du ribosome bactérien, notamment la méthylation de l'ARNr 16S qui entraîne une diminution de la sensibilité à la spectinomycine (Prammananan *et al.*, 1998; Sigmund *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1985).

### 1.3.5 Exemple d'un aminoglycoside particulier : la spectinomycine

La spectinomycine est un aminocyclitol extrait de *Streptomyces spectabilis*, possédant un spectre d'activité moyen à large contre des bactéries à Gram négatif et Gram positif (Mason *et al.*, 1961). C'est un antibiotique largement utilisé dans les traitements des infections *gonococciques* causées par les bactéries du genre *Neisseria* (Laird & Taylor, 1962). Cet antibiotique à effet bactériostatique se lie de manière réversible à l'ARN 16S de la sous-unité 30S (Finch *et al.*), bloquant ainsi la translocation du peptidyl-ARN<sub>t</sub> du site A vers le site P (Carter *et al.*, 2000; Moazed & Noller, 1987). Elle entraîne une mauvaise traduction des protéines, en inhibant spécifiquement la liaison du facteur d'élongation G au ribosome (Bilgin *et al.*, 1990). À l'heure actuelle, trois mécanismes de résistance à la spectinomycine ont été rapportés dans la littérature. Le premier est la résistance naturelle grâce aux pompes d'efflux qui permet de diminuer la concentration intracellulaire de la bactérie (Balganesh *et al.*, 2012; Ramón-García *et al.*, 2007). Le second mécanisme repose sur une modification de la cible et/ou inactivation enzymatique de l'antibiotique (Ramirez & Tolmasky, 2010).

Enfin, la résistance bactérienne à la spectinomycine peut être également due à des mutations ribosomiques. Ces mutations au niveau des ribosomes agissent en déstabilisant le réseau d'interactions entre la tête et le corps de la sous-unité 30S, permettant ainsi à la tête de bouger même en présence de l'antibiotique (Carter *et al.*, 2000).

Hormis l'augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, à l'heure actuelle on se confronte à un problème majeur qui est le fait que beaucoup d'antibiotiques existants sont inefficaces. Chez les bactéries à Gram négatif, cela est dû en partie aux propriétés de la ME qui empêche une absorption efficace des composés extracellulaires. En plus de cela, s'ajoute l'absence de la découverte des nouveaux antibiotiques. Ainsi, la recrudescence des bactéries résistantes aux antibiotiques met la communauté scientifique au défi d'identifier d'urgence de nouvelles cibles antimicrobiennes et de nouveaux antibiotiques. L'une des cibles intéressantes des bactéries à Gram négatif est l'enveloppe bactérienne et les machineries moléculaires conservées qui interviennent dans la biogenèse des protéines membranaires.

## 1.4 L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif

L'enveloppe cellulaire est une structure très complexe, propre aux cellules procaryotes (Dörr *et al.*, 2019). La fonction principale de l'enveloppe cellulaire est de préserver la forme et

l'intégrité de la cellule. Cependant, cette enveloppe joue également un rôle crucial dans la protection et la survie des bactéries dans des environnements hostiles et imprévisibles (Silhavy *et al.*, 2010b). L'enveloppe cellulaire constitue une barrière rigide et sélective, qui permet le transport des nutriments de l'extérieur vers l'intérieur et l'expulsion des déchets intracellulaires. Cette enveloppe est constituée de trois couches séparées à savoir (Figure 1.4), une MI qui sépare le périplasma du cytosol ; l'espace périplasmique, composée d'une fine couche des peptidoglycane et la ME dernière couche qui délimite les cellules de l'environnement extracellulaire (Dworkin, 2006; Gupta, 2011; Silhavy *et al.*, 2010b).

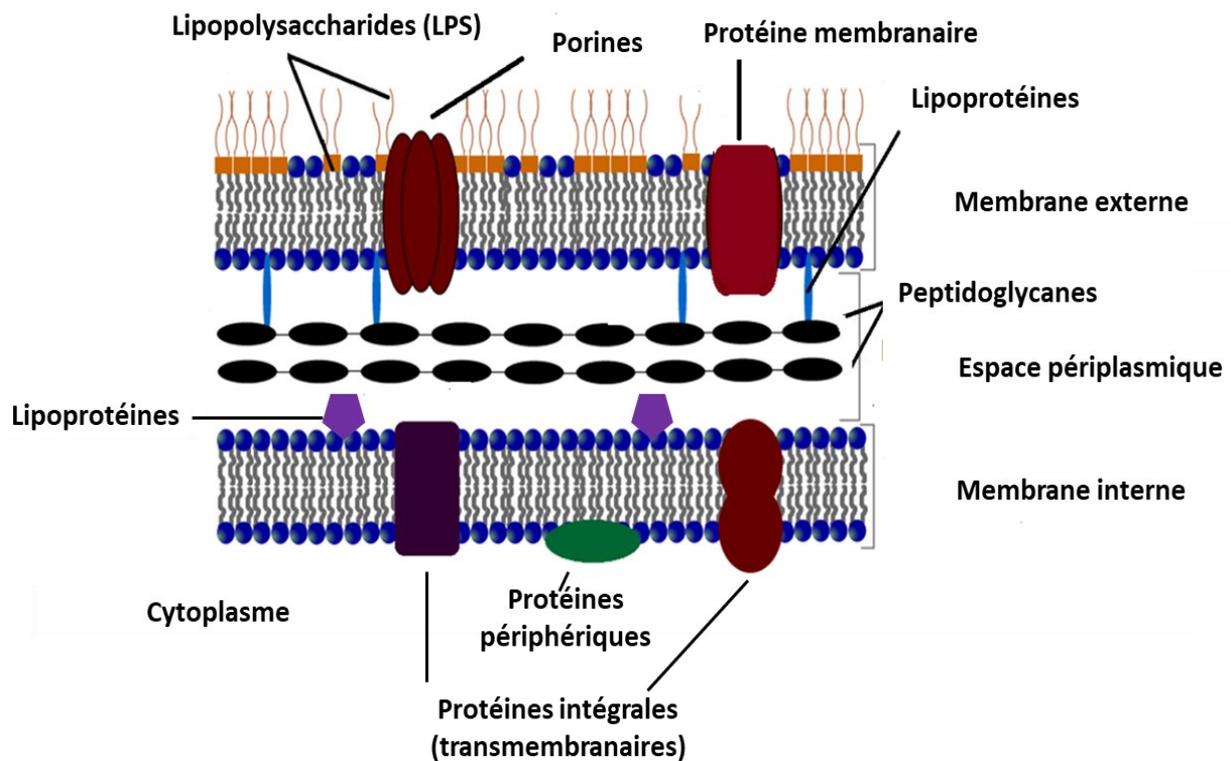


Figure 1.4 : Enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif  
La figure a été adaptée de (Ruiz *et al.*, 2006).

### 1.4.1 La membrane interne

La MI est une bicouche phospholipidique symétrique, qui sépare le cytoplasme du périplasma bactérien (Strahl & Errington, 2017). Elle est constituée d'un feuillet interne et d'un feuillet externe faisant face au périplasma. Elle est composée de phospholipides, de protéines transmembranaires intégrales dont les domaines hélicoïdaux sont insérés dans la MI, et de lipoprotéines (Figure 1.4) (Luirink *et al.*, 2012). Les composants de la MI sont impliqués dans

plusieurs fonctions cellulaires essentielles telles que le transport sélectif des ions et des métabolites, la division cellulaire, la motilité et la signalisation cellulaire (Silhavy *et al.*, 2010b). Ils maintiennent également la force proton motrice nécessaire au stockage de l'énergie (Donnenberg, 2015).

Les protéines membranaires intégrales contiennent un ou plusieurs segments transmembranaires. Elles adhèrent à l'un des feuillet phospholipidiques par le biais d'interactions électrostatiques, hydrophobes ou non covalentes.

Les lipoprotéines constituent un autre groupe de protéines qui interagissent avec la MI. Elles sont ancrées au feuillet externe de la MI par leurs groupements lipidiques N-terminaux (Konovalova & Silhavy, 2015b). Les lipoprotéines de la MI sont impliquées dans diverses fonctions de l'enveloppe cellulaire bactérienne tels l'adhésion aux cellules hôtes, la modulation des processus inflammatoires et la translocation des facteurs de virulence dans les cellules hôtes (Kovacs-Simon *et al.*, 2011).

#### **1.4.2 L'espace périplasmique**

L'espace périplasmique, encore appelé périplasme, est un milieu aqueux qui sépare la MI à la ME des bactéries (Figure 1.4) (Stanier, 1979). Il représente 20% à 40% du volume cellulaire total (Liu, 2019). Dans le périplasme se trouve la fine couche de peptidoglycane (Dworkin, 2006; Silhavy *et al.*, 2010b). Ce dernier stabilise les deux membranes cellulaires contre les pressions osmotiques internes (Silhavy *et al.*, 2010b). De plus, il est impliqué dans de nombreuses autres fonctions notamment grâce à la présence de nombreuses autres protéines telles que les enzymes de détoxification ou de dégradation, les enzymes d'absorption, des protéines impliquées le transport des sucres et des acides aminés ainsi que dans la chimiotaxie, et des protéines chaperonnes impliquées dans la biogenèse des enveloppes cellulaires (Goemans *et al.*, 2014; Liu, 2019).

#### **1.4.3 La membrane externe**

La ME est une bicouche lipidique qui sépare l'environnement extracellulaire de l'environnement intracellulaire bactérienne (Figure 1.4) (Coleman & Smith, 2014). Elle est asymétrique, rigide et uniquement présente chez les bactéries à Gram négatif (Glauert, 1962a; GLAUERT, 1962b; Nikaido, 1994; Nikaido & Vaara, 1985). La ME est essentielle car elle contribue au maintien de l'intégrité cellulaire. Elle joue un rôle clé dans l'interaction des

bactéries avec leur environnement, sert de point d'ancrage pour les systèmes multi-composants impliqués dans la motilité, la sécrétion de protéines, ainsi que dans l'importation et l'exportation de petites molécules (Hoang *et al.*, 2011). La ME sert aussi de barrière sélective en permettant l'import de nutriments, tout en empêchant ou diminuant l'entrée de composés toxiques tels que les composés antimicrobiens produits par tous les organismes et les acides biliaires (Nakae, 1986; Nikaido, 2003; Nikaido & Vaara, 1985; O'Shea & Moser, 2008). Elle restreint également la diffusion des molécules très chargées, telles que les ions, et des grosses molécules comme les sucres et les acides aminés (Nikaido, 2003).

### 1) Les composants de la membrane externe

Cette bicouche asymétrique est constituée de deux feuilletts :

- Le feuillet périplasmique, composé principalement de phospholipides et de lipoprotéines (Chatterjee & Chaudhuri, 2012).
- Le feuillet externe, majoritairement composé d'un glycolipide unique, les LPS (Mühlradt & Golecki, 1975; Teissié & Zerbib, 2018). Les molécules de LPS sont composées (Figure 1.5) d'un lipide A hydrophobe, ancré dans le feuillet externe de la ME ; d'un oligosaccharide de noyau phosphorylé et non répétitif de nature hautement anionique, appelé le *core-OS*, et enfin d'une partie hydrophile, antigène O, constituée de chaînes glucidiques complexes qui s'étend à la surface de la cellule et qui agit comme une surface d'enrobage hydrophile (Raetz & Whitfield, 2002; Whitfield & Trent, 2014). Le LPS confère une charge négative à la surface bactérienne, qui est neutralisée par les cations divalents comme  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Schindler & Osborn, 1979). L'interaction de LPS avec les cations divalents forme une barrière de perméabilité solide dans laquelle les protéines de la ME (OMP) sont insérées pour faciliter l'afflux de nutriments.

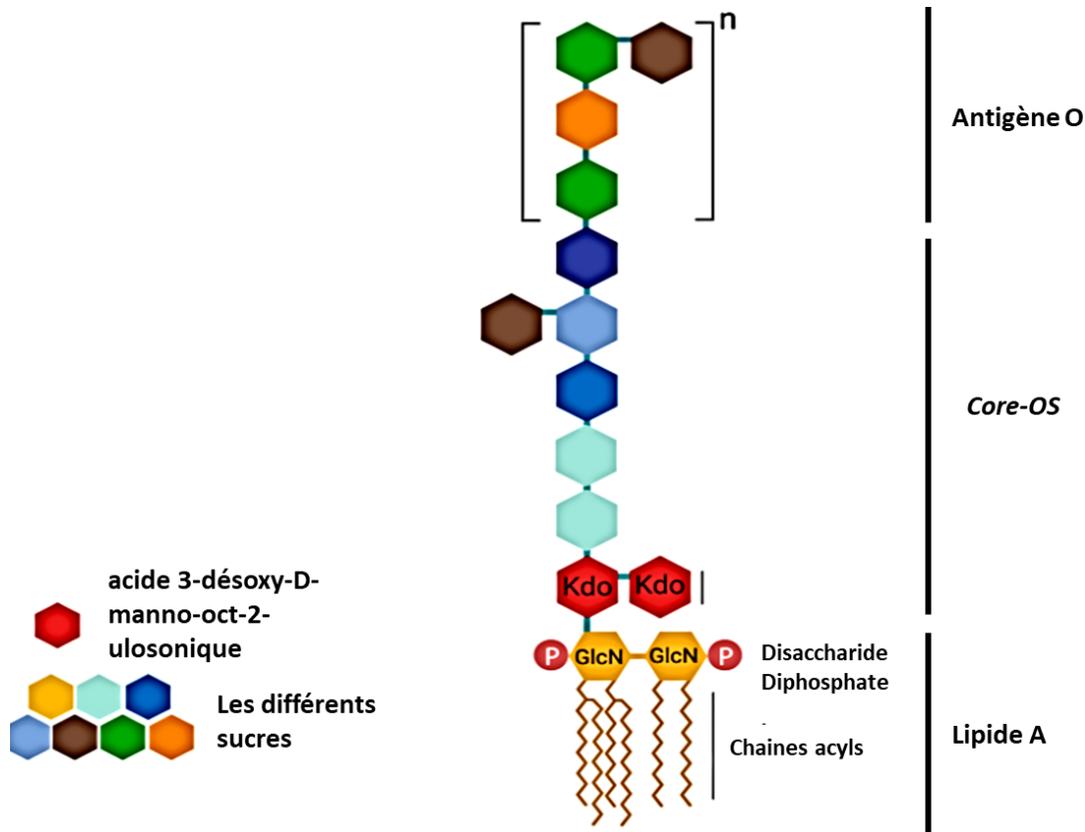
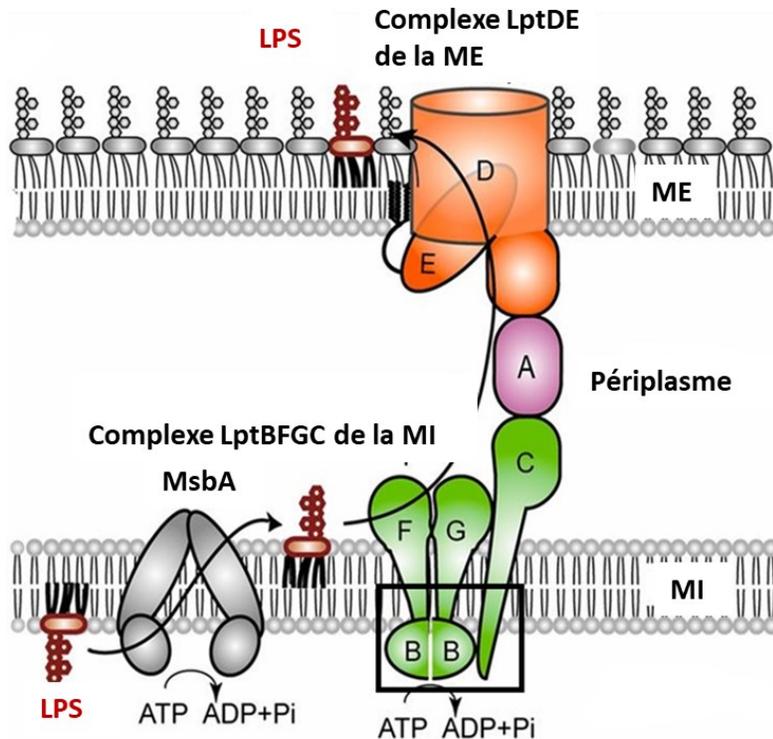


Figure 1.5 : Composition structurale des lipopolysaccharides des bactéries à gram négatif  
La figure a été adaptée de (Mazgaeen & Gurung, 2020).

### 1.4.3.2 Biogénèse des lipopolysaccharides

Chez les bactéries à Gram négatif, le LPS est transporté du cytosol vers la ME par la machinerie multiprotéique Lpt (Figure 1.6) (Wu *et al.*, 2006). Les molécules de LPS sont transportées dans le périplasma par la protéine LptA et sont délivrées au complexe multiprotéique de la ME constitué de LptD, une OMP intégrale et de LptE, une lipoprotéine étroitement associée à LptD. Les molécules de LPS ont également été impliquées dans le repliement et l'assemblage des OMP intégrales (Bulieris *et al.*, 2003); cependant, la fonction précise des LPS dans l'assemblage des OMP est actuellement inconnue.



**Figure 1.6 : Translocation des LPS du cytoplasme vers la ME par la machinerie multiprotéique Lpt**  
 La figure a été adaptée de (Malojčić et al., 2014).

La ME contient un grand nombre des protéines intégrées, dont certaines sont des lipoprotéines (Nanninga, 2014). Les lipoprotéines sont ancrées à la surface de la ME et au feuillet interne de la ME par un groupement lipidique N-terminal et s'étendent dans l'espace périplasmique (Figure 1.7) (Bos *et al.*, 2007; Konovalova & Silhavy, 2015a; Okuda & Tokuda, 2011; Tokuda & Matsuyama, 2004). Elles assurent plusieurs fonctions importantes telles que la biogénèse de l'enveloppe (par exemple les protéines BamD et LptE) (Chimalakonda *et al.*, 2011), le stress extra-cytoplasmique, l'assemblage des pili et des flagelles (Dong *et al.*, 2006; El Rayes *et al.*, 2021; Hospenthal *et al.*, 2017; Laloux & Collet, 2017). Les lipoprotéines sont également impliquées dans l'initiation des processus inflammatoires lors de la translocation des facteurs de virulence dans le cytoplasme de cellules hôtes (Das *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2005). La deuxième catégorie est celle des protéines membranaires intégrales, appelées OMP (Tokuda & Matsuyama, 2004).

## **1.4.4 Les protéines de la membrane externe (OMP)**

### **1.4.4.1 Généralité**

Les OMP sont des protéines qui adoptent généralement une conformation en tonneau-bêta ( $\beta$ ) et constituent environ 50 % de la masse de la ME (Koebnik *et al.*, 2000). Environ 2 à 3% du génome des bactéries à Gram-négatif code pour les OMP (Wimley, 2003). Les OMP se trouvent exclusivement dans la ME et sont des constituants essentiels pour la survie cellulaire. Les OMP comprennent les porines, les pompes de flux ou encore des protéines de locomotion. Les protéines porines constituent la majorité des protéines présentes dans la ME. Comme leur nom l'indique, ces protéines forment des pores transmembranaires avec une structure des brins  $\beta$  antiparallèles qui se replie en un tonneau  $\beta$ . Il existe plusieurs types de porines chez les bactéries à Gram-négatif : les porines monomères, dimères ou trimères (Pagès *et al.*, 2008).

### **1.4.4.2 Fonctions des OMP**

Les OMP sont directement en contact avec l'environnement extérieur de la cellule bactérienne, donc constituent la première ligne de contact de la bactérie avec son environnement. Cette emplacement clé permet aux OMP d'agir dans des fonctions vitales telles que l'absorption des nutriments et des solutés, notamment par les protéines porines TonB, PhoE et OmpF (Noinaj *et al.*, 2010); l'agrégation, l'adhésion et l'attachement (Klebba & Newton, 1998; Mecsas *et al.*, 1995; Silhavy *et al.*, 2010a). Certaines OMP s'associent avec des différentes protéines périplasmiques et/ou de la MI pour former des complexes de sécrétion et de biogénèse de protéines. C'est par exemple le cas des protéines TolC, Imp, BamA (Morona *et al.*, 1983, Noinaj, 2010 #333). D'autres OMP telles les petites protéines intégrales membranaires FadL et Tsx interviennent dans le transport des acides gras et des nucléosides à travers la ME (Kumar & Black, 1993; Ye & van den Berg, 2004). Les OMP permettent également de maintenir l'intégrité structurale de la cellule (Braun & Silhavy, 2002; Stubenrauch & Lithgow, 2019).

### **1.4.4.3 La biogénèse des protéines de la membrane externe**

Après avoir été synthétisées par les ribosomes dans le cytoplasme, les OMP sont transportées par les protéines chaperonnes, vers la ME à travers la MI et le périplasma, tout en empêchant leur agrégation (Rigel & Silhavy, 2012). Les protéines naissantes, ou précurseurs, utilisent un ou plusieurs systèmes de translocation pour atteindre la ME. Deux systèmes de translocation connus interviennent dans le transfert des OMP à travers la ME : le translocon Sec ou le système Tat (twin-arginine translocation) (Denks *et al.*, 2014; du Plessis *et al.*, 2011b;

Lee *et al.*, 2006). Cependant, la grande majorité des OMP seraient ciblées par la machinerie Sec via une séquence signale N-terminale, un motif tripartite (Albrecht *et al.*, 2014; Tsirigotaki *et al.*, 2017). La translocation à travers la MI se produit généralement via les protéines cytoplasmiques SecB, SecA et le complexe de translocation SecYEG intégré à la MI (Figure 1.7) (Driessen & Nouwen, 2008; du Plessis *et al.*, 2011a). Ce mécanisme nécessite de l'énergie chimique sous forme d'ATP, et de l'énergie électrochimique (Bernstein, 2000). Une fois dans le périplasme, la séquence signale N-terminale est clivée par des peptidases périplasmiques puis les OMP se lient à des protéines chaperonnes (Miot & Betton, 2004).

Ces dernières, comme SurA ou Skp, sont essentielles pour maintenir les OMP naissantes dans un état protégé et déplié et les guider vers la ME (Sklar *et al.*, 2007b) à travers le périplasme, environnement aqueux et encombré (Merdanovic *et al.*, 2011) inapproprié pour les OMP qui sont des protéines hydrophobes. Il existe également une autre protéine chaperonne, appelée DegP, qui fonctionne principalement comme une protéase : elle dégrade les OMP mal repliées et agrégées dans le périplasme (Ge *et al.*, 2014). Les OMP doivent ensuite être correctement insérées dans la ME et repliées dans leur état fonctionnel final. Pour cela, des machineries d'assemblages sont requises. La majorité des OMP est acheminée, majoritairement à structure de tonneau  $\beta$ , à la machinerie d'assemblage  $\beta$ -barrel (BAM) bien connue et caractérisée dans la littérature (Ricci & Silhavy, 2012).

#### **1.4.4.4 La machinerie d'assemblage de tonneaux $\beta$ (BAM)**

La grande majorité des OMP nécessitent pour leur assemblage et insertion au niveau de la ME, le complexe transmembranaire BAM, extrêmement bien conservé (Dunstan *et al.*, 2015; Gentle *et al.*, 2004; Ricci & Silhavy, 2012; Wu *et al.*, 2005). Le complexe protéique BAM est un oligomère associé à la ME présent chez toutes les bactéries à Gram négatif. Il a été identifié pour la première fois chez *E. coli* mais a été également étudié chez *Neisseria meningitidis* et *Caulobacter crescentus* (Anwari *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2005). Il est constitué chez la plupart des protéobactéries de cinq protéines, dont l'OMP BamA et des lipoprotéines (Wu *et al.*, 2005). BamA est la protéine principale dans l'assemblage des OMP et appartient à la famille des protéines Omp85. Comme toutes les protéines Omp85, BamA est composée d'un domaine transmembranaire- tonneau $\beta$  à l'extrémité C-terminale et d'un nombre variable de domaines associés au transport de polypeptides disposés dans le périplasme (POTRA) à l'extrémité N-terminale (Gentle *et al.*, 2004; Sánchez-Pulido *et al.*, 2003). Elle est intégrée à la ME par son extrémité C-terminale. Sa région N-terminale est composée de plusieurs domaines POTRA (Ieva *et al.*, 2011). BamA est composée de cinq domaines POTRA qui interagissent

avec les quatre autres protéines du complexe BAM, BamBCDE (Figure 1.7) (Kim *et al.*, 2007). BamBCDE sont des lipoprotéines périplasmiques à tonneau- $\beta$  à 16 brins, ancrées au feuillet interne de la ME via leur domaine N-terminal et qui se lient de manière stable au domaine périplasmique N-terminal de BamA. Contrairement à la protéine BamA, les lipoprotéines BamB, BamC, BamE et la protéine BamF spécifiques aux protéobactéries accomplissent des fonctions accessoires et ne sont pas toujours conservées chez les bactéries à Gram-négatif (Anwari *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2012). Elles sont impliquées à la fois dans l'insertion des protéines membranaires dans la ME et la sécrétion de protéines chez les bactéries et d'autres organites (Baud *et al.*, 2014; Höhr *et al.*, 2018).

Les protéines BamA et BamD seraient essentielles à la survie bactérienne (Gatsos *et al.*, 2008; Malinverni *et al.*, 2006a). En effet, la délétion des gènes codant les protéines BamA et/ou BamD chez *E. coli* entraîne un gros défaut d'assemblage des OMP, conduisant à la mort cellulaire (Lee *et al.*, 2018; Malinverni *et al.*, 2006b). Chez la plupart des bactéries à Gram négatif, la séquence des protéines BamA et BamD est hautement conservée (Gatsos *et al.*, 2008; Sandoval *et al.*, 2011). Ces informations indiquent que ces deux protéines, BamA et BamD, forment le noyau central du complexe et jouent donc un rôle clé lors de l'assemblage des OMP (Malinverni *et al.*, 2006a; Wu *et al.*, 2005). Des délétions des gènes codant les protéines BamC ou BamE cause un léger défaut de la biogenèse membranaire (Sklar *et al.*, 2007a; Wu *et al.*, 2005), il est important de souligner que la présence de toutes les protéines qui composent le complexe BAM est nécessaire pour une insertion efficace des précurseurs des OMP dans la ME mais seule l'absence de BamA et/ou BamD conduit à la mort cellulaire (Selkrig *et al.*, 2012).

Pendant longtemps, il a été pensé que le complexe BAM était la seule machinerie impliquée dans l'assemblage des OMP. Cependant en 2012, Selkrig et ses collaborateurs ont décrit un second complexe d'assemblage des protéines transmembranaires appelé « Module de Translocation et d'Assemblage » (TAM), comme étant nécessaire pour la biogenèse d'un certain nombre des protéines non identifiées (Selkrig *et al.*, 2012). Contrairement au complexe BAM, le module TAM reste encore mal compris et décrit à l'heure actuelle.

#### **1.4.4.5 Le module de translocation et d'assemblage (TAM)**

Le complexe TAM a été identifié chez la plupart des protéobactéries (Selkrig *et al.*, 2015). Il est composé de deux protéines : la protéine TamA, de la famille Omp85, et la protéine TamB, ancrée dans la MI (Figure 1.7) (Gruss *et al.*, 2013; Selkrig *et al.*, 2014; Selkrig *et al.*, 2012). TamA est une protéine homologue à BamA du complexe BAM. Elle constitue la protéine

principale du complexe TAM et sa séquence est conservée chez la grande majorité des protéobactéries (Heinz & Lithgow, 2014). La protéine TamA est composée d'un domaine tonneau  $\beta$  C-terminal associé à la ME et d'une région périplasmique N-terminale qui contient trois domaines POTRA (Figure 1.7) (Gruss *et al.*, 2013). Les trois domaines POTRA de TamA ont une conformation rigide en solution et sont requis pour l'activité catalytique de la protéine. Ils permettent également à TamA d'interagir directement avec la protéine périplasmique TamB, protéine ancrée à la MI par sa région N-terminale (Selkrig *et al.*, 2015; Selkrig *et al.*, 2012). TamB est une grande protéine de structure peu connue. Contrairement à la protéine TamA, celle-ci est présente chez la majorité des bactéries à Gram négatif (Stubenrauch & Lithgow, 2019). La protéine TamB est intégrée à la MI grâce un peptide signal non clivé à son extrémité N-terminale, tandis que son domaine C-terminal contient une région conservée de fonction inconnue (Selkrig *et al.*, 2015; Selkrig *et al.*, 2012). Chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, la protéine TamB est codée par un gène dans un opéron aux côtés du gène *tamA*. Chez les bactéries dépourvues du gène *tamA*, TamB ou ses protéines homologues sont codées par des gènes organisés dans un opéron avec d'autres gènes codant pour la famille des protéines Omp85 (Heinz *et al.*, 2015). Par exemple, chez les *Bacteroidetes* spp. et *Chlorobi* spp., *tamB* se trouve en aval du gène *tamL* (Heinz *et al.*, 2015). En 2015, Selkrig et ses collègues ont démontré que la protéine TamB interagissait spécifiquement avec le domaine POTRA 1 de TamA. Cette interaction au niveau périplasmique, facilite l'assemblage, la localisation et l'exportation de nombreuses protéines, y compris celles des autotransporteurs classiques et d'autres OMP telles que les protéines structurales comme FimD et l'intimine (Heinz *et al.*, 2016; Selkrig *et al.*, 2012; Stubenrauch *et al.*, 2016).

Au cours des dernières années, la littérature rapporte que dans le complexe TAM c'est la protéine TamA qui est nécessaire à l'assemblage efficace de certaines OMP, y compris les auto-transporteurs classiques (Babu *et al.*, 2018; Heinz *et al.*, 2016; Selkrig *et al.*, 2012). Cependant, à l'inverse de la protéine BamA, l'absence de TamA n'affecte pas la survie de la cellule bactérienne, mais pourrait plutôt causer un défaut de colonisation de l'hôte (Selkrig *et al.*, 2012). La suppression du gène codant TamA a un impact sur l'assemblage des auto-transporteurs

*in vivo* et réduit la virulence de certains pathogènes tels que *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter* et *Salmonella* (Selkrig *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2014). Cependant, le mécanisme par lequel la mutation du gène *tamA* impacte la virulence de ces pathogènes reste encore inconnu.

La protéine TamB d'*E. coli* et ses protéines homologues dans d'autres organismes, semblent être impliquées dans l'exportation de divers groupes d'OMP, mais elles sont également importantes pour le maintien de l'intégrité et la morphologie de la membrane. Bien que la mutation du gène *tamB*, n'ait pas d'impact sur la viabilité cellulaire, elle pourrait cependant entraîner une sensibilité accrue à la vancomycine chez *E. coli* (Babu *et al.*, 2011). De plus, Smith et ses collègues ont montré que la délétion du gène *morC* codant pour la protéine de morphogenèse MorC (protéine homologue de TamB) chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cause une sensibilité significativement accrue aux sels biliaires (Smith *et al.*, 2016).

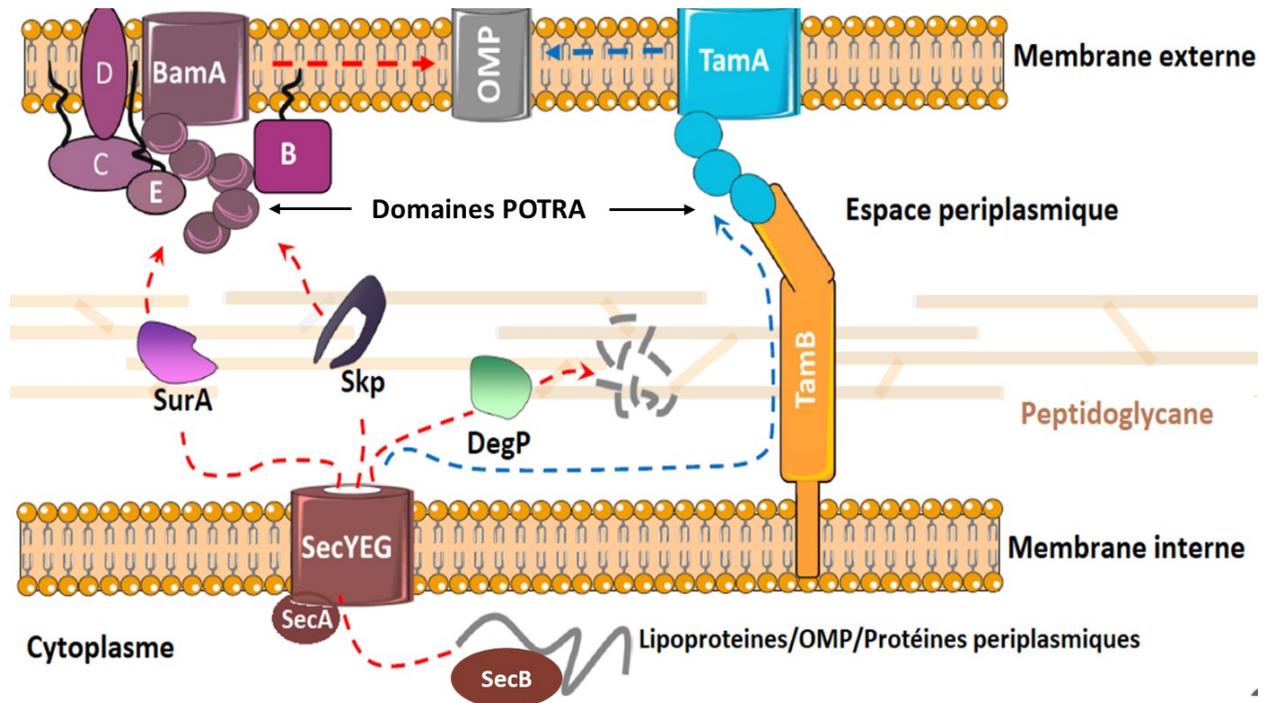


Figure 1.7 : Biogenèse des OMP

Les protéines nouvellement synthétisées sont ciblées par le complexe Sec dès qu'elles émergent du tunnel du ribosome. Les protéines destinées à la ME sont transportées à travers la MI par le complexe. Le complexe se compose du canal conducteur de la protéine SecYEG et la protéine SecA-ATPase. Dans le périplasme, les protéines naissantes sont prises en charge par les chaperonnes SurA et Skp qui empêchent leur dénaturation et agrégation. Les protéines mal repliées sont dégradées par la protéase DegP. Une grande partie des protéines est acheminée au complexe BAM et une autre partie au complexe TAM, pour être assemblées et insérées dans la ME. La figure a été adaptée de (Rollauer *et al.*, 2015).

#### 1.4.4.6 Importance des protéines de la membrane externe dans la virulence

Chez les bactéries à Gram négatif, les OMP déterminent la capacité de la bactérie à survivre, à se maintenir et à compéter avec les microorganismes dans son environnement (Lin *et al.*, 2002). En effet, les OMP sont essentielles au processus d'interactions hôte-pathogène,

comme l'invasion et l'adhésion aux cellules hôtes. Par exemple la protéine OmpA d'*A. baumannii* joue un rôle important dans la régulation de l'adhérence, l'invasion des cellules ainsi que la formation de biofilm (Khalil *et al.*, 2021; Sánchez-Encinales *et al.*, 2017). Chez *P. aeruginosa*, la protéine OprQ a été décrite comme un facteur important de la virulence car elle est impliquée dans l'adhérence à la fibronectine humaine (Arhin & Boucher, 2010). Macfarlane et ses collègues ont également démontré que la protéine OprH régule les systèmes à deux composants PhoP/PhoQ et donc impliquée indirectement dans la résistance de *P. aeruginosa* aux peptides antimicrobiens cationiques et aux antibiotiques aminosides (Macfarlane *et al.*, 2000). Les OMP sont également impliquées dans la résistance des bactéries aux carbapénèmes par exemple les protéines CarO et OprD (Uppalapati *et al.*, 2020).

En raison de leurs implications dans des fonctions importantes à la survie des bactéries, les OMP et les mécanismes par lesquels elles sont générées constituent des cibles potentielles pour le développement des nouveaux traitements anti-infectieux et antimicrobiens. Cependant les mécanismes par lesquels les OMP sont assemblées et insérées dans la ME restent jusqu'à l'heure peu compris, notamment via le complexe TAM.

Du fait du manque des nouveaux antibiotiques, beaucoup d'études sont dirigées vers des nouvelles cibles, notamment la ME mais aussi les protéines qui la constituent, sont importantes dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques contre les infections car elles agissent une barrière protectrice de la cellule contre les stress environnementaux, tels que les antibiotiques. C'est ainsi qu'il est très important de comprendre la biogénèse de cette membrane et les facteurs impliqués dans ce processus.

## **1.5 Modèle d'étude, *Pseudomonas aeruginosa***

### **1.5.1 Intérêt du modèle choisi**

C'est un pathogène opportuniste capable d'infecter plusieurs hôtes dont l'Homme mais aussi les insectes, nématodes et plantes (Silby *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif monotriche, avec un flagelle polaire, capable de croître en condition aérobie et anaérobie. Chez l'être humain, cette bactérie est responsable de plusieurs types d'infections : septicémie, pneumonie, infections urinaires, etc. (Trautmann *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* est également fréquemment impliquée dans des infections nosocomiales, notamment chez les grands brûlés et les patients immunodéprimés, et les individus atteints de fibrose kystique, une maladie génétique récessive (Burns *et al.*, 1998; Folkesson *et al.*, 2012) *P. aeruginosa* est une

bactérie versatile. Sa grande diversité métabolique lui permet de croître dans diverses niches écologiques et de consommer différentes sources de carbone (Moradali *et al.*, 2017). En 2017, *P. aeruginosa* a été reconnue comme l'une des bactéries les plus menaçantes pour la vie et classée comme un pathogène prioritaire pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques par l'Organisation mondiale de la santé (World Health Organization; Geneva, Switzerland).

Dans les milieux hospitaliers, notamment dans les services des soins intensifs, elle se classe parmi les cinq principaux organismes causant des complications médicales (Trautmann *et al.*, 2005; Wisplinghoff *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* est particulièrement préoccupante car elle possède un arsenal de facteurs de virulence et mécanismes de défense (Figure 1.8) lui permettant de contrer la réponse immunitaire de l'hôte et les traitements antibiotiques.

### **1.5.2 Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa***

Les facteurs de virulence facilitent l'infection et l'invasion bactérienne afin de permettre la colonisation d'un large éventail d'environnements et de persister dans ces environnements.

#### **1.5.2.1 Les Lipopolysaccharide de *P. aeruginosa***

Comme toutes les bactéries à Gram négatif, *P. aeruginosa* exprime des molécules de LPS qui sont les constituants principaux du feuillet externe de la ME (Whitfield & Trent, 2014). Ces glycolipides forment une couche stabilisée par des cations divalents et fournissent une barrière de perméabilité efficace contre les molécules délétères, telles que les antibiotiques et les peptides antimicrobiens cationiques (Clifton *et al.*, 2015). Ainsi, grâce à leur nature hydrophobe et leur polarité, ils contribuent à la diminution de la perméabilité membranaire. Chez *P. aeruginosa*, le LPS joue un rôle important dans la formation du biofilm, l'interaction entre l'agent pathogène et l'hôte infecté notamment en interagissant directement ou en s'échappant des réponses du système immunitaire inné et adaptatif. Le LPS est également connu comme étant le récepteur des bactériophages chez *P. aeruginosa*, c'est qui permet l'internalisation et la propagation du virus (Lam *et al.*, 2011). Donc le LPS est intégralement lié au cycle de vie des phages. Le joue un rôle important dans la virulence des bactéries (Nikaido, 2003).

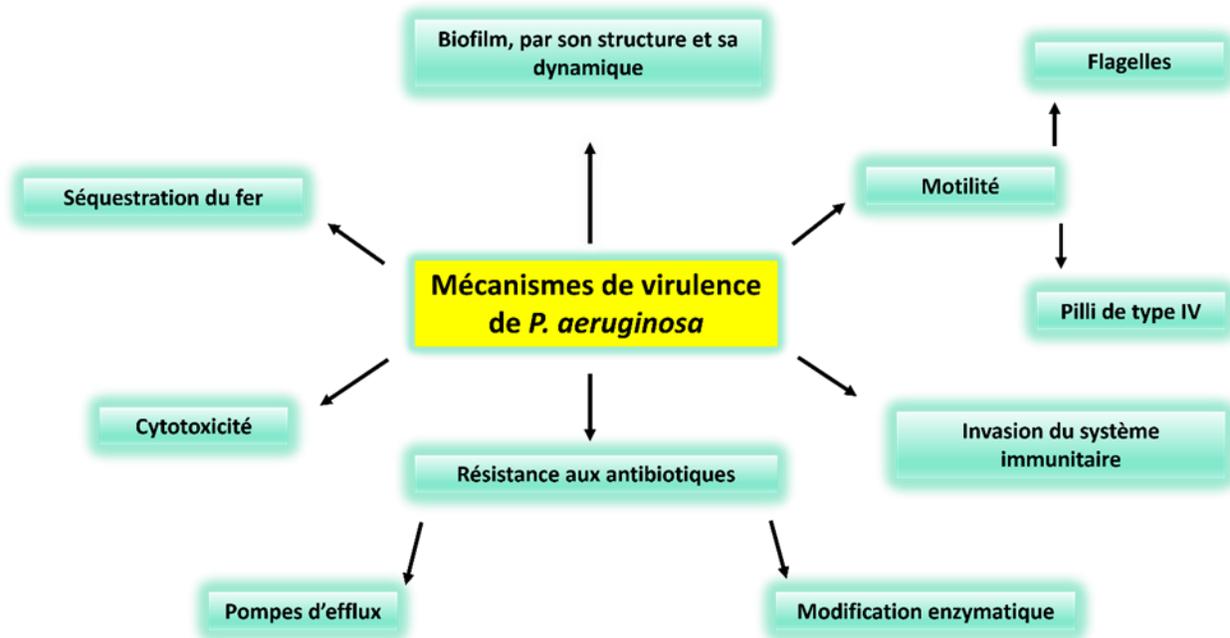


Figure 1.8 : Les différents facteurs de virulence utilisés par *P. aeruginosa*  
 La figure a été adaptée de (Lee & Zhang, 2014).

### 1.5.2.2 La formation de biofilm

La formation d'un biofilm est un facteur de virulence important pour plusieurs bactéries pathogènes (Costerton *et al.*, 1999; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009; Høiby *et al.*, 2010). Chez *P. aeruginosa*, sa capacité à former un biofilm lui permet notamment de mieux résister aux traitements antibiotiques et à l'immunité de l'hôte. Cette protection accrue est potentiellement liée aux nombreux mécanismes agissant dans un biofilm, tels que l'induction de réponse aux stress, la diminution de l'absorption des molécules de grande taille, la neutralisation des molécules chargées négativement, une diminution de l'activité métabolique (Roy *et al.*, 2018). La formation de biofilms est à l'origine de nombreuses infections persistantes, chroniques et parfois fatales chez les humains.

Le biofilm bactérien est une communauté multicellulaire qui adhère à une surface biotique, telle que les cellules de la muqueuse, ou une surface abiotique telle que les cathéters ou les sondes (Donlan, 2002; Høiby *et al.*, 2010; Karatan & Watnick, 2009). Il s'agit d'un agrégat bactérien complexe et organisé, enfermé dans une matrice auto-générée, composée notamment de polymères extracellulaires (EPS) (Donlan, 2002). La matrice forme une enveloppe protectrice pour les bactéries qui composent le biofilm. Les EPS produits par *P. aeruginosa* sont Psl, Pel et l'alginate.

Ces EPS interviennent lors de la fixation à la surface, la formation et la stabilité de l'architecture du biofilm (Franklin *et al.*, 2011). La structure précise, la chimie et la physiologie d'un biofilm varient avec la nature des micro-organismes qui y résident et selon l'environnement colonisé. Dans des conditions hypoxiques et anoxiques, la formation du biofilm se produit selon un processus séquentiel (Figure 1.9) : (1) migration de microorganismes vers une surface biotique ou abiotique, étape de l'adhésion de manière réversible ; (2) Adhésion permanente irréversible et formation de microcolonies; (3 et 4) interaction entre les microcolonies et multiplication (formation de la forme champignon); (5) dispersion des bactéries pour revenir à l'état planctonique et coloniser d'autres surfaces.

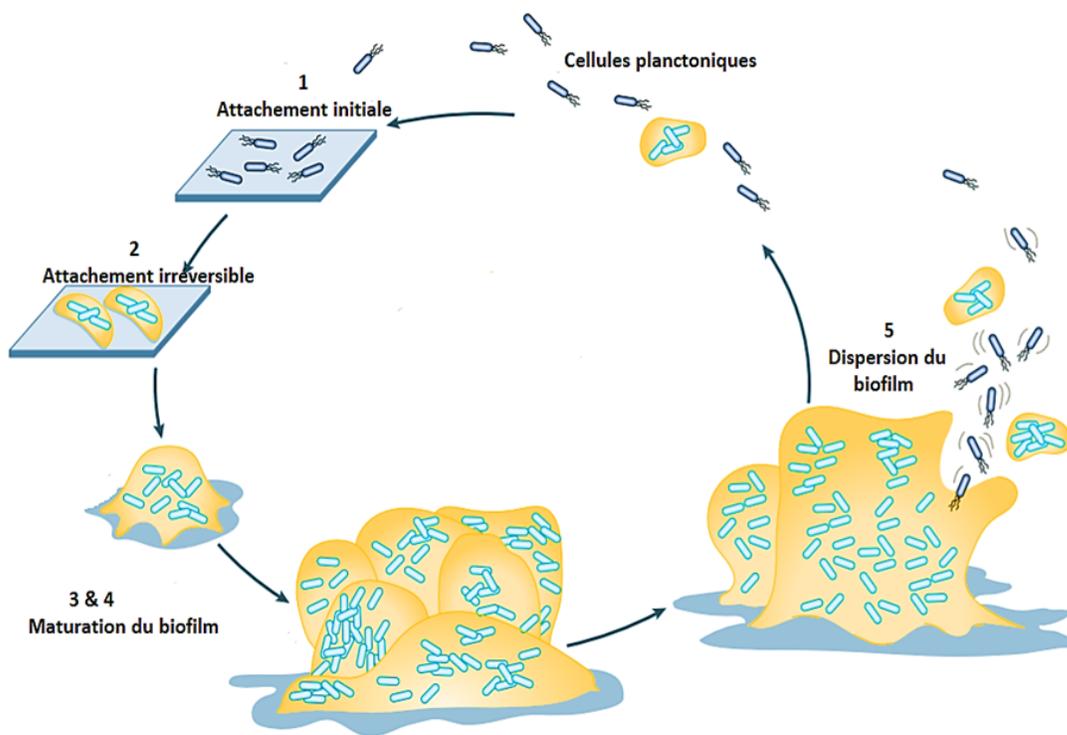


Figure 1.9 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm chez *P. aeruginosa*  
La figure a été adaptée de (Rumbaugh & Sauer, 2020).

### **1) Adhésion réversible**

La première étape dans la formation du biofilm est l'adhésion réversible à une surface biotique ou abiotique. Cette étape est initiée par l'interaction des cellules planctoniques avec une surface en réponse à des signaux environnementaux appropriés. La colonisation initiale des surfaces est médiée par le flagelle, nécessaire à la motilité et au chimiotactisme bactérien (Shapiro, 1995). Ce mode de déplacement induit par le flagelle est appelé motilité de type *swimming*. Le *swimming* se fait grâce à la présence d'un flagelle polaire qui suit un modèle de rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre et de basculement de la cellule (Taylor & Koshland, 1974; Toker & Macnab, 1997).

C'est un mode de déplacement unicellulaire qui se fait dans un environnement liquide à faible viscosité. C'est un type de motilité cellulaire très répandu chez les bactéries à Gram négatif vivants dans des milieux aquatiques (Jarrell & McBride, 2008).

### **2) Adhésion irréversible et formation des microcolonies**

Une fois les cellules attachées de manière irréversible à une surface, elles vont s'agglutiner entre elles, se multiplier et former des microcolonies.

### **3) Formation des microcolonies**

Les bactéries se multiplient de manière progressive et s'attachent de plus en plus à la surface dans une architecture plus structurée, appelée microcolonies. Cette étape nécessite l'intervention des pili de type IV. Ces derniers sont des structures protéiques de la surface bactérienne et sont essentiels à l'adhérence et la colonisation des surfaces cellulaires (Giltner *et al.*, 2012). Ils permettent par leur extension-rétraction de propulser les bactéries à travers la surface solide et de s'attacher entre elles et à la surface. Ce mouvement en saccades qu'ils induisent est appelé la motilité de type *twitching* (Bradley, 1980; Merz *et al.*, 2000; Wall & Kaiser, 1999). Cette motilité indépendante du flagelle induite par les pili de type IV, est un mouvement collectif permettant à des nombreuses bactéries à Gram négatif de se déplacer le long des surfaces solides (biotique ou abiotiques) ou des milieux visqueux (Bradley, 1980; Henrichsen, 1975; Mattick, 2002). Une fois les cellules attachées de manière irréversible à une surface, elles vont s'agglutiner entre elles, se multiplier et former des microcolonies.

Les pili de type IV jouent un rôle vital dans la virulence et possèdent une grande capacité à déclencher une réponse immunitaire (Craig & Li, 2008). C'est également grâce à ces pili que les bactéries d'un biofilm se positionnent les unes par rapport aux autres (différenciation au sein

d'un biofilm), les aidant ainsi à s'échapper du biofilm lorsque cela est nécessaire et à coloniser des nouvelles surfaces (O'Toole & Kolter, 1998a).

La motilité est nécessaire à la fois pour la formation de biofilms (sur les surfaces biotiques et abiotiques) et la pathogénèse de plusieurs pathogènes bactériens (Guentzel & Berry, 1975; Haiko & Westerlund-Wikström, 2013).

#### **4) Maturation du biofilm**

Les microcolonies se développent davantage en structures étendues en trois dimensions ressemblant à une structure en forme de champignon, caractéristique de la maturation du biofilm. À cette étape, les bactéries synthétisent également des EPS ainsi que d'autres constituants (tels que l'ADN double brin,) de la matrice extra polymérique. La matrice va maintenir les bactéries ensemble et à ce stade le biofilm possède une structure complexe.

#### **5) Détachement et dispersion du biofilm**

La dernière étape de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes afin d'aller coloniser une autre surface. C'est une étape essentielle pour la survie des cellules bactériennes. Plusieurs facteurs, tel que la régulation génomique basée sur la densité de la population bactérienne, phénomène mieux connu sous le nom de *quorum sensing* (Karatan & Watnick, 2009), des perturbations mécaniques (force de cisaillement, abrasion) (Choi & Morgenroth, 2003), la dégradation enzymatique de la matrice polymérique, la dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est attaché, l'induction de la motilité, la production d'agents tensioactifs (les rhamnolipides) et le relâchement d'un exopolysaccharide peuvent être à l'origine de la dispersion du biofilm (Kaplan, 2010; Ma *et al.*, 2009). Les cellules détachées d'un biofilm, retournent à la vie planctonique, et adhèrent ensuite à de nouvelles surfaces pour reformer un nouveau biofilm, c'est ainsi que la boucle recommence. La dispersion du biofilm est une étape clé pour la transmission et la propagation des infections chez les hôtes colonisés (Kaplan, 2010). Tout comme les phases d'initiation, la dispersion du biofilm est médiée par le flagelle et les pili (Kostakioti *et al.*, 2013).

Plusieurs facteurs contribuent à la formation des biofilms par exemple les phénotypes appelé « Small Colony Variants » de *P. aeruginosa* sont capables d'augmenter la formation de biofilm.

### 1.5.3 Les Small Colony Variants (SCV)

Dans certaines conditions spécifiques, *P. aeruginosa* est capable d'opérer un changement phénotypique (Proctor *et al.*, 2006). Une des manifestations de ce changement est l'apparition de colonies de petite taille appelées SCV pour *small colony variant* (Götz *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2009a). Les SCV sont capables de former un biofilm plus efficacement que leurs homologues parentaux et pourraient donc jouer un rôle non négligeable dans la formation des biofilms (Besse *et al.*, 2021; Déziel *et al.*, 2001; Kahl *et al.*, 1998; Proctor *et al.*, 1995; Starkey *et al.*, 2009b).

## 1.6 Problématique, hypothèse et objectifs du projet de recherche

### 1.6.1 Problématique

Jusqu'à aujourd'hui, les antibiotiques sont largement utilisés dans le traitement des infections d'origine bactérienne. Cependant, cette option thérapeutique est de plus en plus menacée à cause de l'émergence des bactéries multi-résistantes. L'absence de la découverte de nouveaux antibiotiques naturels ont poussé à réorienter la recherche scientifique vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, c'est-à-dire l'identification de nouveaux facteurs de virulence des pathogènes multirésistants. Chez les bactéries à gram négatif, la cible la plus attrayante est la ME car elle constitue la première ligne de défense des bactéries contre les agressions extracellulaires. Son implication dans la virulence des bactéries à Gram négatif a été largement décrite, du fait de sa complexité et de ses composantes telles que les OMP. Les OMP sont des facteurs critiques des interactions hôte-pathogène, car elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions essentielles, telles que la motilité cellulaire, l'absorption de nutriments, l'adhésion et la colonisation des cellules hôtes, la sécrétion de toxines ou à l'évasion du système immunitaire. Bien que 3% du génome de la souche prototypique PA14 de *P. aeruginosa* code pour des OMP, la plupart sont des protéines hypothétiques donc encore non caractérisées, ce qui représente un réservoir important de cibles potentielles à découvrir. Par ailleurs, en 2012, un nouveau complexe de translocation et de repliement a été décrit, TAM, chez diverses bactéries pathogènes. Bien qu'il ait été rapporté que TAM contribue à la virulence de nombreux pathogènes bactériens en favorisant le repliement et la sécrétion des OMP dans la ME, à l'heure actuelle aucune littérature scientifique n'a rapporté les protéines dont l'activité dépend du complexe TAM, ou son rôle précis dans la virulence de *P. aeruginosa*. Identifier les

OMP dépendantes de TAM chez *P. aeruginosa* pourrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs de virulence et de contribuer à lutter contre les infections causées par *P. aeruginosa*.

### 1.6.2 Hypothèse

Il a été rapporté dans la littérature que la perte des gènes *tamA* ou *tamB*, du complexe TAM, augmente la perméabilité aux antibiotiques de haute taille moléculaire chez *K. pneumoniae* et entraîne un défaut de colonisation, ainsi qu'une perte de virulence chez plusieurs bactéries à Gram négatif tels qu'*E. coli*, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* et *Vibrio fischeri* (Selkrig et al., 2012). En me basant sur cette littérature, j'ai donc émis l'hypothèse que les protéines dont l'assemblage dépend du complexe TAM seraient impliquées dans la résistance aux antibiotiques et seraient potentiellement des facteurs de virulence.

### 1.6.3 Objectif général

Ce projet vise à identifier les protéines membranaires dont l'assemblage au niveau de la ME, et par conséquent l'activité, dépendent du complexe TAM de *P. aeruginosa*, par des tests phénotypiques et des analyses protéomiques.

### 1.6.4 Objectifs spécifiques

Pour vérifier mon hypothèse, la démarche expérimentale suivie a consisté à :

- a. Construire des mutants de délétion propre du gène *tamA* et de l'opéron *tamAB* chez *P. aeruginosa*
- b. Déterminer les phénotypes liés à la mutation du *tamA* et de *tamAB*.
- c. Identifier, grâce à une analyse protéomique, les potentielles protéines de la ME dont l'assemblage et l'insertion dans la bicouche lipidique dépendent du complexe TAM.

## 2 Matériels et Méthodes

---

### 2.1 Les milieux de culture

Le milieu Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco; BD Diagnostics) a été utilisé pour les cultures en milieu liquide. Ce milieu est composé de 17,0 g de Tryptone (Pancreatic Digest of Casein), 3,0 g de Soytone (Peptic Digest of Soybean), 2,5 g de glucose (source de carbone), 5,0 g de chlorure de sodium et 2,5 g de phosphate. Il a été préparé selon les recommandations du fabricant (30 g/L) et stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 1 h avant l'utilisation.

Pour la construction et la sélection des mutants, des géloses Lysogeny Broth (LB), LB plus antibiotiques et LB + 10 % de saccharose sans NaCl ont été utilisées. Les géloses LB ont été préparées en mélangeant pour un litre de milieu, 10 g de Bacto tryptone, 5 g de NaCl (aucun sel n'a été ajouté pour le LB sans NaCl), 5 g d'extrait de levure et 15 g de Bacto agar. Tous les milieux ont été stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 1 h. Pour les géloses LB avec antibiotique ou saccharose, elles ont été refroidies jusqu'à l'atteinte d'une température de 60 °C, puis la concentration désirée de la carbenicilline ou du saccharose a été ajoutée. Des aliquots de 25 mL ont été coulés dans des boîtes de Pétri et laissés solidifiés sous la hotte biologique.

Les milieux Mueller-Hinton liquide (MH) et MH ajusté en cations (MH-II) (Difco; BD Diagnostics) ont été utilisés pour les expériences de sensibilité aux antibiotiques. Ils sont composés de 300 g/L d'infusion de bœuf, de 17,5 g/L des acides casamino et de 1,5 g/L d'amidon soluble (Mueller & Hinton, 1941). Le MH-II est supplémenté avec les cations divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ . La concentration ajoutée de  $Ca^{2+}$  est de 20-25 mg/L et celle de  $Mg^{2+}$  est de 10-12,5 mg/L (Barry *et al.*, 1992). Les milieux MH sont recommandés pour les tests de sensibilité aux antibiotiques par l'organisation mondiale de la santé, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). La recommandation de l'utilisation de ces milieux est basée sur plusieurs raisons telles que la faible présence des inhibiteurs comme les sulfamides, la thymidine et la thymine mais aussi, du fait que dans ces milieux la concentration des cations divalents dont le magnésium et les ions calcium est contrôlée. Enfin, les milieux MH sont non sélectifs et permettent une bonne croissance de la plupart des agents pathogènes bactériens non exigeants. Le milieu MH

contient également de l'amidon, qui agit comme un colloïde et protège ainsi les bactéries contre les matières toxiques.

Pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, les milieux MH ont été préparés selon les indications du fournisseur. Une fois les milieux refroidis, la concentration voulue de l'antibiotique à tester a été ajoutée. Une concentration finale de 50 µg/mL de la spectinomycine et 0,25 µg/mL de la tobramycine ont été ajoutées au milieu MH pour les tests de sensibilité aux antibiotiques.

## 2.2 Les souches bactériennes et les conditions de culture

Toutes les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 2-1. Les souches bactériennes mutées générées au cours de ces travaux ont été obtenues à partir de la souche parentale *P. aeruginosa* PA14 souche UCBPP-PA14 (Rahme *et al.*, 1995). Deux mutants des gènes *tam* ont été générés grâce à une délétion propre au cours de ce projet et des mutants par transposition ont été fournis par la banque de transposon (Tableau 2-1) (Liberati *et al.*, 2006):

- ❖ Un mutant simple du gène *tamA* (PA14\_31680, PA2543) : le gène *tamA* sauvage de 1740 paires de base (pb) a été remplacé par un allèle raccourci du gène sauvage qui fait seulement 464 pb. Cette souche mutée est appelée PA14  $\Delta tamA$ .
- ❖ Un double mutant des gènes *tamA* et *tamB* (PA14\_31690, PA2542) : l'opéron de 5402 pb qui code à la fois le gène *tamA* et *tamB* a été remplacé par un allèle mutant de 684 pb composé d'une partie du gène *tamA* et une partie du gène *tamB*. Cette souche mutée est appelée PA14  $\Delta tamAB$ .

Les différentes étapes de la construction de ces mutants seront détaillées dans les paragraphes suivants.

**Tableau 2-1 : Souches et plasmides utilisés dans cette étude**

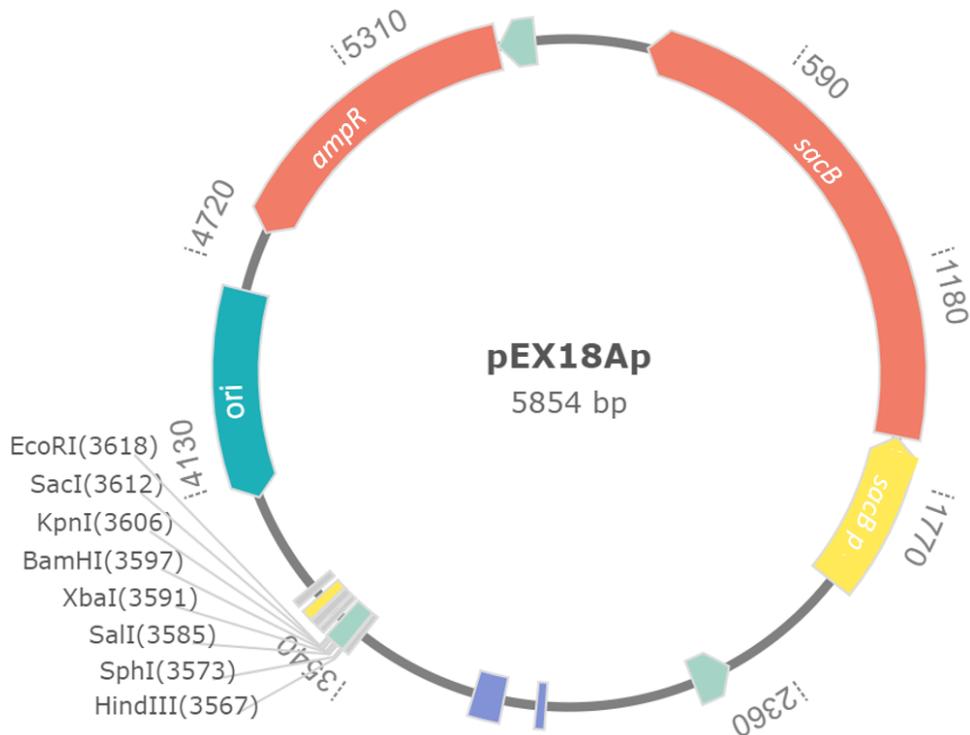
Souches/plasmides	Numéro ED#	Phénotypes	Références
<i>E. coli</i>			
DH5 $\alpha$	78	<i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
SM10 ( $\lambda$ pir)	222	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu</i> Km $\lambda$ pir	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>P. aeruginosa</i>			
UCBPP-PA14	14	wild-type strain	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 $\Delta$ <i>tamA</i>	4169	Délétion sans marqueur de <i>tamA</i> dans PA14	Dans cette étude
PA14 $\Delta$ <i>tamAB</i>	4172	Délétion sans marqueur de <i>tamAB</i> dans PA14	Dans cette étude
PA14 <i>fliC</i> -	13	PA14_50290::MAR2xT7, Gm <sup>R</sup>	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>tamA</i> -	3278	PA14_50290::MrT7, Gm <sup>R</sup>	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
Plasmides			
pEX18Ap	689	Vecteur suicide, Amp <sup>R</sup> , <i>sacB</i>	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pZH1	4173	pEX18Ap avec la construction du gène <i>tamA</i> muté	Dans cette étude
pZH2	4174	pEX18Ap avec la construction du gène <i>tamAB</i> muté	Dans cette étude

Toutes les souches utilisées au cours de ce travail, ont été conservées à -80°C dans des tubes cryogéniques dans 15 % de glycérol. En absence d'indication contraire, les souches de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* ont été inoculées dans 5 mL de milieu TSB et incubées à 37°C pendant 16 h sur un agitateur rotatoire. La croissance bactérienne a été suivie par une mesure de l'absorbance de la densité optique (DO) à 600 nm (DO<sub>600</sub>) au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

### 2.3 Le plasmides pEX18Ap

Tous les plasmides utilisés et construits au cours de ce projet sont dérivés du vecteur suicide pEX1Ap et listés dans le tableau 2-1. Les plasmides construits pour la réalisation des mutants sont : pEX18Ap *tamA* et pEX18Ap *tamB*. Les deux plasmides sont nommés respectivement pZH1 et pZH2 (Tableau 2-1).

Le plasmide pEX18Ap est un vecteur suicide, largement utilisé dans la construction de mutants chez *P. aeruginosa*, notamment basée sur la méthode des échanges alléliques (Huang & Wilks, 2017). Le plasmide pEX18Ap (Figure 2.1), contient dans son génome le gène *sacB* utilisé comme un marqueur de contre-sélection, un allèle *lacZα* pour le criblage bleu-blanc, un site de clonage multiple avec 10 sites de restriction unique, une origine de transfert oriT qui permet le transfert de plasmide par conjugaison et un gène de résistance à l'ampicilline servant de marqueur de sélection (Hoang *et al.*, 1998). La particularité de ce plasmide est dû à la présence du gène *sacB*. Ce gène *sacB* a été à l'origine isolé de *Bacillus subtilis* et code pour la lévansaccharase, l'enzyme qui catalyse la conversion du saccharose en lévane. La lévane est une molécule toxique (Dedonder, 1966) dont l'accumulation dans l'espace périplasmique est létale pour *P. aeruginosa* (Pelicic *et al.*, 1996; Ried & Collmer, 1987; Steinmetz *et al.*, 1983).



**Figure 2.1 : Carte génomique du vecteur de clonage pEX18Ap**  
 La zone en position 3540 correspond au site des restrictions multiple ; le pentagone vert (2360) correspond à oriT, les carrés en mauve correspondes au terminateur rrnB T1 et T2.

## 2.4 Construction des mutants simples et doubles

### 2.4.1 Le principe de la technique d'échange allélique à deux étapes

Le principe de cette méthode est fondé sur un échange allélique, qui utilise la recombinaison homologe pour remplacer des gènes endogènes par des gènes tronqués ou mutés (Goldberg & Ohman, 1987; Hoang *et al.*, 1998). La particularité de cette méthode est basée sur la construction de mutants non marqués par des marqueurs de sélection tels que des gènes de résistances aux antibiotiques par exemple (Hmelo *et al.*, 2015). Avec cette méthode, les sélections positives et négatives des recombinants sont uniquement basées sur les fonctions encodées par le vecteur suicide et les protéines de la cellule hôte (Huang & Wilks, 2017). Elle nécessite généralement un vecteur suicide polyvalent capable de se répliquer chez *E. coli* tel que le plasmide pEX18Ap (Quandt & Hynes, 1993). Pour cette méthode les séquences en amont et en aval du gène(s) à muter sont amplifiées par PCR, fusionnées et clonées dans le vecteur. Ces séquences clonées dans le plasmide serviront à remplacer l'allèle à muter dans le chromosome bactérien. Le vecteur pEX18Ap utilisé est un plasmide conjugatif

et est capable de se répliquer chez *E. coli* grâce à son origine ColE. Le processus de la construction des mutants avec cette méthode se fait en deux étapes (Hmelo *et al.*, 2015) :

- ❖ Première étape (étape de la première recombinaison homologue) : à la suite d'une conjugaison entre la souche receveuse et une souche donneuse contenant le plasmide portant la mutation, ce dernier va s'intégrer dans le chromosome de la receveuse par une réaction de recombinaison homologue. Ce premier événement de la recombinaison est un événement fréquent. Les souches ayant intégrées le plasmide, appelées mérodiploïdes, seront sélectionnées grâce au marqueur de résistance aux antibiotiques codé par le plasmide (Figure 2.2A).
- ❖ Deuxième étape, (étape de la deuxième recombinaison homologue) : les mérodiploïdes subiront un remaniement chromosomique en présence de saccharose. En présence de saccharose, l'expression du gène *sacB*, porté par le plasmide, est létale pour les mérodiploïdes. Afin de survivre à la pression du milieu en présence de saccharose, les bactéries vont être forcées d'éliminer le plasmide en opérant une deuxième recombinaison homologue. Les colonies ayant perdu le squelette plasmidique, auront deux phénotypes possibles : ceux ayant retrouvé l'état WT et les mutants ayant gardé le gène mutant à la place du gène sauvage (Figure 2.2-B).

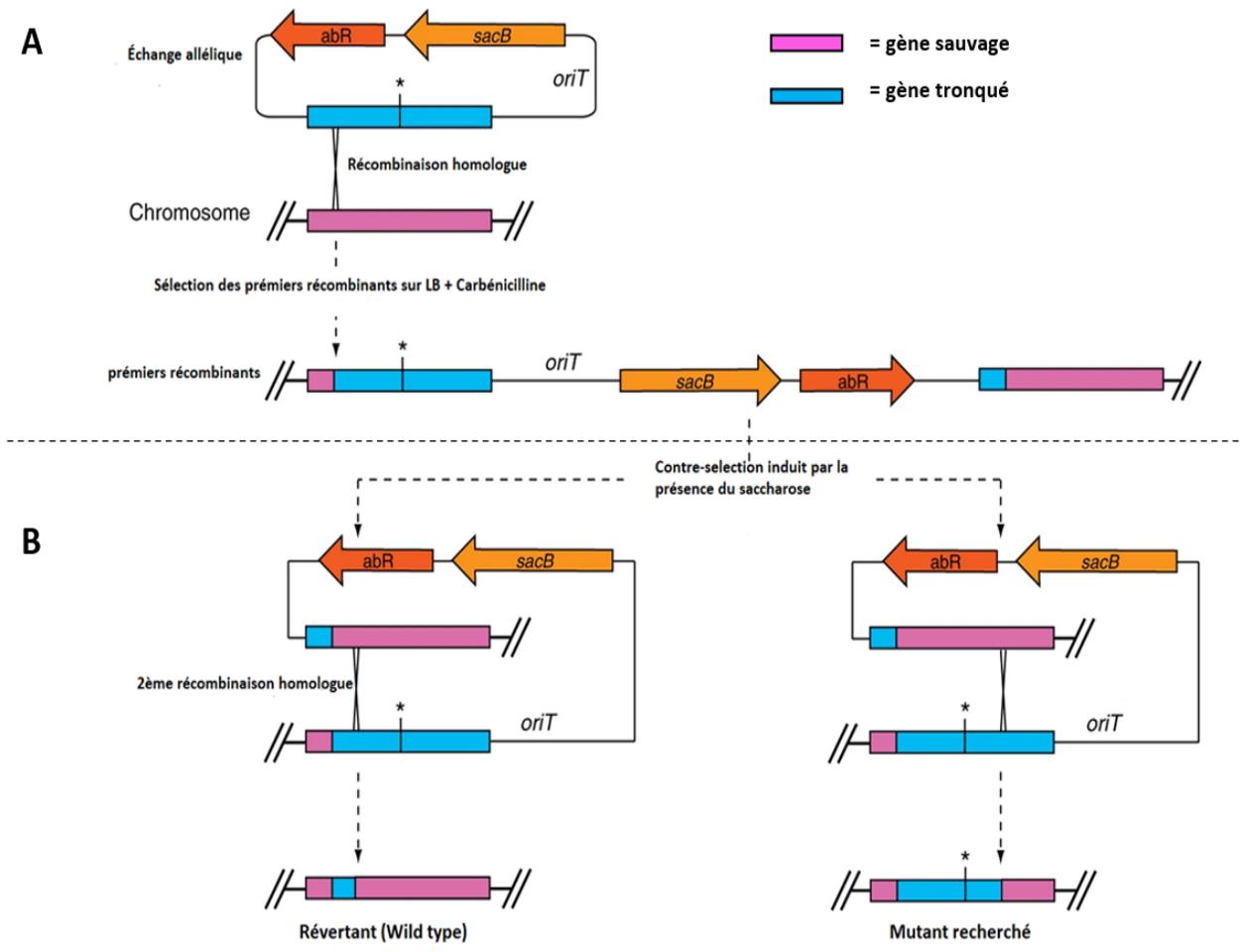


Figure 2.2 : Illustration de l'échange allélique en deux étapes

La figurée a été adaptée de (Hmelo et al., 2015).

## 2.4.2 Le choix de la méthode d'échange allélique à deux étapes

Cette technique permet la construction de souches complexes avec plusieurs mutations dirigées sans l'introduction d'un marqueur de résistance aux antibiotiques, car l'utilisation de ce dernier pourrait amplifier l'apparition des bactéries résistantes (Johnston & Cannon, 1999; Ried & Collmer, 1987). L'échange allélique évite également la création des mutants polaires, car le cadre de lecture est pris en considération lors de la délétion. L'échange allélique évite également la création des mutants polaires, car le cadre de lecture est pris en considération lors de la délétion.

## 2.5 Délétion des gènes *tamA* et *tamAB*

### 2.5.1 Construction des allèles muté du gène *tamA* et *tamAB*

Pour obtenir l'allèle muté du gène *tamA*, une séquence de 222 nucléotides située en amont, donc correspondant au fragment 5' du gène a été amplifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces PA14\_ *tamA*\_UPSOE\_For\_BamHI et PA14\_ *tamA*\_UpSOE\_Rev (Tableau 2-2). Une autre amplification de 249 pb de la séquence en aval, correspondant au fragment 3', du gène *tamA* dans *P. aeruginosa* PA14 a été réalisée par PCR avec es amorces PA14\_ *tamA*\_downSOE\_For et PA14\_ *tamA*\_downSOE\_Rev\_KpnI. La polymérase FastPfu Fly® (Transgen) a été utilisée pour la plupart des réactions PCR (hormis celles de vérification des constructions dont la Easytaq a été utilisée). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µL en suivant le protocole du fournisseur. Le mélange contenait 32 µL d'eau, 10 µL (5×) de tampon de réaction Trans5×, 2 µL d'ADN, 1 µL (2,5 mM) de dNTP, 2,5 µL de DMSO (99,8%), 1 µL (10 µM) de chaque amorce et 0,5 µL (250 U) d'enzyme.

L'amplification par PCR a été réalisée à l'aide du thermocycleur (Thermal Cycler C1000 Touch BIO-RAD) et selon les étapes suivantes: l'étape initiale de dénaturation de l'ADN se fait à 95°C pendant 2 min, puis 30 cycles ont été réalisés, chacun se composant d'une dénaturation initiale à 95 °C durant 20 s, suivie d'une hybridation de 20 s à la température spécifique au couple d'amorces, une élongation à 72 °C dont la durée dépendait de la séquence à amplifier (15 s pour ce cas) et enfin une élongation à 72 °C pendant 5 min. Les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1% contaminant Gel Stain (Transgen) et leur migration visualisée sous UV. Les températures d'hybridation pour les réactions de PCR ont été estimées à l'aide du calculateur NEB™ (<https://tmcalculator.neb.com>).

### 2.5.2 Extraction et purification des fragments UP et down du gène *tamA*

Les produits d'intérêt de la PCR ont été prélevés sur le gel d'agarose à 1% après migration, puis purifiés à l'aide de la trousse « FavorPrep Gel Extraction Mini Kit » de Favorgen en suivant les instructions du fournisseur (figure 2.3). Les fragments ont été dilués dans 40 µl d'eau milli-Q et les concentrations finales des fragments purifiés ont été déterminées en mesurant l'absorbance à 260 nm et 280 nm, complété par l'estimation de la concentration avec l'intensité de la bande sur gel d'agarose. Les deux fragments purifiés ont ensuite été mélangés afin de permettre l'hybridation des séquences homologues pour obtenir un seul fragment de

471 bp. Pour l'hybridation de ces deux séquences, la technique de « Splicing by Overlap Extension » dite aussi PCR-SOE a été choisie.

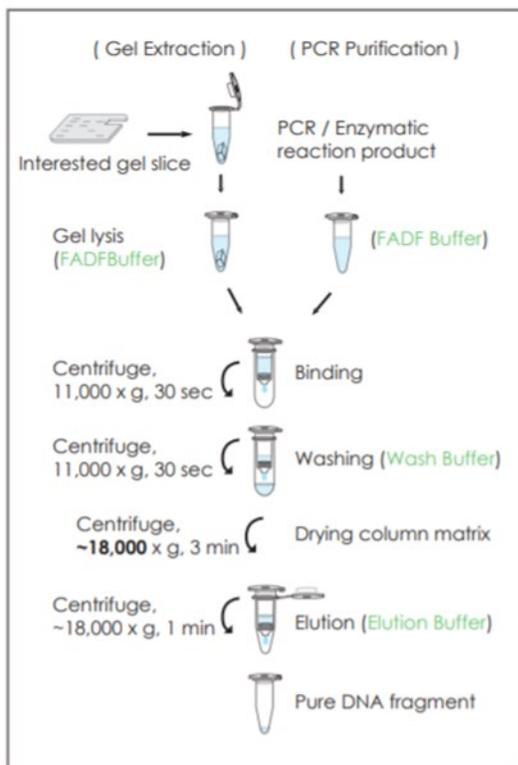


Figure 2.3 : Protocole de purification ou extraction sur gel des produits PCR avec « FavorPrep Gel Extraction Mini Kit »

### 2.5.3 Fusion des deux allèles par extension par chevauchement ou « PCR-SOEing »

Le principe de cette approche est de fusionner deux fragments d'ADN provenant d'une même matrice, en utilisant des séquences complémentaires et sans avoir recours à des enzymes de restriction. Pour cela, on utilise deux amorces de 20 nucléotides chacune (Horton *et al.*, 2013). Ces séquences de 20 nucléotides constituent une complémentarité commune inverse entre les deux fragments et vont permettre par chevauchement aux deux fragments de s'hybrider l'un à l'autre, formant ainsi une seule séquence recombinante (Figure 2.4).

Pour la ligation, les fragment-UP*tamA* et fragment-down*tamA* ont été combinés en quantité égale (2  $\mu$ L de 100 ng de chaque fragment) dans un tube contenant 35  $\mu$ L d'eau. Ensuite, le mélange a été soumis à une dénaturation à 95°C pendant 5 min, avant d'ajouter 5  $\mu$ L (5 $\times$ ) tampon transStart 5 $\times$  et 5 % de DMSO au produit de la dénaturation. Le mélange a été

soumis à une réaction d'hybridation de 30 min à 56 °C. Une fois la réaction terminée, 1 µL (250 U) de la polymérase transStart fastPfu fly et 1 µL (2.5 mM) de dNTP ont été ajoutés au tube pour une réaction d'élongation de 15 s à 72 °C. Cette étape a été suivie par une étape de PCR standard : pour cela 1 µL de l'amorce PA14\_tamA\_UpSOE\_Rev et 1 µL de l'amorce PA14\_tamA\_downSOE\_For (Tableau 2-2) ont été ajoutés au mélange. L'amplification par PCR a été réalisée à l'aide du thermocycleur (Thermal Cycler C1000 Touch BIO-RAD) selon les étapes suivantes : Une étape initiale de dénaturation de l'ADN s'est faite à 95 °C pendant 2min. Suivie de 30 cycles se composant d'une dénaturation à 95°C durant 20 s, suivie d'une hybridation de 20 s à 56 °C, et d'une élongation à 72 °C dont la durée dépendait de la séquence à amplifier (15 s pour ce cas) et enfin une élongation à 72 °C pendant 5 min. Pour confirmer que la ligation des deux fragments d'ADN a été effective, les produits PCR ont été migrés sur un gel d'agarose à 1% contenant du Gel Stain (Transgen). Les fragments ont été purifiés à partir du gel d'agarose selon la procédure décrite sur la figure 2.3. Les fragments recombinants obtenus pour le gène muté *tamA* (471 pb) et le gène *tamAB* (594 pb), ainsi que le vecteur pEX18Ap ont été envoyés à la compagnie Biotech.

#### Création d'un allèle raccourci du gène *tamAB* de *P. aeruginosa*

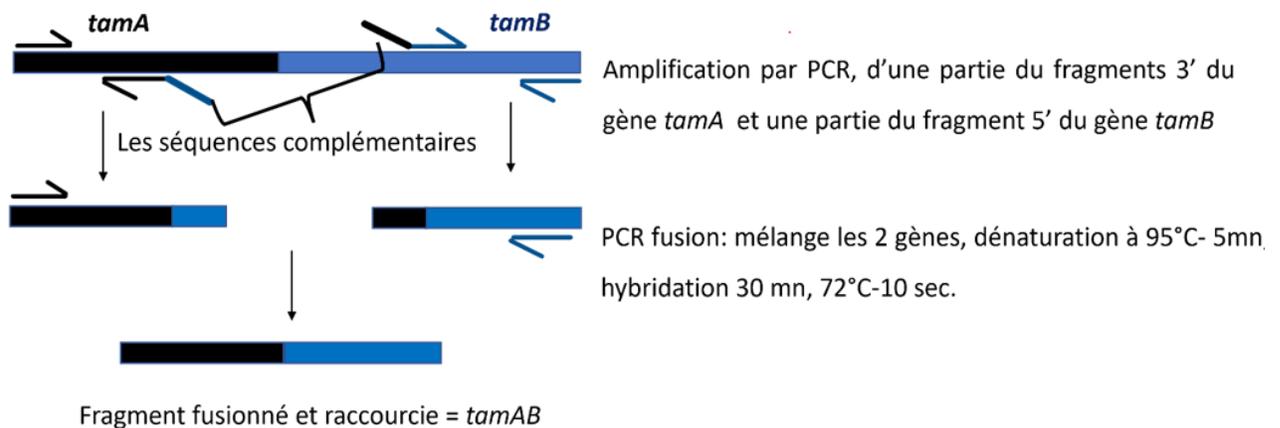


Figure 2.4 : Illustration de la construction des fragments de délétions par la <<PCR-SOEing>>

Tableau 2-2 : Amorces utilisées pour l'amplification et la vérification des séquences intervenant dans la construction des mutants

Amorces	Séquences 5'-3'*	Taille du produit PCR (pb)
PA14_tamA_UPSOE_For_BamHI	gcgc <b>GGATCC</b> <u>CTGCTGTGCCTGAGTACGG</u>	222
PA14_tamA_UpSOE_Rev	<b>GCGCAGCGAGGGCGGGATCGACTTGTAGTCG</b> <b>TTGGTGGCGAT</b> <u>CTTCACCTCGCTGTCGATCT</u>	
PA14_tamA_downSOE_For	<b>GCGCTCGGCTACTTCCAGGCGCAGATCGACA</b> <b>GCGAGGTGAAG</b> <u>ATCGCCACCAACGACTACAA</u>	249
PA14_tamA_downSOE_Rev_KpnI	agagc <b>GGTACC</b> <u>GAAGTCCAGCGAGTTGAAGG</u>	
PA14_tamAB_UPSOE_For_HindIII	<b>AAGCTT</b> ATGAGACTGACTCAAGGATTGTTC	300
PA14_tamAB_UpSOE_Rev	<b>CGCCGGTGCTCATCGGCCGCCCCAGCACCAG</b> <b>GTAGGACAGCG</b> <u>CACTACCTTGAGCGTGAGCTT</u>	
PA14_tamAB_downSOE_For	<b>GTGAAGGACGGCAAGCCGCCGAAGCTCACGC</b> <b>TCAAGGTAGTG</b> <u>CGCTGTCCTACCTGGTGCTG</u>	294
PA14_tamAB_downSOE_Rev_KpnI	agagc <b>GGTACC</b> <u>CGAGATAGAGGCGTTTGGTC</u>	
pUCP20_OE_tamA	cgagctc <b>AAAACCCGAATGTCAGGAG</b> cccaagctt <b>TATGGCCAGCAGGGTGATCT</b>	1849
pUCP20_OE_tamB	cggggtacc <b>TCTCCATGGGGCCAGA</b> ACT aaaactgcag <b>CGCCGCTAAAAGTGACACA</b>	

\*En gras= enzymes de restriction, gras rouge= séquences complémentaires, soulignée= séquence d'amorces et minuscules= quelques nucléotides pour l'enzyme de restriction.

## 2.5.4 Préparation des cellules compétentes d'*E. coli* DH5α et SM10

Des cellules d'*E. coli* DH5α et SM10 thermo-compétentes ont été préparées pour la construction des mutants. Ces souches ont été cultivées en milieu TSB liquide (Sigma) à 37 °C sur un tambour rotatif pendant 16 h. Ces précultures ont ensuite été diluées au 1/100 dans le milieu LB à DO<sub>600</sub> = 0,05 et incubées 37 °C sur un tambour rotatif jusqu'à atteindre une DO de

0,3. La croissance bactérienne a ensuite été arrêtée en gardant les cellules sur de la glace pendant 10 min. Ensuite, 1 mL de culture a été centrifugé pendant 5 minutes à  $10\ 000 \times g$  à 4 °C. Les culots obtenus ont été solubilisés dans 500 µL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM froid et gardés sur la glace pendant 10 min. Après ce temps, une autre étape de centrifugation à  $10\ 000 \times g$  a été effectuée, le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM froid. Les cellules ont été placées sur la glace pendant 1 h avant d'être aliquotées et conservées à -80 °C.

### **2.5.5 Transformations des cellules compétentes**

Les cellules compétentes ont été transformées par choc thermique. Les tubes contenant 50 µL des cellules ont été placés sur de la glace pendant 30 min. Ensuite 5 µL de plasmide contenant le gène tronqué à transformer a été ajouté et mélangé en tapotant le tube. Puis les cellules ont été gardées pendant 40 min sur la glace. Ensuite elles ont été placées 50 s à 42 °C, suivi d'une incubation d'1 h à 37 °C dans du milieu LB. Enfin, les cultures bactériennes ont été étalées sur des géloses contenant 50 µg/mL de carbénicilline pendant 16 h. Les colonies obtenues ont été remises en culture dans du milieu TSB contenant 50 µg/mL de carbénicilline pendant 16 h à 37 °C afin de vérifier qu'elles étaient que leur croissance n'est pas inhibée en présence de l'antibiotique et que le plasmide a bien été intégré.

### **2.5.6 Extraction des constructions pZH1 et 2**

Le plasmide portant la version mutée du gène *tamA* ou *tamAB* a été extrait des bactéries *E. coli* DH5α. L'extraction du plasmide a été effectuée à partir de cellules en phase exponentielle à l'aide d'une trousse « FavorPlasmid extraction Kit » et en suivant les recommandations du fournisseur. Des vérifications par digestion et par PCR ont été effectuées afin de confirmer les plasmides portant les séquences d'échange allélique *tamA* ou *tamAB* mutées.

### **2.5.7 Conjugaison entre *E. coli* SM10 et *P. aeruginosa* (évènement de la première recombinaison homologue)**

La souche donneuse (*E. coli* SM10) a été cultivée sur une gélose LB carbénicilline (100 µg/mL) et la receveuse (PA14) sur du gélose LB sans antibiotique. Les deux cultures ont été incubées respectivement à 37 °C et à 42 °C pendant 6 h. À l'aide d'une oese stérile, les cellules

ayant poussé sur chacune des géloses ont été récupérées, déposées sur une nouvelle gélose LB sans antibiotique puis elles ont été mélangées ensemble et incubées à 37 °C pendant 16 h. La biomasse de la gélose a ensuite été prélevée à l'aide d'un écouvillon et solubilisée dans un tube contenant 1 mL de TSB. Le mélange a été homogénéisé jusqu'à la dissolution totale de la biomasse. L'échantillon a été dilué à  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-6}$  et étalé sur une gélose de LB + 300 µg/mL de carbénicilline et 25 µg/mL de triclosan afin de contre-sélectionner la souche donneuse SM10 et sélectionner que la receveuse PA14 puis les géloses ont été incubées à 37 °C pendant 16 h.

### 2.5.8 Sélection des trans-conjuguants PA14

Pour sélectionner les souches PA14 ayant intégrées le plasmide pZH1 ou pZH2, les colonies obtenues sur la gélose ont été récoltées et une PCR sur colonie a été réalisée pour un criblage rapide et direct. Une amplification du gène *tamA* sauvage et de l'allèle mutant *tamA* a été effectuée. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 µL et en suivant le protocole du fournisseur (Thermo Fisher Scientific). Le mélange contenait 9.5 µL d'eau, 2.5 µL (10×) de tampon de réaction Easy-TAQ buffer 10×, 2 µL (100 ng) d'ADN, 2.5 µL de dNTP, 1 µL (99.8%) de DMSO, 1 µL (10 µM) de chaque amorce et 0,5 µL d'enzyme Easy-Taq. Le couple d'amorce PA14\_UptamA\_For et PA14\_DowntamA\_Rev a été utilisé pour l'amplification (Tableau 2-2). Les cycles d'amplifications sont les mêmes que ceux décrits dans la partie 2.6.2.

### 2.5.9 Evènements de la deuxième recombinaison homologue

L'étape finale de l'échange allélique consiste à contre-sélectionner les souches doubles recombinantes et identifier les mutants souhaités. Le principe de cette 2<sup>ème</sup> étape est d'induire l'excision du plasmide du génome bactérien. Pour induire l'évènement de la 2<sup>ème</sup> recombinaison, les premiers recombinants ont été cultivés à 37°C pendant 16 h dans du milieu TSB supplémenté avec 300 µg/mL de carbénicilline. Le lendemain, les précultures ont été diluées en série dans du milieu LB frais ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ), puis les dilutions ont été étalées sur des géloses LB sans NaCl mais supplémenté avec 15% de saccharose et incubées à 30°C pendant 16 h. Les colonies qui ont poussé sur les géloses au saccharose ont été criblées pour la mutation souhaitée par repiquage sur des nouvelles géloses (voir partie 2.5.10) et par PCR (voir partie 2.5.11).

### 2.5.10 Sélections des mutants sur gélose

Chaque colonie a été repiquée sur une gélose LB sans antibiotique et sur une gélose contenant 300 µg/mL de carbénicilline à l'aide d'un cône stérile. Les clones qui ont poussé exclusivement sur les géloses sans antibiotique ont été sélectionnés puisque considérés comme ayant acquis la mutation ou ayant reverté à l'état sauvage. En effet, les mutants d'intérêt doivent être sensibles à la carbénicilline mais résistants au saccharose.

### 2.5.11 Confirmation des mutants par PCR

Les clones choisis ont été inoculés dans du LB liquide et pour une confirmation supplémentaire dans du LB avec carbénicilline et incubés. L'ADN génomique de chaque clone a été extrait selon la procédure suivante : un volume de 500 µL de culture bactérienne a été déposé dans un tube eppendorf de 1,5 mL ; ensuite la culture a été culottée par centrifugation pendant 3 min à 14 000 × *g*. Le culot bactérien a été suspendu dans 250 µL de PBS 1×, chauffé pendant 10 min à 100 °C puis refroidi sur de la glace pendant 10 min. Le mélange a ensuite été centrifugé à 14 000 × *g* pendant 3 min et 1 µL de surnageant a été utilisé pour un mix PCR de 20 µL de volume final. La confirmation par PCR a été réalisée en utilisant PA14\_UptamA\_For et PA14\_DowntamA\_Rev (Tableau 2-2). Les clones présentant un amplicon de la taille attendue pour les allèles mutants *tamA* ou *tamAB* et l'absence d'amplification à la taille attendue pour les allèles sauvages ont été sélectionnés.

## 2.6 Courbes de croissance des bactéries dans les milieux TSB et LB

Des tests de croissance ont été réalisés dans les milieux de routine LB et TSB, afin de comparer la dynamique de croissance des mutants des gènes du complexe TAM par rapport à la souche PA14 WT. Les précultures bactériennes des souches PA14 WT, PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  ont été réalisées dans le milieu TSB, incubées pendant 16 h à 37 °C sur un tambour rotatif TC-7 (New Brunswick, Canada). Les précultures ont ensuite été diluées à 1:100 dans les milieux TSB et LB frais. Trois cents µL de cultures de  $DO_{600} = 0,05$  ont été déposés dans les puits d'une plaque *Honeycomb* Bioscreen (Oy Growth Curves Ltd, Finlande) à 100 puits. Des contrôles négatifs ont également été déposés dans six puits de la plaque, il s'agit du milieu de culture LB ou TSB non inoculé. Les plaques ont été incubées à 37 °C dans le Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ltd, Finlande) pendant 24 ou 48 h. La  $DO_{600}$  a été

mesurée automatiquement toutes les heures avec une agitation précédant chaque prise de DO. Les expériences ont été répétées indépendamment trois fois afin de confirmer les résultats.

## **2.7 Comparaison morphologique des bactéries par la microscopie électronique à transmission**

Des précultures de 16 h de la souche PA14 WT et de la souche mutante *tamB*<sup>-</sup> ont été préparées du milieu TSB à 37°C avec agitation. Le lendemain, les précultures ont été remises en culture dans le milieu TSB, à 37°C avec agitation pendant 3 h (correspond à la phase exponentielle). Ces cultures fraîches ont été envoyées à la plateforme de la spectrométrie de l'INRS pour l'observation microscopique sur des cellules en phase exponentielle. La fixation des cultures sur les grilles et la coloration ont été effectuées par le technicien chargé de la plateforme.

## **2.8 Test de formation de biofilm**

### **2.8.1 Test en plaques de polystyrène à 96 puits**

Dans le but de déterminer les phénotypes impactés par la mutation du complexe TAM chez *P. aeruginosa*, la capacité de nos mutants du gène *tamA* et de l'opéron *tamAB* à former des biofilms a été testé. Sachant que chez *P. aeruginosa*, le biofilm contribue de manière essentielle à sa survie et c'est également le trait majeur de sa virulence.

Le test de formation de biofilm a été réalisé comme décrit (O'Toole & Kolter, 1998a). Pour la réalisation de ce test, les souches PA14 WT, PA14  $\Delta$ *tamA* et PA14  $\Delta$ *tamAB* ont été ensemencées dans des tubes en verre contenant 5 mL de TSB et incubées pendant 16 h à 37 °C sous agitation. Ces précultures ont ensuite été diluées dans du LB frais afin d'obtenir une même DO<sub>600</sub> de 0,05. Puis, 300 µL de chaque culture bactérienne diluée a été déposée dans une plaque de polystyrène stérile à 96 puits (Costar® 3599, Corning, NY, USA). Pour chaque souche, au moins cinq replicats (cinq puits/plaques) ont été réalisées à chaque expérience. Un total de six puits contenant uniquement les milieux a été utilisé comme un contrôle négatif. Les plaques ont été enrobées avec du papier Parafilm afin de réduire l'évaporation de l'eau et incubées à 37 °C sans agitation pendant 24 et 48 h. Les expériences ont été reprises 3 fois à des différents jours.

Une fois le temps d'incubation voulu atteint, les plaques ont été vidées et lavées par immersion dans l'eau, permettant d'éliminer les cellules non accrochées à la paroi de la plaque, c'est à dire non inclus dans le biofilm. L'excès d'eau a été éliminé en renversant les plaques sur une feuille de papier. La biomasse restante a ensuite été colorée au crystal violet (CV) selon la méthode décrite dans (Au - O'Toole, 2011). 200  $\mu$ L de CV 0,1 % a été ajouté à chaque puits et incubé pendant 20 min à température ambiante. La solution du CV a ensuite été jetée et les puits ont été lavés trois fois par immersion de l'eau milli-Q afin d'éliminer le surplus de CV. Les plaques ont ensuite été séchées à température ambiante. Pour lire l'absorbance du CV, 200  $\mu$ L d'une solution à 30 % d'acide acétique a été ajoutée à chaque puit pour dissoudre le CV et l'absorbance a été mesurée avec un lecteur de plaques multimodes (Tecan) à la longueur d'onde de 590 nm.

### **2.8.2 Test dans des tubes en polystyrènes**

Le principe de cette méthode reste le même que celui du test en plaque de polystyrène à 96 puits. La technique a été adaptée du protocole décrit (O'Toole & Kolter, 1998b). Le but de cette expérience était d'observer la formation de biofilm. La seule différence avec la méthode précédente est l'utilisation des tubes de polystyrène avec un volume final de 3 mL, à la place d'une plaque de 96 puits où le volume final était de 200  $\mu$ L. Ainsi, des précultures ont été cultivées dans 5 mL de TSB pendant 16 h à 37 °C. Les tubes en polystyrène (Ultident Scientific Inc) de 5 mL ont étéensemencés avec 3 mL de suspension bactérienne à  $DO_{600} = 0,05$  dans le milieu LB. Les cultures ont été incubées à 37 °C en conditions statiques pendant 24 h. Pour chaque souche bactérienne, trois réplicats techniques ont été réalisés. Après l'incubation, le tube a été vidé et vigoureusement rincé avec de l'eau milli-Q pour éliminer la biomasse non adhérente aux parois du tube. Trois mL de CV à 0,1% à température ambiante ont été ajoutés. Après 10 min d'incubation, le tube a été rincé à nouveau avec de l'eau milli-Q pour éliminer tout le CV non fixé aux cellules. L'anneau coloré résiduel sur les parois du tube, correspondant au biofilm formé, a ensuite été photographié.

### **2.8.3 Test de *swimming***

Pour réaliser le test de *swimming*, des milieux semi solides ont été préparés. Ces milieux se composent de : 0,02 M de  $NH_4Cl$ , 0,012 M de  $Na_2HPO_4$ , 0,022 M de  $KH_2PO_4$ , 0,0086 M de  $NaCl$ , et 0,3 % d'agar. Après le cycle d'autoclave, le milieu a été refroidi et les produits suivants ont été ajoutés : 0,001 M de  $MgSO_4$ , de 0,001 M de  $CaCl_2$  et 0,011M de dextrose.

Dans chaque boîte de pétri, 10 mL de ce milieu ont été coulés et les géloses ont été séchées 15 min sous l'enceinte biologique.

Des précultures des souches à tester ont été incubées pendant 16 h à 37°C puis diluées dans 5 mL de milieu TSB pour avoir une  $DO_{600}$  de 0,05. Ces cultures ont ensuite été incubées à 37°C jusqu'à atteindre la phase exponentielle ( $DO_{600} = 1,5$ ). Ensuite, à l'aide d'une pipette 2,5  $\mu$ L de chaque culture a été inoculée dans les géloses précédemment préparées et le tout a été incubé à 25°C pendant 16 h. La capacité de motilité a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone circulaire trouble formée par les cellules bactériennes migrant à partir du point d'inoculation. Le mutant PA14 *fliC*- (mutant dans la synthèse flagellaire, donc incapable de faire du *swimming*) a été utilisé comme contrôle négatif.

#### **2.8.4 Test de *swarming***

Le test de *swarming* a été réalisé en utilisant le même milieu que pour les tests de *swimming* (partie 2.8.3). À la différence du milieu pour le *swimming*, 0,5% d'agar a été ajouté au milieu *swarming*. Après le cycle d'autoclave, le milieu a été refroidi sous l'enceinte biologique et les produits suivants ont été ajoutés : 0,001 M de  $MgSO_4$ , de 0,001 M de  $CaCl_2$  et 0,011 M de dextrose. Puis 20 mL de ce milieu ont été coulés dans chaque boîte de pétri et les géloses ont été séchées dans une enceinte de sécurité biologique pendant 75 min. Sur chaque gélose de *swarming* 5  $\mu$ L de chaque culture bactérienne cultivée dans du TSB jusqu'à l'obtention de la phase stationnaire et ajustée à une  $OD_{600}$  de 3,0, ont été inoculées. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 16 h à 34 °C. Le mutant PA14 *fliC*- (mutant dans la synthèse flagellaire, donc incapable de faire du *swimming*) a été utilisé comme contrôle négatif.

#### **2.8.5 Test d'apparition de SCV**

Le test d'apparition de SCV a été réalisé dans les mêmes conditions que celui de la formation de biofilm. Cette méthode a consisté à préparer des cultures sans agitation dans des plaques de polystyrène stériles à 96 puits (Costar® 3599, Corning, NY, USA) (Ueda & Wood, 2009). Des précultures des souches PA14 WT, PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  ont été ensemencées à partir de stock congelé dans des tubes en verre contenant 5 mL de TSB et incubées pendant 16 h à 37°C sous agitation. Ensuite, les précultures ont été diluées dans du TSB frais afin d'obtenir une  $DO_{600}$  de 0,05. Puis, 200  $\mu$ L de chaque culture bactérienne diluée ont été déposés dans la plaque de polystyrène à 96 puits. Trois répliques techniques ont été

préparés pour chacune des souches et les expériences ont été réalisées à deux reprises indépendamment. Un total d'au moins trois puits contenant uniquement les milieux a été utilisé comme contrôle comme contrôle négatif. Les plaques ont été enrobées avec du papier parafilm afin de réduire l'évaporation de l'eau et incubées à 37°C sans agitation pendant 48 h. A J+2, les cultures ont été prélevées et diluées jusqu'à 10<sup>-8</sup> dans du TSB, puis 50 µL de chaque dilution a été étalée sur une gélose TSA -2% d'agar. Les géloses ont été incubées à 30°C pendant 48h. Toutes les colonies de petite taille présentant un phénotype SCV, ont été comptées puis les pourcentages ont été calculées en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ SCV} = \text{nombre de colonies SCV} \times 100 / \text{Total colonies sur la gélose (scv + Lcv)}$$

## **2.9 Test de sensibilité aux antibiotiques**

### **2.9.1 Test de sensibilité aux antibiotiques en milieu liquide**

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés afin d'examiner le rôle possible du complexe TAM dans la résistance aux antibiotiques. À partir des précultures, les souches bactériennes ont été cultivées en triplicats dans du milieu TSB pendant 4 à 5 h jusqu'à atteindre la phase exponentielle. À DO<sub>600</sub> = 1, les cellules ont été centrifugées (10000 x g pendant 3 min) et le culot solubilisé en suspension dans du tampon phosphate salin (PBS) pour éliminer le milieu TSB résiduel. Après le lavage, la DO<sub>600</sub> des suspensions bactériennes a été ajustée à 0,01 dans le milieu MH auquel 50 µg/mL de spectinomycine ou 0,5 µg/mL de tobramycine ont été ajoutées. Un volume de 300 µL de chaque culture a ensuite été déposé dans les plaques 100 puits en polystyrène (*Honeycomb*). Pour chaque souche, 6 puits ont été utilisés. Les milieux sans bactérie ont servi de contrôles négatifs et les contrôles positifs ont été des cultures dans du MH sans antibiotique. Les plaques ont été incubées à 37 °C dans le Bioscreen C MBR pendant 24 à 48 h. La croissance bactérienne a été mesurée par une prise de DO automatiquement toutes les heures d'incubation.

### **2.9.2 Test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur disque**

À partir des précultures de 16 h, les souches bactériennes ont étéensemencées sur les milieux gélosés LB à l'aide d'un écouvillon stérile. Après 5 minutes, un disque de papier Whatman imbibé de 10 µL de solution à étudier a été déposé au centre de la géloseensemencée. La concentration finale de la spectinomycine, néomycine et streptomycine a été

de 50 mg/mL. Un disque ne contenant aucun antibiotique avait été déposé sur les géloses GCB, servant ainsi de contrôle négatif. Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les diamètres d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle (en millimètre).

## **2.10 Test de virulence chez le modèle de *Drosophila melanogaster* : infection par ingestion**

Les infections de *D. melanogaster* par ingestion des bactéries ont été réalisées comme décrit précédemment (Apidianakis & Rahme, 2009). Ce test imite l'infection intestinale en permettant aux bactéries ingérées de coloniser l'intestin des mouches (Blow *et al.*, 2005) et de provoquer une morbidité généralement après 2 à 15 jours d'incubation.

Quelques modifications ont été apportées au protocole original. L'élevage des mouches *Drosophila* a été effectué dans un milieu nutritif conventionnel composé de : 10 g/L d'agar, 12 g/L de saccharose, 30 g/L de levure sèche inactive, 44 g/L de semoule de maïs, 3,78 g/L d'acide propionique et 2 % de Tegosept (à partir d'un stock 20% préparé dans de l'éthanol). Elles ont été entretenues jusqu'à l'infection dans un environnement à température, humidité et lumière contrôlées. Des précultures ont été inoculées avec le stock congelé de la souche mutante PA14  $\Delta tamAB$  et de PA14 WT dans des tubes en verre contenant 6 mL de milieu TSB et incubées pendant 16 h à 37°C sous agitation. Chaque souche a été cultivée en triplicat, ainsi 3 cultures différentes ont été préparées à partir des précultures et incubées jusqu'à  $DO_{600} = 4$ . Une fois les DO voulues atteintes, les cellules ont été lavées 3 fois par centrifugation (2 min à 7500 x g) et les culots bactériens ont été solubilisés dans 100  $\mu$ L d'une solution de saccharose à 5%. Des vials contenant 5 mL de saccharose à 5 % et 1,5 % d'agar ont été préparés dans des conditions stériles sous l'enceinte de sécurité biologique (ESB). Une fois les milieux dans les vials solidifiés, des disques de papier filtre Whatman (2,3 cm de diamètre) ont été déposés à l'aide d'une pince stérile sur leurs surfaces. Ensuite, les 100  $\mu$ L des suspensions bactériennes ont été déposés sur les papiers Whatman. Les vials ont été séchés sous la hotte biologie afin d'éliminer l'excès du liquide. Trois vials ont été utilisés pour chaque souche et 3 vials contenant uniquement une solution de saccharose ont servi de contrôles négatifs.

En parallèle, les mouches ont été transférées dans un contenant de bouffe vide afin de les affamer pendant au moins 5 h. Un total de 10 mouches mâles adultes de 7 jours a été déposé après anesthésies avec CO<sub>2</sub> dans chacun des vials. Les mouches mâles ont été utilisées en raison de l'absence de fertilisation, chose qui impacte la physiologie et l'immunité des drosophiles. Les flacons ont été fermés avec des bouchons de celluloses et incubés à

température ambiante et dans un bac couvert de papier aluminium. Le nombre de mouches vivantes à la suite de l'infection a été compté à chaque jour après que les mouches ont été introduites dans les vials contenant les suspensions bactériennes.

## **2.11 Méthode d'analyses statistiques**

Les analyses statiques des données obtenues au cours de ce projet ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8. La plupart des données ont été calculés par le test Mann-Whitney non paramétrique. Mais, les détails des tests statistiques et la taille des échantillons sont fournis dans les résultats et les légendes des figures.

## **2.12 Préparation des échantillons pour l'analyse protéomique**

### **2.12.1 Extractions des protéines membranaires (interne et externe)**

Le protocole d'extraction des protéines membranaires a été adapté d'un protocole standard (Hancock & Carey, 1979).

Pour extraire les protéines à la fois de la membrane interne et externe, des précultures de la souche PA14  $\Delta tamAB$  et PA14 WT ont été cultivées pendant 16 h d'incubation sous agitation à 37°C. Les cellules ont été lavées dans du PBS (protocole décrit dans la partie 2.10) et diluées dans 500 mL milieu MH plus 50 µg/mL de la spectinomycine afin d'avoir une  $DO_{600}$  égale à 0,1. Ces suspensions bactériennes ont été incubées à 37°C avec agitation sur un tambour rotatif jusqu'à l'entrée de la phase exponentielle ( $DO_{600} = 1$ ). Une fois les  $DO$  voulues atteintes, les cultures ont été centrifugées à 16 800 ×  $g$  (Beckman) pendant 25 min à 4°C. Les surnageants ont été délicatement et complètement éliminés. Les culots bactériens ont été suspendus dans 5 mL d'une solution à pH 8.0 contenant 20 mM de Tris, 200 mM de NaCl, 50 µg/mL de DNase, 250 µL (1 mg/mL) de  $MgCl_2$  et 1 mg/mL de lysozyme. Les suspensions ont été incubées sur de la glace pendant 15 min. Par la suite, les échantillons ont été mélangés sur des plaques agitatrices pendant 30 min dans une chambre froide à 4°C et 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) a été ajouté à chacun des échantillons avant la lyse cellulaire. Le PMSF permet de protéger les protéines d'une dénaturation par les protéases. À l'aide d'un sonicateur, les cellules gardées sur de la glace ont été brisées à deux reprises à un pulse de 50 % pendant 5 min (le temps a été partagé afin d'éviter de surchauffer les cellules). Après la lyse, les cellules brisées sont placées sur de la glace afin de limiter l'action des protéases. Puis les échantillons ont été centrifugés à 10 000 ×  $g$  pendant 15 min à 4 °C afin de

séparer les cellules non lysées (qui tomberont au fond des tubes) des membranes et des protéines. À la fin de la centrifugation, les surnageants ont été éliminés doucement en prenant soin de ne pas recueillir le culot. Puis, à l'aide d'une ultracentrifugeuse, les surnageants ont été centrifugés à 40 000 x g pendant 1 h afin de séparer les membranes bactériennes (culot) des protéines périplasmiques (fraction soluble). Les culots ont été transférés dans un potter, écrasés afin de détruire les membranes pour libérer les protéines insérées dans ces dernières. Ensuite, ils ont été remis en suspension dans la solution d'extraction protéique composée de 20 mM de Tris-NaCl à pH 8,0, 200 mM NaCl et 0,015% de détergent N-Dodecyl-beta-Maltoside (DDM). Les échantillons ont été mélangés par agitation pendant 1 h à 4 °C. Pour éliminer les débris restant des membranes, une dernière étape d'ultracentrifugation à 40 000 × g pendant une heure à 4 °C a été effectuée. Les surnageants, contenant les protéines de la ME et MI, ont été délicatement récupérés et conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

### **2.12.2 Dosage protéique Bradford**

Le dosage protéique par la méthode de Bradford a été utilisé pour déterminer la concentration en protéine des échantillons (Bradford, 1976). La méthode a consisté à préparer une courbe standard avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 0 ; 1,2 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 µg pour un volume final de 1000 µL (New England Biolabs) à partir du stock mère en suspension dans du Tris-HCl à 10 µg/mL en suivant le tableau (Tableau 2-3). La courbe standard a été préparé comme suit :

À partir d'un stock concentré de BSA (20 mg/mL) faire une dilution pour avoir 1 mg/mL, Ensuite diluer 1/10 pour avoir 100 µg/mL.

**Tableau 2-3 : Courbe standard à partir de BSA pour le dosage protéique**

Différentes concentrations de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{L}$ (BSA 100 $\mu\text{L/mL}$ )	$\mu\text{L}$ (0,1 Tris-HCL)
0	0	1000
1,2	12	988
2,5	25	975
5	50	950
7,5	75	925
10	100	900

Les culots bactériens des échantillons à doser ont été suspendus dans 1 mL (0,1N) de Tris-HCL, puis chauffés pendant 1 h à 70°C sur un bloc chauffant. Les échantillons ont été mélangés toutes les 30 min à l'aide d'un vortex pour une bonne homogénéisation. Chaque échantillon a ensuite été dilué dans 1 mL (0,1N) de Tris-HCL selon un facteur 1 :100. Dans une plaque de 96 puits, 3 réplicats de 160  $\mu\text{L}$  ont été déposés dans la plaque pour chacune des dilutions de la courbe standard ainsi que les échantillons dilués au 1 : 100. Ensuite, 40  $\mu\text{L}$  de réactif de Bradford a été ajouté dans chaque puits et les deux solutions ont été mélangées par des aspirations/refoulements tout en éliminant les bulles d'air. Après 5 min d'incubation à température ambiante, les  $\text{DO}_{595}$  ont été mesurées avec le lecteur de plaques multimode Cytation. Les concentrations protéiques des échantillons ont été déterminées à partir de la courbe standard, en utilisant le logiciel GraphPad Prism.

### **2.12.3 La digestion trypsique**

Pour l'analyse LC-MS/MS quantitative, trois réplicas biologiques par souche à 1 mg/ml ont été utilisés. Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon a été déposé dans un tube, correspondant à une quantité de 200  $\mu\text{g}$  de protéines. Puis, 400  $\mu\text{L}$  du tampon d'ammonium bicarbonate à une concentration de 100 mM (pH 8-8.5) ont été ajoutés aux échantillons ainsi que 20  $\mu\text{L}$  de dithreitol (DTT) à 100 mM pour cliver les ponts disulfures. Les mélanges ont été incubés pendant 15 min à 37 °C puis centrifugés à 600 rpm pendant 2 mn et la concentration finale de protéines est de 3.2 mM finale. Après le clivage, 30  $\mu\text{L}$  d'iodoacetamide à 100 mM ont

été ajoutés afin de protéger les cystéines libres, portant la concentration finale de protéine à 4.6mM. Le mélange a été incubé pendant 30 min à 37 °C dans l'obscurité. Les échantillons ont été digérés par 10 µL de trypsine à 1 mg/ml (pancréas bovin de chez Sigma) dans de l'acide acétique 50 mM et dans un ratio 1/20 enzyme/protéine. Les échantillons ont été incubés pendant 4 h à 37 °C dans un thermomixer. Après l'incubation, un volume de 350 µL d'H<sub>2</sub>O a été ajouté à chaque échantillon pour avoir un volume final de 1 mL.

#### **2.12.4 Extraction sur surface solide : SPE (Waters Oasis HLB)**

Cette étape permet d'éliminer tous les sels utilisés, les protéines non digérées par la trypsine et également de réduire le volume final des échantillons en les concentrant. Les peptides tryptiques ont été conditionnés avec un 1 mL de méthanol (MeOH), suivi de 1 mL d'H<sub>2</sub>O nanopure. Puis, 1 mL d'échantillon a été chargé sur la colonne et enfin l'échantillon a été lavé avec un 1 ml d'H<sub>2</sub>O. Les échantillons ont été élués dans 2 x 500 µL de MeOH. Une fois les échantillons séchés (liquide des échantillons évaporés), ils ont été reconstitués avec 150 µL d'acétonitrile à 10% et 0.2% d'acide formique. Finalement, 20 µL de chaque échantillon a été injecté dans le Sciex TripleTOF5600 (SCIEX, Framingham, MA, USA) en utilisant la méthode Aeris de 47 mn.

#### **2.12.5 Méthode HPLC, MS/MS**

La séparation analytique des peptides est effectuée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) en utilisant l'appareil Shimadzu Nexera HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA). La colonne utilisée est la Phenomenex Aeris Peptide XB-C18 à une température de 40 °C. Les tampons (phase mobile) utilisés pour l'éluion sont eau/acide formique 1% (tampon A) et acétonitrile/acide formique 0,1% (tampon B). Les échantillons ont été séparés par un gradient de solvant eau/acétonitrile en 47 min ; initialement, le gradient est de (A/B) 95/5 pendant 5 min, puis de 95/5 à 70/30 pendant 40 min, puis de 70/30 à 50/50 jusqu'à 46,5 min, et de 50/50 à 10/90 jusqu'à 47 min. Puis la colonne a été rééquilibrée à (A/B) 95/5 pendant 8 min.

Les échantillons ont été analysés avec le MS/MS SCIEX TripleTOF 5600 (SCIEX, Framingham, MA, USA). L'ionisation a été réalisée en mode positif et la source était de type ESI (ionisation par electrospray). Pour l'analyse, la température était de 500°C, avec une tension du jet d'ions de 5000 V, un gaz de rideau à 35 psi et un gaz de séchage et de nébulisation à 50 psi. La tension de décalage de collision dans la cellule de collision pour

MS/MS était de 30 +/-10 V. La gamme *m/z* analysée était de 140-1250 en TOF-MS et de 80-1500 en MS/MS. Le mode d'acquisition était le mode MS/MS IDA (acquisition en fonction de l'information) avec sélection des 15 premiers ions par cycle. La durée totale du cycle d'acquisition était de 1,05 s.

### **2.12.6 Analyse Bio-informatique et statistique**

La recherche de l'identité des protéines et le séquençage des peptides a été réalisé avec la banque des protéines OneOmics Protein Pilot (<https://sciex.com/products/software/oneomics>). Puis, les données ont été transférées dans Scaffold 4.0 pour examiner les différences dans les résultats quantiques (intensité peptidique normalisée, avec test T pour trouver les différences statistiques entre WT et mutant). Les hits ont été déterminés selon les conditions suivantes :

Seuils du peptide: 95.0% minimum, Seuils du peptide: 95.0% minimum, Seuils de la protéine: 99,9% minimum et deux peptides minimums, Taux de fausses découvertes du peptide: 0,1%, Taux de fausses découvertes du peptide: 1.0%.

## 3 Résultats

---

### 3.1 Tests phénotypiques préliminaires et morphologie des mutants *tamA* et *tamB*

Pour répondre aux objectifs de ce projet, des tests phénotypiques ont été réalisés dans un premier temps avec les mutants par transposition (avec une cassette de résistance contre la gentamycine) des gènes *tamA* et *tamB*. Ces mutants transpositionnels proviennent de la banque de mutants non-redondants pour la souche PA14 de *P. aeruginosa* (Liberati et al., 2006) et sont disponibles dans la collection de souches du laboratoire du Pr Éric Deziel. Les mutants sont respectivement nommés PA14 *tamA::GmR* et PA14 *tamB::GmR* (Tableau 2–1). Les phénotypes testés sont pour la plupart liés à la colonisation ou à la virulence de *P. aeruginosa* (Al-Wrafy et al., 2017; Moradali et al., 2017)

#### 3.1.1 Suivre de la croissance en milieu TSB des mutants par transposition

La croissance de souches mutantes par transposition, PA14 *tamA::GmR* et PA14 *tamB::GmR* a été comparée à celle de la souche PA14 WT dans le milieu TSB à 37°C. La figure 3.1 montre les courbes de croissance pour les 3 souches. Les résultats montrent une dynamique de croissance similaire entre les souches PA14 WT et les souches mutantes : les trois souches croissent à la même vitesse durant les différentes phases de croissance. Ces résultats ont également été confirmés en utilisant les mutants de délétion propres.

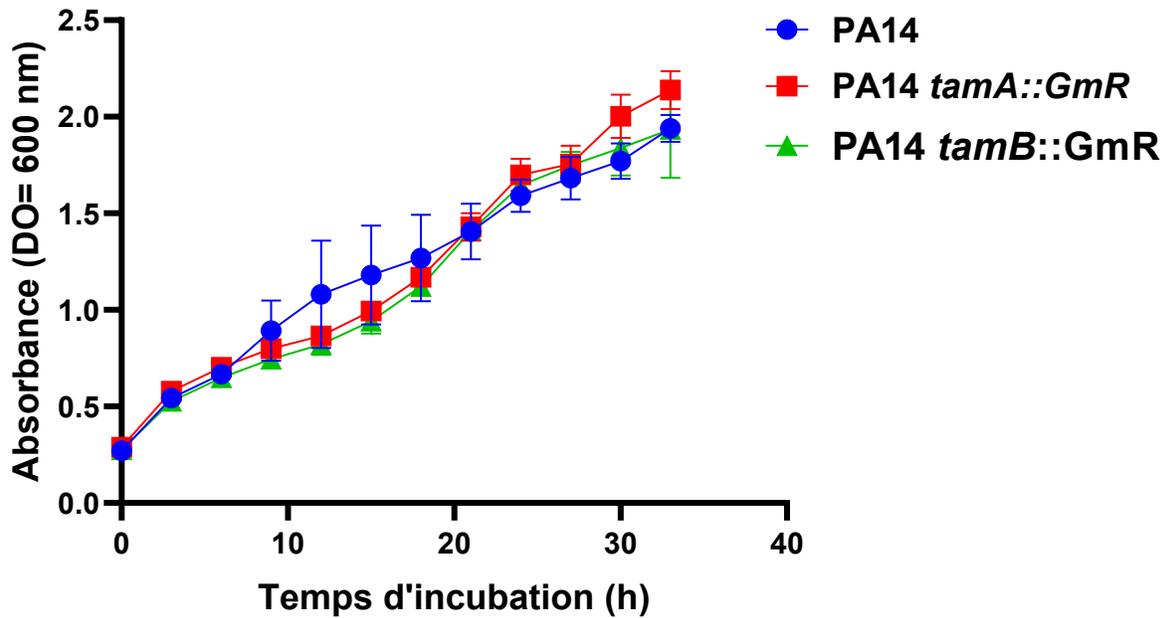
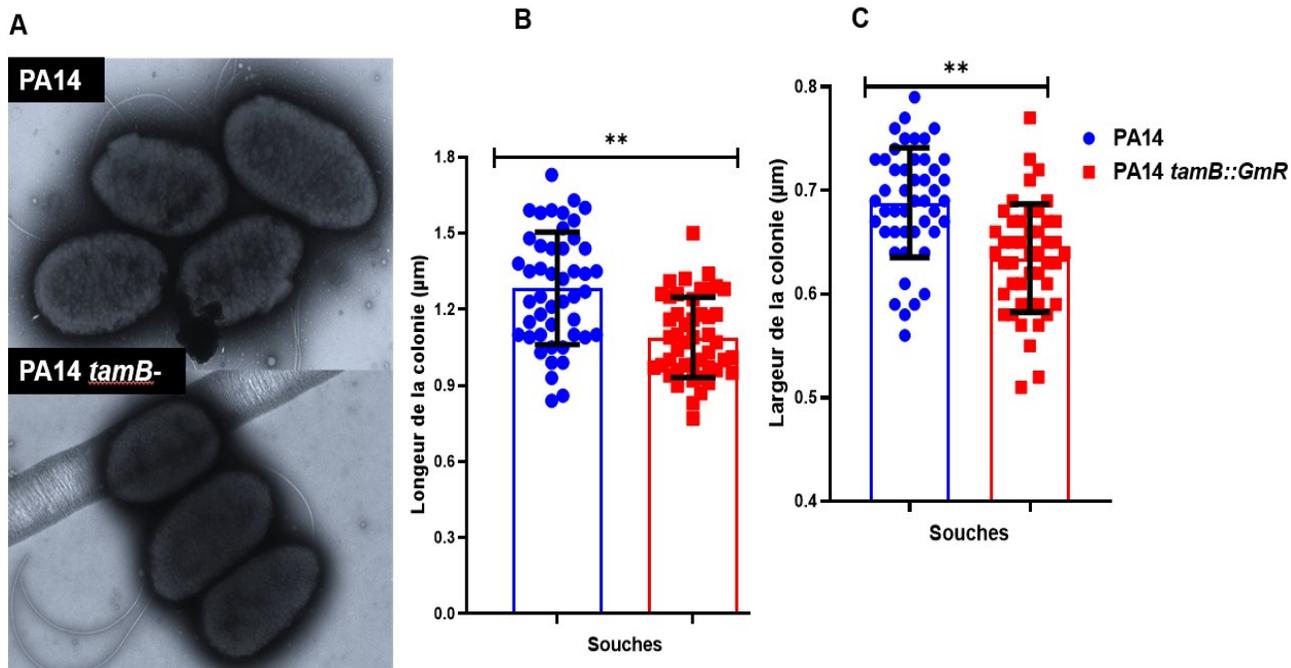


Figure 3.1 : Suivi de croissance en TSB des mutants par transposition et de la souche PA14 WT  
 Les courbes de croissance en milieu TSB des souches, PA14 WT, PA14 *tamA::GmR* et PA14 *tamB::GmR* pendant de 36 h. Les quatre souches ont été cultivées dans du milieu TSB, incubées à 37 °C et la DO<sub>600</sub> a été prise toutes les heures. . Pour chaque souche, 3 réplicats techniques ont été réalisés et 2 l'expériences a été répétée de façon indépendante. Les résultats des deux expériences ont été combinés.

### 3.1.2 Comparaison morphologique de la souche WT avec la souche mutante *tamB::GmR*

La morphologie de la souche PA14 *tamB::GmR* a été comparée à celle de la souche PA14 WT grâce à un microscope électronique à transmission (MET). La longueur et la largeur de 47 cellules PA14 *tamB::GmR* et 47 cellules PA14 WT choisis aléatoirement ont été mesurées (Figure 3.2-B et C). Comme le montre la figure 3.2-A, les souches mutantes paraissent plus courtes et arrondies. Les cellules PA14 *tamB::GmR* étaient plus courtes en longueur que les colonies PA14 WT (Figure 3.1-B) et moins larges (Figure 3.2-C). Ces résultats suggèrent que la mutation de *tamB* pourrait avoir un impact sur la morphologie et donc les souches mutantes pourraient potentiellement présenter des phénotypes différents de la souche PA14 WT. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai testé les phénotypes de formation de biofilm et sensibilité aux antibiotiques.



**Figure 3.2 : Morphologie des souches PA14 WT et PA14 *tamB::GmR***  
 Les souches PA14 WT et PA14 *tamB::GmR* ont été cultivées dans du TSB jusqu'à l'obtention de la DO= 1. Les cellules ont été photographiées au MET avec un grossissement de 20.000 X (A). La longueur et largeur de la souche PA14 WT et la souche mutante ont été mesurées (B et C). Les données indiquent les moyennes des valeurs obtenues pour 47 cellules de chaque souche. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la SD et les tests statistiques ont été calculés par le test Mann-Whitney non paramétrique. Les étoiles au-dessus des colonnes indiquent des différences au niveau \*\* P< 0.01.

### 3.1.3 Formation d'un biofilm par la souche WT et les mutants par transposition dans le gène *tamA* et *tamB*

La formation d'un biofilm est un trait de virulence majeur chez *P. aeruginosa*. Afin de savoir si la mutation du complexe TAM impactait ce phénotype, la capacité à former des biofilms des souches mutantes PA14 *tamA::GmR* et PA14 *tamB::GmR* par rapport à celle de la souche PA14 WT a été testé. Les figures 3.3-A et 3.3-B représentent la formation de biofilm après 24 et 72 h d'incubation pour la souche PA14 WT et les souches mutantes PA14 *tamA::GmR* et PA14 *tamB::GmR*.

Après 24 h (Figure 3.2-A), l'absorbance mesurée pour PA14 *tamA::GmR* ( $p < 0.0001$ ) ou PA14 *tamB::GmR* ( $p < 0.0019$ ) est significativement plus élevée que ceux de la souche PA14 WT, indiquant qu'un plus gros biofilm s'est formé par la souche PA14 *tamA::GmR* comparé à la souche PA14 WT et PA14 *tamB::GmR*.

Après 72 h d'incubation à 37 °C (Figure 3.3-B), les deux souches mutantes ont formé largement plus de biofilm que la souche PA14 WT, notamment la PA14 *tamA::GmR*. Ces données sont statistiquement significatives et suggèrent que les gènes *tam* sont possiblement impliqués dans la formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la mutation du gène *tamA* ou *tamB* entraîne une modification de la formation de biofilm. Cependant, l'insertion d'un transposon entraîne un décalage du cadre de lecture et pourrait avoir un impact sur les gènes en aval du gène muté. Afin de valider ces résultats et de confirmer que le phénotype observé n'est lié qu'à la mutation des gènes *tam*, ces tests ont été répétés avec les mutants de délétion propre (Partie 3.4).

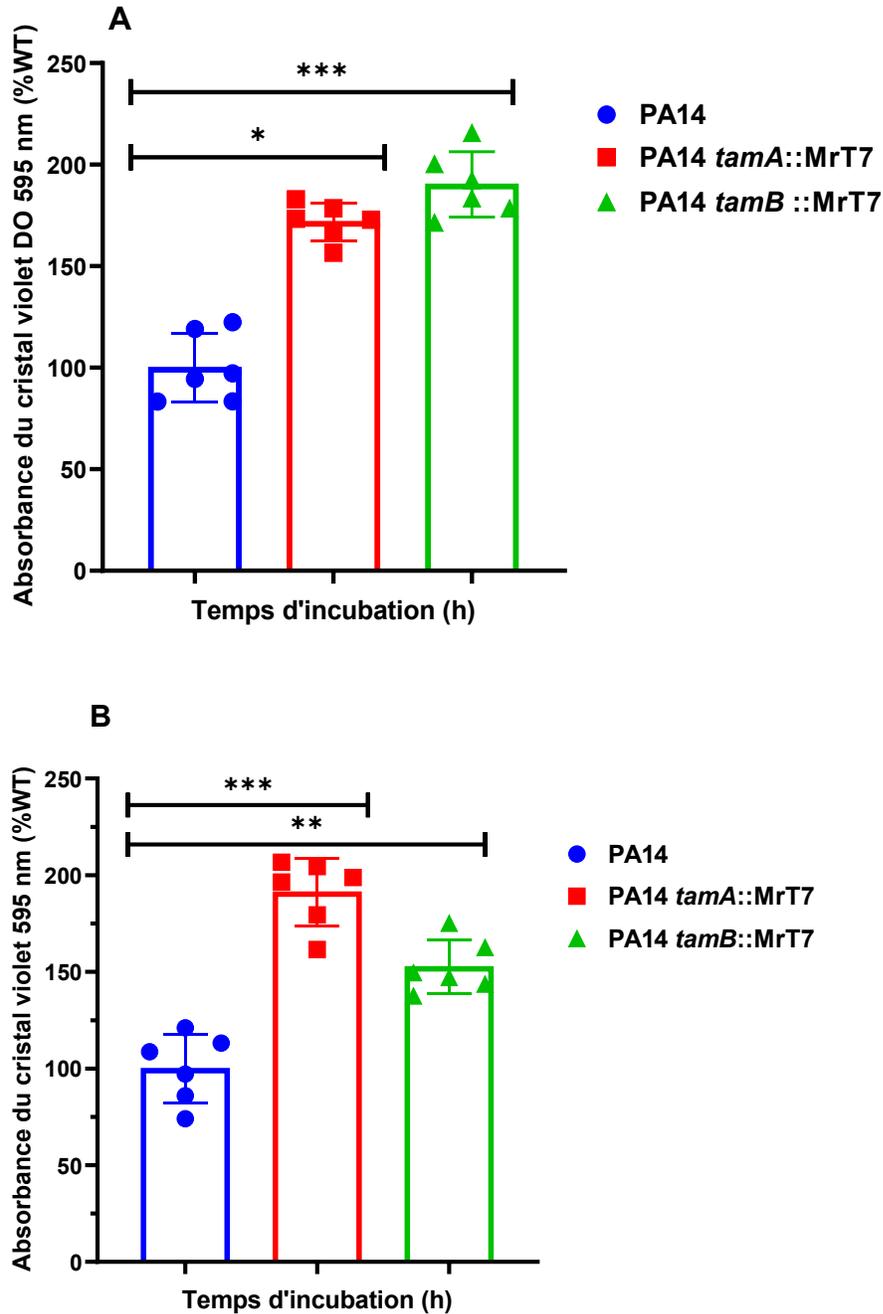


Figure 3.3 : Formation de biofilm par la souche PA14 WT et des mutants PA14 *tamA*::GmR et PA14 *tamB*::GmR

Les souches ont été cultivées dans des microplaques de 96 puits dans un milieu TSB dilué au dixième. Les microplaques ont été incubées en condition statique pendant 24 (A) ou 72 h (B). L'absorbance du CV à 595 nm a été mesurée afin de suivre la formation du biofilm. Les données représentent les moyennes de l'absorbance du CV à 595 nm pour 6 replicats techniques. Les barres d'erreur représentent l'écart-type du standard deviation (SD) et les tests statistiques ont été calculés par l'Ordinary One Way-Anova Non parametric or mixed. Les étoiles au-dessus des colonnes indiquent des différences au niveau \*P < 0,01, \*\* P < 0.001, \*\*\* P < 0.0001.

### 3.1.4 Test de sensibilité à la spectinomycine par la méthode de diffusion sur disque

Le deuxième phénotype associé à la virulence de *P. aeruginosa* que nous avons décidé de tester est sa résistance aux antibiotiques. La résistance à plusieurs antibiotiques a été testée pour les souches mutantes des gènes *tam* et la souche PA14 WT. Les résultats présentés ici sont ceux pour la spectinomycine car c'est l'antibiotique qui a donné les résultats les plus significatifs. La figure 3.4-A montre le diamètre de la zone d'inhibition de croissance pour les souches mutantes des gènes *tam* et la souche PA14 WT autour de disques imbibés avec 50 mg/mL de spectinomycine. Un diamètre d'inhibition significativement plus petit a été observé pour le mutant PA14 *tamB::GmR* par rapport à la souche PA14 WT, indiquant que le mutant PA14 *tamB::GmR* est moins sensible à la spectinomycine. Quant au mutant PA14 *tamA::GmR* comparée avec la souche PA14 WT, aucune différence significative n'a été vue avec cette méthode.

Cependant, les figure 3.4-B et 3.4-C montrent respectivement la sensibilité des souches mutantes et de la souche PA14 WT à la néomycine et la streptomycine. Aucune différence de sensibilité a été observée entre les deux groupes des souches après 16 h de croissance à 37 °C.

Pour les mêmes raisons évoquées précédemment, ces résultats préliminaires de la spectinomycine ayant donné une différence entre le mutant et la WT devraient être confirmés avec des mutants de délétion propre des gènes *tamA* et *tamB*.

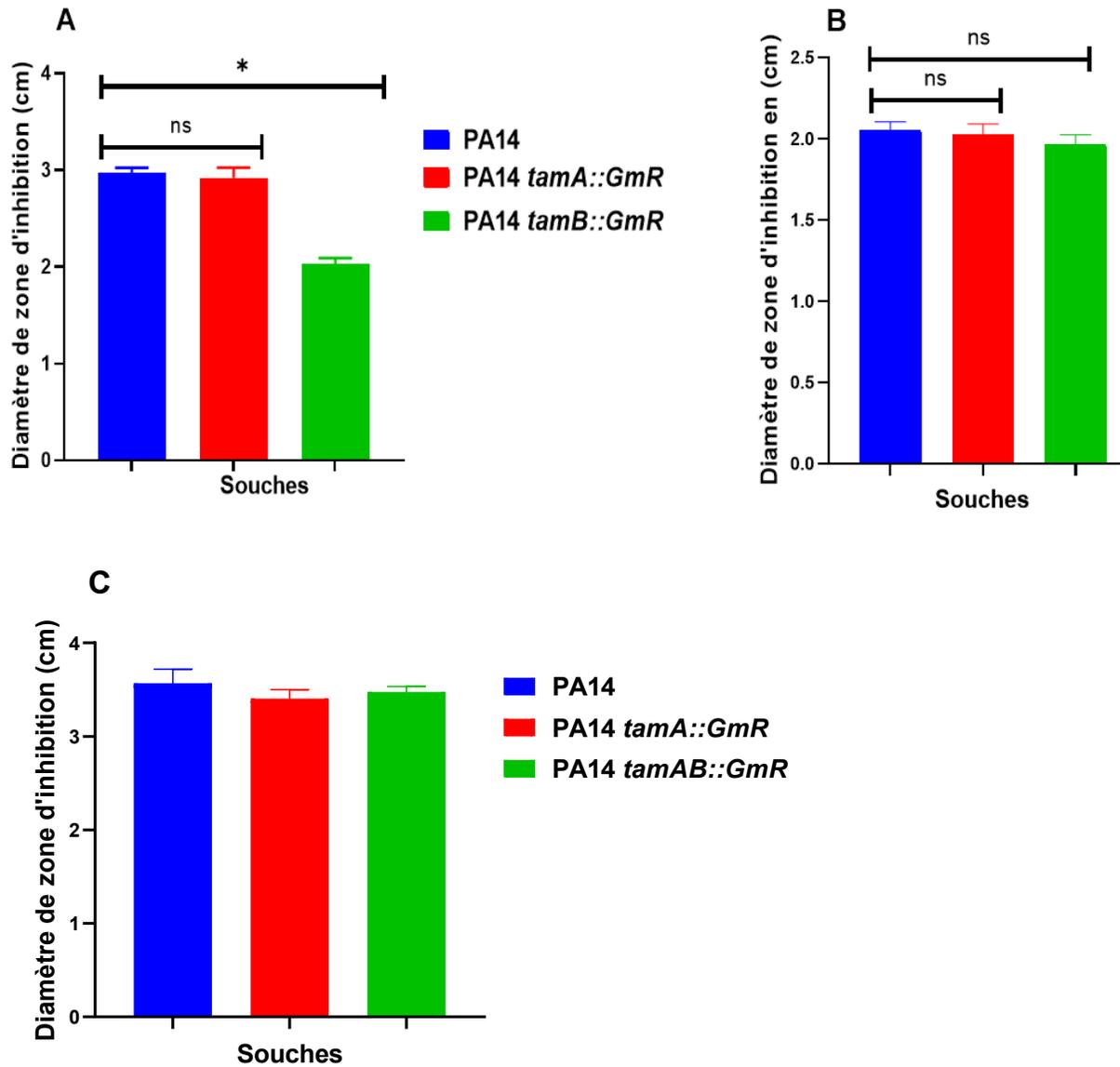


Figure 3.4 : Test de sensibilité à la spectinomycine, néomycine et streptomycine  
 Les souches PA14 WT, PA14 *tamA::GmR* et PA14 *tamB::GmR* ont été étalées sur du milieu TSB agar. Des disques imbibés de 50 mg/mL de spectinomycine (A) ou de néomycine(B) et ou de la streptomycine(C) ont été déposés sur la gélose incubée à 37 °C et la zone d'inhibition pour chaque réplicat technique pour chaque souche ont été mesurées avec une règle. Les barres d'erreur représentent l'écart-type SD et les tests statistiques ont été calculés par un test Mann Whitney Non parametric. Les étoiles au-dessus des colonnes indiquent des différences au niveau, \*\*\* P<0.0001, ns= non significatifs.

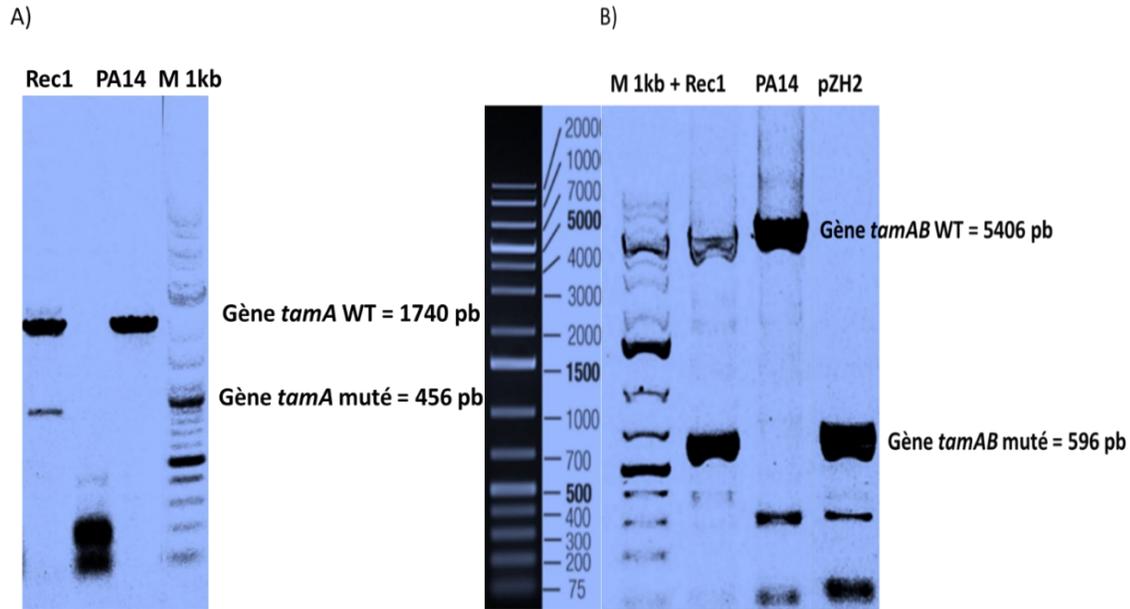
La mutation par transposition pourrait avoir des effets polaires sur les gènes avoisinants. Ainsi, afin de confirmer que les phénotypes observés sont bien liés à la mutation des gènes *tam*, des mutants de délétion propre ont été construits. On parle de mutants de délétion propre car les gènes *tam* ont été mutés tout en respectant la cadre de lecture afin d'impacter aucun autre gène. De plus aucun marqueur de résistance n'a été utilisé pour le remplacement de ces gènes, c'est plutôt une version tronquée qui a été conservée dans le génome de ces mutants.

### 3.2 Délétions du gène *tamA* et de l'opéron *tamAB*

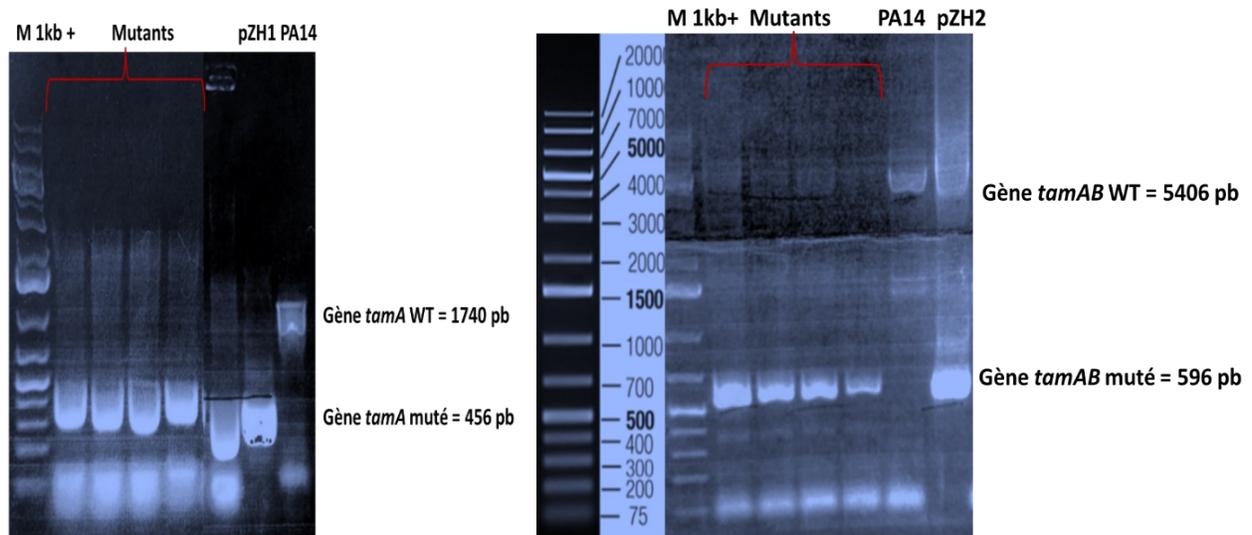
La première étape pour répondre aux objectifs de ce projet a été de construire des mutants de délétion propres du gène *tamA* et de l'opéron *tamAB* chez *P. aeruginosa*. Ces mutants ont été créés en utilisant la méthode d'échange allélique à deux étapes (Figure 2.2). Grâce à cette méthode 80% de la séquence codante du gène *tamA* ont été supprimés dans le simple mutant, et dans le double mutant 90% de la séquence codante de l'opéron *tamAB* ont été éliminés. Comme détaillé dans le matériel et méthodes (Voir partie 2.4), ces délétions ont été réalisées selon deux événements de recombinaison homologue. Après le premier événement de recombinaison homologue, correspondant à l'intégration des plasmides pZH1 ou pZH2 dans le génome de la souche PA14, des clones résistants à la carbénicilline et sensibles au saccharose (acquis sur le plasmide) ont été obtenus. La présence d'une/des versions alléliques des gènes *tamA* et *tamB* a été recherchée dans ces clones, nommés Rec1, par amplification PCR. Pour les clones Rec1 de la délétion simple, des bandes d'amplification à 1740 pb et 456 pb ont été observées (Figure 3.5-A), correspondant respectivement à la taille du gène *tamA* WT et *tamA* muté. Les clones Rec1 possédaient donc bien à la fois la version mutée du gène *tamA* ainsi que la version sauvage (Figure 3.5-A). Pour la double mutation, les clones Rec1 obtenus possédaient également deux bandes d'amplification correspondant à la taille de l'opéron *tamAB* WT et muté, faisant respectivement 5402 et 596 nucléotides (Figure 3.5-B).

Après le deuxième événement de recombinaison homologue correspondant à l'élimination du plasmide sous la pression générée par la présence de saccharose dans le milieu, des clones mutants devenus résistants au saccharose et sensibles à la carbénicilline ont été sélectionnés. La confirmation de ces mutants par PCR en utilisant l'amorce pUCP20\_OE\_ *tamA* F/R et pUCP20\_OE\_ *tamB* F/R (Tableau 2-2) a permis de confirmer l'absence du gène *tamA* WT ou *tamAB* WT (Figure 3.6) correspondants respectivement à 1740 et 5402 nucléotides. Les amorces utilisées pour cette confirmation finale sont situées à l'extérieur de la région des gènes ciblés (Tableau 2). La présence de bandes de 456 ou 596 pb

correspondant respectivement à la taille des gènes mutés *tamA* (Figure 3.6-A) ou *tamAB* (Figure 3.6-B) ont confirmé le succès de la deuxième recombinaison.



**Figure 3.5 : Amplifications par PCR de l'ADN des premiers recombinants, PA14 ::pZH1 et pZH2**  
 Les amplicons obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose 1%. M 1 Kb + est le marqueur de taille GeneRuler 1 kb Plus DNA (Thermo Scientific™), Rec1 correspond aux premiers recombinants. Les plasmides pZH1 et pZH2 ont été utilisés comme contrôles positifs pour l'amplification des gènes mutés. La souche PA14 WT a été utilisée comme contrôle positif pour l'amplification du gène WT.



**Figure 3.6 : Confirmation par PCR des souches PA14  $\Delta$ tamA et PA14  $\Delta$ tamAB**  
 M 1 Kb + est le marqueur de taille Gene Ruler 1 kb Plus DNA (Thermo Scientific™), les plasmides pZH1 et pZH2 ont été utilisés comme témoins positifs pour l'amplification des gènes mutés et la souche PA14 WT pour les gènes sauvages.

Les mutants confirmés, ils ont été utilisés pour les tests phénotypiques impliqués dans la virulence et la colonisation de *P. aeruginosa*.

### 3.3 Suivie de la croissance en milieu TSB et LB

Afin de vérifier si les mutations  $\Delta tamA$  ou  $\Delta tamAB$  affectent la croissance bactérienne de PA14 dans des conditions normales de croissance (absence de stress), des cultures des mutants et de la souche PA14 WT dans les milieux de cultures riches LB et le TSB ont été réalisées. Ces tests primaires sont nécessaires pour déterminer si la mutation du gène *tamA* ou de l'opéron *tamAB* a un impact sur la croissance des bactéries dans des conditions normales de croissance (absence de tout stress).

La croissance des souches à 37 °C a été mesurée toutes les heures pendant 48 h. Les figures 3.7 et 3.8 illustrent les courbes de croissance de la souche PA14 WT, PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  dans les milieux LB et TSB, respectivement. Dans les 2 milieux, la dynamique de croissance était similaire pour la souche PA14 WT et les souches mutantes PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$ . Aucune différence de croissance n'était observée durant la phase exponentielle entre 6 à 26 h ainsi que durant la phase stationnaire entre 26 et 42 h dans le milieu LB (Figure 3.7). Les résultats sont similaires même dans le milieu TSB (Figure 3.8), aucune différence de croissance n'a été observée durant la phase exponentielle 4 à 34 h et la phase du déclin entre 36 à 48 h.

En effet, les trois souches ont poussé à la même vitesse durant les différentes phases de croissance. D'après ces résultats, la croissance bactérienne de *P. aeruginosa* ne semble pas être affectée par la délétion du gène *tamA* ou de l'opéron *tamAB* dans ces conditions de croissance. Ceci permettra de faire la comparaison des résultats qui seront obtenus lors des expériences de caractérisation phénotypiques suivantes pour la souche PA14 WT et les mutants.

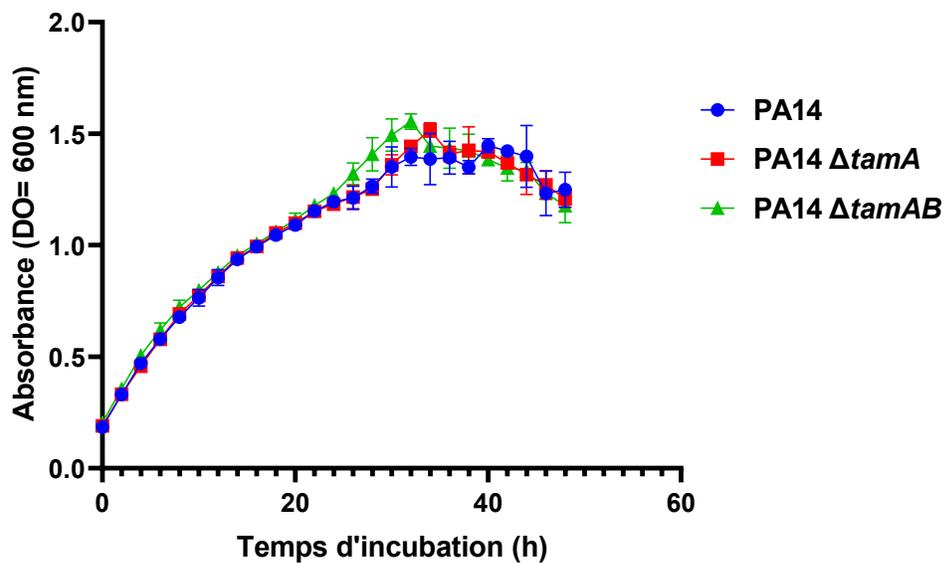


Figure 3.7 : Suivre de la croissance bactérienne en milieu LB.  
Cinétique de croissance des souches PA14  $\Delta tamA$ , PA14  $\Delta tamAB$  et PA14 WT en milieu LB pendant 48 h. Les trois souches ont été cultivées à 37 °C, la  $DO_{600}$  est mesurée toutes les heures. Les données représentent la moyenne des valeurs d'absorbance des cultures en triplicata biologique. Les barres d'erreur représentent l'écart-type SD.

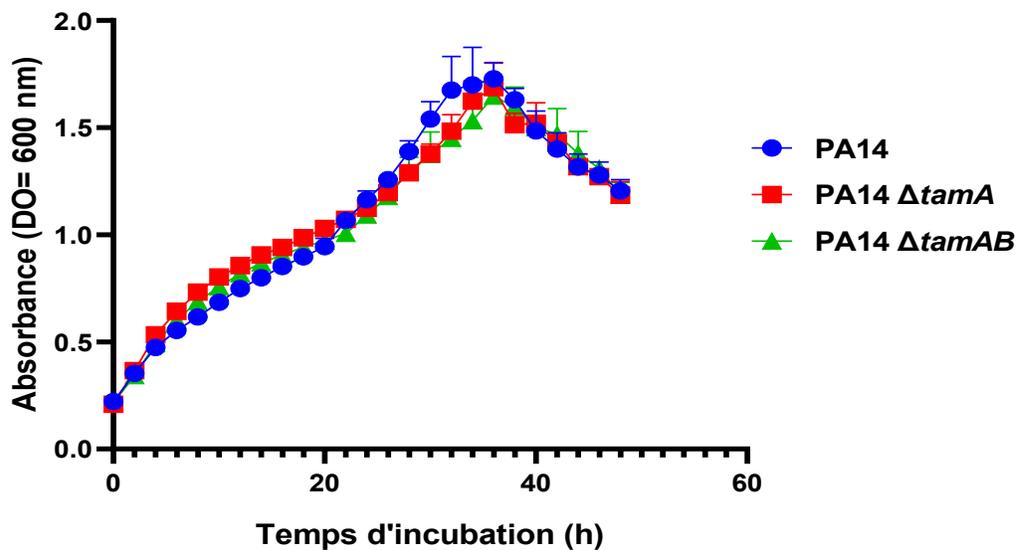


Figure 3.8 : Suivre de la croissance bactérienne en milieu TSB  
Cinétique de la croissance bactérienne en milieu TSB pendant 48 h des souches PA14  $\Delta tamA$ , PA14  $\Delta tamAB$  et de la souche PA14 WT. Les trois souches ont été cultivées à 37°C et les  $DO_{600}$  ont été prises à toutes les heures. Les données représentent la moyenne des valeurs d'absorbance des cultures en triplicata biologique. Les barres d'erreur représentent l'écart-type SD.

## 3.4 Formation de biofilm

### 3.4.1 Formation de biofilm en tubes de polystyrène

Étant donné que la formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* représente un trait majeur de sa virulence, j'ai voulu savoir si la mutation du complexe TAM impactait ce phénotype. Pour cela, j'ai testé la capacité à former des biofilms des souches mutantes PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  par rapport à celle de la souche PA14 WT.

Afin de vérifier les résultats de formation de biofilm obtenus avec la méthode de culture en plaque de 96 puits chez les mutants par transposition, j'ai effectué des tests de formation de biofilm en culture statique dans des tubes en polystyrène. La figure 3.9 montre le biofilm coloré au CV sur la paroi des tubes utilisés pour le test de formation de biofilm des souches. Une intensité de coloration au CV nettement plus forte est observée pour les souches mutantes PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  par rapport à la souche PA14 WT, indiquant une différence dans la formation du biofilm entre les souches mutantes et le WT (Figure 3.9). L'anneau du biofilm de la souche PA14 WT est très légèrement coloré tandis que ceux des mutants sont très intenses et semblent rigidement adhérer à la paroi du tube. Cependant, lors du lavage, le biofilm de la souche PA14 WT se décrochait plus facilement que celui des mutants suggérant que le biofilm du WT est plus fragile que les biofilms des mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$ .

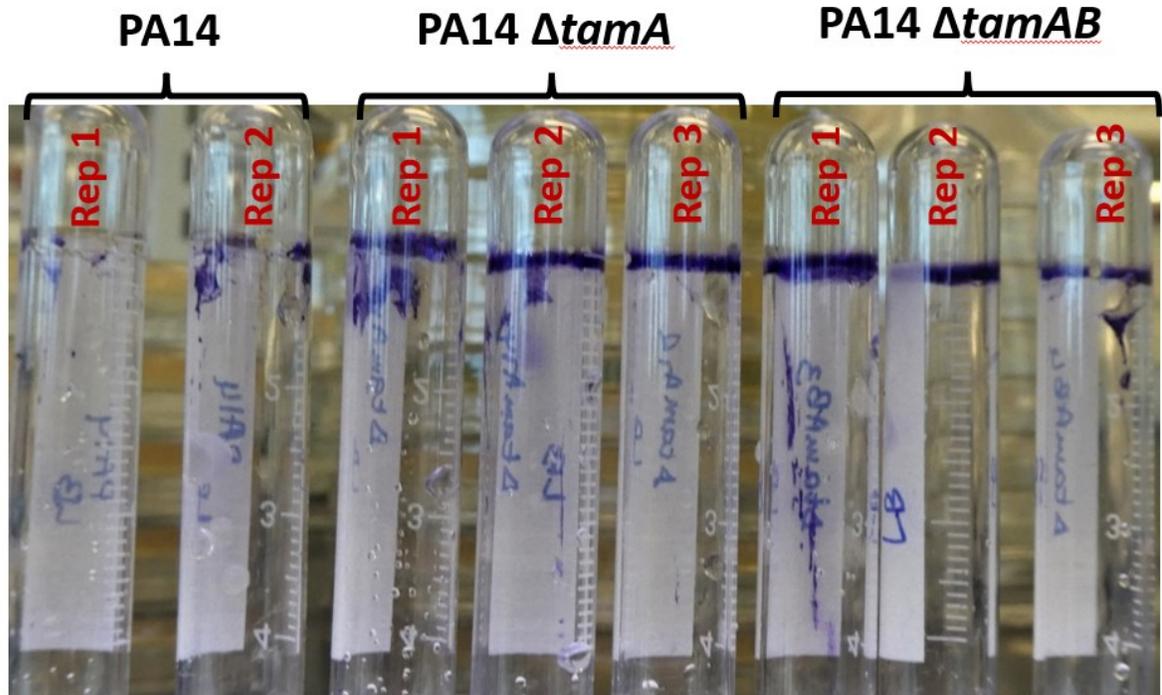


Figure 3.9 : Formation de biofilm dans du milieu LB en tube de polystyrène  
 Biofilms formés sur la paroi des tubes en polystyrènes colorés au CV dans le milieu LB dilué au dixième et cultivés en condition statique pendant 24 h à 37 °C. Rep= réplicat.

### 3.4.2 Formation de biofilm en plaques de 96 puits

Les tests ont été réalisés dans des microplaques de 96 puits avec l'absorbance du CV pour suivre la formation du biofilm après 24 h à 37 °C. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3.10-A. Après 24 h d'incubation, les souches mutantes PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  ont formé respectivement plus de biofilm que la souche PA14 WT. Les biofilms formés par les souches PA14  $\Delta tamA$  ( $p < 0.0207$ ) ou PA14  $\Delta tamAB$  ( $p < 0.001$ ) étaient significativement plus élevés que ceux de la souche PA14 WT. Aucune différence significative de quantité de biofilm formé n'a été observée entre les souches PA14  $\Delta tamA$  ou PA14  $\Delta tamAB$  (Figure 3.10-A). Ces résultats suggèrent une implication directe ou indirecte des protéines TamA et TamB dans le processus de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*.

Le même test a été réalisé en incubant les souches dans les mêmes conditions pendant 48 h (Figure 3.10-B). Les mutants forment toujours plus de biofilm que la souche PA14 WT (Figure 3.10-B). Cependant, le double PA14  $\Delta tamAB$  forme plus de biofilm que le simple mutant PA14  $\Delta tamA$  et cette différence est significative. De plus le double mutant forme deux fois plus de biofilm que la souche PA14 WT.

Ces résultats confirment les résultats obtenus avec les mutants par transposition PA14 *tamA::GmR* et PA14 *tamB::GmR*. Ces résultats valident ceux des tests effectués dans les microplaques de 96 puits avec les mutants par transposition et en tubes en polystyrène. Tous ces résultats démontrent clairement que les mutants du gène du complexe TAM pourraient posséder une capacité à former un biofilm plus robuste que la souche PA14 WT. J'émetts l'hypothèse que l'avantage de formation du biofilm observé pour les mutants des gènes du complexe TAM, pourrait être dû à une adhésion plus forte aux parois des tubes et/ou présenter un retard dans la dispersion du biofilm.

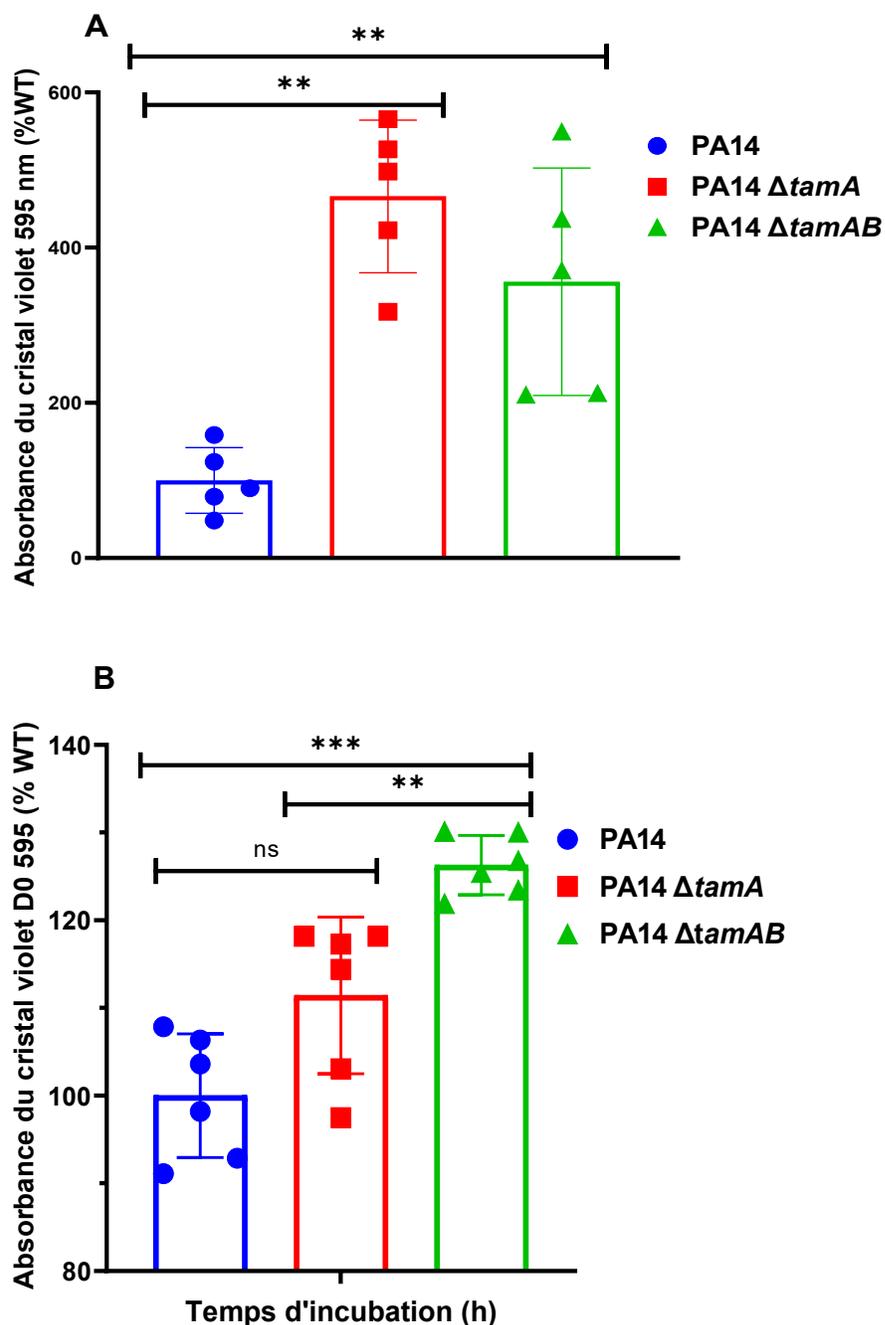


Figure 3.10 : Formation de biofilm par PA14 WT et les mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$

Le test de formation de biofilm PA14 WT, PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  a été effectué dans un milieu LB dilué au dixième, les cultures ont été incubées en condition statique pendant 24h (A) et 48h (B). Des lectures d'absorbance du cristal violet plus élevées indiquent des biofilms plus robustes. (A) Les données représentent la moyenne de 5 réplicats technique pour chaque souche. (B) Les données représentent la moyenne des 6 réplicats technique. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la SD et les tests statistiques ont été calculés par le Mann Whitney Non parametric or mixed. Les étoiles au-dessus des colonnes indiquent des différences au niveau, \*\*\*  $P < 0.0001$ , \*\*  $P < 0.001$ , ns= non significatif.

Au vu de ces données, j'ai voulu savoir plus précisément quelle étape du développement du biofilm était impactée par la mutation des gènes du complexe TAM, ou quels facteurs nécessaires à la formation du biofilm étaient impactés. Tel qu'il a été rapporté dans la partie décrivant la formation du biofilm (partie 1.5.2.2), les facteurs impliqués dans l'adhésion initiale et la dispersion d'un biofilm chez *P. aeruginosa* sont les flagelles et les pili de type IV, deux appendices de la surface cellulaire nécessaires pour l'adhérence et la motilité (Klausen *et al.*, 2003). Ainsi des tests permettant de vérifier la fonctionnalité du flagelle et des pili chez les souches mutantes ont été réalisés.

### **3.4.3 Test de *swimming* en milieu semi-solide (0,3% agar)**

Le *swimming* des souches mutantes a été testé dans le but de comprendre leur capacité à faire plus de biofilm que la souche PA14 WT. Pour vérifier la fonctionnalité du flagelle, j'ai réalisé des tests de *swimming* puisque cet appendice est indispensable pour que le *swimming* soit effectif. Le *swimming* a été déterminé par l'expansion de la colonie bactérienne à partir de son point d'inoculation après 24 h d'incubation à 30 °C sur des géloses molles (0,3 % d'agar). La figure 3.11-A représente les images de *swimming* de chaque souche testée. Sur ces images, il est difficile de voir la différence du diamètre de la zone de *swimming*. La mesure du diamètre des zones de *swimming* pour le mutant du gène *tamA* est légèrement plus grands que la souche PA14 WT (Figure 3.11-B). L'activité flagellaire de PA14  $\Delta tamA$  est significativement améliorée comparée à celle de la souche PA14 WT. D'après ces données, la délétion du gène *tamA* et de *tamAB* pourrait avoir un impact sur la formation ou le fonctionnement du flagelle de *P. aeruginosa*.

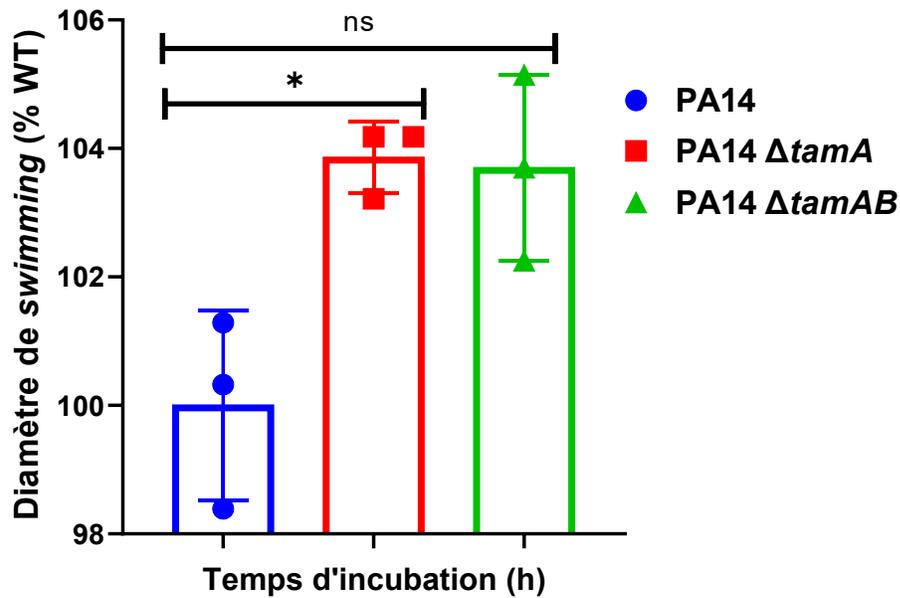
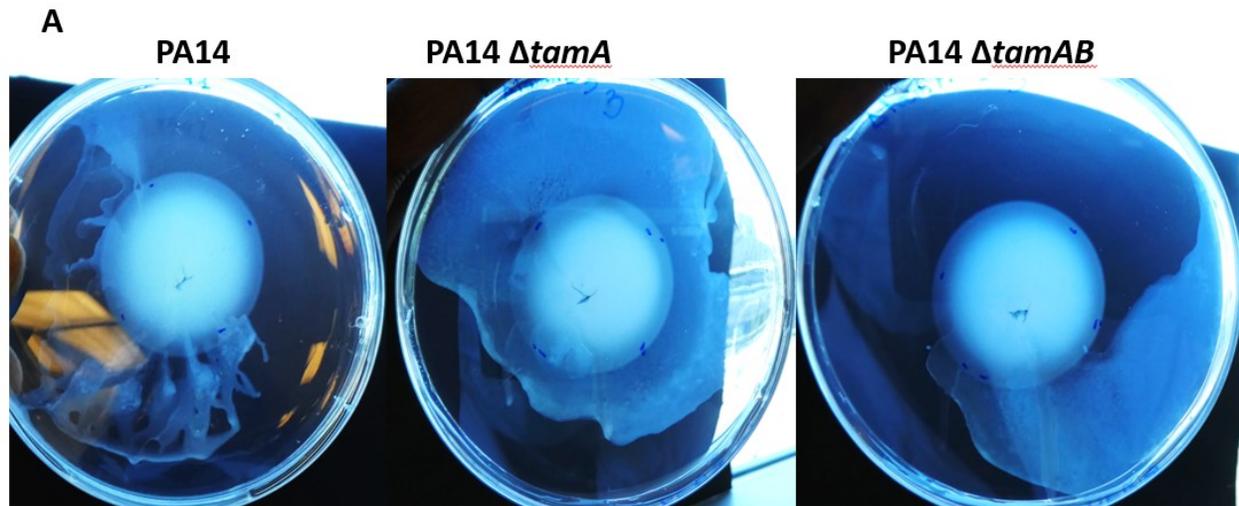
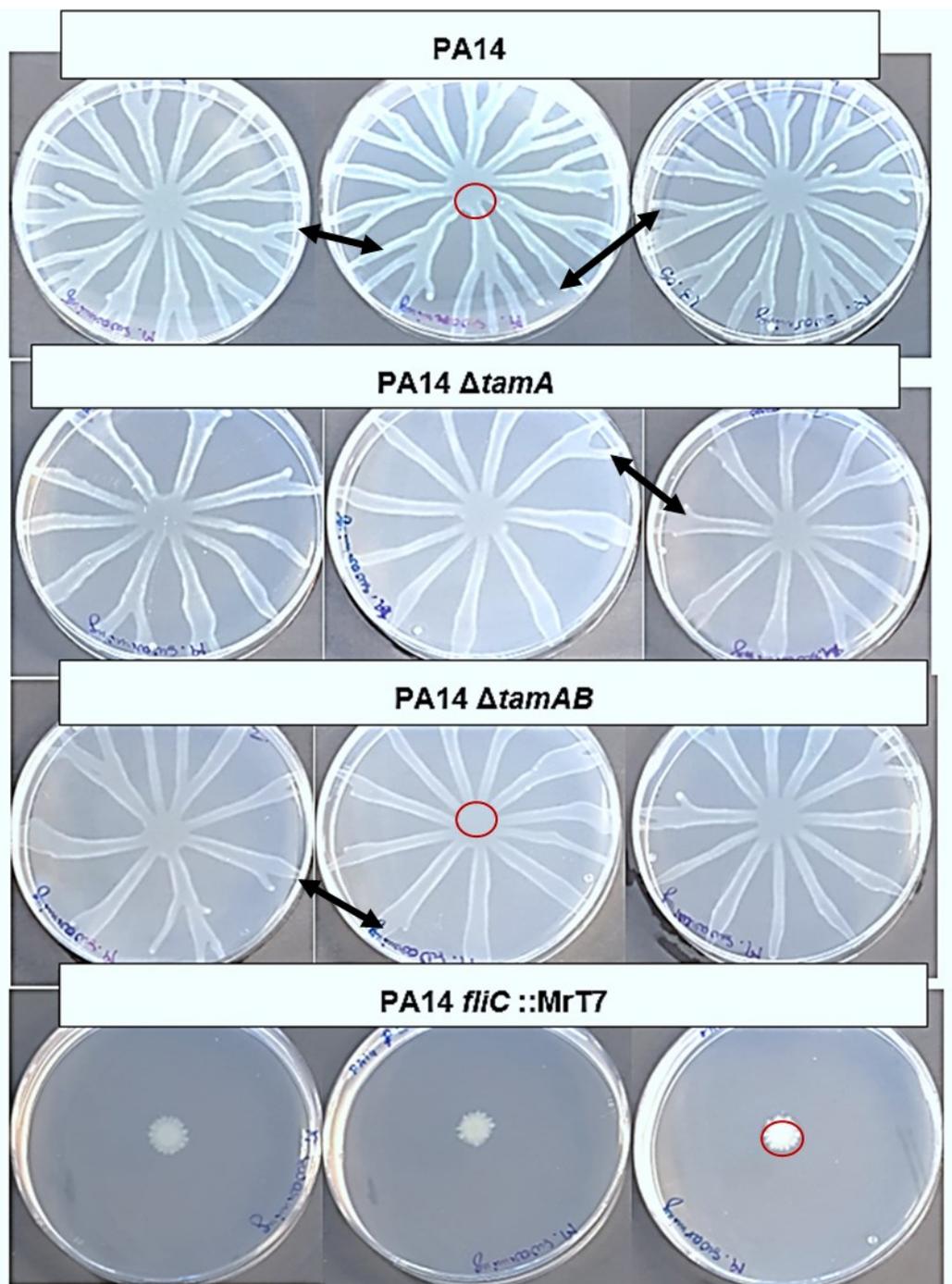


Figure 3.11 : Test de motilité de type *swimming* de la PA14 WT et des mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$ . Le *swimming* a été réalisé en milieu LB avec 0,3% d'agar après 16 h d'incubation. (A) montre les images représentatives pour chacune des trois souches. (B) représente les diamètres des zones de *swimming*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des triplicats biologiques. Les tests statistiques ont été calculés par le Mann Whitney Non parametric or mixed. Les étoiles au-dessus des colonnes indiquent des différences au niveau, \*  $P < 0.001$ .

#### 3.4.4 Test de *swarming*

La motilité de type *swarming* a été comparée visuellement chez la souche PA14 WT et les mutants des gènes *tam* après 24 h d'incubation à 30 °C (Figure 3.12). La souche PA14 WT et les mutants sont capables de faire du *swarming*, lorsqu'on compare avec la souche contrôle PA14 *fliC*<sup>-</sup>, dépourvue de flagelle et donc incapable de faire du *swarming* (Figure 3.12, flèches noires). La motilité de type *swarming* est difficile à quantifier (mesure de la surface de la gélose recouverte/largeur des dendrites/nombre de dendrites ?), cependant, on observe plus de ramifications des dendrites chez la souche PA14 WT que les mutants (Figure 3-13, flèches noires). Les dendrites des mutants se forment un peu plus tard que celui de la souche PA14 WT. Ces résultats suggèrent que la mutation des gènes *tam* impacte sur le *swarming* sans l'éliminer ou diminuer.

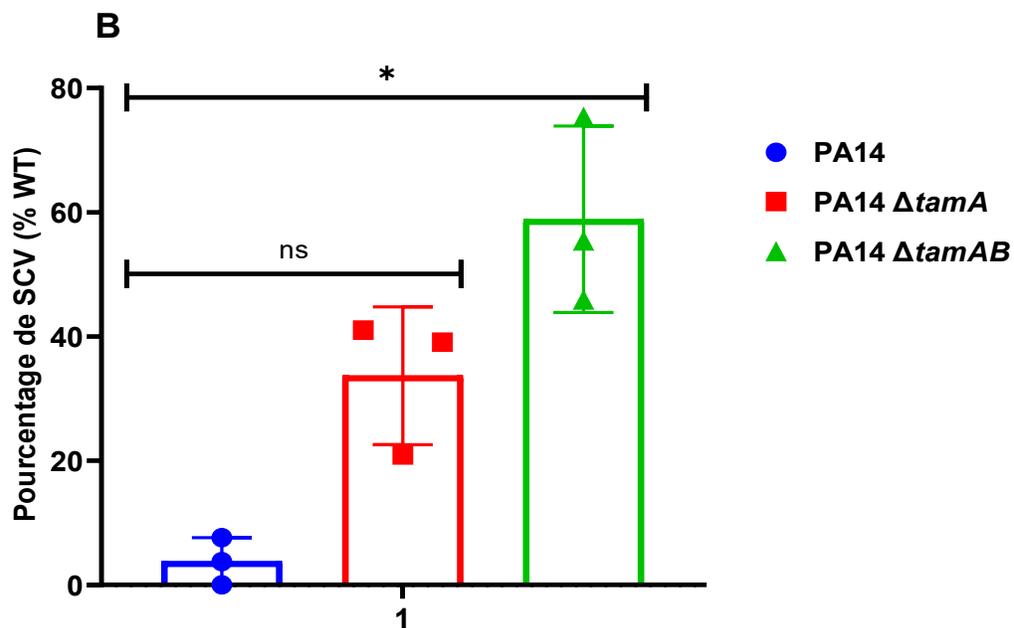
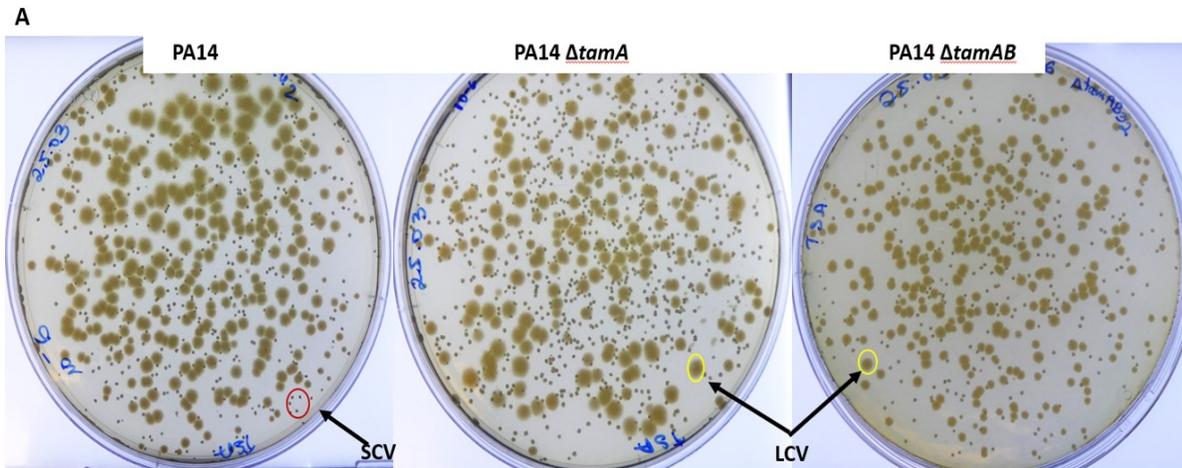


**Figure 3.12 : Test de motilité de type *swarming***

Les géloses ont été incubées pendant 16 h à 34 °C. Les flèches noires indiquent les ramifications formées autour de corps cellulaires ou les dendrites et les croix rouges indiquent les points d'inoculation.

### 3.4.5 Proportion de *Small Colony Variants* (SCV) formée dans des conditions de biofilm

Dans le but de comprendre pourquoi les mutants TAM forment plus de biofilm, j'ai voulu vérifier si les mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  forment plus SCV que la souche PA14 WT dans des conditions de formation de biofilm. Après 24 h d'incubation à 37 °C en condition statique, les pourcentages de SCV formés par les mutants sont significativement plus élevés que ceux de la souche PA14 WT. Le double mutant avait produit 60% plus de SCV que PA14 WT et le mutant *tamA* 30% (Figure 3.13-B). Ces résultats indiquent clairement que la mutation du gène *tam* impacte le pourcentage des SCV en condition de formation de biofilm.



**Figure 3.13 : Apparition de SCV dans une culture statique en milieu TSB**

Les cellules ont été cultivées en condition statique pendant 48 h, puis étalées sur des géloses. Après 24 h d'incubation à 34 °C, les SCV présentés sur les géloses ont été comptés et un % de SCV est exprimé en fonction du nombre total de colonies sur la gélose. (A) montre les images des colonies SCV encadré en rouge et en jaune les colonies WT dites LCV (Large colony variant) de chaque souche. (B) représente la moyenne des valeurs de % obtenus pour des cultures des triplicats biologique. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la SD des triplicats biologiques. Les tests statistiques ont été calculés par le Mann Whitney test Non parametric or mixed. Les étoiles au-dessus des colonnes indiquent des différences au niveau \*P < 0,01, ns= non significatif.

### 3.5 Sensibilité aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un autre facteur de virulence important de *P. aeruginosa*. J'ai investigué si la délétion des gènes du complexe TAM impactait la sensibilité aux antibiotiques de *P. aeruginosa*. J'ai sélectionné plusieurs antibiotiques appartenant à différentes familles : la néomycine, la polymyxine, la carbénicilline, la streptomycine, la spectinomycine et la tobramycine. Les résultats des tests de sensibilité obtenus exclusivement pour les antibiotiques spectinomycine et tobramycine seront développés dans ce rapport car ce sont ceux pour lesquels une différence significative entre les mutants PA14  $\Delta tamA$ , PA14  $\Delta tamAB$  et la souche PA14 WT a été observée. Les résultats obtenus pour les autres antibiotiques sont présentés en annexe de ce mémoire.

La spectinomycine et la tobramycine appartiennent à la famille des aminoglycosides. Pour les tests de sensibilité, nous avons comparé les résultats sans et avec des cations divalents ( $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ ).

#### 3.5.1 Validation de la croissance dans le milieu Mueller-Hinton

Avant de tester la sensibilité aux antibiotiques des souches mutantes, la première étape était de vérifier qu'ils n'avaient pas de défaut de croissance dans le milieu Mueller-Hinton (MH) dans lequel les tests de sensibilité aux antibiotiques seront réalisés. Pour ce faire, une cinétique de 28 h au Bioscreen a été réalisée et la croissance bactérienne a été mesurée tous les heures (Figure 3.14). On constate que la courbe de croissance des souches PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  est similaire à celle de la souche PA14 WT, donc rassure sur la fiabilité des résultats qui seront obtenus en présence d'antibiotiques dans ce même milieu.

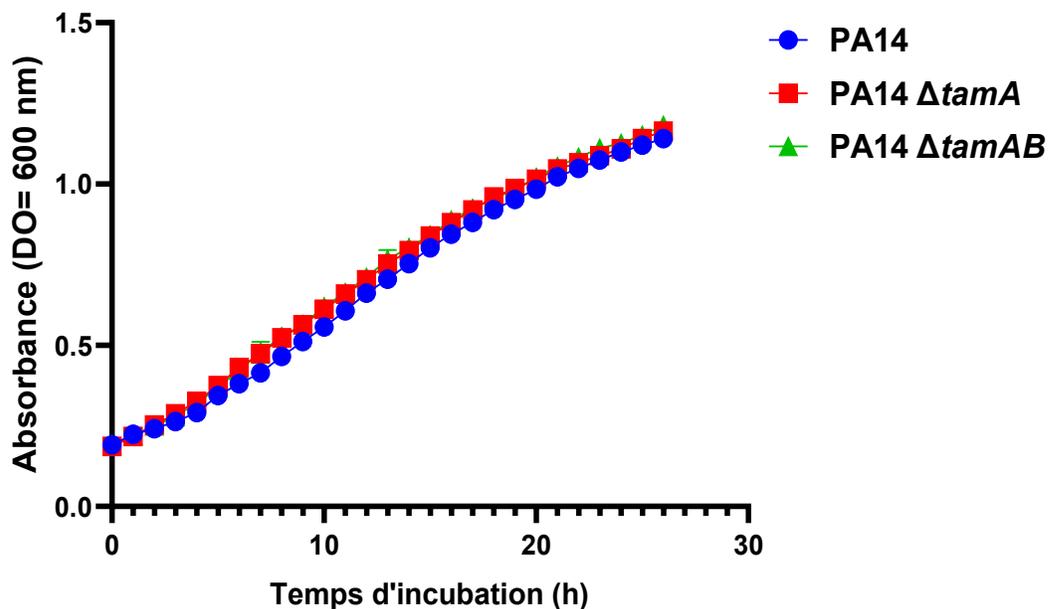


Figure 3.14 : Suivre de la croissance en milieu MH

La croissance des souches PA14 WT, PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  a été réalisée en milieu MH pendant 28 h à 37 °C, la  $DO_{600}$  a été prise toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type SD de la  $DO_{600}$  de triplicats biologique.

### 3.5.2 Sensibilité à la spectinomycine en milieu Mueller-Hinton

Dans un premier temps, un test de sensibilité à la spectinomycine a été réalisé dans le milieu MH. La concentration d'antibiotique à ajouter au milieu doit être assez élevée pour ralentir la croissance de la souche PA14 WT, mais pas trop élevée pour ne pas inhiber complètement sa croissance. Après avoir testé les concentrations de 150, 50 et 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , nous avons choisi la concentration finale de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Car, la concentration de 150  $\mu\text{g/mL}$  étaient très élevées et n'inhibent la croissance bactérienne tandis que la concentration de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  n'a pas montré de différence entre les souches. En présence de la spectinomycine, une différence significative de croissance entre les souches mutantes et la souche PA14 WT a été observée après 8 h de croissance (Figure 3.15). On remarque que les mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  ont un avantage de croissance par rapport à PA14 WT jusqu'après 26 h d'incubation. Il semble que les souches mutantes soient plus tolérantes à la présence de la spectinomycine par rapport à la souche PA14 WT. Cette expérience a été réalisée deux fois à des jours différents et les résultats obtenus ont été les mêmes.

Après 26 h de croissance, l'écart de la croissance entre les souches mutantes et la souche PA14 a diminué (Figure 3.15). Ceci pourrait être due à la diminution de l'antibiotique dans le milieu avec le temps.

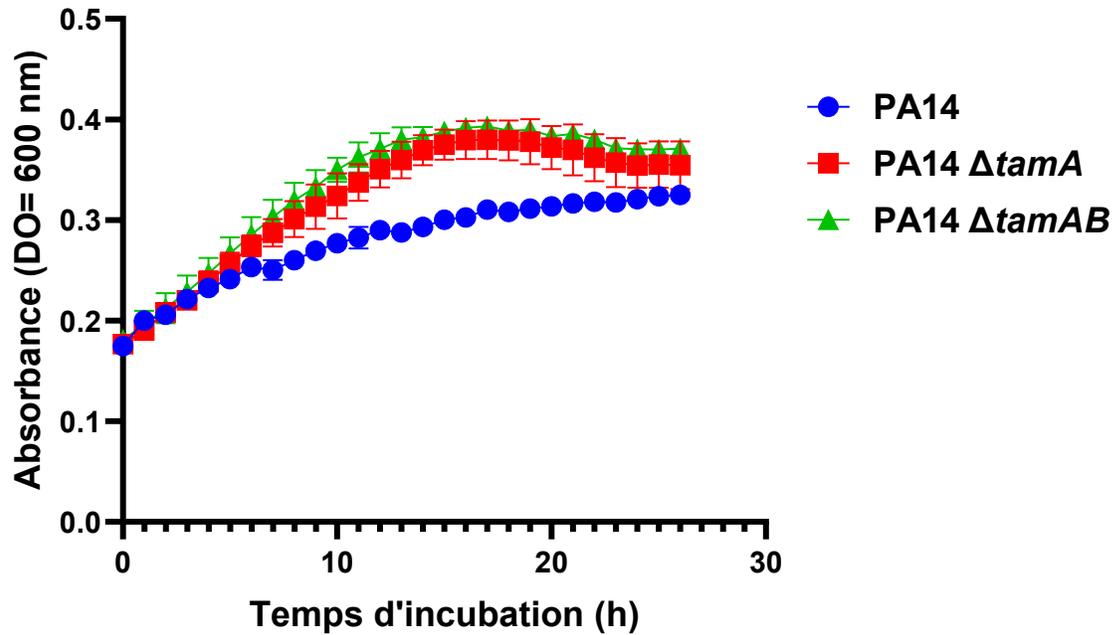


Figure 3.15 : Test de sensibilité en milieu MH plus de la spectinomycine

La croissance bactérienne est réalisée en milieu MH auquel on a été ajouté 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la spectinomycine. Les bactéries sont incubées à 37 °C pendant et la DO<sub>600</sub> a été prise toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type de DO<sub>600</sub> de triplicats biologiques correspondant à un écart type de DO<sub>600</sub> de triplicats biologiques.

À la suite de ces résultats, l'hypothèse a été émise que les mutants pourraient être plus résistants à certains antimicrobiens de la famille des aminoglycosides. Pour explorer cette idée, la tobramycine, qui est aussi un aminoglycoside, a été testée afin de comparer la sensibilité de souches mutantes à celle de la souche PA14 WT.

### 3.5.3 Sensibilité à la tobramycine en milieu Mueller-Hinton

Le test de susceptibilité à la tobramycine a été réalisé dans les mêmes conditions que celui de la spectinomycine. Ce test a été effectué dans l'objectif de vérifier si l'effet de la résistance à la spectinomycine observé est spécifique à cet antibiotique ou plus largement aux antibiotiques de la famille des aminoglycosides. Trois différentes concentrations (résultats dans la partie annexe) dont, 0,5 µg/mL et 0,25 µg/mL, ont été testées et parmi ces trois, celle choisie est la concentration finale de 0,25 µg/mL. Cette concentration permettait de ralentir la croissance de PA14 WT sans inhiber complètement la croissance bactérienne. Tandis que l'ajout à 0,5 µg/mL ne permettait pas aux bactéries de pousser (Voir figure 6.7).

La figure 3.16 illustre les résultats obtenus après 28 h de croissance dans le milieu MH avec 0,25 µg/mL de tobramycine. On observe que, tout comme pour la spectinomycine, la tobramycine impacte légèrement plus la croissance de la souche PA14 WT par rapport aux mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$ . Bien que la différence de susceptibilité entre les trois souches n'ait pas été très grande, mais une tendance de résister à la tobramycine a été observée chez les mutants par rapport à la souche PA14 WT. Ici encore, l'avantage de croissance des souches PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  apparaît après environ 8 h de croissance et se maintient tout au long de la phase stationnaire entre 12 à 20 h (Figure 3.16).

Puisque les résultats de ces deux expériences se confirment, je suppose que les mutants des gènes du complexe TAM semblent mieux tolérer certains aminoglycosides que la souche PA14 WT.

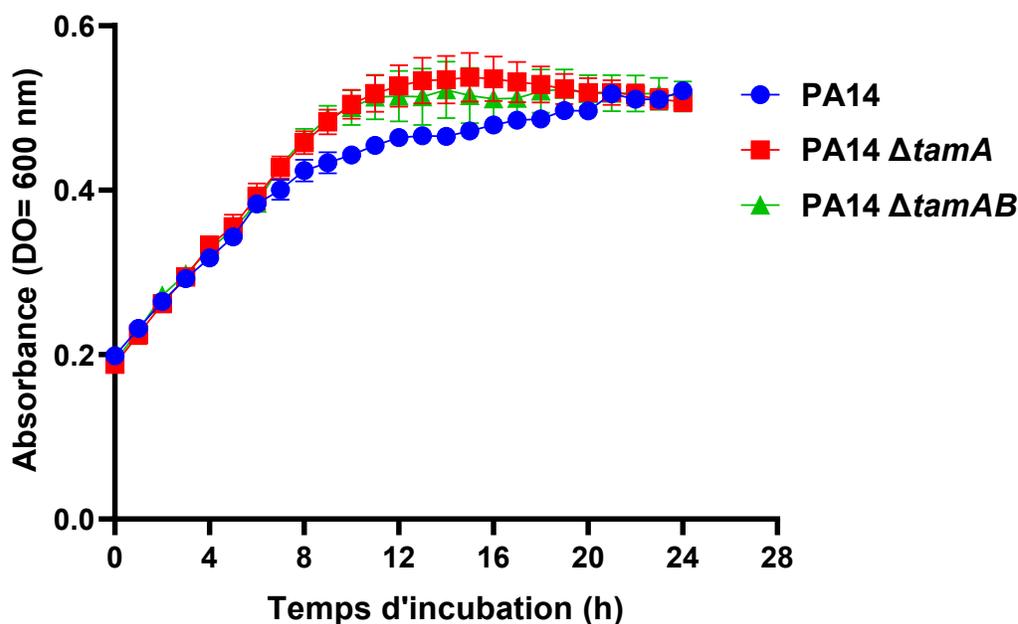


Figure 3.16 : Test de sensibilité en milieu MH plus la tobramycine  
 Comparaison de la croissance des souches PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  à la souche PA14 WT. Les trois souches bactériennes ont été cultivées dans un milieu MH auquel 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tobramycine a été ajouté. Les bactéries sont incubées à 37 °C pendant 28 h et la DO<sub>600</sub> a été prise toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type SD de DO<sub>600</sub> de triplicats biologiques.

### 3.5.4 Sensibilité à la spectinomycine en milieu Mueller-Hinton ajusté en Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>

Les résultats montrant une plus grande résistance à la spectinomycine des mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  par rapport à la souche PA14 WT ont été réalisés dans le milieu MH. Ce milieu ne contient pas d'ions calcium et magnésium. Sachant que ces deux ions divalents sont des compétiteurs des aminoglycosides pour le site de fixations que sont les LPS, j'ai voulu vérifier s'il existe un lien entre le site de fixation d'ions et la résistance des mutants. Pour ce faire, le milieu MH ajusté en Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> (MH-II) a été utilisé afin de vérifier cette hypothèse. Le MH-II a été développé spécifiquement pour accroître la fiabilité des essais de CMI lors de l'utilisation des aminoglycosides sur *P. aeruginosa*. La teneur en cations divalents des milieux de culture est connue pour affecter les tests de sensibilité aux aminoglycosides pour *P. aeruginosa*. Ainsi le milieu MH est complété avec des concentrations fixes de Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> afin de produire des CMI correctes avec des aminoglycosides lorsqu'il sont testés chez *P. aeruginosa*. Le milieu MH-II peut être obtenue auprès de nombreux fabricants internationaux sous forme d'une poudre déshydratée (Åhman *et al.*, 2020; Barry *et al.*, 1992).

Les résultats illustrés dans les figures 3.17 et 3.18, montrent respectivement la dynamique de croissance des trois souches dans le milieu MH-II sans et avec antibiotique. En absence d'antibiotique, aucune différence de croissance entre la souche PA14 WT et les mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  n'a été observée dans le milieu MH-II, donc en présence de cations (figure 3.17).

Cependant, lorsque l'antibiotique est ajouté au milieu MH-II, la croissance est similaire entre les souches PA14 WT et les souches mutantes. Ce résultat est différent de celui observé dans le milieu MH, en absence de ces cations (Figure 3.15). Il faut noter que la même concentration finale de 50  $\mu\text{g/mL}$  de spectinomycine a été ajoutée à ce milieu MH-II. La résistance à la spectinomycine n'était donc pas la même en présence ou en absence de cations pour les mutants du gène *tamA* et *tamAB*. Il semble que l'ajout des ions calcium et magnésium ait corrigé la différence de résistance précédemment observée. Donc, il est probable qu'il y ait un lien entre la résistance des mutants et les cations divalents.

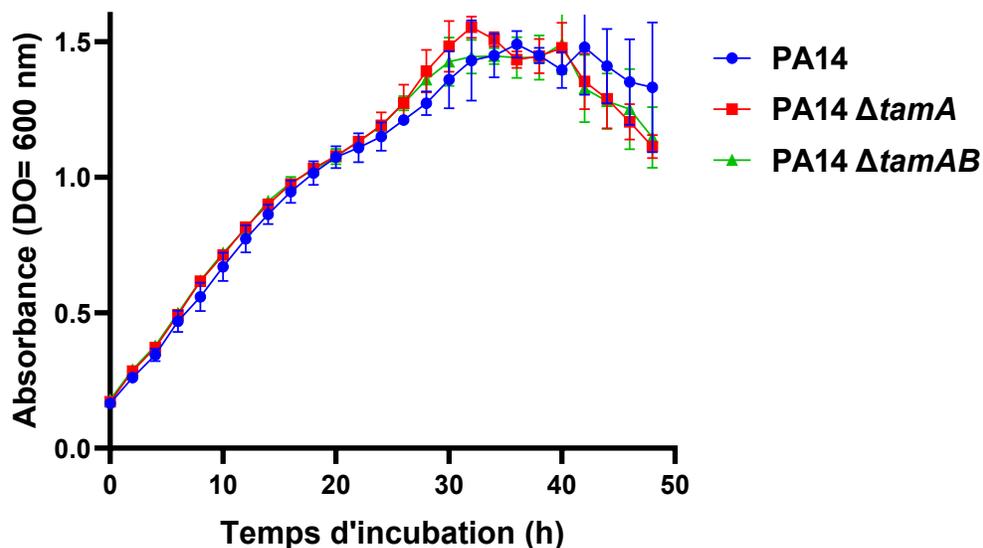


Figure 3.17 : Suivi de la croissance en milieu MH-II

Les courbes de croissance pendant en milieu MH-II des souches PA14  $\Delta tamA$ , PA14  $\Delta tamAB$  et de la souche PA14 WT pendant 48 h. Les trois souches ont été cultivées à 37°C et la  $DO_{600}$  a été prise à toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type de la SD de  $DO_{600}$  de triplicats biologiques.

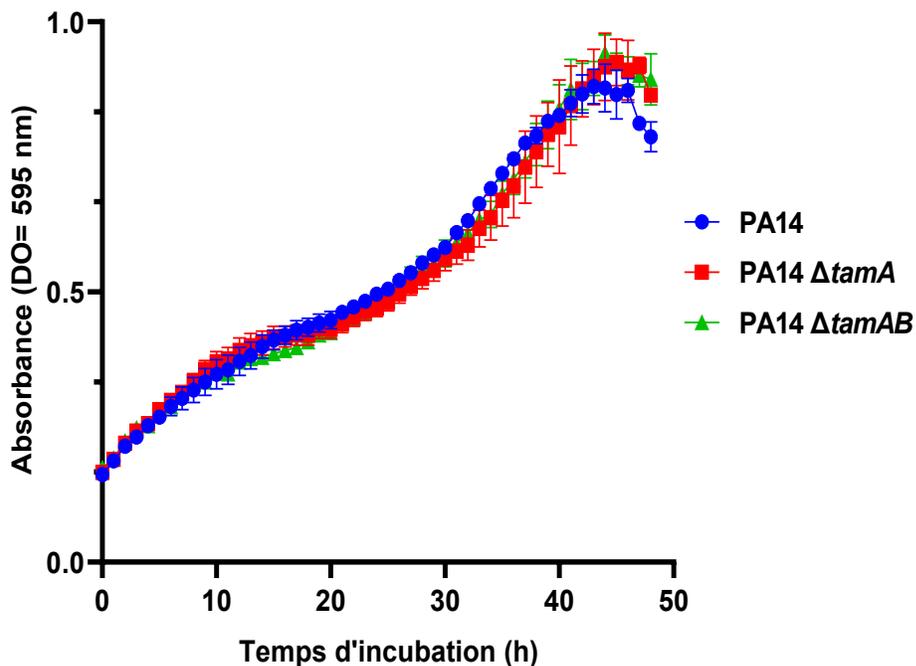


Figure 3.18 : Suivi de la croissance en milieu MH-II plus de la spectinomycine MH-II plus de la spectinomycine

Les courbes de croissance pendant en milieu MH-II des souches PA14  $\Delta tamA$ , PA14  $\Delta tamAB$  et de la souche PA14 pendant 48 h. Les trois souches ont été cultivées dans du milieu MH-II plus 50  $\mu\text{g/mL}$  de la spectinomycine à 37 °C et la  $DO_{600}$  a été prise toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type de la SD de  $DO_{600}$  de triplicats biologiques.

### 3.6 Test de virulence chez le modèle de *Drosophila melanogaster* : infection par ingestion

L'implication du complexe TAM dans la virulence de certains pathogènes a été rapportée dans la littérature, ainsi j'ai voulu vérifier l'impact de son absence dans la virulence de *P. aeruginosa*. La figure 3-19 représente les courbes de mortalité des mouches drosophiles après une infection par ingestion des différentes souches de *P. aeruginosa*. Après 250 h d'exposition, 100% de survie ont été rapportés pour les groupes contrôles nourris uniquement du saccharose (Témoin 1 et 2). Un taux de 50% de mortalité a été atteint après 250 h lorsque les drosophiles ont été en contact avec les souches PA14 WT et les doubles mutants PA14  $\Delta tamAB$ . Le taux de 100% de mortalité n'a pas été atteint même après 300 h d'exposition, c'est qui semble différent des résultats dans d'autres études. Les résultats de cette expérience n'ont montré aucune différence entre les souches PA14 WT et les doubles mutants du complexe TAM.

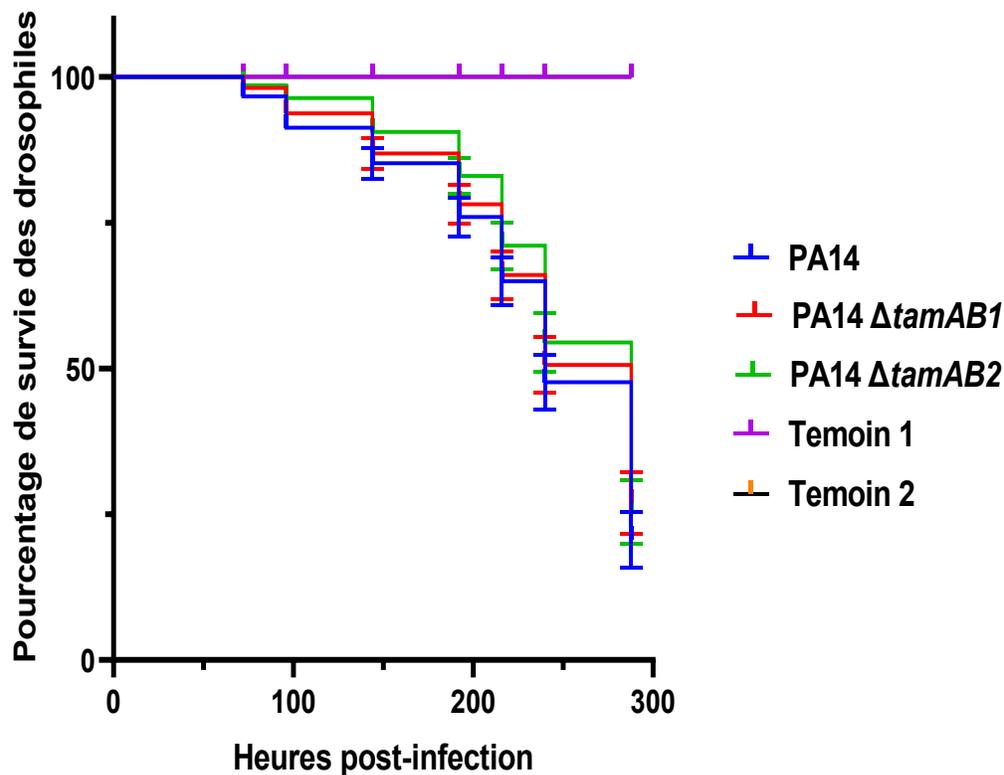


Figure 3.19 : Survie des drosophiles infectées par la souche PA14 WT ou les mutants *tam*. Les souches PA14 WT et les doubles mutants PA14  $\Delta tamAB$  ont été cultivées pendant 6 h puis lavées et suspendues dans une solution de saccharose à 5% et déposées sur des disques de papier wattman stériles à la surface des géloses. Un total de 50 drosophiles affamées pendant 5 h, ont été réparties dans les tubes (dont 10/tube) contenant les bactéries et les tubes sans bactérie qui correspondent aux deux tubes témoins (1 et 2).

### 3.7 Étude protéomique

D'après l'hypothèse formulée pour ce projet, parmi les protéines assemblées dans la ME par le complexe TAM, il y aurait des protéines impliquées dans la virulence et/ou la colonisation de l'hôte par *P. aeruginosa*. Ainsi j'ai proposé qu'en absence de TamA ou à la fois de TamA et TamB, ces protéines s'accumulent dans le cytoplasme et seraient dégradées par les protéines chaperonnes telle que la protéase DegP, protéine multifonctionnelle qui agit à la fois comme une chaperonne et protéase.

Pour explorer la possibilité que l'absence du complexe TAM conduise à une absence ou à une mauvaise localisation de certaines protéines membranaires, le protéome de la souche double mutante PA14  $\Delta tamAB$  a été comparé à celui de la souche sauvage PA14 WT. Les deux souches bactériennes, la souche PA14 WT et le mutant PA14  $\Delta tamAB$  ont été cultivées dans le milieu MH complété avec une concentration finale de 50  $\mu\text{g/mL}$  de spectinomycine car c'est dans ces conditions que nous avons observé une différence de sensibilité entre la souche PA14 WT et les mutants. J'ai analysé les extraits correspondant à la fraction membranaire, comprenant les protéines intégrées dans le ME et MI. Les analyses ont été faites en considérant les résultats de 3 replicats biologiques, c'est -à -dire 3 extractions indépendantes pour la même souche.

Un total de 1132 protéines a été détectées dans la fraction membranaire mais il y a également des protéines cytoplasmiques dans cette liste. Parmi ces 1132 protéines, 46 présentaient une différence d'abondance statistiquement significative entre le double mutant PA14  $\Delta tamAB$  et la souche PA14 WT. Afin de faciliter l'analyse de ces résultats, les protéines ont été regroupées en onze groupes sur la base de leurs fonctions prédites par le site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (Tableau 3.1): groupe de métabolisme d'acide gras, d'acide aminé et phospholipide, groupe de biosynthèse et transport de LPS, groupe de métalloenzymes, groupe des transporteurs, groupe des porines, groupe de synthèse ribosomique, groupe de système de sécrétion de type III, groupe des protéines réparatrices de l'ADN, groupe des protéases et des protéines chaperonnes, groupe de protéines hypothétiques et enfin le groupe des protéines auto-transporteurs.

Les protéines majoritairement retrouvées dans cette analyse étaient surtout impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des acides gras et des phospholipides et on également retrouve majoritairement des protéines cytoplasmiques au lieu des OMP (Tableau 3.1). Par exemple, les protéines PrpC, AtoB et SucD sont respectivement impliquées dans le

catabolisme du pyruvate, du méthanol et du citrate. Ces trois protéines étaient moins abondantes chez les souches mutantes PA14  $\Delta tamAB$  que chez PA14 WT. Quelques autres protéines intervenant dans le métabolisme des acides gras ont été également retrouvées, dont les protéines FadB, FadE et le FabD. Les trois protéines ont aussi été moins abondantes chez les souches mutantes PA14  $\Delta tamAB$ . Il en est de même pour les protéines CarA et AruC, nécessaires dans le métabolisme de l'arginine. Il est intéressant de noter que les protéines des voies métaboliques ont toutes été moins abondantes dans les extraits de la fraction membranaire des mutants par rapport à celle de la souche PA14 WT. Ces données suggèrent une implication directe ou indirecte de gènes *tam* dans les voies métaboliques.

Dans la catégorie des protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des LPS, deux protéines du système LPT, dont la protéine périplasmique LptA et la protéine LptB, étaient retrouvées. La protéine périplasmique LptA était moins abondante chez le mutant tandis que la protéine LptB était plus abondante chez le mutant par rapport à la souche PA14 WT. De plus, la protéine RmlD impliquée dans le processus de la biosynthèse de la région centrale des LPS, était également moins abondante chez les souches doubles mutantes.

Dans le groupe des métalloenzymes, cinq protéines étaient différentiellement abondantes entre le mutant et la souche PA14 WT. Trois de ces cinq protéines étaient moins présentes chez le mutant dont, la protéine hypothétique PA3768 étant prédite comme une métalloenzyme, la protéine SerS et la protéine GshB. Tandis que le transporteur transmembranaire NqRB du complexe NQR et la protéine ShaD plus abondantes dans la fraction membranaire du double mutant comparée à celle de la souche PA14 WT.

On retrouve également dans les 46 protéines, la protéine RpsI et la RpsC deux protéines ribosomales. Ces deux protéines étaient plus abondantes chez le double mutant que chez la souche PA14 WT.

À l'inverse des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des acides gras et des phospholipides qui étaient majoritaires, on retrouve seulement deux OMP dont l'abondance entre les deux souches a significativement différencié. Comme attendu, la protéine principale TamA du complexe TAM, a bien été retrouvée dans la fraction membranaire de la souche PA14 WT, pour les 3 réplicats correspondant aux 3 extractions de la même souche. De façon plus surprenante, TamA a également été retrouvée dans la fraction membranaire du mutant PA14  $\Delta tamAB$ , mais seulement dans un seul des 3 réplicats. Le fait de retrouver des traces de TamA chez le double mutant PA14  $\Delta tamAB$  pourrait s'expliquer par le fait que lors de construction des mutants, environ 500 nucléotides codant pour le gène *tamA* ont été laissés

dans le génome de la bactérie. Cette stratégie m'a permis de respecter le cadre de lecture et d'éviter d'affecter les gènes environnants.

La deuxième OMP retrouvée est la lipoprotéine associée au peptidoglycane OprL, membre du complexe Tol-Pal nécessaire au maintien de l'intégrité de la ME chez les bactéries à Gram négatif (Lazzaroni *et al.*, 1999). La protéine OprL était moins abondante dans les fractions membranaires des souches PA14  $\Delta tamAB$  que dans celles de la souche PA14 WT. Cela suggère que l'absence des gènes *tam* aurait impacté l'abondance de certains OMP.

Dans la catégorie des systèmes de sécrétion de type III (T3SS), on retrouve en faible abondance chez les souches doubles mutantes la sous-unité d'aiguille PscF du T3SS de *P. aeruginosa*. Cette protéine est essentielle pour la translocation des toxines effectrices dans les cellules humaines l'un des facteurs de virulence de PA14 (Moir *et al.*, 2020).

En revanche, dans la catégorie des « Protéines hypothétiques », six étaient régulées à la baisse dans le double mutant tandis que les cinq autres sont plus abondants. Pour les onze « Protéines hypothétiques » aucun lien fonctionnel entre ces protéines n'a pu être trouvé.

Pour la catégorie des « protéines chaperonnes » et facteurs sigma, on y trouve la chaperonne périplasmique DnaK et la protéine HslU toutes les deux décrites comme étant des protéines de la réponse au stress. Dans nos données, les deux protéines étaient présentes à la baisse chez le double mutant par à la souche PA14 WT. La protéine DnaK est la principale Hsp70, exprimée de manière constitutive et est inductible par le stress dans le cytoplasme dans *E. coli* (Hesterkamp & Bukau, 1998).

Pris ensemble, ces données montrent clairement que le protéome de *P. aeruginosa* est affecté par la double mutation des gènes *tamA* et *tamB*. D'après l'hypothèse qui était que le complexe TAM est impliqué dans l'assemblage d'un certain nombre d'OMP, on s'attendait à avoir une diminution d'abondance de cette catégorie des protéines. Bien que le profil protéique global ait été modifié chez le mutant, ces données n'ont pas permis de déterminer des OMP dépendantes du complexe TAM.

**Tableau 3-1 Classes fonctionnelles des protéines dont l'abondance est significativement différente entre les souches WT et le double mutant  $\Delta tamAB$**

Classes fonctionnelles	Nom de la protéine	Nom du gène PA01 et PA14	Fold Change de la ration des moyennes des protéines du mutant/WT	Moyenne des valeurs quantitatives	
				WT	Mutant
Métabolisme d'acide gras, d'acide aminé et phospholipide	Citrate synthase	<i>prpC</i> / PA14_53950	0*	1479,2	0
	Acetyl-CoA acetyltransferase	<i>atoB</i> / PA14_38630	0	1479,2	0
	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	<i>fabD</i> / PA14_25650	0	3113,3	0
	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisF1	<i>hisF1</i> / PA14_67880	0	1393,6	0
	Glutamine--tRNA ligase	<i>glnS</i> / PA14_41380	0,09	1251,6	108,93
	Triosephosphate isomerase	<i>tpiA</i> / PA14_62830	0,1	1764,5	231,873
	Xanthine phosphoribosyltransferase	<i>Xpt</i> / PA14_69940	0,2	2581,5	621,166
	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	<i>gatA</i> / PA14_58180	0,2	1916,73	464,503
	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	<i>rmlD</i> / PA14_68190	0,2	1051,45	193,206
	Glutathione synthetase	<i>gshB</i> / PA14_05310	0,2	1272,33	222,99
	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	<i>carA</i> / PA14_62930	0,2	2197,3	474,233
	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	<i>dapE</i> / PA14_49380	0,2	835,1	145,636
Succinylornithine	<i>aruC</i> / PA14_52720	0,3	2228,8	712,846	

	transaminase/acetylornithine aminotransferase				
	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	<i>gatB</i> / PA14_58190	0,5	2527,83	1202,166
	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	<i>fadB</i> / PA14_25080	0,6	2259,23	1451,866
	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	<i>sucD</i> / PA14_43940	0,6	6372,1	3859,766
	Aromatic-amino-acid aminotransferase	<i>phhC, tyrB</i> / PA14_53010	0,7	1540	1107,286
	Adenosylhomocysteinase	<i>ahcY, SahH</i> /PA14_05620	0,8	4072,56	3127,2
	Aspartate ammonia-lyase	<i>aspA</i> / PA14_71650	0,6	2690,66	1501,666
Biosynthèse et transport de LPS	Lipopolysaccharide export system protein LptA	<i>lptA (yhbN)</i> / PA14_57920	0,5	10202,3	5471,333
	Lipopolysaccharide export system ATP-binding protein LptB	<i>lptB (yhbG)</i> / PA14_57930	1,4	3168,23	4329,166
	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	<i>rmlD</i> / PA14_68190	0,2	1051,45	193,206
Métalloenzymes	Probable metallo-oxidoreductase	PA3768/ PA14_15670	0,4	1700,3	659,86
	Serine--tRNA ligase	<i>serS</i> / PA14_30330	0,5	2548,26	1326,033
	Glutathione synthetase	<i>gshB</i> / PA14_05310	0,2	1272,33	222,99
	Na (+) -translocating NADH-quinone reductase subunit B	<i>nqrB</i> / PA14_25305	3,9	1639,2	6383,966
	Uncharacterized protein	<i>PA105/ShaD</i> / PA14_50700	2,3	2080,06	4880,166

Synthèse ribosomique	30S ribosomal protein S3	<i>rpsC</i> / PA14_08910	1,2	11576	13742,333
	30S ribosomal protein S9	<i>rpsI</i> / PA14_57580	1,4	10432,1	14624,66
Transporteur	Probable ATP-binding component of ABC transporter	<i>dppD</i> / PA14_58470	0,7	1888,9	1343,566
Porines	Peptidoglycan-associated lipoprotein	<i>pal (oprL)</i> / PA14_51710	0,8	10713,4	8274,466
Protéases, protéines chaperonnes	Probable periplasmic serine endoprotease DegP-like	<i>algW</i> / PA14_57760	0,6	1893,63	1111,246
	Chaperone protein DnaK	<i>dnaK</i> / PA14_62970	0,7	6938,3	4594,433
	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	<i>hslU</i> / PA14_66790	0,7	4632,66	3240,6
Système de sécrétion de type III	Type III needle protein PscF	<i>pscF</i> / PA14_42310	0,7	10303,1	7293,2
	Proline-tRNA ligase	<i>proS</i> / PA14_51900	6,1	315,03	1926,9
Réparation de l'ADN	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	<i>trmB</i> / PA14_05000	8,6	119,93	1029,273
Protéines Hypothétique	CMD domain-containing protein	PA2331/ PA14_03490	0,5	3938,53	2050,633
	Probable acyl-CoA dehydrogenase	PA0506/ PA14_68510	0	1140,54	0
	Uncharacterized protein	PA2982/PA14_25500	0,6	2716,3	1734,733
	Uncharacterized protein	PA4717/ PA14_62420	0,4	1812,4	663,3
	Acyl-coenzyme A dehydrogenase	PA2815/ PA14_27730	0,8	2635,9	2155,866
	Uncharacterized protein	PA1057 <i>ShaD</i> / PA14_50700	2,3	2080,06	4880,166
	Uncharacterized protein	PA0935/ PA14_52160	INF	0	1082,87

		(mazG)			
	Uncharacterized protein	<i>SbrR</i> / PA14_26610	INF	0	2002,9
	Zn_protease domain-containing protein	PA1768/ PA14_41690	0,7	3959,23	2745,966
	Rhodanese domain-containing protein	PA5130/ PA14_67750	1,5	5160,56	7517,4
	Ubiquinol-cytochrome c-reductase iron-sulfur subunit	PA4431/ PA14_57570	0,8	3871,76	2936,833
Auto-transporteur et OMP	Autotransporter assembly factor TamA	<i>tamA</i> / PA14_31680	0,2	1390	312,333
	Putative beta-barrel assembly-enhancing protease	PA1005/ PA14_51320	INF*	0	10626,5

**INF = protéine uniquement présente chez le mutant, 0\* = protéine uniquement présente chez le WT, peptide Thresholds: 95,0% minimum, Protein Thresholds: 99,9% minimum and 2 peptides minimum, peptide FDR: 0,1% (Decoy), protein FDR: 1,0% (Decoy)**

## 4 Discussion et Conclusion

---

La ME des bactéries à Gram négatif protège les cellules contre les agressions extérieures et assure leur survie dans des environnement hostiles (Henderson & Nataro, 2001). La synthèse des OMP participe à la survie et la virulence bactérienne. En effet, les OMP sont essentielles au processus d'interactions hôte-pathogène, et sont par exemple impliquées dans l'invasion et l'adhésion aux cellules des hôtes (Lin *et al.*, 2002; Selkrig *et al.*, 2014). L'assemblage efficace des OMP nécessite l'intervention de complexes d'assemblage, indispensables pour le bon fonctionnement de la ME (Ranova *et al.*, 2018). Chez *P. aeruginosa*, deux complexes ont été identifiés : BAM et TAM. Lors de ce travail, je me suis intéressée au complexe TAM, nécessaire pour l'assemblage de certains sous-groupes d'OMP (Heinz *et al.*, 2015; Selkrig *et al.*, 2015; Stubenrauch & Lithgow, 2019). L'implication du complexe TAM dans la virulence a déjà été rapportée chez certaines espèces pathogènes (Selkrig *et al.*, 2012; Struve *et al.*, 2003; Stubenrauch & Lithgow, 2019). Cependant, à l'heure actuelle aucune littérature scientifique n'a rapporté les protéines utilisant le complexe TAM ou son rôle dans la virulence du pathogène opportuniste *P. aeruginosa*.

Au cours de ce projet, plusieurs phénotypes liés à la virulence de *P. aeruginosa*, ont été testés dans l'optique de savoir si ces phénotypes dépendent d'OMP assemblées dans la ME par le complexe TAM. Un premier résultat était que les mutants des gènes du complexe TAM, PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  ne présentent aucun défaut de croissance, suggérant qu'aucune protéine dont la fonction est essentielle pour la survie de la bactérie dépend exclusivement de TAM pour son repliement et son bon adressage. Néanmoins, les mutants forment plus de biofilm que la souche PA14 WT (Figures 3.10) et possèdent une activité flagellaire plus importante (Figure 3.11). Ces deux activités sont fondamentales à l'établissement du biofilm et à la dissémination de *P. aeruginosa* dans les nombreux environnements qu'elle colonise. Ces fonctions permettent à cette bactérie saprophyte et pathogène opportuniste de coloniser un large éventail d'environnements tels que les humains, les plantes, des nématodes, des insectes et des mammifères. Le flagelle est important pour l'étape initiale de formation du biofilm. En effet, en 1998, O'Toole et Kolter, ont rapporté que la motilité médiée par le flagelle, le *swimming*, favorise l'attachement initial aux surfaces lors de la première phase de formation du biofilm (O'Toole & Kolter, 1998a). Le lien entre les gènes *tam* et l'activité du flagelle a déjà été observé chez d'autres genres bactériens, apportant des résultats hétérogènes. Chez *P. mirabilis*, des mutants par transposition dans le gène *tamA* et *tamB* ne présentent aucun défaut

de motilité de type *swarming* (Burall *et al.*, 2004). Tandis que Li et ses collègues rapportent que les mutations du gène *tamA* ou *tamB* chez *Edwardsiella tarda* affectent la formation des flagelles, entraînant ainsi une altération de la motilité (Li *et al.*, 2020). Tandis que pour la motilité de type *swarming*, aucune différence sur la vitesse du *swarming* n'a été observée mais une ramification/formation des dendrites plus tardive a été remarquée chez les mutants. Puisque TAM affecte la sécrétion des protéines, il est légitime de penser que les mutants pourraient posséder un flagelle différent, expliquant l'activité flagellaire différente et le retard dans la formation des dendrites chez les mutants par rapport à la souche PA14 WT. Cependant, nos clichés de microscopie électronique n'ont pas un agrandissement suffisant pour distinguer de façon claire un flagelle, ne me permettant pas de conclure si le flagelle était différent chez les mutants par rapport au WT.

Dans le même temps, nous avons observé une augmentation de la formation de biofilm chez les mutants. Deux scénarios pourraient expliquer ce phénomène : (1) l'augmentation de la motilité favorise la formation du biofilm, ou (2) cette augmentation ne dépend pas de l'activité du flagelle. Pour vérifier cela et tirer une conclusion sur la potentielle implication du complexe TAM dans la formation du biofilm via l'activité flagellaire, d'autres expériences doivent être réalisées et seront discutées dans la partie 5 (perspectives). L'augmentation du biofilm chez les mutants demeure complexe à expliquer, car la formation de biofilm est un processus dynamique, très complexe qui peut être influencé par plusieurs facteurs à différentes étapes. Un des éléments qui pourrait en partie expliquer l'augmentation de la formation de biofilm est l'émergence de variants appelés *Small Colony Variants* (SCV). Chez *P. aeruginosa*, l'émergence de SCV a déjà été associée à une augmentation de formation du biofilm (Déziel *et al.*, 2001). Dans cette étude (Figure 3.13), le pourcentage de SCV formés par les mutants dans des conditions de cultures en biofilm a été largement plus important que ceux de la souche PA14 WT. On pourrait alors émettre l'hypothèse que les mutants *tam* forment des biofilms plus robustes parce qu'ils produisent plus de SCV. Cependant, la relation de causalité entre SCV et biofilms n'est pas encore clairement établie et on ne peut pas affirmer avec certitude que l'augmentation du nombre de SCV soit directement responsable de l'augmentation de la formation de biofilm. Au vu des résultats obtenus, plusieurs autres éléments pourraient expliquer l'augmentation de biofilm observée chez les mutants *tam*. Plusieurs questionnements et hypothèses ont alors été formulés : les mutants sont-ils altérés dans leur chimiotactisme ? C'est-à-dire au lieu d'une mobilité non linéaire dirigée par le chimiotactisme, les mutants adoptent un déplacement linéaire ou en une direction, c'est qui permet un déplacement rapide des cellules mutantes par rapport à la souche PA14 WT et une formation plus efficace de biofilm ? L'implication du

complexe TAM dans la formation du biofilm de *P. aeruginosa* pourrait être un effet indirect causé par l'absence d'une OMP ? Par exemple, la perte ou la modification d'une protéine(s) qui déclenche une réponse induisant une régulation positive des gènes impliqués dans la formation de biofilm.

L'analyse protéomique a révélé que deux protéines impliquées dans la formation de biofilm *P. aeruginosa* étaient différemment exprimées chez la souche mutante. Il s'agit de la protéine GshB, moins abondante chez les mutants *tam*, et la protéine SbrR carrément absente chez la souche PA14 WT et très présente chez les mutants (Tableau 3-1). La protéine GshB est une protéine cytoplasmique que l'on a pourtant retrouvée dans nos fractions d'extraction des protéines membranaires. Il est très probable d'avoir une contamination lors de type d'expérience : en faisant une extraction des membranes j'augmente ma chance de recouvrement des protéines membranaires mais cela n'élimine pas totalement le risque d'avoir des protéines cytoplasmiques. La protéine GshB est une oxydoréductase putative impliquée dans la biosynthèse du glutathion (GSH) (Wongsaroj *et al.*, 2018). Une mutation du gène *gshB* atténue la virulence de *P. aeruginosa* chez les mouches drosophiles et augmente la formation du biofilm de cette bactérie (Wongsaroj *et al.*, 2018). Au cours de ce projet, les résultats de test de virulence chez les mouches drosophiles n'ont montré aucune différence entre les mutants et la souche PA14 WT. Mais, il est nécessaire de reprendre les tests de virulence mais en respectant cette fois les conditions nécessaires au bon fonctionnement du test notamment le contrôle de la lumière et l'humidité.

En plus de la formation de biofilm, j'ai également observé que les mutants du complexe TAM possédaient une modification d'un autre phénotype impliqué dans la virulence de *P. aeruginosa* par rapport à la souche PA14 WT. Il s'agit de la résistance aux antibiotiques. En effet, lorsqu'ils sont comparés à la souche PA14 WT, les mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  ont montré une résistance plus importante à la spectinomycine et à la tobramycine, qui sont tous les deux des antibiotiques cationiques de la famille des aminoglycosides (Figure 3.15 et 3.16). Deux autres antibiotiques de la famille des aminoglycosides dont la néomycine et la streptomycine ont été testés mais n'avaient pas montré des différences de résistance entre les souches. Cela pourrait être lié à la concentration des antibiotiques et à la méthode. Car l'expérience a été effectuée seulement en milieu gélose. L'efficacité de l'action des aminoglycosides dépend en partie de la perméabilité membranaire (Krause *et al.*, 2016). Dans la littérature, il a été rapporté qu'une modification des LPS modifie la charge de la surface bactérienne et réduit l'affinité de liaison des antibiotiques cationiques avec la ME donc

l'absorption de ces antibiotiques (Shakil *et al.*, 2008). La perte de chaînes latérales de l'antigène O chez *P. aeruginosa* est corrélée à la résistance aux aminoglycosides, éventuellement en réduisant la liaison à la surface cellulaire (Kadurugamuwa *et al.*, 1993). Donc ces souches défectueuses en LPS développent une résistance aux aminoglycosides. Il a également été constaté que la tobramycine avait une capacité réduite à perméabiliser les membranes externes de ces mutants (Gunn, 2001; Moosavian *et al.*, 2020; Olaitan *et al.*, 2014; Schurek *et al.*, 2008). Dans le cas actuel, plusieurs éléments indiquent que la résistance accrue des mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  à la spectinomycine et à la tobramycine pourrait être due à une modification des LPS, ou en d'autres mots que le complexe TAM affecte les LPS de *P. aeruginosa*, ce qui aurait causé une diminution de l'entrée des aminoglycosides dans les cellules. Tout d'abord, nos analyses protéomiques ont révélé une plus faible abondance chez le mutant de deux protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des LPS, la protéine LptA et la protéine RmlD. La protéine LptA (anciennement YhbN), fait partie du système Lpt et relie les autres composantes du Lpt dans le périplasme (Tran *et al.*, 2008). Cette protéine permet le transport des LPS de la MI vers la ME et également responsable de l'ajout du phosphoéthanolamine à la tête du lipide A chez *Neisseria meningitidis* (Shapiro *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2008). Donc, la mutation du gène qui code pour la protéine LptA cause une modification de la structure du lipide A chez *Neisseria meningitidis*. C'est qui fait que la mutation de lptA affectera le lipide Le lipide A étant le composant biologiquement actif du LPS, son remodelage est connu pour altérer l'intégrité de la ME de la bactérie (King *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2013). La protéine RmlD est impliquée dans le processus de la biosynthèse de la région centrale des LPS. La mutation du gène *rmlD* chez *V. cholerae* entraîne une colonisation défectueuse en affectant la synthèse des pili (Chiang & Mekalanos, 1999). De plus, Burns et Hull en 1998 ont démontré que chez *E. coli*, la mutation de *rmlD* a entraîné une perte d'expression de l'antigène O mais laisse intact le noyau du LPS et la structure du lipide A, produisant des bactéries viables. Alors, il est probable la diminution de l'abondance de la Lipoprotéine LptA et de la protéine RmlD chez le mutant PA14  $\Delta tamAB$  aie affecté ou modifié la structure des LPS. Le lien entre TAM et la structure des LPS a déjà été rapporté chez d'autres bactéries à Gram négatif. Une étude récente du complexe TAM chez *K. pneumoniae*, a montré que la mutation du gène *tamA* peut altérer la structure des LPS (modification délicate du lipide A) lorsque les cellules sont cultivées dans du milieu en faible teneur de sel (Jung *et al.*, 2021). De plus, la mutation de la protéine AsmA protéine homologue des protéines TAM chez *S. enterica*, a été rapporté comme capable d'induire la résistance aux sels biliaires en activant la transcription de l'opéron *marRAB* et de réduire l'invasion des cellules épithéliales (Prieto *et al.*,

2009). Il est donc légitime de penser que l'absence des protéines TAM aurait un effet sur les LPS de *P. aeruginosa*.

Le LPS de la ME constitue une barrière efficace contre les médicaments et autres molécules nuisibles (Ebbensgaard *et al.*, 2018). Cette fonction de protection dépend de leurs interactions électrostatiques avec les cations divalents tels que  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  qui stabilisent l'interaction latérale entre les molécules de LPS voisines, établissant ainsi une barrière efficace (Hancock *et al.*, 1991b). Les aminoglycosides déplacent de manière compétitive les cations divalents du noyau des LPS, déstabilisant ainsi la membrane et permettant leur transport vers l'intérieur des cellules (Hancock *et al.*, 1981; Rabanal & Cajal, 2017). Toutes ces informations corroborent nos données et nos hypothèses car l'avantage de la croissance qu'avaient les mutants par rapport à la souche PA14 WT en présence de la spectinomycine ou la tobramycine a été annulé dans un milieu MH complété avec les cations divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Figure 3.18). Je propose un modèle où la mutation des gènes *tamA* et *tamB* causerait directement ou indirectement une modification de la structure des LPS, impactant ainsi la disponibilité de sites de liaisons des cations divalents et donc la liaison des aminoglycosides. Les LPS sont également considérés comme un réservoir d'ions magnésium dans des conditions limitantes en magnésium (Groisman *et al.*, 2013). En effet, une carence en  $Mg^{2+}$  active la régulation du système à deux composants PhoP-PhoQ chez plusieurs bactéries à Gram négatif. Chez *P. aeruginosa*, le système de régulation PhoP-PhoQ a été identifié comme un signal impliqué dans la résistance aux aminoglycosides en absence de  $Mg^{2+}$  (McPhee *et al.*, 2006; Mulcahy & Lewenza, 2011). D'ailleurs, l'activité du senseur kinase PhoQ de *P. aeruginosa* est réprimée par l'ajout de cations divalents (Lesley & Waldburger, 2001). De plus, l'activation du PhoP déclenche une cascade de régulation conduisant à une activation des gènes impliqués dans la formation de biofilm (Mulcahy & Lewenza, 2011; Wang *et al.*, 2019). Une perturbation de la disponibilité des cations divalents aurait entraîné une augmentation de la formation de biofilm en activant le système à deux composants PhoP-PhoQ. L'impact de la modification de la structure du LPS sur la formation du biofilm a été décrit chez *H. pylori* : les mutations des gènes impliqués dans la synthèse du lipide A des LPS ont entraîné une augmentation de la forme physique de *H. pylori*, de la formation de biofilm et une diminution de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Gaddy *et al.*, 2015).

En plus de la modification de la structure des LPS, la mutation du complexe TAM pourrait avoir aussi impacté le transport des LPS vers la ME. En effet, la protéine codée par le gène PA\_51320 a été abondamment retrouvée dans les extraits membranaires des souches

mutantes et complètement absente chez la souche PA14 WT. Cette protéine est prédite comme étant à la fois une chaperonne pour les OMP et une métalloprotéase (Rundell *et al.*, 2020; Winsor *et al.*, 2016). Elle permet de maintenir l'intégrité de la ME en favorisant soit l'assemblage, soit la dégradation des OMP, en fonction de leur état de repliement. Chez *E. coli*, la protéine PA\_51320 est une homologue de la protéine BepA (YfgC). Elle aide à l'assemblage de LptD, protéine nécessaire au transport des LPS vers la ME (Klein & Raina, 2019). Cette protéine interagit également avec les composants du complexe Bam (qui est nécessaire au transport des protéines  $\beta$ -barrel vers la ME), et favorise la dégradation de celles qui sont mal repliées (Narita *et al.*, 2013). Vu le rôle de la protéine BepA, la surexpression de la protéine PA\_51320 chez le mutant appuie l'hypothèse de l'implication du complexe TAM dans l'assemblage des protéines du complexe Lpt, et donc le transport des LPS vers la ME. Sperondeo et ses collègues ont rapporté que la protéine TamB présente une similitude frappante avec le système de transport des LPS (Sperandeo *et al.*, 2009). Les trois protéines LptC, LptA et LptD possèdent un domaine de repliement  $\beta$ -jelly roll avec un sillon intérieur hydrophobe (Dong *et al.*, 2014). Ce domaine est également retrouvé chez la protéine TamB (Josts *et al.*, 2017; Ranava *et al.*, 2018). De plus, à l'instar de ces trois protéines, TamB possède un domaine AsmA-like (Ruiz *et al.*, 2021). Bien que l'implication du complexe TAM dans le transport des LPS est une avenue intéressante, elle reste à être vérifiée.

Finalement, ma dernière hypothèse a été formulée qu'une sensibilité de la souche mutante à la spectinomycine et la tobramycine pourrait résulter d'une modification de l'expression d'une ou plusieurs protéines de porines. Les porines sont des protéines qui forment des canaux à travers la ME des bactéries à Gram-négatif et médient l'absorption ou l'efflux d'un certain nombre de composés tels que les ions, les petites molécules nutritives, les antibiotiques et les grands complexes fer-sidérophores (Tamber *et al.*, 2006; Tashiro *et al.*, 2008). Cependant, aucune porine de la ME impliquée dans le transport des antibiotiques ou servant de pompe d'efflux n'a été trouvée dans la liste des protéines différemment exprimées chez le mutant. Ce résultat est très surprenant et inattendu vis à vis de la littérature et du lien établi entre porines et résistance aux antibiotiques. Une explication plausible serait que la méthode LC MS-MS utilisée pour l'analyse, n'est pas adaptée pour la détection des OMP. Tout comme pour ce projet, Jung et ses collègues (Jung *et al.*, 2021) ont étudié le protéome de la souche *K. pneumoniae*  $\Delta tamA$  versus la souche *K. pneumoniae* WT PA14 WT et ont remarqué également une absence de protéines de la ME dans leurs données de la protéomique.

Cependant, j'ai observé que la protéine OprL était moins abondante chez la souche mutante. OprL est une lipoprotéine associée au peptidoglycane de la ME (Lazzaroni & Portalier, 1992; Lim *et al.*, 1997). Elle forme avec la famille des protéines Tol, le système Tol-OprL qui joue un rôle clé dans le maintien de l'intégrité de la ME et de la morphologie cellulaire chez les bactéries à Gram-négatif (Llamas *et al.*, 2000; Llamas *et al.*, 2003). Cette étude est la première à rapporter un lien entre les protéines OprL avec le complexe TAM.

D'après toutes ces observations, l'hypothèse selon laquelle les mutations des gènes *tamA* et *tamB* pourraient supprimer ou délocaliser des OMP notamment une(des) pompe(s) à efflux jusqu'ici inconnue pour transporter les aminoglycosides, n'a pas pu être confirmée. Cependant, des changements significatifs de plusieurs protéines prédites comme étant des protéines de la membrane cytoplasmique étaient mis en évidence. Ces données pourraient être des conséquences indirectes de la mutation des gènes *tamA* et *tamB* et/ou suggèrent une implication du complexe dans l'assemblage des protéines de la membrane cytoplasmique en des OMP.

L'analyse comparative du protéome des souches mutants PA14  $\Delta tamAB$  plus à celui des souches PA14 WT a permis d'identifier 46 protéines différemment exprimées entre les deux souches. Parmi ces 46 protéines, il y a 13 protéines qui ont attiré mon attention, car leur abondance avait significativement varié entre le WT et les mutants et leurs fonctions est en lien avec la ME. Parmi ces 13 protéines, sept protéines étaient régulées à la baisse et 6 étaient régulées à la hausse chez les mutants.

De façon remarquable, les sept protéines (PrpC, HisF1, AtoB, FadE, FabD, GlnS, TpiA) moins abondantes chez le mutant sont des protéines associées aux voies métaboliques des acides aminés, des acides gras et des phospholipides. Les protéines PrpC, AtoB, FadE, FabD sont des enzymes nécessaires à la dégradation et à la biosynthèse des acides gras à courtes chaînes. Plusieurs données dans la littérature ont rapporté que la mutation des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras entraîne une diminution des niveaux de LPS et renforcent l'interaction entre les niveaux de LPS et d'acides gras (Douglass *et al.*, 2021; Emiola *et al.*, 2016). Ainsi, on peut dire que l'absence des gènes du complexe TAM impacte négativement ces voies métaboliques. Il est intéressant de souligner que la protéine FabD qui est fortement réduite chez le mutant est responsable de l'initiation de la synthèse des acides gras chez *E. coli* (Rock & Jackowski, 2002). Afin de vérifier qu'elle pourrait être la conséquence d'une diminution de la synthèse des acides gras chez *E. coli*, des expériences seront proposées et détaillées dans la partie perspectives (partie 5).

L'enzyme TpiA a également été réduite chez le mutant *tam*. Cette enzyme, hautement conservée, catalyse la conversion du phosphate de dihydroxyacétone (DHAP) en D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Cette réaction est importante dans la glycolyse et la gluconéogenèse. TpiA pourrait aussi être impliquée dans le mécanisme de résistance aux antibiotiques notamment les aminoglycosides. En effet, une mutation du gène *tpiA* améliore le métabolisme bactérien du carbone, la respiration et la phosphorylation oxydative, ce qui augmente le potentiel membranaire et favorise l'absorption des aminoglycosides chez *P. aeruginosa* (Xia et al., 2020). Cependant, ces données ne concordent pas avec nos résultats qui montrent une résistance aux aminoglycosides chez les mutants alors que les résultats de la protéomique révèlent une faible abondance de TpiA chez la souche mutante par rapport à la souche PA14 WT.

En plus des protéines moins abondantes chez le mutant *tam*, j'ai également identifié six protéines plus abondantes chez la souche double mutante et quasi absente chez la souche PA14 WT. Ce résultat est surprenant car, si une diminution de l'abondance d'une protéine en conséquence de la mutation du complexe TAM est facilement concevable (toutes les protéines dont le repliement et l'assemblage passent par le complexe TAM seront dégradés par les protéases après leurs accumulations dans le cytoplasme et donc moins abondantes) ; une augmentation de l'abondance des protéines est plus difficile à analyser et interpréter. En effet, il est peu probable que TAM soit un régulateur. Je fais l'hypothèse qu'une augmentation de l'abondance pourrait être l'effet indirecte de la mutation des gènes *tam*. Deux scénarios de régulation indirecte pourraient déboucher sur une augmentation de l'abondance en réponse à la mutation de TAM : (1) ces protéines sont surexprimées pour répondre à un stress induit par l'absence de TAM ou (2) l'absence de TAM a entraîné l'absence d'une protéine inhibitrice de la synthèse de ces protéines.

La protéine SbrR est un facteur anti- $\sigma$  chez *P. aeruginosa* qui lie spécifiquement SbrI et le séquestre au niveau de la MI, en l'empêchant de s'associer à l'ARN polymérase. D'après McGuffie et ses collègues, la protéine SbrR pourrait détecter un stress de l'enveloppe cellulaire et induire l'activation de la protéine SbrI, qui à son tour active l'expression de *muiA* (inhibiteur de mucoïde) et la transition de cellules mobiles à la croissance sous forme de biofilm. Dans ce même article, il a été rapporté que les cellules dépourvues de *sbrR* sont incapables de s'engager dans la motilité d'essaimage et présentent une formation accrue de biofilm en raison de l'augmentation dépendant de SbrI de l'expression de *muiA* observée dans ces cellules (Xia

*et al.*, 2020). Ces résultats sont les contraires de données obtenus des tests de *swimming* ainsi que le test de *swarming*.

En prenant l'ensemble de nos résultats, on peut avancer l'idée que le complexe TAM pourrait être impliqué dans l'assemblage des protéines du complexe LPT. On pense également que la mutation de ce complexe serait impliquée dans la réponse au stress induisant la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*.

En conclusion, la découverte que la perte de TAM réduit la sensibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques aminoglycosides, et que cet effet est abrogé par l'ajout de cations divalents, combiné à l'accroissement des biofilms dans ce mutant, suggèrent fortement que TAM affecte la structure fonctionnelle des LPS. Un complexe TAM non fonctionnel aurait impacté la biosynthèse et/ou le transport des LPS. Les LPS sont des déterminant important de la colonisation et de la virulence des infections des bactéries pathogènes. Des bactéries déficientes en LPS ou dans l'expression de l'antigène O sont atténués dans leur capacité à coloniser l'intestin des cellules hôtes. Donc la double mutation du complexe TAM pourrait participer à l'atténuation de la virulence de *P. aeruginosa* et à la colonisation des cellules hôtes. Identifier et caractériser les protéines dépendantes du complexe TAM devrait permettre de connaître des nouveaux facteurs de virulence et de contribuer à lutter contre la virulence de *P. aeruginosa*.

## 5 Perspectives

---

Au vu de l'implication du complexe TAM dans la virulence de certaines bactéries pathogènes, son implication dans la formation de biofilm ainsi que la diminution de l'abondance de la protéine PscF, il serait intéressant de répéter le test de la virulence chez les mouches drosophiles (Figure 3.19), en améliorant les conditions d'incubation et en surveillant la luminosité afin de créer les conditions du jour et de la nuit. La protéine PscF est bien connue comme étant essentielle pour la translocation des toxines effectrices dans les cellules humaines mais elle facilite également l'établissement et la dissémination de l'infection (Moir *et al.*, 2020; Pastor *et al.*, 2005). Si la mutation du complexe a un effet sur cette protéine alors la virulence pourrait être impactée.

Parmi les protéines pertinentes ressorties dans les résultats protéomiques on retrouve la protéine hypothétique PA2982 (PocB). C'est une protéine décrite en 2013 comme étant un transport transmembranaire qui fait partie de la famille de TonB et forme en s'associant avec les protéines TonB3 et PA2983 un complexe associé à la membrane appelé POC (Cowles *et al.*, 2013). Cowles et ses collègues ont montré que la mutation du gène qui code pour cette protéine n'empêche pas la synthèse du flagelle mais entraîne une localisation aléatoire du flagelle et une modification de la taille des cellules (plus courtes). Étant donné que PocB a beaucoup diminué chez le mutant, il serait donc intéressant d'étudier la morphologie ainsi que la localisation du flagelle des mutants à différents stades de la croissance grâce à la microscopie électronique. Les données préliminaires (Figure 3.2) de l'étude de la morphologie des mutants par transpositions dans le gène *tamB* de PA14, m'a permis de voir que les cellules de la souche mutante sont légèrement plus courtes et arrondies par rapport à celles des souches PA14 WT.

J'ai proposé que l'accroissement de la motilité de type *swimming* observée pourrait favoriser la formation du biofilm. Cependant, l'augmentation du biofilm chez les mutants pourrait aussi n'avoir aucun rapport avec l'activité du flagelle. Pour vérifier cela, il faudrait rajouter la mutation *fliC* dans le double mutant *tamAB* et comparer dans les conditions réalisées dans cette étude la capacité à former de biofilm de ce triple mutant *tamAB fliC*.

L'augmentation de la formation du biofilm pourrait aussi avoir un lien avec la synthèse de glutathion (GSH). D'après Wongsaroj et ses collègues, la glutathion synthétase GshB est nécessaire pour la synthèse du GSH (Wongsaroj *et al.*, 2018). Il semble que la biosynthèse du

GSH pourrait contrôler la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1. Les résultats protéomiques ont montré une diminution de l'abondance de la protéine GshB chez le mutant PA14  $\Delta tamAB$ , c'est qui suggère un lien entre le complexe TAM et la protéine GshB. Il serait intéressant de comparer la quantité du biofilm formé par les mutants PA14  $\Delta tamA$  et PA14  $\Delta tamAB$  par rapport à un mutant du gène *gshB*. De plus, il serait également important de quantifier l'expression génomique de *gshB* par RT-pcr chez les deux mutants.

Plusieurs pistes avaient suggéré l'implication des cations divalents dans la résistance aux cations divalents et la formation de biofilm. Je propose ainsi de tester la formation de biofilm dans un milieu MH plus ou moins des cations divalents.

Au cours de ce projet, j'ai tenté d'identifier les OMP impactées par l'absence des protéines TamA et TamB, mais en effectuant une extraction à la fois de la MI et ME. Comme, il a été remarqué dans les données protéomiques, on retrouve majoritairement des protéines cytoplasmiques au lieu des OMP, afin de remédier à cela, il serait plus impactant d'extraire uniquement la ME tout en évitant au maximum les contaminations avec les protéines des autres compartiments. Il serait également intéressant de refaire une extraction des protéines à partir d'une culture en milieu MH sans antibiotique et un milieu riche TSB. Ces expériences pourraient permettre de voir l'impact de la mutation des gènes *tam* et de conclure si les changements des protéines observés serait la réponse aux stress des différentes souches.

Plusieurs hypothèses liées à la synthèse des LPS nécessitent également d'être vérifiées. Si l'absence du complexe à diminuer l'abondance des LPS ou induit une modification de leurs structures, alors il serait intéressant de vérifier par un gel LPS, l'abondance des LPS en condition de stress et sans stress chez le mutant en comparaison avec la souche PA14 WT. Il serait également pertinent de quantifier l'expression des gènes par RT-pcr *lptA*, *rmID* et *lptB* dans des conditions avec et sans stress. Il serait également intéressant de tester la croissance des mutants versus les PA14 WT à différentes températures.

Il a été remarqué que plusieurs protéines au métabolisme d'acide gras, des acides aminés et des phospholipides ont été moins abondantes chez les mutants. Il serait donc intéressant de tester la croissance des bactéries dans un milieu minimum (M9 par exemple) et en utilisant des acides gras à long et à courtes chaînes comme source principale de carbone.

De plus, il serait très important de confirmer la restauration des phénotypes observés en effectuant une complémentation des gènes *tamA* et/ou l'opéron *tamAB*.

Comme apporté dans la partie, le complexe TAM semble être impliqué dans la colonisation, la résistance et le transport d'un groupe des protéines non connu. Ainsi, comprendre le fonctionnement du module TAM et les protéines dépendantes de TAM pourrait nous permettre de trouver des nouveaux facteurs de virulence et potentiellement des nouvelles cibles antimicrobiennes/anti-infectieuses.

## 6 ANNEXE

---

### 6.1 Sensibilité aux agents antimicrobiens

Différents agents antimicrobiens dont quelques antibiotiques, agents oxydants et un chélateur des métaux ont été testés sur les mutants par transposition en comparaison à la recherche des phénotypes discriminants entre ces souches. La figure 6.1, représente les résultats de test de sensibilité à l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) qui est un agent chélateur qui se lie aux ions fer et calcium. Les résultats montrent qu'il n'y a pas une différence de croissance entre les mutants et la souche PA14 WT.

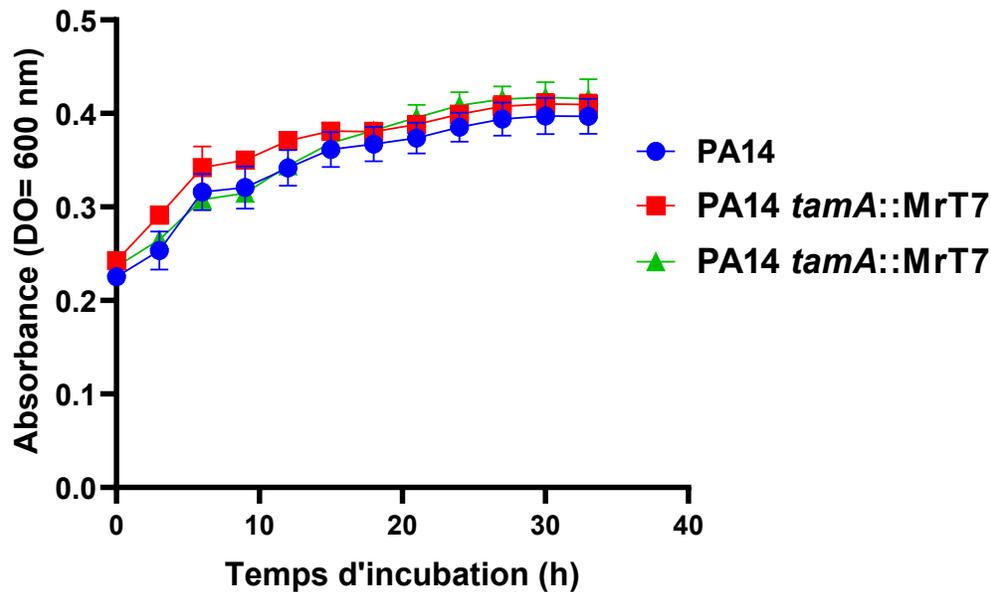


Figure 6-1 : Suivie de croissance en milieu TSB plus EDTA  
Les courbes de croissance des souches PA14 *tamA::GmR*, PA14 *tamB::GmR* et PA14 WT ont été réalisées en milieu TSB plus 1250  $\mu$ M pendant de 36 h. Les quatre souches ont été cultivées dans du milieu TSB, incubées à 37 °C et la DO<sub>600</sub> a été prise toutes les heures.

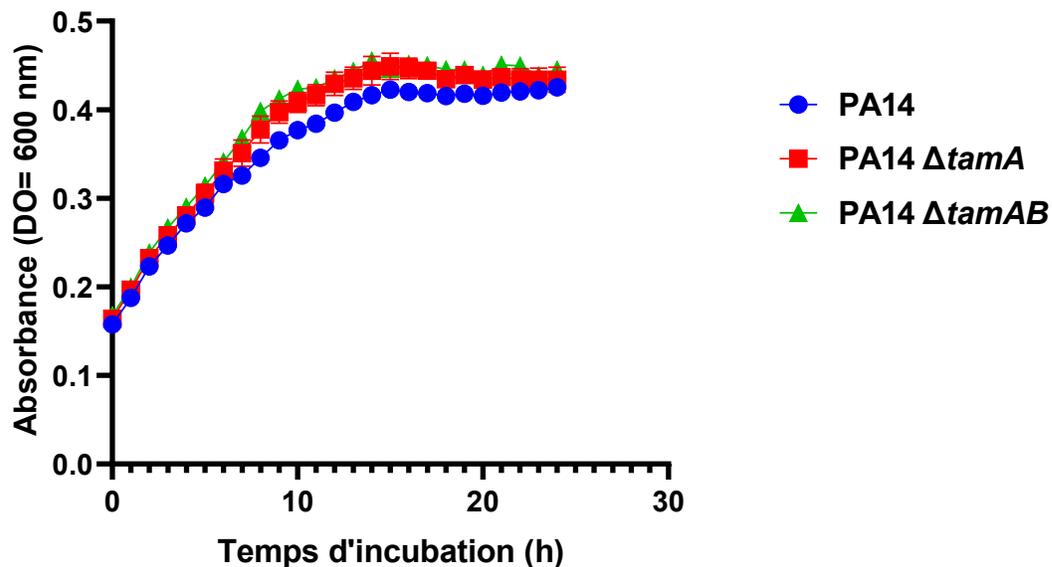


Figure 6-2 : Suivre de croissance en milieu MH plus spectinomycine 25 µg/mL  
 La croissance bactérienne est réalisée en milieu MH auquel on a été ajouté 25 µg/mL de la spectinomycine. Les bactéries ont été incubées à 37 °C pendant et la DO<sub>600</sub> a été prise toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type de DO<sub>600</sub> de triplicats correspondant à un écart type SD de DO<sub>600</sub> de triplicats biologique.

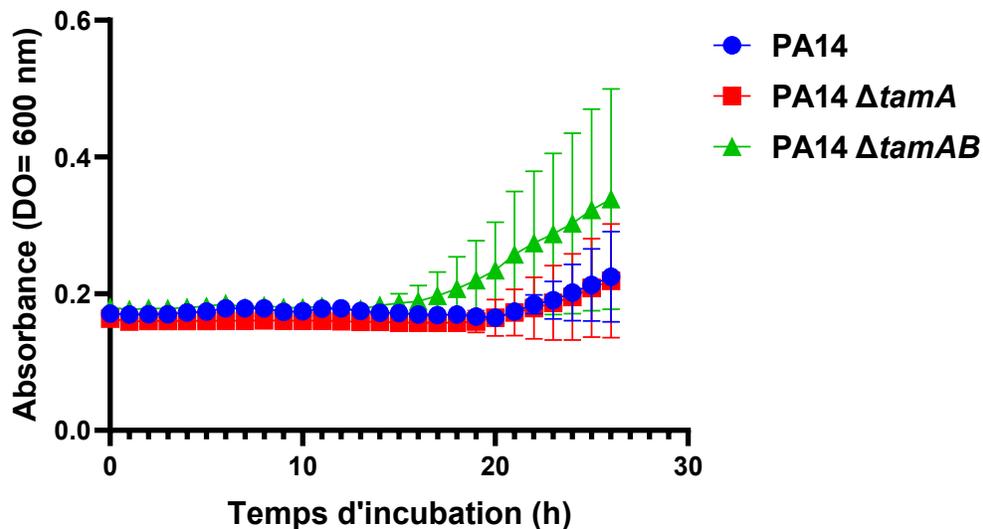


Figure 6-3 : Suivre de croissance en milieu MH plus spectinomycine 150 µg/mL  
 La croissance bactérienne est réalisée en milieu MH auquel on a été ajouté 150 µg/mL de la spectinomycine. Les bactéries ont été incubées à 37 °C pendant et la DO<sub>600</sub> a été prise toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type SD de DO<sub>600</sub> de triplicats biologique.

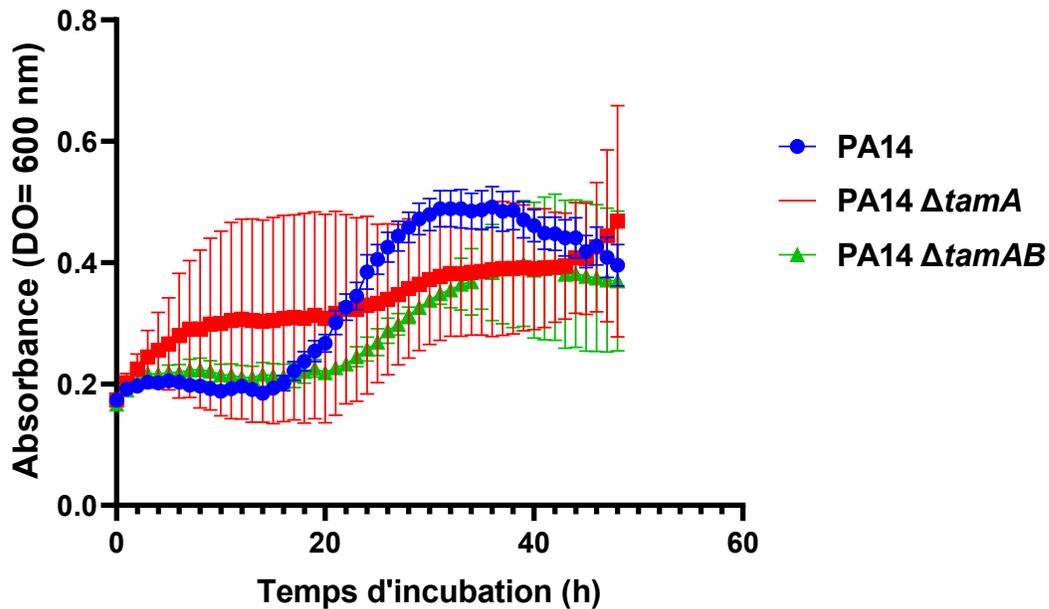


Figure 6-4 : Suivre de croissance en milieu MH plus tobramycine 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . La croissance bactérienne est réalisée en milieu MH auquel on a été ajouté 25  $\mu\text{g/mL}$  de la spectinomycine. Les bactéries ont été incubées à 37°C pendant et la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  a été prise toutes les heures. Les barres d'erreur correspondent à un écart type de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de triplicats biologiques correspondent à un écart type SD de  $\text{DO}_{600}$  de triplicats

## 6.2 Test de *twitching*

La figure 6.5 représente les résultats du test de *twitching* de la souche PA14 WT et des mutants de délétion. Les données semblent dire que le double mutant PA14  $\Delta tamAB$  a une motilité de type *twitching* légèrement réduite par rapport à la souche PA14 WT. Quant au mutant simple PA14  $\Delta tamA$  ne montre pas de différence avec la souche PA14 WT. Tout de même cette expérience a été réalisée qu'une fois donc il serait plus judicieux de reprendre dans les mêmes conditions mais en ayant plus de réplicats par souche.

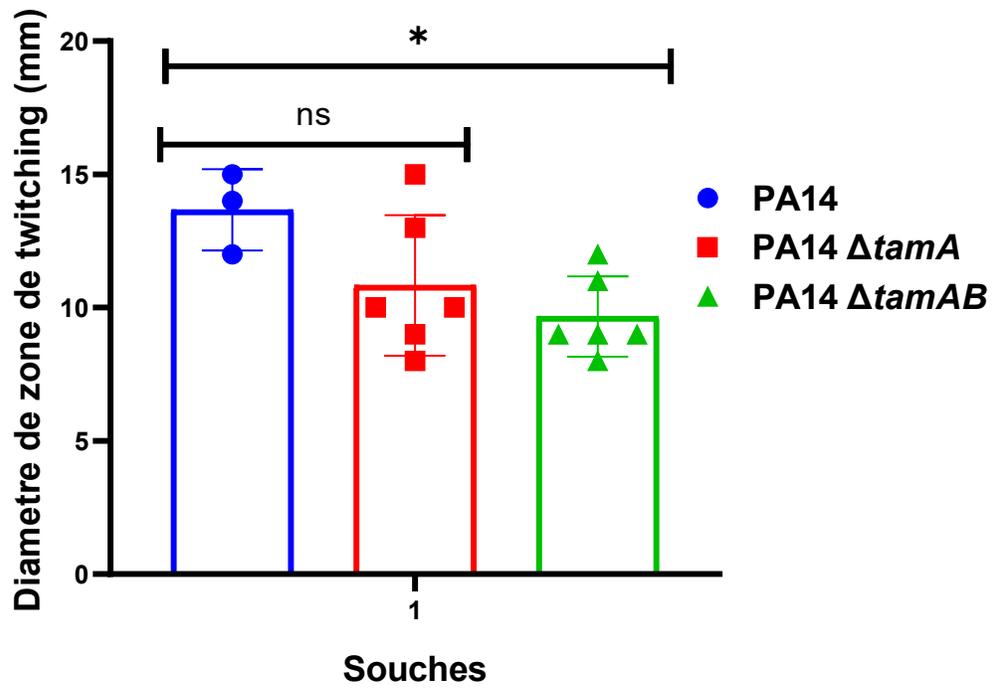


Figure 6-5 : Test *twitching* en milieu LB agar 1%

Le lien pour les données brutes de la protéomique :

[https://www.dropbox.com/sh/s4cuoyl9s1r1h8p/AADrT-8F9\\_iXetR1LortADWYa?dl=0](https://www.dropbox.com/sh/s4cuoyl9s1r1h8p/AADrT-8F9_iXetR1LortADWYa?dl=0)

## 7 Bibliographie

---

- Åhman J, Matuschek E & Kahlmeter G (2020) EUCAST evaluation of 21 brands of Mueller-Hinton dehydrated media for disc diffusion testing. *Clin Microbiol Infect* 26(10):1412 e1411-1412 e1415.
- Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górska S & Gamian A (2017) Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 71(0):78-91.
- Albrecht R, Schütz M, Oberhettinger P, Faulstich M, Bermejo I, Rudel T, Diederichs K & Zeth K (2014) Structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein biogenesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70(Pt 6):1779-1789.
- Annunziato G & Costantino G (2020) Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015-2020). *Expert Opin Ther Pat* 30(12):931-947.
- Anwari K, Poggio S, Perry A, Gatsos X, Ramarathinam SH, Williamson NA, Noinaj N, Buchanan S, Gabriel K, Purcell AW, Jacobs-Wagner C & Lithgow T (2010) A modular BAM complex in the outer membrane of the alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *PLoS One* 5(1):e8619.
- Anwari K, Webb CT, Poggio S, Perry AJ, Belousoff M, Celik N, Ramm G, Lovering A, Sockett RE, Smit J, Jacobs-Wagner C & Lithgow T (2012) The evolution of new lipoprotein subunits of the bacterial outer membrane BAM complex. *Mol Microbiol* 84(5):832-844.
- Apidianakis Y & Rahme LG (2009) *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat Protoc* 4(9):1285-1294.
- Arhin A & Boucher C (2010) The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin. *Microbiology* 156(5):1415-1423.
- Au - O'Toole GA (2011) Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE* doi:10.3791/2437(47):e2437.
- Babu M, Bundalovic-Torma C, Calmettes C, Phanse S, Zhang Q, Jiang Y, Minic Z, Kim S, Mehla J, Gagarinova A, Rodionova I, Kumar A, Guo H, Kagan O, Pogoutse O, Aoki H, Deineko V, Caufield JH, Holtzapple E, Zhang Z, Vastermark A, Pandya Y, Lai CC, El Bakkouri M, Hooda Y, Shah M, Burnside D, Hooshyar M, Vlasblom J, Rajagopala SV, Golshani A, Wuchty S, J FG, Saier M, Uetz P, T FM, Parkinson J & Emili A (2018) Global landscape of cell envelope protein complexes in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 36(1):103-112.
- Babu M, Díaz-Mejía JJ, Vlasblom J, Gagarinova A, Phanse S, Graham C, Yousif F, Ding H, Xiong X, Nazarians-Armavil A, Alamgir M, Ali M, Pogoutse O, Pe'er A, Arnold R, Michaut M, Parkinson J, Golshani A, Whitfield C, Wodak SJ, Moreno-Hagelsieb G, Greenblatt JF & Emili A (2011) Genetic Interaction Maps in *Escherichia coli* Reveal Functional Crosstalk among Cell Envelope Biogenesis Pathways. *PLOS Genetics* 7(11):e1002377.
- Bahar AA & Ren D (2013) Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* 6(12):1543-1575.
- Balganesh M, Dinesh N, Sharma S, Kuruppath S, Nair AV & Sharma U (2012) Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrob Agents Chemother* 56(5):2643-2651.

- Barry AL, Reller LB, Miller GH, Washington JA, Schoenknecht FD, Peterson LR, Hare RS & Knapp C (1992) Revision of standards for adjusting the cation content of Mueller-Hinton broth for testing susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *J Clin Microbiol* 30(3):585-589.
- Baud C, Guérin J, Petit E, Lesne E, Dupré E, Locht C & Jacob-Dubuisson F (2014) Translocation path of a substrate protein through its Omp85 transporter. *Nature communications* 5(1):1-9.
- Becker B & Cooper MA (2013) Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chemical Biology* 8(1):105-115.
- Bernatová S, Samek O, Pilát Z, Serý M, Ježek J, Ják P, Siler M, Krzyžánek V, Zemánek P, Holá V, Dvořáčková M & Růžička F (2013) Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. *Molecules* 18(11):13188-13199.
- Bernstein HD (2000) The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. *Curr Opin Microbiol* 3(2):203-209.
- Besse A, Trottier M, Groleau M-C & Déziel E (2021) The ability of *Pseudomonas aeruginosa* to adopt a Small Colony Variant (SCV) phenotype is conserved, and not restricted to clinical isolates. *bioRxiv* 10.1101/2021.02.05.430018:2021.2002.2005.430018.
- Bilgin N, Richter AA, Ehrenberg M, Dahlberg AE & Kurland CG (1990) Ribosomal RNA and protein mutants resistant to spectinomycin. *EMBO J* 9(3):735-739.
- Blow NS, Salomon RN, Garrity K, Reveillaud I, Kopin A, Jackson FR & Watnick PI (2005) *Vibrio cholerae* Infection of *Drosophila melanogaster* Mimics the Human Disease Cholera. *PLOS Pathogens* 1(1):e8.
- Bos MP, Robert V & Tommassen J (2007) Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* 61:191-214.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bradley DE (1980) A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Canadian Journal of Microbiology* 26(2):146-154.
- Braun M & Silhavy TJ (2002) Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45(5):1289-1302.
- Bryan LE & Kwan S (1983) Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 23(6):835-845.
- Bui T & Preuss CV (2022) Cephalosporins. *StatPearls*, © 2022, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island FL.
- Bulieris PV, Behrens S, Holst O & Kleinschmidt JH (2003) Folding and Insertion of the Outer Membrane Protein OmpA Is Assisted by the Chaperone Skp and by Lipopolysaccharide\*. *Journal of Biological Chemistry* 278(11):9092-9099.
- Burall LS, Harro JM, Li X, Lockett CV, Himpsl SD, Hebel JR, Johnson DE & Mobley HL (2004) *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect Immun* 72(5):2922-2938.

- Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, Ramsey BW & Clausen CR (1998) Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 27(1):158-163.
- Busse HJ, Wöstmann C & Bakker EP (1992) The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. *J Gen Microbiol* 138(3):551-561.
- Cai Y, Fan Y, Wang R, An M-M & Liang B-B (2009) Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(3):563-566.
- Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT & Ramakrishnan V (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407(6802):340-348.
- Chatterjee S & Chaudhuri K (2012) *Outer membrane vesicles of bacteria*. Springer Science & Business Media,
- Chiang SL & Mekalanos JJ (1999) rfb mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. *Infection and immunity* 67(2):976-980.
- Chimalakonda G, Ruiz N, Chng S-S, Garner RA, Kahne D & Silhavy TJ (2011) Lipoprotein LptE is required for the assembly of LptD by the  $\beta$ -barrel assembly machine in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(6):2492-2497.
- Choi YC & Morgenroth E (2003) Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci Technol* 47(5):69-76.
- Clifton LA, Skoda MWA, Le Brun AP, Ciesielski F, Kuzmenko I, Holt SA & Lakey JH (2015) Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir* 31(1):404-412.
- Cloekaert A, Zygmunt MS & Doublet B (2017) Editorial: Genetics of Acquired Antimicrobial Resistance in Animal and Zoonotic Pathogens. *Frontiers in microbiology* 8:2428-2428.
- Coates A, Hu Y, Bax R & Page C (2002) The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov* 1(11):895-910.
- Coleman JP & Smith CJ (2014) Structure and Composition of Microbes☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Cowles KN, Moser TS, Siryaporn A, Nyakudarika N, Dixon W, Turner JJ & Gitai Z (2013) The putative Poc complex controls two distinct *Pseudomonas aeruginosa* polar motility mechanisms. *Molecular microbiology* 90(5):923-938.
- Cox G & Wright GD (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 303(6-7):287-292.
- Craig L & Li J (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* 18(2):267-277.

- Damper PD & Epstein W (1981) Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 20(6):803-808.
- Das S, Kanamoto T, Ge X, Xu P, Unoki T, Munro CL & Kitten T (2009) Contribution of lipoproteins and lipoprotein processing to endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol* 191(13):4166-4179.
- Davis BD (1987) Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* 51(3):341-350.
- Dedonder R (1966) [86] Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol 8. p 500-505.
- Denks K, Vogt A, Sachelaru I, Petriman NA, Kudva R & Koch HG (2014) The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Membr Biol* 31(2-3):58-84.
- Déziel E, Comeau Y & Villemur R (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 183(4):1195-1204.
- Doi Y, Wachino J-I & Arakawa Y (2016) Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 30(2):523-537.
- Dong C, Beis K, Nesper J, Brunkan-Lamontagne AL, Clarke BR, Whitfield C & Naismith JH (2006) Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* 444(7116):226-229.
- Dong H, Xiang Q, Gu Y, Wang Z, Paterson NG, Stansfeld PJ, He C, Zhang Y, Wang W & Dong C (2014) Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature* 511(7507):52-56.
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8(9):881-890.
- Donnenberg MS (2015) 220 - Enterobacteriaceae. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, Bennett JE, Dolin R & Blaser MJ (Édit.) W.B. Saunders, Philadelphia. p 2503-2517.e2505.
- Donowitz GR & Mandell GL (1988) Beta-Lactam Antibiotics. *New England Journal of Medicine* 318(7):419-426.
- Dörr T, Moynihan PJ & Mayer C (2019) Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Frontiers in Microbiology* 10:2051.
- Douglass MV, Cléon F & Trent MS (2021) Cardiolipin aids in lipopolysaccharide transport to the gram-negative outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(15):e2018329118.
- Driessen AJ & Nouwen N (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77:643-667.
- du Plessis DJ, Nouwen N & Driessen AJ (2011a) The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta* 1808(3):851-865.
- du Plessis DJF, Nouwen N & Driessen AJM (2011b) The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808(3):851-865.

- Dunstan RA, Hay ID, Wilksch JJ, Schittenhelm RB, Purcell AW, Clark J, Costin A, Ramm G, Strugnell RA & Lithgow T (2015) Assembly of the secretion pores GspD, Wza and CsgG into bacterial outer membranes does not require the Omp85 proteins BamA or TamA. *Molecular Microbiology* 97(4):616-629.
- Dworkin M (2006) *The Prokaryotes: Vol. 7: proteobacteria: delta and epsilon subclasses. Deeply rooting bacteria*. Springer Science & Business Media,
- Ebbensgaard A, Mordhorst H, Aarestrup FM & Hansen EB (2018) The Role of Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides for the Sensitivity of *Escherichia coli* to Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology* 9.
- El Rayes J, Rodríguez-Alonso R & Collet J-F (2021) Lipoproteins in Gram-negative bacteria: new insights into their biogenesis, subcellular targeting and functional roles. *Current Opinion in Microbiology* 61:25-34.
- Emiola A, Andrews SS, Heller C & George J (2016) Crosstalk between the lipopolysaccharide and phospholipid pathways during outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(11):3108-3113.
- Evans-Roberts KM, Mitchenall LA, Wall MK, Leroux J, Mylne JS & Maxwell A (2016) DNA Gyrase Is the Target for the Quinolone Drug Ciprofloxacin in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 291(7):3136-3144.
- Fair RJ & Tor Y (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem* 6:25-64.
- Fernández-Villa D, Aguilar MR & Rojo L (2019) Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *Int J Mol Sci* 20(20):4996.
- Finch RG, Greenwood D, Norrby SR & Whitley RJ (ANTIBIOTIC AND CHEMOTHERAPY).
- Fleming A (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology* 10(3):226-236.
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N & Molin S (2012) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 10(12):841-851.
- Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC & Puglisi JD (1996) Structure of the A Site of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA Complexed with an Aminoglycoside Antibiotic. *Science* 274(5291):1367-1371.
- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT & Howell PL (2011) Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in microbiology* 2:167-167.
- Gaddy JA, Radin JN, Cullen TW, Chazin WJ, Skaar EP, Trent MS, Algood HMS, Rosch J & McDaniel LS (2015) *Helicobacter pylori* Resists the Antimicrobial Activity of Calprotectin via Lipid A Modification and Associated Biofilm Formation. *mBio* 6(6):e01349-01315.
- Gatsos X, Perry AJ, Anwari K, Dolezal P, Wolyneć PP, Likić VA, Purcell AW, Buchanan SK & Lithgow T (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32(6):995-1009.
- Gaynes R (2017) The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis* 23(5):849-853.

- Gaynor M & Mankin AS (2003) Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem* 3(9):949-961.
- Ge X, Wang R, Ma J, Liu Y, Ezemaduka AN, Chen PR, Fu X & Chang Z (2014) DegP primarily functions as a protease for the biogenesis of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins in the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *FEBS J* 281(4):1226-1240.
- Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R & Lithgow T (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* 164(1):19-24.
- Giamerllou H (1986) Aminoglycosides plus beta-lactams against Gram-negative organisms. *Am J Med* 80(suppl 6B):126-137.
- Giltner CL, Nguyen Y & Burrows LL (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(4):740-772.
- Glauert AM (1962a) The fine structure of bacteria. *Br Med Bull* 18:245-250.
- GLAUERT AM (1962b) THE FINE STRUCTURE OF BACTERIA. *British Medical Bulletin* 18(3):245-250.
- Goemans C, Denoncin K & Collet J-F (2014) Folding mechanisms of periplasmic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1843(8):1517-1528.
- Goldberg JB & Ohman DE (1987) Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* algB mutants: role of algB in high-level production of alginate. *J Bacteriol* 169(4):1593-1602.
- Götz Fv, Häussler S, Jordan D, Saravanamuthu SS, Wehmhöner D, Strüßmann A, Lauber J, Attree I, Buer J, Tümmler B & Steinmetz I (2004) Expression Analysis of a Highly Adherent and Cytotoxic Small Colony Variant of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Lung of a Patient with Cystic Fibrosis. *J Bacteriol* 186(12):3837-3847.
- Gould IM & Bal AM (2013) New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* 4(2):185-191.
- Groisman EA, Hollands K, Kriner MA, Lee E-J, Park S-Y & Pontes MH (2013) Bacterial Mg<sup>2+</sup> homeostasis, transport, and virulence. *Annu Rev Genet* 47:625-646.
- Gruss F, Zähringer F, Jakob RP, Burmann BM, Hiller S & Maier T (2013) The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nat Struct Mol Biol* 20(11):1318-1320.
- Guentzel MN & Berry LJ (1975) Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 11(5):890-897.
- Gunn JS (2001) Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res* 7(1):57-62.
- Gupta RS (2011) Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100(2):171-182.
- Haiko J & Westerlund-Wikström B (2013) The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)* 2(4):1242-1267.
- Hall-Stoodley L & Stoodley P (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 11(7):1034-1043.

- Hancock RE (1984) Alterations in outer membrane permeability. *Annu Rev Microbiol* 38:237-264.
- Hancock RE & Carey AM (1979) Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J Bacteriol* 140(3):902-910.
- Hancock RE, Farmer SW, Li ZS & Poole K (1991a) Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 35(7):1309-1314.
- Hancock RE, Farmer SW, Li ZS & Poole K (1991b) Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 35(7):1309-1314.
- Hancock RE, Raffle VJ & Nicas TI (1981) Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 19(5):777-785.
- Heinz E & Lithgow T (2014) A comprehensive analysis of the Omp85/TpsB protein superfamily structural diversity, taxonomic occurrence, and evolution. *Front Microbiol* 5:370.
- Heinz E, Selkrig J, Belousoff MJ & Lithgow T (2015) Evolution of the Translocation and Assembly Module (TAM). *Genome Biol Evol* 7(6):1628-1643.
- Heinz E, Stubenrauch CJ, Grinter R, Croft NP, Purcell AW, Strugnell RA, Dougan G & Lithgow T (2016) Conserved Features in the Structure, Mechanism, and Biogenesis of the Inverse Autotransporter Protein Family. *Genome Biology and Evolution* 8(6):1690-1705.
- Henderson IR & Nataro JP (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69(3):1231-1243.
- Henrichsen J (1975) The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 83(3):171-178.
- Hermann T (2007) Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* 64(14):1841-1852.
- Hesterkamp T & Bukau B (1998) Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E.coli*. *EMBO J* 17(16):4818-4828.
- Hmelo LR, Borlee BR, Almblad H, Love ME, Randall TE, Tseng BS, Lin C, Irie Y, Storek KM, Yang JJ, Siehnel RJ, Howell PL, Singh PK, Tolker-Nielsen T, Parsek MR, Schweizer HP & Harrison JJ (2015) Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nature Protocols* 10(11):1820-1841.
- Hoang HH, Nickerson NN, Lee VT, Kazimirova A, Chami M, Pugsley AP & Lory S (2011) Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries. *mBio* 2(6):e00246-00211.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ & Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212(1):77-86.
- Höhr AI, Lindau C, Wirth C, Qiu J, Stroud DA, Kutik S, Guiard B, Hunte C, Becker T & Pfanner N (2018) Membrane protein insertion through a mitochondrial  $\beta$ -barrel gate. *Science* 359(6373).

- Høiby N, Ciofu O & Bjarnsholt T (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 5(11):1663-1674.
- Horton RM, Cai Z, Ho SN & Pease LR (2013) Gene Splicing by Overlap Extension: Tailor-Made Genes Using the Polymerase Chain Reaction. *BioTechniques* 54(3):129-133.
- Hospenthal MK, Costa TRD & Waksman G (2017) A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15(6):365-379.
- Huang W & Wilks A (2017) A rapid seamless method for gene knockout in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 17(1):199.
- Hutchings MI, Truman AW & Wilkinson B (2019) Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* 51:72-80.
- Ieva R, Tian P, Peterson JH & Bernstein HD (2011) Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter beta domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(31):E383-391.
- Jacoby GA (2005) Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 41(Supplement\_2):S120-S126.
- Jana S & Deb JK (2006) Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70(2):140-150.
- Jarrell KF & McBride MJ (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6(6):466-476.
- Johnston DM & Cannon JG (1999) Construction of mutant strains of *Neisseria gonorrhoeae* lacking new antibiotic resistance markers using a two gene cassette with positive and negative selection. *Gene* 236(1):179-184.
- Josts I, Stubenrauch CJ, Vadlamani G, Mosbahi K, Walker D, Lithgow T & Grinter R (2017) The Structure of a Conserved Domain of TamB Reveals a Hydrophobic  $\beta$  Taco Fold. *Structure* 25(12):1898-1906 e1895.
- Jung H-J, Sorbara MT & Pamer EG (2021) TAM mediates adaptation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to antimicrobial stress during host colonization and infection. *PLOS Pathogens* 17(2):e1009309.
- Kadurugamuwa JL, Lam JS & Beveridge TJ (1993) Interaction of gentamicin with the A band and B band lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and its possible lethal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 37(4):715-721.
- Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA & Peters G (1998) Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases* 177(4):1023-1029.
- Kannan K, Kanabar P, Schryer D, Florin T, Oh E, Bahroos N, Tenson T, Weissman JS & Mankin AS (2014) The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(45):15958-15963.
- Kaplan JB (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 89(3):205-218.
- Karatan E & Watnick P (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73(2):310-347.
- Katz L & Baltz RH (2016) Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43(2-3):155-176.

- Khalil MAF, Ahmed FA, Elkhateeb AF, Mahmoud EE, Ahmed MI, Ahmed RI, Hosni A, Alghamdi S, Kabrah A, Dablood AS, Hetta HF, Moawad SS & Hefzy EM (2021) Virulence Characteristics of Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* in Clinical Isolates Using a *Galleria mellonella* Model. *Microorganisms* 9(11).
- Khan T, Sankhe K, Suvarna V, Sherje A, Patel K & Dravyakar B (2018) DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 103:923-938.
- Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC & Kahne D (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* 317(5840):961-964.
- King JD, Kocíncová D, Westman EL & Lam JS (2009) Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun* 15(5):261-312.
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S & Tolker-Nielsen T (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48(6):1511-1524.
- Klebba PE & Newton SM (1998) Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. *Curr Opin Microbiol* 1(2):238-247.
- Klein G & Raina S (2019) Regulated Assembly of LPS, Its Structural Alterations and Cellular Response to LPS Defects. *Int J Mol Sci* 20(2):356.
- Koebnik R, Locher KP & Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37(2):239-253.
- Kohanski MA, Dwyer DJ & Collins JJ (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8(6):423-435.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G & Collins JJ (2008) Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 135(4):679-690.
- Konovalova A & Silhavy TJ (2015a) Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1679).
- Konovalova A & Silhavy TJ (2015b) Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1679):20150030.
- Kosikowska P & Lesner A (2016) Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin Ther Pat* 26(6):689-702.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M & Hultgren SJ (2013) Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(4):a010306-a010306.
- Kotra LP (2000) Bacteria Fight Back. *Chemistry & Industry* :341-344.
- Kotra LP, Haddad J & Mobashery S (2000) Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44(12):3249-3256.
- Kovacs-Simon A, Titball RW & Michell SL (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and immunity* 79(2):548-561.
- Krause KM, Serio AW, Kane TR & Connolly LE (2016) Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(6).

- Kumar GB & Black PN (1993) Bacterial long-chain fatty acid transport. Identification of amino acid residues within the outer membrane protein FadL required for activity. *J Biol Chem* 268(21):15469-15476.
- Laird SM & Taylor G (1962) Treatment of gonorrhoea with actinospectacin. *Br J Vener Dis* 38(2):60-63.
- Laloux G & Collet J-F (2017) Major Tom to ground control: how lipoproteins communicate extracytoplasmic stress to the decision center of the cell. *J Bacteriol* 199(21):e00216-00217.
- Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y & Kocíncová D (2011) Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol* 2:118.
- Lazzaroni JC, Germon P, Ray M-C & Vianney A (1999) The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiology Letters* 177(2):191-197.
- Lazzaroni JC & Portalier R (1992) The excC gene of *Escherichia coli* K-12 required for cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL). *Mol Microbiol* 6(6):735-742.
- Lee J, Sutterlin HA, Wzorek JS, Mandler MD, Hagan CL, Grabowicz M, Tomasek D, May MD, Hart EM & Silhavy TJ (2018) Substrate binding to BamD triggers a conformational change in BamA to control membrane insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(10):2359-2364.
- Lee J & Zhang L (2014) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell* 6:26 - 41.
- Lee PA, Tullman-Ercek D & Georgiou G (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* 60:373-395.
- Lesley JA & Waldburger CD (2001) Comparison of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* PhoQ sensor domains: evidence for distinct mechanisms of signal detection. *J Biol Chem* 276(33):30827-30833.
- Li M-f, Jia B-b, Sun Y-y & Sun L (2020) The Translocation and Assembly Module (TAM) of *Edwardsiella tarda* Is Essential for Stress Resistance and Host Infection. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T & Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2833-2838.
- Lim A, De Vos D, Brauns M, Mossialos D, Gaballa A, Qing D & Cornells P (1997) Molecular and immunological characterization of OprL, the 18 kDa outer-membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 143(5):1709-1716.
- Lin J, Huang S & Zhang Q (2002) Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect* 4(3):325-331.
- Liu D (2019) *Escherichia coli*☆. *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)*, Schmidt TM (Édit.) Academic Press, Oxford. p 171-182.

- Llamas MA, Ramos JL & Rodríguez-Herva JJ (2000) Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J Bacteriol* 182(17):4764-4772.
- Llamas MA, Rodríguez-Herva JJ, Hancock REW, Bitter W, Tommassen J & Ramos JL (2003) Role of *Pseudomonas putida* *tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* 185(16):4707-4716.
- Llano-Sotelo B, Azucena EF, Jr., Kotra LP, Mobashery S & Chow CS (2002) Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem Biol* 9(4):455-463.
- Luirink J, Yu Z, Wagner S & de Gier J-W (2012) Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817(6):965-976.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K & Wozniak DJ (2009) Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens* 5(3):e1000354-e1000354.
- Macfarlane ELA, Kwasnicka A & Hancock REW (2000) Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* 146(10):2543-2554.
- Maddison JE, Watson ADJ & Elliott J (2008) Chapter 8 - Antibacterial drugs. *Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition)*, Maddison JE, Page SW & Church DB (Édit.) W.B. Saunders, Edinburgh. p 148-185.
- Malinverni JC, Werner J, Kim S, Sklar JG, Kahne D, Misra R & Silhavy TJ (2006a) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61(1):151-164.
- Malinverni JC, Werner J, Kim S, Sklar JG, Kahne D, Misra R & Silhavy TJ (2006b) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 61(1):151-164.
- Malojčić G, Andres D, Grabowicz M, George AH, Ruiz N, Silhavy TJ & Kahne D (2014) LptE binds to and alters the physical state of LPS to catalyze its assembly at the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(26):9467-9472.
- Marra A, Lawson S, Asundi JS, Brigham D & Hromockyj AE (2002) In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology (Reading)* 148(Pt 5):1483-1491.
- Martinez JL (2014) General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol* 11:33-39.
- Mason DJ, Dietz A & Smith RM (1961) Actinospectacin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *Antibiot Chemother (Northfield)* 11:118-122.
- Mattick JS (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56:289-314.
- Mazgaen L & Gurung P (2020) Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci* 21(2).
- McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS & Hancock RE (2006) Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg<sup>2+</sup>-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188(11):3995-4006.

- Mecenas J, Welch R, Erickson JW & Gross CA (1995) Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 177(3):799-804.
- Merdanovic M, Clausen T, Kaiser M, Huber R & Ehrmann M (2011) Protein quality control in the bacterial periplasm. *Annu Rev Microbiol* 65:149-168.
- Merz AJ, So M & Sheetz MP (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407(6800):98-102.
- Miller MH, Edberg SC, Mandel LJ, Behar CF & Steigbigel NH (1980) Gentamicin uptake in wild-type and aminoglycoside-resistant small-colony mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 18(5):722-729.
- Miot M & Betton J-M (2004) Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb Cell Fact* 3(1):4-4.
- Moazed D & Noller HF (1987) Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327(6121):389-394.
- Moir DT, Bowlin NO, Berube BJ, Yabut J, Mills DM, Nguyen GT, Aron ZD, Williams JD, Mecenas J, Hauser AR & Bowlin TL (2020) A Structure-Function-Inhibition Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion Needle Protein PscF. *J Bacteriol* 202(18).
- Moosavian M, Emam N, Pletzer D & Savari M (2020) Rough-type and loss of the LPS due to lpx genes deletions are associated with colistin resistance in multidrug-resistant clinical *Escherichia coli* isolates not harbouring mcr genes. *PLOS ONE* 15(5):e0233518.
- Moradali MF, Ghods S & Rehm BHA (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:39-39.
- Morona R, Manning PA & Reeves P (1983) Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 153(2):693-699.
- Mueller JH & Hinton J (1941) A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the Gonococcus and Meningococcus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 48(1):330-333.
- Mühlberg E, Umstätter F, Kleist C, Domhan C, Mier W & Uhl P (2020) Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. *Can J Microbiol* 66(1):11-16.
- Mühlradt PF & Golecki JR (1975) Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem* 51(2):343-352.
- Mulcahy H & Lewenza S (2011) Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PloS one* 6(8):e23307-e23307.
- Munita JM & Arias CA (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4(2).
- Nakae T (1986) Outer-Membrane Permeability of Bacteria. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 13(1):1-62.
- Nanninga N (2014) Cell Structure, Organization, Bacteria and Archaea☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier.

- Narita S, Masui C, Suzuki T, Dohmae N & Akiyama Y (2013) Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of  $\beta$ -barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(38):E3612-3621.
- Nikaido H (1994) Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science* 264(5157):382-388.
- Nikaido H (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4):593-656.
- Nikaido H & Vaara M (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49(1):1-32.
- Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ & Buchanan SK (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* 64:43-60.
- Noller HF (1991) Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem* 60:191-227.
- O'Neill J (2014) Review on antimicrobial resistance.
- O'Toole GA & Kolter R (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30(2):295-304.
- O'Toole GA & Kolter R (1998b) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28(3):449-461.
- O'Shea R & Moser HE (2008) Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 51(10):2871-2878.
- Okuda S & Tokuda H (2011) Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 65(1):239-259.
- Olaitan AO, Morand S & Rolain J-M (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology* 5:643-643.
- Oliphant CM & Green GM (2002) Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician* 65(3):455-464.
- Pagès J-M, James CE & Winterhalter M (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6(12):893-903.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA & Bonomo RA (2011) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 55(11):4943-4960.
- Pastor A, Chabert J, Louwagie M, Garin J & Attree I (2005) PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiology Letters* 253(1):95-101.
- Pellicic V, Reytrat JM & Gicquel B (1996) Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* 178(4):1197-1199.
- Peterson E & Kaur P (2018) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Prammananan T, Sander P, Brown BA, Frischkorn K, Onyi GO, Zhang Y, Böttger EC & Wallace RJ, Jr. (1998) A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to

- amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis* 177(6):1573-1581.
- Prieto AI, Hernández SB, Cota I, Pucciarelli MG, Orlov Y, Ramos-Morales F, García-del Portillo F & Casadesús J (2009) Roles of the outer membrane protein AsmA of *Salmonella enterica* in the control of marRAB expression and invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* 191(11):3615-3622.
- Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN & Arbeit RD (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20(1):95-102.
- Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M & Peters G (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology* 4(4):295-305.
- Quandt J & Hynes MF (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127(1):15-21.
- Rabanal F & Cajal Y (2017) Recent advances and perspectives in the design and development of polymyxins. *Nat Prod Rep* 34(7):886-908.
- Raetz CR & Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635-700.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG & Ausubel FM (1995) Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. *Science* 268(5219):1899-1902.
- Ramirez MS & Tolmasky ME (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13(6):151-171.
- Ramón-García S, Martín C, De Rossi E & Ainsa JA (2007) Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Antimicrob Chemother* 59(3):544-547.
- Ranova D, Caumont-Sarcos A, Albenne C & Ieva R (2018) Bacterial machineries for the assembly of membrane-embedded  $\beta$ -barrel proteins. *FEMS Microbiol Lett* 365(10).
- Recht MI, Douthwaite S & Puglisi JD (1999) Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 18(11):3133-3138.
- Reygaert WC (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 4(3):482-501.
- Reynolds PE (1989) Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8(11):943-950.
- Ricci DP & Silhavy TJ (2012) The Bam machine: a molecular cooper. *Biochim Biophys Acta* 1818(4):1067-1084.
- Ried JL & Collmer A (1987) An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* 57(2-3):239-246.
- Rigel NW & Silhavy TJ (2012) Making a beta-barrel: assembly of outer membrane proteins in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 15(2):189-193.
- Rock CO & Jackowski S (2002) Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 292(5):1155-1166.

- Rollauer SE, Soorshjani MA, Noinaj N & Buchanan SK (2015) Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1679).
- Roy R, Tiwari M, Donelli G & Tiwari V (2018) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 9(1):522-554.
- Ruiz N, Davis RM, Kumar S & Gottesman S (2021) YhdP, TamB, and YdbH Are Redundant but Essential for Growth and Lipid Homeostasis of the Gram-Negative Outer Membrane. *mBio* 12(6):e02714-02721.
- Ruiz N, Kahne D & Silhavy TJ (2006) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 4(1):57-66.
- Rumbaugh KP & Sauer K (2020) Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology* 18(10):571-586.
- Rundell EA, Commodore N, Goodman AL & Kazmierczak BI (2020) A Screen for Antibiotic Resistance Determinants Reveals a Fitness Cost of the Flagellum in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 202(6).
- Rybak LP & Whitworth CA (2005) Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov Today* 10(19):1313-1321.
- Salimi A, Eybagi S, Seydi E, Naserzadeh P, Kazerouni NP & Pourahmad J (2016) Toxicity of macrolide antibiotics on isolated heart mitochondria: a justification for their cardiotoxic adverse effect. *Xenobiotica* 46(1):82-93.
- Sánchez-Encinales V, Álvarez-Marín R, Pachón-Ibáñez ME, Fernández-Cuenca F, Pascual A, Garnacho-Montero J, Martínez-Martínez L, Vila J, Tomás MM, Cisneros JM, Bou G, Rodríguez-Baño J, Pachón J & Smani Y (2017) Overproduction of Outer Membrane Protein A by *Acinetobacter baumannii* as a Risk Factor for Nosocomial Pneumonia, Bacteremia, and Mortality Rate Increase. *J Infect Dis* 215(6):966-974.
- Sánchez-Pulido L, Devos D, Genevrois S, Vicente M & Valencia A (2003) POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 28(10):523-526.
- Sandoval CM, Baker SL, Jansen K, Metzner SI & Sousa MC (2011) Crystal structure of BamD: an essential component of the  $\beta$ -Barrel assembly machinery of gram-negative bacteria. *J Mol Biol* 409(3):348-357.
- Schatz A, Bugle E & Waksman SA (1944) Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.\*†. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 55(1):66-69.
- Schindler M & Osborn MJ (1979) Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry* 18(20):4425-4430.
- Scholar E (2007) Aminoglycosides. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Enna SJ & Bylund DB (Édit.) Elsevier, New York <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61015-3p1-4>.
- Schurek KN, Marr AK, Taylor PK, Wiegand I, Semenek L, Khaira BK & Hancock REW (2008) Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(12):4213-4219.
- Selkrig J, Belousoff MJ, Headey SJ, Heinz E, Shiota T, Shen H-H, Beckham SA, Bamert RS, Phan M-D, Schembri MA, Wilce MCJ, Scanlon MJ, Strugnell RA & Lithgow T (2015)

- Conserved features in TamA enable interaction with TamB to drive the activity of the translocation and assembly module. *Sci Rep* 5:12905-12905.
- Selkrig J, Leyton DL, Webb CT & Lithgow T (2014) Assembly of  $\beta$ -barrel proteins into bacterial outer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843(8):1542-1550.
- Selkrig J, Mosbahi K, Webb CT, Belousoff MJ, Perry AJ, Wells TJ, Morris F, Leyton DL, Totsika M, Phan MD, Celik N, Kelly M, Oates C, Hartland EL, Robins-Browne RM, Ramarathinam SH, Purcell AW, Schembri MA, Strugnell RA, Henderson IR, Walker D & Lithgow T (2012) Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat Struct Mol Biol* 19(5):506-510, S501.
- Shah NR, Albitar-Nehme S, Kim E, Marr N, Novikov A, Caroff M & Fernandez RC (2013) Minor modifications to the phosphate groups and the C3' acyl chain length of lipid A in two *Bordetella pertussis* strains, BP338 and 18-323, independently affect Toll-like receptor 4 protein activation. *J Biol Chem* 288(17):11751-11760.
- Shakil S, Khan R, Zarrilli R & Khan AU (2008) Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of Biomedical Science* 15(1):5-14.
- Shallcross LJ, Howard SJ, Fowler T & Davies SC (2015) Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1670):20140082-20140082.
- Shapiro AB, Gu RF & Gao N (2014) Dimerization of isolated *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide transporter component LptA. *Biochem Biophys Res Commun* 450(4):1327-1332.
- Shapiro L (1995) The bacterial flagellum: from genetic network to complex architecture. *Cell* 80(4):525-527.
- Shen H-H, Leyton DL, Shiota T, Belousoff MJ, Noinaj N, Lu J, Holt SA, Tan K, Selkrig J, Webb CT, Buchanan SK, Martin LL & Lithgow T (2014) Reconstitution of a nanomachine driving the assembly of proteins into bacterial outer membranes. *Nature communications* 5:5078-5078.
- Sigmund CD, Ettayebi M & Morgan EA (1984) Antibiotic resistance mutations in 16S and 23S ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 12(11):4653-4663.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB & Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews* 35(4):652-680.
- Silhavy TJ, Kahne D & Walker S (2010a) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(5):a000414.
- Silhavy TJ, Kahne D & Walker S (2010b) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(5):a000414-a000414.
- Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1(9):784-791.
- Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D & Silhavy TJ (2007a) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(15):6400-6405.

- Sklar JG, Wu T, Kahne D & Silhavy TJ (2007b) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 21(19):2473-2484.
- Smith KP, Voogt RD, Ruiz T & Mintz KP (2016) The conserved carboxyl domain of MorC, an inner membrane protein of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, is essential for membrane function. *Mol Oral Microbiol* 31(1):43-58.
- Spelman DW, Spicer WJ & McDonald M (1989) Aminoglycoside antibiotic agents: a review. *Medical Journal of Australia* 151(6):346-349.
- Sperandeo P, Dehò G & Polissi A (2009) The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1791(7):594-602.
- Stanier RY (1979) Introduction to the microbial world.).
- Starkey M, Hickman JH, Ma L, Zhang N, De Long S, Hinz A, Palacios S, Manoil C, Kirisits MJ, Starner TD, Wozniak DJ, Harwood CS & Parsek MR (2009a) *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* 191(11):3492-3503.
- Starkey M, Hickman JH, Ma L, Zhang N, Long SD, Hinz A, Palacios S, Manoil C, Kirisits MJ, Starner TD, Wozniak DJ, Harwood CS & Parsek MR (2009b) *Pseudomonas aeruginosa* Rugose Small-Colony Variants Have Adaptations That Likely Promote Persistence in the Cystic Fibrosis Lung. *J Bacteriol* 191(11):3492-3503.
- Steinmetz M, Le Coq D, Djemia HB & Gay P (1983) [Genetic analysis of sacB, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg]. *Mol Gen Genet* 191(1):138-144.
- Stocco G, Lucafò M & Decorti G (2020) Pharmacogenomics of Antibiotics. *Int J Mol Sci* 21(17):5975.
- Strahl H & Errington J (2017) Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu Rev Microbiol* 71:519-538.
- Struve C, Forestier C & Krogfelt KA (2003) Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. *Microbiology* 149(1):167-176.
- Stubenrauch C, Belousoff MJ, Hay ID, Shen H-H, Lillington J, Tuck KL, Peters KM, Phan M-D, Lo AW & Schembri MA (2016) Effective assembly of fimbriae in *Escherichia coli* depends on the translocation assembly module nanomachine. *Nature microbiology* 1(7):1-8.
- Stubenrauch CJ & Lithgow T (2019) The TAM: A Translocation and Assembly Module of the beta-Barrel Assembly Machinery in Bacterial Outer Membranes. *EcoSal Plus* 8(2).
- Taber HW, Mueller JP, Miller PF & Arrow AS (1987) Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* 51(4):439-457.
- Takahashi H, Carlson RW, Muszynski A, Choudhury B, Kim KS, Stephens DS & Watanabe H (2008) Modification of lipooligosaccharide with phosphoethanolamine by LptA in *Neisseria meningitidis* enhances meningococcal adhesion to human endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* 76(12):5777-5789.
- Tamber S, Ochs MM & Hancock REW (2006) Role of the Novel OprD Family of Porins in Nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188(1):45-54.

- Tashiro Y, Nomura N, Nakao R, Senpuku H, Kariyama R, Kumon H, Kosono S, Watanabe H, Nakajima T & Uchiyama H (2008) Opr86 Is Essential for Viability and Is a Potential Candidate for a Protective Antigen against Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190(11):3969-3978.
- Taylor BL & Koshland DE, Jr. (1974) Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria: generation of changes in direction. *J Bacteriol* 119(2):640-642.
- Teissié J & Zerbib D (2018) Eradication of Bacteria Via Electropulsation. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Wandelt K (Édit.) Elsevier, Oxford. p 224-234.
- Thompson J, Skeggs PA & Cundliffe E (1985) Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to the aminoglycoside antibiotics gentamicin and kanamycin determined by DNA from the gentamicin-producer, *Micromonospora purpurea*. *Mol Gen Genet* 201(2):168-173.
- Toker AS & Macnab RM (1997) Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J Mol Biol* 273(3):623-634.
- Tokuda H & Matsuyama S-i (2004) Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1693(1):5-13.
- Tomasz A (1979) The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* 33:113-137.
- Tran AX, Trent MS & Whitfield C (2008) The LptA protein of *Escherichia coli* is a periplasmic lipid A-binding protein involved in the lipopolysaccharide export pathway. *The Journal of biological chemistry* 283(29):20342-20349.
- Trautmann M, Lepper PM & Haller M (2005) Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 33(5 Suppl 1):S41-49.
- Tsirigotaki A, De Geyter J, Šoštaric´ N, Economou A & Karamanou S (2017) Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nature Reviews Microbiology* 15(1):21-36.
- Ueda A & Wood TK (2009) Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog* 5(6):e1000483.
- Uppalapati SR, Sett A & Pathania R (2020) The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Uyttendaele M & Debevere J (2003) 15 - The use of applied systematics to identify foodborne pathogens. *Detecting Pathogens in Food*, Mcmeekin TA (Édit.) Woodhead Publishing, p 332-359.
- van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP & Aarts HJM (2011) Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology* 2:203-203.
- Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40(4):277-283.
- Wagner D, Sangari FJ, Parker A & Bermudez LE (2005) fecB, a gene potentially involved in iron transport in *Mycobacterium avium*, is not induced within macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 247(2):185-191.
- Wall D & Kaiser D (1999) Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology* 32(1):01-10.

- Wang T, Flint S & Palmer J (2019) Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. *Biofouling* 35(9):959-974.
- Webb CT, Heinz E & Lithgow T (2012) Evolution of the  $\beta$ -barrel assembly machinery. *Trends Microbiol* 20(12):612-620.
- Whitfield C & Trent MS (2014) Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem* 83:99-128.
- Wimley WC (2003) The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* 13(4):404-411.
- Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA & Brinkman FS (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* 44(D1):D646-653.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP & Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39(3):309-317.
- Wongsaroj L, Saninjuk K, Romsang A, Duang-Nkern J, Trinachartvanit W, Vattanaviboon P & Mongkolsuk S (2018) *Pseudomonas aeruginosa* glutathione biosynthesis genes play multiple roles in stress protection, bacterial virulence and biofilm formation. *PLoS One* 13(10):e0205815.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ & Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17(9):3469-3478.
- Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ & Kahne D (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* 121(2):235-245.
- Wu T, McCandlish AC, Gronenberg LS, Chng SS, Silhavy TJ & Kahne D (2006) Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(31):11754-11759.
- Xia Y, Wang D, Pan X, Xia B, Weng Y, Long Y, Ren H, Zhou J, Jin Y, Bai F, Cheng Z, Jin S & Wu W (2020) TpiA is a Key Metabolic Enzyme That Affects Virulence and Resistance to Aminoglycoside Antibiotics through CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 11(1).
- Ye J & van den Berg B (2004) Crystal structure of the bacterial nucleoside transporter Tsx. *EMBO J* 23(16):3187-3195.
- Yilancioglu K (2019) Antimicrobial Drug Interactions: Systematic Evaluation of Protein and Nucleic Acid Synthesis Inhibitors. *Antibiotics (Basel)* 8(3):114.
- Zahar JR & Lesprit P (2014) Management of multidrug resistant bacterial endemic. *Med Mal Infect* 44(9):405-411.
-