

**DIFFERENTS TYPES DE *QUORUM SENSING* DU PATHOGENE
OPPORTUNISTE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* :
CARACTERISATION DE SOUCHES CLINIQUES ET
ENVIRONNEMENTALES**

Par
Hélène Taillefer

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Richard Villemur
INRS-Centre Armand Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Olivier Lesouhaitier
LMSM – IUT Evreux, Université de
Rouen

Directeur de recherche

Éric Déziel
INRS –Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Mes remerciements seront d'abord adressés à mon directeur de maîtrise, le professeur Éric Déziel pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Merci pour sa disponibilité, pour son soutien et ses conseils professionnels qui m'ont beaucoup apporté.

Un merci particulier à Marie-Christine Groleau, pour ses précieux conseils, son aide et sa confiance tout au long de mon projet.

Un grand merci également à Marianne Piochon pour le temps qu'elle m'a accordé et les conseils qu'elle a su m'apporter qui ont été essentiels dans la réalisation du projet.

Merci à toute l'équipe du laboratoire et particulièrement à Zeneba, Samar, Charles, Thays et Alison, pour votre accompagnement, pour vos conseils, votre bonne humeur.

Enfin, je remercie plus personnellement mes parents pour leur soutien apporté au quotidien.

RÉSUMÉ

Classée priorité 1 (critique) par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est une cause importante d'infections et de mortalité principalement chez les individus atteints de fibrose kystique. Ce pathogène opportuniste, prévalent dans nos environnements utilise un mécanisme densité-dépendant de communication intercellulaire (*quorum sensing*) lui permettant de moduler entre autres, sa virulence. Ce mécanisme hiérarchisé débute par l'activation du système Las, permettant ensuite l'activation des systèmes Rhl et PQS. La prévalence de mutants dans le système Las a beaucoup été rapportée dans des études sur des souches cliniques isolées d'individus atteints de fibrose kystique, impliquant la mise en place d'hypothèses de pressions environnementales menant à la sélection de tels mutants.

Leur prévalence restait essentiellement inconnue dans d'autres environnements. Après analyse et caractérisation de nombreuses souches environnementales (évier d'hôpitaux, sols contaminés, produits alimentaires), presque 50% des isolats montrent des phénotypes indiquant un défaut de fonctionnement du système Las. Par ailleurs, plusieurs de ces isolats montrent un phénotype particulier, certains ont par exemple conservé la capacité de production des cibles du système Rhl dont l'activation dépend normalement du système Las. Les différents phénotypes étudiés ont permis la mise en place d'une méthode fiable de caractérisation des isolats.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, souches environnementales, *quorum sensing*, LasR, RhlR.

ABSTRACT

Classified as priority 1 (critical) by the World Health Organization (WHO), the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an important cause of infections and mortality mainly for individuals with cystic fibrosis. This opportunistic pathogen, prevalent in our environments, uses a bacterial communication process that is density-dependent (quorum sensing) allowing it to modulate among other things, its virulence. This hierarchical mechanism begins with the activation of the Las system is activated, allowing then the activation of the Rhl and PQS systems. The prevalence of mutants for the Las system has been widely reported in studies of clinical strains isolated from patients with cystic fibrosis, involving the establishment of hypotheses of environmental pressures leading to this mutation. The incidence of such mutants remained largely unknown in other environments. After analysis and characterization of many environmental strains (hospital sinks, contaminated soil, food produce), almost 50% of isolates show phenotypes indicating a malfunction of the Las system. Furthermore, various Las mutant strains show a particular phenotype Some have, for instance maintained the ability to produce targets of the Rhl system whose activation normally depends on the Las system. The different phenotypes studied allowed the establishment of a reliable method of characterization of the isolates.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, environmental strains, quorum sensing, environment, LasR, RhlR.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ÉQUATIONS	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
1 INTRODUCTION ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1.1 INTRODUCTION	1
1.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	2
1.2.1 <i>Généralité et description</i>	2
1.2.2 <i>Enjeux sanitaires</i>	2
1.2.2.1. Fibrose kystique	2
1.2.2.2. Multirésistance aux antibiotiques	3
1.2.2.3. Etat bactérien	3
1.3 COMMUNICATION BACTERIENNE	4
1.3.1 <i>Le quorum sensing</i>	4
1.2.2.4. Généralités et utilités pour la bactérie	4
1.2.2.5. Fonctionnement chez les bactéries à Gram négatif	5
1.3.2 <i>Le quorum sensing chez P. aeruginosa</i>	6
1.2.2.6. Le système Las	6
1.2.2.7. Le système Rhl.....	6
1.2.2.8. Le système PQS.....	7
1.2.2.9. Hiérarchisation et interactions des systèmes	8
1.4 FACTEURS DE VIRULENCE CONTROLES PAR LE <i>QUORUM SENSING</i> CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i>	11
1.4.1 <i>Biofilms</i>	11
1.4.2 <i>Phénazines</i>	12
1.4.3 <i>Protéases</i>	12
1.4.4 <i>Rhamnolipides</i>	13
1.5 ECOLOGIE DU <i>QUORUM SENSING</i> DE <i>P. AERUGINOSA</i>	14

1.6	OBJECTIFS	18
1.6.1	<i>Objectif général</i>	18
1.6.2	<i>Objectifs spécifiques</i>	18
2	MATERIEL ET METHODES	19
2.1	MATERIEL BIOLOGIQUE	19
2.2	CROISSANCE SUR MILIEU CASEINE	19
2.3	PRODUCTION DE PYOCYANINE	20
2.4	QUANTIFICATION DES MOLECULES-SIGNALS DU QS	21
2.4.1	<i>Extraction des molécules HAQ à l'acétate d'éthyle</i>	21
2.4.2	<i>Détection et quantification des HAQ par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)</i>	22
2.5	EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE	24
2.6	QUANTIFICATION DES RHAMNOLIPIDES	25
2.6.1	<i>Préparation des échantillons pour analyse des rhamnolipides</i>	25
2.6.2	<i>Détection et quantification des rhamnolipides par HPLC-MS</i>	25
2.7	TRANSFORMATION DES SOUCHES	26
2.7.1	<i>Transformation par électroporation</i>	26
2.7.2	<i>Transformation par choc thermique</i>	27
2.7.3	<i>Transformation par conjugaison solide</i>	27
2.8	MESURE DE L'EXPRESSION DU GENE <i>RHLA</i>	28
2.8.1	<i>Introduction du gène rapporteur rhlA-gfp</i>	28
2.8.2	<i>Mesure de l'expression du rapporteur rhlA-gfp</i>	28
2.9	MESURE DE L'EXPRESSION DU GENE <i>RHLR</i>	28
2.10	DOSAGE DE LA QUANTITE TOTALE DE PROTEINE – BRADFORD	31
2.11	ANALYSE DES DONNEES DE SEQUENÇAGE.....	32
3	RESULTATS	33
3.1	ANALYSE PHENOTYPIQUE.....	33
3.1.1	<i>Croissance sur un milieu caséine</i>	33
3.1.1.1.	<i>Prérequis et mise au point</i>	33
3.1.1.2.	<i>Observations phénotypiques</i>	35
3.1.2	<i>Sélection d'un groupe de souches représentatives</i>	36
3.2	ETUDE DE LA PRODUCTION DE MOLECULES-SIGNALS DU QS	39
3.2.1	<i>Production de AHL à 3h et à 6h</i>	39
3.2.2	<i>Productions de HAQ à 6h et à 24h</i>	42
3.3	ETUDE DE L'ACTIVITE DU SYSTEME RHL	46
3.3.1	<i>Expression de l'opéron rhlAB</i>	47
3.3.2	<i>Production de rhamnolipides</i>	48

3.3.2.1.	Mise au point	49
3.3.2.2.	Quantification des rhamnolipides	51
3.3.3	<i>Production de pyocyanine</i>	52
3.3.3.1.	Différence de production de pyocyanine en TSB et King's A.....	52
3.3.3.2.	Production de pyocyanine à 6 h et à 24 h en milieu King's A	54
3.3.4	<i>Mesure de l'expression du gène rhIR</i>	55
3.3.4.1.	Vérification des transformants	55
3.3.4.2.	Cinétique d'expression du gène rapporteur <i>rhIR-lacZ</i>	56
3.4	RESUME DES DIFFERENTS PROFILS DE PRODUCTION SELON LE TYPE DE QS	58
3.5	ANALYSE GENOMIQUE	59
4	DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	62
5	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	66
6	ANNEXES	XII

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU QS CHEZ UNE BACTERIE A GRAM NEGATIF.	5
FIGURE 2 : STRUCTURES CHIMIQUES DES PRINCIPAUX AHL ET HAQ PRODUITS PAR <i>P. AERUGINOSA</i>	8
FIGURE 3 : <i>QUORUM SENSING</i> CHEZ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	10
FIGURE 4 : STRUCTURES CHIMIQUES DES RHAMNOLIPIDES PRODUITS PAR <i>P. AERUGINOSA</i>	14
FIGURE 5 : PROCEDURE D'UTILISATION DU FAVORPREP MINI KIT – FAVORGEN.....	24
FIGURE 6 : PHENOTYPES DE COLONIES SUR MILIEU 1% CASEINE 1,5% AGAR.	34
FIGURE 7 : REPARTITION DES PHENOTYPES SELON LES ENVIRONNEMENTS.....	36
FIGURE 8 : PRODUCTION DE 3-OXO-C ₁₂ -HSL APRES 3 H ET 6 H D'INCUBATION EN MILIEU TSB.	40
FIGURE 9 : PRODUCTION DE C ₄ -HSL APRES 3H ET 6 H D'INCUBATION EN MILIEU TSB.	41
FIGURE 10 : PRODUCTION DE HHQ-C ₇ APRES 6 H ET 24 H D'INCUBATION EN MILIEU KING'S A.....	43
FIGURE 11 : PRODUCTION DE PQS-C ₇ APRES 6 H ET 24 H D'INCUBATION EN MILIEU KING'S A.	44
FIGURE 12 : PRODUCTION DE HQNO-C ₇ APRES 6 H ET 24 H D'INCUBATION EN MILIEU KING'S A.....	45
FIGURE 13 : MESURE DE L'ACTIVITE DU GENE RAPPORTEUR <i>RHLA-GFP</i>	48
FIGURE 14 : TESTS DE PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES DANS DIFFERENTES CONDITIONS.	50
FIGURE 15 : PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES.....	52
FIGURE 16 : PRODUCTION DE PYOCYANINE APRES 18 H EN MILIEUX TSB ET EN KING'S A.....	53
FIGURE 17 : PRODUCTION DE PYOCYANINE APRES 6 H ET 24 H EN MILIEU KING'S A.....	54
FIGURE 18 : PHOTOGRAPHIE DE LA MIGRATION DE L'EXTRAIT PCR SUR GEL D'AGAROSE 1%.....	56
FIGURE 19 : CINETIQUE D'ACTIVITE DU GENE <i>RHLR</i>	57

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : RECAPITULATIF DE LA PROVENANCE DES SOUCHES.	19
TABLEAU 2 : COMPOSITION DE LA BASE DE MILIEU MINERAL M9 CONCENTREE 5 X.	20
TABLEAU 3 : COMPOSITION DU MILIEU AGAR M9 CONTENANT 1% DE CASEINE.....	20
TABLEAU 4 COMPOSITION DU MILIEU KING'S A (KING ET AL., 1954).....	21
TABLEAU 5 : COURBE STANDARD POUR LA QUANTIFICATION RELATIVE DES AHL ET HAQ.	23
TABLEAU 6 : PARAMETRES TECHNIQUES UTILISES LORS DE L'ANALYSE HPLC-MS.	24
TABLEAU 7 : PARAMETRES POUR L'ANALYSE DES RHAMNOLIPIDES AU HPLC-MS.....	25
TABLEAU 8 : COURBE STANDARD POUR LA QUANTIFICATION RELATIVE DES RHAMNOLIPIDES.	26
TABLEAU 9 : COMPOSITION D'UNE SOLUTION DE Z-BUFFER AJUSTEE A PH 7.0.....	30
TABLEAU 10 : AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DU GENE DE RESISTANCE.....	30
TABLEAU 11 : MELANGE DE REACTION POUR L'AMPLIFICATION DU GENE DE RESISTANCE.	31
TABLEAU 12 : PROGRAMME DE REACTION D'AMPLIFICATION UTILISE.	31
TABLEAU 13 : COURBE STANDARD A PARTIR DE BSA POUR LE DOSAGE PROTEIQUE.	31
TABLEAU 14 : SEQUENCES D'ADN DE REFERENCE (<i>P. AERUGINOSA</i> UCBPP-PA14).	32
TABLEAU 15 : LISTE ET CARACTERISTIQUES DES ISOLATS SELECTIONNES.	38
TABLEAU 16 : SOUCHES TEMOINS UTILISEES COMME REFERENCES.	39
TABLEAU 17 : ISOLATS SELECTIONNES POUR LA MISE AU POINT DU TEST.....	49
TABLEAU 18 : PROFILS DE PRODUCTION DES MOLECULES DU QS SELON LE GROUPE DE QS.....	58

LISTE DES ÉQUATIONS

EQUATION 1 : FORMULE PERMETTANT LE CALCUL DE L'ACTIVITE B-GAL EN UNITE MILLER.....30

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-oxo-C₁₂-HSL : *N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AI : Auto-Inducteur

BLAST : Basic Local Alignment Search Tools

C₄-HSL : *N*-butanoyl-L-homosérine lactone

DO : Densité Optique

FK : Fibrose Kystique

HAQ : 4-hydroxy-2-alkylquinolines

HHQ-C₇ : 4-hydroxy-2-heptylquinoline

HQNO-C₇ : 4-hydroxy-2-heptylquinoline *N*-oxide

AHL : acyl-homosérine lactone

LB : Lysogeny Broth (Luria Broth)

MDR : Multi-Drug Resistance

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONPG : *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside

ppm : partie par million

PQS-C₇ : *Pseudomonas* Quinolone Signal ; 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline

QS : *Quorum Sensing*

TSB : Tryptic Soy Broth

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WHO : Worl Health Organization

1 INTRODUCTION ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Introduction

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est très répandue dans nos environnements de vie. De par sa virulence et son adaptabilité, elle représente un pathogène opportuniste grave à l'origine de plusieurs infections. Il est en effet, responsable de diverses infections chez les végétaux et chez les animaux, mais c'est chez l'humain, et notamment chez des individus immunodéprimés qu'il représente une cause de morbidité élevée. *P. aeruginosa*, via un mécanisme densité-dépendant appelé *quorum sensing* (QS), a la capacité de coordonner et ainsi de réguler sa virulence, son déplacement, sa survie ou encore le développement de sa population entière.

Chez *P. aeruginosa*, le QS est hiérarchisé selon une cascade de réaction débutant par l'activation du système Las. Ce premier système permet l'activation du deuxième système, le système Rhl. Puis c'est un troisième système qui est activé selon la régulation appliquée par les deux premiers, le système PQS. Le QS est donc un mécanisme en cascade hiérarchisée, qui chez *P. aeruginosa* commence par l'expression du gène *lasR*. Lors d'isolement de souches cliniques, surtout provenant d'individus atteints de la Fibrose Kystique (FK), des mutations chez ce gène ont souvent été observées. Étant donné sa place en haut de la cascade de régulation, le QS de ces souches se retrouve partiellement ou entièrement impacté, modifiant le comportement général de la population bactérienne.

Puisqu'il s'agit d'un pathogène responsable d'infections chroniques et d'infections nosocomiales (contractées lors de soins dans un établissement de santé), la majorité des informations connus à son sujet est issu d'études sur des souches cliniques (isolées sur d'individus atteints de FK ou dans un établissement de santé). De ces études ont été émises plusieurs hypothèses quant à l'apparition de tels phénotypes dans les souches cliniques. Toutes les hypothèses, même si elles varient, supportent l'idée d'une pression sélective liée aux environnements pulmonaires ou cliniques (chambres d'hôpitaux). Ainsi, mieux adaptée à son milieu, la population peut développer des avantages de croissance ou de survie.

Tout en considérant l'hypothèse d'une adaptation clinique, il est intéressant de se questionner sur la fréquence d'apparition de ces mêmes mutations, non plus dans des échantillons cliniques, mais aussi dans des échantillons environnementaux. En d'autres termes, est-ce que les souches mutantes apparues par sélection dans les poumons des individus atteints de FK, sont également retrouvées dans d'autres types d'environnements ?

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Généralité et description

Pseudomonas aeruginosa est un bacille ubiquitaire à Gram négatif. Motile via un flagelle polaire, cette bactérie est préférentiellement aérobie. Pouvant se développer entre +4°C et +45°C, on dit qu'elle est mésophile mais sa température de croissance optimale se situe entre 30°C et 37°C. Elle ne produit pas de spore ou de capsule et elle est très facilement reconnaissable via le pigment bleu-vert qu'elle produit. *P. aeruginosa* est omniprésente dans nos environnements grâce son adaptabilité et sa versatilité (Moradali *et al.*, 2017). On la retrouve dans des environnements comme le sol et l'eau, mais c'est dans les environnements où la présence et l'activité humaine est la plus forte qu'on la retrouve le plus (Crone *et al.*, 2020). Elle peut survivre et se multiplier sur des supports inertes humides comme les lavabos, les robinets ou les appareils hospitaliers de ventilation (Talon *et al.*, 1998). De ce fait, les infections peuvent facilement apparaître dans le milieu hospitalier (Bédard *et al.*, 2016). Selon l'OMS, ce pathogène fait partie des douze familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine, Il est considéré comme priorité critique dû à sa grande résistance à de nombreux antibiotiques. Il est notamment une des causes principales d'infections nosocomiales (de Bentzmann & Plésiat, 2011; Floret *et al.*, 2009; Sikora & Zahra, 2021), pouvant également causer des otites, des pneumonies, des inflammations des os ou encore des infections de la peau (dans les brûlures, plaies). Il est surtout dangereux voir mortel lorsqu'il touche une population plus faible comme les individus immunodéprimés atteints par exemple du Virus de l'immunodéficience Humaine (VIH) ou de la FK (Govan & Nelson, 1992).

1.2.2 Enjeux sanitaires

1.2.2.1. Fibrose kystique

La FK, connue également sous le nom de mucoviscidose, est une maladie génétique mortelle chez la majorité des personnes atteintes. Dite récessive, c'est une anomalie devant être transmise par les deux parents pour se déclarer chez l'enfant. Souvent recensée dans le nord de l'Europe, elle affecte environ 1 personne sur 3500 et cause de nombreuses déficiences immunitaires laissant place aux infections aiguës ou chroniques. On reconnaît la prévalence de *P. aeruginosa* lors d'infections nosocomiales avec un taux de mortalité jusqu'à 50% (Osmon *et al.*, 2004), c'est en effet l'un des pathogènes le plus couramment retrouvé lors d'infections pulmonaires.

Chez les individus atteints de FK, l'infection chronique à *P. aeruginosa* dégrade fortement leur fonction pulmonaire tout en aggravant leurs symptômes. Ainsi ils sont exposés à une plus forte morbidité et mortalité (Chmiel & Davis, 2003; Lyczak *et al.*, 2000).

1.2.2.2. Multirésistance aux antibiotiques

Les premières infections par *P. aeruginosa* des voies respiratoires chez les individus atteints de FK sont souvent traitées et soignées par des antibiotiques mais sont rapidement suivies d'autres infections par des souches plus résistantes. Via l'accumulation de mutations adaptatives et de transferts horizontaux de gènes (Breidenstein *et al.*, 2011), les souches s'adaptent à leur environnement et développent des résistances aux antibiotiques. Ces dernières sont donc maintenant capables d'engendrer une infection pulmonaire sur le long terme (Folkesson *et al.*, 2012). Ainsi via « l'adaptation bactérienne » à partir d'une souche initialement résistante (Bragonzi *et al.*, 2009), la colonisation des voies respiratoires persiste pendant plusieurs années, voire des dizaines d'années (Cramer *et al.*, 2010; Jelsbak *et al.*, 2007). Il est donc difficile, voire impossible d'éradiquer de telles souches si l'infection chronique s'installe. Les médicaments sont peu nombreux et leur efficacité est menacée par cette « tolérance aux médicaments » acquise par des bactéries dites multirésistantes aux antibiotiques (MDR). En 2006, les estimations indiquaient qu'entre 25 et 45% des adultes atteints de FK étaient infectés par une souche de *P. aeruginosa* MDR dans les voies respiratoires (Lechtzin *et al.*, 2006).

1.2.2.3. Etat bactérien

P. aeruginosa cause donc de nombreuses infections en utilisant de façon efficace ces facteurs de virulence afin de maximiser sa survie. En effet, lors d'infections aiguës, elle sera préférentiellement sous forme planctonique et mobile, mode de vie lui permettant de libérer différentes toxines directement dans son milieu. A contrario, lors d'infection chronique, elle est retrouvée sous forme sessile entourée d'une matrice protectrice qu'elle produit, nommée biofilm. Ces deux modes d'infections (aiguë et chronique) nécessitent une organisation de l'activité interne de la bactérie ainsi qu'une coordination en communauté principalement régulée par le QS.

1.3 Communication bactérienne

1.3.1 Le *quorum sensing*

1.2.2.4. Généralités et utilités pour la bactérie

Le QS a été premièrement découvert dans les années 1970 chez la bactérie marine *Vibrio fischeri*, lors de l'observation d'une symbiose bactérie-animal et plus précisément lors de l'étude de production de bioluminescence par la bactérie. En effet, *V. fischeri* peut vivre en association avec un céphalopode (une sépiole) (Nealson *et al.*, 1970). La bactérie produit de la bioluminescence offrant au céphalopode un camouflage des prédateurs puisque ce dernier reproduit un rayonnement lumineux du soleil ou de la lune dans l'océan.

On parle ici d'un phénomène densité-dépendant car lorsque *V. fischeri* est dispersée dans l'eau de mer elle n'émet pas de luminescence. C'est lorsqu'elle colonise l'animal marin que l'on observe une proximité bactérienne puisqu'elle se multiplie dans un espace restreint, qu'elle déclenche la production de bioluminescence (Bassler *et al.*, 1993; Engebrecht *et al.*, 1983). Lors de cette proximité bactérienne, les bactéries échangent de nombreuses molécules chimiques de signalisation et ainsi une coordination de la communauté est observée. Le QS est donc un procédé de communication dépendant de la densité bactérienne permettant de coordonner les réponses non plus en tant d'individu seul mais en groupe (Boyle *et al.*, 2015; Fuqua & Greenberg, 2002). Ce mécanisme assure la survie de bactérie tout en réduisant ses dépenses énergétiques (de Kievit & Iglewski, 2000). Ainsi lorsqu'elles sont en forte densité cellulaire, le QS permet aux bactéries d'œuvrer ensemble vers un objectif commun : la survie de la communauté (Darch *et al.*, 2012; Stevens *et al.*, 2012).

Le QS participe à la régulation de l'expression du génome de la bactérie (Bassler & Losick, 2006; Keller & Surette, 2006) comprenant des gènes de virulence, des gènes essentiels aux métabolismes bactérien (réplication, transcription et traduction d'ADN, division cellulaire ou biosynthèse d'acides aminés) ainsi que des gènes du comportement (comme pour la formation de biofilm, la production de protéases extracellulaires, ou encore la résistance aux antimicrobiens). Ce procédé très étudié depuis plusieurs dizaines d'années nous apprend que la bactérie peut donc coordonner et amplifier l'expression de différents gènes en activant leur transcription suivant les signaux qu'elle reçoit de son environnement de telle manière à synchroniser la survie et virulence de la population entière.

1.2.2.5. Fonctionnement chez les bactéries à Gram négatif

Le QS est un mécanisme de signalisation présent chez les bactéries à Gram négatif permettant une coopération bactérienne intra et inter-spécifique (McKenney *et al.*, 1995; Pierson *et al.*, 1998). Il est basé sur la production et la détection de petites molécules de signalisation appelées Acyl-Homosérine Lactone (AHL) capables de diffuser facilement de bactéries en bactéries, représenté schématiquement à la Figure 1. Plus la densité de population augmente, plus la concentration d'AHL augmente et ainsi plus il y a de signal, plus les bactéries vont produire du signal.

La molécule-signal AHL aussi dite auto-inductrice, est synthétisée par l'enzyme de type LuxI codé par le gène *luxI*. Elle s'accumule dans l'espace extracellulaire et ainsi lorsque celle-ci est en suffisamment grande quantité c'est-à-dire que la concentration de molécule a atteint un seuil critique, elle est captée par la protéine régulatrice de type LuxR codée par le gène *luxR*. Ce complexe formé permet 1) l'activation de la transcription de gènes cibles visant le contrôle de différentes fonctions de la bactérie et 2) comme son nom l'indique le régulateur activé peut également induire la transcription du gène codant pour la AHL synthase formant une boucle d'auto-induction positive (Galloway *et al.*, 2011).

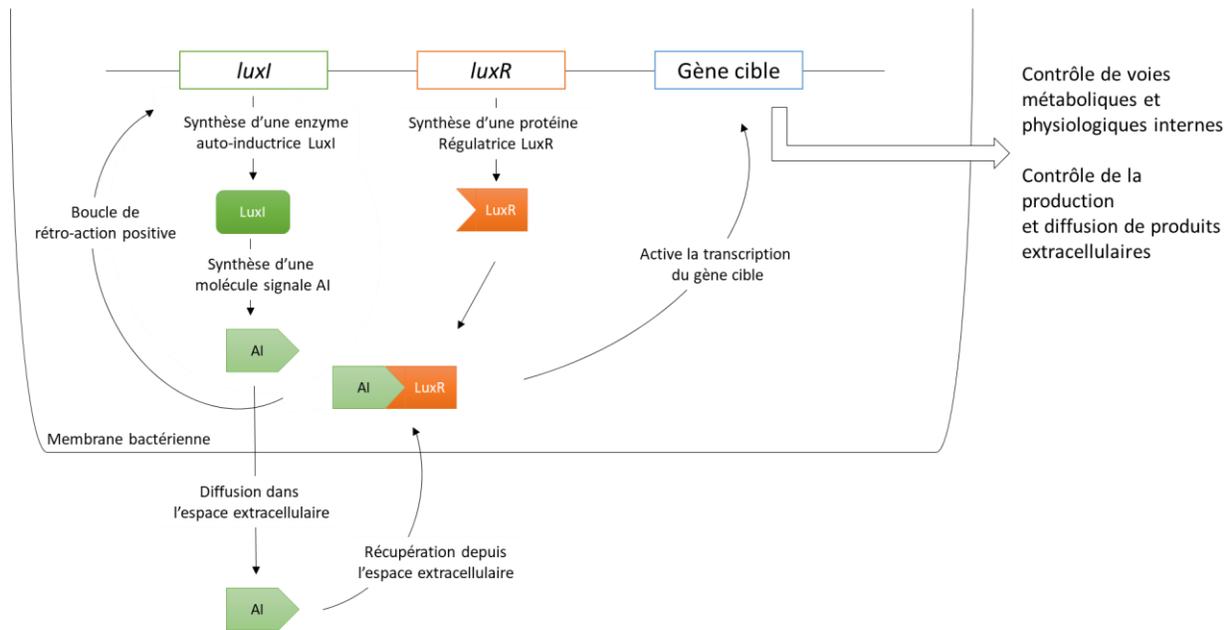


Figure 1 : Représentation schématique du QS chez une bactérie à Gram négatif.

Fonctionnement schématisé du *quorum sensing* chez une bactérie à Gram négatif lorsque la synthase LuxI permet la production d'un autoinducteur AI qui pourra se lier à la protéine régulatrice LuxR afin d'activer la transcription des gènes cibles.

1.3.2 Le quorum sensing chez *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, on note que la transcription de jusqu'à 11% des gènes serait affectée par le QS (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 1999). Le réseau de communication propre à *P. aeruginosa* est organisé de manière hiérarchique. A travers l'activation contrôlée de trois principaux systèmes, la bactérie régule son comportement à chacune de ses phases de croissances.

1.2.2.6. Le système Las

Comme reporté le plus souvent (Seed *et al.*, 1995), le QS de *P. aeruginosa* est en fait activé dès le début de la phase exponentielle de croissance avec la synthèse du *N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) (Figure 2, a)), par la protéine synthase LasI (type LuxI) codée par le gène *lasI* (Pearson *et al.*, 1994). Codé par le gène *lasR*, la protéine régulatrice LasR (type LuxR) reconnaît et se complexe avec le 3-oxo-C₁₂-HSL (Passador *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1994). Ce complexe LasR/3-oxo-C₁₂-HSL permet ensuite l'activation de la transcription des gènes-cibles du système Las. C'est ainsi qu'est contrôlée l'expression de plusieurs gènes de virulence tels que *lasA* et *lasB* codant respectivement pour la staphylosine et l'élastase (Gambello & Iglewski, 1991; Toder *et al.*, 1991), *aprA* codant pour une protéase alcaline, ou encore *toxA* responsable de la production de l'exotoxine A.

Actif jusqu'à la phase stationnaire de croissance, le système LasI/LasR permet également via une boucle d'auto-induction positive, d'induire l'expression de *lasI* lui-même pour augmenter davantage le niveau de 3-oxo-C₁₂-HSL (Seed *et al.*, 1995).

Le système Las est souvent reconnu comme le système au début de la cascade de réaction du QS chez *P. aeruginosa* puisqu'il s'établit en premier et qu'il permet en plus de l'activation de ses cibles directes, l'activation du deuxième système, le système Rhl (Pearson *et al.*, 1995) et d'un troisième système, le système PQS.

1.2.2.7. Le système Rhl

Activé généralement en fin de phase exponentielle de croissance, ce deuxième système appelée Rhl/RhIR, fonctionne de manière similaire suivant le schéma LuxI/LuxR (Latifi *et al.*, 1995). La protéine Rhl catalyse la production de la molécule AHL *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL) (Figure 2, b)) (Brint & Ohman, 1995; Pearson *et al.*, 1997). On parle de hiérarchie ici car LasR est le régulateur principal de cette protéine Rhl (Groleau *et al.*, 2020). Cette dernière sera reconnue par la protéine régulatrice de type LuxR nommée RhIR, formant ainsi un nouveau

complexe actif. Capable d'activer l'expression de *rhlI* également, ce complexe permet le contrôle de l'expression d'autres gènes impliqués dans la virulence de la bactérie comme l'opéron *rhlAB* responsable de la production de rhamnolipides, *lasB* déjà majoritairement exprimé avec le système LasI/LasR (Toder *et al.*, 1991), l'opéron *hcnABC* responsable de la production de cyanure (Blumer & Haas, 2000; Reimann *et al.*, 1997; Winson *et al.*, 1995), *lecA* et *lecB* codant pour des lectines (Girard & Bloemberg, 2008; Lee & Zhang, 2015), ou encore les opérons *phzABCDEFG1* et *phzABCDEFG2* responsables de la production de phénazines (Higgins *et al.*, 2018; Whiteley & Greenberg, 2001) comme la pyocyanine.

Les systèmes Las et RhlR fonctionnent en tandem (Pearson *et al.*, 1997) et se coordonnent avec un troisième système qui permet d'ajouter un niveau de contrôle supplémentaire permettant de moduler l'infection, le système PQS.

1.2.2.8. Le système PQS

Ce troisième système appelé PQS pour *Pseudomonas* Quinolone Signal, est exprimé également en fin de phase exponentielle de croissance et possède ses propres types de molécules de signalisation, les 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) (Déziel *et al.*, 2004) parmi lesquelles on retrouve principalement: le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (aussi nommé *Pseudomonas* Quinolone Signal ; PQS-C₇) (Pesci *et al.*, 1999), le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-C₇) et le 4-hydroxy-2-heptylquinolone *N*-oxyde (HQNO-C₇) (Figure 2, c), d) et e)).

Les HAQ sont produits par l'action des enzymes PqsABCD codées par les gènes pqsABCD (Dulcey *et al.*, 2013). Le HHQ-C₇ est converti en PQS-C₇ via l'action de la protéine PqsH (Schertzer *et al.*, 2010). La molécule de signalisation PQS-C₇, lorsqu'elle est en concentration suffisante, se lie avec le récepteur de type LysR, MvfR (PqsR). Ce complexe est capable d'activer l'expression des gènes *pqsABCDE* et *phnAB* entraînant la production de plus de HHQ-C₇ et de PQS-C₇, ce qui entraînera la production de pyocyanine (Déziel *et al.*, 2004; Diggle *et al.*, 2003). En plus du PQS-C₇, le HHQ-C₇ agit également comme auto-inducteurs de MvfR (Xiao *et al.*, 2006a). Même si le HQNO-C₇ n'est pas une molécule-signal, il fait tout de même partie de la famille des HAQ, et sa fonction semble plutôt dans l'interaction avec d'autres espèces bactériennes (Hoffman *et al.*, 2006; Klaus *et al.*, 2020; Mitchell *et al.*, 2010). L'enzyme PqsL (monoxygénase permettant l'oxydation du groupement azoté du noyau quinoline en *N*-oxyde) est requis pour la synthèse du HQNO-C₇ (Lépine *et al.*, 2004) à partir de substrats dont l'identité reste encore hypothétique (Drees *et al.*, 2018).

La protéine codée par le dernier gène de l'opéron *pqsABCDE*, PqsE n'est pas nécessaire à la production de HAQ (Déziel *et al.*, 2004) car un mutant $\Delta pqsE$ produit autant que la souche WT. L'activité thioestérase de la protéine PqsE pourrait néanmoins participer à la biosynthèse des HAQ (Drees *et al.*, 2018; Drees & Fetzner, 2015). Par ailleurs, PqsE est essentielle dans l'activation complète du système Rhl lorsque le système Las n'est pas fonctionnel (Groleau *et al.*, 2020), et elle permet la modulation de l'expression de plusieurs gènes cibles (Farrow *et al.*, 2008; Hazan *et al.*, 2010; Rampioni *et al.*, 2010). Le mode d'action de PqsE reste énigmatique (García-Reyes *et al.*, 2020).

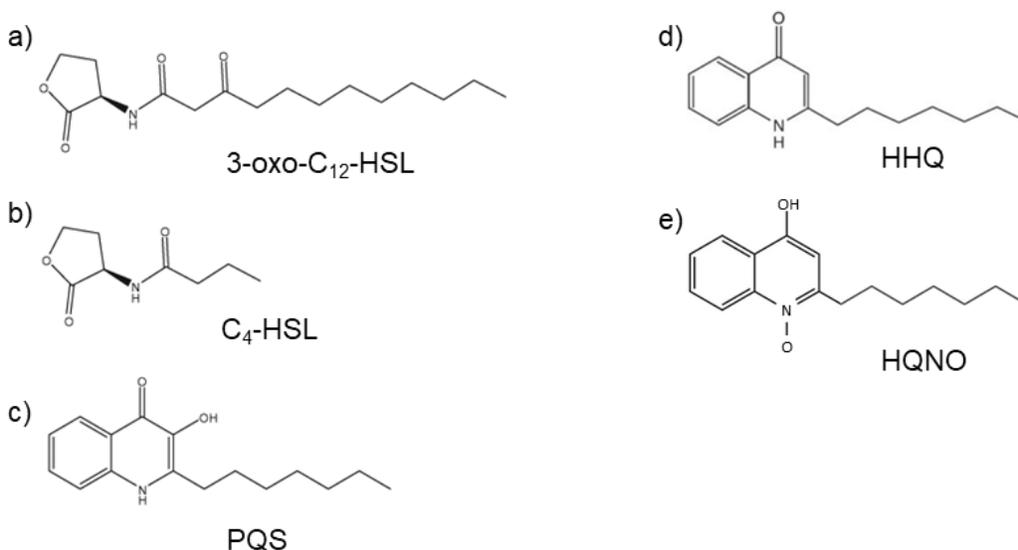


Figure 2 : Structures chimiques des principaux AHL et HAQ produits par *P. aeruginosa*.

Les structures des N-acyl-L-homoserine lactones (AHL) sont représentées en a) N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) et b) N-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL) tandis que les structures des principaux 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) sont représentées en c) 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (PQS-C₇), d) 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-C₇) et e) 4-hydroxy-2-heptyl N-oxide (HQNO-C₇).

1.2.2.9. Hiérarchisation et interactions des systèmes

Un grand nombre d'interactions existe entre les systèmes de QS chez *P. aeruginosa* (Figure 3 ,a)). Comme nous l'avons vu précédemment, le système Las activé au début de la phase exponentielle de croissance, permet l'activation du système Rhl dans un second temps (Nadal Jimenez *et al.*, 2012), c'est-à-dire lors de la fin de la phase exponentielle de croissance. Via une production contrôlée d'AHL, la régulation du QS est hiérarchisée en cascade surtout pour les deux premiers systèmes. Ensuite, les système Las et Rhl régule tous deux la transcription de l'opéron *pqs*.

Le système PQS lui, dépend donc de la balance de production de 3-oxo-C₁₂-HSL et C₄-HSL, tout en interagissant avec les deux systèmes de type LuxI/LuxR (Figure 3, b)). Alors que le LasR active la transcription du gène *mvfR* et de l'opéron *pqs*, RhIR a un effet négatif sur la transcription de *pqsABCDE* (Brouwer *et al.*, 2014; Wade *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006b). A contrario, l'enzyme PqsE serait impliquée dans la régulation de plusieurs gènes régulés par le système Rhl (*phz*, *hcn*, *lecA*) (Diggle *et al.*, 2003; García-Reyes *et al.*, 2020; Rampioni *et al.*, 2010). Par un mécanisme dont on ne connaît pas encore bien le fonctionnement, PqsE pourrait augmenter l'affinité de RhIR pour le C₄-HSL (Farrow *et al.*, 2008) ou permettre la synthèse d'un ligand alternatif pour RhIR (Mukherjee *et al.*, 2018).

Ces mécanismes interdépendant entre systèmes permet donc une autorégulation de la production des molécules-signaux et de la communication cellule-cellule nécessaire à la virulence de la communauté bactérienne (Passador *et al.*, 1993).

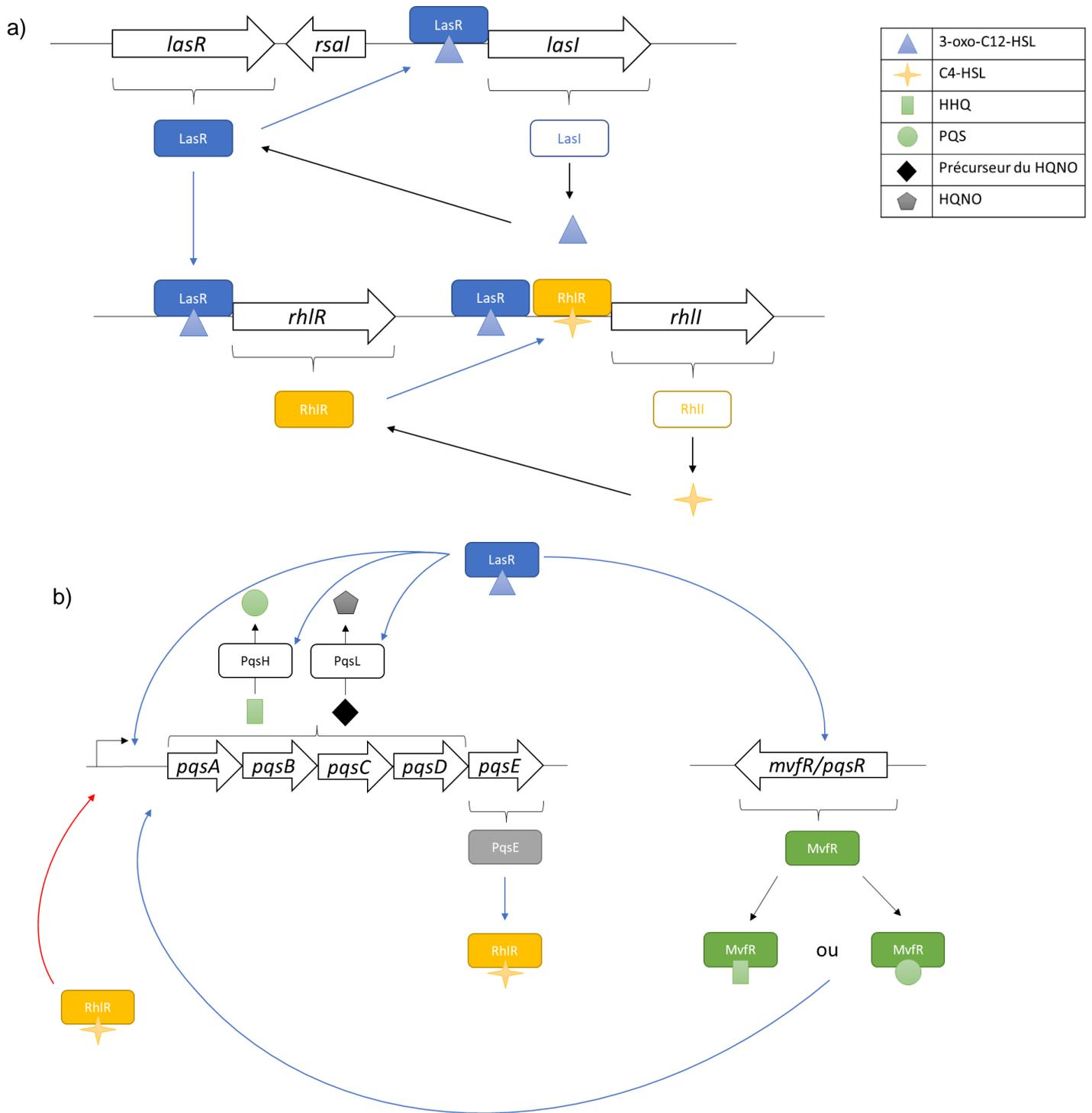


Figure 3 : Quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonctionnement et interactions a) du système Las et du système Rhl et b) du système PQS en fonction des interactions avec les systèmes Las et Rhl. Les flèches bleu et rouge signifient respectivement une régulation positive et une régulation négative. Le gène *mvfR* (*pqsR*) est codé sur le brin inverse des gènes *pqsABCD* et *pqsE*.

1.4 Facteurs de virulence contrôlés par le *quorum sensing* chez *P. aeruginosa*

A l'aide du QS, *P. aeruginosa* régule une partie de ses facteurs de virulence (Nadal Jimenez *et al.*, 2012; Smith & Iglewski, 2003; Winson *et al.*, 1995). La virulence bactérienne et donc la pathogénicité se traduit non seulement par sa capacité à s'organiser en communauté, mais aussi par son aptitude à synchroniser la production et la dispersion de facteurs de virulence dans son environnement.

1.4.1 Biofilms

P. aeruginosa est connu pour développer de robuste biofilm (Keehoon *et al.*, 2017). Matrice exopolymérique adhésive et protectrice formée suite à l'adhésion stable d'une micro-colonie sur une surface. Ce mode de vie fait suite à un rassemblement bactérien adhérent dans un premier temps de manière réversible, puis irréversible ensuite (Filloux & Vallet, 2003). Cette matrice composée d'exo-polysaccharides, d'ADN extracellulaire, d'ARN, de protéines et de lipides (O'Toole *et al.*, 2000; Wei & Ma, 2013) représente jusqu'à 85% du volume total du biofilm. Elle fournit une protection à la population bactérienne face aux environnements difficiles, de telle manière que les bactéries en biofilm sont généralement plus résistantes aux antibiotiques et aux biocides (Costerton *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 1998; Donlan, 2002).

Ce mode de vie sessile est favorisé par la bactérie car la densité et la proximité cellulaire offre un meilleur partage des produits métaboliques et des nutriments, ainsi qu'un acheminement d'oxygène contrôlé via des canaux aqueux, au sein de la communauté.

De par son rôle dans la réponse à la densité de population et dans l'organisation de groupe, le QS est fortement impliqué dans la formation de biofilm. En 1998, Davies *et al.* rapportent qu'une souche ne produisant pas de 3-oxo-C₁₂-HSL (mutant *lasI*) n'est pas apte à former une structure de type biofilm. Cette première découverte met donc en évidence l'implication du QS dans la formation de biofilm. De plus, on reconnaît l'implication du système Rhl puisque ce dernier régule la production de rhamnolipides, impliqués dans la dispersion du biofilm (Juhás *et al.*, 2005; Patriquin *et al.*, 2008). Le biofilm apparaît comme réel problème dans le milieu médical puisque 65% des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms (Chicurel, 2000). Dans le cas des infections par *P. aeruginosa* comme la FK, la formation de biofilm permet à la population bactérienne d'échapper au système immunitaire de l'hôte et de mieux résister aux antibiotiques (Alkawash *et al.*, 2006), rendant son élimination presque impossible d'où l'utilisation du terme infection chronique.

1.4.2 Phénazines

Chez *P. aeruginosa*, la biosynthèse de phénazines implique la transcription de plusieurs gènes. En effet, la transcription des deux opérons *phz* (*phzA1B1C1D1E1F1G1* et *phzA2B2C2D2E2F2G2*) permettent la formation de phenazine-1-carboxylic acid (PCA), et la transcription des trois gènes *phzM*, *phzS* et *phzH* permet la formation d'enzymes impliquées de la conversion de PCA en pyocyanine et en phenazine-1-carboxamide (PCN).

La pyocyanine (1-hydroxy-5-méthyl-phénazine) est un pigment bleu vert caractéristique de *P. aeruginosa* aussi connu sous le nom de bacille « du pus bleu ». La production de pyocyanine est fortement liée au QS et elle est souvent utilisée pour étudier ce dernier car elle est facilement mesurable et quantifiable.

Le QS est impliqué puisque la transcription des opérons *phz1* et *phz2* dépend du système Rhl (Brint & Ohman, 1995). De plus les molécules de signalisation HHQ-C₇ et PQS-C₇, produite via le système PQS ont été rapporté comme jouant un rôle dans le contrôle de la production de pyocyanine également (Liang *et al.*, 2011).

P. aeruginosa synthétise la pyocyanine et l'exporte dans son environnement et notamment dans les poumons de individus atteints de FK. Le fonctionnement de ces derniers est affecté négativement via les propriétés redox de cette toxine (inactivation de la vacuolar ATPases) (Ran *et al.*, 2003) formant un stress oxydatif pouvant causer une nécrose des tissus respiratoires (Britigan *et al.*, 1997; Lau *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 1996).

1.4.3 Protéases

Le QS de *P. aeruginosa* contrôle également la synthèse de nombreuses protéases dans son milieu extracellulaire. La production d'exoprotéases est principalement régulée par LasR et elles sont synthétisées dans le cytoplasme puis sécrétées à travers la membrane bactérienne via des systèmes de sécrétions (6 systèmes principaux T1SS-T6SS recensés chez *P. aeruginosa* (Desvaux M, 2009; Durand *et al.*, 2009)). Parmi celles-ci, on retrouve quatre protéases capables de dégrader d'autres protéines et d'interférer avec le système immunitaire de l'hôte : a) la staphylolysine ou endopeptidase staphylolytique, communément appelée LasA peut dégrader l'élastine ; b) la pseudolysin ou élastase, aussi appelé LasB possède une activité catalytique de constituants majeurs de l'épithélium pulmonaire soit le collagène, la fibrine et également l'élastine. Il est d'ailleurs reconnu que l'activité de LasB est augmentée par une combinaison d'activité avec LasA. Cette dernière rendant l'élastine plus accessible au clivage (Wolz *et al.*, 1991).

LasB est aussi capable d'inactiver certaines protéines impliquées dans les défenses immunitaires de l'hôte comme les IgA et les IgG. Cette protéase joue donc un rôle majeur dans lors de l'établissement d'une infection chronique comme la FK (Cigana *et al.*, 2021) ; c) la protéase IV ou protéase à sérine, endoprotéase aussi appelé PrpL (Engel *et al.*, 1998) qui contribue de la même manière via la dégradation de protéines surfactant des poumons à la propagation d'une infection pulmonaire aigu ou chronique (Malloy *et al.*, 2005). L'inhibition de l'activité de cette protéase IV (engendrée par une pro-protéase IV) est levée grâce à l'intervention de LasB (Oh *et al.*, 2017) ; et finalement d) la protéase alcaline, une métalloprotéase capable de dégrader efficacement les cytokines impliquées dans la réponse immune et inflammatoire (Parmely *et al.*, 1990).

1.4.4 Rhamnolipides

C'est en 1949 que la production de biosurfactants rhamnolipides a été décrite chez *P. aeruginosa* (Jarvis & Johnson, 1949). Composés d'un dimère d'acide gras hydrophobe couplé à un ou deux rhamnose(s) hydrophile(s), les rhamnolipides sont donc des molécules amphiphiles dites tensioactives permettant de réduire la tension de surface.

Pour l'organisme qui les produit, les rhamnolipides jouent plusieurs rôles. Puisqu'ils réduisent la tension de surface, ils permettent la régulation de l'assimilation de substrats hydrophobes (Koch *et al.*, 1991; Noordman & Janssen, 2002). Chez *P. aeruginosa*, on reconnaît son implication dans la virulence de la bactérie, notamment lors de l'établissement, le maintien et la dissémination du biofilm (Davey *et al.*, 2003) ou dans la motilité de type *swarming* (Déziel *et al.*, 2003; Köhler *et al.*, 2000). Seuls, les rhamnolipides ont aussi montré une activité directe sur les cellules immunitaires humaines, comme l'oxydation de monocytes (Kharazmi *et al.*, 1989) ou la destruction de macrophages dérivés de monocytes (McClure & Schiller, 1992).

Le complexe RhlR/C₄-HSL permet l'activation de la transcription de l'opéron *rhIAB* avec le gène *rhIA* qui permet la synthèse du dimère lipidique servant de précurseur, recevant le 1^{er} rhamnose. Le gène *rhIB* lui code pour une rhamnosyltransférase, responsable de la synthèse des mono-rhamnolipides. (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b; Déziel *et al.*, 2003; Dulcey *et al.*, 2019; Ochsner *et al.*, 1994; Ochsner & Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997; Zhu & Rock, 2008) . Une deuxième rhamnosyltransférase responsable de l'ajout du 2^e rhamnose est codée par le gène *rhIC* et la régulation de son l'expression est synchronisée avec celle de l'opéron *rhIAB* (Rahim *et al.*, 2001).

Chez *P. aeruginosa* les rhamnolipides les plus abondants sont le mono-rhamnolipide rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate et le di-rhamnolipide rhamnosyl-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate, annotés respectivement RC10C10 et RRC10C10 (Figure 4 a) et b)).

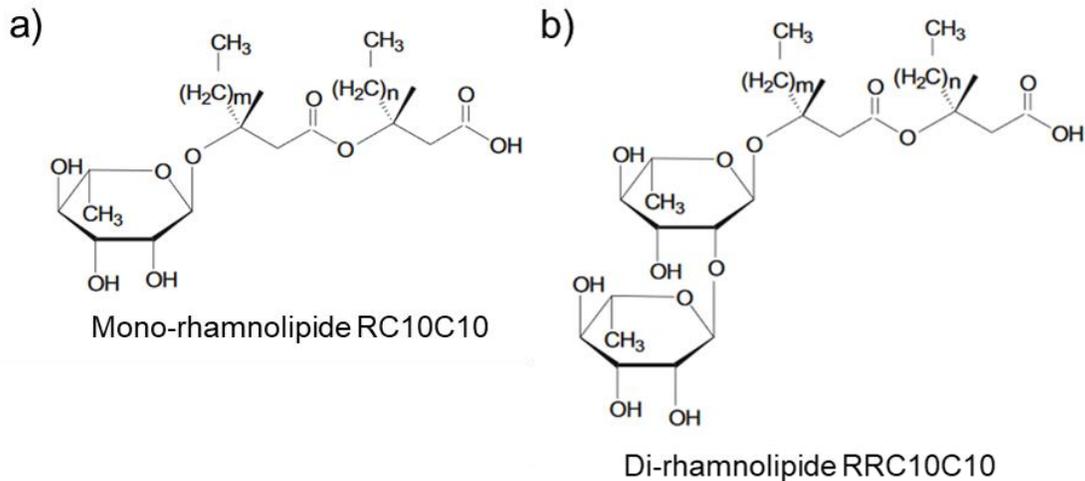


Figure 4 : Structures chimiques des rhamnolipides produits par *P. aeruginosa*.

Les deux rhamnolipides les plus abondamment retrouvés chez *P. aeruginosa* sont décrit en a) Mono-rhamnolipide ou rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RC10C10) et en b) Di-rhamnolipide ou rhamnosyl-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RRC10C10). Figure inspirée de (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

1.5 Ecologie du *quorum sensing* de *P. aeruginosa*

Depuis une vingtaine d'année, des souches mutantes pour le système LasI/LasR ont été recensées parmi les souches isolées chez des individus atteints de FK (Feltner *et al.*, 2016; Hoffman *et al.*, 2009b; Köhler *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2006).

Quelques caractéristiques permettent de facilement identifier une souche présentant un LasR défectueux ou absent. Premièrement, un manque de production d'exoprotéases sera rapidement apparent sur gélose en présence de caseine, ou simplement de lait écrémé. De la même manière, due à une accumulation de HHQ-C₇ à sa surface (car le HHQ-C₇ n'est pas converti en PQS-C₇ par l'enzyme PqsH, celle-ci étant contrôlée par LasR), une colonie d'un isolat mutant *lasR* apparaîtra comme iridescente avec une aspect métallique et des plages d'autolyse (D'Argenio *et al.*, 2007). Il a également été noté que lorsque la croissance est effectuée en milieu liquide A de King *et al.* (King *et al.*, 1954), un mutant *lasR* surproduira de la pyocyanine en phase de croissance stationnaire, bien au-delà de la souche sauvage (Cabeen, 2014; Dekimpe & Deziel,

2009). Ces différents phénotypes de croissance particuliers et propres à un mutant *lasR* s'accompagnent d'une diminution de la virulence aigue chez ces derniers (Kuang *et al.*, 2011). En effet, puisque la majorité des protéases extracellulaires ne sont pas produites et que le système Rhl sera activé plus tardivement (puisque rhlI est activée par LasR), alors plusieurs de ses facteurs de virulence ne sont pas ou peu produit (rhamnolipides, cyanure d'hydrogène, exoprotéases). L'activation du système Rhl n'est que retardée chez un mutant *lasR*, et ce dernier permet aussi l'activation de la transcription de certaines cible de LasR quand il est non-fonctionnel (Dekimpe & Deziel, 2009).

L'hypothèse principale concernant l'émergence de souches LasR-défectueux dans les échantillons cliniques provenant de individus atteints de FK soutient l'idée d'une adaptation à l'environnement d'infection chroniques. La raison de cette émergence reste tout de même controversée et plusieurs hypothèses sont avancées. Il a d'abord été suggéré que la bactérie pratique une forme de *silencing*, c'est à dire, qu'elle réduit intentionnellement sa virulence afin de ne pas être détectée par le système immunitaire de l'hôte. Effectivement, le système LasI/LasR contrôle de nombreux facteurs de virulence, alors la perte de la fonction LasR réduit considérablement la virulence aigue de la bactérie (Köhler *et al.*, 2009; Passador *et al.*, 1993).

En 2005, Heurlier, K et son équipe montrent qu'une souche mutante *lasR* serait significativement plus résistante à la lyse cellulaire qu'une souche sauvage après plusieurs jours d'incubation (30 à 54 h) lorsque le pH du milieu devient plus basique ($\text{pH} \leq 9$) (Heurlier *et al.*, 2005).

Il a été aussi proposé l'hypothèse d'un avantage nutritionnel de croissance lorsque la bactérie se nourrit de source de carbones particulières telles que certains acides aminés (phénylalanine, isoleucine ou tyrosine) et qu'elle est soumise à des conditions avec un haut taux de nitrate, conditions présentant des similitudes avec l'environnement pulmonaire d'un individu atteint de FK (Barth & Pitt, 1996; D'Argenio *et al.*, 2007). L'inactivation de LasR améliore la capacité de *P. aeruginosa* à cataboliser la phénylalanine, phénomène d'inactivation observé après 48h de croissance dans un milieu où la phénylalanine est la seule source de carbone disponible pour la bactérie. Cette hypothèse est soutenue par l'observation chez les mutants LasR d'une augmentation de la transcription du gène *cbrB* codant pour une histidine kinase largement impliquée dans le catabolisme du carbone (Nishijyo *et al.*, 2001).

Depuis 2007, pour des isolats issus d'échantillons prélevés sur des individus atteints de FK évolués en laboratoire, il est également suggéré un comportement dit de « social cheating » (Dandekar *et al.*, 2012; Diggle *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2019; Sandoz *et al.*, 2007). Cette hypothèse s'appuie sur la production de produits extracellulaires par une partie de la population

bactérienne et sur l'utilisation de ces derniers par une autre partie de la population dite « cheater ». De nombreux produits extracellulaires comme les protéases par exemple, sont synthétisés selon l'activité du QS de la bactérie. Un mutant LasR sera décrit ici comme individu n'ayant pas la capacité de produire ce genre de molécule, et appelé « cheater ». Il sera donc caractérisé par sa capacité à utiliser les biens publics produits par les autres bactéries environnantes, sans nécessairement devoir les produire. En 2019, deux études d'évolutions expérimentales ont été menées (Chen *et al.*, 2019; Kostylev *et al.*, 2019) en milieu minimal avec pour seule source de carbone et d'énergie, la caséine. Dans ces conditions, il a déjà été reconnu que *P. aeruginosa* a besoin de produire la protéase élastase LasB pour croître. LasB devient un bien public et partagé. De cette manière, la population déficiente profite de l'effet de groupe, sans dépenser l'énergie qu'il lui aurait fallu pour produire le bien. L'émergence d'une telle population mutante LasR « cheater » est observée après plusieurs passages (entre 10 et 14 jours) mais sa proportion au sein de la population globale se stabilise autour de 30% à 50%. Effectivement, puisqu'elle nécessite la production des biens publics par les autres bactéries, elle sera plus à son avantage si elle reste minoritaire (Diggle *et al.*, 2007; Sandoz *et al.*, 2007). Une telle adaptation impact la dynamique de la population bactérienne sur le long terme.

En 2016, l'équipe de Ajai Dandekar (U. Washnigton) étudie une large sélection d'isolats qu'ils nomment variants (pour le système Las) provenant d'échantillons clinique d'individus atteint de FK (Feltner *et al.*, 2016). Sans être en contradiction avec les autres hypothèses émises auparavant, comme l'avantage nutritionnel ou le *social cheating*, ils apportent de nouvelles observations menant à une remise en question des différentes interprétations faites quant à l'utilité d'une mutation dans le gène *lasR* pour la bactérie. En effet, ils constatent que tous les isolats variants LasR n'ont pas nécessairement un système Las complètement inactif ou déficient. S'il s'agit d'une simple substitution de nucléotide, la fonctionnalité de la protéine produite peut rester intacte ou être moindrement modifiée sans être que celle-ci ne soit complètement inactive. Cette équipe recense d'ailleurs plusieurs souches variantes dont les productions de C₄-HSL et de pyocyanine sont supérieures que celles observées chez la souche prototype PAO1. Ainsi, pour ces souches, ils avancent la possibilité de la contribution de molécules non-AHL comme le HHQ-C₇ ou le PQS-C₇ dans l'induction de facteurs de virulence via le système Rhl. D'autres souches n'ayant pas un LasR fonctionnel mais ayant conservées une forme de virulence ont été recensées dans les dernières années (Kostylev *et al.*, 2019; Martínez-Carranza *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2017). Nous l'avons vu précédemment, le système Rhl peut aussi interagir ou être activé partiellement par PqsE. Suivant cette optique, il est possible de remettre en question la place du système Las que l'on dit toujours primaire au sein de la hiérarchie de QS.

Puisque dans un mutant LasR, on observe une accumulation de HHQ-C₇ (Déziel *et al.*, 2004) il est possible de croire que plusieurs fonctions dépendantes du système Las puissent être produites via l'activation du système Rhl par les molécules du système PQS ou indirectement par l'activation de PqsE ou encore via une auto-induction du système Rhl directement. Plusieurs études cliniques recensent déjà des souches LasR-défectueux comme ils sont souvent appelés, pour lesquels le système Rhl conserve une activité et une régulation (Feltner *et al.*, 2016; Kostylev *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019), signifiant que le QS n'est pas à l'arrêt complet lorsque LasR n'est pas fonctionnel.

Les souches LasR-défectueux, sont donc fréquemment recensés dans divers environnements cliniques (Cabrol *et al.*, 2003; D'Argenio *et al.*, 2007; Feltner *et al.*, 2016; Hoffman *et al.*, 2009a; Vincent *et al.*, 2017), mais la prévalence de tels mutants dans d'autres types d'environnements reste inconnue.

1.6 Objectifs

1.6.1 Objectif général

Le volet principal de ce projet porte sur l'étude du QS retrouvé non seulement parmi les souches cliniques, mais surtout et principalement parmi une collection d'isolats environnementaux de *P. aeruginosa*. Au cours des différentes phases de croissance, et à travers différentes analyses phénotypiques, génomiques et moléculaires, l'objectif général était de mieux comprendre le QS des souches LasR-défectueux et afin de mesurer l'impact de telles mutations sur son adaptation et son mode de survie.

Parmi les questions ayant été explorées au cours de ce projet : La prévalence d'apparition de souches LasR-défectueux dans les environnements cliniques s'applique-t-elle aux environnements non liés à des infections ? Parmi ces souches environnementales, peut-on identifier et caractériser des souches LasR-défectueux avec un système Rhl actif ? Quels sont les critères significatifs permettant une classification des souches selon la fonctionnalité de leur LasR ? Quelle est la répartition des différents types de QS que l'on peut retrouver au sein des souches cliniques et environnementales ?

1.6.2 Objectifs spécifiques

Pour ce faire, l'objectif principal a été divisé en plusieurs objectifs spécifiques. Avec une collection d'isolats cliniques et environnementaux de *P. aeruginosa* :

- Caractériser phénotypiquement en milieux de culture liquide et solide
- Mesurer la production de molécules de signalisation des systèmes de communication Las, Rhl et PQS
- Quantifier des produits des cibles du système Rhl
- Quantifier l'expression de gènes sous le contrôle du système Rhl
- Identifier les variations dans les séquences de gènes liés au QS

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel biologique

Lors de cette étude, nous avons à notre disposition 219 isolats de *P. aeruginosa* provenant surtout du Canada et de la Côte d'Ivoire. Les échantillons ayant permis l'isolement des souches ont été collectés dans différents environnements comme décrit brièvement dans le Tableau 1, Plus d'information est fournie à l'Annexe 1. Les souches sont toutes conservées à -80°C dans des tubes cryogéniques avec 15% glycérol.

Tableau 1 : Récapitulatif de la provenance des souches.

Provenance des souches	n =
Sols contaminés aux résidus pétroliers	18
Rhizosphère du riz	1
Evier d'hôpitaux	38
Environnements non-spécifiés	20
Viande bovine	55
Poisson frais	25
Poisson fumé	20
Pleuro pulmonaire	10
Otorhinolaryngologie (ORL)	13
Urine	15
Bout de sonde cathéter	3
American Type Culture Collection (ATCC)	1
Total	219

2.2 Croissance sur milieu Caséine

Les souches sont cultivées en milieu Lysogeny Broth (LB), pendant 16h sous agitation à 37°C, puis 3 µL de culture sont déposés sur un milieu gélosé contenant 1% de caséine comme seule source de carbone. Le milieu est préparé à base de milieu M9 comme décrit dans le Tableau 2, auquel il est ajouté du sulfate de magnésium (MgSO₄), du chlorure de calcium (CaCl₂), de l'agar bactériologique (AlphaBiosciences, USA) et de la caséine (*casein sodium salt from bovine milk* – Sigma), comme décrit dans le Tableau 3.

Basée sur l'expérience de Chen *et al.*, 2019 nous avons effectué une mise au point du test en 3.1.1.1. Ce dernier permet donc, après 24 h d'incubation à 37°C, de différencier les souches présentant un défaut dans la production de protéases extracellulaires, un phénotype typiquement attribué à une souche avec LasR défectueux ou absent.

Tableau 2 : Composition de la base de milieu minéral M9 concentrée 5 X.

Ingrédient	Pour 1L
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5 g
H ₂ O Osmose Inverse	Jusqu'à 1 L

Tableau 3 : Composition du milieu agar M9 contenant 1% de caséine.

Milieu M9 1% caséinate, 1,5% Agar	Pour 100 mL
M9 5X	20 mL
MgSO ₄ 1 M	200 µL
CaCl ₂ 1 M	10 µL
Casein sodium salt from bovine milk – Sigma	1 g
Agar bactériologique – AlphaBiosciences, USA	1,5 g
H ₂ O Osmose inverse	Jusqu'à 100 mL

2.3 Production de pyocyanine

La mesure de la production de ce pigment bleu caractéristique de *P. aeruginosa* est souvent utilisée pour différencier les souches sauvages des souches mutantes pour le système de communication Las. La production de pyocyanine requiert les gènes codant pour la production des phénazines (*phzA1B1C1D1E1F1G1* et *phzA2B2C2D2E2F2G2*), gènes régulés par le système Rhl. Puisque LasR régule RhlI et RhlR, une culture d'une souche LasR-défectueux ne présentera pas de production de pyocyanine tandis qu'une souche sauvage en produira. En effet, lors d'une culture liquide en milieu Tryptic Soy Broth (TSB), le milieu d'une souche sauvage apparaîtra comme bleu/vert tandis que le milieu d'une souche mutante Las apparaîtra comme jaune.

A l'inverse, une surproduction de pyocyanine chez les souches avec un LasR défectueux est observé lorsque celles-ci sont cultivées en milieu A de King (King *et al.*, 1954). Dans ce milieu limité en phosphate, les souches mutantes LasR surproduisent la pyocyanine (Dekimpe & Deziel,

2009) et apparaissent bleu foncé après une culture sur la nuit, en comparaison avec une souche sauvage qui apparaîtra bleu/verte.

Pour quantifier la production de pyocyanine d'une souche bactérienne dans les deux milieux, celle-ci est d'abord cultivée 16 h dans un milieu TSB sous agitation à 37°C. Elle est ensuite diluée soit dans 5 mL de milieu TSB, soit dans 5 mL de milieu King's A (Tableau 4) avec une DO₆₀₀ de départ de 0,01. Après une incubation de 18 h sous agitation à 37°C, les cellules et le surnageant sont séparés par une centrifugation de 15 minutes à 2000 x g. L'absorbance à 695 nm du surnageant est mesurée avec un lecteur de plaques 96 puits multimodes Cytation (BioTek Instrument, VT, USA). La A₆₉₅ du milieu de départ est soustraite et les valeurs sont normalisées par la concentration en protéines totale contenue dans le culot bactérien obtenue par un dosage type Bradford (Bradford, 1976).

Tableau 4 Composition du milieu King's A (King et al., 1954).

	Pour 1L
Bacto-peptone	20 g
MgCl ₂	1,4 g
K ₂ SO ₄	10 g
Glycérol	10-20 g
H ₂ O Osmose inverse	Jusqu'à 1L
Autoclave	
FeCl ₃	100 µM

2.4 Quantification des molécules-signaux du QS

2.4.1 Extraction des molécules HAQ à l'acétate d'éthyle

Les souches sont cultivées en milieu TSB, 16 h sous agitation à 37°C puis diluée dans 5 mL de TSB avec une DO₆₀₀ de départ de 0,05. Puisque l'on cherche à quantifier les molécules du QS présentes dans toute la culture et que les cultures ne sont pas toujours homogènes (formation d'agrégats), il est préférable de réaliser une culture pour chaque temps d'observation, soit à 3 h et à 6 h.

Après 3 h ou 6 h d'incubation, la DO₆₀₀ est lue et la culture est transférée dans un tube de type Falcon de 15 mL en polypropylène (PP), polymère adapté à l'utilisation de l'acétate d'éthyle. Le standard interne 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d₄) (molécule synthétique non présente naturellement dans les cultures permettant la standardisation de la quantification), ainsi que 2 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés à la culture. L'acétate d'éthyle est le solvant le mieux adapté pour

l'extraction des HAQ puisqu'il a une forte affinité pour les molécules non-polaires présentes dans la culture bactérienne. La solution est mélangée par vortex puis centrifugée 3 minutes à 6000 x g (Allegra X12-R, Beckman) afin de bien séparer la phase aqueuse retrouvée en bas et la phase organique non polaire d'acétate d'éthyle contenant désormais les molécules extraites, au-dessus. Cette dernière est transférée dans une éprouvette, évaporée au jet d'azote, puis remise en suspension dans 500 µL d'acétonitrile pour l'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS). La concentration finale de standard interne de quantification HHQ-d₄ s'élèvera à 2 ppm.

2.4.2 Détection et quantification des HAQ par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)

Les extraits obtenus précédemment et suspendus en acétonitrile ont été analysés par HPLC-MS. Cette méthode permet la séparation des molécules d'un mélange via l'utilisation d'une phase stationnaire solide et d'une phase mobile liquide. La séparation est basée sur les affinités de divers composants du mélange vis-à-vis d'une des phases. Dans cette étude, la phase stationnaire est une silice greffée de chaînes alkyles à 18 carbones. Elle est donc apolaire (phase dite « inverse ») alors que la phase mobile est polaire (mélange de solvants polaires tels que l'eau et l'acétonitrile). Lorsque le solvant polaire passe dans la colonne apolaire, les composés apolaires sont retenus plus longtemps, à causes des interactions hydrophobes avec la colonne.

C'est ensuite avec le spectromètre de masse que les composants vont être analysés après leur passage par la source d'ionisation en sortie de colonne. Les molécules y sont alors vaporisées et forment ainsi des gouttelettes chargées positivement ou négativement selon le mode d'ionisation choisi (mode positif pour les HAQ). Elles passent ensuite dans l'analyseur qui est constitué de quadripôles et dans lesquels les molécules chargées vont être détectées selon leur rapport masse sur charge (m/z) : on parle alors d'ion pseudomoléculaire. Cet ion peut ensuite être fragmenté selon un deuxième mode de détection : le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) : dans ce cas, l'ion que l'on appelle alors « parent » passe dans une cellule de collision dans laquelle un gaz inerte (ici l'argon) va le fragmenter en ion fragment. Les divers quadripôles vont ensuite permettre de détecter et suivre les transitions « ion parent > ion fragment » offrant ainsi une plus grande spécificité dans l'analyse d'une molécule donnée. Ce mode a été choisi pour notre projet et les transitions de masses suivies sont répertoriées dans le Tableau 6. Le détecteur génère ensuite un signal électrique qui va être transcrit en signal numérique et donner ainsi le résultat sous forme d'un chromatogramme auquel est associé un spectre de masse pour chaque molécule détectée.

En mesurant l'aire sous la courbe des pics chromatographiques correspondant aux analytes d'intérêt, on peut calculer la concentration des molécules dans l'extrait. L'utilisation du HHQ-d₄ (standard interne) ajouté avant les extractions permet d'apporter une correction à nos calculs de quantification (Lépine & Déziel, 2011).

Pour la quantification des HAQ,

une droite d'étalonnage pour chaque analyte d'intérêt est obtenue en injectant des solutions des composés purs à différentes concentrations (AHL provenant de Sigma-Aldrich). Les AHL ont donc été quantifiés en même temps pour permettre une quantification relative. Les extraits ont ensuite été injectés dans les mêmes conditions d'analyses que celles utilisées pour les solutions standards AHL. Les solutions pour la courbe standard permettant la quantification relative ont été préparées comme indiqué dans le Tableau 5. Les informations caractéristiques de chaque HAQ nécessaires à l'analyse avec le logiciel (MassLynx Mass Spectrometry Software) sont indiquées en Tableau 6. Les autres HAQ (HHQ-C₇, PQS-C₇ et HQNO-C₇) ont été quantifiés en même temps que les AHL, l'établissement de droite d'étalonnage n'a pas été nécessaire. En effet, nous avons pu utiliser les échelles de grandeurs des AHL obtenus dans les échantillons, ainsi que la quantification du standard interne.

Pour chaque analyte d'intérêt, une droite d'étalonnage est obtenue en injectant des solutions des composés purs à différentes concentrations (AHL provenant de Sigma-Aldrich). Les solutions pour les courbes standards ont été préparées comme indiqué dans le Tableau 5. Les extraits ont été injectés dans les mêmes conditions d'analyses que celles utilisées pour les solutions standards AHL et lors de la même expérience pour permettre une quantification relative.

Tableau 5 : Courbe standard pour la quantification relative des AHL et HAQ.

Concentration initiale (Ci) Concentration finale (Cf)	1	2	3	4
3oxo-C12-HSL Ci = 25 ppm	Cf = 1 ppm Vi = 32 µL	Cf = 2 ppm Vi = 64 µL	Cf = 3 ppm Vi = 96 µL	Cf = 4 ppm Vi = 128 µL
C4-HSL Ci = 25 ppm	Cf = 1 ppm Vi = 32 µL	Cf = 2 ppm Vi = 64 µL	Cf = 3 ppm Vi = 96 µL	Cf = 4 ppm Vi = 128 µL
Standard interne HHQ-d4 Ci = 493,8 ppm	Cf = 5 ppm Vi = 8,1 µL			
VOLUME d'acétonitrile Vf = 800 µL	V = 727,9 µL	V = 663,9 µL	V = 599,9 µL	V = 535,9 µL

Tableau 6 : Paramètres techniques utilisés lors de l'analyse HPLC-MS.

	m/z	Temps de rétention (min)
HHQ-d4	248,2 > 162,7	11
PQS-d4	264,2 > 178,7	10,8
3-oxo-C12-HSL	298,2 > 101,8	10,5
C4-HSL	172,4 > 101,8	8,1
HHQ-C7	244,4 > 158,7	11
PQS-C7	260,2 > 174,7	10,8
HQNO-C7	260,2 > 172,2	10,55

Pour chaque HAQ le rapport masse sur charge (m/z) comprenant m/z de l'ion précurseur > m/z de l'ion fragment ; et le temps de rétention en minutes, soit le temps qu'il a fallu au composé pour traverser la colonne (Lépine & Déziel, 2011).

2.5 Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée avec la trousse FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit de Favorgen suivant le protocole décrit en Figure 5 et en Annexe 2. L'extrait d'ADN plasmidique est élué dans 80 µL de tampon d'éluion et peut se conserver à -20 °C. Le contenu de l'extrait est déposé sur gel d'agarose 0,7% à 2% (dépendamment de la taille du plasmide) afin de vérifier l'identité du plasmide extrait.

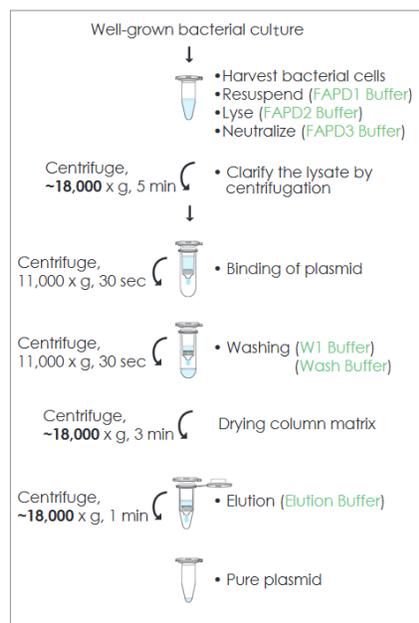


Figure 5 : Procédure d'utilisation du FavorPrep Mini Kit – Favorgen.

2.6 Quantification des rhamnolipides

Molécules produites via le système Rhl, les rhamnolipides sont donc indicateur de l'activation de ce dernier. Chez une souche sauvage comme PA14 ou PAO1, ils sont produits en grande quantité dans un second temps lorsque la phase exponentielle de croissance achève. Suite à la mise au point des conditions optimales pour la quantification des rhamnolipides (décrites en 3.3.2.1.), ils seront ici quantifiés après 6 h d'incubation dans un milieu King's A contenant 10 μ M de chlorure de fer FeCl₃, pour les 30 souches sélectionnées.

2.6.1 Préparation des échantillons pour analyse des rhamnolipides

La culture diluée à une DO₆₀₀ initiale = 0,05 dans 3 mL de milieu King's A contenant 10 μ M de FeCl₃ était cultivée 6 h sous agitation à 37°C. Puisque les rhamnolipides sont retrouvés majoritairement dans le surnageant de la culture, celle-ci est centrifugée à 10 000 x g, puis on ajoute 300 μ L de MeOH (contenant deux fois la concentration finale de standard interne HHQ-d₄, soit 10 ppm) pour diluer ces derniers et éviter un signal saturé lors de la quantification au HPLC-MS.

2.6.2 Détection et quantification des rhamnolipides par HPLC-MS

Les échantillons sont pipetés dans des vials adaptées pour une analyse au HPLC-MS en mode négatif (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014a) suivant les paramètres du Tableau 7.

Afin de quantifier de manière absolue les rhamnolipides, une courbe de calibration avec 5 différentes concentrations de RC10C10 et RRC10C10 comme introduit dans le Tableau 8 a été établie. Les culots bactériens sont utilisés afin de quantifier le nombre de protéine totale pour chaque prélèvement en utilisant un dosage par Bradford (2.10). Ainsi la valeur obtenue après analyse du résultat du HPLC-MS est corrigée par la concentration en protéine totale.

Tableau 7 : Paramètres pour l'analyse des rhamnolipides au HPLC-MS.

	m/z	Temps de rétention (min)
RhaC10C10	503,4	11
RhaRhaC10C10	649,5	11
HHQ-d4	248,2	10

Tableau 8 : Courbe standard pour la quantification relative des rhamnolipides.

		1	2	3	4	5
RhaC10C10	Cf (ppm)	10	30	40	50	75
Ci = 1008 ppm	Vi (µL)	4,96	14,88	19,84	24,80	37,20
RhaRhaC10C10	Cf (ppm)	10	30	40	50	75
Ci = 1067 ppm	Vi (µL)	4,69	14,05	18,74	23,40	35,10
HHQ-d4	Cf (ppm)	5				
Ci = 493,8 ppm	Vi (µL)	5				
MeOH Vf = 600 µL	V (µL)	485,35	466,07	456,42	446,80	422,70

2.7 Transformation des souches

2.7.1 Transformation par électroporation

La transformation bactérienne par électroporation est une méthode visant à perméabiliser les membranes cellulaires à l'aide d'impulsion de champ électrique permettant l'introduction d'un ADN ou d'un plasmide dans la cellule bactérienne.

La bactérie est d'abord cultivée 16h dans 3 mL de milieu TSB, sous agitation à 37°C. Les cellules de la culture sont ensuite séparées du surnageant avec une centrifugation de 1 minute à 17 000 x g. Elles sont lavées trois fois dans une solution de sucrose 300 nM, puis suspendues dans 80 µL de ce même milieu. Ensuite, l'ADN que l'on souhaite introduire est ajouté aux cellules (1 µL d'extrait d'ADN à 100 ng/µL). Le champ électrique appliqué pour la déstabilisation des membranes cellulaires est de 2500 volt pour une durée optimale de quatre à cinq secondes. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 h sous agitation à 37°C, puis étalées sur des géloses sélectives contenant l'antibiotique approprié (selon le gène de résistance présent dans l'ADN introduit) à une concentration suffisante pour empêcher la croissance de la souche WT. Ainsi, seules les cellules ayant la capacité de résister à l'antibiotique, donc les cellules ayant intégrées l'ADN, vont croître et se multiplier. Après isolement d'un ou de plusieurs clones, les cultures des souches transformées sont resuspendues dans une solution de glycérol 15% pour une conservation -80°C.

2.7.2 Transformation par choc thermique

La méthode de transformation décrite ici a été utilisée pour rendre *Escherichia coli* compétente en utilisant le choc thermique. Après une préculture de 16 h en TSB sous agitation à 37°C, les cellules sont diluées à $DO_{600}=0,05$ puis incubées à 37°C quelques heures jusqu'à ce que la DO_{600} atteigne 0,5. Le tube de culture est ensuite placé 10 min sur de la glace puis centrifugée 5 min à 10 000 x g. Le culot bactérien est suspendu dans 500 µL de $CaCl_2$ à 50 mM (préalablement placé au froid) puis placé à nouveau 10 min sur un bain de glace. Après une nouvelle centrifugation et resuspension en $CaCl_2$, la culture est placée 1 h dans un bain de glace. Les cellules de *E. coli* sont maintenant compétentes, elles peuvent être mélangées avec l'ADN plasmidique pour effectuer une transformation par chaud/froid (choc thermique). Les cellules sont placées dans un bain de glace pendant 40 min, incubées 50 sec à 42°C puis placées à nouveau dans un bain de glace pendant 1 min. Elles sont ensuite resuspendues dans 1 mL de milieu TSB et placées en incubation 1 h à 37°C sous agitation. Les cellules de *E. coli* transformées sont finalement isolées via l'antibiotique de sélection puisque seules les cellules ayant introduit le plasmide ont acquis la résistance à l'antibiotique.

2.7.3 Transformation par conjugaison solide

La transformation bactérienne par conjugaison solide permet le transfert de matériel génétique, ici d'ADN plasmidique par contact direct (via un pili) entre une souche donneuse et une souche réceptrice. La souche donneuse de *E. coli* a été préalablement transformée par choc thermique.

Pour la transformation par conjugaison, 200 µL de la préculture de 16 h de la souche donneuse *E. coli* portant le plasmide sont étalés sur un milieu LB agar contenant l'antibiotique approprié puis incubés à 37°C. De la même manière, 100 µL de la préculture de 16h de la souche receveuse *P. aeruginosa* sont étalés sur un milieu LB agar puis incubés à 42°C. Après quelques heures d'incubation, les deux tapis bactériens sont mélangés sur une nouvelle gélose ne contenant pas d'antibiotique, puis incubés 24 h à 37°C. Le mélange est ensuite suspendu dans 1 mL de TSB puis étalé sur une gélose LB agar contenant l'antibiotique de sélection ainsi qu'un deuxième antibiotique visant à éliminer les bactéries donneuses restantes. Après 24 h d'incubation à 37 °C, seules les bactéries receveuses *P. aeruginosa* ayant acceptées l'ADN plasmidique se sont multipliées sur la gélose.

2.8 Mesure de l'expression du gène *rhIA*

2.8.1 Introduction du gène rapporteur *rhIA-gfp*

Les 30 souches sélectionnées en 3.1.2., ont été transformées par électroporation avec le plasmide non intégratif pJF01 (Feltner *et al.*, 2016) contenant la région promotrice du gène *rhIA* en amont du gène reporteur *gfp* (pPROBE-GT (Miller *et al.*, 2000), variant instable de la GFP), ainsi que le gène de résistance à la gentamicine (Gm). Une extraction d'ADN plasmidique (2.5.) et une migration sur gel d'agarose ont été fait pour confirmer que le plasmide a bien été acquis par les souches.

2.8.2 Mesure de l'expression du rapporteur *rhIA-gfp*

Pour chacune des souches, la préculture de 16 h est effectuée en milieu TSB contenant 30 µg/mL de gentamicine, sous agitation à 37°C. Après deux lavages en PBS, les cellules sont suspendues à $DO_{600} = 0,05$ dans 800 µL de milieu King's A et transférées dans une microplaque 96 puits (200 µL par puit en réplicats). La plaque est placée en incubation pendant 30 h sous agitation à 37°C. La fluorescence émise par l'expression du gène *gfp*, est mesurée avec un lecteur de microplaque Cytation avec pour longueur d'onde d'excitation 489 nm et pour longueur d'onde d'émission 520 nm. Les valeurs ainsi obtenues sont normalisées par la DO_{600} .

2.9 Mesure de l'expression du gène *rhIR*

Le rapporteur *rhIR-lacZ* (pPCS1002) (Pesci *et al.*, 1997) est utilisé afin de mesurer la transcription du gène *rhIR* via la production de l'enzyme LacZ facilement quantifiable. Le gène *lacZ* code pour la protéine β-galactosidase LacZ, qui peut métaboliser le substrat ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) pour libérer l'ortho-nitrophényl qui a une coloration jaune.

Les souches sélectionnées ont été transformées par électroporation ou par conjugaison avec le rapporteur transcriptionnel non intégratif contenant la région intergénique en amont du gène *rhIR* en amont du gène reporteur *lacZ*, ainsi que le gène *bla* codant pour une β-lactamase (enzyme de dégradation de l'antibiotique).

Pour chacune des souches, la préculture de 16 h est effectuée en milieu TSB contenant 50 µg/mL de carbénicilline, sous agitation à 37 °C. Celle-ci est ensuite diluée à une DO_{600} de 0,05 dans 5 mL de TSB puis incubée à 37 °C sous agitation. A différent moment au cours de la croissance, des prélèvements seront effectués soit au bout de 3 h, 4 h, 5h, 6 h et 7 h d'incubation. Pour

chacun des points de cinétique, un échantillon est prélevé, sa DO_{600} est de mesurée et 100 μL est ajouté à 900 μL de tampon Z dont la composition est décrite en Tableau 9.

Une goutte de SDS 0,1% et deux gouttes de chloroforme sont ensuite ajoutées. Les cellules sont lysées au vortex pendant 10 secondes puis incubées à 30°C pendant 5 minutes. C'est au moment où 200 µL d'une solution d'ONPG sont ajoutés que le temps de réaction enzymatique commence à être enregistré. Lorsque la solution devient jaune, alors la réaction peut être arrêtée avec 200 µL d'une solution de Na₂CO₃ 1M. Après une centrifugation rapide, la DO₄₂₀ du surnageant est mesurée avec le Cytation.

Tableau 9 : Composition d'une solution de Z-Buffer ajustée à pH 7.0.

	Concentration finale	Quantité pour 1 L
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0,06 M	16,1 g
Na ₂ H ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,04 M	5,5 g
KCl	0,01 M	0,75 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,001 M	0,246 g
β-mercaptoéthanol	0,05 M	2,7 mL

L'activité β-gal en unité Miller (Miller, 1972) est calculée selon la formule suivante en utilisant le temps en minutes (t) de réaction et le volume (v) de culture utilisé lors de la dilution en tampon Z (0,1 dans notre cas).

$$\text{Activité } \beta - gal = \frac{1000 \times DO420}{t \times v \times DO600}$$

Equation 1 : Formule permettant le calcul de l'activité β-gal en unité Miller.

Ici, le gène *bla* code pour une β-lactamase qui va permettre la dégradation de l'antibiotique (ampicilline ou carbénicilline). Pour vérifier l'insertion de ce gène et donc du promoteur sur lequel il est placé, l'ADN plasmidique est extrait puis une amplification du gène est faite par PCR avec les amorces décrites en Tableau 10, selon le mélange et le programme décrit en Tableau 11 et 12. L'amplicon attendu de 377pb peut ensuite être révélé par migration sur un gel d'agarose 1% (40 min à 100 Volts).

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène de résistance.

	Longueur	Tm (°C)	% GC	Séquence
Amp-F (sens)	20 nucléotides	51,37	45	GAGTAAGTAGTTCGCCAGTT
Amp-R (antisens)	20 nucléotides	59,98	50	GCTATGTGGCGCGGTATTAT

Tableau 11 : Mélange de réaction pour l'amplification du gène de résistance.

	Pour une réaction (μL)
Taq Buffer	2,5
dNTP 10 mM	0,5
Amp-F (sens)	0,5
Amp-R (antisens)	0,5
Diméthyl-sulfoxyde (DMSO)	0,5
H ₂ O mili Q stérile	19,3
Easy Taq 5 U/ μL	0,2
ADN 100 ng/ μL	1
Total	25

Tableau 12 : Programme de réaction d'amplification utilisé.

	Température	Temps	X 30 cycles
Dénaturation initiale	94 °C	5 min	
Dénaturation	94 °C	30 sec	
Hybridation	58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	25 sec	
Elongation finale	72 °C	7 min	

2.10 Dosage de la quantité totale de protéine – Bradford

Le dosage de type Bradford (Bradford, 1976), de la quantité totale de protéine contenue dans le culot bactérien est réalisé grâce à l'élaboration d'une courbe standard de plusieurs dilutions de protéine BSA (Bovine Serum Albumin). Les dilutions pour la courbe standard sont conçues selon les indications du Tableau 13 à partir d'un stock fraîchement préparé de BSA à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans une solution de NaOH 0,1 N.

Tableau 13 : Courbe standard à partir de BSA pour le dosage protéique.

		1	2	3	4	5	6
BSA	Cf ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	1,2	2,5	5	7,5	10
Ci = 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Vi (μL)	0	12	25	50	75	100
NaOH 0,1 N	V (μL)	1000	988	975	950	925	900

Concernant les échantillons, les culots bactériens des cultures utilisées lors des différentes quantifications, sont suspendus dans 1 mL de NaOH 0,1 N, puis chauffés (au bain-marie ou avec un bloc chauffant) pendant 1 h à 70 °C, avec des mélanges par vortex régulier pour que le culot se remette en suspension entièrement dans le NaOH 0,1 N.

Pour chacun des échantillons, la suspension est diluée 1/100 dans 160 µL de NaOH et déposée directement dans une plaque 96 puits. Trois réplicats de 160 µL seront également déposés dans la plaque pour chacun des dilutions de la courbe standard. Ensuite, 40 µL de réactif Bradford (Bio-Rad) sont ajoutés dans chacun des puits et le contenu de chaque puit est mélangé à la pipette par des « up and down ». Après 5 minutes à la température ambiante, la DO₅₉₅ est mesurée au lecteur de plaque Cytation. Les valeurs obtenues par la courbe standard permettent la mise au point d'une équation du type $y = a(x) + b$ donnant accès au calcul de la quantité totale en protéine d'un échantillon selon le volume de l'échantillon, soit une concentration en µg/mL.

2.11 Analyse des données de séquençage

Pour certaines des souches sélectionnées pour mon étude, le génome avait été précédemment séquencé par Illumina MiSeq en 2016. Les séquences complètes ont été mises à disposition via la plateforme The International Pseudomonas Consortium Database (IPCD).

Grâce à la plateforme NCBI et à la fonction Nucleotide Blast, le génome des souches a pu être aligné face aux séquences de plusieurs gènes de référence (www.Pseudomonas.com) décrites en Tableau 14. Cet alignement permet la sélection de la séquence d'ADN correspondant au gène d'intérêt chez la souche étudiée. L'outil Expasy permet l'obtention de la séquence protéique la plus probablement produite de cette séquence. Et enfin, à l'aide de la fonction Protein Blast, la séquence protéique obtenue peut être alignée avec la séquence protéique codée par le gène de référence.

Cette opération a été effectuée avec les gènes *lasR*, *mvfR*, *rhIR* et *rhII* afin de mettre en évidence de potentielle mutation sur les protéines produites par les souches de l'étude.

Tableau 14 : Séquences d'ADN de référence (*P. aeruginosa* UCBPP-PA14).

	Locus Tag	Polarité	Localisation génomique
<i>lasR</i>	PA14_45960	-	4085339 - 4086058
<i>lasI</i>	PA14_45940	-	4084370 - 4084975
<i>mvfR</i>	PA14_51340	+	4562837 - 4563835
<i>rhIR</i>	PA14_19120	+	1650990 - 1651715
<i>rhII</i>	PA14_19130	+	1651896 - 1652501

3 RESULTATS

3.1 Analyse phénotypique

3.1.1 Croissance sur un milieu caséine

3.1.1.1. Prérequis et mise au point

Des souches déficientes pour le système Las sont fréquemment identifiées parmi les échantillons cliniques et notamment des isolats issus d'individu atteint de fibrose kystique. Notre étude porte sur la recherche de telles souches LasR-déficientes parmi les souches cliniques, mais aussi parmi les souches environnementales. Le QS de *P. aeruginosa* est complexe et il n'est pas rare qu'un isolat possède un profil particulier ou anormal.

En 2019 Chen *et al.*, publie une étude sur l'isolat clinique de *P. aeruginosa* E80, isolé d'expectoration d'un individu atteint de FK (Feltner *et al.*, 2016). Cet isolat possède un LasR non-fonctionnel mais conserve tout de même la capacité de produire du C₄-HSL, de la pyocyanine et des protéases extracellulaires. Ils ont ensuite remarqué que cet isolat avait la capacité de croître sur un milieu avec la caséine comme seule source de carbone disponible. L'isolat E80 a donc la capacité de produire des exoprotéases via une activation par son système de QS Rhl qui est lui-même activé indépendamment de LasR.

Suites à ces observations, un essai de croissance sur un milieu M9 contenant 1% de caséine comme unique source de carbone a été mis au point. Ce test permet d'observer rapidement si la croissance est représentative d'un LasR fonctionnel ou non. La mise au point a permis d'obtenir trois types de profil de croissance tels présentés à la Figure 6.

Après 24 h d'incubation à 37 °C, un premier profil est observé chez les souches ayant un LasR fonctionnel comme PA14 ou encore une souche mutante pour le gène *lasR* dans laquelle le vecteur pUCPSK-*lasR* a été réintroduit pour rétablir l'expression du gène *lasR*, soit une colonie beige, lisse, opaque avec un halo de dégradation observable en Figure 6 a). Le deuxième profil observé en Figure 6 b) est une colonie plus petite et transparente. Ce phénotype a été observé chez les souches PA14 ayant des LasR ou LasB non fonctionnels soit PA14 *lasR*::Gm (obtenu par mutagenèse dirigée par double recombinaison homologe) et PA14 *lasB*::Gm (obtenu par mutagenèse aléatoire avec transposon). Un troisième phénotype a été observé en Figure 6 c), pour l'isolat E80 ainsi que pour une souche PA14 *lasR*::Gm contenant un plasmide exprimant *rhlR* de façon constitutive (pUCPSK-*rhlR*). La colonie est généralement du même diamètre qu'une

colonie observée chez la souche PA14 *lasR*::Gm, mais elle est cette fois-ci opaque et bien plus dense et sans halo.

Si pour le profil a), il est possible de dire que la bactérie a produit suffisamment de protéases extracellulaires via l'utilisation de ces deux principaux systèmes du QS pour utiliser la seule source de carbone présente dans le milieu (la caséine), et constituer une colonie dense et opaque ; alors il est également possible de penser que pour le profil b), c'est le manque de production de protéases extracellulaires dû à des systèmes Las et Rhl dysfonctionnels, qui empêche la bactérie de croître et de se multiplier correctement sur ce milieu. Concernant le profil c), même si la croissance bactérienne n'est pas égale à celle d'une souche sauvage, elle semble être plus présente que chez une souche LasR-défectueux. Théoriquement, si le système Rhl a été rétabli, alors une partie de la production de protéases extracellulaires a été également rétablie, d'où une croissance bactérienne présente mais pas aussi étendue que chez une souche sauvage.

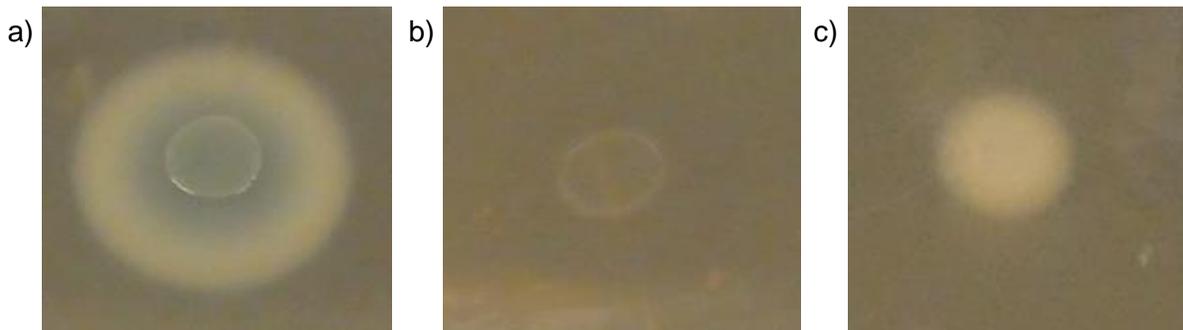


Figure 6 : Phénotypes de colonies sur milieu 1% caséine 1,5% agar.

Croissance de colonies observées après 24 h d'incubation à 37 °C sur milieu M9 1% caséine, 1,5% agar à partir d'une préculture de 16 h en milieu LB, pour les souches utilisées comme témoins. a) Phénotype de croissance de la souche sauvage PA14 et de la souche LasR-défectueux dans laquelle le gène *lasR* a été réintroduit (PA14 *lasR*::Gm, pUCPSK-*lasR*) ; b) Phénotype de croissance de la souche LasR-défectueux (PA14 *lasR*::Gm) et de la souche LasB-défectueux (PA14 *lasB*::Gm) ; c) Phénotype de croissance de la souche E80 et de souche LasR-défectueux dans laquelle le vecteur RhlR a été réintroduit (PA14 *lasR*::Gm, pUCPSK-*rhlR*) dite LasR-défectueux, RhlR-actif.

3.1.1.2. Observations phénotypiques

A l'aide de cette mise au point, le profil de croissance sur caséine pour les 219 de la collection de souche à l'étude (Figure 7) a été caractérisé. Il est à noter que même de mineurs changements dans les conditions de cultures peuvent influencer sur le résultat final du test. De ce fait, le test été fait plusieurs fois et les résultats pouvaient varier d'un essai à l'autre.

Parmi la totalité de isolats (Figure 7 a)), une majorité présente un profil de type WT, soit 109 isolats (49,8%), une autre portion de 84 isolats (38,4%) présente un profil de type LasR-défectueux et enfin une minorité de isolats présentent un profil de type LasR-défectueux/RhIR-actif, soit 26 isolats (11,9%). Les proportions ont également été calculées si l'on considère les échantillons cliniques (prélèvements pulmonaires, d'urines, d'otorhinolaryngologie (ORL) ou de bouts de sondes cathéter) et les échantillons environnementaux (viandes bovines, poissons frais, poissons fumés, sols contaminés aux résidus de produits pétroliers, éviers d'hôpitaux ou environnements non-définis.) séparément, permettant d'obtenir les Figures 7 b) et c).

Parmi les échantillons cliniques, 42,9% des isolats présentent un profil type WT, 52,4% des isolats ont un profil type LasR-défectueux et 4,8% des isolats montrent un profil similaire aux souches du type LasR-défectueux, RhIR-actif.

Les proportions observées ici pour les échantillons environnementaux sont différentes puisque ce sont 51,4% des isolats qui présentent un profil du type WT, 35% des isolats ont un profil type LasR-défectueux avec cette fois-ci, 13,6% des isolats ayant un profil similaire aux souches du type LasR-défectueux, RhIR-actif lors de la croissance sur caséine agar. Les profils phénotypiques de croissance sur milieu caséine pour chacun des isolats est décrit en Annexe 1.

Plus globalement, 57,2% des échantillons cliniques, contre 48,6% des échantillons environnementaux ont montré un profil de croissance sur caséine différent d'une souche du type WT, soit des niveaux de production de protéases extracellulaires différents.

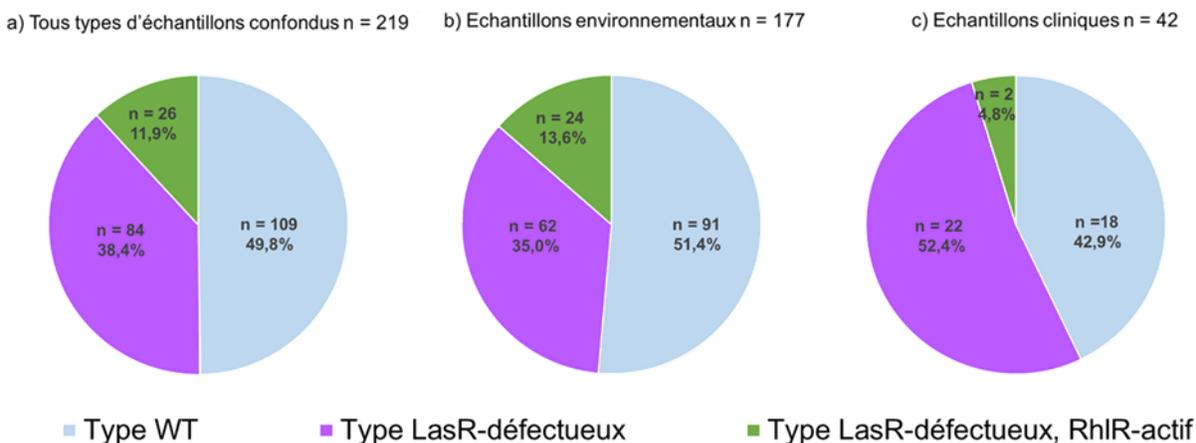


Figure 7 : Répartition des phénotypes selon les environnements.

Représentation schématique des proportions des trois types de profils obtenus sur un milieu caséine : a) Proportions calculées considérant la totalité des échantillons ;b) Proportions calculées considérant uniquement les échantillons cliniques provenant de prélèvements pulmonaires, d'urines, d'otorhinolaryngologie (ORL) ou de bouts de sondes cathéter ;c) Proportions calculées considérant uniquement les échantillons environnementaux provenant de viandes bovines, de poissons frais, de poissons fumés, de sols contaminés aux résidus de produits pétroliers, d'éviers d'hôpitaux ou d'environnements non-définis.

3.1.2 Sélection d'un groupe de souches représentatives

Le potentiel fonctionnel du système Las de tous ces isolats avait été précédemment caractérisé de façon préliminaire par deux stagiaires : Sara Habouria et par Donatien Comoe Benie. A cette première caractérisation a été combinée au test de croissance sur un milieu ayant pour seule source de carbone la caséine.

L'objectif étant de sélectionner environ 30 souches, soit une dizaine de souches ayant le profil de type WT, une dizaine de souches ayant le profil de type LasR-défectueux et une dizaine de souches ayant le profil de type LasR-défectueux, RhIR-actif. Pour chaque groupe, il a été choisi au moins un isolat par origine de provenance. En annexe 1, vous trouverez le tableau comportant l'origine et la provenance des souches, ainsi que les deux caractérisations préliminaires des profils de QS des souches. Les souches sélectionnées pour la suite de l'étude étant inscrites en gras et suivies d'un astérisque.

En fonction du profil de croissance sur milieu caséine obtenu précédemment, de l'origine et du type d'échantillon, un panel représentatif de chaque type de profil a été choisi parmi les 219 isolats de la collection pour la suite du projet. Comme décrit dans le Tableau 15, 10 isolats ont été sélectionnés pour un premier groupe ayant le profil de type WT, comprenant 2 isolats issus d'éviers d'hôpitaux, 7 isolats collectés sur des produits animaliers et un isolat collecté d'un sol contaminé aux résidus de produits pétroliers.

Le deuxième groupe est composé de 10 isolats ayant le profil de type LasR-défectueux comprenant 2 isolats collectés dans l'environnement (non-déterminé), 3 isolats issus d'éviers d'hôpitaux, 3 isolats collectés sur des produits animaliers et enfin, 2 isolats collectés sur des sols contaminés aux résidus de produits pétroliers. Le troisième et dernier groupe comprend 10 isolats ayant le profil de type LasR-défectueux, RhIR-actif, il est composé de 3 isolats issus d'évier d'hôpitaux, de 5 isolats collectés sur des produits animaliers, d'un isolat collecté sur des sols contaminés aux résidus de produits pétroliers et d'un isolat collecté dans un environnement non-déterminé.

Dans un souci de compréhension, tout au long de nos tests futurs, les souches sélectionnées pour ce groupe seront dites appartenant au type dans lesquels elles ont été classées avec les résultats du test préliminaire de croissance en caséine. Cependant, il est important de noter que même si le test de croissance en milieu caséine a été effectué plusieurs fois dans les mêmes conditions, les résultats n'ont pas toujours montré une répétabilité. Il s'agit d'une méthode préliminaire permettant de visualiser la production de protéases extracellulaires et ainsi de faire des suppositions quant aux types de QS que la bactérie met en place dans ces conditions. Les tests effectués par la suite permettront une classification plus solide donc il n'est pas exclu que certaines souches sélectionnées n'aient pas été classées dans le bon type préliminaire.

Dans chacun des trois groupes, des souches témoins ont été ajoutés, permettant la validation du bon fonctionnement des expériences et la comparaison des résultats : elles sont regroupées dans le Tableau 16. Ainsi pour le groupe de type WT, PA14 et PAO1 ont été choisis. Pour le groupe de type LasR-défectueux, il a été choisi d'utiliser des mutants dans le gène *lasR*, soit PA14 *lasR::Gm* et PAO1 *lasR::Gm*. Pour finir, pour le troisième groupe du type LasR-défectueux, RhIR-actif, nous avons lors de cette étude modifié une nouvelle fois la souche PA14 *lasR::Gm* comme indiqué auparavant pour que celle-ci ait tout de même un système Rhl actif, soit PA14 *lasR::Gm*, pUCPSK-*rhIR*. De plus, pour ce dernier groupe, le professeur Ajai Dandekar (University of Washington à Seattle) (Cruz *et al.*, 2020; Feltner *et al.*, 2016) a fourni les isolats E90, E125 et E167 qui auraient les caractéristiques de souches LasR-défectueux, RhIR-actif.

Tableau 15 : Liste et caractéristiques des isolats sélectionnés.

Code Souche	Provenance	Type d'échantillon	Source	Caractérisation préliminaire	Profil sur milieu Caséine
DCB62 ; PB VB17 C1	Port Bouet	Viande bovine	Benie et al., 2017	LasR- like	WT
19SJO	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers	Déziel et al., 1996	LasR- like	
PA-CL513	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	WT like	
PA-CL532	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	WT like	
DCB12 ; ABO VB30 C1	Abobo	Viande bovine	Benie et al., 2017	WT like	
DCB13 ; YOP VB2 C3	Yopougou	Viande bovine	Benie et al., 2017	WT like	
DCB22 ; ABO PFR5 C2	Abobo	Poisson Frais	Benie et al., 2017	WT like	
DCB31 ; ABO PF5 C1	Abobo	Poisson Fumé	Benie et al., 2017	WT like	
DCB43 ; ADJ PF14 C2	Adjame	Poisson Fumé	Benie et al., 2017	WT like	
DCB88 ; ADJ PFR26 C1	Adjame	Poisson Frais	Benie et al., 2017	WT like	
PA-CL507	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	WT like	
PA-CL504	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	WT like	
18G	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers	Déziel et al., 1996	LasR- like	
32SB	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers	Déziel et al., 1996	LasR- like	
PA-CL521c	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	ND	
DCB3 ; ABO PFR11 C1	Abobo	Poisson Frais	Benie et al., 2017	LasR- like	
DCB36 ; ABO VB5 C2	Abobo	Viande bovine	Benie et al., 2017	WT like	
DCB85 ; ADJ VB12 C1	Adjame	Viande bovine	Benie et al., 2017	WT like	
DCB117 ; ENVPBT	Port Bouet	Environnement	Benie et al., 2017	WT like	
DCB108 ; ENVADJ	Adjamé	Environnement	Benie et al., 2017	LasR- like	
DCB74 ; PB VB14 C1	Port Bouet	Viande bovine	Benie et al., 2017	WT like	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL521b	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	LasR- like	
PA-CL521a	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	LasR- like	
78RV	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers	Déziel et al., 1996	LasR- like	
PA-CL512	Canada	Evier d'hôpital	Lalancette et al., 2017	LasR- like	
DCB38 ; ABO VB5 C3	Abobo	Viande bovine	Benie et al., 2017	LasR- like	
DCB50 ; ABO PF26	Abobo	Poisson Fumé	Benie et al., 2017	LasR- like	
DCB54 ; ABO PF3 C2	Abobo	Poisson Fumé	Benie et al., 2017	LasR- like	
DCB86 ; ABO VB4C1	Abobo	Viande bovine	Benie et al., 2017	LasR- like	
DCB109 ; ENVADJ	Adjamé	Environnement	Benie et al., 2017	WT like	

ORL: Otorhinolaryngique. (Benie et al., 2017; Deziel et al., 1996; Lalancette et al., 2017).

Tableau 16 : Souches témoins utilisées comme références.

Code Souche	Source	Détails	Profil sur milieu Caséine
PA14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	WT
PAO1	(Stover <i>et al.</i> , 2000)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (référence)	
PA14 <i>lasR</i> ::Gm	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, mutant pour le gène <i>lasR</i> généré par double recombinaison homologue.	LasR-défectueux
PAO1 <i>lasR</i> ::Gm	(Wang <i>et al.</i> , 2015)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (PAO1-UW), mutant pour le gène <i>lasR</i> généré par double recombinaison homologue.	
PA14 <i>lasR</i> ::Gm, pUCPSK- <i>rhIR</i>	(Groleau <i>et al.</i> , 2020)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, mutant pour le gène <i>lasR</i> généré par double recombinaison homologue et complémentation avec le plasmide pUCPSK (Watson <i>et al.</i> , 1996)- <i>rhIR</i> (construction non publiée).	LasR-défectueux, RhIR-actif
E90	(Cruz <i>et al.</i> , 2020)		
E125	(Feltner <i>et al.</i> , 2016)		
E167	(Feltner <i>et al.</i> , 2016)		

3.2 Etude de la production de molécules-signals du QS

Les différents systèmes du QS sont régis par la production et l'utilisation de molécules de signalisation tout au long de la croissance de la bactérie. Pour chacun des isolats sélectionnés appartenant aux trois groupes définis, nous avons donc quantifié les molécules AHL et HAQ à différents moments de la croissance bactérienne. Dans un premier temps, les AHL ont été quantifiés dans le milieu dans lequel ils sont le plus souvent étudiés, le milieu TSB. Par la suite, les cultures ont été faites en milieu King's A car il permet la surproduction de pyocyanine chez les isolats LasR-défectueux. Les HAQ ont ici été quantifiés à partir des mêmes cultures ayant servi à l'étude de la pyocyanine soit après une croissance bactérienne dans le milieu King's A.

3.2.1 Production de AHL à 3h et à 6h

Les molécules de signalisation du type AHL ont été quantifiées à la fin de phase de latence soit après 3 h d'incubation et à la fin de la phase de croissance exponentielle, soit après 6 h d'incubation. Les AHL produites par le système Las, le 3-oxo-C₁₂-HSL et par le système Rhl, C₄-HSL ont été quantifiées par HPLC-MS, les concentrations obtenues en ppm ont été normalisées par la concentration en protéine totale de la culture. Les résultats sont présentés respectivement en Figures 8 et 9. Les valeurs numériques sont présentées en Annexe 3.

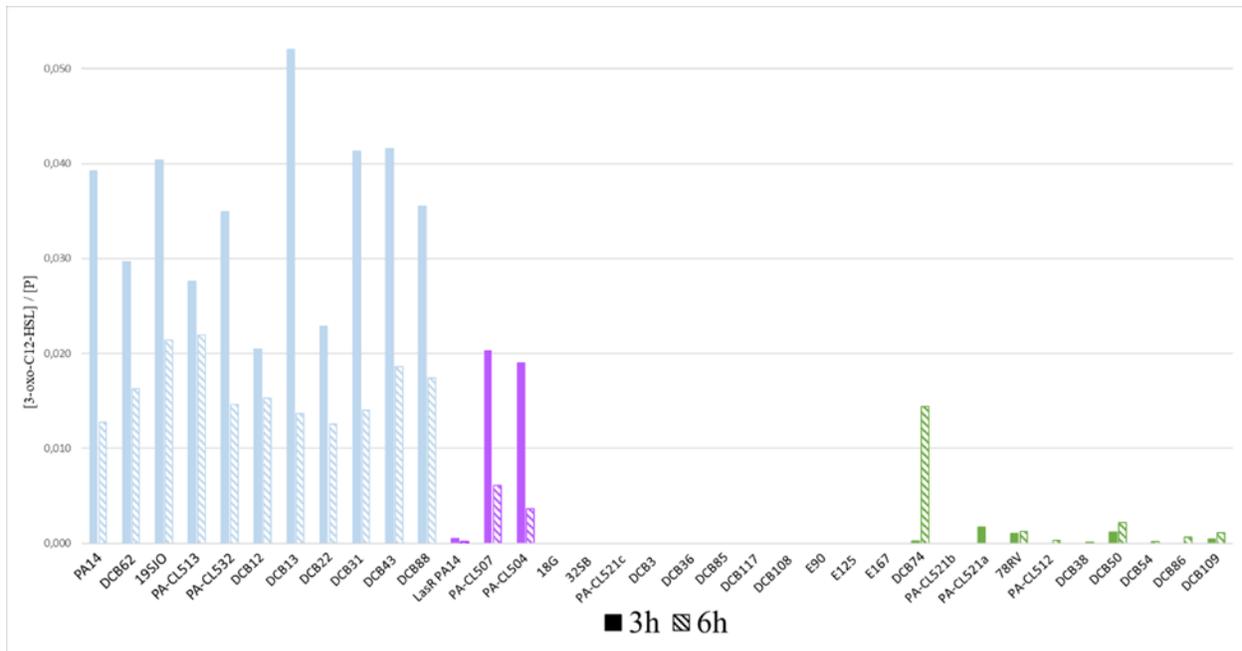


Figure 8 : Production de 3-oxo-C₁₂-HSL après 3 h et 6 h d'incubation en milieu TSB.

La production de la molécule de signalisation spécifique au système Las, le 3-oxo-C₁₂-HSL, a été quantifiée à 3 h (plein) et à 6 h (rayé) pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en vert violet) et du groupe LasR-défectueux, RhIR actif (en vert). Les valeurs ont été normalisées par la quantité de protéine présente dans l'échantillon analysé.

De manière globale, nous pouvons noter que les souches du type WT produisent du 3-oxo-C₁₂-HSL en plus grande quantité si l'on compare aux quantités produites par les isolats du type LasR-défectueux et du type LasR-défectueux, RhIR-actif qui sont très faibles ou nulles. Pour les souches de type WT, au début de la phase exponentielle de croissance dans nos conditions (au temps 3 h), la quantité de 3-oxo-C₁₂-HSL est environ le double de la quantité mesurée après 6 h d'incubation. Chez notre souche témoin PA14 *lasR*::Gm le 3-oxo-C₁₂-HSL est très faiblement produit, résultat attendu puisque le système Las n'est pas fonctionnel pour cette souche, ne permettant pas la production. Le même phénomène est observé pour tous les isolats du groupe *lasR*-défectueux, sauf pour les isolats PA-CL507 et PA-CL504 qui même s'ils ne produisent pas autant de 3-oxo-C₁₂-HSL qu'une souche du type WT, montrent une production significative.

Concernant les isolats du type LasR-défectueux, RhIR-actif, la production mesurée est faible mais présente pour les isolats DCB74, PA-CL521a, 78RV, PA-CL512, DCB38, DCB50, DCB54, DCB86 et DCB109. Avec l'isolat DCB74 qui montre une plus grande production de 3-oxo-C₁₂-HSL après 6 h d'incubation que toutes les souches du type LasR-défectueux et du type LasR-défectueux, RhIR-actif. Parmi les isolats du type LasR-défectueux, RhIR-actif, seuls les isolats E90, E125, E167 et PA-CL521b n'ont produit aucun 3-oxo-C₁₂-HSL.

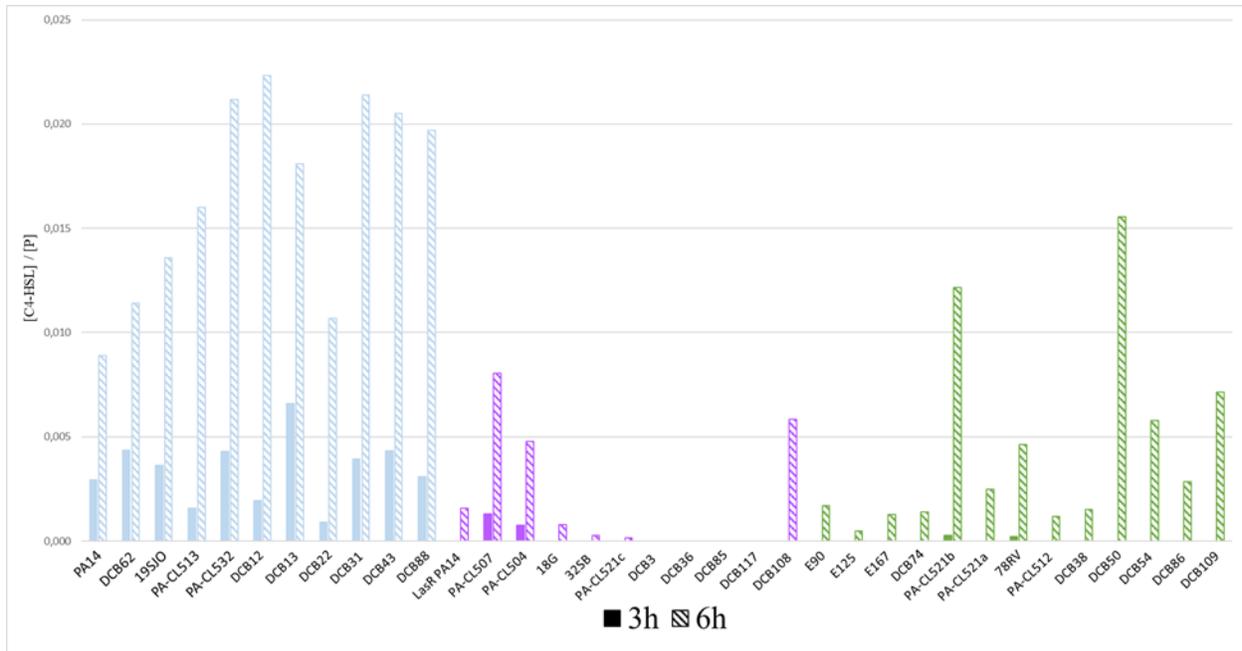


Figure 9 : Production de C₄-HSL après 3h et 6 h d'incubation en milieu TSB.

La production de la molécule de signalisation spécifique au système Rhl, le C₄-HSL, a été quantifiée à 3 h (plein) et à 6 h (rayé) pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhlR actif (en vert). Les valeurs ont été normalisées par la quantité de protéine présente dans l'échantillon analysé.

Concernant la quantité de C₄-HSL, le phénomène inverse que pour le 3-oxo-C₁₂-HSL est observé pour les souches du type WT. En effet, il y a peu de C₄-HSL produit après 3 h d'incubation pour une quantité plus importante après 6 h d'incubation, soit au moment où le système Rhl est plus actif.

Pour le témoin PA14 *lasR* ::Gm ainsi que pour les isolats, 18G, 32SB, PA-CL521c et DCB108, il y a production de C₄-HSL uniquement après 6 h d'incubation. Pour les isolats PA-CL507 et PA-CL504, le profil de production est encore une fois identique au type WT, soit une augmentation de la production entre les temps 3 h et 6 h.

Si la production de C₄-HSL est nulle ou très faible (pour PA-CL521b et 78RV) à 3 h pour les isolats du type LasR-défectueux, RhlR-actif, la production paraît significative après 6 h d'incubation. Cette observation suggérant une activité tardive du système Rhl pour les isolats classés dans le type LasR-défectueux, RhlR-actif.

Ne prenant en considération que les résultats pour les souches de notre panel, en particulier les souches de référence, nous retiendrons de ces résultats qu'une souche de type WT, produira dans son milieu extracellulaire, du 3-oxo-C₁₂-HSL (beaucoup à 3 h et moins à 6 h) et du C₄-HSL

(peu à 3 h et plus à 6 h). Une souche du type LasR-défectueux aurait tendance à ne produire que très peu tardivement, ou pas de 3-oxo-C₁₂-HSL et de C₄-HSL. En revanche, une souche du type LasR-défectueux, RhlR-actif semble produire une quantité faible de 3-oxo-C₁₂-HSL et une quantité plus importante de C₄-HSL à 6 h.

3.2.2 Productions de HAQ à 6h et à 24h

Puisque les autres molécules de signalisation du QS, telles que le HHQ-C₇, le HQNO-C₇ et le PQS-C₇, sont produites des suites de l'activation des deux systèmes principaux Las et Rhl, il a été décidé de les quantifier non pas en début de phase exponentielle de croissance, mais plutôt en fin de phase exponentielle de croissance, soit à 6 h. De plus, les isolats n'ont pas tous la même vitesse de croissance, nous avons donc quantifié également ces molécules après 24 h d'incubation afin d'obtenir une quantification représentative d'une production ou d'une utilisation globale. Comme pour les AHL, les HAQ ont été quantifiées au HPLC-MS, les productions des molécules HHQ-C₇, PQS-C₇ et HQNO-C₇ à 6h à 24h sont donc représentés en Figures 10, 11 et 12 respectivement (données brutes en Annexe 3).

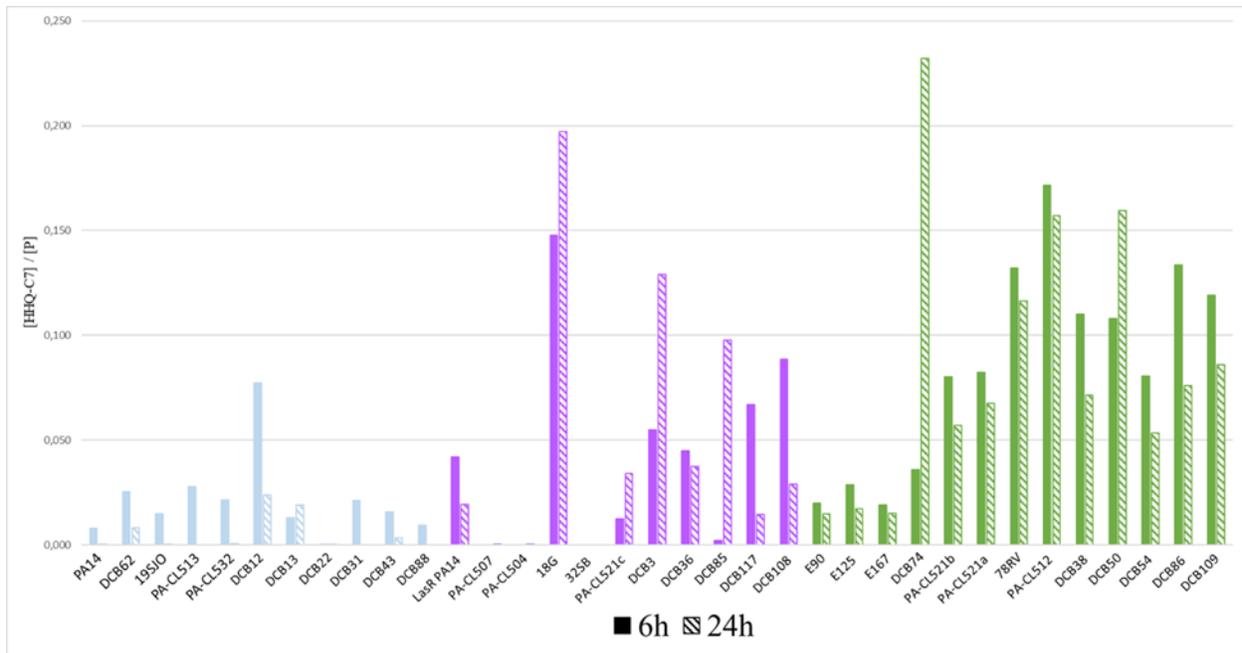


Figure 10 : Production de HHQ-C₇ après 6 h et 24 h d'incubation en milieu King's A.

La production de la molécule de signalisation spécifique au système PQS, le HHQ-C₇, a été quantifiée à 6 h (plein) et à 24 h (rayé) pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhIR actif (en vert). Les valeurs ont été normalisées par la quantité de protéine présente dans l'échantillon analysé.

Pour les isolats du type WT, le HHQ-C₇ est détecté après 6 h d'incubation mais peu après 24h. L'hypothèse la plus probable est qu'il a été converti en PQS-C₇. En effet, l'enzyme PqsH permet la production de PQS-C₇ à partir de HHQ-C₇. Le HHQ-C₇ pourra se lier à la protéine MvfR pour réguler positivement la transcription de l'opéron *pqsABCDE*.

C'est notamment l'hypothèse émise pour les isolats PA14, 19SJO, PA-CL513, PA-CL532, DCB31 et DCB88, pour lesquels on voit une disparition complète du HHQ-C₇ après 24h d'incubation. Puisque tous les isolats n'ont pas les mêmes vitesses de croissance, il est possible de suggérer que les isolats DCB62, DCB12, DCB13 et DCB43, ayant toujours du HHQ-C₇, utilisent ce dernier plus lentement ou plus tardivement.

Concernant les isolats du type LasR-défectueux et du type LasR-défectueux, RhIR-actif, les profils de production sont semblables. Dans la majorité des cas, après 6 h et 24 h, les niveaux de HHQ-C₇ mesurés sont beaucoup plus importants que pour un isolat du type WT. En effet, à 6 h comme à 24 h, les isolats produisent toujours du HHQ-C₇, mais celui-ci semble s'accumuler puisqu'il n'est pas converti par PqsH dont l'activité est d'ordinaire régulée par LasR.

On notera le profil particulier des isolats DCB22, PA-CL507, PA-CL504 et 32SB chez lesquels à 6h ou à 24h, aucun HHQ-C₇ n'est détecté dans le milieu.

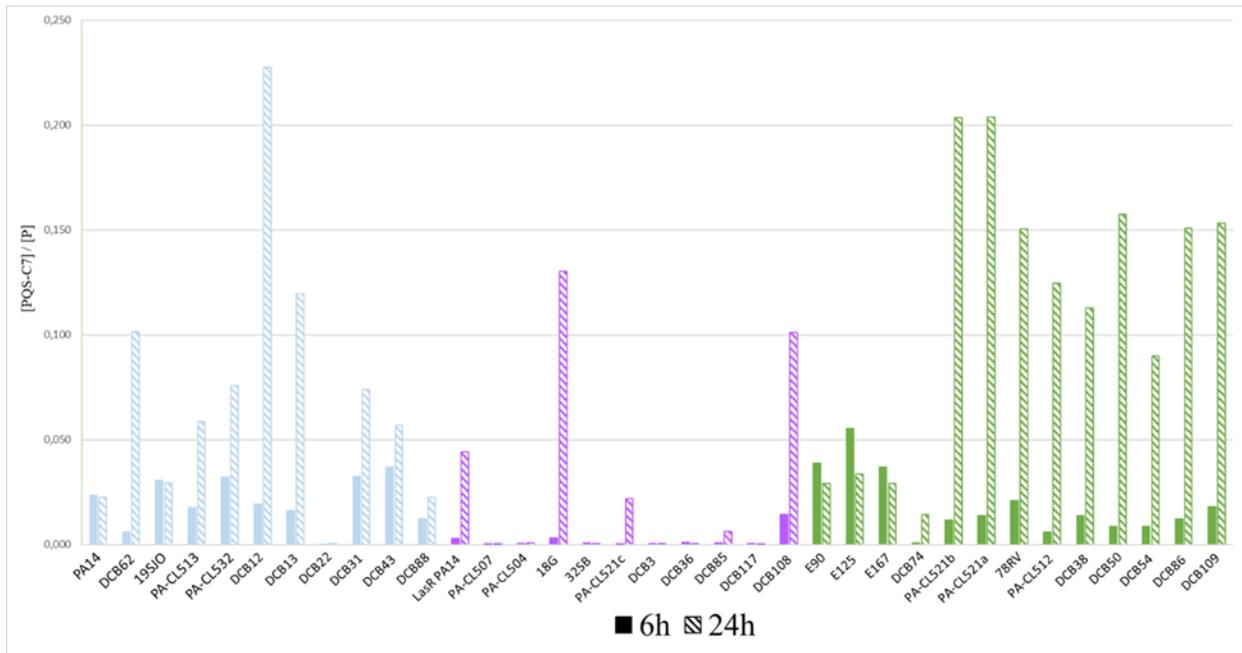


Figure 11 : Production de Pqs-C₇ après 6 h et 24 h d'incubation en milieu King's A.

La production de la molécule de signalisation spécifique au système Rhl, le Pqs-C₇, a été quantifiée à 6 h (plein) et à 24 h (rayé) pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhlR actif (en vert). Les valeurs ont été normalisées par la quantité de protéine présente dans l'échantillon analysé.

La production de molécule Pqs-C₇ à partir de HHQ-C₇ est réalisée par l'enzyme PqsH dont l'activité est régulée positivement pas LasR. Ainsi pour les isolats du type WT, lorsqu'à 24 h, le HHQ-C₇ n'est plus détecté et que beaucoup de Pqs-C₇ est détecté, on peut supposer que PqsH a transformé la majorité des HHQ-C₇ en Pqs-C₇. En effet, si le système Las est activé, on observe une production faible à 6 h et une production forte à 24 h de Pqs-C₇.

Pour les isolats DCB62, DCB12, DCB13 et DCB43, nous avons observé une faible production de HHQ-C₇ à 24 h, signe éventuellement d'un retard de production car les autres souches du types WT ne produisaient plus de HHQ-C₇ à 24 h. Pour ces isolats, la production de Pqs-C₇ est plus importante à 24 h également qu'à 6 h, alors qu'elle est identique (à 6 h et à 24 h) pour PA14. La conversion du HHQ-C₇ en Pqs-C₇ par PqsH est conservée mais semble donc simplement retardée.

En revanche, pour les isolats du type LasR-défectueux, le Pqs-C₇ n'est détecté qu'en très faible quantité, sauf pour PA14 *lasR*::Gm, 18G et DCB108, ou une plus grande concentration est

mesurée à 24 h. En supposant encore une activation tardive du système Las, la transformation de HHQ-C₇ en PQS-C₇ a peut-être été activé par RhIR pour ces isolats.

Concernant les isolats classés dans le type LasR-défectueux, RhIR-actif, deux profils de production sont observés. Les isolats E90, E125 et E167 produisent plus de molécules PQS-C₇ à 6 h qu'à 24 h, tandis que tous les autres isolats de ce type produisent plus de molécules PQS-C₇ à 24 h qu'à 6 h.

Comme pour le HHQ-C₇, les isolats DCB22, PA-CL507, PA-CL504 et 32SB ne semblent pas produire de PQS-C₇.

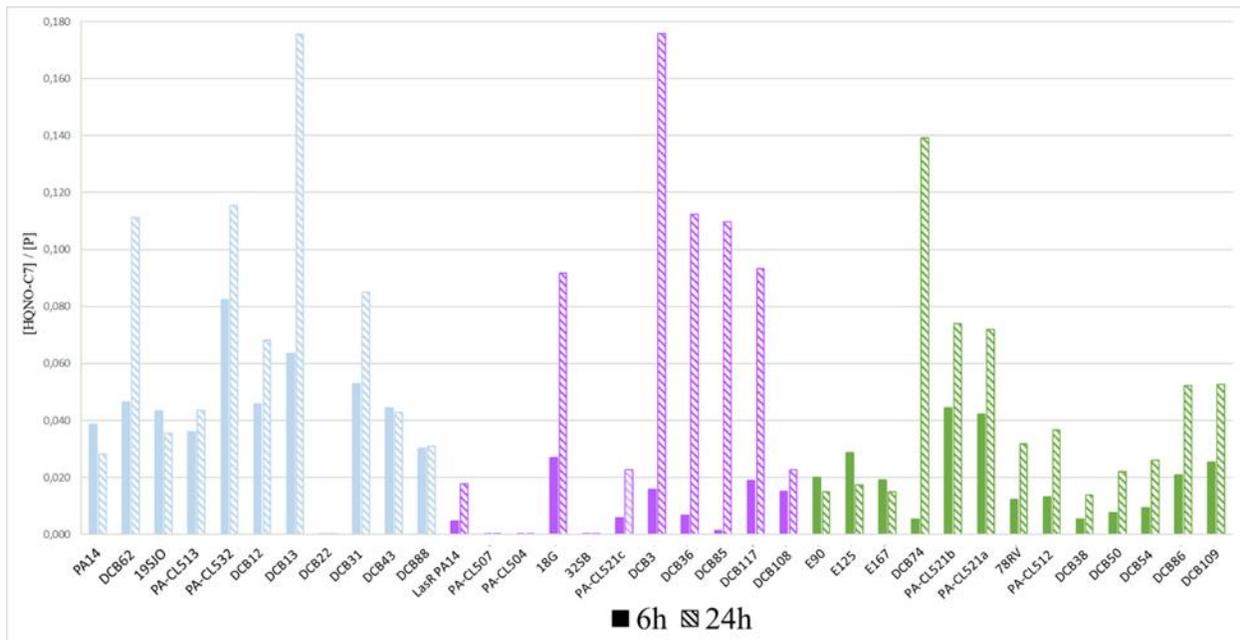


Figure 12 : Production de HQNO-C₇ après 6 h et 24 h d'incubation en milieu King's A.

La production de la molécule de signalisation spécifique au système PQS, le HQNO-C₇, a été quantifié à 6 h (plein) et à 24 h (rayé) pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhIR actif (en vert). Les valeurs ont été normalisées par la quantité de protéine présente dans l'échantillon analysé.

La production du HQNO-C₇ est soumise à la régulation positive qu'applique LasR sur l'enzyme PqsL permettant sa synthèse. Du HQNO-C₇ est donc détecté après 6 h et après 24 h d'incubation pour les souches ayant un système Las fonctionnel, soit les isolats du type WT. En effet, pour ces derniers, il est observé une production de HQNO-C₇ relativement élevée à 6 h déjà, et une production plus forte à 24 h, lorsque le système PQS a pu entrer en jeu de manière totale permettant la production du précurseur du HQNO-C₇ via l'opéron *pqsABCD*. Concernant les isolats du type LasR-défectueux, une très faible concentration de HQNO-C₇ est mesurée à 6 h et une plus forte concentration après 24 h.

Chez un isolat mutant pour le système Las, ce dernier finira tout de même par s'activer de manière très tardive. Ce qui peut expliquer la quantité de HQNO-C₇ mesurée chez ces isolats après 24 h car LasR pourra finalement positivement activer la production de HQNO-C₇ via PqsL.

Pour les isolats ayant été classé de façon préliminaire en type LasR-défectueux, RhIR-actif, les niveaux de productions observés sont plus faibles, mais plus constant. C'est-à-dire, que pour tous les isolats, une quantité de HQNO-C₇ à 6 h et à 24 h a été mesurée. Généralement après 24 h d'incubation, la production de HQNO-C₇ est plus forte, mais les différences de production sont moins importantes ici (sauf pour DCB74). On notera que pour la majorité des isolats de ce groupe, la production de HQNO-C₇ est plus forte à 24 h qu'à 6 h et le phénomène inverse est observé pour les isolats E90, E125 et 167. Observation déjà réalisée pour la production de PQS-C₇ de ces isolats. Si la régulation positive des deux enzymes catalysant la production de HQNO-C₇ et de PQS-C₇ est habituellement faite par LasR, il se pourrait qu'ici elle soit faite par un autre régulateur et relativement tôt dans la croissance, pourquoi pas via une activation par le système Rhl.

Finalement, les isolats DCB22, PA-CL507, PA-CL504 et 32SB pour lesquels nous n'avons pas quantifié de HHQ-C₇ et de PQS-C₇ à 6 h ou à 24 h, n'ont également pas montré de production de HQNO-C₇ à 6h ou à 24 h.

3.3 Etude de l'activité du système Rhl

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de communication au sein des différents profils QS de nos trois classes de souches, plusieurs cibles du système Rhl ont été étudiées. Puisque le régulateur RhIR est un activateur direct de l'opéron *rhlAB* responsable de la production de rhamnolipides, le niveau de transcription à partir du promoteur de l'opéron *rhlAB* a été mesurée à l'aide d'un rapporteur *rhlA-gfp*. De plus, la production de rhamnolipide a été quantifiée par HPLC-MS. Nous savons également que RhIR contrôle la transcription d'autres gènes codant pour des exo-produits et notamment pour les opérons *phz1* et *phz2* responsables de la production de phénazines telle la pyocyanine. Dans un second temps, le taux de pyocyanine produit a donc été mesuré. Pour finir avec l'étude du système Rhl, l'expression du gène *rhlR* a été mesurée à l'aide d'un rapporteur *rhlR-lacZ*.

3.3.1 Expression de l'opéron *rhIAB*

Pour chacune des 30 souches, le rapporteur *rhIA-gfp* a été introduit par électroporation. Mesurer l'activité de ce dernier permet de mesurer l'expression du gène *rhIA* (Figure 13). La fluorescence de la Green Fluorescence Protein (*gfp*) a été mesurée après 30 h d'incubation, avec une longueur d'onde d'excitation de 489 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm.

Pour les souches du type WT, il est attendu que *rhIA* sera exprimé. Concernant les autres isolats du type WT, les isolats 19SJO, PA-CL513, PA-CL532, DCB43 et DCB88 présentent une activité faible à moyenne pour le rapporteur *rhIA-gfp*. On notera une forte activité pour l'isolat DCB13 et une activité très faible ou nulle pour les isolats DCB62, DCB12, DCB22 et DCB31.

Comme attendu, aucune activité du gène rapporteur n'a été mesurée chez les témoins PA14 *lasR*::Gm et PAO1 *lasR*::Gm (nouveau témoin ajouté dans l'analyse). Il en est de même pour les autres isolats de ce groupe, excepté pour PA-CL507, PA-CL521c et DCB108 qui montrent une activité du rapporteur, suggérant une expression du gène *rhIA* conservée et donc un système Rhl potentiellement actif. Pour le témoin PA14 *lasR*::Gm pUCPSK-*rhIR*, nous nous attendions à mesurer une activité pour le rapporteur *rhIA-gfp*, cependant ça n'a pas été le cas ni lors de cette expérience, ni lors des suivantes effectuées pour confirmer ce résultat. Pourtant, pour plusieurs des isolats du type LasR-défectueux, RhIR-actif, une activité pour le rapporteur *rhIA-gfp* a été détectée. Pour ce témoin PA14 *lasR*::Gm pUCPSK-*rhIR*, l'absence d'activité suggère fortement que l'insertion d'un deuxième plasmide n'a pas fonctionné et que la bactérie a finalement perdu les deux plasmides.

En effet, une activité du rapporteur pour les souches E90, E125, E167, PA-CL521C, PA-CL521a, 78RV, PA-CL512, DCB38, DCB50, DCB86 et DCB109 a été mesurée. L'activité mesurée pour les isolats DCB74 et DCB54 reste faible suggérant très peu d'expression du gène *rhIA* pour ces derniers.

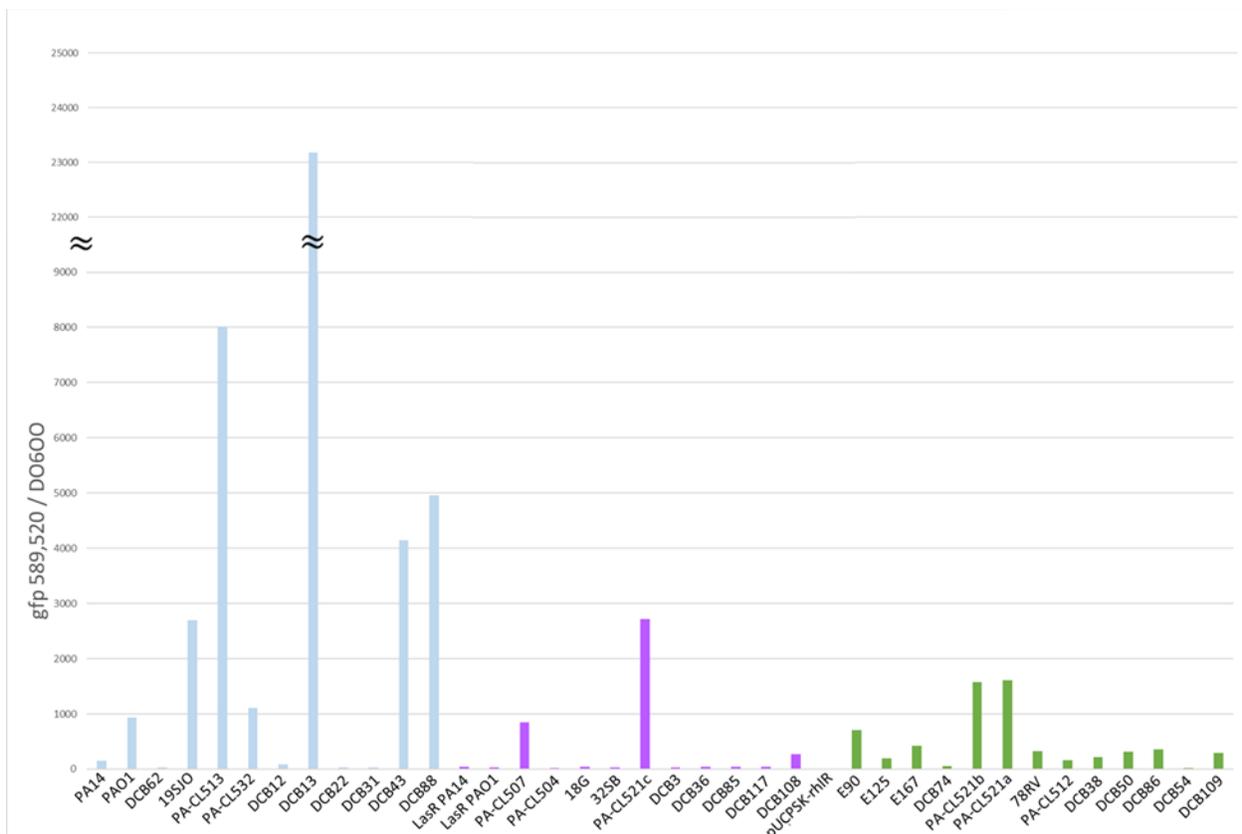


Figure 13 : Mesure de l'activité du gène rapporteur *rhIA-gfp*.

Mesure de la fluorescence produite par l'expression du rapporteur *rhIA-gfp* après 30 h d'incubation dans un milieu King's A à 37°C, corrigée par la densité optique (DO₆₀₀), pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhlR actif (en vert). Les gels d'agarose fait pour valider l'insertion du plasmide ne sont pas montrés car ils n'apportent aucune informations supplémentaires nécessaire à la compréhension de la suite du projet. Toutes les valeurs numériques sont présentées en Annexe 3.

3.3.2 Production de rhamnolipides

L'activité du gène *rhIAB* mesurée via l'utilisation du rapporteur *rhIA-gfp* permet une première visualisation des différents niveaux d'activité du système Rhl. Cependant les niveaux d'activité nul ou proche de zéro laissent planer un sérieux doute sur la bonne insertion du plasmide pour certaines souches. Puisqu'il est difficile de différencier si l'activité du gène est nulle ou si c'est le plasmide qui n'est pas correctement intégré, nous avons décidé de quantifier une des cibles de cette opéron, les rhamnolipides.

3.3.2.1. Mise au point

La concentration de rhamnolipides dans des cultures a été généralement mesurée après 24 h d'incubation sous agitation à 37 °C. Constituant additionnel indispensable notamment pour la croissance bactérienne, du fer est ajouté sous différentes formes dans le milieu de culture, ici sous forme de chlorure de fer (FeCl₃) à 100 µM.

Lors de la mise au point, trois isolats représentatifs de chacun des groupes prédéfinis ont été choisis (Tableau 17). Après une préculture de 16 h en milieu TSB à 37 °C sous agitation, les souches sélectionnées pour ce premier test ont été diluées à DO = 0,05 pour commencer l'incubation. Deux périodes d'incubation ont été testées, une incubation de 24 h comme il est généralement fait et une incubation de 6 h, soit à la fin de la phase exponentielle de croissance, moment où les niveaux d'expression du QS sont théoriquement plus représentatif d'un profil ou d'un autre. Afin de pouvoir observer la plus grande différence possible entre les profils, trois concentrations FeCl₃ différentes ont été testées, soit 0, 10 et 100 µM dans le milieu King's A. Pour dissoudre les rhamnolipides dans les cultures, 300 µL de surnageant de culture sont ajoutés à 300 µL de méthanol (MeOH), contenant deux fois la concentration finale de standard interne HHQ-d₄ soit 10 ppm. Ensuite, 500 µL sont transférés dans un vial HPLC-MS et analysés en HPLC-MS (mode négatif) afin de quantifier les RC10C10 et les RRC10C10, les rhamnolipides les plus abondamment retrouvés chez *P. aeruginosa*. Le dosage est relatif puisqu'il est rapporté à une valeur quantitative en utilisant une solution standard composée de 50 ppm de chacun des deux rhamnolipides et 5 ppm de standard interne HHQ-d₄, comme comparaison.

Tableau 17 : Isolats sélectionnés pour la mise au point du test.

Groupes prédéfinis	Type WT	Type LasR-défectueux	Type LasR-défectueux, RhlR-actif
Isolats	PA14	PA14 <i>lasR</i> ::Gm	PA14 <i>lasR</i> ::Gm (pUCPSK- <i>rhlR</i>)
	19SJO	18G	78RV
	DCB62	PA-CL521c	PA-CL521b

Il est à supposer que les souches type WT produiront des rhamnolipides de manière régulière, que les souches type LasR-défectueux produiront une quantité faible de rhamnolipides et que les souches du types LasR-défectueux, RhIR-actif produiront des rhamnolipides si leur système de QS le leur permet après 6 h d'incubation. Les résultats de la mise au point de ce test sont décrits en Figure 14.

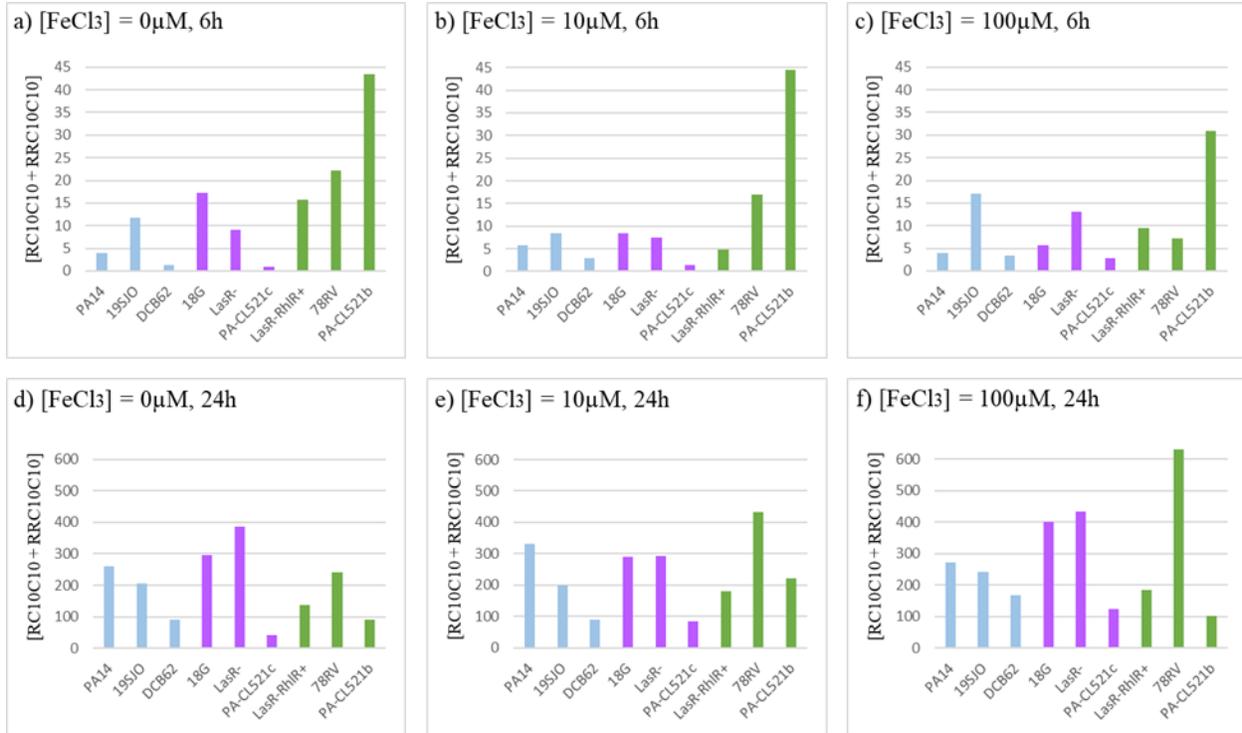


Figure 14 : Tests de production de rhamnolipides dans différentes conditions.

Production de rhamnolipides RC10C10 et RRC10C10 à 6 h a), b) et c) et à 24 h d), e) et f) selon différentes concentrations de Chlorure de Fer (FeCl_3) : 0 μM a) et d) ; 10 μM b) et e) ; 100 μM c) et f), pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhIR actif (en vert). Pour ces 1^{ers} tests, les valeurs n'ont pas été corrigées par la quantité de protéines totales.

Les conditions utilisées à la Figure 14 f), soit 24 h d'incubation dans un milieu contenant 100 μM de FeCl_3 , ne permettent pas ici d'observer une tendance claire dans la différence de production entre les trois groupes prédéfinis. De la même manière, pour les deux autres concentrations de FeCl_3 à 24 h en d) et en e), il n'est pas observé de tendance de production selon le groupe. Cependant, le fait que les valeurs n'aient pas été corrigées par la croissance totale (biomasse en protéine), pourrait en partie expliquer cette situation.

Après 6 h d'incubation, la quantité de rhamnolipide produite est significativement plus faible mais elle permet d'observer plus de différence de niveau de la quantité produite selon les groupes. Ce n'est pas le cas lorsque le milieu contient 100 μM de FeCl_3 (en c)), cependant sans FeCl_3 ajouté en a) ou avec seulement 10 μM de FeCl_3 en b), une faible production de rhamnolipides pour les souches du type WT et du type LasR-défectueux est observée, pour une production moyenne pour les souches du types LasR-défectueux, RhlR-actif.

À la suite de ces observations, une période d'incubation de 6 h en milieu King's A contenant 10 μM de FeCl_3 a été choisi. Ainsi, même si le but général de cette expérience est de catégoriser les souches selon leur production de rhamnolipides, ici la différenciation entre les trois groupes n'est pas visible de manière évidente.

3.3.2.2. Quantification des rhamnolipides

A la suite de la mise au point, les rhamnolipides ont donc été quantifié par HPLC-MS après 6 h d'incubation dans un milieu King's A contenant 10 μM de FeCl_3 . Comme il est possible de l'observer dans la Figure 15 (valeurs numériques présentées en Annexe 3), toutes les souches du type WT produisent des rhamnolipides, de manière plus importante pour DCB31, DCB43 ou DCB88 et de manière plus faible notamment pour DCB62 et DCB12. Concernant les souches du type LasR-défectueux, la production est comme attendu, très faible pour plusieurs isolats, comme PA-CL521c, DCB3, DCB36, DCB85, DCB117, et le témoin PAO1 *lasR* ::Gm. A noter que le témoin PA14 *lasR* ::Gm lui, produit une quantité moyenne de rhamnolipide légèrement plus faible que celle observée pour le témoin PA14. Il en est de même pour les isolats PA-CL507, PA-CL504, 18G, 32SB et DCB108. Parmi les isolats du types LasR-défectueux, RhlR-actif, seul l'isolat DCB74 ne semble pas produire de rhamnolipides après 6 h d'incubation. En effet, tous les autres isolats de ce type produisent des rhamnolipides et notamment DCB109 qui semble en produire une grande quantité, presque une quantité double par rapport aux autres isolats.

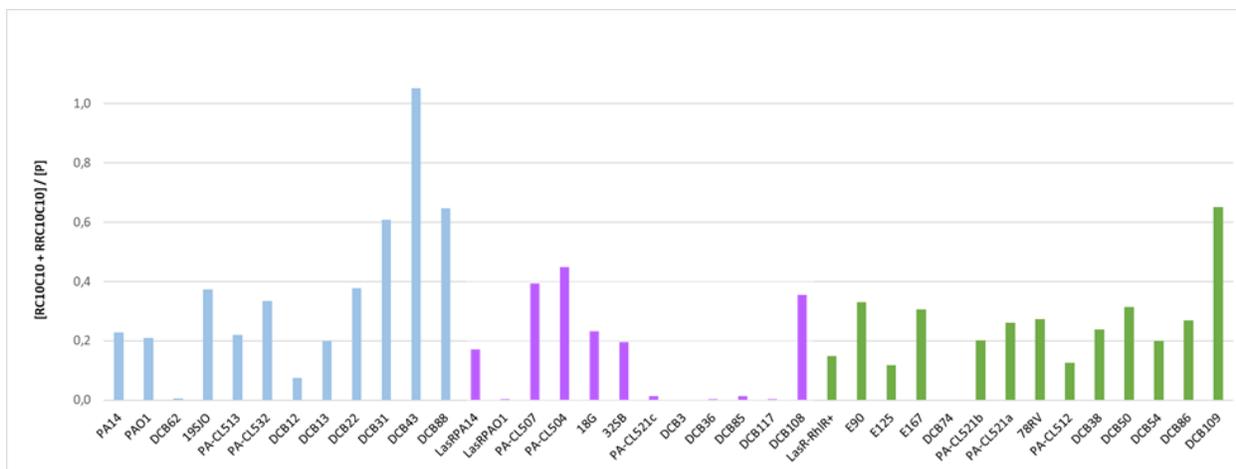


Figure 15 : Production de rhamnolipides.

Production de rhamnolipides mesurée après 6h d'incubation dans le milieu Kings'A, à 37°C. Les quantités de RC10C10 et de RRC10C10 obtenues aux HPLC-MS ont été additionnées puis normalisées par la quantité totale de protéine dans l'échantillon, pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhlR actif (en vert). Toutes les valeurs numériques sont présentées en Annexe 3.

3.3.3 Production de pyocyanine

La pyocyanine est également une des cibles produites via les opérons *phz1* et *phz2* dont la régulation est en partie contrôlée par le système Rhl. Puisque la pyocyanine est souvent étudiée et qu'elle représente un indicateur du fonctionnement du QS chez *P. aeruginosa*, nous avons ici mesuré sa production sous différentes conditions.

3.3.3.1. Différence de production de pyocyanine en TSB et King's A

La production de pyocyanine a été mesurée après 18 h d'incubation en milieu TSB et en milieu King's A. Avec cette expérience, nous avons voulu observer les différences de productions selon ces deux milieux et selon les trois classes prédéfinis de souches. Ainsi à la Figure 16, il est possible d'observer pour chacun des deux milieux, la mesure de la DO₆₉₅ du surnageant de culture corrigée par la concentration en protéine totale de l'échantillon calculée avec la méthode Bradford.

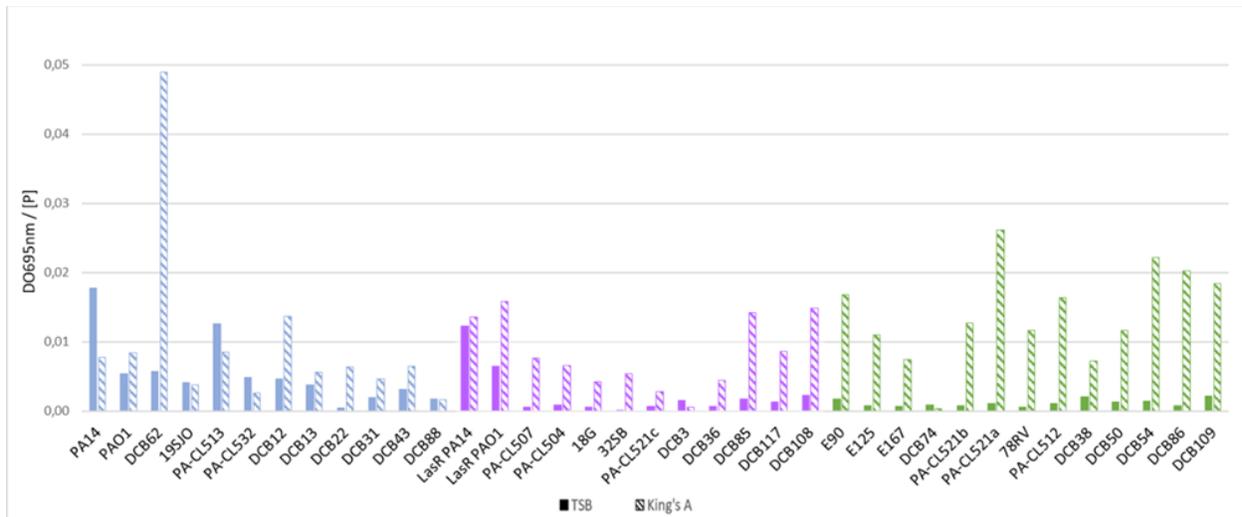


Figure 16 : Production de pyocyanine après 18 h en milieux TSB et en King's A.

Production de pyocyanine mesurée après 18 h d'incubation dans un milieu TSB (plein) ou dans un milieu King's A (rayé), pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhIR actif (en vert). La valeur quantitative obtenue par la lecture de la DO₆₉₅ a été normalisée par la quantité totale de protéine dans l'échantillon. Lors de la mise au point, les résultats ont montré une bonne répétabilité, ainsi pour cette expérience, il n'a pas été fait de réplicat. Toutes les valeurs numériques sont présentées en Annexe 3.

Comme attendu, PA14 produit plus de pyocyanine que PA14 *lasR* ::Gm après 18 h d'incubation dans un milieu TSB, et inversement, PA14 *lasR* ::Gm produit plus de pyocyanine que PA14 après 18 h d'incubation dans un milieu King's A.

Si l'on considère maintenant les souches selon leur type initialement prédit, seuls les isolats 19SJO, PA-CL513, PA-CL532, classés préalablement dans le type WT présentent une production de pyocyanine plus élevée en milieu TSB qu'en milieu King's A, soit un phénotype WT. Dans ce même groupe une production de pyocyanine plus forte en milieu King's A est observée pour les isolats DCB12, DCB13, DCB22, DCB31, DCB43 ainsi que chez DCB62 qui surproduit la pyocyanine presque quatre fois plus qu'en milieu TSB.

Parmi les souches classées LasR-défectueux et LasR-défectueux, RhIR-actif, seul l'isolat DCB3 présente un profil typique d'une souche WT, même si les niveaux de productions de pyocyanine sont faibles. Tous les autres isolats de ces deux groupes présentent des niveaux de production de pyocyanine après 18 h d'incubation similaires aux souches témoins PA14 *lasR* ::Gm et PAO1 *lasR* ::Gm.

On notera également que lors de cette expérience, PAO1 a présenté des niveaux de production similaires à une souche type LasR-défectueux. L'étude de cette souche et de son mutant est ici plus prise à titre d'information qu'à titre de référence.

Par la clairement plus grande production en milieu King's A par rapport au milieu TSB, cette expérience peut permettre une distinction entre une souche type WT et une souche type LasR-défectueux, si ces dernières possèdent des phénotypes de production de pyocyanine réguliers. Cependant, cette méthode ne permet pas la distinction entre une souche LasR-défectueux d'une souche avec un phénotype LasR-défectueux, RhlR-actif.

3.3.3.2. Production de pyocyanine à 6 h et à 24 h en milieu King's A

L'étude de la production selon deux milieux de culture a permis de mettre en évidence qu'il y a une plus grande quantité produite en milieu King's A pour chacun des groupes après 18 h d'incubation. C'est pourquoi, nous avons maintenant décidé d'observer l'évolution de cette production au fil de la croissance bactérienne, soit à 6 heures et à 24 heures d'incubation en Figure 17 (les valeurs numériques sont présentées en Annexe 3).

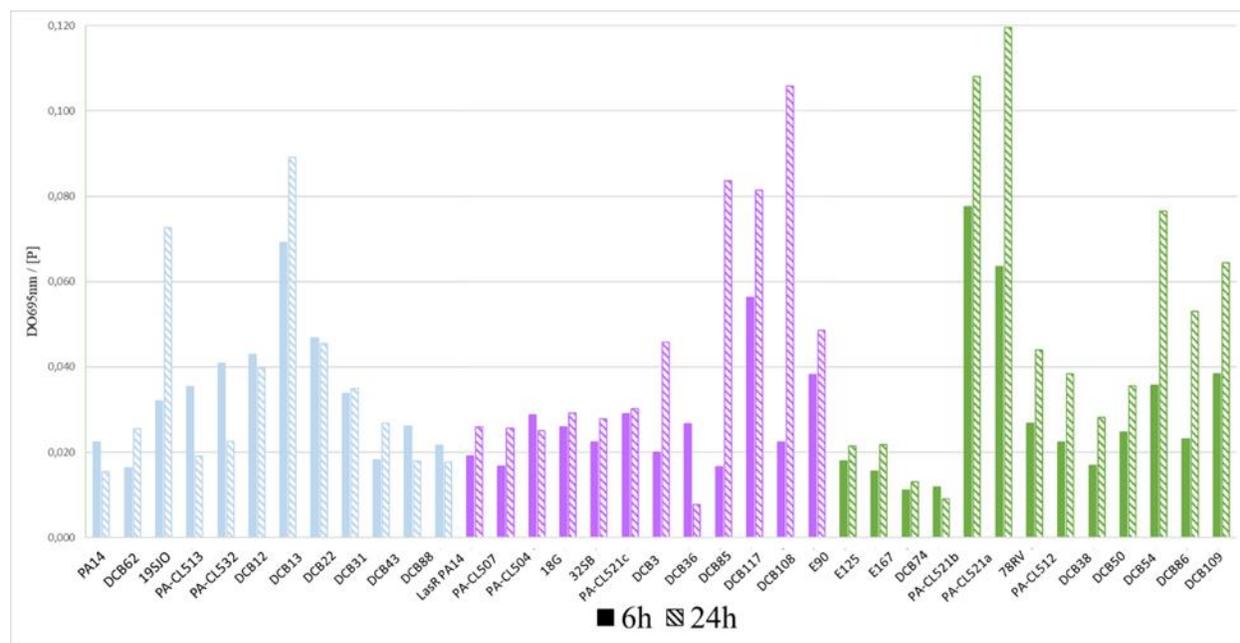


Figure 17 : Production de pyocyanine après 6 h et 24 h en milieu King's A.

Production de pyocyanine mesurée après 6 h (plein) ou 24 h (rayé) d'incubation dans un milieu TSB, pour chacun des isolats du groupe WT (en bleu), du groupe LasR-défectueux (en violet) et du groupe LasR-défectueux, RhlR actif (en vert). La valeur quantitative obtenue par la lecture de la DO₆₉₅ a été normalisée par la quantité totale de protéine dans l'échantillon. Lors de la mise au point, les résultats ont montré une bonne répétabilité, ainsi pour cette expérience, il n'a pas été fait de réplicat. Toutes les valeurs numériques sont présentées en Annexe 3.

De manière attendue puisque la pyocyanine est rapidement produite par une souche type WT, il est observé une plus grande production de pyocyanine à 6 h qu'à 24 h pour les isolats du type WT 19SJO, PA-CL513, PA-CL532, DCB13, DCB43 et DCB88. Les isolats DCB62, DCB12 et DCB22, eux montrent une production de pyocyanine plus importante après 24 h d'incubation.

Phénotype qui semble être ici plutôt représentatif du type LasR-défectueux et LasR-défectueux, RhlR-actif. En effet, pour tous les isolats de ces deux groupes, sauf pour DCB3 et DCB74, la production de pyocyanine est plus tardive.

3.3.4 Mesure de l'expression du gène *rhlR*

L'analyse des cibles du système Rhl permet la visualisation globale du fonctionnement de ce système. Pour mieux le comprendre, nous avons essayé de visualiser l'activité du gène *rhl* lui-même car c'est normalement lorsqu'il est transcrit que le système débute une nouvelle cascade de régulation.

3.3.4.1. Vérification des transformants

Afin de mesurer l'activité du gène *rhlR*, le rapporteur *rhlR-lacZ* (pPCS1002) a été introduit chez différentes souches. La transformation des souches a été faite par électroporation ou par conjugaison en milieu solide. Malgré de nombreux essais, toutes les transformations n'ont pas fonctionné. Lors de la sélection, seulement une dizaine de souches ont présenté une croissance. Différents clones ont pu être sélectionnés pour la suite de l'expérience, soit un clone de 19SJO, un clone de DCB50, un clone de E167, deux clones de E90, un clone de DCB3, un clone de DCB85, un clone de DCB117, un clone de PAO1 et un clone de PA14 *lasR*::Gm. Grâce aux souches transformées au préalable au sein du laboratoire, deux clones de PA14 et un clone PA14 *lasR*::Gm, *rhlR*::Tc (tétracycline) ont pu être ajoutés lors de cette expérience comme témoins.

Dans le but de vérifier l'insertion du plasmide pour les clones sélectionnés, l'ADN plasmidique a été extrait. À partir de cet extrait, une amplification PCR a été effectuée sur le gène de résistance à l'antibiotique. L'amplicon obtenu, d'une taille de 377pb est révélé à l'aide du gel d'agarose 1% montré à la Figure 18., après une migration de 40 min à 100 Volts. La bande d'intérêt, représentative de l'introduction du gène de résistance à l'antibiotique est ici la bande la plus haute (à hauteur de la bande 400 pb du Gene Ruler). Il est possible que les deux autres bandes de faible taille présentes chez tous les transformants correspondent à de l'ARN résiduel ou aux amorces utilisées pour l'amplification.

De cette vérification, il est observée une bande représentative de la taille de l'amplicon, pour les transformants E90 (1) et (2), DCB50, E167, PAO1, PA14 *lasR*::Gm, PA14 (1) et (2), PA14 *lasR*::Gm, *rhlR*::Tc et également pour le transformant 19SJO même si l'intensité de la bande est faible. Puisqu'il s'agit d'un indicateur de la présence du gène de résistance à l'antibiotique et donc de l'introduction complète du plasmide, ces transformants peuvent être conservés pour la suite de

l'analyse. En revanche, pour les transformants DCB3, DCB85 et DCB117, l'amplification est plutôt faible et la présence du plasmide devrait être confirmée à nouveau.

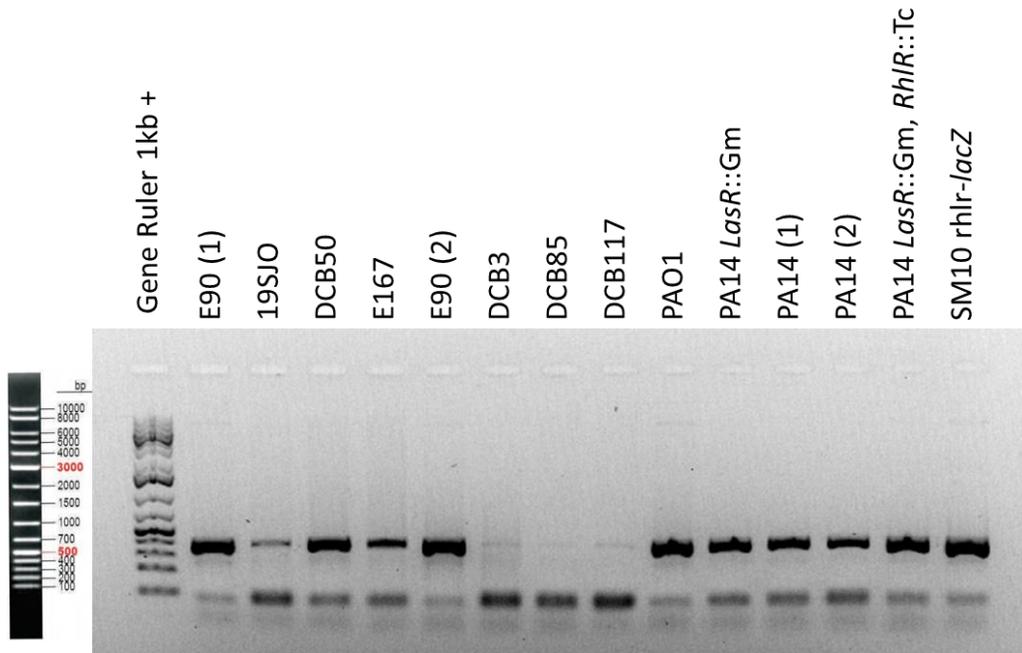


Figure 18 : Photographie de la migration de l'extract PCR sur gel d'agarose 1%.

Migration sur gel d'agarose 1% de l'amplicon obtenu suite à l'extraction d'ADN plasmidique et à la PCR effectuée sur cette dernière. Comme référence, nous utilisons ici SM10 *rhIR-lacZ*.

3.3.4.2. Cinétique d'expression du gène rapporteur *rhIR-lacZ*

L'activité du rapporteur *rhIR-lacZ* a été mesurée à différents temps (Figure 19). Le rapporteur montre une forte activité dès une DO_{600} d'environ 1,5 pour les deux clones PA14 ainsi que pour le clone PAO1. Pour le clone PA14 *lasR::Gm*, l'activité est légèrement plus faible et elle est plus tardive, puisqu'elle augmente entre DO_{600} 2 et 3. Le rapporteur montre une activité nulle pour les isolats DCB50 et E167 mais une activité faible pour les deux isolats E90 et le témoins PA14 *lasR::Gm*, *rhIR::Tc*.

L'activité du rapporteur, mesurée pour l'isolat 19SJO, classée comme une souche de type WT, est restée nulle lors des multiples cinétiques effectuées. Pourtant, nous l'avons vu dans les expériences précédentes, cet isolat produit de la pyocyanine, des rhamnolipides et montre une activité pour le rapporteur *rhlA-gfp*. Puisque la bande observée sur le gel de vérification montre une intensité plus faible que les autres et qu'aucune activité n'a été mesurée pour le rapporteur,

il est possible de suggérer une insertion erronée ne permettant pas la production de l'enzyme, un gène de la β -galactosidase muté, ou encore que le promoteur de 19SJO soit trop différent du promoteur de la souche de référence PA14, ne contenant pas les sites de reconnaissance habituellement utilisés.

De cette expérience, nous pouvons retenir une activité du gène rapporteur plus tôt et plus intense pour les souches du type WT, pour une activité plus tardive et moins intense chez les souches LasR-défectueux.

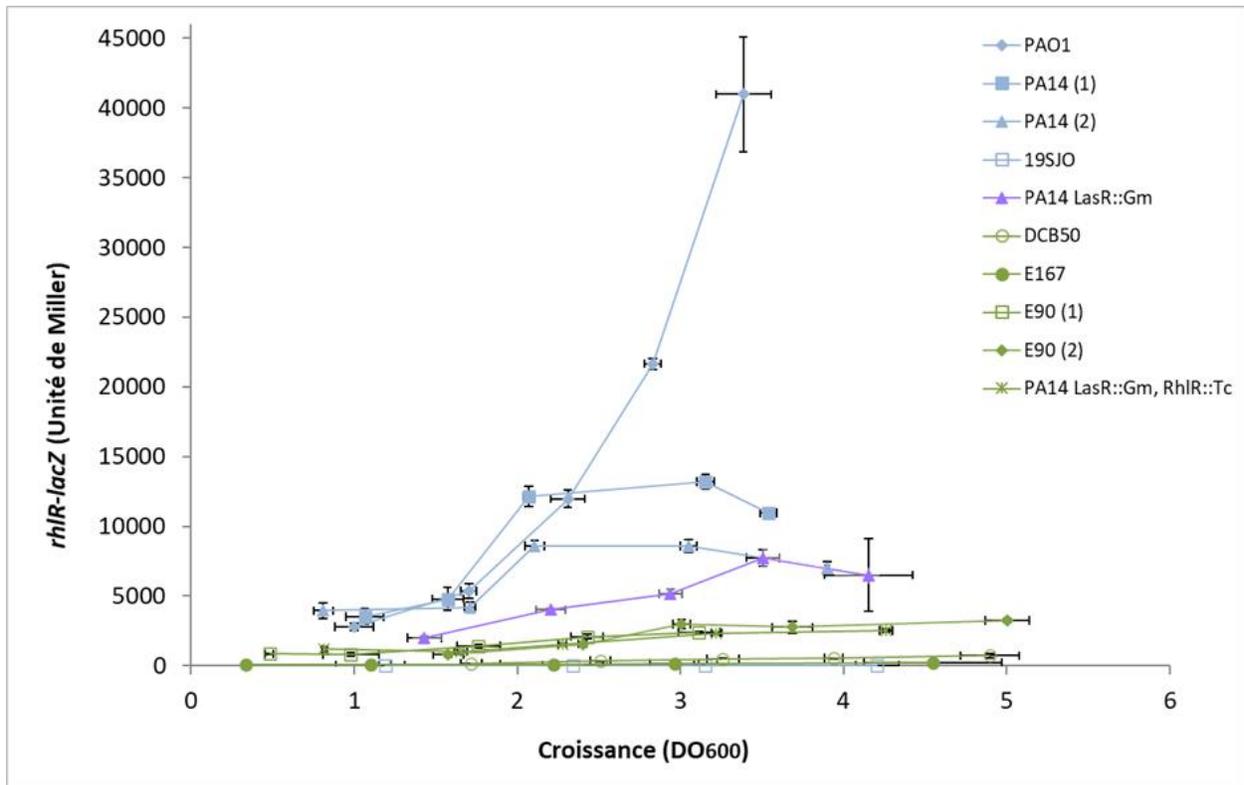


Figure 19 : Cinétique d'activité du gène *rhIR*.

Mesure de l'activité du gène rapporteur *rhIR-lacZ* des souches transformées par conjugaison ou électroporation. Les transformants ont été cultivés en milieu TSB contenant 50 μ g/mL de carbénicilline sous agitation à 37 °C. Les prélèvements ont été effectués après 3 h, 4 h, 5 h, 6 h et 7 h d'incubation à partir d'une culture à DO_{600} de 0,05. Les cinétiques des souches appartenant au groupe WT sont en bleu, celle appartenant au groupe LasR-défectueux est en violet et celles du groupe LasR-défectueux, RhIR-actif sont ici en vert.

3.4 Résumé des différents profils de production selon le type de QS

L'ensemble des résultats des différents tests ont été résumé dans le Tableau 18, permettant l'obtention d'une vision globale des niveaux de production des différentes molécules liées au QS pour chacun des types prédéfinis. Pour les quantités produites mesurées de manière quantitative, ici la transformation en valeurs qualitatives a été effectuée selon la mise en commun des observations obtenues pour les souches d'un même groupe, en particulier les profils des souches de références.

Tableau 18 : Profils de production des molécules du QS selon le groupe de QS.

	Type WT	Type LasR-défectueux	Type LasR-défectueux, RhlR-actif
Protéases extracellulaires	++	∅	+/-
3-oxo-C12-HSL à 3h	++	∅	+/-
3-oxo-C12-HSL à 6h	+	∅	+/-
C4-HSL à 3h	+	∅	+/-
C4-HSL à 6h	++	+	++
HHQ-C7 à 6h	+	+/-	++
HHQ-C7 à 24h	-	+/-	+
HQNO-C7 à 6h	+	+/-	+
HQNO-C7 à 24h	+	++	++
PQS-C7 à 6h	+	-	-
PQS-C7 à 24h	++	-	++
Rhamnolipides à 6h	+	∅/-	+
Activité du gène <i>rhlA</i> à 30h	++	-	+
Pyocyanine à 18h en TSB	+	-	-
Pyocyanine à 18h en King's A	-	++	++
Pyocyanine à 6h en King's A	++	+	+
Pyocyanine à 24h en King's A	+	+	++

Récapitulatif de production des différentes molécules selon les différents groupes. En fonction de la molécule, le + indique qu'il y a une production moyenne, le ++ indique une production forte, le - indique une production faible et le ∅ représente une absence de production.

Si la totalité des tests est faite sur de nouveaux isolats, la méthode de caractérisation sera robuste mais cependant très longue. Il est pourtant possible de limiter le nombre de test permettant une caractérisation fiable des isolats puisque certains des tests permettent une meilleure différenciation que d'autres. En effet, considérant seulement les productions de 3-oxo-C₁₂-HSL (3 h et 6 h) (Figure 8), de PQS-C₇ (6 h et 24 h) (Figure 11) et de pyocyanine en King's A (6 h et 24 h) (Figure 17), il est possible d'obtenir une classification fiable. De plus, si la quantité de

rhamnolipides produit à 6 h est également prise en compte, alors l'identification d'isolats LasR-défectueux, RhIR-actif est d'autant plus facile.

En utilisant uniquement les critères pré-cités, nous avons pu remarquer que les souches 18G et DCB108, classés initialement comme étant des souches du type LasR-défectueux, présentent finalement un profil du type LasR-défectueux, RhIR-actif puisqu'elles produisent des rhamnolipides, et qu'une augmentation de la production de PQS-C₇ (entre 6 h et 24 h) est observée alors que ce sont des souches qui ne produisent pas de 3-oxo-C₁₂-HSL. (On notera aussi qu'elles produisent un peu de C₄-HSL à 6 h).

L'isolats DCB74, classé lors du test en croissance sur caséine comme type LasR-défectueux, RhIR-actif montre finalement des productions de AHL, de HAQ et de pyocyanine similaires à une souche WT, mais en quantité plus faible et plus tardivement (d'où sûrement l'absence de rhamnolipide encore après 30h).

Les isolats PA-CL507 et PA-CL504, que nous avons classé dans le type LasR-défectueux montrent finalement un profil de production des AHL, des rhamnolipides et de pyocyanine similaire au type WT. Cependant, ces isolats ne produisent aucun HAQ, il était donc difficile de les classer.

3.5 Analyse génomique

Pour quelques-unes des souches sélectionnées dans le panel de 30 souches, le génome a été précédemment séquencé par Illumina MiSeq. A l'aide d'outils numériques comme Blast ou Expasy, les séquences protéiques associées à cinq gènes d'intérêts ont été analysées et comparées aux séquences protéiques de référence (*P. aeruginosa* souche UCBPP-PA14). Pour ces souches, nous avons donc analysé les séquences protéiques de LasR, de LasI, de MvfR, de RhIR et de RhII. Les différences observées sont décrites en Annexe 4.

L'isolat 19SJO (pré-classé de type WT), montre une substitution d'acide aminé pour sa séquence LasR en position 91 et deux substitutions dans sa séquence RhII, cependant le pourcentage d'identité avec la référence reste de 99%. Puisque cet isolat n'a montré aucune différence de production en comparaison avec PA14 lors de nos analyses, on peut supposer que ces mutations n'affectent pas la fonction de LasR.

L'isolat PA-CL513 (pré-classé de type WT) ne montre aucune mutation dans ses séquences d'acides aminés pour LasR, RhII et RhII, mais une substitution est trouvée en position 314 sur la séquence de MvfR. Même si pour cet isolat, on remarque une activité du rapporteur *rhlA-gfp*

importante, sa production de rhamnolipides reste équivalente au taux de PA14. Puisqu'il en est de même pour toutes les autres molécules étudiées dans cette étude, on peut supposer que cette variation n'a pas impactée son QS.

Pour l'isolat PA-CL532 (pré-classé de type WT), aucune variation n'est recensée pour LasR, MvfR, RhIR, mais deux substitutions sont trouvées en positions 83 et 127 sur la séquence de RhII. Ces substitutions n'impactent pas le pourcentage d'identité qui reste de 99%. De plus, tous les niveaux de production de cet isolat sont équivalents à PA14, elles ne semblent donc pas avoir modifier la fonction des protéines.

La souche 18G (pré-classé de type LasR-défectueux), montre effectivement une substitution d'acide aminé sur la séquence de LasR en position 218. Deux substitutions sont également retrouvées dans la séquence de RhII. L'isolat 18G représente un profil LasR- typique car il ne produit pas de 3-oxo-C₁₂-HSL, ne produit que tardivement du C₄-HSL et il accumule le HHQ-C₇ à 6 h et à 24 h. Cependant, on observe une grande quantité de HQNO-C₇ et de PQS-C₇ produit à 24 h.

Les séquences protéiques de LasR et RhII de l'isolat 32SB (pré-classé de type LasR-défectueux), montrent les mêmes substitutions que les séquences de l'isolat 18G, avec une délétion supplémentaire de quatre acides aminés (37-40) dans la séquence protéique de MvfR. Le pourcentage d'identité reste cependant de 99%. Comme pour 18G, il ne produit pas de 3-oxo-C₁₂-HSL et produit une faible quantité de C₄-HSL à 6 h, néanmoins, 32SB ne produit aucun HAQ (HHQ-C₇, HQNO-C₇ et PQS-C₇) à 6 h ou à 24 h, signe probable que cette variation dans MvfR impacte la production des HAQ. Le gène rapporteur *rhIA-gfp* n'a pas montré d'activité pour cet isolat, mais une production de rhamnolipides et de pyocyanine en King's A similaires aux autres isolats du type lasR-défectueux a été mesurée. Tenant compte de ces informations, on peut penser que le plasmide n'était pas présent pour cet isolat dans notre expérience.

Les isolats PA-CL504 et PA-CL507 (pré-classés de type LasR-défectueux) sont les deux seuls avec PA-CL532 pour lesquels il a été recensé uniquement les mutations en position 83 et 127 dans la séquence protéique de RhII. Pourtant, à l'inverse de PA-CL532, pour ces isolats, le QS montre des différences en comparaison avec une souche type WT. En effet, même si elles produisent du 3-oxo-C₁₂-HSL et du C₄-HSL à 3 h et à 6 h, ainsi que des rhamnolipides à 30 h comme une souche WT, elles ne produisent aucun HAQ à 6 h et à 24 h, pourtant aucune variation dans la séquence protéique de MvfR n'a été trouvée.

Enfin, pour les isolats pré-classés de type LasR-défectueux, RhIR-actif, les mutations observées pour les séquences protéiques de l'isolat 78RV sont une substitution en position 196 pour LasR et deux substitutions pour RhII. Pour cet isolat, le 3-oxo-C₁₂-HSL est produit faiblement à 3 h et à 6 h, et même si la production de C₄-HSL à 6 h n'est pas équivalente à une souche WT, elle est tout de même non négligeable. Il a été également mesuré une production de HAQ, de pyocyanine et de rhamnolipides.

L'isolat PA-CL512 (pré-classé de type LasR-défectueux, RhIR-actif) montre une substitution en position 223 dans la séquence protéique de LasR ainsi que deux substitutions dans la séquence protéique de MvfR. Cet isolat montre à 6 h une faible production de 3-oxo-C₁₂-HSL et de C₄-HSL, et comme pour 78RV, il peut produire des HAQ, de la pyocyanine et des rhamnolipides.

Les isolats PA-CL521a et PA-CL521b (pré-classés de type LasR-défectueux, RhIR-actif), isolés au même endroit montrent les mêmes substitutions dans la séquence protéique de MvfR mais aussi un grand nombre de variations sur la séquence protéique de LasR entre les acides aminés 33 et 112, avec principalement des substitutions et huit délétions et une insertion. Ces différentes variations modifient largement la séquence car le pourcentage d'identité est ici seulement de 70%. De plus elles se situent dans le domaine de liaison à l'autoinducteur, ce qui vu l'importance de la variation, peut modifier l'affinité de la protéine avec son ligand. Ces deux isolats expriment plus le gène *rhlA* que les autres du même groupe, mais ils produisent des rhamnolipides comme ces derniers. Ils produisent également beaucoup de pyocyanine en King's A à 6 h et à 24 h. Même si leur production de HAQ est similaire aux productions des isolats du même type, PA-CL521a produit une faible quantité de 3-oxo-C₁₂-HSL à 6 h, alors que PA-CL521b n'est produit aucun. Au contraire, alors que PA-CL521a ne produit qu'une faible quantité de C₄-HSL, PA-CL521b montre une importante production de celui-ci à 6 h.

On notera que les deux substitutions dans la séquence protéique de RhII, retrouvées chez 18G, 19SJO, 32SB, 78RV, PA-CL504, PA-CL507, PA-CL512, PA-CL532, PA-CL521a et PA-CL521b sont de même nature, soit une substitution d'un acide aspartique (D, Asp) par un acide glutamique (E, Glu) en position 83 et une substitution d'une glycine (G, Gly) par une alanine (A, Ala) en position 127. Même si elles ne semblent pas avoir modifiés le QS de PA-CL532, elles contribuent peut-être à la modification du QS de PA-CL504 et PA-CL507, si ces derniers ont d'autres mutations dans leur génome, que l'on n'aurait pas vu dans cette étude.

Finalement, aucune variation dans la séquence d'acide aminé de RhIR n'a été retrouvée, même pour nos isolats du type LasR-défectueux, RhIR-actif.

4 DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Chez *P. aeruginosa*, le système Las est souvent qualifié d'initiateur des réactions en chaînes du QS. Lors de cette étude, son fonctionnement et son implication ont été bien étudié chez plusieurs isolats provenant de différents environnements.

On estime souvent qu'un isolat défectueux pour le système Las ne peut pas avoir un QS fonctionnel car la production du 3-oxo-C₁₂-HSL est obtenue via LasI et que c'est le complexe qu'il forme avec LasR qui agit comme activateur du système Rhl et de *mvfR*.

Ce genre d'isolat a été associé à une virulence diminuée en infection aigue (Kuang *et al.*, 2011). Pour certaines des souches ayant été étudiées au cours de ce projet, prenons l'exemple de DCB3, aucun AHL n'est produit et les productions de rhamnolipides et de pyocyanine sont fortement diminuées, signes que RhlR n'est pas activé. De plus, on remarque une accumulation de HHQ, signe que ce dernier est produit, mais n'est pas transformé en PQS. Cette observation est cohérente si l'on considère la régulation positive de LasR sur PqsH. DCB3 présente donc les traits caractéristiques d'un LasR-défectueux. Pour cet exemple, l'hypothèse du *silencing*, c'est-à-dire se cacher du système immunitaire de l'hôte en réduisant sa virulence pourrait être valide si l'isolat en question avait été isolé dans un environnement clinique ou chez un individu atteint de FK, or DCB3 est une souche isolée sur du poisson frais dans un marché. Même si la bactérie pourrait ici chercher à se cacher du système immunitaire du poisson, la pression d'évolution clinique décrite dans cette hypothèse prévalente dans la littérature n'est pas présente ici. La perte d'une partie de la cascade de QS chez de tels isolats suggère qu'un mode de vie associé à une infection chronique n'est pas le seul favorisant un tel QS alternatif.

Selon certaines études (Barth & Pitt, 1996; D'Argenio *et al.*, 2007), les souches défectueuses pour le système Las apparaissent principalement en environnement clinique car elles auraient un avantage nutritionnel de croissance dans un milieu similaire à un environnement pulmonaire d'individu atteint de FK (sources de carbone particulière comme la phénylalanine et un taux élevé de nitrate). Effectivement, même si les phénotypes associés à un LasR-défectueux sont souvent décrits parmi les souches cliniques, ici nous avons étudié un groupe de souches provenant de divers environnements, non-FK. Le premier test effectué afin de mesurer la capacité à produire des protéases (issues d'une activité du système Las) des différents isolats montre que 57,2% des isolats cliniques montrent effectivement un déficit dans le taux production de protéases mais aussi que 48,6% des isolats environnementaux sont concernés par ce déficit.

C'est lors de ce premier test que différents phénotypes de production de protéases ont été observés pour certaines souches LasR-défectueux. En 2019, Chen *et al.* avaient déjà observé chez l'isolat LasR-défectueux E80 une croissance sur le milieu caséine nécessitant la production de protéases extracellulaires, signe d'une activité protéolytique conservée. Après avoir effectué ce test sur les isolats de notre étude, nous avons trouvé une proportion non négligeable d'environ 24% des isolats présentant ce profil parmi les isolats lasR-défectueux, soit 12% des isolats au total (échantillons cliniques et environnementaux confondus). Ce profil a été nommé lasR-défectueux, RhIR-actif, puisque l'hypothèse ici est notamment une réactivation du QS via l'activation indépendante du système Rhl (Chen *et al.*, 2019; Feltner *et al.*, 2016).

Puisque LasR est responsable de l'activation de l'opéron *pqs*, nous devrions observer un défaut de production de PqsE dans les souches LasR-défectueux. Pourtant, cette protéine serait essentielle pour l'activation complète du système Rhl (Groleau *et al.*, 2020). Effectivement, plusieurs souches de la collection testée ne produisent pas de HAQ, pourtant, certaines conservent la capacité à produire de la pyocyanine, et des rhamnolipides ou des protéases extracellulaires supportant l'hypothèse que PqsE serait transcrit même si ces souches ne produisent pas de HAQ. Comme décrit dans une étude précédente (Cruz *et al.*, 2020), l'activation du système Rhl pourrait se faire de manière indépendante du système Las et/ou le circuit hiérarchique pourrait s'en retrouver modifié. Nous avons vu que certains isolats ne produisent aucun 3-oxo-C₁₂-HSL mais produisent néanmoins du C₄-HSL et conserve une production de facteurs de virulence via la production de cibles du système Rhl (pyocyanine, rhamnolipides).

La méthode rapide de différenciation des trois types de QS suggérés repose sur la mesure de quatre facteurs : le 3-oxo-C₁₂-HSL, le PQS-C₇, la pyocyanine et les rhamnolipides. Si la production de PQS-C₇ est plus importante à 24 h qu'à 6 h d'incubation, et que la souche produit du 3-oxo-C₁₂-HSL, alors elle sera décrite comme une souche WT. En revanche, pour un même profil de production de PQS-C₇, si la souche ne produit aucun ou que peu de 3-oxo-C₁₂-HSL, alors elle sera décrite comme LasR-défectueux, RhIR-actif. Si la souche ne produit que peu de PQS-C₇ et de 3-oxo-C₁₂-HSL, alors elle sera dite LasR-défectueux. Même si ces deux facteurs seuls pourraient suffire à la différenciation des trois phénotypes, la production de pyocyanine reste un bon indicateur également. Si la quantité mesurée est plus importante à 6 h qu'à 24 h, alors il s'agira probablement d'une souche WT et à l'inverse si elle est plus importante à 24 h qu'à 6 h, alors la souche serait LasR-défectueux, RhIR-actif. Pour une souche LasR-défectueux, la quantité de pyocyanine produite tout au long de sa croissance restera globalement stable.

Enfin, si la souche produit des rhamnolipides après 6 h alors qu'elle ne produit pas de 3-oxo-C₁₂-HSL, alors elle sera également considérée LasR-défectueux, RhIR-actif.

L'étude du niveau de transcription du gène *rhIR* n'a ici pas été concluante. Malgré plusieurs tentatives pour transformer les souches, de différentes manières, nous n'avons pas la certitude que ces dernières ait acquis le plasmide correctement. Puisque nous avons déjà beaucoup d'informations sur l'activité générale du système Rhl, cette expérience serait pertinente pour peut-être observer un lien avec le niveau de transcription du gène.

Puisque le génome de certaines souches avait été séquencé, nous avons pu regarder si les variations dans certaines séquences protéiques associées à des gènes d'intérêt engendraient nécessairement une modification phénotypique des souches.

L'information importante à retenir lors de cette comparaison est que pour chaque souche de type WT, LasR-défectueux ou LasR-défectueux, RhIR-actif, des isolats avec des variations dans la séquence protéique de LasR ont été trouvées. Si parfois la variation n'a engendré aucun changement dans le phénotype de l'isolat (19JSO par exemple), c'est chez les isolats qui présentent des mutations dans la séquence de plusieurs protéines qu'il est observé des modifications de comportements phénotypiques. Ainsi, si la séquence nucléique du gène ou la séquence d'acide aminé de la protéine LasR comprend une variation par rapport à PA14, alors celui-ci n'est pas forcément non fonctionnel.

C'est en utilisant cette méthode de classification mise au point ici, que nous avons pu caractériser un nombre plus important d'isolat. Parmi ces derniers certains étaient également séquencés et grâce au Professeur Antoni T. Vincent, une méthode d'identification programmée des mutations dans les séquences protéiques des gènes d'intérêts a été mise en place. C'est également avec l'aide du Professeur Philippe Constant que nous avons pu effectuer les tests statistiques sur les résultats obtenus. De ces collaborations résulte un article écrit par Marie-Christine Groleau et moi-même : « *Pseudomonas aeruginosa* isolates defective in function of LasR quorum sensing regulator are frequent in diverse environmental niches. 2021 », sous la direction du Professeur Eric Déziel, présenté en Annexe 5.

Si nous avons montré la prévalence de souches LasR-défectueux parmi les souches environnementales, nous n'avons pas pu ici étudier l'hypothèse du *social cheating*. Selon cette hypothèse, une partie d'une population bactérienne perdu la capacité à produire certaines protéases ou sidérophores, mais à utiliser ceux produits par l'autre portions de la population.

Ainsi, les bactéries d'une même population partagent des biens publics, tout en réduisant ses dépenses énergétiques. Puisque nous savons à présent différencier les types de QS de manière rapide et efficace, il serait intéressant d'établir des co-cultures comprenant deux types de QS, et de mesurer les proportions obtenues. Si la co-culture comprend un pourcentage égal de WT et de LasR-défectueux, alors l'un des deux phénotypes va-t-il devenir majoritaire ? Va-t-on observer l'émergence de souches LasR-défectueux, RhIR-actif dans cette co-culture ? Ou encore, puisqu'une souche LasR-défectueux, RhIR-actif est tout de même capable de produire certain facteur de virulence, est-ce qu'une co-culture de LasR-défectueux et LasR-défectueux, RhIR-actif se maintiendrait sur le long terme ou la souche ayant un RhIR actif indépendamment de LasR serait avantagée ? Certaines souches auraient-elles la capacité de rétablir un QS fonctionnel comme un WT ?

En conclusion, le QS de *P. aeruginosa* est plus complexe que suggéré par les études présentées dans la littérature se concentrant pour la majorité sur un petit nombre de souches prototypes. Les implications pourraient être importantes si nous souhaitons un jour viser le QS dans une stratégie de contrôle de la virulence comme approche thérapeutique.

5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2014a) Liquid chromatography/mass spectrometry for the identification and quantification of rhamnolipids. *Methods Mol. Biol.* 1149:359-373.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2014b) A stereospecific pathway diverts β -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chem Biol* 21(1):156-164.
- Alkawash MA, Soothill JS & Schiller NL (2006) Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS* 114(2):131-138.
- Barth AL & Pitt TL (1996) The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 45(2):110-119.
- Bassler BL & Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* 125(2):237-246.
- Bassler BL, Wright M, Showalter RE & Silverman MR (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9(4):773-786.
- Bédard E, Prévost M & Déziel E (2016) *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *MicrobiologyOpen* 5(6):937-956.
- Benie CKD, Dadié A, Guessennd N, N'gbesso-Kouadio NA, Kouame NzD, N'golo DC, Aka S, Dako E, Dje KM & Dosso M (2017) Characterization of virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish. *European Journal of Microbiology and Immunology EuJMI* 7(1):55-64.
- Blumer C & Haas D (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173(3):170-177.
- Boyle KE, Monaco H, van Ditmarsch D, Deforet M & Xavier JB (2015) Integration of Metabolic and Quorum Sensing Signals Governing the Decision to Cooperate in a Bacterial Social Trait. *PLOS Computational Biology* 11(6):e1004279.
- 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(1):248-254.
- Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Di Serio C, Döring G & Tümmler B (2009) *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med* 180(2):138-145.
- Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C & Hancock RE (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19(8):419-426.
- Brint JM & Ohman DE (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* 177(24):7155-7163.
- Britigan BE, Rasmussen GT & Cox CD (1997) Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infection and immunity* 65(3):1071-1076.
- Brouwer S, Pustelny C, Ritter C, Klinkert B, Narberhaus F & Häussler S (2014) The PqsR and RhlR Transcriptional Regulators Determine the Level of *Pseudomonas* Quinolone Signal

- Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by Producing Two Different *pqsABCDE* mRNA Isoforms. *J. Bacteriol.* 196(23):4163-4171.
- Cabeen MT (2014) Stationary Phase-Specific Virulence Factor Overproduction by a *lasR* Mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 9(2):e88743.
- Cabrol S, Olliver A, Pier GB, Andremont A & Ruimy R (2003) Transcription of Quorum-Sensing System Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185(24):7222-7230.
- Chen R, Déziel E, Groleau M-C, Schaefer AL & Greenberg EP (2019) Social cheating in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(14):7021-7026.
- Chicurel M (2000) Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature* 408(6810):284-286.
- Chmiel JF & Davis PB (2003) State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir. Res.* 4(1):8.
- Cigana C, Castandet J, Sprynski N, Melessike M, Beyria L, Ranucci S, Alcalá-Franco B, Rossi A, Bragonzi A, Zalacain M & Everett M (2021) *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Contributes to the Establishment of Chronic Lung Colonization and Modulates the Immune Response in a Murine Model. *Front. Microbiol.* 11(3443).
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Cramer N, Wiehlmann L & Tümmler B (2010) Clonal epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(8):526-533.
- Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, Martínez-García E, Rojas-Acosta C, Catalina Gomez-Puerto M, Calum H, Whiteley M, Kolter R & Bjarnsholt T (2020) The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 128(3):220-231.
- Cruz RL, Asfahl KL, Bossche SVd, Coenye T, Crabbé A, Dandekar AA & Winans SC (2020) RhIR-Regulated Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in a Cystic Fibrosis Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 11(2):e00532-00520.
- D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Déziel E, Smith EE, Nguyen H, Ernst RK, Larson Freeman TJ, Spencer DH, Brittnacher M, Hayden HS, Selgrade S, Klausen M, Goodlett DR, Burns JL, Ramsey BW & Miller SI (2007) Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* 64(2):512-533.
- Dandekar AA, Chugani S & Greenberg EP (2012) Bacterial Quorum Sensing and Metabolic Incentives to Cooperate. *Science* 338(6104):264-266.
- Darch SE, West SA, Winzer K & Diggle SP (2012) Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(21):8259-8263.
- Davey ME, Caiazza NC & O'Toole GA (2003) Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 185(3):1027-1036.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 280(5361):295-298.

- de Bentzmann S & Plésiat P (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ. Microbiol.* 13(7):1655-1665.
- de Kievit TR & Iglewski BH (2000) Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity* 68(9):4839-4849.
- Dekimpe V & Deziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155(Pt 3):712-723.
- Desvaux M HM, Talon R, Henderson IR (2009) Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. . *Trends Microbiol.* Apr;17(4):139-45. .
- Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G & Rahme LG (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl- L-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.* 55(4):998-1014.
- Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG & Rahme LG (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(5):1339-1344.
- Déziel E, Lépine F, Milot S & Villemur R (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149(8):2005-2013.
- Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F & Bisailon J (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6):1908-1912.
- Diggle SP, Griffin AS, Campbell GS & West SA (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450(7168):411-414.
- Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M & Williams P (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* 50(1):29-43.
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 8(9):881-890.
- Drees SL, Ernst S, Belviso BD, Jagmann N, Hennecke U & Fetzner S (2018) PqsL uses reduced flavin to produce 2-hydroxylaminobenzoylacetate, a preferred PqsBC substrate in alkyl quinolone biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 293(24):9345-9357.
- Drees Steffen L & Fetzner S (2015) PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules. *Chem. Biol.* 22(5):611-618.
- Dulcey CE, Dekimpe V, Fauvelle DA, Milot S, Groleau MC, Doucet N, Rahme LG, Lépine F & Déziel E (2013) The end of an old hypothesis: the *Pseudomonas* signaling molecules 4-hydroxy-2-alkylquinolines derive from fatty acids, not 3-ketofatty acids. *Chem Biol* 20(12):1481-1491.

- Dulcey CE, López de los Santos Y, Létourneau M, Déziel E & Doucet N (2019) Semi-rational evolution of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoate (HAA) synthase RhlA to improve rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae*. *The FEBS Journal* 286(20):4036-4059.
- Dunnen JTd & Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Hum. Mutat.* 15(1):7-12.
- Durand E, Verger D, Rego AT, Chandran V, Meng G, Fronzes R & Waksman G (2009) Structural Biology of Bacterial Secretion Systems in Gram-Negative Pathogens- Potential for New Drug Targets. *Infectious Disorders - Drug Targets* 9(5):518-547.
- Engbrecht J, Nealson K & Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32(3):773-781.
- Engel LS, Hill JM, Moreau JM, Green LC, Hobden JA & O'Callaghan RJ (1998) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39(3):662-665.
- Farrow JM, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP & Pesci EC (2008) PqsE Functions Independently of PqsR-*Pseudomonas* Quinolone Signal and Enhances the *rhl* Quorum-Sensing System. *J. Bacteriol.* 190(21):7043-7051.
- Feltner JB, Wolter DJ, Pope CE, Groleau M-C, Smalley NE, Greenberg EP, Mayer-Hamblett N, Burns J, Déziel E, Hoffman LR & Dandekar AA (2016) LasR Variant Cystic Fibrosis Isolates Reveal an Adaptable Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 7(5):e01513-01516.
- Feng X, Kostylev M, Dandekar AA & Greenberg EP (2019) Dynamics of cheater invasion in a cooperating population of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 9(1):10190.
- Filloux A & Vallet I (2003) Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Medecine sciences : M/S* 19(1):77-83.
- Floret N, Bertrand X, Thouverez M & Talon D (2009) Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie* 57(1):9-12.
- 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.
- Fuqua C & Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(9):685-695.
- Gambello MJ & Iglewski BH (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* 173(9):3000-3009.
- García-Reyes S, Soberón-Chávez G & Cocotl-Yanez M (2020) The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J. Med. Microbiol.* 69(1):25-34.
- Girard G & Bloemberg GV (2008) Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.* 3(1):97-106.
- Govan JRW & Nelson JW (1992) Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br. Med. Bull.* 48(4):912-930.

- Groleau M-C, de Oliveira Pereira T, Dekimpe V & Déziel E (2020) PqsE Is Essential for RhlR-Dependent Quorum Sensing Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems* 5(3):e00194-00120.
- Groleau M-C, Taillefer H, Vincent AT, Constant P & Déziel E (2021) *Pseudomonas aeruginosa* isolates defective in function of the LasR quorum sensing regulator are frequent in diverse environmental niches. *bioRxiv* 10.1101/2021.03.25.437011:2021.2003.2025.437011.
- Guerra-Santos L, Käppeli O & Fiechter A (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology* 48(2):301-305.
- Hazan R, He J, Xiao G, Dekimpe V, Apidianakis Y, Lesic B, Astrakas C, Déziel E, Lépine F & Rahme LG (2010) Homeostatic Interplay between Bacterial Cell-Cell Signaling and Iron in Virulence. *PLOS Pathogens* 6(3):e1000810.
- Heurlier K, Dénervaud V, Haenni M, Guy L, Krishnapillai V & Haas D (2005) Quorum-sensing-negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J. Bacteriol.* 187(14):4875-4883.
- Higgins S, Heeb S, Rampioni G, Fletcher MP, Williams P & Cámara M (2018) Differential Regulation of the Phenazine Biosynthetic Operons by Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8:252-252.
- Hoffman LR, Déziel E, D'Argenio DA, Lépine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW & Miller SI (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(52):19890-19895.
- Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW & Miller SI (2009a) *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *Journal of Cystic Fibrosis* 8(1):66-70.
- Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW & Miller SI (2009b) *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 8(1):66-70.
- Jarvis FG & Johnson MJ (1949) A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71(12):4124-4126.
- Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagensen JA, Høiby N & Molin S (2007) Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 75(5):2214-2224.
- Juhas M, Eberl L & Tümmler B (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 7(4):459-471.
- Keehoon L, Sang Sun Y & * (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(6):1053-1064.
- Keller L & Surette MG (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(4):249-258.
- Kharazmi A, Bibi Z, Nielsen H, Høiby N & Döring G (1989) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil and monocyte function. *APMIS* 97(7-12):1068-1072.
- King EO, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44(2):301-307.

- Klaus JR, Majerczyk C, Moon S, Eppler NA, Smith S, Tuma E, Groleau M-C, Asfahl KL, Smalley NE, Hayden HS, Piochon M, Ball P, Dandekar AA, Gauthier C, Déziel E, Chandler JR & Cann I (2020) *Burkholderia thailandensis* Methylated Hydroxyalkylquinolines: Biosynthesis and Antimicrobial Activity in Cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* 86(24):e01452-01420.
- Koch A, Käppeli O, Fiechter A & Reiser J (1991) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173(13):4212-4219.
- Köhler T, Buckling A & van Delden C (2009) Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(15):6339-6344.
- Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C & Pechère J-C (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *J. Bacteriol.* 182(21):5990-5996.
- Kostylev M, Kim DY, Smalley NE, Salukhe I, Greenberg EP & Dandekar AA (2019) Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116(14):7027-7032.
- Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE & Lau GW (2011) *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One* 6(11):e27091.
- Kumar RS, Ayyadurai N, Pandiaraja P, Reddy AV, Venkateswarlu Y, Prakash O & Sakthivel N (2005) Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J. Appl. Microbiol.* 98(1):145-154.
- Lalancette C, Charron D, Laferrière C, Dolcé P, Déziel E, Prévost M & Bédard E (2017) Hospital Drains as Reservoirs of *Pseudomonas aeruginosa*: Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis Genotypes Recovered from Faucets, Sink Surfaces and Patients. *Pathogens* 6(3):36.
- Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, Lazdunski A & Williams P (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* 17(2):333-343.
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H & Kong F (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* 10(12):599-606.
- Lechtzin N, John M, Irizarry R, Merlo C, Diette GB & Boyle MP (2006) Outcomes of adults with cystic fibrosis infected with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiration* 73(1):27-33.
- Lee J & Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6(1):26-41.
- Lépine F & Déziel E (2011) Liquid chromatography/mass spectrometry for the detection and quantification of N-acyl-L-homoserine lactones and 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Quorum sensing*, Springer. p 61-69.
- Lépine F, Milot S, Déziel E, He J & Rahme LG (2004) Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15(6):862-869.

- Liang H, Duan J, Sibley CD, Surette MG & Duan K (2011) Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 60(Pt 1):22-34.
- Lyczak JB, Cannon CL & Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2(9):1051-1060.
- Malloy JL, Veldhuizen RAW, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ & Wright JR (2005) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 288(2):L409-L418.
- Martínez-Carranza E, García-Reyes S, González-Valdez A & Soberón-Chávez G (2020) Tracking the genome of four *Pseudomonas aeruginosa* isolates that have a defective Las quorum-sensing system, but are still virulent. *Access Microbiol* 2(7):acmi000132-acmi000132.
- McClure CD & Schiller NL (1992) Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *Journal of leukocyte biology* 51(2):97-102.
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics.
- Miller RA, Rasmussen GT, Cox CD & Britigan BE (1996) Protease cleavage of iron-transferrin augments pyocyanin-mediated endothelial cell injury via promotion of hydroxyl radical formation. *Infection and immunity* 64(1):182-188.
- Miller WG, Leveau JH & Lindow SE (2000) Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(11):1243-1250.
- Mitchell G, Séguin DL, Asselin AE, Déziel E, Cantin AM, Frost EH, Michaud S & Malouin F (2010) *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-*N*-oxide. *BMC Microbiol.* 10:33.
- Moradali MF, Ghods S & Rehm BHA (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7(39).
- Morales E, González-Valdez A, Servín-González L & Soberón-Chávez G (2017) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing response in the absence of functional LasR and LasI proteins: the case of strain 148, a virulent dolphin isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 364(12).
- Mukherjee S, Moustafa DA, Stergioula V, Smith CD, Goldberg JB & Bassler BL (2018) The PqsE and RhlR proteins are an autoinducer synthase–receptor pair that control virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(40):E9411-E9418.
- Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH & Quax WJ (2012) The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(1):46-65.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* 104(1):313-322.
- Nishijyo T, Haas D & Itoh Y (2001) The CbrA–CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 40(4):917-931.
- Noordman WH & Janssen DB (2002) Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 68(9):4502-4508.

- O'Toole G, Kaplan HB & Kolter R (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54(1):49-79.
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A & Reiser J (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176(7):2044-2054.
- Ochsner UA & Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(14):6424-6428.
- Oh J, Li X-H, Kim S-K & Lee J-H (2017) Post-secretional activation of Protease IV by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 7(1):4416.
- Osmon S, Ward S, Fraser VJ & Kollef MH (2004) Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 125(2):607-616.
- Parmely M, Gale A, Clabaugh M, Horvat R & Zhou WW (1990) Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 58(9):3009-3014.
- Passador L, Cook J, Gambello M, Rust L & Iglewski B (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260(5111):1127-1130.
- Patriquin GM, Banin E, Gilmour C, Tuchman R, Greenberg EP & Poole K (2008) Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190(2):662-671.
- Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH & Greenberg EP (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(1):197-201.
- Pearson JP, Passador L, Iglewski BH & Greenberg EP (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(5):1490-1494.
- Pearson JP, Pesci EC & Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179(18):5756-5767.
- Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP & Iglewski BH (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(20):11229-11234.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC & Iglewski BH (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179(10):3127-3132.
- Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS & Soberón-Chávez G (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40(3):708-718.
- Rahme L, Stevens E, Wolfort S, Shao J, Tompkins R & Ausubel F (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219):1899-1902.
- Rampioni G, Pustelny C, Fletcher MP, Wright VJ, Bruce M, Rumbaugh KP, Heeb S, Cámara M & Williams P (2010) Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environ. Microbiol.* 12(6):1659-1673.

- Ran H, Hassett DJ & Lau GW (2003) Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(24):14315-14320.
- Reimann C, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A & Haas D (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* 24(2):309-319.
- Sandoz KM, Mitzimberg SM & Schuster M (2007) Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(40):15876-15881.
- Schertzer JW, Brown SA & Whiteley M (2010) Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Mol. Microbiol.* 77(6):1527-1538.
- Schuster M, Lostroh CP, Ogi T & Greenberg EP (2003) Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: a Transcriptome Analysis. *J. Bacteriol.* 185(7):2066-2079.
- Seed PC, Passador L & Iglewski BH (1995) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* 177(3):654-659.
- Sikora A & Zahra F (2021) Nosocomial infections. *StatPearls [Internet]*.
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R & Olson MV (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(22):8487-8492.
- Smith RS & Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(1):56-60.
- Stevens AM, Schuster M & Rumbaugh KP (2012) Working Together for the Common Good: Cell-Cell Communication in Bacteria. *J. Bacteriol.* 194(9):2131-2141.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrock-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GKS, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S & Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-964.
- Talon D, Mulin B, Rouget C, Bailly P, Thouverez M & Viel J-F (1998) Risks and routes for ventilator-associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of respiratory and critical care medicine* 157(3):978-984.
- Toder DS, Gambello MJ & Iglewski BH (1991) *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol. Microbiol.* 5(8):2003-2010.
- Vincent AT, Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault J-G, Leduc A, Boyle B, Jean-Pierre F, Groleau M-C, Déziel E, Barbeau J, Charette SJ & Levesque RC (2017) Genomic characterisation of environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dental unit waterlines revealed the insertion sequence ISPa11 as a chaotropic element. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93(9).

- Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP & Pesci EC (2005) Regulation of *Pseudomonas* Quinolone Signal Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187(13):4372-4380.
- Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI & Iglewski BH (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185(7):2080-2095.
- Wang M, Schaefer AL, Dandekar AA & Greenberg EP (2015) Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(7):2187-2191.
- Watson AA, Alm RA & Mattick JS (1996) Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 172(1):163-164.
- Wei Q & Ma LZ (2013) Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* 14(10).
- Whiteley M & Greenberg EP (2001) Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J. Bacteriol.* 183(19):5529-5534.
- Whiteley M, Lee KM & Greenberg EP (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(24):13904-13909.
- Winson MK, Camara M, Latifi A, Foglino M, Chhabra SR, Daykin M, Bally M, Chapon V, Salmond GP & Bycroft BW (1995) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(20):9427-9431.
- Wolz C, Hellstern E, Haug M, Galloway DR, Vasil ML & Döring G (1991) *Pseudomonas aeruginosa* LasB mutant constructed by insertional mutagenesis reveals elastolytic activity due to alkaline proteinase and the LasA fragment. *Mol. Microbiol.* 5(9):2125-2131.
- Xiao G, Déziel E, He J, Lépine F, Lesic B, Castonguay MH, Milot S, Tampakaki AP, Stachel SE & Rahme LG (2006a) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol. Microbiol.* 62(6):1689-1699.
- Xiao G, He J & Rahme LG (2006b) Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152(6):1679-1686.
- Zhou H, Wang M, Smalley NE, Kostylev M, Schaefer AL, Greenberg EP, Dandekar AA, Xu F & O'Toole G (2019) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Glutathione. *J. Bacteriol.* 201(9):e00685-00618.
- Zhu K & Rock CO (2008) RhIA Converts B-Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Intermediates in Fatty Acid Synthesis to the B-Hydroxydecanoyl-B-Hydroxydecanoate Component of Rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190(9):3147-3154.

6 ANNEXES

Annexe 1 : Liste des isolats dont le potentiel LasR a été caractérisé lors de la croissance sur un milieu 1% caséine. Les isolats inscrits en gras suivis d'un astérisque composent la sélection utilisée pour la suite des expériences. ORL : Otorhinolaryngique ; ATCC : American Type Culture Collection ; ND : non défini. Les caractérisations préliminaires ont été faites par Sara Habouria et par Donatien Comoe Benie.

Code Souche	Provenance	Type d'échantillon	Source	Caractérisation préliminaire	Profil sur milieu Caséine
18G*	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers	(Deziel <i>et al.</i> , 1996)	LasR-défectueux	LasR-défectueux
19SJO*	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	WT
19SJV	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	LasR-défectueux
19R	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	LasR-défectueux
19SV	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		WT	WT
32SP	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	LasR-défectueux
32SB*	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	LasR-défectueux
32R	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		ND	LasR-défectueux
34JS	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	WT
34JR	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		ND	LasR-défectueux
57SJ	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		WT	WT
57SP	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		WT	WT
57RV	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	LasR-défectueux
57RP	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		ND	LasR-défectueux
78RJ	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		ND	WT
78RV*	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		LasR-défectueux	LasR-défectueux
78S	Sablière Thouin, Qc	Sols contaminés aux résidus de produits pétroliers		ND	WT
HSJ2	Montréal, Qc	Evier d'hôpital Saint-Justine	(Déziel <i>et al.</i> , 2005)	ND	WT
PG201	USA	Sol (à proximité d'une raffinerie de pétrole)	(Guerra-Santos <i>et al.</i> , 1984)	LasR-défectueux	LasR-défectueux
PUPa3	USA	Rhizosphère du riz	(Kumar <i>et al.</i> , 2005)	ND	WT like
PA-CL501	Canada	Evier d'hôpital	(Lalancette <i>et al.</i> , 2017)	WT	LasR-défectueux
PA-CL502	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT

PA-CL504*	Canada	Evier d'hôpital	(Lalancette <i>et al.</i> , 2017)	WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL505	Canada	Evier d'hôpital		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL506b	Canada	Evier d'hôpital		WT	LasR-défectueux
PA-CL507*	Canada	Evier d'hôpital		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL508	Canada	Evier d'hôpital		WT	LasR-défectueux
PA-CL509	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux
PA-CL511	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux
PA-CL512*	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL513*	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL514	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL515	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL516	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL517	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL518	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL519	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL520	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL521a*	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL521b*	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL521c*	Canada	Evier d'hôpital		ND	LasR-défectueux
PA-CL522b	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux
PA-CL523b	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
PA-CL524	Canada	Evier d'hôpital		LasR-défectueux	LasR-défectueux
PA-CL527	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT

PA-CL528	Canada	Evier d'hôpital	(Lalancette <i>et al.</i> , 2017)	WT	WT
PA-CL529	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL532*	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL534a	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL534b	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL534x	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL535	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL542a	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL542b	Canada	Evier d'hôpital		WT	LasR-défectueux
PA-CL545a	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL547b	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
PA-CL549	Canada	Evier d'hôpital		WT	WT
DCB1 ; YOP VB5 C1	Yopougon	Viande bovine	(Benie <i>et al.</i> , 2017)	WT	LasR-défectueux
DCB2 ; ABO VB 29 C1	Abobo	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB3 ; ABO PFR11 C1*	Abobo	Poisson Frais		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB4 ; YOP VB24 C1	Yopougon	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB5 ; ABO VB 48 C1	Abobo	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB6 ; BG VB5 C2	Bingerville	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB7 ; ABO VB50 C1	Abobo	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB8 ; PB VB19 C1	Port Bouet	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB9 ; PB VB6 C1	Port Bouet	Viande bovine		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB10 ; BG VB5 C	Bingerville	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB11 ; PB VB13 C1	Port Bouet	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB12 ; ABO VB30 C1*	Abobo	Viande bovine		WT	WT
DCB13 ; YOP VB2 C3*	Yopougon	Viande bovine		WT	WT
DCB14 ; PB VB16 C3	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB15 ; ADJ VB5 C1	Adjame	Viande bovine		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif

DCB16 ; ADJ VB2 C1	Adjame	Viande bovine	(Benie <i>et al.</i> , 2017)	WT	LasR-défectueux
DCB17 ; PB VB15 C1	Port Bouet	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB18 ; YOP PFR12 C3	Yopougon	Poisson Frais		WT	LasR-défectueux
DCB19 ; BG VB11 C1	Bingerville	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB20 ; ADJ PF1 C1	Adjame	Poisson Fumé		WT	LasR-défectueux
DCB21 ; BG VB1 C2	Bingerville	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB22 ; ABO PFR5 C2*	Abobo	Poisson Frais		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB23 ; ABO VB7 C1	Abobo	Viande bovine		WT	WT
DCB24 ; BG VB1 C3	Bingerville	Viande bovine		WT	WT
DCB25 ; ABO VB52 C1	Abobo	Viande bovine		WT	WT
DCB26 ; ADJ VB7 C1	Adjame	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB27 ; ABO VB3 C1	Abobo	Viande bovine		WT	WT
DCB28 ; YOP VB2 C2	Yopougon	Viande bovine		LasR-défectueux	WT
DCB29 ; PB PFR5 C1	Port Bouet	Poisson Frais		WT	LasR-défectueux
DCB30 ; ABO PF3 C3	Abobo	Poisson Fumé		WT	WT
DCB31 ; ABO PF5 C1*	Abobo	Poisson Fumé		WT	WT
DCB32 ; BG PFR4	Bingerville	Poisson Fumé		WT	WT
DCB33 ; ABO PFR9	Abobo	Poisson Frais		LasR-défectueux	WT
DCB34 ; PB PFR11 C2	Port Bouet	Poisson Frais		WT	WT
DCB35 ; PB PFR1 C1	Port Bouet	Poisson Fumé		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB36 ; ABO VB5 C2*	Abobo	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB37 ; ABO VB3 C2	Abobo	Viande bovine		WT	WT
DCB38 ; ABO VB5 C3*	Abobo	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB39 ; PB PFR12 C1	Port Bouet	Poisson Frais		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB40 ; ABO PF5 C3	Abobo	Poisson Fumé		WT	LasR-défectueux
DCB41 ; ABO PFR1 C2	Abobo	Poisson Frais		WT	WT
DCB42 ; ABO VB44 C1	Abobo	Viande bovine	WT	WT	

DCB43 ; ADJ PF14 C2*	Adjame	Poisson Fumé	(Benie <i>et al.</i> , 2017)	WT	WT
DCB44 ; PB PFR5 C2	Port Bouet	Poisson Frais		WT	WT
DCB45 ; ABO PF10 C1	Abobo	Poisson Fumé		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB46 ; ABO PFR1 C1	Abobo	Poisson Frais		WT	WT
DCB47 ; YOP PFR15 C2	Yopougon	Poisson Frais		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB48 ; ABO PF12	Abobo	Poisson Fumé		WT	WT
DCB49 ; PB VB7 C3	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB50 ; ABO PF26*	Abobo	Poisson Fumé		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB51 ; BG PFR9	Bingerville	Poisson Frais		WT	WT
DCB52 ; ADJ PFR19	Adjame	Poisson Frais		WT	WT
DCB53 ; ADJ VB5 C3	Adjame	Viande bovine		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB54 ; ABO PF3 C2*	Abobo	Poisson Fumé		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB55 ; BG VB2 C2	Bingerville	Viande bovine		LasR-défectueux	WT
DCB56 ; ABO VB7 C2	Abobo	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB57 ; YOP VB15 C1	Yopougon	Viande bovine		LasR-défectueux	WT
DCB58 ; YOP VB5 C3	Yopougon	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB59 ; PB VB22 C1	Port Bouet	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB60 ; PB VB19 C2	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB61 ; PB VB6 C2	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB62 ; PB VB17 C1*	Port Bouet	Viande bovine		LasR-défectueux	WT
DCB63 ; ADJ PFR17	Adjame	Poisson Frais		LasR-défectueux	WT
DCB64 ; YOP VB13 C1	Yopougon	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB65 ; ADJ PFR21	Adjame	Poisson Frais		WT	WT
DCB66 ; ABO VB6 C3	Abobo	Viande bovine		WT	WT
DCB67 ; PB VB8 C1	Port Bouet	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB68 ; PB VB22 C1	Port Bouet	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux

DCB69 ; ADJ PF23	Adjame	Poisson Fumé	(Benie <i>et al.</i> , 2017)	LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB70 ; YOP PFR12 C3	Yopougon	Poisson Frais		LasR-défectueux	WT
DCB71 ; ADJ PFR12	Adjame	Poisson Frais		WT	WT
DCB72 ; ADJ PFR16	Adjame	Poisson Frais		WT	WT
DCB73 ; ADJ PFR15	Adjame	Poisson Frais		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB74 ; PB VB14 C1*	Port Bouet	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB75 ; ADJ PF20 C1	Adjame	Poisson Fumé		LasR-défectueux	WT
DCB76 ; ABO VB6 C1	Abobo	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB77 ; PB VB9 C3	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB78 ; PB VB8 C2	Port Bouet	Viande bovine		LasR-défectueux	WT
DCB79 ; PB PFR7 C1	Port Bouet	Poisson Frais		WT	WT
DCB80 ; PBVB2 C2	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB81 ; PB VB7 C1	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB82 ; ABO VB4 C2	Abobo	Viande bovine		LasR-défectueux	WT
DCB83 ; ADJ PFR10 C1	Adjame	Poisson Frais		WT	WT
DCB84 ; PB VB13 C2	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB85 ; ADJ VB12 C1*	Adjame	Viande bovine		WT	LasR-défectueux
DCB86 ; ABO VB4C1*	Abobo	Viande bovine		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB87 ; ABO PF11 C1	Abobo	Poisson Fumé		WT	WT
DCB88 ; ADJ PFR26 C1*	Adjame	Poisson Frais		WT	WT
DCB89 ; ADJ VB3 C2	Adjame	Viande bovine		WT	WT
DCB90 ; ADJ PFR4 C1	Adjame	Poisson Frais		WT	WT
DCB91 ; YOP PFR2 C1	Yopougon	Poisson Frais		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB92 ; ABO PF15	Abobo	Poisson Fumé		LasR-défectueux	WT
DCB93 ; ABO VB3 C3	Abobo	Viande bovine		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB94 ; PB VB9 C2	Port Bouet	Viande bovine		WT	WT
DCB95 ; ADJ PF14 C1	Adjame	Poisson Fumé		LasR-défectueux	LasR-défectueux

DCB96 ; ADJ PF9C1	Adjame	Poisson Fumé	(Benie <i>et al.</i> , 2017)	WT	WT
DCB97 ; ADJ PF6C1	Adjame	Poisson Fumé		WT	WT
DCB98 ; ADJ PF13	Adjame	Poisson Fumé		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB99 ; YOP PF29C1	Yopougon	Poisson Fumé		WT	WT
DCB100 ; YOP PFR12 C2	Yopougon	Poisson Frais		WT	WT
DCB101 ; ENVABO	Abobo	Environnement		WT	WT
DCB102 ; ENVABO	Abobo	Environnement		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB103 ; ENVABO	Abobo	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB104 ; ENVABO	Abobo	Environnement		WT	WT
DCB105 ; ENVABO	Abobo	Environnement		WT	WT
DCB106 ; ENVADJ	Adjamé	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB107 ; ENVADJ	Adjamé	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB108 ; ENVADJ*	Adjamé	Environnement		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB109 ; ENVADJ*	Adjamé	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB110 ; ENVADJ	Adjamé	Environnement		LasR-défectueux	WT
DCB111 ; ENVYOP	Yopougon	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB112 ; ENVYOP	Yopougon	Environnement		WT	WT
DCB113 ; ENVYOP	Yopougon	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB114 ; ENVYOP	Yopougon	Environnement		WT	WT
DCB115 ; ENVYOP	Yopougon	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB116 ; ENVPBT	Port Bouet	Environnement		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB117 ; ENVPBT*	Port Bouet	Environnement		WT	LasR-défectueux
DCB118 ; ENVPBT	Port Bouet	Environnement		WT	WT
DCB119 ; ENVBG	Bingerville	Environnement		WT	WT
DCB120 ; ENVBG	Bingerville	Environnement		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB121 ; UBC1	Médecine	Pleuro pulmonaire		WT	WT
DCB122 ; UBC2	Médecine	Pleuro pulmonaire		WT	WT

DCB123 ; UBC3	Médecine	Pleuro pulmonaire	(Benie <i>et al.</i> , 2017)	WT	LasR-défectueux
DCB124 ; UBC4	Médecine	Pleuro pulmonaire		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB125 ; UBC5	Médecine	Pleuro pulmonaire		WT	WT
DCB126 ; UBC6	Médecine	Pleuro pulmonaire		WT	WT
DCB127 ; UBC7	Médecine	Pleuro pulmonaire		WT	WT
DCB128 ; UBC8	Médecine	Pleuro pulmonaire		WT	WT
DCB129 ; UBC9	Médecine	Pleuro pulmonaire		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB130 ; UBC10	Médecine	Pleuro pulmonaire		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB131 ; UBC11	Médecine	ORL		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB132 ; UBC12	Médecine	ORL		WT	WT
DCB133 ; UBC13	Médecine	ORL		WT	LasR-défectueux
DCB134 ; UBC14	Médecine	ORL		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB135 ; UBC15	Médecine	ORL		WT	WT
DCB136 ; UBC16	Médecine	ORL		WT	LasR-défectueux
DCB137 ; UBC17	Médecine	ORL		WT	LasR-défectueux
DCB138 ; UBC18	Consultation externe	ORL		WT	WT
DCB139 ; UBC19	Consultation externe	ORL		WT	LasR-défectueux
DCB140 ; UBC20	Consultation externe	ORL		WT	WT
DCB141 ; UBC21	Consultation externe	ORL		WT	WT
DCB142 ; UBC22	Médecine	ORL		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB143 ; UBC23	Médecine	ORL		WT	WT
DCB144 ; UBC24	Médecine	Urines		WT	LasR- like
DCB145 ; UBC25	Consultation externe	Urines		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB146 ; UBC26	Consultation externe	Urines		WT	LasR-défectueux
DCB147 ; UBC27	Consultation externe	Urines		WT	LasR-défectueux, RhIR-actif
DCB148 ; UBC28	Consultation externe	Urines		LasR-défectueux	WT
DCB149 ; UBC29	Consultation externe	Urines		WT	WT

DCB150 ; UBC30	Médecine	Urines	(Benie <i>et al.</i> , 2017)	LasR-défectueux	WT
DCB151 ; UBC31	Consultation externe	Urines		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB152 ; UBC32	Médecine	Urines		WT	WT
DCB153 ; UBC33	Pédiatrie	Urines		WT	LasR-défectueux
DCB154 ; UBC34	Pédiatrie	Urines		WT	WT
DCB155 ; UBC35	Pédiatrie	Urines		WT	LasR-défectueux
DCB156 ; UBC36	Pédiatrie	Urines		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB157 ; UBC37	Consultation externe	Urines		WT	LasR-défectueux
DCB158 ; UBC38	Consultation externe	Urines		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB159 ; UBC39	Médecine	Bout de sonde cathéter		LasR-défectueux	LasR-défectueux
DCB160 ; UBC40	Médecine	Bout de sonde cathéter		WT	WT
DCB161 ; UBC41	Médecine	Bout de sonde cathéter		WT	LasR-défectueux
DCB162 ; ATCC	ATCC	ATCC		WT	LasR-défectueux

Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN plasmidique FavorPrep – Favorgen.



FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit

Cat. No.: FAPDE 004
FAPDE 100
FAPDE 300
(For Research Use Only)

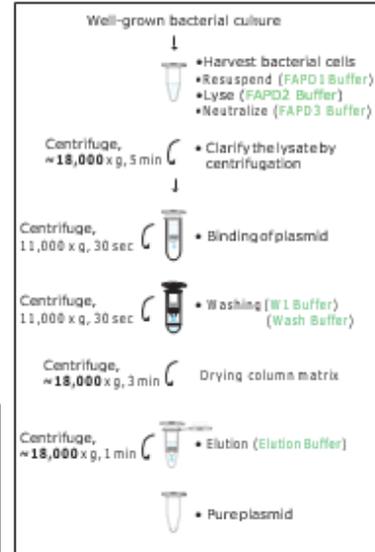
Kit Contents:

Cat. No.:	FAPDE 004 (4 preps_sample)	FAPDE 100 (100 preps)	FAPDE 300 (300 preps)
FAPD1 Buffer	1.0 ml	25 ml	75 ml
FAPD2 Buffer	1.0 ml	25 ml	75 ml
FAPD3 Buffer	1.5 ml	35 ml	105 ml
W1 Buffer	2.0 ml	45 ml	135 ml
Wash Buffer (concentrate) ^a	1.0 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	0.5 ml	15 ml	35 ml
FAPD Column	4 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	4 pcs	100 pcs	300 pcs
RNase A	0.1 mg	2.5 mg	7.5 mg
User Manual	1	1	1
Preparation of Wash Buffer by adding ethanol (96 ~ 100%)			
Ethanol volume for Wash Buffer ^a	4 ml	80 ml	200 ml

Specification:

Principle:	mini spin column (silica matrix)
Sample size:	1 ~ 3 ml
Size of plasmid or construct:	< 15 kb
Operation time:	< 25 minutes
Typical Yield:	20 ~ 30 µg
Binding capacity:	60 µg/ column
Column applicability:	centrifugation and vacuum

Brief procedure:



Important Notes:

1. Store RNase A at -20 °C upon receipt of kit.
2. Add 0.5 ml of FAPD1 Buffer to a RNase A tube, vortex the tube to mix well. Briefly spin the tube and transfer the total RNase A mixture back to the FAPD1 bottle, mix well by vortexing and store the FAPD1 buffer at 4 °C.
3. If precipitates have formed in FAPD2 Buffer, warm the buffer in 37°C waterbath to dissolve precipitates.
4. Preparation of Wash Buffer by adding 96 ~ 100% ethanol (not provided) for first use.
5. Centrifugation steps are done by a microcentrifuge capable of the speed at 11,000 ~ 1,8000 x g.

General Protocol:

Please Read Important Notes Before Starting Following Steps.

1. Transfer 1 ~ 3 ml of well-grown bacterial culture to a centrifuge tube (not provided).
2. Centrifuge the tube at 11,000 x g for 1 minute to pellet the cells and discard the supernatant completely.
3. Add 200 µl of FAPD1 Buffer (RNase A added) to the cell pellet and resuspend the cells completely by pipetting.
 - Make sure that RNase A has been added into FAPD1 Buffer when first use.
 - No cell pellet should be visible after resuspension of the cells.
4. Add 200 µl of FAPD2 Buffer and gently invert the tube 5 ~ 10 times. Incubate the sample mixture at room temperature for 2 ~ 5 minutes to lyse the cells.
 - Do not vortex, vortex may shear genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the lysate become clear.
 - Do not proceed the incubation over 5 minutes.
5. Add 300 µl of FAPD3 Buffer and invert the tube 5 ~ 10 times immediately to neutralize the lysate.
 - Invert immediately after adding FAPD3 Buffer will avoid asymmetric precipitation.
6. Centrifuge at full speed (~18,000 x g) for 5 min to clarify the lysate. During centrifugation, place a FAPD Column in a Collection Tube.
7. Transfer the supernatant carefully to the FAPD Column and centrifuge at 11,000 x g for 30 seconds. Discard the flow-through and place the column back to the Collection Tube.
 - Do not transfer any white pellet into the column.
8. Add 400 µl of W1 Buffer to the FAPD Column and centrifuge at 11,000 x g for 30 seconds. Discard the flow-through and place the column back to the Collection Tube.

9. Add 700 μ l of Wash Buffer to the FAPD Column and centrifuge at 11,000 x g for 30 seconds. Discard the flow-through and place the column back to the Collection Tube.
 - Make sure that ethanol (96-100 %) has been added into Wash Buffer when first use.
 10. Centrifuge at full speed (\sim 18,000 x g) for an additional 3 minutes to dry the FAPD Column.
 - Important step! The residual liquid should be removed thoroughly on this step.
 11. Place the FAPD Column to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).
 12. Add 50 μ l \sim 100 μ l of Elution Buffer or ddH₂O to the membrane center of the FAPD Column. Stand the column for 1 minute.
 - Important step! For effective elution, make sure that the elution solution is dispensed on the membrane center and is absorbed completely.
- **Note!** Do not Elute the DNA using less than suggested volume (50 μ l). It will lower the final yield.
13. Centrifuge at full speed (\sim 18,000 x g) for 1 minute to elute plasmid DNA and store the DNA at -20°C.

Troubleshooting

Low yield

Bacterial cells were not lysed completely

- Too many bacterial cells were used (OD₆₀₀ > 10). Separate the bacterial culture into multiple tubes.
- After FAPD3 Buffer addition, break up the precipitate by inverting to ensure higher yield.

Overgrown of bacterial cells

- Incubation time should not longer than 16 hours.

Bacterial cells were insufficient

- Ensure that bacterial cells have grown to an expected amount (OD₆₀₀ > 1) after incubation under suitable shaking modes.

Incorrect DNA elution step

- Ensure that Elution Buffer was added and absorbed to the center of the FAPD Column matrix.

Incomplete DNA Elution

- If size of DNA fragments is larger than 10 kb, use preheated Elution Buffer (60 \sim 70°C) on solution step to improve the elution efficiency.

Incorrect preparation of Wash Buffer

- Ensure that the correct volume of ethanol (96 \sim 100 %) was added to and Wash Buffer prior to use.

Eluted DNA does not perform well

Residual ethanol contamination

- After Wash Step, dry the FAPD Column with an additional centrifugation at top speed (\sim 18,000 x g) for 5 minutes or incubation at 60°C for 5 minutes.

Genomic DNA Contaminates

Lysate prepared improperly.

- Gently invert the tube after adding the FAPD2 Buffer. And the incubation time should not longer than 5 minutes.
- Do Not use overgrown bacterial culture.

RNA Contaminates Plasmid DNA

Insufficiency of RNase A activity in FAPD1 Buffer because of long-term storage

- Prior to using FAPD1 Buffer, ensure that RNase A was added. If RNase A added FAPD1 Buffer is out of date, add additional RNase A into FAPD1 Buffer to a concentration of 50 μ g/ ml then store 4°C.
- Too many bacterial cells were used, reduce sample volume.

Smearing or degrading of Plasmid DNA

Nuclease contamination

- If used host cells have high nuclease activity (e.g., *enA*⁺ strains), perform the following optional Wash Step to remove residuary nuclease.
 - a. After DNA Binding Step, add 400 μ l of W1 Buffer into the FAPD Column and incubate for 2 minutes at room temperature.
 - b. Centrifuge at full speed (\sim 18,000 xg) for 30 seconds.
 - c. Proceed to step 9.

Plasmid DNA is not adequate for enzymatic digestions

Eluted plasmid DNA contains residual ethanol

- Make sure you have discarded the flow-through after washing with Wash Buffer (Step 9) and centrifuged for an addition 3 minutes (Step 10).

Denatured Plasmid DNA migrate faster than supercoiled form during electrophoresis

Incubation in FAPD2 Buffer too long

- Do not incubate the sample longer than 5 minutes in FAPD2 Buffer

Annexe 3 : Données brutes obtenus lors des différents dosages effectués lors de cette étude.

	HSL-CL2-30x0 3h / / [P] 3h	HSL-CL2-30x0 6h / / [P] 6h	HSL-C4 3h / / [P] 3h	HSL-C4 6h / / [P] 6h	PYO D0695 6h / / [P] 6h	PYO D0695 24h / / [P] 24h	HHQ-C7 6h / / [P] 6h	HHQ-C7 24h / / [P] 24h	HONO-C7 6h / / [P] 6h	HONO-C7 24h / / [P] 24h	POS-C7 6h / / [P] 6h	POS-C7 24h / / [P] 24h	RC10C10 + RR10C10 6h / / [P] 6h	Fluo rHA1Agfp 30h / D0600 30h	PYO D0695 18h / / [P] 18h	PYO D0695 18h / / [P] King's A
PA14	0,03922	0,01273	0,00294	0,00888	0,02243	0,01550	0,00784	0,00006	0,03861	0,02815	0,02333	0,02246	0,2286	153,19	0,0177	0,0077
DCB62	0,02963	0,01630	0,00436	0,01141	0,03197	0,07274	0,02554	0,00815	0,04639	0,11119	0,00599	0,10148	0,0061	26,84	0,0057	0,0489
19SIO	0,04039	0,02143	0,00363	0,01359	0,03543	0,01917	0,01492	0,00010	0,04337	0,03561	0,03063	0,02928	0,3728	2699,06	0,0041	0,0037
PA-CL513	0,02762	0,02192	0,00158	0,01600	0,04092	0,02258	0,02780	0,00000	0,03600	0,04357	0,01760	0,05850	0,2204	8017,82	0,0126	0,0085
PA-CL532	0,03492	0,01462	0,00430	0,02117	0,04291	0,03973	0,02160	0,00077	0,08246	0,11535	0,03204	0,07571	0,3333	1107,76	0,0049	0,0026
DCB12	0,02046	0,01528	0,00193	0,02232	0,06913	0,08905	0,07736	0,02384	0,04570	0,06829	0,01907	0,22781	0,0758	88,54	0,0046	0,0136
DCB13	0,05204	0,01369	0,00660	0,01810	0,04675	0,04550	0,01306	0,01912	0,06342	0,17564	0,01622	0,11949	0,1988	23198,40	0,0037	0,0056
DCB22	0,02287	0,01255	0,00090	0,01068	0,03380	0,03496	0,00003	0,00002	0,00002	0,00006	0,00031	0,00061	0,3763	34,39	0,0004	0,0064
DCB31	0,04133	0,01401	0,00393	0,02138	0,01824	0,02687	0,02118	0,00000	0,05285	0,08498	0,03238	0,07414	0,6082	33,47	0,0019	0,0047
DCB43	0,04157	0,01863	0,00432	0,02051	0,02607	0,01796	0,01564	0,00328	0,04446	0,04283	0,03695	0,05693	1,0508	4139,91	0,0031	0,0064
DCB88	0,03554	0,01744	0,00309	0,01969	0,02159	0,01770	0,00955	0,00000	0,03026	0,03081	0,01224	0,02256	0,6474	4959,20	0,0017	0,0017
lasR PA14	0,00051	0,00016	0,00000	0,00158	0,01912	0,02590	0,04204	0,01928	0,00477	0,01775	0,00279	0,04430	0,1710	40,55	0,0122	0,0136
PA-CL507	0,02036	0,00609	0,00130	0,00805	0,02876	0,02506	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000	0,00008	0,00027	0,3932	848,93	0,0005	0,0077
PA-CL504	0,01898	0,00365	0,00074	0,00478	0,02598	0,02919	0,00000	0,00003	0,00002	0,00005	0,00048	0,00087	0,4482	21,63	0,0009	0,0065
18G	0,00000	0,00000	0,00000	0,00079	0,02234	0,02789	0,14762	0,19706	0,02682	0,09167	0,00309	0,13027	0,2330	45,23	0,0006	0,0042
325B	0,00000	0,00000	0,00000	0,00026	0,02904	0,03017	0,00000	0,00000	0,00001	0,00003	0,00070	0,00052	0,1944	35,01	0,0002	0,0054
PA-CL521c	0,00000	0,00000	0,00000	0,00016	0,02002	0,04572	0,01249	0,03408	0,00575	0,02269	0,00020	0,02183	0,0142	2720,81	0,0007	0,0028
DCB3	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,02661	0,00780	0,05482	0,12898	0,01581	0,17577	0,00041	0,00036	0,0009	30,02	0,0016	0,0005
DCB36	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,01655	0,08355	0,04512	0,03758	0,00682	0,11243	0,00104	0,00033	0,0038	38,88	0,0006	0,0045
DCB85	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,05621	0,08148	0,00229	0,09783	0,00149	0,10958	0,00082	0,00627	0,0134	45,69	0,0018	0,0142
DCB117	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,02232	0,10582	0,06696	0,01452	0,01901	0,09321	0,00060	0,00003	0,0026	41,82	0,0013	0,0086
DCB108	0,00000	0,00000	0,00000	0,00584	0,03816	0,04852	0,08868	0,02904	0,01505	0,02269	0,01435	0,10116	0,3552	267,16	0,0023	0,0148
E90	0,00000	0,00000	0,00000	0,00168	0,01798	0,02149	0,01995	0,01497	0,01995	0,01497	0,03870	0,02903	0,3299	707,69	0,0017	0,0168
E125	0,00000	0,00000	0,00000	0,00048	0,01557	0,02177	0,02859	0,01734	0,02859	0,01734	0,05543	0,03362	0,1172	197,99	0,0008	0,0110
E167	0,00000	0,00000	0,00000	0,00127	0,01110	0,01308	0,01911	0,01502	0,01911	0,01502	0,03705	0,02912	0,3055	420,76	0,0006	0,0074
DCB74	0,00023	0,01444	0,00000	0,00138	0,01187	0,00913	0,03588	0,23198	0,00547	0,13926	0,00066	0,01425	0,0008	52,63	0,0009	0,0003
PA-CL521b	0,00000	0,00000	0,00026	0,01217	0,07751	0,10802	0,08033	0,05711	0,04441	0,07401	0,01165	0,20345	0,2016	1571,78	0,0008	0,0127
PA-CL521a	0,00170	0,00000	0,00000	0,00247	0,06348	0,11958	0,08229	0,06769	0,04225	0,07186	0,01382	0,20396	0,2613	1608,20	0,0011	0,0262
78RV	0,00107	0,00124	0,00021	0,00463	0,02686	0,04396	0,13219	0,11639	0,01232	0,03190	0,02104	0,15042	0,2721	321,46	0,0006	0,0116
PA-CL512	0,00000	0,00030	0,00000	0,00117	0,02242	0,03831	0,17153	0,15721	0,01319	0,03668	0,00595	0,12449	0,1266	165,88	0,0011	0,0164
DCB38	0,00000	0,00011	0,00000	0,00152	0,01692	0,02810	0,11007	0,07155	0,00543	0,01375	0,01371	0,11299	0,2389	214,68	0,0021	0,0072
DCB50	0,00121	0,00214	0,00000	0,01555	0,02476	0,03558	0,10799	0,15963	0,00755	0,02209	0,00859	0,15758	0,3137	319,17	0,0013	0,0117
DCB54	0,00000	0,00020	0,00000	0,00578	0,03564	0,07659	0,08066	0,05339	0,00947	0,02606	0,00866	0,08987	0,1988	26,22	0,0014	0,0222
DCB86	0,00000	0,00065	0,00000	0,00283	0,02316	0,05307	0,13359	0,07616	0,02089	0,05226	0,01233	0,15084	0,2693	354,32	0,0008	0,0203
DCB109	0,00042	0,00109	0,00000	0,00713	0,03830	0,06435	0,11903	0,08587	0,02529	0,05260	0,01796	0,15339	0,6509	295,15	0,0021	0,0184
PAO1	ND	ND	ND	ND	0,01625	0,02555	0,03837	0,01809	0,01944	0,06904	0,00596	0,07912	0,2090	932,86	0,0053	0,0084
lasR PAO1	ND	ND	ND	ND	0,01679	0,02565	0,00789	0,10313	0,00130	0,04534	0,00026	0,03431	0,0033	28,46	0,0065	0,0158

Annexe 4 : Variations recensées parmi les séquences protéiques de quelques gènes d'intérêt en comparaison avec PA14. Partie 1.

Isolat	LasR			Mvtr			RhlR			RhlI		
	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine
18G	p.K218N	99%	GerE	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
19SJO	p.G91X	99%	Autoinducer binding	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
32SB	p.K218N	99%	GerE	p.37deIS p.38deIA p.39deIV p.40deIS	99%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
78RV	p.E196K	99%	GerE	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
PA-CL504	-	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
PA-CL507	-	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
PA-CL512	p.S223F	99%	GerE	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
PA-CL513	-	100%	-	p.A314V	99%	-	-	100%	-	-	100%	-
PA-CL532	-	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-

Comparaison des séquences protéiques de certains gènes d'intérêt avec la référence *Pseudomonas aeruginosa* UCPBB-PA14. Il n'a été trouvé aucune différences dans les séquences pour LasI, c'est pourquoi il n'apparaît pas dans ce tableau. La nomenclature utilisée ici est décrite par (Dunnen & Antonarakis, 2000).

Annexe 4 : Variations recensées parmi les séquences protéiques de quelques gènes d'intérêt en comparaison avec PA14. Partie 2.

Isolat	LasR			MvfI			RhlR			RhlI		
	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine	Nature de mutation	Pourcentage d'identité	Domaine
PA-CL521a	p.K33A p.L34C p.L35C p.F36L p.37deG p.L38R p.L39T p.P40A p.K41R p.D42T p.S43T p.Q44R p.D45T p.Y46P p.E47S p.N48S p.A49S p.F50A p.L51T p.V52T p.G53R p.N54P p.Y55P p.P56G p.A58S p.W59I p.R60T p.E61T p.H62G p.Y63L p.D64A p.R65T p.A66R p.Y68S p.A69T p.V71R p.D72S p.P73V p.73_74msPR p.S74A p.H75Y p.T77R p.Q78F p.80deIV p.81deIL p.82deIP p.83deII p.F84G p.W85N p.E86R p.89deII p.90deIY p.91deIQ p.K94R p.Q95E p.H96S p.E97S p.F98T p.F99S p.E100S p.E101S p.A102R p.S103K p.A104P p.A105R p.G106P p.L107P p.V108A p.Y109W p.G110C p.L111M p.T112G	70%	Autoinducer binding	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-
PA-CL521b	Idem PA-CL521a	70%	Autoinducer binding	-	100%	-	-	100%	-	p.D83E p.G127A	99%	-

Annexe 5 : *Pseudomonas aeruginosa* isolates defective in function of LasR quorum sensing regulator are frequent in diverse environmental niches (Groleau *et al.*, 2021).

Marie-Christine Groleau^a, Hélène Taillefer^a, Antony T. Vincent^b, Philippe Constant^a and Eric D  ziel^{a*}

^a Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique (INRS), Laval, Qc, Canada

^b Département des sciences animales, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, 2425, rue de l'Agriculture, Quebec City, Qc, Canada

*Correspondance : eric.deziel@inrs.ca

ABSTRACT

The saprophyte *Pseudomonas aeruginosa* is a versatile opportunistic pathogen causing infections in immunocompromised individuals. To facilitate its adaptation to a large variety of niches, this bacterium exploits population density-dependant gene regulation systems called quorum sensing. In *P. aeruginosa*, three distinct but interrelated quorum sensing systems (*las*, *rhl* and *pqs*) regulate the production of many survival and virulence functions. In prototypical strains, the *las* system, through its transcriptional regulator LasR, is important for the full activation of the *rhl* and *pqs* systems. Still, LasR-deficient isolates have been reported, mostly sampled from the lungs of people with cystic fibrosis, where they are considered selected by the chronic infection environment. In this study, we show that a defect in LasR activity appears to be an actually widespread mechanism of adaptation in this bacterium. Indeed, we found abundant LasR-defective isolates sampled from hydrocarbon-contaminated soils, hospital sink drains, and meat/fish market environments, using an approach based on phenotypic profiling, supported by gene sequencing. Interestingly, several LasR-defective isolates maintain an active *rhl* system or are deficient in *pqs* system signaling. The high prevalence of a LasR-defective phenotype among environmental *P. aeruginosa* isolates questions the role of quorum sensing in niche adaptation.