

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

CARACTÉRISATION DU COMPORTEMENT DE SURFACE DE LA BACTÉRIE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Par
Charles Morin

Thèse présenté(e) pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences de Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jonathan Perreault
INRS - Centre AFSB

Examineur externe

Pascale B. Beauregard
Faculté des sciences
Université de Sherbrooke

Examineur externe

Alain Stintzi
Faculty of Medicine
University of Ottawa

Directeur de recherche

Eric Déziel
INRS – Centre AFSB

REMERCIEMENTS

Mon parcours aux études graduées a été l'une des plus palpitantes périodes de ma vie. Elle a également été la plus demandante, principalement au niveau mental. C'est avec joie et soulagement que je me permets enfin de tourner la page sur cette grande aventure, ayant par le fait même beaucoup grandi de mon côté. La fin de cette étape est le meilleur moment pour reconnaître le support que j'ai reçu durant ce cheminement.

Je tiens tout d'abord à remercier Eric, sans qui il n'y aurait pas eu de thèse à effectuer. Tu as toutes les qualités pour être un excellent directeur de recherche. Ta patience, ton écoute et ta disponibilité ont rendu l'expérience du doctorat d'autant plus agréable, et tu représentes le modèle idéal que les *leaders* dans le domaine de la recherche se doivent de suivre. J'ai beaucoup appris durant ce parcours, et c'est en grande partie grâce à toi.

Et que dire de Marie-Christine? Tel un pilier imbrisable, elle supporte l'entièreté du laboratoire avec brio. Ta présence positive et ton amitié ont été un support précieux durant les six dernières années. Je te souhaite que du bonheur à venir pour toi et ta famille.

Merci à toute l'équipe du laboratoire, présente et passée. En six ans, j'ai eu la chance de côtoyer plusieurs collègues passionnés par la recherche. L'ambiance a toujours été imbattable dans le laboratoire. J'ai eu de la chance d'avoir intégré un groupe aussi convivial. Je souhaite que ça demeure ainsi le plus longtemps possible dans les années à venir.

Évidemment, un merci tout particulier à ma conjointe Christine. Les dernières années n'ont pas été facile pour nous deux. Je suis heureux que nous nous soyons trouvés au début de nos études au baccalauréat, et que nous ayons eu la chance de nous supporter durant les études graduées. Je suis content de tourner la page et d'entamer cette nouvelle étape avec toi. Bisou, je t'aime fort ! <3

Un grand merci à ma famille, mes parents Gérald et Nathalie, et mes sœurs Camille et Sandrine. Votre aide, votre support et votre amour ont été cruciaux à ma réussite. Je vous aime très fort.

Merci à Jonathan Perreault et à son équipe pour m'avoir supporté durant mes travaux avec l'ARN. Jonathan, je suis content que tu aies accepté de réviser ma thèse. J'espère que tu apprécieras.

Merci à Pascale Beauregard. Tu m'as offert ma première expérience de recherche au sein de son laboratoire en 2015 (bientôt 10 ans déjà). Ce stage m'a donné la pique pour la microbiologie.

Je suis très content que tu fasses partie de mon comité d'évaluation. Je souhaite à ton laboratoire et à toi le plus grand succès.

RÉSUMÉ

Pseudomonas aeruginosa possède un génome plutôt grand pour une bactérie. Avec plus de 6 millions de paires de base, son génome code pour une vaste gamme d'appendices cellulaires, de systèmes de sécrétion et de gènes de régulation. Ces outils lui confèrent un avantage considérable pour coloniser une diversité de niches écologiques : principalement les milieux perturbés par l'activité humaine. Cependant, *P. aeruginosa* est également un pathogène opportuniste notoire de l'humain, les souches multirésistantes causant des infections de plus en plus difficiles à traiter. *Pseudomonas aeruginosa* utilise ses gènes de régulation pour finement moduler son mode de vie, soit sessile ou motile, pour s'adapter aux conditions environnementales changeantes. Une de ces voies importantes pour cette adaptation est appelée Gac/Rsm. La motilité de type *swarming* est un déplacement social effectué sur une surface. Pour ce faire, *P. aeruginosa* exprime fortement son flagelle polaire et produit une grande quantité d'agents mouillants (surfactants) pour faciliter le mouvement de sa population. Mes travaux visent à caractériser la motilité *swarming* de *P. aeruginosa* et l'utiliser comme modèle pour étudier son comportement de surface. Je démontre que les comportements de surface de *P. aeruginosa*, effectués seuls ou en communautés polymicrobiennes, sont plus complexes qu'ils n'y paraissent. L'utilisation d'agents gélifiant alternatifs permettent l'induction de la motilité *swarming* de façon indépendante des surfactants. L'utilisation de milieux sans calcium favorise un étalement d'une colonie sans flagelle nommé *sliding*. De plus, mélanger des espèces bactériennes différentes en condition de *swarming* permet d'induire des phénotypes complètement nouveaux. Par exemple, une bactérie comme *Burkholderia cenocepacia* peut induire une motilité flagelle-indépendante chez *P. aeruginosa* PA14. Les conditions induisant la motilité de surface permettent également d'employer des stratégies expérimentales d'évolutions dirigées en laboratoire et d'ainsi explorer les mécanismes de régulation génique qui contrôlent ce comportement. Une telle évolution a permis d'évoluer l'activité du régulateur post-transcriptionnel global RsmA. Par une méthode de *pull-down in vitro*, je mets en évidence les vastes différences de régulation globale que la substitution R31S induit chez RsmA. En améliorant nos connaissances des comportements sociaux de *P. aeruginosa* et de leur contrôle, nous nous approchons d'un contrôle au niveau de ses infections.

Swarming ; *sliding* ; motilité ; interactions interbactériennes ; surfactants ; *Burkholderia cenocepacia* ; pathogène opportuniste ; régulation génique ; Gac/Rsm

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a bacterium with quite a large genome for such a microorganism. With over six million base pairs of genetic data coding for multiple virulence factors, antimicrobial resistance mechanisms and gene regulation pathways, *P. aeruginosa* is very versatile. This toolkit is crucial for this bacterium to colonize its environment, mainly those with intense human activity. This is quite relevant since *P. aeruginosa* is an important opportunistic pathogen of humans. Multiresistant strains of *P. aeruginosa* are particularly nasty, causing either untreatable long-lasting chronic infections or severe acute ailments. *P. aeruginosa* uses its vast set of regulation pathways to finely tune its lifestyle to its current environment. A very important pathway for such adaptation is the Gac/Rsm pathway, regulating the transition between motile and sessile lifestyles. In the lab, we use a swarming-based model to study the social behaviors of *P. aeruginosa*. In short, swarming is a social motility triggered on semi-solid surfaces when the polar flagellum of *P. aeruginosa* is activated and when its tensioactive molecules (surfactants) are produced. This allows a whole population to spread on a surface. Using this model, I show that surface behavior of *P. aeruginosa* is more complex than previously assumed. Swarming can be initiated without surfactant when alternative gelling agents are used instead of agar. Furthermore, using calcium-depleted media allows the spread of *P. aeruginosa* colonies without the expression of its flagellum. Social behavior is also greatly affected by the presence of other bacterial species in the swarming population. For example, another bacterium called *Burkholderia cenocepacia* is able to trigger a flagellum-independent spread of *P. aeruginosa* PA14 on a semi-solid surface. A swarming study model can also be used to experimentally evolve population to increase their motility, shedding light on the regulation processes that take place within the cytoplasm of swarming-deficient mutants. Such an evolution allowed a $\Delta hptB$ mutant to acquire the R31S substitution in the RsmA protein sequence. This RsmA allele is thought to have a different binding affinity for some of its targets. To shed light on the impact of this mutation, I conducted an *in vitro* pull-down assay with a synthetic pool of 5'UTR regions of *P. aeruginosa* PA14. This method identified a few binding targets of RsmA that are affected in their affinity with the RsmAR31S variant. In all, my work gives insight on the complex behavior that is swarming motility and its regulation.

Swarming ; sliding ; motility ; interbacterial interactions ; surfactants ; *Burkholderia cenocepacia* ; opportunistic pathogen ; gene regulation ; Gac/Rsm

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXI
1 INTRODUCTION	1
1.1 LES OUTILS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	1
1.1.1 <i>Les appendices locomoteurs</i>	1
1.1.2 <i>Les appendices non-locomoteurs</i>	6
1.1.3 <i>Les systèmes de sécrétion</i>	7
1.2 LA REGULATION DE <i>P. AERUGINOSA</i>	13
1.2.1 <i>Les systèmes à deux composantes</i>	13
1.2.2 <i>Les seconds messagers</i>	15
1.2.3 <i>Les petits ARN régulateurs et les ribonucléoprotéines</i>	19
1.2.4 <i>La communication intercellulaire (Quorum sensing)</i>	20
1.3 LA VOIE GAC/RSM	21
1.3.1 <i>GacS et le réseau multikinase</i>	22
1.3.2 <i>Au cœur de la voie : les protéines Rsm</i>	25
1.3.3 <i>L'impact de la voie</i>	26
1.3.4 <i>L'homéostasie de la voie</i>	27
1.4 LES COMPORTEMENTS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	29
1.4.1 <i>Le mode de vie sessile</i>	29
1.4.2 <i>Les types de motilité</i>	31
1.5 LA MOTILITE DE TYPE SWARMING	33
1.5.1 <i>Les besoins du swarming</i>	34
1.5.2 <i>Le contrôle du swarming</i>	36
2 PROBLÉMATIQUE	37
3 MATERIEL ET METHODES	41
3.1 CONDITIONS DE CROISSANCE DES BACTERIES	41
3.2 ESSAI DE MOTILITE DE TYPE SWARMING	41
3.2.1 <i>Utilisation des agents gélifiants alternatifs</i>	42

3.2.2	<i>Utilisation de marqueurs fluorescents</i>	43
3.3	AMPLIFICATIONS PCR	45
4	1^{ER} CHAPITRE DE RÉSULTATS : LES CONDITIONS PHYSICOCHIMIQUES QUI INFLUENCENT LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING	47
4.1	RESUME EN FRANÇAIS	49
4.2	ABSTRACT.....	49
4.3	INTRODUCTION	50
4.4	MATERIALS AND METHODS	51
4.4.1	<i>Bacterial strains and culture</i>	51
4.4.2	<i>Swarming motility assay</i>	52
4.4.3	<i>Construction of ΔfliC mutants</i>	52
4.4.4	<i>Construction of rhlC- mutant</i>	53
4.5	RESULTS AND DISCUSSION.....	53
4.5.1	<i>Surface motility pattern is affected by the type of gelling agent used</i>	53
4.5.2	<i>Rhamnolipids are not required for motility on alternative gelling agents but still contribute to the motility pattern</i>	56
4.6	CONCLUSIONS.....	62
4.7	ACKNOWLEDGMENTS	63
4.8	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES: CONDITIONS PHYSICOCHIMIQUES INFLUENÇANT LA MOTILITÉ DE SURFACE.....	63
4.8.1	<i>Détails expérimentaux pour les résultats supplémentaires</i>	63
4.8.2	<i>Les rhamnolipides ne sont pas le seul facteur contrôlant la formation des dendrites</i>	66
4.8.3	<i>L'absence de calcium induit une motilité de surface flagelle-indépendante</i>	67
4.8.4	<i>L'apport de la voie Gac/Rsm dans le contrôle du sliding</i>	75
4.9	DISCUSSION.....	77
4.9.1	<i>Utilisation des agents gélifiants</i>	77
4.9.2	<i>Différences entre l'agar, la carraghénane et la gomme de gellane</i>	79
4.9.3	<i>Contribution de la surface à la motilité</i>	81
4.9.4	<i>Contribution des nutriments à la motilité</i>	81
4.9.5	<i>Classification des types de motilité</i>	82
4.10	PERSPECTIVES.....	83
5	2^E CHAPITRE DE RÉSULTATS : INTERACTIONS INTERBACTÉRIENNES DURANT LE SWARMING	85
5.1	RESUME EN FRANÇAIS	87
5.2	ABSTRACT.....	87
5.3	IMPORTANCE	87
5.4	INTRODUCTION	88

5.5	RESULTS.....	89
5.5.1	<i>B. cenocepacia</i> K56-2 can exploit rhamnolipids produced by <i>P. aeruginosa</i> PA14 to achieve a swarming behavior.	89
5.5.2	Nonflagellated PA14 Δ fliC mutant can spread in a swarm when co-inoculated with K56-2.	91
5.5.3	Investigating the appendages required for interactions between <i>P. aeruginosa</i> and <i>B. cenocepacia</i> in a swarming colony.	94
5.6	DISCUSSION.....	96
5.7	CONCLUSION.....	99
5.8	MATERIALS AND METHODS.....	99
5.8.1	Strains, plasmids, and growth conditions.....	99
5.8.2	Motility assays.....	101
5.8.3	Swarming with added rhamnolipids or plastic beads.....	101
5.8.4	Generation of a Δ pilA Δ fliC double mutants.	101
5.8.5	Fluorescence labeling of PA14 with mCherry.....	102
5.8.6	Inactivation of <i>cupA</i> and <i>tadA</i> genes in fluorescent cells.....	102
5.8.7	Fluorescent labeling of <i>B. cenocepacia</i> K56-2.	102
5.8.8	Fluorescent imaging of PA14 and K56-2 co-swarming.....	102
5.9	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES : INTERACTIONS INTERBACTÉRIENNE	103
5.9.1	Détails expérimentaux	103
5.9.2	Interactions diverses avec d'autres espèces bactériennes	106
5.9.3	Évitement intra-espèce en swarming.....	110
5.9.4	L'évitement en swarming implique potentiellement les protéines Hcp	120
5.10	DISCUSSION: INTERACTIONS INTERBACTÉRIENNES DURANT LE SWARMING.....	121
5.10.1	Le swarming chez les autres espèces bactériennes	121
5.10.2	Le partage des ressources	122
5.10.3	L'évitement.....	123
5.11	PERSPECTIVES.....	124
6	3^E CHAPITRE DE RÉSULTATS : IDENTIFICATION DE CIBLES DE RÉGULATION DE RSMA	127
6.1	RESUME EN FRANÇAIS	128
6.2	ABSTRACT.....	128
6.3	INTRODUCTION	128
6.4	MATERIALS AND METHODS.....	130
6.4.1	Producing a bank of in vitro synthesized PA14 5'UTR DNA.....	130
6.4.2	In vitro transcription of the DNA pool.....	130
6.4.3	RsmA protein purification.....	131

6.4.4	<i>RNA pull-down assay</i>	131
6.4.5	<i>Preparing the sample sequencing library</i>	132
6.4.6	<i>Sequencing data analysis</i>	132
6.5	RESULTS AND DISCUSSION	132
6.5.1	<i>In vitro RNA pull-down assay reveals new potential binding targets of RsmA</i>	132
6.6	CONCLUSIONS.....	134
6.7	DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 3	134
7	4^E CHAPITRE DE RÉSULTATS : RÉGULATION DE LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING	
	135	
7.1	MISE EN CONTEXTE	135
7.2	DÉTAILS EXPÉRIMENTAUX	135
7.2.1	<i>Souches bactériennes utilisées dans cette section</i>	135
7.2.2	<i>Essai pull-down avec RsmA_{WT} et RsmA_{R31S}</i>	137
7.2.3	<i>Création des rapporteurs traductionnels luminescents</i>	138
7.2.4	<i>Délétion de rsmY et rsmZ dans ΔhptB RsmA_{R31S}</i>	139
7.2.5	<i>Transfert des rapporteurs traductionnels par conjugaison</i>	140
7.2.6	<i>Validation in vivo de la régulation de RsmA avec les rapporteurs traductionnels</i>	140
7.2.7	<i>Délétion de PA14_45700 and PA14_45710 par échange allélique</i>	140
7.2.8	<i>Construction pEX18-ΔgacS et délétion de ce gène dans PA14</i>	141
7.2.9	<i>Évolution gacS- et analyse des séquences par Breseq</i>	141
7.3	RÉSULTATS.....	142
7.3.1	<i>Le pull-down d'ARN révèle l'impact de la mutation R31S sur le contrôle des cibles de RsmA</i>	142
7.3.1	<i>L'importance de SST6 pour la motilité de type swarming</i>	149
7.3.2	<i>Le swarming permet l'évolution de propriétés pro-swarming chez le mutant gacS- .</i>	151
7.4	DISCUSSION.....	156
7.4.1	<i>L'impact de la mutation R31S sur la fonction de RsmA</i>	156
7.4.2	<i>Le swarming et l'évolution</i>	158
7.4.3	<i>Le swarming et le SST6</i>	159
7.4.4	<i>Perspectives</i>	159
8	CONCLUSION GÉNÉRALE	161
9	BIBLIOGRAPHIE.....	163
10	ANNEXE I	185
10.1	PUBLICATIONS.....	185
10.2	COMMUNICATION.....	185
11	ANNEXE II	187

12 ANNEXE III195

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 STRUCTURE DU CORPS BASAL DU FLAGELLE OBTENUE PAR TECHNIQUE CRYO-EM	2
FIGURE 1.2 DIFFERENCE ENTRE LE CORPS BASAL DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ET <i>SALMONELLA ENTERICA</i> ...	3
FIGURE 1.3 STRUCTURE SCHÉMATISÉE DU COMPLEXE DE SÉCRÉTION D'UN PILUS DE TYPE IVA.....	6
FIGURE 1.4 STRUCTURE DE L'APPAREIL DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III (SST3).....	9
FIGURE 1.5 STRUCTURE DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE VI (SST6).....	12
FIGURE 1.6 SCHEMA D'UN SENSEUR KINASE : EXEMPLE DE GACS	14
FIGURE 1.7 SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME PIL-CHP	17
FIGURE 1.8 SCHEMATISATION DU COMPLEXE WSP	18
FIGURE 1.9 INTERACTION ENTRE LES TROIS SYSTEMES DE QUORUM SENSING DE <i>P. AERUGINOSA</i>	21
FIGURE 1.10 UN RESEAU DE PLUSIEURS SENSEUR KINASES GOUVERNE LE SOMMET DE LA VOIE GAC/RSM.....	23
FIGURE 1.11 SCHEMA DE L'INTER REGULATION DES MEMBRES DE LA VOIE GAC/RSM	28
FIGURE 1.12 CYCLE DE DÉVELOPPEMENT DU BIOFILM	30
FIGURE 1.13 LE FLAGELLE S'ENROULE AUTOUR DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> POUR FACILITER LE CHANGEMENT D'ORIENTATION.	32
FIGURE 1.14 PATRON ÉTOILÉ D'UNE COLONIE SWARMING DE <i>P. AERUGINOSA</i> PA14 SAUVAGE	35
FIGURE 2.1 LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING EST AFFECTÉE PAR L'AJOUT DE MÉTAUX.	38
FIGURE 3.1 SCHEMA EXPERIMENTAL DE MICROSCOPIE D'UNE SECTION DE DENDRITE DE COLONIE SWARMING. ...	45
FIGURE 4.1 GELLING AGENT PERCENTAGE ALLOWING FOR SURFACE SPREADING OF <i>P. AERUGINOSA</i> PA14 WT. ...	54
FIGURE 4.2 SOCIAL SURFACE MOTILITY OF <i>P. AERUGINOSA</i> PA14 WT ON MEDIUM SOLIDIFIED WITH VARIOUS GELLING AGENTS	55
FIGURE 4.3 SWARMING PHENOTYPE OF PA14 WT ON CARRAGEENAN 0.5%.....	55
FIGURE 4.4 SURFACE MOTILITY OF RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS MUTANTS (<i>RHLA</i> -, <i>RHLB</i> - AND <i>RHLC</i> -) COMPARED TO WT.	56
FIGURE 4.5 SURFACE MOTILITY ON CARRAGEENAN AND GELLAN GUM MEDIA DOES NOT REQUIRE QUORUM SENSING AND DEPENDS ON THE FLAGELLUM.....	57
FIGURE 4.6 SWARMING ASSAY OF PA14 WT, <i>RHLA</i> -, <i>RHLB</i> - AND <i>RHLC</i> - MUTANTS ON M9DCAA MEDIA SOLIDIFIED WITH DIFFERENT AGAR BRANDS.	59
FIGURE 4.7 SPREADING OF AQUEOUS COLORING AGENT DROPS ONTO SWARMING GELS.....	60
FIGURE 4.8 DARKFIELD IMAGES OF COLONY BORDER OF PA14 <i>RHLA</i> - MUTANT ON ALTERNATIVE GELLING AGENTS.	61
FIGURE 4.9 FORMATION DE DENDRITES PAR UN MUTANTS Δ <i>PILA RHLA</i> -	66
FIGURE 4.10 MOTILITÉ DE MUTANTS DE PA14 SUR MILIEUX BSM	67
FIGURE 4.11 COMPARAISON ENTRE LE PHÉNOTYPE D'ÉTALEMENT SUR LES MILIEUX M9DCAA ET BSM POUR DIVERS MUTANTS.....	68
FIGURE 4.12 COMPARAISON DE LA DISPERSION INDUITE POUR LE MUTANT AFLAGELLAIRE Δ <i>FLIC</i> POUR DIVERS MILIEUX HYBRIDES.	69
FIGURE 4.13 L'ABSENCE DE CALCIUM INDUIT LE <i>SLIDING</i> D'UN MUTANT Δ <i>PILA</i> Δ <i>FLIC</i>	71

FIGURE 4.14 L'EXPANSION EN <i>SLIDING</i> EST POSSIBLE SANS PRODUCTION DE RHAMNOLIPIDES SUR MILIEUX GÉLIFIÉ À LA GOMME DE GELLANE.	72
FIGURE 4.15 L'AJOUT DE $MgCl_2$ N'A PAS LE MEME IMPACT PHYSIOLOGIQUE QUE L'AJOUT DE $CaCl_2$	73
FIGURE 4.16 LA CONTRIBUTION DE L'ALUMINIUM A LA MOTILITE DE SURFACE EST RHAMNOLIPIDES-DEPENDANTE.	74
FIGURE 4.17 CONTRIBUTION DU RÉGULATEUR RSMa DANS L'INDUCTION DU <i>SLIDING</i>	76
FIGURE 5.1 CO-SWARMING OF <i>P. AERUGINOSA</i> PA14 AND <i>B. CENOCEPACIA</i> K56-2.	90
FIGURE 5.2 <i>BURKHOLDERIA CENOCEPACIA</i> K56-2 CAN SWARM AND PRODUCES AN UNIDENTIFIED SURFACE-ACTIVE AGENT.	91
FIGURE 5.3 LOCALIZATION OF FLUORESCENTLY LABELED <i>P. AERUGINOSA</i> PA14 IN A CO-SWARM WITH <i>B. CENOCEPACIA</i> K56-2.	93
FIGURE 5.4 CLSM IMAGING OF <i>P. AERUGINOSA</i> AND <i>B. CENOCEPACIA</i> CO-SWARMING.	94
FIGURE 5.5 CO-SWARMING BETWEEN <i>B. CENOCEPACIA</i> K56-2 AND <i>P. AERUGINOSA</i> PA14 AFLAGELLATED DOUBLE MUTANTS.	95
FIGURE 5.6 LOCALIZATION OF FLUORESCENT POLYSTYRENE BEADS DURING CO-SWARMING OF <i>B. CENOCEPACIA</i> K56-2 AND <i>P. AERUGINOSA</i> PA14.	96
FIGURE 5.7 CO-SWARMING ENTRE <i>P. AERUGINOSA</i> ET PLUSIEURS ESPÈCES BACTÉRIENNES.	107
FIGURE 5.8 SWARMING SEUL POUR <i>P. AERUGINOSA</i> PA14 ET D'AUTRES ESPÈCES BACTÉRIENNES.	108
FIGURE 5.9 SWARMING AVEC DEUX ESPÈCES CÔTE-À-CÔTE.	109
FIGURE 5.10 ÉVITEMENT DU SWARMING.	110
FIGURE 5.11 ÉVITEMENT DES DENDRITES EN SWARMING.	111
FIGURE 5.12 LIMITE DU FRONT DE DIFFUSION DES RHAMNOLIPIDES.	112
FIGURE 5.13 INTERACTION D'UNE DENDRITE DE PA14 WT AVEC UNE COLONIE NON-MOTILE.	113
FIGURE 5.14 INTERACTION ENTRE UNE COLONIE MOTILE DE PA14 ET UNE COLONIE NON-MOTILE $\Delta PILA \Delta FLIC RHLA$ -.	114
FIGURE 5.15 ÉVITEMENT CAUSE PAR DIVERS EXTRAITS DE PA14 $\Delta RSMa RHLA$ -.	115
FIGURE 5.16 ÉVITEMENT CAUSÉ PAR LES POLYAMINES.	116
FIGURE 5.17 ESSAI D'ÉVITEMENT AVEC DES EXTRAITS DE PYOCINE DE TYPE R.	117
FIGURE 5.18 FRACTIONS DE DIVERSES MASSES MOLÉCULAIRES CAPABLE DE CAUSER L'ÉVITEMENT.	118
FIGURE 5.19 EXTRAIT D'ÉVITEMENT PURIFIÉ SUR GRADIENT.	119
FIGURE 5.20 GEL DENATURANT DES EXTRAITS CAUSANT OU NON DE L'ÉVITEMENT EN SWARMING.	121
FIGURE 6.1. PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS OF EACH PULL-DOWN SAMPLING CONDITIONS.	133
FIGURE 7.1: LA DÉLÉTION DES DEUX PHOSPHATASES TPM PA14_45700 ET PA14_45710 N'A PAS D'IMPACT SUR LE PHÉNOTYPE SWARMING DE <i>P. AERUGINOSA</i> PA14.	147
FIGURE 7.2 RSMa _{WT} AND RSMa _{R31S} ONT UN IMPACT DIFFÉRENT SUR LA TRADUCTION DE LEURS CIBLES RESPECTIVES IDENTIFIÉES PAR LE PULL-DOWN.	148
FIGURE 7.3 SWARMING DE DOUBLES MUTANTS HSI.	149
FIGURE 7.4 SWARMING DES MUTANTS HCP-.	150
FIGURE 7.5 PHÉNOTYPE EN SWARMING DES POTENTIELS EFFECTEURS DANS LA RÉGION GÉNOMIQUE DE HCPB.	151
FIGURE 7.6 SWARMING DE MULTIPLES MUTANTS GACS- DE <i>P. AERUGINOSA</i>	152
FIGURE 7.7 SWARMING DES MUTANTS GACA- ET GACS- MONTRENT UNE DIFFÉRENCE DE PHÉNOTYPE.	152

FIGURE 7.8 COMPARAISON DU PHÉNOTYPE EN <i>SWARMING</i> ENTRE LES DIVERS ÉVOLUANTS <i>GAC</i> S-.....	153
FIGURE 7.9 LA PERTE DE <i>GAC</i> S DANS LE <i>BACKGROUND</i> GENETIQUE DU WT NE CAUSE PAS DE DEFAUT DE <i>SWARMING</i>	155
FIGURE 7.10 APPARITION DE DENDRITES TARDIVES POUR LE TRIPLE MUTANT NON-MOTILE Δ <i>PILA</i> Δ <i>FLIC</i> <i>RHLA</i> -	156

LISTE DES TABLEAUX

TABLE 3.1 CONCENTRATION D'ANTIBIOTIQUE UTILISES POUR LA SELECTION DES CASSETTES DE RESISTANCE.....	41
TABLE 3.2 VISUALISATION DES FLUOROPHORES AU TYPHOON	44
TABLE 4.1 BACTERIAL STRAINS USED IN THIS STUDY.....	52
TABLE 4.2 SOUCHES UTILISEES DANS CETTE SECTION.....	64
TABLE 4.3 COMPARAISON DE LA COMPOSITION NUTRITIVE ENTRE LES MILIEUX M9DCAA ET BSM.....	69
TABLE 5.1 STRAINS/PLASMIDS USED IN THIS STUDY	100
TABLE 5.2 SOUCHES UTILISEES POUR LES TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES DU CHAPITRE 2.....	104
TABLE 5.3 CONCENTRATION ET VOLUME D'OPTIPREP UTILISES POUR PRODUIRE LE GRADIENT DE CENTRIFUGATION	106
TABLE 6.1 PRIMERS USED IN THIS STUDY	130
TABLE 7.1: SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES DANS CETTE SECTION.....	136
TABLE 7.2 AMORCES UTILISEES POUR LES TRAVAUX DE CETTE SECTION.....	138
TABLE 7.3 SOMMAIRE DES GÈNES AUXQUELLES LES <i>READS</i> DE LEUR 5'UTR SONT PLUS ABONDANTS DANS RSM _A ^{WT} QUE RSM _A ^{R31S}	143
TABLE 7.4 SOMMAIRE DES GÈNES AUXQUELLES LES <i>READS</i> DE LEUR 5'UTR SONT PLUS ABONDANTS DANS RSM _A ^{R31S} QUE RSM _A ^{WT}	144
TABLE 7.5 LISTE DES MUTATIONS PONCTUELLES POUR CHAQUE EVOLUANT	154
TABLE 11.1 RESULTATS SUPPLEMENTAIRE DE L'ARTICLE 3: LISTE DE TOUTES LES CIBLES STATISTIQUEMENT ENRICHIES PAR RSM _A COMPARATIVEMENT AU CONTROLE NON TRAITE.	187
TABLE 12.1 LISTE DE TOUTES LES CIBLES DIFFERENTIELLEMENT ENRICHIES RSM _A ^{WT} VS RSM _A ^{R31S}	195

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3OC12-HSL	3-oxo-dodécanoyl-homosérine lactone
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	Acyl-homosérine lactone
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
C4-HSL	butanoyl-homosérine lactone
CDS	<i>Coding sequence</i>
ChIP	<i>Chromatin Immuno-Precipitation</i>
Cryo-EM	Microscopie électronique cryogénique
Cryo-ET	Topographie électronique cryogénique
Cup	<i>Chaperone Usher Pathway</i>
di-GMPc	Di-guanosine monophosphate cyclique
DO	Densité optique
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , protéine fluorescente verte
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HAA	3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoic Acid
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
HPT	Histidine phosphotransférase, domaine protéique
HSI	<i>Hcp Secretion Island</i>
HSL	Homosérine lactone
LB, LA	<i>Lysogeny Broth, Agar</i>
M9DCAA	Milieu M9 avec Dextrose et acides casaminés
pARN	Petit ARN régulateur
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PQS	3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline
PT4	Pili de type IV
RBS	<i>Ribosome binding site</i>
REC	<i>Receiver</i> , Domaine protéique receveur
RLU	<i>Relative Light Units</i>
SST1	Système de sécrétion de type I
SST2	Système de sécrétion de type II
SST3	Système de sécrétion de type III
SST5	Système de sécrétion de type V
SST6	Système de sécrétion de type VI
TSB, TSA	<i>Tryptic Soy Broth, Agar</i>
UTR	<i>Untranslated Regions</i>
WT	<i>Wild Type</i> , souche de type sauvage

1 INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie très versatile qui peut coloniser une vaste gamme d'environnements (Moradali *et al.*, 2017). Notamment, sa présence dans un environnement donné est corrélée positivement avec l'activité humaine (Crone *et al.*, 2020). Ceci constitue un problème de santé publique important puisque *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste de l'humain ; elle infecte principalement les individus avec des défenses immunitaire affaiblies (Morin *et al.*, 2021). De plus, l'émergence rapide de souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes rend de plus en plus difficile le traitement des infections qu'elle cause (Garnacho-Montero & Amaya-Villar, 2022). Sa grande versatilité lui permet de non seulement s'épanouir dans les environnements naturels et artificiels, mais aussi de pouvoir envahir virtuellement toutes les régions du corps humain, de la tête (méningites) aux pieds (ulcères) (Morin *et al.*, 2021).

Cette capacité à coloniser ces niches diverses est conférée à *P. aeruginosa* par son génome relativement grand pour une bactérie – plus de six millions de paires de bases (Lee *et al.*, 2006; Stover *et al.*, 2000). Ce génome code pour un nombre impressionnant de fonctions nutritives, prédatrices et protectrices qui lui permettent de dominer son milieu.

1.1 Les outils de *P. aeruginosa*

Cette section survole les principaux appendices cellulaires que *P. aeruginosa* déploie pour interagir avec son environnement ainsi que les autres microorganismes voisins.

1.1.1 Les appendices locomoteurs

P. aeruginosa possède deux appendices locomoteurs différents : un flagelle polaire et des pili de type IV (PT4). Dans ces deux cas, la présence d'un système motorisé énergie-dépendant produit des forces suffisantes pour permettre le déplacement de la bactérie.

1.1.1.1 Le flagelle

Le système flagellaire est un complexe multiprotéique ancré dans les deux membranes externes de *P. aeruginosa* et autres bactéries à Gram négatif (Johnson *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2021). Les avancées récentes en imagerie de protéine par des techniques de microscopie électronique (Cryo-EM) ont permis d'imager la structure complète du corps basal du flagelle de *Salmonella enterica* (Johnson *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2021). La Figure 1.1 présente cette structure obtenue

par Tan et ses collègues (2021). Le corps basal est composé de plusieurs structures en anneau qui servent à ancrer la tige flagellaire aux membranes et à la paroi de la bactérie (Bouteiller *et al.*, 2021). L'anneau L, composé de la protéine FlgH, s'imbrique dans la membrane externe. L'anneau P est formé par la protéine FlgI et s'intègre dans la paroi de peptidoglycane. La protéine FliF forme l'anneau MS qui se place dans la membrane interne. L'anneau C (absent de la Figure 1.1) est formé par trois protéines FliG, FliM, FliN se trouve sous la membrane interne et l'anneau MS. L'anneau C transfère la force motrice des stators vers la tige flagellaire.

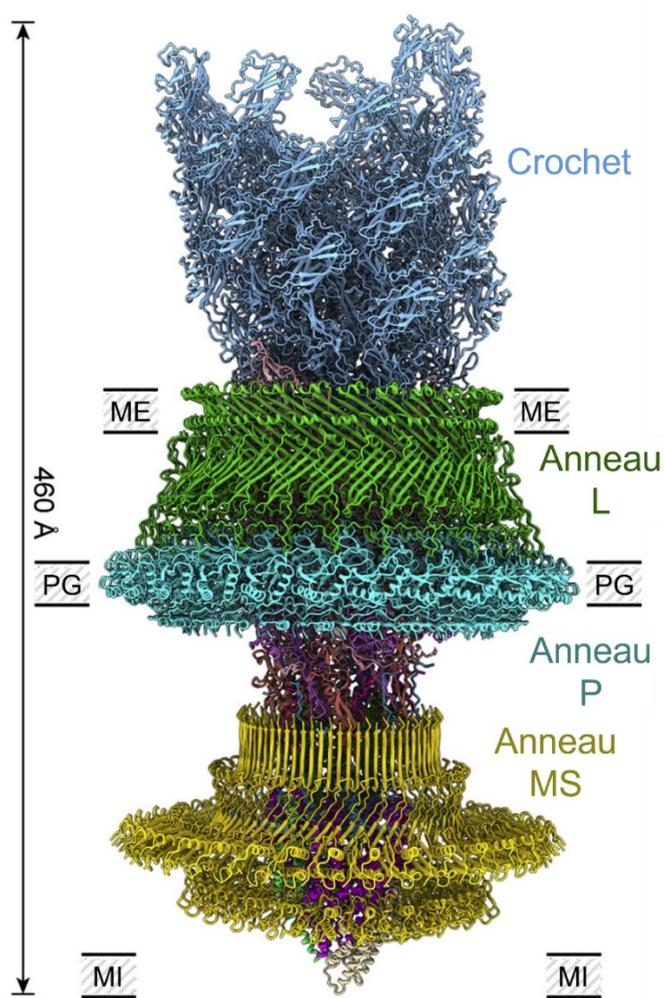


Figure 1.1 Structure du corps basal du flagelle obtenue par technique Cryo-EM

Schéma représentant la structure du corps basal du flagelle de la bactérie à Gram négatif *Salmonella enterica* sv. Typhimurium LT2, adapté des travaux publiés par Tan et ses collègues (2021). Le schéma a été produit à partir de données d'imagerie cryo-EM obtenues *in situ*. L'assemblage comprend (de haut en bas) **EN BLEU** le crochet flagellaire, **EN VERT** l'anneau L ancré dans la membrane externe (ME), **EN TURQUOISE** l'anneau P ancré dans la paroi de peptidoglycane (PG), **EN JAUNE** l'anneau MS s'attache sur la membrane interne (MI). L'anneau C est absent de ce schéma et se trouve sous l'anneau MS. (Tan *et al.*, 2021)

Le flagelle de *P. aeruginosa* présente deux structures supplémentaires à celui de *Salmonella* sp. et *Escherichia coli* : deux anneaux protéiques supplémentaires H et T associés aux anneaux L et P, respectivement (Zhu *et al.*, 2019). La Figure 1.2 montre cette différence visible par tomographie électronique (cryo-ET) obtenue par les travaux de Zhu *et al.* en 2019.

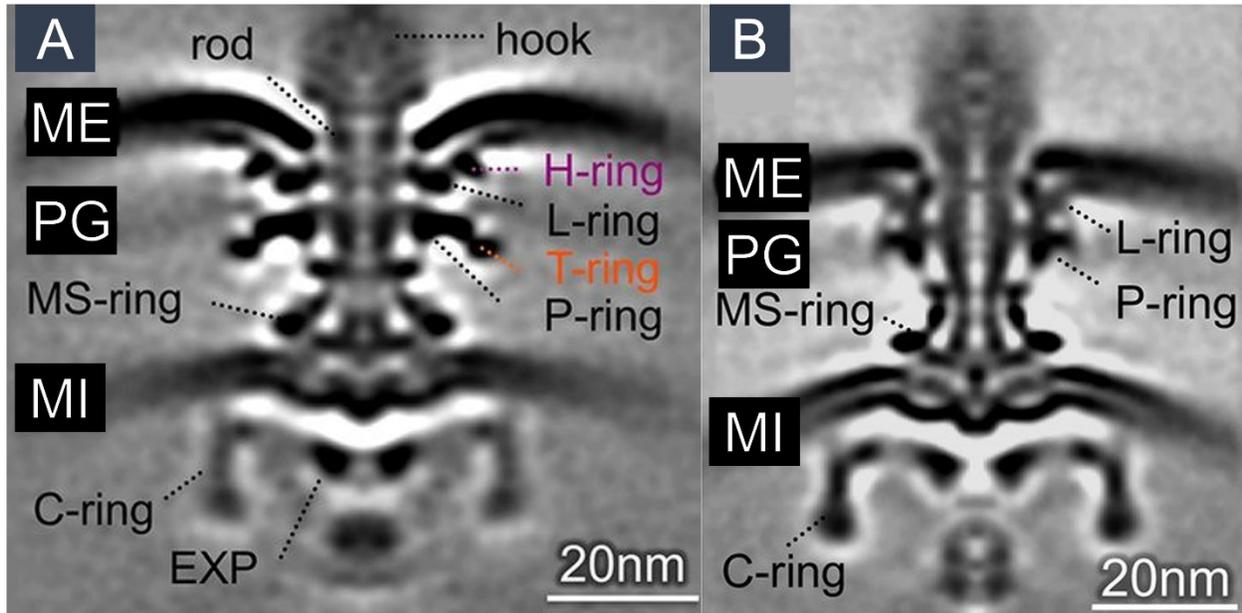


Figure 1.2 Différence entre le corps basal de *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica*

La coupe transversale du corps basal du flagelle de (A) *P. aeruginosa* PAK et (B) *S. enterica* sv. Typhimurium SB1780 obtenu par tomographie électronique (cryo-ET). Image adaptée des travaux de Zhu *et al.* (2019). ME : Membrane externe. PG : Peptidoglycane. MI : Membrane interne. Hook : Crochet. Rod : Tige du flagelle. EXP : Système d'exportation de l'assemblage flagellaire. Ring : Anneau.

Tel mentionné, la force motrice du flagelle est produite par un couple de protéine constituant le stator : MotA et MotB (Bouteiller *et al.*, 2021). Un dimère de MotB s'implante à travers de la membrane interne et la paroi de peptidoglycane autour du corps basal ; la protéine MotA s'assemble autour de la section membranaire de MotB (Deme *et al.*, 2020). Ensemble, le couple de protéine forme une pompe à proton. Le passage d'un H^+ à travers le complexe produit une force proton-motrice qui fait tourner la protéine MotA. Cette dernière interagit avec l'anneau C comme un engrenage pour transmettre cette rotation au flagelle complet (Deme *et al.*, 2020). *Pseudomonas aeruginosa* est particulière du fait qu'elle possède un deuxième couple homologue à MotA/B : MotC et MotD (Bouteiller *et al.*, 2021). Alors que les deux complexes de stator peuvent être utilisés pour effectuer la motilité *swimming*, MotC/D sont strictement requis pour la motilité de type *swarming*. Il est donc supposé que l'action de MotC/D produit une force plus élevée essentielle dans des conditions de plus haute viscosité (Doyle *et al.*, 2004; Toutain *et al.*, 2005). Le *swimming* et le *swarming* sont décrit à la Section 1.4.

Le moteur génère une force capable de pivoter la tige flagellaire. Cette structure traverse les deux membranes de la bactérie. La fibre flagellaire complète est creuse, ce qui permet l'exportation successive des protéines du flagelle lors de son assemblage (Bouteiller *et al.*, 2021). Dès l'extérieur de la membrane externe, la tige assemble un segment appelé « crochet ». Composé de plusieurs unités de la protéine FlgE, cette partie flexible sert d'adaptateur entre la tige et le filament de flagelline. Ce dernier est un filament de plusieurs milliers d'unité de flagelline (protéine FliC). Atteignant une longueur d'environ 10 μm , le filament de flagelline propulse la bactérie via la rotation de la tige causée par le moteur (Bouteiller *et al.*, 2021). Il existe deux types de flagelline présentés dans les différentes souches de *P. aeruginosa* : la flagelline A et la flagelline B (Spangenberg *et al.*, 1996). Chaque souche possède un seul type de flagelline à la fois. Par exemple, la souche PAK possède la flagelline A alors que PA14 code dans son génome la flagelline B (Schirm *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2006). Mise à part une séquence protéine légèrement différente entre les deux types, chaque flagelline peut être distinctivement O-glycosylée. Dans le cas de PA14, sa flagelline B reçoit un disaccharide phosphaté de 356 Da (Verma *et al.*, 2006). Cette modification est effectuée par un opéron de quatre gènes (*fgtA*-PA1088) présent entre les gènes *fliC* et *flgL*. Ces modifications post-traductionnelles semblent jouer un rôle principal dans l'immunogénicité de la flagelline (Verma *et al.*, 2005). Bien que son implication dans la motilité de *P. aeruginosa* soit négligeable selon la littérature, j'ai souligné par mes travaux de maîtrise qu'un mutant *fgtA*- incapable de glycosyler son flagelle a un défaut de motilité de type *swarming* (Arora *et al.*, 2005; Morin, 2019).

L'assemblage complet du flagelle se fait par un système de sécrétion homologue au système de sécrétion de type III (SST3) utilisé dans la virulence (Bouteiller *et al.*, 2021). Ce processus est contrôlé par quatre niveaux de régulation. Le premier niveau implique RpoD (σ^{70} , régulateur des gènes domestiques) qui active l'expression du régulateur FleQ. Ce dernier active l'expression des gènes du corps basal, des régulateurs FleN et FlhF, et du système à deux composantes FleS/FleR durant le deuxième niveau, une activation qui implique RpoN (σ^{54}). Le régulateur de réponse FleR actif et RpoN induisent l'activation des gènes impliqués dans la formation du crochet et activent aussi la transcription de FliA pendant le troisième niveau. Par la suite, FliA (σ^{28}) contrôle l'extension du filament de flagelline (Bouteiller *et al.*, 2021). Ce processus complexe permet d'assurer l'assemblage d'un flagelle polaire unique. Un mutant ayant perdu le gène *fleN* possède plusieurs flagelles polaires, alors qu'un mutant *flhF*- perd la localisation polaire de son flagelle (Dasgupta *et al.*, 2000; Murray & Kazmierczak, 2006).

1.1.1.2 Les pili de type IVa

Les pili de type IV (quatre) forment deux sous-groupes d'appendices incluant les pili de types IVa, IVb. De ceux-ci, les trois types sont présents dans plusieurs souches de *P. aeruginosa*, incluant PA14 (Burrows, 2012; Lee *et al.*, 2006). De plus, seuls les pili de type IVa sont directement associés à une motilité (le *twitching*). Par simplicité, je réfère souvent aux pili de type IVa par leur nom simplifié : pili de type IV (PT4).

Les PT4 sont de longues fibres de protéines – appelées pilines – sécrétées à partir de l'espace périplasmique pour un complexe de sécrétion homologue au système de sécrétion de type II (Burrows, 2012). Ce complexe inclue : PilC et PilQ qui servent à l'ancrage et la sécrétion de la fibre, respectivement ; la polymérase PilB qui permet l'élongation de la fibre ; les polymérases PilT et PilU qui rétractent la fibre ; plusieurs protéines accessoires dont PilF, PilM, PilN, PilO et PilP (Figure 1.3) (Burrows, 2012). La fibre elle-même est composée de la piline majeure PilA, chapeauté par plusieurs pilines mineures : PilV, PilW, PilX, PilY1 et FimU. Ces dernières initient la polymérisation de la fibre et agissent comme adhésine pour interagir avec divers substrats (Jacobsen *et al.*, 2020). La piline majeure PilA est exportée lors de sa synthèse dans l'espace périplasmique où elle s'ancre dans la membrane interne. Lors de la polymérisation de la fibre, les nouvelles unités de PilA s'ajoutent au bas de la fibre par PilB. Lors de la dépolymérisation, PilA est recyclé et retourne dans l'espace périplasmique. Les protéines PilM, PilN, PilO et PilP forment un complexe transmembranaire qui lie PilC et PilQ, en plus de guider les unités de PilA lors de la polymérisation (Figure 1.3) (Tammam *et al.*, 2013). La plateforme PilC interagit avec la polymérase PilB et la dépolymérase PilT (Takhar *et al.*, 2013). Une seconde dépolymérase – PilU – existe chez *P. aeruginosa* et d'autres espèces bactériennes, sa fonction étant dépendante de la présence de PilT (Adams *et al.*, 2019). Celle-ci semble compléter l'action de PilT en augmentant la force de rétraction. L'assemblage de PilBCTU forme un moteur ATP-dépendant capable de produire une force de plus de 100 pN (Maier *et al.*, 2002). La force cumulée de plusieurs fibres permet le déplacement de la cellule par une motilité appelée *twitching* (vu à la section 1.4).

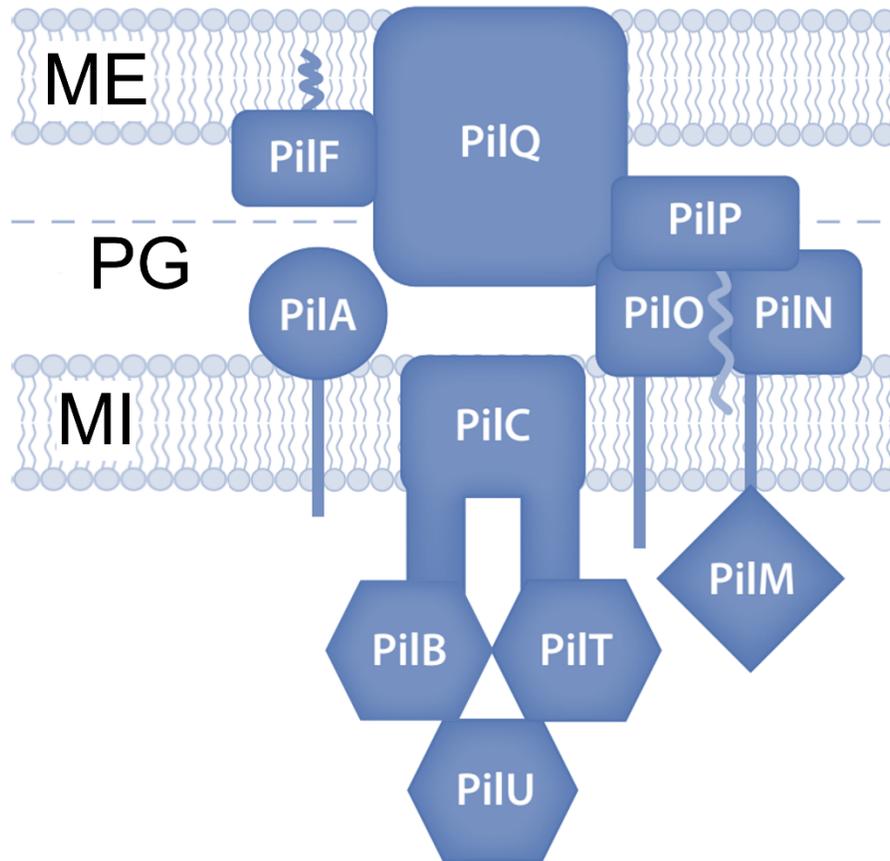


Figure 1.3 Structure schématisée du complexe de sécrétion d'un pilus de type IVa

Les protéines qui constituent l'appareil de sécrétion d'un pilus de type IVa sont présentées en 2D. La sécrétine PilQ (aidée de sa protéine accessoire PilF) forme un pore dans la membrane externe (ME) qui permet la sortie du pilus. Le moteur PilBCTU assemble et rétracte la fibre de façon ATP-dépendante. Les protéines PilMNOP servent d'ancrage pour le système. Les pilines mineures ne sont pas illustrées. PG : Peptidoglycane. MI : Membrane interne. Figure adaptée de (Burrows, 2012).

1.1.2 Les appendices non-locomoteurs

En plus des pili de type IVa et de son flagelle, *P. aeruginosa* possède des appendices supplémentaires qui servent d'ancrage.

P. aeruginosa possède deux autres types de pili de la famille des pili de type IVb (PT4b) : les PT4b et les pili de type Tad (*tight adherence pili*, ou PT4c). Dans les deux cas, ces deux appendices ne sont pas associés directement à une forme de motilité (Burrows, 2012). En fait, leur structure ne comporte pas toujours une dépolymérase active. Le PT4b est homologue au système de conjugaison dans le plasmide conjugatif R64 (Carter *et al.*, 2010). Le PT4b est encodé dans un îlot de pathogénicité appelé PAPI-I (*Pseudomonas aeruginosa Pathogenicity Island I*) (He *et al.*, 2004). Cet îlot possède toutes les caractéristiques d'un élément conjugatif et intégratif (ICE, *Integrative and Conjugative Element*) (Qiu *et al.*, 2006). L'îlot PAPI-I se transfère

d'une souche à l'autre de façon PT4b-dépendante (Carter *et al.*, 2010). Le pili Tad est beaucoup moins étudié chez *P. aeruginosa*. Incluant les gènes *tadABCDGZ-flp-rcpA*, leur fonction semble être principalement liée à un attachement (Burrows, 2012). D'autres espèces bactériennes possèdent une machinerie plus complexe pour leurs pili Tad. C'est le cas entre autres de *Caulobacter crescentus* : l'expression de son pili Tad est intimement lié à son cycle cellulaire complexe et possède une ATPase bifonctionnelle impliquée dans l'extension et la rétraction du pilus (Ellison *et al.*, 2019; Sangermani *et al.*, 2019). Il est possible que les pili Tad de *P. aeruginosa* possèdent une mécanique plus complexe qui n'a pas encore été élucidée.

P. aeruginosa possède également des fimbriae de type *chaperone-usher pathway*, ou « Cup ». Ces Cup-fimbriae obtiennent leur nom de leur mécanisme de sécrétion : possible grâce à une protéine chaperonne et une protéine *usher* (Waksman & Hultgren, 2009). La chaperonne guide les sous-unités du fimbriae de la membrane interne jusqu'à la membrane externe où a lieu l'assemblage par la protéine *usher*. Cette dernière est un pore de sécrétion et une plateforme de polymérisation qui permet d'exporter les sous-unités à l'extérieur de la cellule et les joindre ensemble pour former une fibre. Au sommet de la fibre se trouve une adhésine, servant d'ancrage à la bactérie. Il existe cinq opérons Cup distincts chez *P. aeruginosa* : *cupA* à *cupE*. Seul *cupE* est absent de la souche PA14, notons que l'opéron *cupD* est situé sur l'îlot PAPI-I (Mikkelsen *et al.*, 2009). La régulation de ces divers opérons diverge les uns des autres, mais ils sont en généralement tous contrôlés par des cascades associées au second messager di-GMPc (di-guanosine monophosphate cyclique) (Kulasekara *et al.*, 2005; Meissner *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2009). Ces fimbriae sont donc fortement associés à la vie sur une surface, spécifiquement en biofilm (Vallet *et al.*, 2001). La formation du biofilm et la régulation par le di-GMPc sont présentées aux sections 1.2.2 et 1.4.1, respectivement.

1.1.3 Les systèmes de sécrétion

En plus des systèmes de sécrétion employés pour l'assemblage de ses appendices extracellulaires, *P. aeruginosa* emploie également ces types de systèmes pour sécréter une panoplie d'effecteurs toxiques (Filloux, 2011).

1.1.3.1 Le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III (SST3) est l'appareil de sécrétion de *P. aeruginosa* le plus fortement associé à sa virulence chez l'humain (Morin *et al.*, 2021). L'appareil entier traverse les deux membranes cellulaires et livre ses effecteurs toxiques directement dans le cytoplasme des

cellules du tissu infecté. Quatre principales toxines sont sécrétées ainsi : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY – ExoS et ExoU sont toujours mutuellement exclusives au sein d'un génome (Horna & Ruiz, 2021). D'autres effecteurs sont aussi connus pour utiliser le SST3. C'est le cas de PemA et PemB, qui ont été découverts en utilisant l'apprentissage automatique (*machine learning*). La sécrétion de ces deux effecteurs a été confirmée en laboratoire (Burstein *et al.*, 2015). Cependant, ces deux effecteurs semblent être présents dans un nombre très restreint d'isolats séquencés, dont la souche PA7. Ces deux effecteurs sont possiblement retrouvés en grande partie (mais non exclusivement) chez la nouvelle espèce *Pseudomonas paraeruginosa* (Rudra *et al.*, 2022). Le rôle des effecteurs Pem dans la virulence de *P. aeruginosa* n'est pas clair, ne produisant pas d'effets cytotoxiques chez les levures ou certaines lignées cellulaires (Burstein *et al.*, 2015). PemB semble avoir été partiellement caractérisé par des techniques de biophysique et serait entre autres capables de lier les phosphoinositides chez les cellules eucaryotes (Choudhury *et al.*, 2023). En contrepartie, les quatre effecteurs principaux ont été extensivement caractérisés et leur action est bien connue. ExoU est de loin l'effecteur considéré le plus cytotoxique. Il s'agit d'une phospholipase de type A2 qui affecte la membrane de phospholipides de la cellule ciblée, menant à une mort cellulaire nécrotique (Horna & Ruiz, 2021). ExoU est présent chez PA14, encodé dans l'îlot de pathogénicité PAPI-2 (Harrison *et al.*, 2010). ExoS et ExoT sont structurellement et fonctionnellement similaires, tous les deux possèdent une double action toxique : capable d'inhiber le cytosquelette d'actine et de déclencher l'apoptose (Horna & Ruiz, 2021). ExoY possède une activité nucléotidyl cyclase et produit de grande quantité de nucléotide cyclique, perturbant ainsi plusieurs voies de régulation cellulaire (Horna & Ruiz, 2021).

L'appareil de sécrétion lui-même utilise une structure en aiguille pour transporter les effecteurs directement dans le cytoplasme des cellules visées. Il possède une structure très similaire au corps basal du flagelle (Figure 1.4) (Diepold & Wagner, 2014).

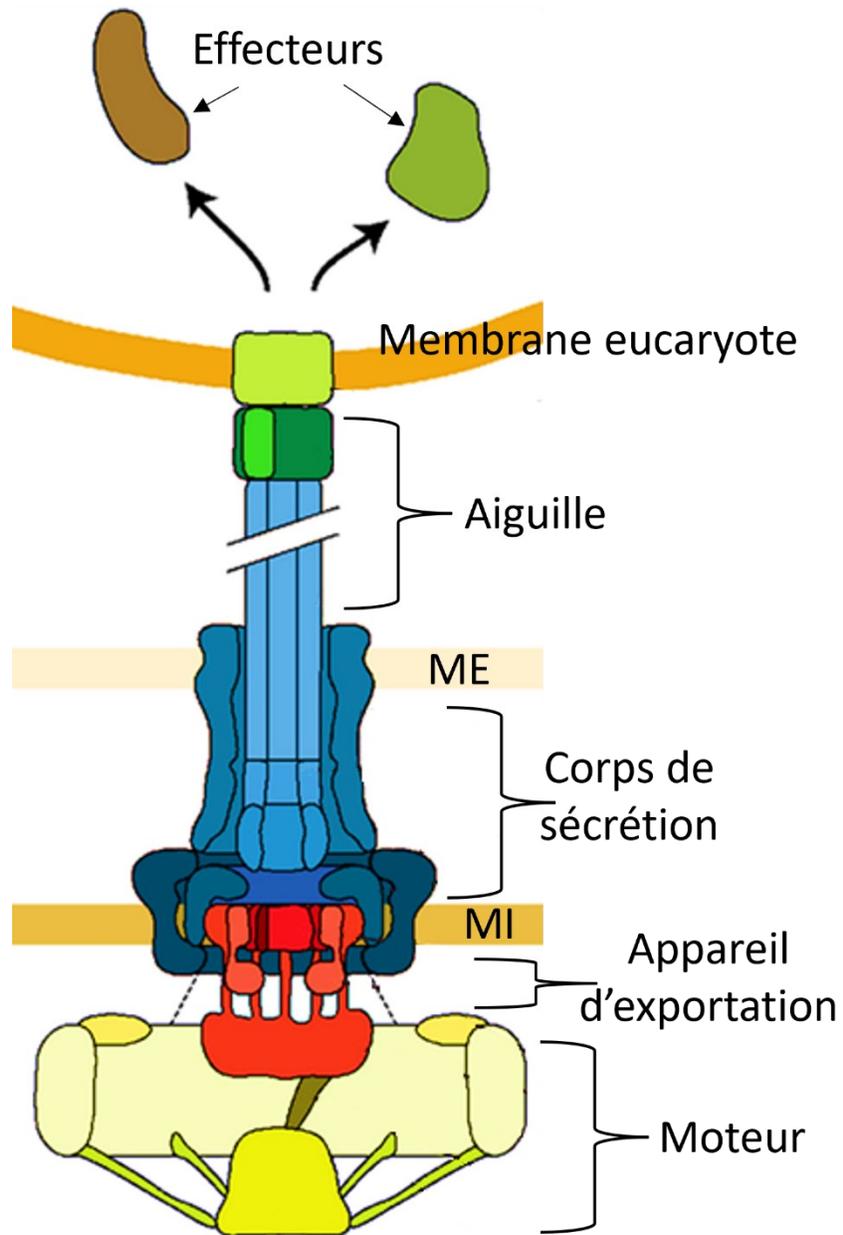


Figure 1.4 Structure de l'appareil du Système de Sécrétion de Type III (SST3)

Schématisme en deux dimensions du SST3. L'appareil utilise une aiguille (bleu pâle) pour transloquer les effecteurs toxiques directement dans le cytoplasme de cellules eucaryotes. Le SST3 implique des protéines structurales (bleues foncées), l'appareil d'exportation (en rouge) et le moteur ATP-dépendant (en jaune). Image adaptée de (Diepold & Wagner, 2014).

1.1.3.2 Le système de sécrétion de type VI

Le système de sécrétion de Type VI (SST6) est le plus complexe de ces systèmes chez *P. aeruginosa*. Il s'agit d'un appareil sécrétoire homologue à une queue contractile de phage (Cherrak *et al.*, 2019). Les effecteurs de ce système sont principalement impliqués dans la compétition interbactérienne, mais certains d'entre eux peuvent affecter les cellules eucaryotes (Sana *et al.*, 2016).

Dans le génome, les SST6 sont encodés par trois îlots génomiques appelés *Hcp-Secretion Island* : HSI-1, HSI-2 et HSI-3 (ou H#-SST6) (Sana *et al.*, 2016). Chacun de ces îlots mène à un complexe de sécrétion fonctionnel qui possède ses propres effecteurs spécifiques. Les gènes codant pour ces effecteurs ne font pas nécessairement partis des îlots, et sont souvent dispersés dans le génome. Puisque les effecteurs du SST6 sont majoritairement antibactériens, chacun encode également une protéine d'immunité à côté de son gène, en plus de certains gènes accessoires si requis (Cherrak *et al.*, 2019).

La complexité du SST6 est liée à la régulation des trois HSI et des multiples combinaisons d'effecteurs qui peuvent être sécrétés ensemble. La structure et la mécanique d'action du SST6 est en fait très simple comparé au SST3 (Cherrak *et al.*, 2019). La Figure 1.5 montre l'assemblage des différentes protéines qui composent un SST6. Un tube composé d'une protéine Hcp est entouré d'une gaine contractile (TssBC) ancrée aux membranes par un complexe protéique (formé par TssEFGJLM). Lorsque la gaine se contracte, le tube Hcp est expulsé et perce la membrane de la cellule ciblée, entraînant avec lui une série d'effecteurs spécifiques dans le cytoplasme opposé (Cherrak *et al.*, 2019). Au sommet du tube se trouve une pointe protéique composée de protéines VgrG et une protéine à motif PAAR. Les effecteurs peuvent s'introduire dans le lumen du tube Hcp, ou se fixer sur la pointe. Au total, six protéines Hcp ont été identifiées dans le génome de *P. aeruginosa*, une dizaine de VgrG et plusieurs protéines PAAR (Sana *et al.*, 2016). De plus, ces protéines de transport peuvent contenir des domaines supplémentaires qui sont toxiques. C'est le cas de Tse5 et Tse6, qui contiennent un domaine toxique et un domaine PAAR, leur permettant de former la pointe de l'aiguille et d'agir directement comme effecteurs (Quentin *et al.*, 2018). L'interaction entre les divers Hcp, VgrG, protéines PAAR et effecteurs semblent très spécifique, et dicte quelles toxines seront sécrétées par chacun des trois HSI (Cianfanelli *et al.*, 2016; Wettstadt *et al.*, 2019; Wood *et al.*, 2019). Les effecteurs qui portent à la fois une fonction structurale et une fonction toxique sont souvent nommés « effecteurs spécialisés », alors que les effecteurs toxiques strictes sont considérés « cargo ».

La complexité du SST6 est en fait liée à la grande diversité d'effecteurs qui y sont associés, spécifiques à chacun des îlots. Le H1-SST6 utilise plus de six effecteurs, généralement nommés Tse#, chacun d'eux avec une action antibactérienne et une protéine immunitaire dédiée (Sana *et al.*, 2016). Le H1-SST6 utilise Hcp1 pour livrer ses effecteurs et requiert soit Tse5/VgrG4, ou Tse6/VgrG1 pour fonctionner adéquatement (Quentin *et al.*, 2018; Whitney *et al.*, 2014).

Le H2-SST6 sécrète des effecteurs généralement nommé Tle# (Sana *et al.*, 2016). La particularité de ce système est que sa protéine Hcp dédiée Hcp2 possède trois homologues avec une séquence protéique identique dans le génome – HcpA, HcpB et HcpC. Il y a donc toutes les raisons de croire que ces quatre Hcp ont exactement la même fonction, et diverge seulement en termes de dynamique d'expression (Wood *et al.*, 2019). Deux phospholipases PldA (Tle5a) et PldB (Tle5b) sécrétées par le H2-SST6 requièrent leur protéine VgrG dédiée respective, VgrG4b et VgrG5. Cette action est possible grâce à un domaine adaptateur supplémentaire en C-terminal pour ces deux VgrG qui dicte la spécificité de l'interaction (Wettstadt *et al.*, 2019). Ces deux phospholipases ont également une activité toxique face aux cellules eucaryotes, faisant du H2-SST6 le seul système de sécrétion avec une activité qui va au-delà du règne bactérien (Sana *et al.*, 2016).

Le H3-SST6 est le moins étudié des systèmes. L'effecteur PldB a longtemps été associé au H3-SST6, bien que des données récentes montrent une association à H2-SST6 (Jiang *et al.*, 2014; Wettstadt *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2016). Une mutation inactivant ce système semble affecter l'expression d'un grand nombre d'autres toxines de *P. aeruginosa* de façon globale, incluant la pyocyanine (Li *et al.*, 2020). Cette action globale pourrait être causée par l'effecteur TseF, qui semble être impliqué dans l'importation du fer et de PQS présents dans les vésicules extracellulaires (Lin *et al.*, 2017).

Le SST6 a une fonction cruciale pour *P. aeruginosa*, notamment au niveau de sa compétitivité directe avec les autres bactéries dans son milieu et l'hôte qu'elle infecte, en plus de l'adoption de certains phénotypes. Les travaux de notre laboratoire visent depuis longtemps d'élucider l'impact que le SST6 a au niveau de la motilité de type *swarming* (sera discuté à la section 7.3.1) (Robitaille, 2020; Tremblay, 2007).

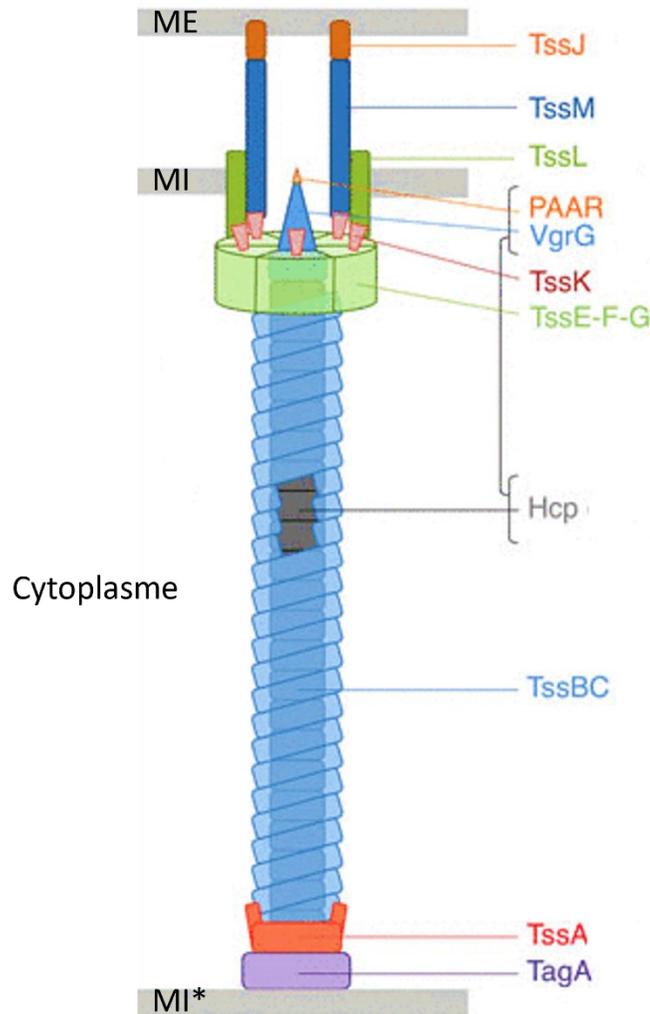


Figure 1.5 Structure du Système de Sécrétion de Type VI (SST6)

Schématisme en deux dimensions du SST6. Les protéines TssEFGJLM forment un complexe entre les membranes externe (ME) et interne (MI). La gaine contractile TssBC s'assemble sous forme décontractée autour d'une structure en aiguille composée du tube Hcp et du point VgrG-PAAR. L'aiguille et la gaine s'assemblent dans le cytoplasme jusqu'à l'atteinte de la membrane interne opposée (MI*). La gaine se contracte pour expulser l'aiguille qui contient les effecteurs spécifiques. Image adaptée de (Cherrak *et al.*, 2019).

1.1.3.3 Les autres systèmes de sécrétion

En plus des SST3 et SST6, *P. aeruginosa* possède plusieurs autres types de systèmes de sécrétion. Le système de sécrétion de type I (SST1) AprDEF sécrète la protéase alcaline AprA de façon spécifique (Filloux, 2011). Le système de sécrétion de type II (SST2) est impliqué dans l'exportation d'exoenzymes comme la protéase LasB et la lipase LipA (Filloux, 2011). Ce système fonctionne en deux étapes : le transport de l'enzyme à travers la membrane interne *via* un système de transport générique, puis l'export du périplasme vers l'espace extracellulaire par le

complexe Xcp (Filloux, 2011). Le Système de Sécrétion de Type V (SST5) utilise lui aussi un mécanisme à deux étapes et se sous-divise en deux groupes (a et b). Le SST5a regroupe des protéines autotransportrices ayant leur propre baril β pour s'exporter elles-mêmes vers l'extérieur de la cellule (Filloux, 2011). La protéine EstA est une estérase qui fait partie de cette classe de protéines sécrétées, impliquées dans divers phénotypes à cause de son potentiel lien avec la production de rhamnolipides (Wilhelm *et al.*, 2007). Le SST5b regroupe les machineries de sécrétion appelées « à deux partenaires » (Filloux, 2011). L'exotoxine ExIA est un bon exemple de cette classe de protéine, sécrétée à l'aide de son partenaire ExIB (Huber, 2022). Cette toxine est principalement retrouvée dans les isolats du groupe PA7, qui forment maintenant leur propre espèce : *Pseudomonas paraeruginosa* (Rudra *et al.*, 2022).

1.2 La régulation de *P. aeruginosa*

Pour réguler tous les outils présentés dans les sections précédentes, *P. aeruginosa* possède un large éventail de voies de régulation différentes qui indiquent à quel moment la production de ces outils est la plus opportune.

1.2.1 Les systèmes à deux composantes

Comme leur nom l'indique, les systèmes à deux composantes impliquent l'interaction entre deux partenaires : un senseur à activité kinase et un régulateur de réponse.

Les senseurs kinases sont nombreux chez *P. aeruginosa* : plus de 60 sont encodés dans son génome (Lee *et al.*, 2006; Stover *et al.*, 2000). Ceux-ci sont des senseurs à activité histidine kinase intrinsèque, chacun a donc la capacité de détecter un signal spécifique, de s'autophosphoryler suite à cette détection et ainsi recruter un effecteur appelé régulateur de réponse. Cette action se fait grâce à la présence de plusieurs sections fonctionnelles chez ces protéines (Figure 1.6) (Ishii & Eguchi, 2021).

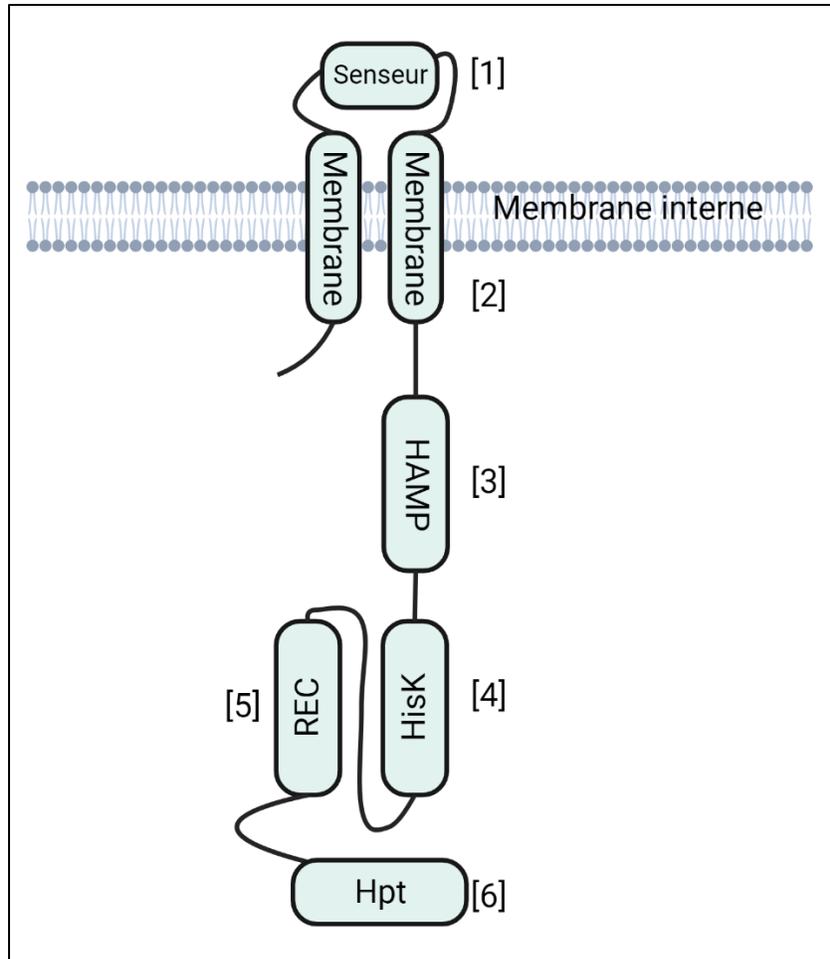


Figure 1.6 Schéma d'un senseur kinase : Exemple de GacS

Représentation en deux dimensions de la structure de GacS comportant : [1] Une région périplasmique de détection de signal; [2] Deux domaines transmembranaires ; [3] Une région de transduction de signal (Domaine HAMP) ; [4] Une section catalytique (Domaine Histidine Kinase HisK) ; [5] Une section receveuse (Domaine REC) ; [6] Une section de phosphotransfert (Domaine Histidine Phosphotransférase HPT).

- [1] Un ou plusieurs domaines senseurs extracytoplasmiques ont pour fonction de détecter un stimulus précis. Cette détection induit un changement structural qui affecte les domaines suivants, permettant l'autophosphorylation, puis la phosphorylation du régulateur de réponse.
- [2] Une section transmembranaire présente dans la majorité (80% +) des senseurs.
- [3] Une section de transduction de signal, qui inclue un arrangement de plusieurs domaines cytoplasmiques. Les domaines HAMP (retrouvés chez plusieurs protéines de régulation) servent principalement à transmettre le changement conformationnel vers les domaines catalytiques suivant. D'autres, comme les domaines PAS et GAF, peuvent intégrer des signaux chimiques et physiques additionnels dans le contrôle du senseur.

- [4] Une section catalytique qui inclut le domaine de dimérisation, le domaine kinase – contenant l'histidine ciblée par l'autophosphorylation – et un domaine ATPase.
- [5] Une section receveuse qui contient un domaine REC – homologue aux domaines receveurs des régulateurs de réponse – possédant un résidu asparagine qui peut recevoir le phosphate.
- [6] Une section phosphotransférase (HPT), qui permet le transfert du phosphate du domaine REC vers un régulateur de réponse (Ishii & Eguchi, 2021).

Les senseurs kinases sont divisés en trois groupes selon les domaines qu'ils contiennent (Mikkelsen *et al.*, 2011b). Les plus fréquents et les plus simples sont les senseurs classiques, qui ne possèdent pas de domaines REC ni HPT. Les senseurs non-orthodoxes possèdent ces domaines REC et HPT. Entre les deux se trouvent les senseurs hybrides, qui possèdent seulement un domaine REC, et ont donc besoin de protéines accessoires appelées Histidine phosphotransférase (Hpt) (Mikkelsen *et al.*, 2011b).

Les régulateurs de réponse sont les effecteurs sous le contrôle des senseurs kinases. Ils contiennent un domaine receveur REC en plus d'un domaine effecteur. Ce dernier peut être un domaine de liaison à l'ADN pour agir comme régulateur transcriptionnel, ou un domaine enzymatique pour contrôler les niveaux de seconds messagers dans le cytoplasme.

Un exemple de système à deux composantes mentionné précédemment est le couple FleS/FleR, impliqué dans l'assemblage du flagelle (Bouteiller *et al.*, 2021). FleS est un senseur classique qui ne contient pas de régions extracytoplasmiques ou transmembranaires (Zhou *et al.*, 2021). Sa séquence inclut seulement une région signal avec un domaine PAS et une région catalytique. L'activation de FleS par un signal inconnu permet à son tour d'activer FleR en le phosphorylant. Ce régulateur de réponse possède un domaine REC (réception du signal phosphate), un domaine AAA (associé à une fonction ATPase) et un domaine HTH (liaison à l'ADN) (Zhou *et al.*, 2021). Cet effecteur pourra donc lier la région promotrice de ses gènes cibles et promouvoir leur transcription.

1.2.2 Les seconds messagers

Les seconds messagers sont des signaux moléculaires cytoplasmiques qui agissent comme intermédiaires entre plusieurs partenaires pour transduire un signal. Les seconds messagers les plus connus chez les bactéries sont les nucléotides cycliques, tel l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et la di-guanosine

monophosphate cyclique (di-GMPc). Leur production se fait par des cyclases ; leur dégradation par des phosphodiesterase (Ha & O'Toole, 2015; Williams McMackin *et al.*, 2019).

L'AMPC a un rôle assez simple chez *P. aeruginosa* d'activateur de facteurs de virulence. Ceci est possible par l'action de deux adénylates cyclases nommées CyaA et CyaB, ainsi que de la phosphodiesterase CpdA (Williams McMackin *et al.*, 2019). CyaA est cytoplasmique et son mode d'action n'est pas connue jusqu'à présent. En revanche, CyaB est beaucoup plus étudiée. Elle est associée à la membrane et est activée par le complexe de détection de surface Pil-Chp. Ce dernier est un complexe multiprotéique qui s'associe avec les pili de type IV pour détecter la tension dans la fibre des pili. Cette tension est transformée en signal à travers Pil-Chp par une succession de phosphotransfert au sein de ce complexe (Figure 1.7). En premier lieu, la protéine PilJ détecte la présence des unités de piline PilA du côté périplasmique de la membrane interne (Bertrand *et al.*, 2010). Un changement de conformation de PilJ active alors le senseur histidine kinase ChpA (Bertrand *et al.*, 2010). Celle-ci est du côté cytoplasmique de la membrane interne, attachée à PilJ avec l'aide de protéines accessoires Pill et ChpC. ChpA activé s'autophosphoryle, ce phosphate se distribue le long des huit domaines phosphotransférases pour agir sur les deux régulateurs de réponse PilG et PilH (Silversmith *et al.*, 2016). C'est PilG qui active CyaB suite à l'action du complexe Pil-Chp (Fulcher *et al.*, 2010; Silversmith *et al.*, 2016). CyaB active synthétise l'AMPC, qui agit sur son récepteur dédié Vfr. Ce dernier est un régulateur transcriptionnel global qui active l'expression de plusieurs facteurs de virulence, dont le système de quorum sensing Las et le SST3.

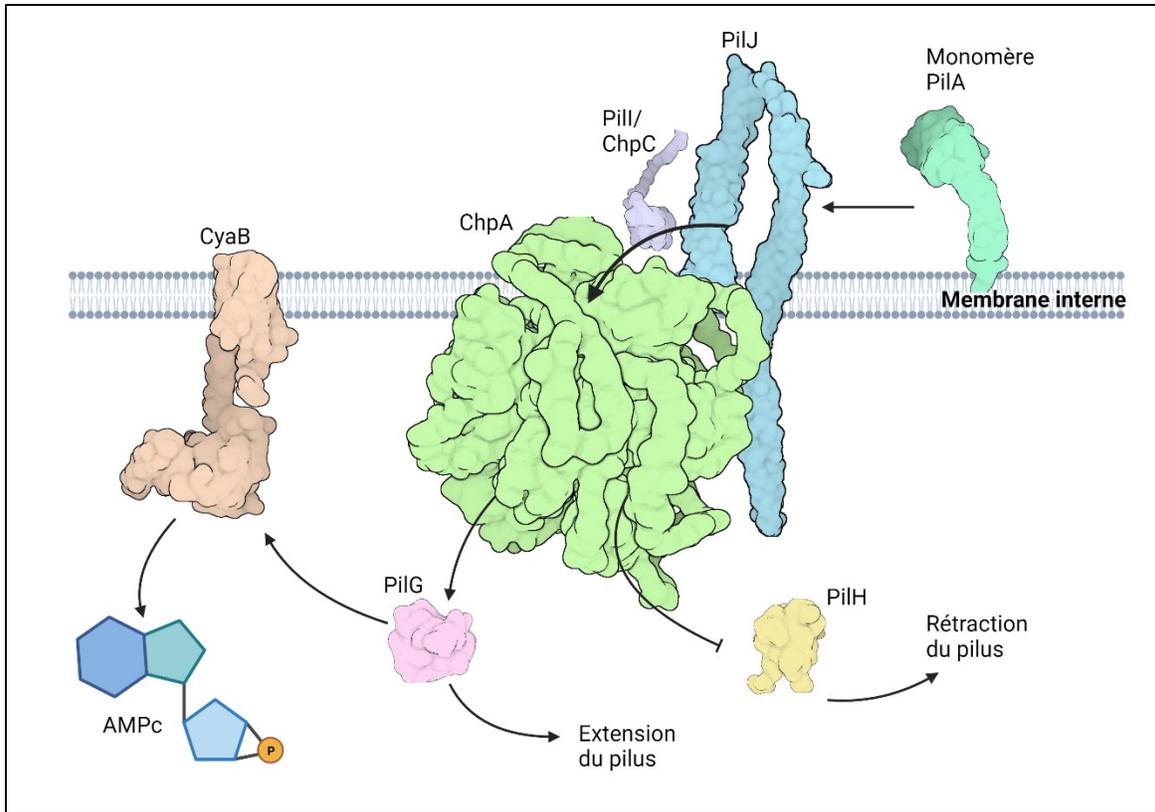


Figure 1.7 Schéma de fonctionnement du système Pil-Chp

Fonctionnement du système Pil-Chp : [1] PilJ détecte la présence de la piline PilA dans l'espace périplasmique. [2] PilJ active alors le senseur kinase ChpA avec l'aide de PilI ou ChpC. [3] ChpA actif phosphoryle le régulateur de réponse PilG. [4] PilG active à la fois la synthèse d'AMPc par CyaB et l'extension du pilus de type IV. Le schéma n'est pas à l'échelle, la forme schématique des protéines est basée sur leur structure prédite par AlphaFold. Schéma basé sur (Bertrand *et al.*, 2010). Réalisé avec BioRender.

Le di-GMPc est un second messager principalement impliqué dans la transition sessile-motile en régulant : [1] l'attachement à la surface et la synthèse de matrice exopolymérique (biofilm) ; [2] la dispersion et la motilité (Kim & Lee, 2016; Valentini & Filloux, 2016). Le génome de *P. aeruginosa* code pour un grand nombre de diguanylate cyclase, plusieurs d'entre-elles produisant le di-GMPc dans des conditions spécifiques et de façon locale ou globale. En contrepartie, un aussi grand nombre de phosphodiesterases éliminent le di-GMPc. En général, une accumulation du di-GMPc favorise un mode de vie sessile, alors qu'un niveau faible de ce second messager permet la motilité (Kim & Lee, 2016; Valentini & Filloux, 2016). Un exemple de cette régulation implique le régulateur FleQ. Ce régulateur transcriptionnel possède un domaine d'interaction impliqué dans la liaison à une molécule de di-GMPc (Hickman & Harwood, 2008). FleQ peut jouer un rôle activateur ou répresseur de ses gènes cibles dépendant de la liaison du di-GMPc. Une fois lié à ce signal FleQ active la transcription des opérons de synthèse des exopolymères Pel chez *P. aeruginosa* (Baraquet *et al.*, 2012). La diguanylate cyclase la plus connue est WspR (Figure

1.8). Elle fait partie d'un autre complexe associé à la détection de la surface : le complexe Wsp (opéron *wspABCDEFR*). WspA détecterait les distorsions de la membrane causées par un contact avec la surface (O'Neal *et al.*, 2022). Ceci active le complexe Wsp et permet la polymérisation de WspR (Huangyuthitham *et al.*, 2013). Celui-ci produit alors de grande quantité de di-GMPc qui activera une série d'effecteurs impliqués dans la formation de biofilm.

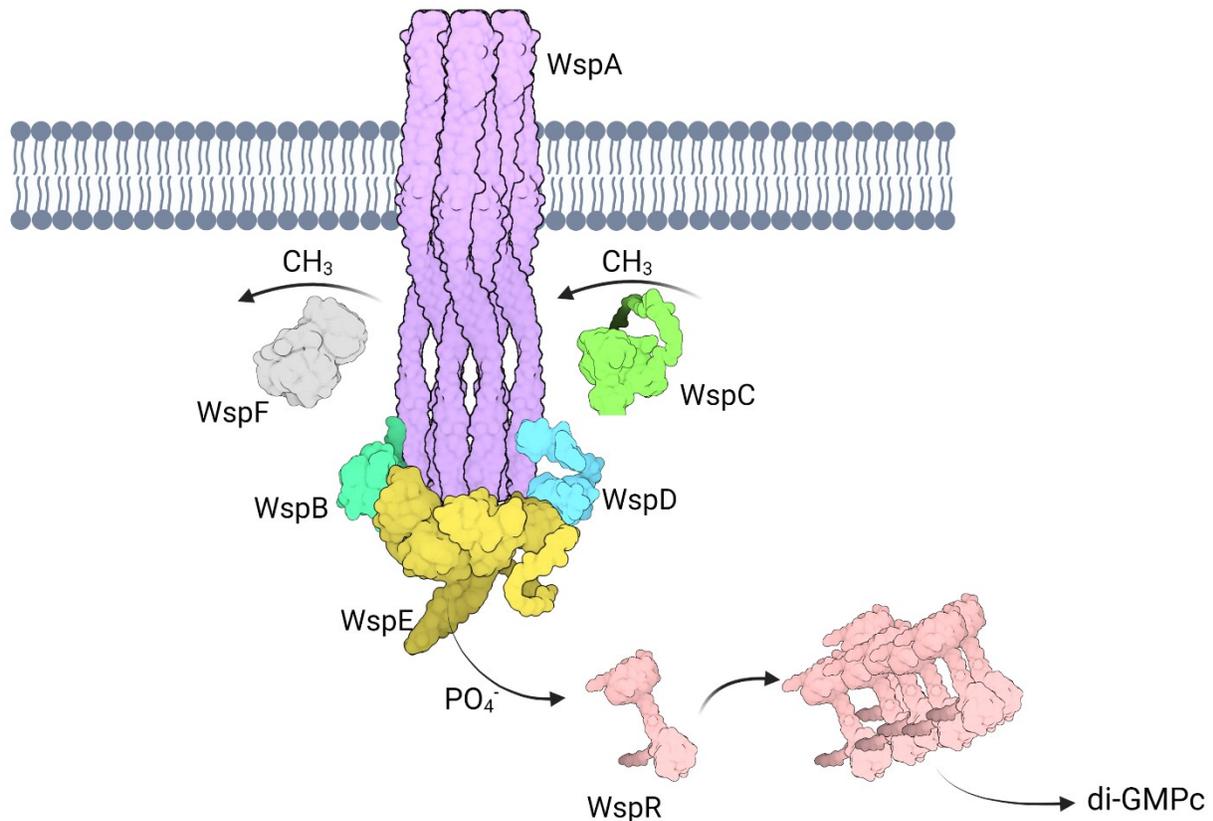


Figure 1.8 Schématisation du complexe Wsp

Représentation du complexe de détection de la surface *WspABCDEFR*. Un triple dimère de la protéine WspA (en mauve) est associée à la membrane. Suite à une perturbation de la membrane, WspA se tord et expose un site de méthylation. WspC (en vert-vert) méthyle ce site exposé, menant à l'activation de l'histidine kinase WspE (en jaune). L'enzyme WspF (en gris) peut retirer le groupement méthyle de WspA. WspE active peut alors phosphoryler WspR. Ce groupement phosphate active WspR, permet son assemblage en grappe et permet la production de di-GMPc. Les protéines WspB (verte) et WspD (bleue) servent à stabiliser le complexe. Le schéma utilise les structure protéique 3D prédites par AlphaFold, basé sur (Kessler *et al.*, 2021) et (Belas, 2014). Créé avec Biorender.

Les deux mécanismes de détection de la surface connus chez *P. aeruginosa* utilisent donc les seconds messagers pour effectuer leur contrôle. Les complexes Pil-Chp et Wsp sont donc cruciaux dans le cycle de vie de cette bactérie. Étant lié aux pili de type IV, Pil-Chp est situé aux pôles et est principalement associé à l'étape d'attachement initial. En fait, les contacts transitoires entre *P. aeruginosa* et la surface mène à une accumulation successive d'AMPc, qui est

maintenue au fil des générations et permet l'adaptation progressive de *P. aeruginosa* à la surface (Lee *et al.*, 2018). Le complexe Wsp, lui, est localisé sur les côtés de la cellule et est associé à l'étape d'attachement longitudinal irréversible (O'Connor *et al.*, 2012). L'influx de di-GMPc pourra ainsi activer la transcription d'adhésine comme les fimbriae Cup (Meissner *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2009).

1.2.3 Les petits ARN régulateurs et les ribonucléoprotéines

En plus d'effecteurs protéiques divers, *P. aeruginosa* encode dans son génome un grand nombre de petits ARN non-codants régulateurs (pARN). Ces molécules d'ARN simple brin ne se traduisent pas en protéine, elles régulent directement l'expression ou l'action d'autres processus cellulaires. Comme les protéines, la fonction et mécanisme d'action des pARN sont intimement liés à la séquence ou structure qu'ils possèdent. Deux mécanismes de contrôle existent : [1] l'hybridation directe avec d'autres acides nucléiques ; [2] l'interaction structurale avec d'autres composantes cellulaires.

Les pARN PrrF1, PrrF2 et PrrH sont transcrits à partir de deux gènes : *prfF1* et *prfF2* (Wilderman *et al.*, 2004). PrrH est constitué de la séquence des deux gènes et leur région intergénique (Oglesby-Sherrouse & Vasil, 2010). Leur séquence nucléotidique leur permet de réguler les gènes impliqués dans le métabolisme du fer (PrrF1-2) et de l'hème (PrrH). Ils régulent leurs cibles en liant l'ARNm au site de fixation du ribosome et bloquant la traduction (Reinhart *et al.*, 2015). Ces cibles incluent des protéines possédant du fer comme SodB (superoxyde dismutase) et l'opéron *pqs* (voir *quorum sensing* à la section 1.2.4) (Oglesby *et al.*, 2008; Wilderman *et al.*, 2004).

P. aeruginosa contrôle le catabolisme du carbone via une voie de régulation appelée « répression catabolique du carbone » (*carbon catabolite repression*). Cette voie utilise un système à deux composantes appelé CbrA/CbrB (Valentini *et al.*, 2014). Contrairement à *Escherichia coli* et bien d'autres bactéries, les sources de carbone préférées par *P. aeruginosa* ne sont pas des sucres comme le glucose, mais des acides dicarboxyliques comme le succinate (Rojo, 2010). En réponse aux sources de carbone préférées de *P. aeruginosa*, le senseur kinase CbrA active le régulateur de réponse CbrB, l'activateur transcriptionnel du pARN CrcZ (Abdou *et al.*, 2011). Une fois accumulé dans la cellule, CrcZ se lie à la protéine Hfq. Cette dernière est une chaperonne à ARN qui stabilise l'action de plusieurs pARN (Sonnleitner *et al.*, 2017; Sorger-Domenigg *et al.*, 2007). Hfq est aussi capable de lier l'ARNm de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme du carbone comme AmiE (amidase aliphatique) (Sonnleitner & Blasi, 2014). Le

régulon de Hfq est donc complexe et implique l'abondance de CrcZ, des pARN qui requiert Hfq pour leur action et les ARNm bloqués par Hfq (Sonnleitner *et al.*, 2017). La présence de certaines sources de carbones dans un milieu a donc un fort potentiel d'influencer le comportement de *P. aeruginosa*, surtout en considérant les régulons entrecroisés de Hfq et RsmA (voir la section 1.3.3).

1.2.4 La communication intercellulaire (*Quorum sensing*)

En plus de sa capacité à détecter divers stimuli grâce à un grand éventail de senseurs kinase, de finement moduler son mode de vie par les variations de concentration intracellulaire de seconds messagers et de contrôler virtuellement toutes ses fonctions cellulaires par une panoplie de pARN, *P. aeruginosa* considère aussi la densité de sa population pour finement moduler l'expression de plusieurs facteurs extracellulaires, en particulier des facteurs de virulence. Ce *quorum sensing* – un recensement chimique des bactéries avoisinantes – est effectué via l'entremise de systèmes de régulation autoinducteurs utilisant des signaux diffusibles. Le système de quorum sensing prototypique chez les bactéries à Gram négatif est le système LuxI/R. Un tel système utilise une synthase (de type LuxI) pour produire un autoinducteur de type acyl-homosérine lactone (Lee & Zhang, 2015). Cette molécule peut diffuser vers l'espace extracellulaire, et atteindre le cytoplasme des cellules avoisinantes. Lorsque présente dans le cytoplasme, l'acyl-homosérine lactone lie son récepteur spécifique (de type LuxR), un régulateur transcriptionnel capable de contrôler plusieurs gènes, dont *luxI*. Ceci permet d'induire une boucle de rétroactivation. Cette dernière cause l'accumulation progressive de l'autoinducteur dans la population bactérienne au fil de la croissance, activant les gènes contrôlés par les régulateurs de type LuxR lorsqu'un seuil critique du signal est atteint.

Chez *P. aeruginosa*, il existe trois systèmes de *quorum sensing* : Las (LasI et LasR) et Rhl (RhlI et RhlR), qui sont homologues à LuxI/LuxR, et le système PQS (Lee & Zhang, 2015). Au lieu d'acyl-homosérine lactones, le système PQS utilise deux autoinducteurs du type alkyl-quinoline. Ces molécules sont le HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline) et le *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS ; 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline), synthétisées par les enzymes PqsABCD, en plus de PqsH qui converti le HHQ en PQS (Lee & Zhang, 2015). Ces trois systèmes sont hautement interreliés et se régulent de façon hiérarchique (Figure 1.9). Las est le système activé le plus rapidement, et active les deux autres systèmes (Lee & Zhang, 2015) ; la protéine PqsE est requise pour l'action optimale de RhlR (Groleau *et al.*, 2020). Les effecteurs régulés par ces systèmes sont en majorité des exoproduits partagés (« biens publics ») comme des

exoprotéases, les phénazines (tel la pyocyanine) et les rhamnolipides (biosurfactants glycolipidiques) (Lee & Zhang, 2015).

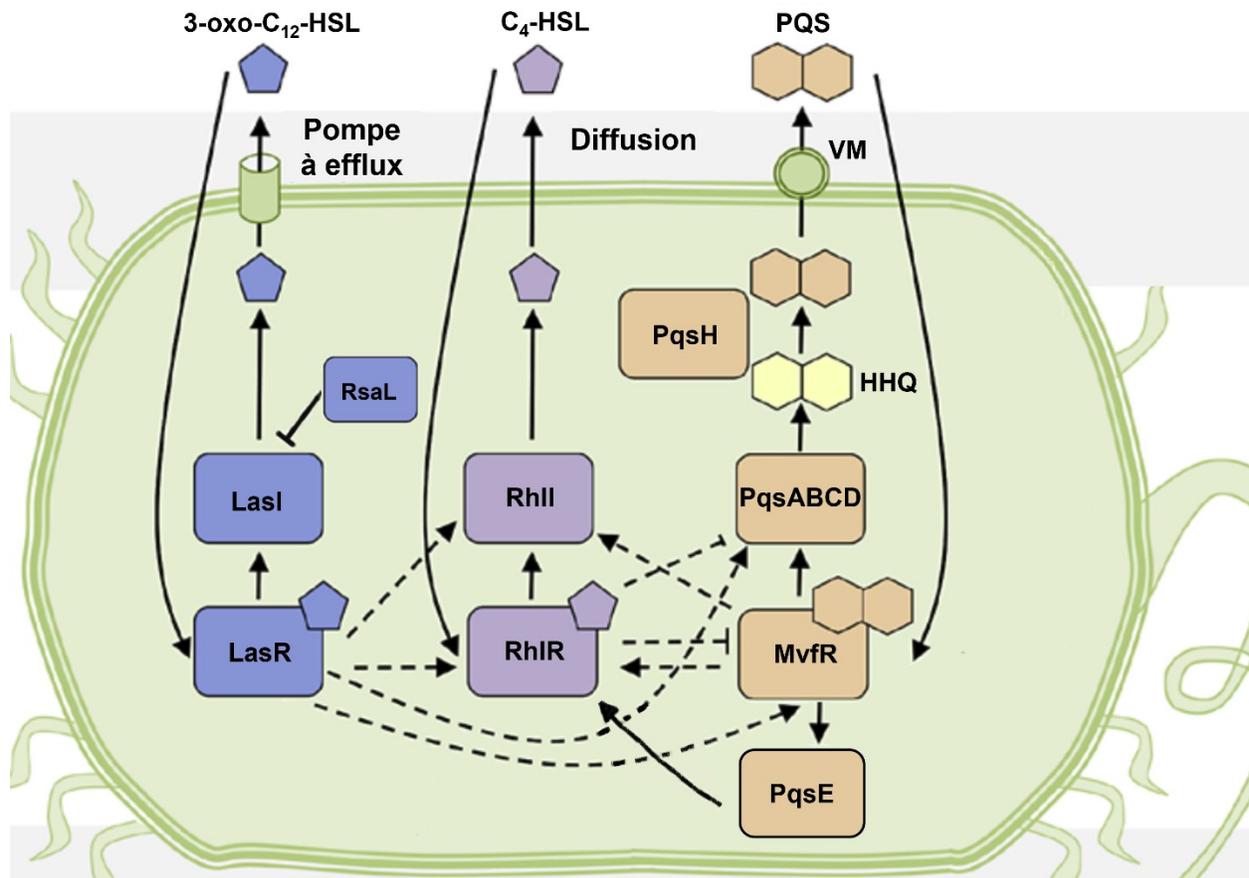


Figure 1.9 Interaction entre les trois systèmes de *quorum sensing* de *P. aeruginosa*

Représentation visuelle des trois systèmes de *quorum sensing* de *P. aeruginosa*. Les systèmes sont interreliés : LasI/LasR utilise le 3-oxo-dodécanyl-homoserine lactone comme signal et active les systèmes RhlI/RhIR et PQS. RhlI produit du butanoyl-homoserine lactone et RhIR réprime le système PQS. Ce dernier active le système Rhl via PqsE. VM : Vésicules membranaires. Adapté de (Turkina & Vikstrom, 2019).

1.3 La voie Gac/Rsm

La majorité des facteurs de virulence et autres outils de survie de *P. aeruginosa* sont régulés directement ou indirectement par une voie de contrôle appelée la voie Gac/Rsm (Francis *et al.*, 2017; Mikkelsen *et al.*, 2011b). Il s'agit d'un réseau complexe de régulation qui implique des systèmes à deux composants, des ARN non-codants, des seconds messagers et les régulateurs post-transcriptionnels globaux RsmA et RsmN.

Le rôle principal de la voie Gac/Rsm est de contrôler le métabolisme secondaire des espèces du genre *Pseudomonas* et beaucoup d'autres Gamma-proteobacteria, incluant la transition entre les modes de vie sessile et motile.

Normalement, les gènes codant pour un couple senseur kinase/ régulateur de réponse dédié sont localisés ensemble dans un génome. Ce n'est pas le cas pour GacS et GacA. Ce dernier a été découvert dans une souche de biocontrôle appartenant à l'espèce *Pseudomonas protegens* : le nom Gac veut dire « Global Antibiotics and Cyanide Control » (Laville *et al.*, 1992). GacS, quant à lui, a originalement été nommé LemA (Lesion Manifestation) lors de sa découverte chez le phytopathogène *Pseudomonas syringae* (Rich *et al.*, 1994; Willis *et al.*, 1990).

1.3.1 GacS et le réseau multikinase

Au sommet de la voie Gac/Rsm se trouve le système à deux composantes Gac. Ce système inclue le senseur kinase GacS et le régulateur de réponse GacA (Mikkelsen *et al.*, 2011b). Le senseur kinase GacS fait partie de la classe non-orthodoxe, il possède un domaine REC (receveur) et un domaine HPT (phosphotransférase) qui lui permet de transduire son signal vers son régulateur de réponse dédié. Pour former un homodimère, GacS requiert au minimum son domaine HAMP et histidine kinase ; pour interagir avec GacA, il requiert son domaine histidine kinase et REC (Workentine *et al.*, 2009). Bien que le domaine périplasmique de GacS ait été cristallisé, le signal détecté par GacS n'a toujours pas été identifié (Ali-Ahmad *et al.*, 2017). Selon plusieurs travaux depuis sa découverte, GacS serait activé par une petite molécule aliphatique diffusible, dont la sécrétion est dépendante de la densité de la population (Latour, 2020; Valverde *et al.*, 2003). Plusieurs candidats ont été testés sans succès : dont les acyl-homosérine lactones, des intermédiaires du cycle de Krebs, des cations et des sucres (Ali-Ahmad *et al.*, 2017; Latour, 2020). L'identité de ce signal nous échappe toujours.

Le contrôle de GacS est d'autant plus intéressant à cause de son interaction directe avec d'autres senseurs kinases membranaires : RetS et LadS (Figure 1.10Figure 1.11) (Mikkelsen *et al.*, 2011b).

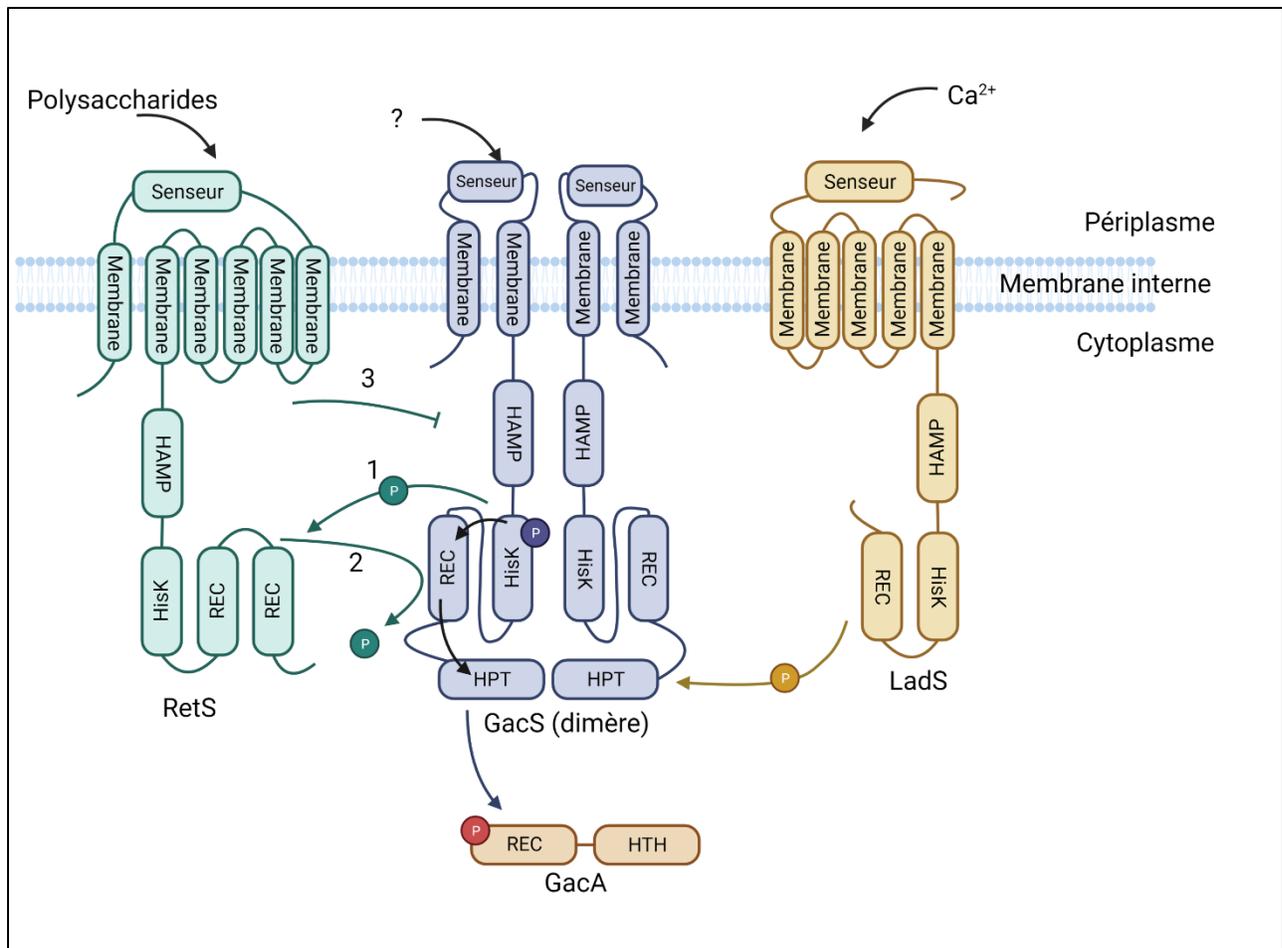


Figure 1.10 Un réseau de plusieurs senseur kinases gouverne le sommet de la voie Gac/Rsm.

Trois senseurs kinase principaux contrôlent la phosphorylation de GacA : RetS (vert), GacS (bleu) et LadS (jaune). Une fois dimérisé, GacS transfère un phosphate (P) vers GacA à partir de ses domaines cytoplasmiques. RetS inhibe l'action de GacS via trois mécanismes : [1] interrompt le phosphorelais de GacS en prenant le phosphate de son domaine Histidine kinase ; [2] déphosphoryle le domaine REC de GacS ; [3] Bloque la dimérisation de GacS. LadS active GacS en phosphorylant son domaine HPT. Domaines : Histidine kinase-Adénylyl cyclase-Méthyl binding proteins-Phosphatase (HAMP, réfère à la prévalence de ce domaine), Receveur (REC), Histidine kinase (HisK), Histidine Phosphotransférase (HPT), Helix-Turn-Helix (HTH)

RetS est un senseur hybride possédant deux domaines REC, mais pas de HPT. Le domaine périplasmique de RetS possède une structure similaire aux modules de détection de saccharides, et récemment son signal a été identifié : les unités de sucre qui recouvrent la mucine (Jing *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2021). RetS est reconnu pour jouer un rôle inhibiteur sur la transduction du signal de GacS. Cette inhibition est possible puisque RetS est capable de lier GacS (Goodman *et al.*, 2009). Récemment, trois mécanismes distincts ont été élucidés pour expliquer cette inhibition (Francis *et al.*, 2018). [1] L'histidine phosphorylée de GacS transfère son phosphate vers le 2^e domaine REC de RetS. [2] RetS agit comme phosphatase sur le domaine REC de GacS. [3] RetS bloque l'autophosphorylation de GacS. Sans son signal, il est proposé que RetS

existe sous forme dimérique, et que l'association avec son signal dissocie le dimère et permet de former l'hétérodimère avec GacS (Vincent *et al.*, 2010). De plus, RetS n'empêche pas l'homodimérisation de GacS, peut se fixer directement sur un dimère GacS-GacS et exploite le domaine ATPase retrouvé dans la région catalytique de GacS pour exercer son contrôle enzymatique (Mancl *et al.*, 2019). Bien que l'interaction entre GacS et RetS soit de mieux en mieux comprises, elle ne prend pas en compte les interactions qu'a RetS avec d'autres facteurs de régulation. En effet, RetS est également capable de lier un autre senseur kinase hybride appelé PA1611 (son *locus tag* chez la souche PAO1) (Bhagirath *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2013). De plus, la nature hybride de RetS et PA1611 leur permettent de participer à un phosphorelais avec la protéine HptB (Histidine phosphotransférase B) (Hsu *et al.*, 2008).

Tel mentionné, GacS peut aussi interagir avec un autre senseur kinase hybride appelé LadS. Ce senseur possède un domaine périplasmique capable de lier la calcium (Ca^{2+}) (Broder *et al.*, 2016). Une fois actif, LadS s'associe avec GacS et transmet son phosphate vers le domaine HPT de GacS, au lieu d'interagir avec une protéine Hpt dédiée (Chambonnier *et al.*, 2016). En fait, le domaine HPT seul de GacS est suffisant pour permettre le phosphorelais entre LadS et GacA (Chambonnier *et al.*, 2016). Dans le génome de la souche PA14, la séquence du gène *ladS* comporte une duplication de 49 nucléotides qui induit un cadre de lecture aberrant et annule l'activité de cette protéine, menant à la plus grande virulence de cette souche (Mikkelsen *et al.*, 2011a).

Le contrôle de GacS sur GacA est donc extrêmement complexe et intègre l'information chimique de plusieurs senseurs de façon dynamique. GacA reçoit un groupe phosphate sur une asparagine de son domaine REC et adopte une conformation active qui lui permet de lier l'ADN génomique de *P. aeruginosa* pour activer la transcription de certains gènes. Une fois actif, il permet la transcription de deux pARN, RsmY et RsmZ (Brencic *et al.*, 2009). Bien que cette action ait longtemps été considérée exclusive, GacA pourrait potentiellement contrôler la transcription de deux autres pARN, RsmV et RsmW (Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016). Il existe aussi des données contradictoires concernant la possibilité que GacA puisse contrôler d'autres cibles que ces pARN. D'un côté, des analyses de ChIP-on-chip ont démontrées que GacA possède seulement des sites de liaison spécifique pour les gènes *rsmY* et *rsmZ* et que son impact global sur le métabolisme secondaire agit exclusivement *via* ces pARN (Brencic *et al.*, 2009). D'un autre côté, des données plus récentes de Chip-Seq indiquent que GacA serait capable de lier et activer la région promotrice d'autres gènes, dont le sien (gène *gacA*) (Huang *et al.*, 2019). Il reste donc encore des éléments à mieux comprendre au niveau de la régulation et l'activité de GacA.

La voie Gac/Rsm tient son nom d'une part du vaste réseau de régulation qui influence le couple GacS/GacA. « Rsm » réfère aux pARN sous le contrôle du système à deux composantes. Les deux principaux pARN – et les plus étudiés – chez *P. aeruginosa* sont RsmY et RsmZ. Tel mentionné plus haut, deux autres pARN, RsmV et RsmW, ont été découverts dans la dernière décennie, mais n'ont virtuellement pas été étudiés depuis (Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016). Les pARN de la famille Rsm sont présents chez toutes les espèces de *Pseudomonas*, et plusieurs homologues Rsm peuvent être présent dans un même génome. En général, les pARN RsmX/Y/Z sont les plus fréquemment retrouvées dans un même génome chez les autres espèces du genre *Pseudomonas* (Ferreiro & Gallegos, 2021; Lapouge *et al.*, 2008). La redondance des pARN s'explique par l'existence de voie de régulation alternatives qui peuvent influencer leur transcription ou leur stabilité indépendamment de GacA. Le pARN RsmY peut interagir avec Hfq pour augmenter sa stabilité et se protéger contre la dégradation par la ribonucléase E (Sorger-Domenigg *et al.*, 2007). De plus, la transcription de RsmY est réprimée, au moins dans certaines souches de *P. aeruginosa*, par une cascade de régulation HptB-dépendante impliquant HsbR et HsbA (Bordi *et al.*, 2010). L'expression de RsmZ est réprimée par HptB de façon surface-dépendante chez la souche PA14 (Jean-Pierre *et al.*, 2016). De plus, la stabilité de RsmZ est contrôlée par une ribonucléase spécifique nommée CafA (Petrova & Sauer, 2010). L'équipe qui a identifiée RsmV souligne dans leurs travaux que l'expression de ce pARN ne semble pas contrôlée par GacA (Janssen *et al.*, 2018a). RsmW semble être réprimé par GacA et RhlR, de façon indirecte (Miller *et al.*, 2016). La dynamique d'expression différente entre les pARN Rsm est le facteur clé qui permet de finement réguler la régulation de la voie Gac/Rsm, et l'action de ces pARN se fait sur les régulateurs globaux du métabolisme secondaire : RsmA et RsmN (Ferreiro & Gallegos, 2021).

1.3.2 Au cœur de la voie : les protéines Rsm

La famille des protéine Rsm est présente chez un grand nombre de gamma-proteobacteria, appelée Csr chez certaines espèces comme *Escherichia coli* (Sobrero & Valverde, 2020). Les membres de la famille Rsm sont de petites protéines capables de lier les structures en tige-boucle présentes sur les ARN. Ces tige-boucles doivent posséder la séquence consensus ANGGA au sommet de la tige pour permettre la liaison d'une protéine Rsm. Chez *P. aeruginosa*, il existe deux membres de cette famille : RsmA et RsmN (Chihara *et al.*, 2021). Chez le genre *Pseudomonas* en entier, il existe neuf membres de cette famille (Sobrero & Valverde, 2020). Quatre de ces groupes sont bien connus (RsmA, RsmE, RsmI et RsmN) alors que les cinq autres sont prédits par des analyses de séquence et prédictions de structure (RsmC, RsmD, RsmH,

RsmL et RsmM). Plus de 90 % des espèces du genre *Pseudomonas* possède au moins deux paralogues Rsm, RsmA plus un autre membre de la famille (Sobrero & Valverde, 2020). Il est important de noter qu'un possible homologue de RsmA et RsmN chez *P. aeruginosa* – codé par le gène PA4570, juste à côté de RsmW – n'a pas été détecté dans les analyses d'orthologues qui ont définis les 9 familles de protéine Rsm (Miller *et al.*, 2016; Sobrero & Valverde, 2020).

Leur fonction est principalement associée à la répression de la traduction d'ARNm cibles, principalement en bloquant la séquence de fixation du ribosome, lorsqu'une tige-boucle y est présente. La séquence consensus des protéines Rsm – ANGGA – concorde bien avec les séquences riches en A/G des sites de fixation du ribosome (Ma *et al.*, 2002). Les pARN Rsm agissent comme « appât » en présentant plusieurs tige-boucle ANGGA dans leur structure. Ceux-ci servent alors à titrer RsmA et libérer les transcrits qui sont réprimés. Le but de la voie Gac/Rsm est de contrôler la disponibilité de RsmA et lorsque les conditions sont adéquates, permettre la traduction des ARNm impliqués dans la sécrétion de métabolites secondaires et l'établissement d'un mode de vie sessile (Valentini *et al.*, 2018). En plus d'avoir des cinétiques d'expression différentes entre eux, les pARN Rsm ont des séquences – donc un nombre de site GGA – distinctes ; RsmV-W-Y-Z ont respectivement 6-7-7-7 site GGA, mais ceux-ci ne sont pas toujours présents au sommet d'une tige-boucle (Janssen *et al.*, 2018a; Janssen *et al.*, 2018b; Miller *et al.*, 2016). De plus, l'affinité d'un site change selon le contexte de la séquence adjacente (Janssen *et al.*, 2018b).

1.3.3 L'impact de la voie

La voie Gac/Rsm est extrêmement complexe, et cette complexité est intimement corrélée à l'impact qu'elle peut avoir sur le cycle cellulaire de *P. aeruginosa* (Francis *et al.*, 2017; Mikkelsen *et al.*, 2011b). RsmA régulerait plus de 500 gènes de façon directe ou indirecte (Brencic & Lory, 2009). RsmA réprime directement la traduction de transcrits associés à la production de cyanure d'hydrogène, les phénazines, au SST6 et à la synthèse des exopolymères Pel et Psl ; permet l'activation indirecte de ceux associés à SST3, pili de type IV, rhamnolipides et flagelle (Brencic & Lory, 2009; Burrowes *et al.*, 2006; Heurlier *et al.*, 2004). Ces cibles ont récemment été mise en lumière dans plusieurs études employant des variations de la méthode CHIP-seq (Chihara *et al.*, 2021; Gebhardt *et al.*, 2020; Gerovac *et al.*, 2021). En utilisant un inhibiteur de la transcription (rifampicine), l'équipe de Gerhardt et ses collègues (2020) ont démontré que RsmA lie ses cibles durant le processus actif de la transcription de l'ARNm. Parmi les cibles qu'ils ont identifiées sont retrouvés EstA, AmrZ (activateur transcriptionnel du SST6), les gènes du SST6 eux-mêmes. Ils

ont également démontré que plusieurs des cibles de RsmA sont liées par Hfq (Gebhardt *et al.*, 2020). Une autre étude publiée par Chihara et ses collègues (2021) utilise une approche de ChIP-seq avec des liaisons *crosslinking* pour mettre en évidence les différences de cibles entre RsmA et RsmN. Ils ont pu préciser la séquence consensus de chacune : CAUGGANN et CANGGANG pour RsmA et RsmN, respectivement. De plus, leurs données mettent en lumière la liaison de RsmA et RsmN à plusieurs autres pARN, dont SPA0079 (impliqué dans la régulation du *quorum sensing*) qui a été confirmé. Cependant, la liaison de SPA0079 avec RsmA ne semble pas pouvoir compétitionner avec RsmY/Z ou ses transcrits cibles (Chihara *et al.*, 2021). Une troisième étude par Gerovac et ses collègues (2021) utilisent une approche de Grad-Seq pour extraire toutes les composantes cellulaires et les séparent par ultracentrifugation. Ils ont donc été en mesure de séparer les complexes ARN-protéine selon leur coefficient de précipitation, en distinguant entre les ribosomes, l'ARN polymérase et les ribonucléoprotéines (Gerovac *et al.*, 2021). L'équipe a démontré que RsmA et RsmN précipitent principalement dans la fraction des ribonucléoprotéines avec les quatre pARN Rsm, mais est présente également dans la fraction associée au ribosome (Gerovac *et al.*, 2021). RsmA peut aussi réguler un grand nombre de cibles clés avec l'aide de la chaperonne à ARN Hfq. Ces cibles incluent Vfr (le régulateur global de plusieurs gènes de virulence) (Irie *et al.*, 2019).

1.3.4 L'homéostasie de la voie

Un fait important qui a été relevé au cours de la dernière décennie concerne l'autorégulation complexe de la voie Gac/Rsm, principalement via RsmA et RsmN. Il a été démontré par des travaux de notre laboratoire que RsmA est capable d'inhiber la traduction de son propre transcrit (Jean-Pierre *et al.*, 2015). RsmA et RsmN peuvent aussi cibler et bloquer la traduction des autres protéines impliquées dans la voie Gac/Rsm. C'est le cas de HptB et CafA, qui ont tous les deux un impact sur la présence de pARN RsmY et RsmZ (Figure 1.11) (Bordi *et al.*, 2010; Chihara *et al.*, 2021; Jean-Pierre *et al.*, 2016; Petrova & Sauer, 2010). La capacité de RsmA à inhiber la traduction de RetS explique comment un mutant sans RsmA peut difficilement produire ses propres pARN RsmY et RsmZ (Corley *et al.*, 2022). Un mutant *rsmA*- a donc un RetS plus actif, et par conséquent une voie Gac/Rsm réprimée (Corley *et al.*, 2022). D'autres cibles relevées par des données de ChIP-seq incluent les trois senseurs kinase GacS, LadS et SagS (Chihara *et al.*, 2021). Ce dernier interagit avec la voie Gac/Rsm via HptB (Hsu *et al.*, 2008). Ce vaste réseau d'autorégulation permet de maintenir l'homéostasie de la voie et empêche des situations où RsmA est tellement présent en grande quantité dans la cellule que son activité de répression ne peut plus être surmontée (Figure 1.11).

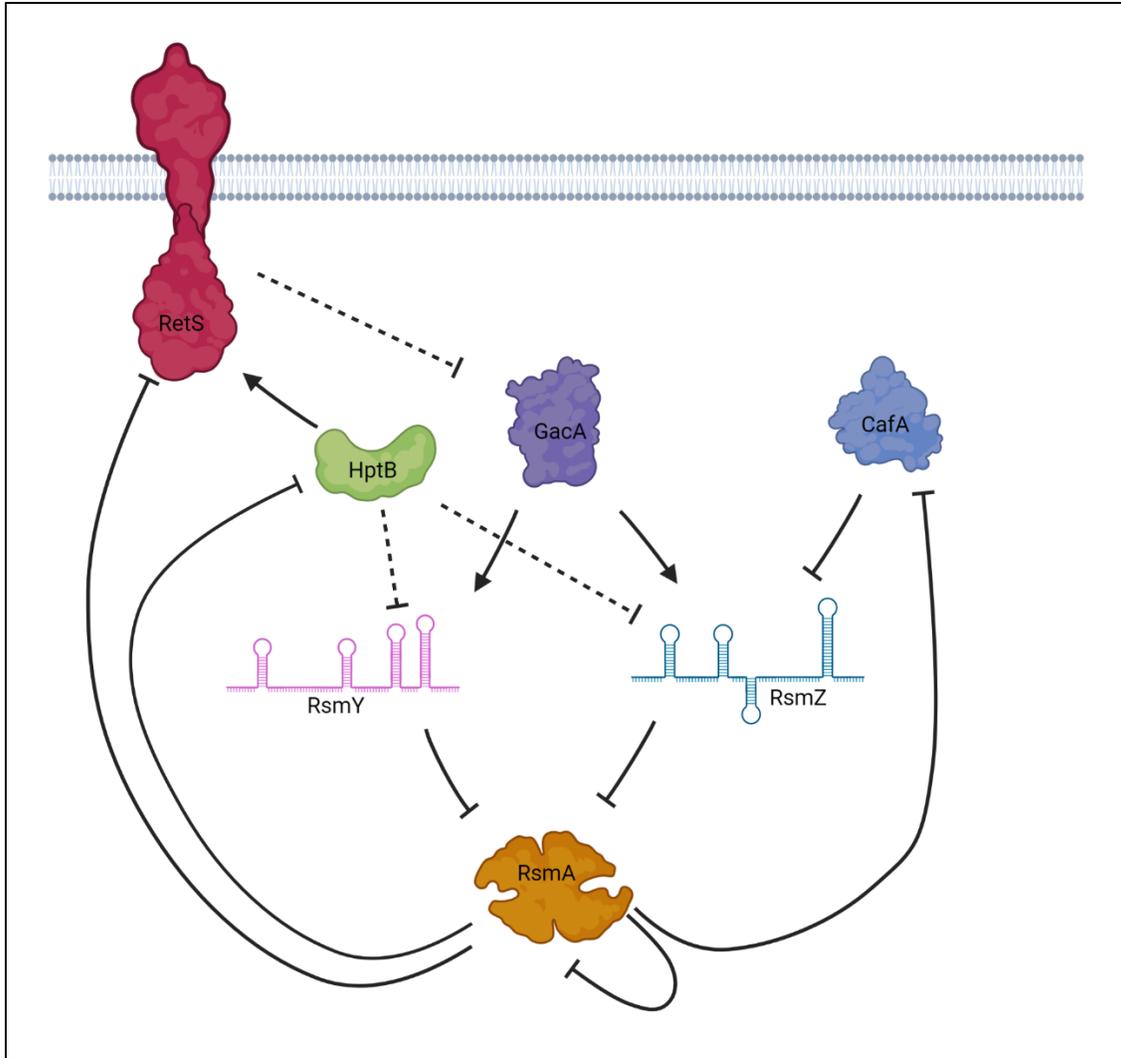


Figure 1.11 Schéma de l'inter-régulation des membres de la voie Gac/Rsm

Les régulateurs impliqués dans la voie Gac/Rsm interagissent entre eux. Un trait plein présente une interaction directe, un trait pointillé une interaction indirecte. Une flèche pointue montre une action positive, une flèche plate une action négative. Couche de phospholipides : membrane interne.

La dernière décennie a également mis en lumière les interactions complexes entre Rsm et Hfq. Pour rappel, Hfq est une chaperonne à ARN essentielle pour la fonction de plusieurs pARN, dont ceux de la famille Prr (homéostasie du fer, voir section 1.2.3) (Reinhart *et al.*, 2015). Hfq est aussi impliqué dans le contrôle de la voie CCR (contrôle du catabolisme du carbone) en interagissant avec le pARN CrcZ, permettant la traduction d'enzymes importantes dans l'utilisation de sources de carbone diverses lorsque les sources de carbone préférées de *P. aeruginosa* sont absentes du milieu (Sonnleitner & Blasi, 2014; Valentini *et al.*, 2014). Cette chaperonne à ARN est très en demande dans la cellule et certaines voies de régulation entrent en compétition pour l'utiliser (Sonnleitner *et al.*, 2017). RsmA et Hfq corégulent certains ARNm cibles, et RsmY requiert Hfq

pour rester stable et agir sur RsmA (Gebhardt *et al.*, 2020; Irie *et al.*, 2019; Sorger-Domenigg *et al.*, 2007). Il y a donc une dynamique intéressante en jeu entre les régulateurs de Hfq et de RsmA qui influence le contrôle des deux voies. Il est fort probable que Hfq offre le *feedback* du métabolisme primaire sur la voie Gac/Rsm qui a longtemps été observé (Latour, 2020).

La voie Gac/Rsm régule la transition motile-sessile, une régulation qui est également effectuée par les cascades du second messager di-GMPc. Ces deux voies sont majoritairement parallèles et complémentaires, mais interagissent entre elles de quelques façons. RetS peut influencer l'action de la diguanylate cyclase WspR, et ainsi influencer la balance motile-sessile de manière dépendante à la di-GMPc (Moscoso *et al.*, 2011). La voie Gac/Rsm influence la concentration de di-GMPc dans la cellule, et influence la production de sidérophores via le régulateur PvdS de façon di-GMPc-dépendante (Frangipani *et al.*, 2014). RsmA réprime également la diguanylate cyclase SadC (Moscoso *et al.*, 2014). Les diguanylates cyclases SiaA et SiaD influencent l'activation de la transcription de RsmY et RsmZ de façon di-GMPc-dépendante (Colley *et al.*, 2016). Ensemble, la voie Gac/Rsm et le second messager di-GMPc régulent de façon précise le cycle cellulaire de *P. aeruginosa* par le contrôle de la motilité, l'attachement, la formation de biofilm et la dispersion (Francis *et al.*, 2017).

1.4 Les comportements de *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie capable de coordonner son mode de vie avec les autres membres de sa population pour adopter des comportements sociaux comme la formation de biofilm et la motilité de type *swarming*. Tel mentionné auparavant, le choix entre un mode de vie sessile (biofilm) et un mode de vie motile (motilités de type *swimming*, ou *swarming*) est grandement régulé par la voie Gac/Rsm et la concentration intracellulaire de di-GMPc.

1.4.1 Le mode de vie sessile

L'adoption d'un mode de vie sessile et la formation de biofilm ont été extensivement étudiées. Ce cycle de vie comporte six stades : [1] La vie planctonique unicellulaire ; [2] L'attachement initial réversible ; [3] L'attachement longitudinal irréversible ; [4] l'initiation de la production de la matrice du biofilm ; [5] la maturation du biofilm [6] le détachement et le retour à l'état planctonique (Figure 1.12) (Lee & Yoon, 2017).

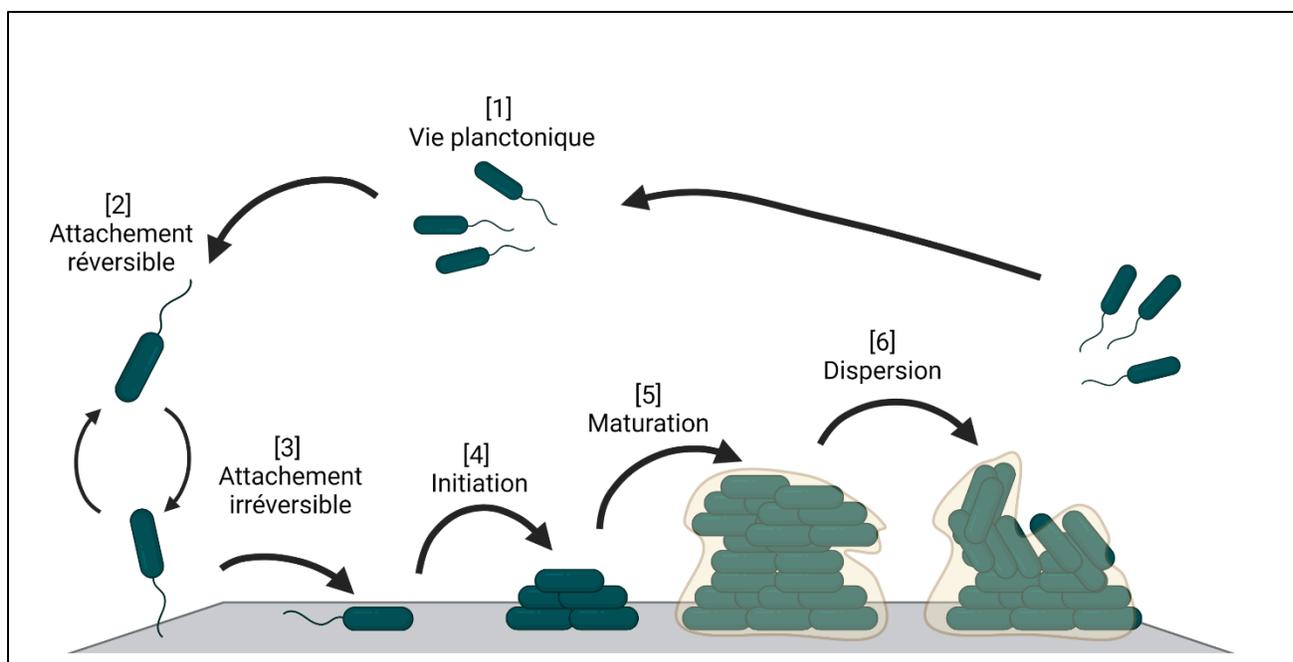


Figure 1.12 Cycle de développement du biofilm

Le schéma montre les étapes de développement d'un biofilm bactérien. Basé sur la figure de (Toyofuku *et al.*, 2016). Réalisé avec BioRender.

[1] La vie planctonique libre dans un milieu liquide est associée à un taux faible de di-GMPc dans la cellule et la présence d'un flagelle polaire qui permet à *P. aeruginosa* de se déplacer dans son milieu. Ceci représente la motilité appelé *swimming* qui sera présentée dans une section suivante (Section 1.4.2).

[2] Les premier contacts avec la surface sont effectués par les pôles de la cellule et impliquent l'interaction entre la surface, les pili de type IV (PT4) et le flagelle. Ces interactions transitoires mènent à la production de plusieurs « vagues » d'AMPc et di-GMPc par les PT4 (via Pil-Chp) et le flagelle (via les stators) (Lee *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2020). L'accumulation progressive de ces signaux permet l'acclimatation à la surface (Lee *et al.*, 2018). Les bactéries peuvent également se déplacer sur la surface suite à ce premier contact grâce à la motilité de type *twitching* vertical (*walking*) (Conrad *et al.*, 2011).

[3] L'adaptation à la surface va augmenter la production d'appendices d'attachement comme les PT4 et les fimbriae Cup (Colley *et al.*, 2016; Persat *et al.*, 2015). Lorsque cette liaison à la surface devient suffisamment solide, *P. aeruginosa* bascule sur son côté longitudinal et s'attache solidement et de façon irréversible à son substrat (Ha & O'Toole, 2015). La balance entre le AMPc et le di-GMPc semble cruciale pour contrôler cette transition, demandant plus de di-GMPc que d'AMPc (Ono *et al.*, 2014). À cette étape, *P. aeruginosa* peut aussi se déplacer par *twitching*

horizontal (*crawling*) et possiblement par *swarming* lorsque les conditions le permettent (Conrad *et al.*, 2011). Le contact longitudinal avec la surface augmente la production de di-GMPc par le complexe Wsp (Belas, 2014; O'Connor *et al.*, 2012).

[4] Une fois fortement ancrée à la surface, *P. aeruginosa* commence à sécréter sa matrice exopolymérique. Cette bactérie possède trois opérons de synthèse des exopolymères (EPS, *extracellular polymeric substances*) impliqués dans la formation de son biofilm : produisant le Pel, le Psl (absent chez PA14) et l'alginate (Lee & Yoon, 2017). La production d'ADN extracellulaire contribue aussi à la structure de cette matrice. À cette étape, les niveaux de AMPc sont bas et ceux de di-GMPc sont élevés. FleQ détecte le di-GMPc, bloquant la synthèse du flagelle et activant la transcription de l'opéron *pel* (Baraquet *et al.*, 2012; Hickman & Harwood, 2008). De plus, les niveaux de RsmY et RsmZ sont élevés. Ceux-ci bloquent RsmA, permettant la traduction des enzymes responsables de la production de Psl (Irie *et al.*, 2010).

[5] Durant la maturation du biofilm, l'organisation de la population prend forme en évoluant de microcolonies à macrocolonies (Ha & O'Toole, 2015). La distinction morphologique principale entre les deux formes de colonies est au niveau de la taille et l'organisation tri-dimensionnelle. Au niveau physiologique, les niveaux élevés de di-GMPc se maintiennent, la production d'EPS se poursuit. L'adhésine CdrA est produite et favorise une liaison rigide entre *P. aeruginosa* et sa matrice (Borlee *et al.*, 2010; Ha & O'Toole, 2015). Deux lectines, LecA et LecB, ont une fonction d'adhésion similaire en favorisant l'association entre les polysaccharides de la matrice et d'autres glycanes dans l'environnement immédiat du biofilm de *P. aeruginosa* (Fazli *et al.*, 2014; Imberty *et al.*, 2004).

[6] En réponse à certains signaux, *P. aeruginosa* peut enclencher sa dispersion du biofilm. Ce processus utilise plusieurs voies impliquant des phosphodiésterases spécifiques qui réduisent la concentration de di-GMPc cellulaire pour se convertir en un mode de vie motile (Ha & O'Toole, 2015). Deux exemples de signaux externes sont l'oxyde nitrique et le glutamate. L'oxyde nitrique active les phosphodiésterases MucR et NbdA, alors que le glutamate semble utiliser MucR, DipA et RbdA (An *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2012). Les bactéries qui se dispersent retournent à l'état planctonique (Lee & Yoon, 2017).

1.4.2 Les types de motilité

P. aeruginosa colonise son milieu en utilisant plusieurs mécanismes de déplacement. Ces mécanismes ont originalement été décrits par Jorgen Henrichsen, il y a 50 ans. L'observation de l'étalement des colonies bactériennes – en plus de leur déplacement unicellulaire à l'échelle

microscopique – a permis de créer des classes de motilité qui sont encore utilisés de nos jours (Henrichsen, 1972).

1.4.2.1 La motilité de type *swimming*

Le *swimming* est un déplacement unicellulaire flagelle-dépendant qui est utilisé dans les milieux liquides. Cette motilité utilise la rotation du flagelle polaire comme hélice de propulsion pour se déplacer, appliquant un biais aléatoire (la « marche aléatoire ») selon des gradients chimio-attractant ou chimio-répulsif environnant. Puisque *P. aeruginosa* est monoflagellé, son mécanisme de marche aléatoire n'est pas le classique « *Run and Tumble* » utilisé par *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*. En fait, le terme employé pour décrire la marche aléatoire est « *Run-Reverse-Turn* (ou *Pause*) » (Avance-Recule-Tourne/Pause) (Cai *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2013). Pour avancer, *P. aeruginosa* tourne son flagelle dans le sens anti-horaire ; elle peut reculer en tournant son flagelle dans le sens horaire. L'avancement vers le haut d'un gradient est alors possible en augmentant le temps de marche, peu importe la direction. *P. aeruginosa* peut donc reculer vers un nutriment ou autre signal attractif (Cai *et al.*, 2016). L'orientation de la marche semble contrôlée par deux mécanismes : en effectuant des pauses entre les changements de direction ou en enroulant le flagelle autour de sa cellule (Figure 1.13) (Qian *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2022). Ce *wrap* (ou *flick*) est possible grâce à une flexion du crochet flagellaire (Tian *et al.*, 2022).

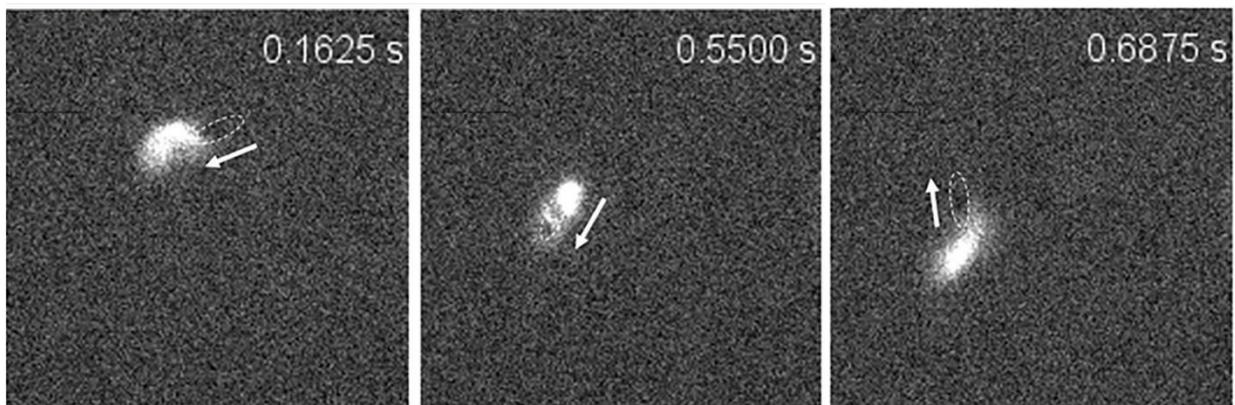


Figure 1.13 Le flagelle s'enroule autour de *Pseudomonas aeruginosa* pour faciliter le changement d'orientation.

L'image présente une cellule de *P. aeruginosa* à travers trois intervalles de temps (temps en haut à droite, pour chaque panneau). Le flagelle avec une flagelline modifiée (T394C) permettant la coloration avec un fluorophore. Le cercle pointillé montre le contour de la cellule. La flèche montre la direction du *swimming*. Image adaptée des travaux de Tian et ses collègues (2022). Référence : Figure 1 (Tian *et al.*, 2022).

1.4.2.2 Les motilités de type *twitching*, *sliding* et *surfing*

Le *twitching* est une motilité qui dépend des pili de type IV (PT4). Ce mouvement utilise les PT4 comme un harpon, qui s'ancre à une surface et tire la cellule vers le point d'ancrage (Burrows, 2012). Tel que mentionné, le *twitching* peut être effectué en position verticale (*walking*, à l'interface entre un liquide et un solide) ou à l'horizontale (*crawling*) (Conrad *et al.*, 2011).

Le *sliding* et le *surfing* sont deux motilités considérées « passives » puisqu'elles n'utilisent pas d'appendices locomoteurs pour promouvoir le déplacement (c'est-à-dire sans flagelle ni pili de type IV). Ces deux motilités utilisent des forces osmotiques (généralement associées au *sliding*) et tensio-actives (associées au *surfing*) pour permettre à une colonie de s'étendre en glissant (Angelini *et al.*, 2009; Hennes *et al.*, 2017a). Il existe une controverse à savoir si ces deux motilités doivent être considérées la même – les deux sont passives et requièrent un agent tensioactif (Hennes *et al.*, 2017b; Kovacs *et al.*, 2017). Certains éléments amènent à considérer qu'elles sont distinctes. Les travaux de Ma et ses collègues (2021) présentent la formation de larges gouttelettes de bactéries sur gélose capables de se déplacer en suivant les gradients de surfactant présents dans le milieu (Ma *et al.*, 2021). Selon moi, ceci correspond à un meilleur exemple de *surfing* chez *P. aeruginosa*. Le terme *surfing* a aussi été utilisé pour décrire une motilité flagelle-dépendante et surfactant-indépendante (Sun *et al.*, 2018; Yeung *et al.*, 2012). L'utilisation par Sun et Yeung *et al.* du terme *surfing* n'est pas compatible avec la définition du *surfing* et *sliding* – considérées des motilités passives – principalement à cause de la nécessité d'exprimer le flagelle pour obtenir leur phénotype.

1.5 La motilité de type *swarming*

Le *swarming* possède deux définitions dans le monde bactérien (Henrichsen, 1972). Le *swarming* au sens large décrit l'étalement général d'une colonie unique en croissance sur une gélose, sans discrimination quant aux mécanismes de déplacement utilisé. En contrepartie, le *swarming* au sens strict décrit une motilité flagellaire sociale effectuée sur une surface qui permet à une colonie entière de coloniser une surface, bien souvent une gélose (Henrichsen, 1972; Kearns, 2010). Le terme *swarming* utilisé dans le cadre de cette thèse réfère à la définition stricte.

Plusieurs espèces bactériennes sont d'excellentes *swarmer*, c'est le cas de *Proteus mirabilis* (Harshey & Partridge, 2015). Celle-ci va se différencier en *swarmer* par l'élongation de sa cellule et la production d'un plus grand nombre de flagelles, leur permettant de se déplacer sur des gels plus fermes (concentration allant jusqu'à 1,5% d'agar). *Pseudomonas aeruginosa* est considéré

un *swarmer* tempéré, capable de se déplacer sur des géloses semi-solides 0,5% à 0,7% d'agar (Tremblay & Déziel, 2008).

1.5.1 Les besoins du *swarming*

Pour effectuer sa motilité de type *swarming*, *P. aeruginosa* a besoin d'exprimer une série de facteurs. En général, deux éléments sont requis : la production d'un agent mouillant (surfactant) et la présence d'un flagelle fonctionnel (Kearns, 2010).

La structure et les fonctions du flagelle sont présentées aux sections 1.1.1.1 et 1.4.2.1, respectivement. Dans le contexte du *swarming*, le flagelle sert de propulseur pour regrouper les bactéries ensemble, les aligner dans la même direction et donner la force motrice à la population par entraînement (Anda *et al.*, 2023). Puisque le stator MotCD est requis pour fournir la force de rotation suffisante pour le *swarming*, cet entraînement semble dépendant de la proportion de cellule dans le *swarm* qui utilise MotCD (Anda *et al.*, 2023). *P. aeruginosa* possède un seul flagelle et ne se différencie pas en condition de *swarming* (Harshey & Partridge, 2015). Cependant, un mutant ayant perdu le régulateur FleN va exprimer plusieurs flagelles polaires, ce qui mène à un effet bénéfique sur le mouvement de la population entière et l'étalement en *swarming* (Deforet *et al.*, 2014; van Ditmarsch *et al.*, 2013).

P. aeruginosa doit aussi sécréter des molécules tensioactives (agents mouillants) pour réduire la tension de surface (Kearns, 2010). Ces biosurfactants sont les rhamnolipides et leur précurseur dilipidique, le HAA [3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoic Acid]. Ces glycolipides sont produits par une succession de trois réactions enzymatiques : deux molécules de 3-hydroxyacyl sont converties en HAA par l'enzyme RhIA → un TDP-L-Rhamnose est ajouté au HAA par RhIB pour former un mono-rhamnolipide → un second TDP-L-Rhamnose est ajouté par RhIC pour former un di-rhamnolipide (Déziel *et al.*, 2003; Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Ces molécules sont librement sécrétées dans le milieu autour de la colonie, et sur gélose peuvent même diffuser à plusieurs centimètres des bactéries (Yan *et al.*, 2019). Cette zone de diffusion est visible à l'œil nu, souvent appelé « zone mouillée ». Elle apparaît comme une fine couche de liquide à la surface du gel, mais elle constitue en fait un gonflement de l'agar qui est rempli de surfactants (Deforet, 2023). Alors que les trois molécules tensioactives de *P. aeruginosa* (HAA, mono-Rhl et di-Rhl) sont capables de favoriser le *swarming* de la colonie, cette zone mouillée est principalement constituée de mono-rhamnolipides et di-rhamnolipides (Tremblay *et al.*, 2007). En effet, les rhamnolipides sont plus hydrosolubles que leur précurseur et diffuse mieux dans le gel hydraté (Tremblay *et al.*, 2007). En plus d'être requis pour permettre l'étalement de la colonie, les

biosurfactants de *P. aeruginosa* servent à coordonner la forme de l'étalement : menant à la formation de dendrites et d'un patron étoilé (Figure 1.14) (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). Le besoin de biosurfactants pour effectuer son *swarming* impose une limite à la colonie de *P. aeruginosa* puisque ceux-ci ne sont pas produits dans toutes les conditions. Premièrement, l'expression des trois enzymes RhIA, RhIB et RhIC requiert l'activation du système de *quorum sensing* Rhl. Deuxièmement, les conditions nutritives doivent être adéquates : par exemple, les biosurfactants ne sont produits que dans des conditions où le carbone est en excès (versus l'azote) (Dobler *et al.*, 2016). Ceci explique pourquoi il existe un temps de latence de plusieurs heures de croissance avant qu'une colonie commence à se déplacer par l'action du *swarming*, et aussi pourquoi le *swarming* requiert des conditions nutritives particulières (Tremblay, 2007; Tremblay & Déziel, 2008).

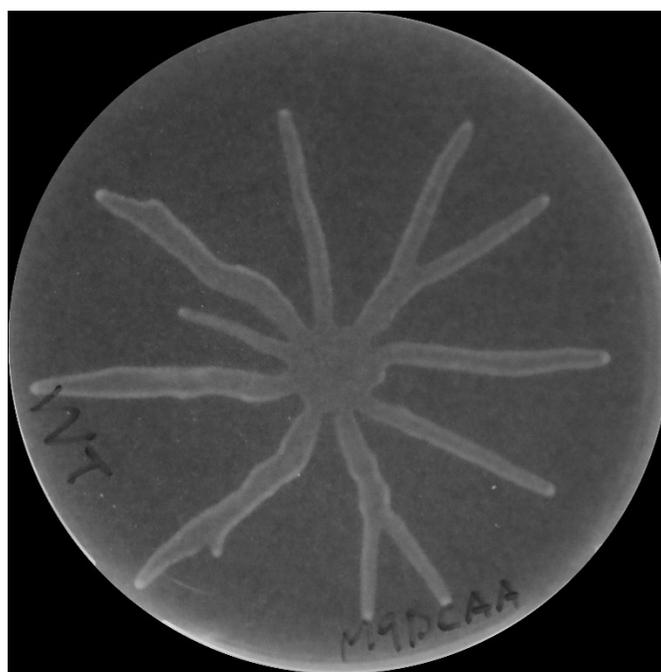


Figure 1.14 Patron étoilé d'une colonie *swarming* de *P. aeruginosa* PA14 sauvage

Une suspension bactérienne de *P. aeruginosa* est inoculée au centre d'une gélose semi-solide et est incubée pendant environ 20 heures. Durant cette incubation, la colonie se développe : les bactéries coalescent ensemble pour former des populations motiles qui s'éloignent progressivement du centre, formant des dendrites avec une forme étoilée. Cette population motile se trouve à la pointe des dendrites. L'image représente le *swarming* classique effectué par la souche PA14 sur milieu M9DCAA.

Les conditions physiques du milieu sont aussi importantes pour permettre le *swarming*. Selon les modèles actuels, les cellules en *swarming* doivent extraire l'eau du gel par capillarité pour permettre l'étalement (Srinivasan *et al.*, 2019). La facilité à extraire l'eau du gel est influencée par la quantité de soluté dans le gel et la concentration d'agar (Yang *et al.*, 2017). La colonie sécrète

aussi des osmolytes qui facilitent l'attraction de l'eau hors du gel (Ping *et al.*, 2014). Ces osmolytes sont proposés d'être les antigènes des lipopolysaccharides et les EPS (alginate, Pel et Psl) (Ping *et al.*, 2014).

Certaines publications suggèrent que *P. aeruginosa* doit exprimer des pili de type IV pour pouvoir effectuer le *swarming* (Kohler *et al.*, 2000; Leech & Mattick, 2006). Pourtant, leur présence n'est pas nécessaire, et l'impact d'une mutation causant la perte des PT4 semble dépendre énormément des conditions expérimentales (Leech & Mattick, 2006; Morin & Déziel, 2021; Yang *et al.*, 2017). Ceci pourrait être dû au contrôle des PT4 via le complexe Pil-Chp, qui est connu pour être influencé par certaines sources d'acide aminés comme la peptone. Dans nos conditions expérimentales, l'absence de PT4 ne provoque pas d'effets notables sur le patron de déplacement d'une colonie *swarming* de PA14 (Morin & Déziel, 2021).

L'initiation du *swarming* est donc très sensible aux conditions environnantes. Il n'est pas surprenant que cette forme de motilité soit difficile à observer dans l'environnement ou dans un contexte infectieux, mis à part des observations indirectes (Coleman *et al.*, 2021).

1.5.2 Le contrôle du *swarming*

Comme le mode de vie sous forme de biofilm, le *swarming* est un mode de vie social qui est régulé par la voie Gac/Rsm et le di-GMPc (Heurlier *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2020; McCarter & Gomelsky, 2015). Les protéines RsmA et RsmN doivent être libres pour activer la motilité, dont le *swarming*. Un mutant *hptB*- surexprime les pARN RsmY et RsmZ, il présente donc un défaut de *swarming* (Jean-Pierre *et al.*, 2016). Un mutant sans RsmA aura un défaut encore plus prononcé (Robitaille *et al.*, 2020b). En contrepartie, un mutant *gacA*- ou un double mutant *rsmYZ*- auront un phénotype « *hyperswarmer* » (Jean-Pierre *et al.*, 2016). Contrairement à ce qui est souvent répété dans la littérature, les cellules en *swarming* ne surexpriment pas leurs facteurs de virulence (Overhage *et al.*, 2008). Cette observation est basée sur une comparaison biaisée entre le profil transcriptomique de cellules en culture liquide (planctoniques) et une population entière en *swarming*. Notre laboratoire a clairement démontré que cette observation ne tient pas en comparant le profil transcriptomique d'une population non motile sur gélose comparée à une population en *swarming* (Tremblay & Déziel, 2010). Cette comparaison plus juste – surface non-motile *versus* surface motile – a permis de démontrer que les cellules en *swarming* expriment principalement des fonctions énergétiques qui leur permettent de maintenir un métabolisme élevé pour se déplacer. Le *swarming* mène aussi à des populations distinctes : celle à la pointe d'une dendrite et celle au centre de la colonie (Tremblay & Déziel, 2010).

2 PROBLÉMATIQUE

La motilité de type *swarming* est un mode de vie complexe qui requiert un haut niveau d'interactions sociales pour s'effectuer. Cette forme de motilité est donc un modèle d'étude intéressant en sociomicrobiologie pour identifier des facteurs qui influence les comportements sociaux des bactéries (Yan *et al.*, 2019). Plusieurs étudiants précédents du laboratoire Déziel ont examiné l'impact de plusieurs de ces facteurs sur le modèle du *swarming* (Jean-Pierre, 2017; Robitaille, 2020; Tremblay, 2011). Les travaux rapportés dans cette thèse se veulent une continuation de ces efforts de caractérisation.

Les travaux de Julien Tremblay ont mis en lumière la haute variété de phénotype qui s'exprime en *swarming* selon la conception du milieu de culture. Plusieurs paramètres de croissance comme le type de source de carbone, le pH du milieu, la présence de microéléments, le temps de séchage des géloses ainsi que le pourcentage d'agar utilisé vont influencer la capacité de *P. aeruginosa* à coloniser une surface (Figure 2.1) (Tremblay, 2007; Tremblay, 2011). Vu l'importance de paramètres liés directement à la surface, j'ai postulé que changer l'agar pour un autre agent gélifiant devrait avoir un impact considérable sur la motilité sociale. En effet, l'importance de la sécrétion de rhamnolipides pour réaliser le *swarming* est grandement diminuée sur ces surfaces alternatives. La caractérisation exhaustive faite par Julien concernait principalement la souche sauvage de *P. aeruginosa*. Il y a donc un fort potentiel de caractériser davantage l'impact des composantes physicochimiques d'un milieu sur le comportement social de souches mutantes. Durant mes travaux, j'ai soulevé un tel impact potentiel du calcium sur l'étalement d'un mutant sans flagelle de *P. aeruginosa*, un déplacement appelé *sliding*.

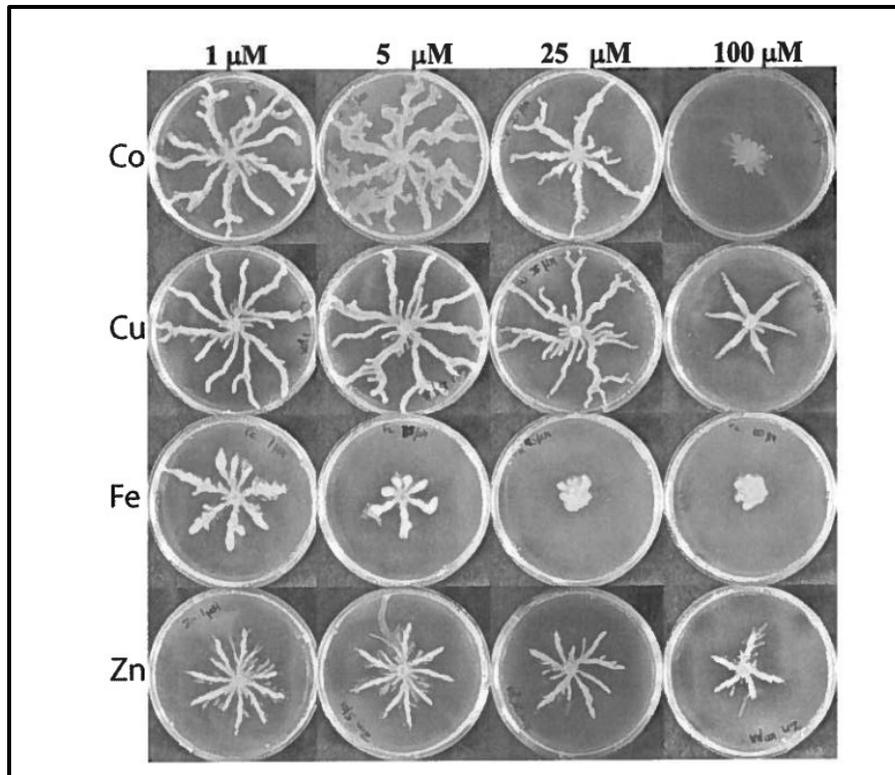


Figure 2.1 La motilité de type *swarming* est affectée par l'ajout de métaux.

Image tirée des travaux de maîtrise de Julien Tremblay (2007). La motilité *swarming* de *P. aeruginosa* PA14 est modifiée selon la concentration en divers métaux dans le milieu, soit : le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le fer (Fe) ou le zinc (Zn). La motilité est effectuée par inoculation ponctuelle au centre d'une gélose semi-solide d'une culture de *P. aeruginosa* (Tremblay, 2007).

Similairement à ces travaux, certaines expériences effectuées par Fabrice Jean-Pierre et May Landry ont souligné une capacité similaire qu'un mutant sans flagelle a à se déplacer au sein d'une colonie *swarming* de la souche sauvage de *P. aeruginosa* PA14 ou *Burkholderia cenocepacia* K56-2 (Jean-Pierre, 2017; Landry, 2018). L'hypothèse posée est alors que cette dispersion de PA14 sans flagelle peut potentiellement s'effectuer par attachement direct aux bactéries motiles, par la friction des bactéries motiles (entraînement par un courant) ou par l'activation du *sliding* en condition de coculture.

La régulation génique qui mène à l'établissement d'un comportement complexe comme le *swarming* a été exploré par Julien Tremblay, Fabrice Jean-Pierre, Sophie Robitaille et moi-même dans le cadre de ma maîtrise (Jean-Pierre, 2017; Morin, 2019; Robitaille, 2020; Tremblay, 2011). Leurs travaux portent sur le rôle de la protéine HptB dans la régulation de ce comportement via la voie Gac/Rsm. Des conditions expérimentales qui favorisent le *swarming* vont souvent mener des mutants déficients pour ce type de motilité à acquérir des mutations supplémentaires pour

compenser leur défaut. J'utilise cette approche expérimentale pour caractériser davantage l'impact de la voie Gac/Rsm sur le *swarming*.

Mes résultats sont séparés en trois chapitres, pour les trois axes de recherche que j'ai explorés, soit : [1] l'influence des conditions physicochimiques sur l'étalement bactérien ; [2] les interactions sociales inter-espèces favorisées par le *swarming* ; [3] le contrôle de la voie Gac/Rsm sur le *swarming*.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Conditions de croissance des bactéries

La liste des souches bactériennes utilisées se trouve dans les sections de méthodes respectives de chaque chapitre. De façon générale, les bactéries utilisées sont mises en culture à partir d'un stock congelé à -80°C. Les bactéries sont cultivées de routine en inoculant 3 à 5 mL de bouillon *Tryptic Soy Broth* (TSB, Difco) ou *Lysogeny Broth* (LB, Alpha Biosciences). Lorsqu'un étalement est requis, les bactéries sont étalées par striation ou par l'utilisation de billes de verre stériles sur gélose *Tryptic Soy Agar* (TSA, Alpha Biosciences) ou *Lysogeny Agar* (LA, Alpha Biosciences). Les cultures sont incubées à 37°C durant la nuit pour obtenir des cultures en phase stationnaire le lendemain. La Table 3.1 présente les concentrations d'antibiotique utilisées pour sélectionner les bactéries avec une cassette de résistance.

Table 3.1 Concentration d'antibiotique utilisés pour la sélection des cassettes de résistance

Antibiotique	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Carbéniciline	10 µg/mL	250 µg/mL
Gentamicine	50 µg/mL	15 µg/mL
Kanamycine	50 µg/mL	N/A ¹
Tetracycline	15 µg/mL	75 ou 125 µg/mL
Triclosan ²	0 µg/mL	25 µg/mL

1 La kanamycine n'est normalement pas utilisée pour sélectionner *P. aeruginosa*.

2 Le triclosan est utilisé pour contre-sélectionner *E. coli*.

3.2 Essai de motilité de type *swarming*

La capacité qu'a *P. aeruginosa* à se déplacer grâce à sa motilité sociale est évaluée par des essais sur géloses semi-solide. Les paramètres de cet essai sont basés sur les travaux d'optimisation de *swarming* effectués par Julien Tremblay, un précédent étudiant du laboratoire Déziel (Tremblay & Déziel, 2008). Le fruit de cette optimisation est la conception d'un milieu basé sur le M9 appelé M9DCAA (**M9** modifié avec ajout de **D**extrose et **CasA**mino **A**cides). La composition complète de ce milieu est : NH₄Cl (20 mM), Na₂HPO₄ (12 mM), KH₂PO₄ (22 mM), NaCl (8,6 mM), acides casaminés (BD Difco™ ; 0,5 %), agar de marque Bacto™ (BD Difco™ ; 0,5 %), ainsi que MgSO₄ (1 mM), CaCl₂ (1 mM) et dextrose (11 mM). Les trois derniers composés sont ajoutés après la stérilisation du milieu à l'autoclave, juste avant de couler les géloses dans les boîtes de Pétri. La marque d'agar est cruciale et a un grand impact sur le phénotype de motilité qui est observé (un exemple est présenté à la section 4.5).

Les géloses sont coulées dans une enceinte de sécurité biologique. Les boîtes de Pétri sont préalablement répandues au sein de l'enceinte et leurs couvercles sont retirés. Un volume de 20 mL de milieu fondu après autoclavage est mesuré à l'aide d'un tube de centrifugation gradué de 50 mL, puis est versé dans une boîte de Pétri. Les géloses sont laissées à découvert sous la ventilation de l'enceinte pour sécher pendant 25 minutes, puis les couvercles sont fermés. Il est important de noter que le séchage n'est pas uniforme au sein de la superficie de l'enceinte, créant un effet de groupe. Pour réduire l'impact de cet effet de groupe, les géloses sont mélangées de façon aléatoire. Une modification de mon protocole comparé à celui de Julien Tremblay : j'effectue un séchage plus court (25 minutes au lieu de 75 minutes) et je ne place pas mes géloses dans des sacs de plastique fermés. Cette dernière étape a été retirée à cause de la difficulté d'utilisation lorsque le nombre de géloses excède 30 (chaque sac a une limite de 10 géloses) et de l'effet de groupe additionnel causé par la séparation des géloses dans plusieurs sacs. Je place l'entièreté des géloses de mon essai dans un bac à autoclave recouvert d'un sac de plastique pour maintenir le niveau d'humidité. Après l'ensemencement, les géloses sont finalement incubées durant la nuit à 30°C ou 37°C. La différence majeure entre les deux températures est liée à la vitesse de *swarming* : la colonie s'étale plus vite à 37°C. Les géloses sont toujours fraîchement préparées avant l'ensemencement.

Les géloses *swarming* sont inoculées à leur centre avec une goutte de 5 µL d'une suspension bactérienne ajustée à une densité optique à 600 nm de 3,0. Cette suspension bactérienne est préparée à partir d'une préculture de la souche désirée ou une culture fraîche (obtenue par la dilution 1/100 d'une préculture dans du milieu frais et une incubation de trois à quatre heures. L'utilisation de l'un ou l'autre a très peu d'impact sur le phénotype selon mon expérience personnelle.

La prise d'image pour une gélose entière est faite par un appareil photo numérique Lumix ZS70 (Panasonic). Les géloses sont placées avec leur ouverture vers le bas sans le couvercle à l'intérieur d'une boîte à lumière. Cette dernière a été conçue à partir d'une boîte de carton, contient une ouverture circulaire sur le dessus pour laisser passer l'objectif de l'appareil photo et un fond noir pour améliorer le contraste. De plus, des images à plus grand grossissement sont prises grâce à un stéréomicroscope Olympus SZX16 en mode *darkfield*.

3.2.1 Utilisation des agents gélifiants alternatifs

Des agents gélifiants autres que l'agar ont été utilisés pour produire des géloses semi-solides pour les essais de motilité sur une surface. Les deux autres agents gélifiants utilisés sont la

carraghénane (Sigma) et la gomme de gellane (Phytigel™, Sigma). Ces deux polymères gélifiants ont des caractéristiques d'utilisation différentes de l'agar : leur température de gélification est plus élevée et un pouvoir gélifiant plus dépendant des ions présents dans le milieu (Das *et al.*, 2015). La gomme de gellane et la carraghénane sont toutes deux utilisées de la même façon que l'agar : elles sont ajoutées au milieu avant la stérilisation à l'autoclave et vont se dissoudre durant le cycle de stérilisation. Il faut seulement couler les géloses plus tôt qu'à l'habitude – alors que les milieux sont assez chauds – car elles gélifient à une température plus élevée que l'agar. Il faut aussi bien agiter en ajoutant les stocks de sels concentrés (CaCl₂ et MgSO₄) puisque leur présence peut faire précipiter les polymères du gel.

Des essais d'optimisation ont révélé qu'une concentration de 0,5 % de carraghénane produit une surface qui permet l'étalement en *swarming* d'une colonie de *P. aeruginosa* PA14. Pour sa part, la gomme de gellane forme une surface adéquate pour le *swarming* de PA14 à une concentration de 0,1 %.

Entre les deux, la gomme de gellane est beaucoup plus intéressante à utiliser : elle forme des gels beaucoup plus clairs que l'agar, alors que la carraghénane utilisée contient beaucoup de débris qui rendent l'imagerie difficile. Les phénotypes obtenus sont aussi beaucoup plus consistants avec la gomme de gellane. De plus, la faible quantité requise pour gélifier et son faible coût rend l'utilisation de la gomme de gellane de 15 à 20 fois moins chère que l'agar Bacto™ utilisé couramment dans notre laboratoire.

3.2.2 Utilisation de marqueurs fluorescents

Plusieurs outils génétiques nous permettent de marquer les cellules bactériennes que nous utilisons. Ces outils sont basés sur le système intégratif Tn7 qui permet une intégration stable dans le chromosome en simple copie. Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé les plasmides pUC18-miniTn7-P_{A1/04/03}-mCherry-Gm^R (pour marquer *P. aeruginosa* avec la mCherry) (Zhao *et al.*, 2013) et le pUC18R6KT-miniTn7T-P_{S12}-eGFP-Kan^R (pour marquer *B. cenocepacia* K56-2 avec la *Green Fluorescent Protein*, GFP) (Norris *et al.*, 2010). L'intégration du Tn7 dans le génome se fait par conjugaison (*quad-mating*) entre la souche *Escherichia coli* donneuse du plasmide, une souche *E. coli* pKR2013 (*helper*), une souche *E. coli* avec le plasmide pTNS3 (transposase) et la souche receveuse. Le transfert peut aussi se faire par électrotransformation avec les deux plasmides directement : celui avec le Tn7 et l'autre avec la transposase. Les souches marquées contiennent une intégration chromosomique stable qui n'a pas besoin d'être maintenue par sélection aux antibiotiques.

La visualisation des souches marquées peut se faire de plusieurs façons. (1) La méthode principale et la plus performante est l'utilisation d'un numériseur à balayage laser avec un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, USA). L'appareil permet l'imagerie de géloses entières et la visualisation de plusieurs marqueurs en parallèle. Les conditions de visualisation sont présentées à la Table 3.2. Le Typhoon est limité au niveau du grossissement et de la résolution, ainsi que l'absence d'un mode en lumière visible.

Table 3.2 Visualisation des fluorophores au Typhoon

Protéine fluorescente	Filtre	Laser
GFP	BGP1	473 nm ¹
mCherry	LPR	532 nm ¹

¹La puissance du laser est ajustée à 500 V

(2) Les souches peuvent aussi être visualisées par stéréomicroscopie avec l'appareil Olympus SZX16 (44vident, USA). Les fluorophores GFP et mCherry sont révélés par l'utilisation d'un laser et des filtres GFP et RFP, respectivement. L'utilisation de cet appareil permet un meilleur grossissement et l'acquisition de plus de détail en mode lumière visible, le fond noir (*Darkfield*, DF) étant le plus approprié. Cet appareil est limité par le faible signal fluorescent obtenu, mais aussi à cause de l'absence d'automatisation qui rend la prise d'image en plusieurs canaux parallèles difficile.

(3) Les bactéries marquées peuvent finalement être visualisées par microscopie confocale à balayage laser avec un Zeiss LSM 780. Cette méthode offre la meilleure résolution et une élimination du bruit de fond qui permet la visualisation très claire des bactéries présentes au sein de la colonie *swarming*. Cependant, l'aspect très macroscopique du *swarming* réduit beaucoup l'utilité d'augmenter le grossissement au profit de la réduction du champ de vision. Celui-ci peut être compensé en choisissant un grossissement faible (20X) et en réalisant plusieurs balayages côte-à-côte qui peuvent être joints ensemble par la suite. La densité cellulaire élevée dans chaque région de la colonie *swarming* ne permet pas de distinguer les cellules uniques même au plus fort grossissement (1000X). La plus grande difficulté de la méthode est le traitement des lames pour préparer la visualisation. Le *swarming* est préparé comme à l'habitude. Après l'incubation, une section de gélose contenant une pointe de dendrite est découpée puis placée sur une lamelle de verre (face avec les bactéries vers le haut). Le fond d'une mini boîte de Pétri adapté à la microscopie avec un fond en lamelle (voir Nunc™, Thermofisher, #cat 150680) est doucement déposé sur la pointe pour ne pas trop la détériorer et la boîte est fermée. Ceci permet

d'emprisonner le coupon de gélose dans la mini boîte de Pétri pour ne pas la briser. La visualisation de la pointe peut alors être effectuée (voir le schéma à la Figure 3.1).

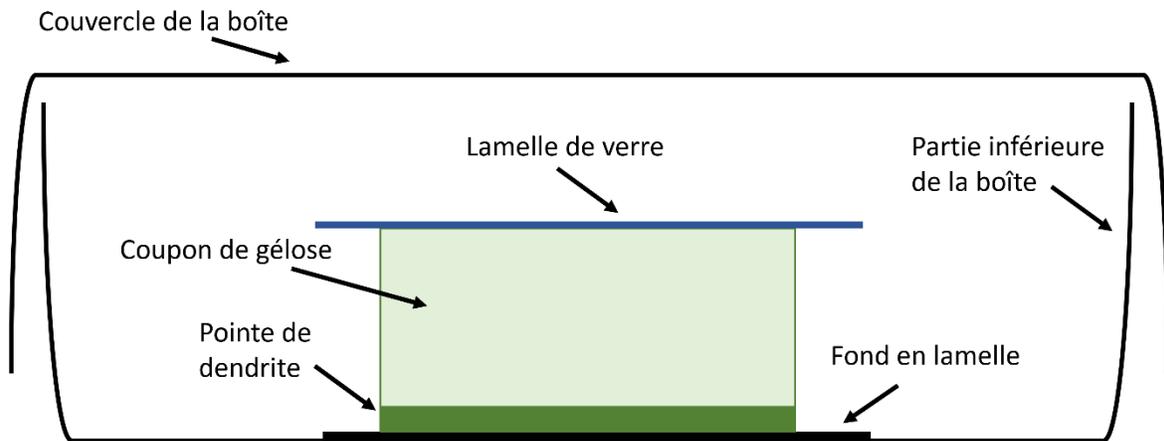


Figure 3.1 Schéma expérimental de microscopie d'une section de dendrite de colonie *swarming*.

Montage d'un coupon de gélose semi-solide contenant une section de dendrite à visualiser à la microscopie confocale à balayage laser. La pointe de dendrite est collée sur le fond en lamelle de la boîte.

3.3 Amplifications PCR

Les amplifications PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sont effectuées de routine selon la recette suivante (concentration finale pour chaque réaction de 25 μ L) : tampon de réaction commercial 1X, mélange de dNTP 200 μ M, amorces sens (*forward*) 0,4 μ M, amorce antisens (*reverse*) 0,4 μ M, diméthylsulfoxyde (DMSO) 4 à 10 %, enzyme polymérase 0,5 U. Les enzymes – et leur tampon respectif – utilisés sont la EasyTaq (TransGen Biotech, Chine) pour les PCR diagnostiques et la polymérase Q5 haute-fidélité (New England Biolabs, USA) pour les PCR de conceptions biomoléculaires.

4 1^{er} CHAPITRE DE RÉSULTATS : LES CONDITIONS PHYSICOCHIMIQUES QUI INFLUENCENT LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING

(Article 1) « *Use of alternative gelling agents reveals the role of rhamnolipids in Pseudomonas aeruginosa surface motility* »

L'utilisation d'agents gélifiants alternatifs révèle le rôle des rhamnolipides dans la motilité de surface de *Pseudomonas aeruginosa*

Auteurs :

Charles D. Morin et Eric Déziel

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique (INRS), Laval (Québec), H7V 1B7, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Biomolécules

Soumission : 28 juillet 2021

Acceptation : 3 septembre 2021

Publication : 6 octobre 2021

<https://doi.org/10.3390/biom11101468>

Contribution des auteurs :

Charles Morin : Conception et réalisation des expérimentations. Analyses des résultats. Rédaction et correction du manuscrit.

Eric Déziel : Conception des expérimentations. Analyse des résultats et encadrement. Révision du manuscrit. Obtention du financement.

4.1 Résumé en français

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie sociale capable de coloniser une gélose grâce à une motilité de groupe appelée *swarming*. *P. aeruginosa* doit activer son flagelle polaire et sécréter des agents mouillants pour effectuer ce type de motilité. Notre compréhension de ce phénomène est limitée aux conditions d'études qui permettent de l'observer : notamment l'utilisation ubiquitaire de géloses constituées d'agar. Pour étudier le comportement de *P. aeruginosa* sur des surfaces alternatives, nous avons évalué sa capacité de déplacement en conditions de motilité de type *swarming* avec des géloses gélifiées avec de la gomme gellane et de la carraghénane. Nos résultats montrent que la souche prototypique PA14 produit des patrons de dispersion différents sur ces surfaces alternatives. De plus, la sécrétion d'agents mouillants n'est plus requise pour observer un déplacement dans ces conditions. L'importance des rhamnolipides semblent dépendre des caractéristiques physicochimiques de la surface testée. Ces agents gélifiants alternatifs offrent la possibilité d'accroître notre compréhension de l'adaptation et la coordination sociale de *P. aeruginosa*.

4.2 Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a motile bacterium able to exhibit a social surface behaviour known as swarming motility. Swarming requires the polar flagellum of *P. aeruginosa* as well as the secretion of wetting agents to ease the spread across the surface. However, our knowledge on swarming is limited to observed phenotypes on agar-solidified media. To study the surface behaviour and the impact of wetting agents of *P. aeruginosa* on other surfaces, we assessed surface motility capabilities of the prototypical strain PA14 on semi-solid media solidified with alternative gelling agents, gellan gum and carrageenan. We found that, on these alternative surfaces, the characteristic dendritic spreading pattern of *P. aeruginosa* is drastically altered. One striking feature is the loss of dependence on rhamnolipids to spread effectively on plates solidified with these alternative gelling agents. Indeed, a *rhlA*-null mutant unable to produce its wetting agents still spreads effectively, albeit in a circular shape on both the gellan gum- and carrageenan-based media. Our data indicate that rhamnolipids do not have such a crucial role in achieving surface colonization of non-agar plates, suggesting a strong dependence on the physical properties of the tested surface. The use of alternative gelling agent provides new means to reveal unknown features of bacterial surface behaviour.

4.3 Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a versatile bacterium—mainly recognized as an important opportunistic pathogen—capable of complex social behaviours such as biofilm formation and surface group motility (Valentini *et al.*, 2018). Multiple types of bacterial motilities were originally described by Jorgen Henrichsen (Henrichsen, 1972). Of those, swimming, swarming, twitching and sliding have been reported in *P. aeruginosa*. Swimming is a single cell, flagellum-driven motility that occurs in liquid environments and through soft gels (i.e. up to 0.3% agar). Swarming motility, on the other hand, is a social form of flagellum-dependant translocation on semi-solid surfaces that requires the secretion of wetting agents to facilitate the movement of the bacteria over the surface (Kearns, 2010). This coordinated population movement often gives rise to complex dispersion patterns, like the characteristic “concentric circle” shape formed by *Proteus mirabilis* (Schaffer & Pearson, 2015), or the fractal patterns of *Bacillus subtilis* (Julkowska *et al.*, 2004). The surfactants produced during such surface motility are typically amphiphilic molecules such as lipopeptides (e.g. surfactin for *Bacillus*) or glycolipids (e.g. rubiwettins for *Serratia rubidaea*) (Kearns *et al.*, 2004; Matsuyama *et al.*, 1990). In the case of *P. aeruginosa*, these surfactants are 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAA), monorhamnolipids and dirhamnolipids sequentially produced by the RhlA, RhlB and RhlC enzymes, respectively (Déziel *et al.*, 2003). HAAs and rhamnolipids not only promote bacteria spreading across the surface during swarming motility, but also induce the characteristic dendritic swarm pattern often displayed by *P. aeruginosa* (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). As HAAs do not possess rhamnose moieties, they are more hydrophobic than mono- and dirhamnolipids. Because of this chemical property, they also diffuse less in the swarming medium, compared to its rhamnose-bearing counterparts, creating an increasing gradient ratio away from the colony (Tremblay *et al.*, 2007). The production of HAAs and rhamnolipids is controlled at the transcriptional level by the quorum sensing regulator RhlR once the bacterial population has reached a threshold density (Ochsner & Reiser, 1995). Along with rapid surface colonization, swarming has been linked to increased antibiotic tolerance (Lai *et al.*, 2009; Overhage *et al.*, 2008). Twitching is another form of social motility, where cells drag themselves across a solid surface (such as polystyrene) through the action of their type IV pili (T4P) (Burrows, 2012). Sliding is a surfactant-driven form of motility that was observed only in the absence of functional flagellum and T4P (Murray & Kazmierczak, 2008). Another type of surface motility more recently described for *P. aeruginosa* and other bacterial species is surfing (Sun *et al.*, 2018; Yeung *et al.*, 2012). This motility is flagellum-driven, it does not require the production of wetting agents but instead exploits the wetting properties of mucin supplemented to the culture medium.

Agar is the most used gelling agent in routine lab experiments. Most of our knowledge on bacterial behaviours on semi-solid and solid gels comes from observations of agar-based plate assays. Agar is primarily formed by chains of disaccharide agarose (formed by units of D-galactose and L-galactopyranose), produced by some red algae species (Chi *et al.*, 2012). Alternatives to agar, like carrageenan and gellan gum, have gained popularity in recent years due to their lower cost and different gelling properties (Das *et al.*, 2015). Carrageenan is also obtained from red algae and is formed of chains of D-galactopyranose with varying numbers of lateral sulphate groups (van de Velde *et al.*, 2002). It possesses a greater tolerance to high pH than agar (Datta *et al.*, 2011). Gellan gum is formed by chains of tetrasaccharides (D-glucose, D-glucuronic acid, D-glucose, L-rhamnose). This polysaccharide is produced from *Sphingomonas* species (Giavasis *et al.*, 2000). Its higher melting point makes it suitable for the culture of thermophiles (Childers *et al.*, 1992).

A phenotype such as swarming motility is extremely sensitive to culture conditions, it is therefore challenging to obtain reproducible data (Morales-Soto *et al.*, 2015). Indeed, this motility phenotype is directly linked to the characteristics of the agar gel surface, such as gelling agent concentration, drying time, osmotic pressure, and wettability (Tremblay & Déziel, 2008; Yang *et al.*, 2017). Seemingly trivial factors such as the brand of agar were reported to influence the swarming phenotype (Hara *et al.*, 2012; Harshey & Matsuyama, 1994; Leech & Mattick, 2006). Here, we investigated the effect of two alternative gelling agents—carrageenan and gellan gum—on surface spreading of *P. aeruginosa*. Using standard swarming conditions, we reveal novel motility phenotypes that diverge from standard swarming motility on agar gels, highlighting our very limited understanding of bacterial social surface motility phenomena.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Bacterial strains and culture

Bacterial strains used in this study are listed in Table 4.1. Bacteria were routinely cultured in Tryptic Soy Broth (TSB, Alpha Biosciences) at 37°C in a roller drum, or on Tryptic Soy Agar (TSA, Alpha Biosciences) plates. Swarming medium was based on modified M9 with dextrose and casamino acids (M9DCAA), as described (Tremblay & Déziel, 2008). Briefly, M9DCAA medium (20 mM NH₄Cl, 12 mM Na₂HPO₄, 22 mM K₂HPO₄, 8.6 mM NaCl, 0.5 % casamino acids (Difco), 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 11.1 mM dextrose) was solidified with either 0.5 % Bacto™ Agar (Difco), 0.5 % carrageenan (mixture of κ-carrageenan and λ-carrageenan, Millipore-Sigma) or 0.1 % gellan gum (Phytigel™, Millipore-Sigma) to obtain a semi-solid gel. A volume of 20 mL of

this medium was poured into 100 mm polystyrene Petri dishes and left to dry under the flow of a biosafety cabinet for 25 minutes.

Table 4.1 Bacterial strains used in this study

Strain	Stock #	Genotype	Reference
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
PA14 WT	ED14	UCBPP-PA14, parental wild-type strain	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 <i>rhIA</i> -	ED1	PA14 <i>rhIA</i> ::Mar2xT7	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 Δ <i>fliC</i>	ED3956	PA14 Δ <i>fliC</i>	This study
PA14 <i>rhIB</i> -	ED286	PA14 <i>rhIB</i> ::Mar2xT7	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>rhIC</i> -	ED777	PA14 <i>rhIC</i> :: <i>tet</i> ^R	This study
PA14 <i>lasR</i> - <i>rhIR</i> -	ED266	PA14 <i>lasR</i> ::Gm ^R <i>rhIR</i> :: <i>tet</i> ^R	(Dekimpe & Deziel, 2009)
<i>Escherichia coli</i>			
S17.1 pEX18Gm- Δ <i>fliC</i>	ED3955	<i>E. coli</i> strain with suicide vector pEX18Gm- Δ <i>fliC</i> for allelic exchange deletion of <i>fliC</i>	(Murray & Kazmierczak, 2008)
SM10 pNTPS138- <i>rhIC</i> :: <i>tet</i> ^R	ED1271	<i>E. coli</i> strain with suicide vector to insert a tetracycline resistance cassette into <i>rhIC</i> by allelic exchange.	This study

4.4.2 Swarming motility assay

Overnight bacterial cultures were diluted 1/30 in TSB and incubated at 37°C for about 4 hours to late exponential phase. All the cultures were adjusted to an OD₆₀₀ of 3.0 and 5 μ L of each were spot-inoculated onto the center of one semi-solid M9DCAA plate. The plates were incubated at 30°C overnight (between 16 and 20 hours). After incubation, a picture of each whole plate was taken with a Panasonic Lumix DMC-ZS60 digital camera in a custom-made lightbox. Higher magnification images were captured using an Olympus SZX16 stereomicroscope. Each combination of mutants and gelling agents was tested in triplicates at least three times.

4.4.3 Construction of Δ *fliC* mutants

Deletion of the *fliC* gene was achieved by allelic exchange using suicide vector pEX18Gm- Δ *fliC* using standard procedure. Briefly, pEX18Gm vector was transferred into *P. aeruginosa* via mating with the *E. coli* donor strain: both donor strain and recipient strains were grown in TSB without shaking at 37°C and 42°C, respectively. After a few hours of growth, cells were centrifuged at 10,000 x *g* for 1 minute, supernatant was discarded, and cells were mixed into 100 μ L TSB. This cell suspension was dropped onto a Tryptic Soy Agar (TSA, Alpha Biosciences) plate and left overnight at 37°C. Bacteria were scraped from the surface of the agar gel, suspended into buffered saline and diluted prior to spread on selective medium containing 15 μ g/mL gentamycin to select for recipient merodiploid cells that integrated the plasmid and 25 μ g/mL triclosan to

counter-select the donor cells. Subsequent selection of the second recombination event was achieved by plating onto tryptone yeast medium supplemented with 15% sucrose (Hmelo *et al.*, 2015). Loss of flagellum was confirmed using a swimming assay (Jean-Pierre *et al.*, 2016).

4.4.4 Construction of *rhIC*-mutant

The gene sequence of *rhIC* was amplified from the PA14 genome using primers *rhIC_fwd* (CGCTGGCGCCAAGCTTATGGACCGGATAGACATGG) and *rhIC_rev* (CGAAGCTAGCGA-ATTCGTACAGGGGCACGTCCAG). This sequence contains an intrinsic PstI restriction site and was cloned into plasmid pNTPS138 to produce pNTPS183-*rhIC*. The sequence of tetracycline resistance cassette (*tet^R*) was amplified from plasmid pACYC184 using primers *tet_fwd* (AAACTGCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGA) and *tet_rev* (AAACTGCAGTTTGCGCATT-CACAGTTCTC), both containing PstI restriction sites. The *tet^R* gene sequence was then cloned into the PstI site of *rhIC* gene sequence of pNTPS138-*rhIC* the resulting plasmid pNTPS138-*rhIC::tet^R* was transformed into the conjugative *E. coli* strain SM10. The plasmid was transferred into the recipient *P. aeruginosa* wild-type strain using bacterial conjugation as described above. Recipient cells that integrated the resistance cassette into their *rhIC* gene were selected on medium containing 125 µg/mL tetracycline and were confirmed by PCR and sequencing.

4.5 Results and discussion

4.5.1 Surface motility pattern is affected by the type of gelling agent used

Our current definition of swarming motility is based on the use of agar as culture medium solidifying agent. To explore the impact of gel properties on the spreading phenotype of *P. aeruginosa*, we used alternative gelling agents, gellan gum and carrageenan, to solidify the M9DCAA medium routinely used for swarming motility assays. We tested various percentages of gelling agents: 0.1%, 0.3%, 0.5% and 1% for gellan gum and 0.5%, 0.7% and 1% for carrageenan. Figure 4.1 shows the spreading phenotype of *P. aeruginosa* PA14 WT at 0.5% and 0.7% for agar, 0.5% and 0.7% for carrageenan and 0.1% and 0.3% for gellan gum. Under our conditions, concentrations that allowed surface spreading of *P. aeruginosa* were 0.1% for gellan gum and 0.5% for carrageenan (Figure 4.2 and Figure 4.1). We also tested xanthan gum but were unable to form stable gels, even at concentrations up to 2% (data not shown).

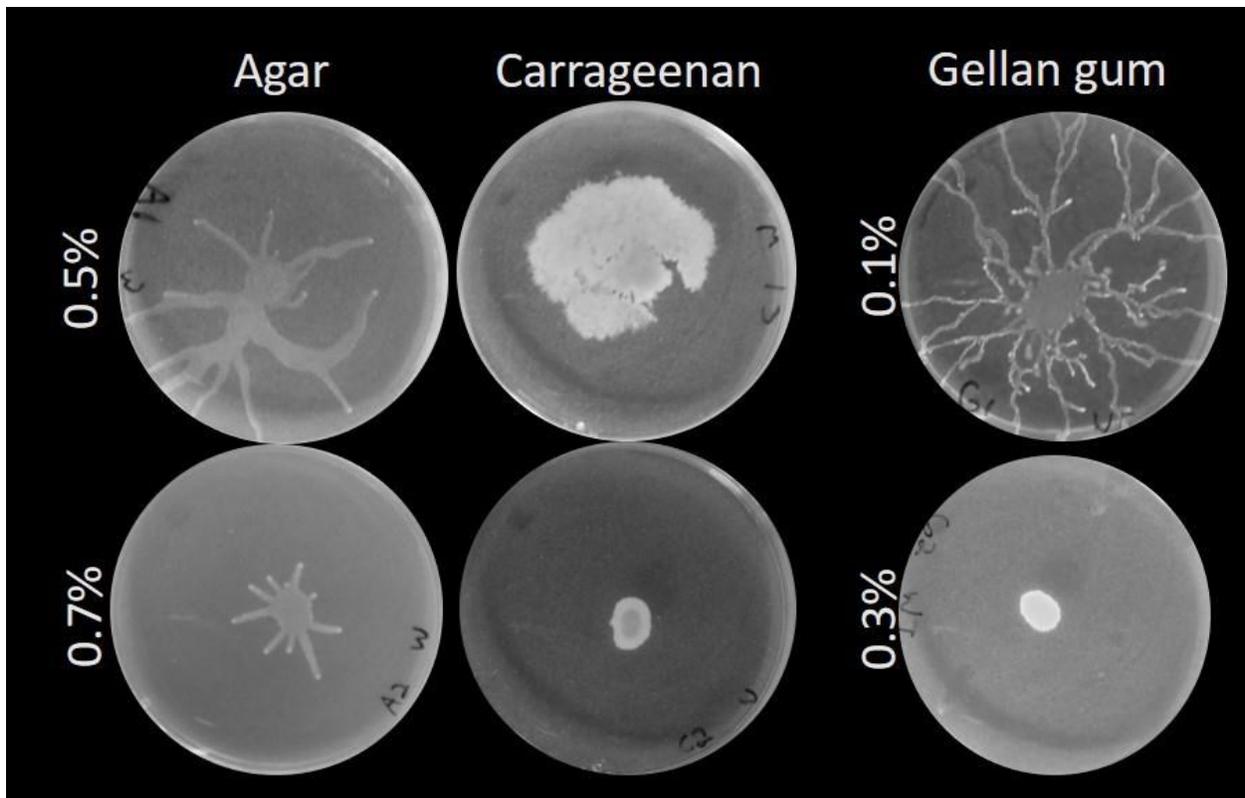


Figure 4.1 Gelling agent percentage allowing for surface spreading of *P. aeruginosa* PA14 WT.

Concentration of 0.5% allows motility for agar and carrageenan, but not 0.7%. Concentration of 0.1% allows motility of PA14 WT for gellan gum, but not 0.3%

Swarming motility of wild-type *P. aeruginosa* strains, such as strain PA14, typically forms a characteristic dendritic pattern with tendrils spreading away from the inoculation center and from each other (e.g. Figure 4.2). When we solidified our M9DCAA medium with either 0.5% carrageenan or 0.1% gellan gum, we noticed an impact on the dissemination of *P. aeruginosa* during surface motility. With gellan gum, the motility pattern displays finer tendrils which spread away from the center, in a manner similar to agar gels. With carrageenan, the spread pattern is circular and more disorganized, with only a few occasional tendrils showing per plates (Figure 4.2), although we found this phenotype to be inconsistent (i.e. sometimes there are lots of tendrils or none at all). Figure 4.3 visually presents this inconsistency from a sample of assays of PA14 WT on carrageenan. In these conditions, there seems to be a fine balance between a branched pattern and a circular pattern. All in all, this suggested that classic tendril-like swarming is possible on those alternative surfaces. Multiple factors influence the formation of a branching swarming pattern, such as volumetric growth, chemotaxis and—especially in the case of *P. aeruginosa*—

the presence of surface tension gradients induced by the release of wetting agents (Fauvart *et al.*, 2012; Giverso *et al.*, 2016; Trinschek *et al.*, 2018). *P. aeruginosa* produces HAA and rhamnolipids as its surfactant, which play a role in the outcome of the swarm pattern (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). We hypothesized that rhamnolipids would likely play an important role in the slightly different swarm patterns displayed on carrageenan and gellan gum. We then set out to test the motility of three mutants on these different gels: *rhIA*- (unable to produce any surfactant), *rhIB*- (producing only HAA), and *rhIC*- (producing HAA and mono-rhamnolipids) (Déziel *et al.*, 2003).

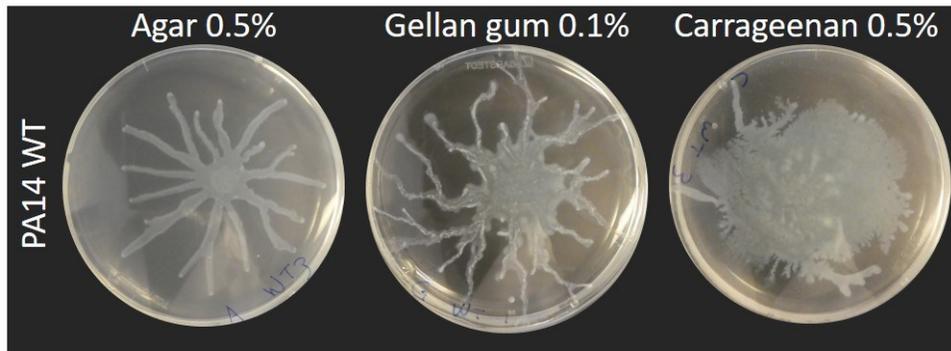


Figure 4.2 Social surface motility of *P. aeruginosa* PA14 WT on medium solidified with various gelling agents
Swarming medium M9DCAA was solidified with 0.5% agar, 0.1% gellan gum or 0.5% carrageenan. Each picture is representative of three biological replicates.

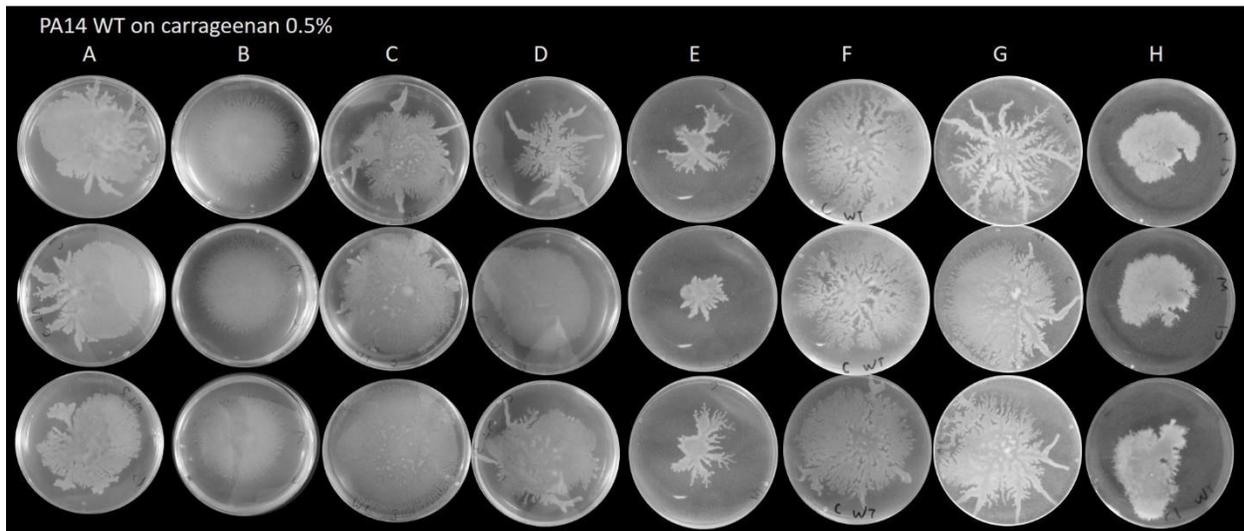


Figure 4.3 Swarming phenotype of PA14 WT on carrageenan 0.5%.
Each letter presents the triplicate of PA14 WT from an independent assay.

4.5.2 Rhamnolipids are not required for motility on alternative gelling agents but still contribute to the motility pattern

Swarming motility of *P. aeruginosa* is considered to require both a functional flagellum to allow movement on the surface and the production of a wetting agent to reduce surface tension. This is true on agar gels, as Figure 4.4 shows the loss of swarming of a *rhIA*- mutant (Figure 4.5 shows the swarming-deficient phenotype of a *fliC*- mutant). As we have previously reported (Tremblay *et al.*, 2007), HAA will suffice to promote surface motility: a *rhIB*- mutant will swarm almost as well as the WT (with a slightly altered pattern) and a *rhIC*- mutant is nearly identical to the WT (Figure 4.4).

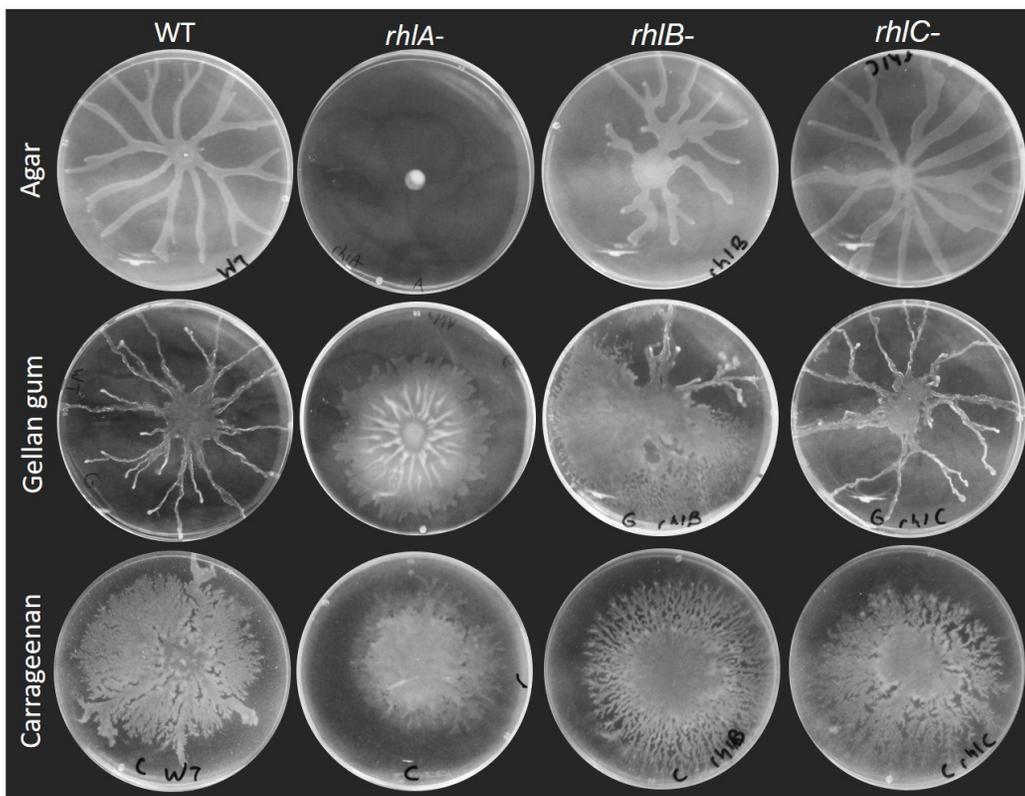


Figure 4.4 Surface motility of rhamnolipids biosynthesis mutants (*rhIA*-, *rhIB*- and *rhIC*-) compared to WT.

Motility assays were conducted on M9DCAA solidified with either agar (0.5%), carrageenan (0.5%) or gellan gum (0.1%). Pictures are representative of at least three biological replicates, repeated three times.

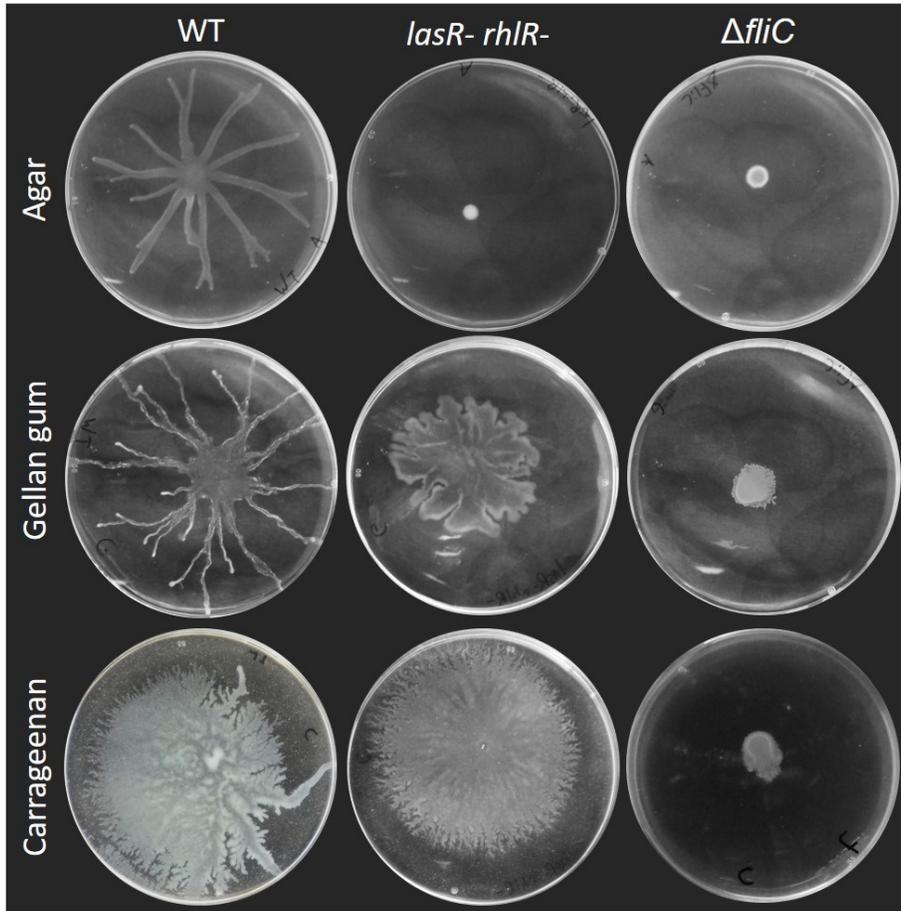


Figure 4.5 Surface motility on carrageenan and gellan gum media does not require quorum sensing and depends on the flagellum.

Swarming motility of quorum sensing-deficient *lasR- rhIR-* double mutant and flagellum-deficient *fliC-* of *P. aeruginosa* PA14 compared to wild type (WT) on agar M9DCAA semi-solid gels with agar (0.5%), carrageenan (0.5%) and gellan gum (0.1%). Each picture is representative of three biological replicates.

Surprisingly, however, this was not true when swarming was assessed on plates solidified with the other gelling agents. A *rhIA-* mutant retains its ability to spread across the surface of a carrageenan or gellan gum gel, albeit in a circular form that is distinct between the two agents. This suggests that the need to produce a wetting agent is not indispensable for swarming motility, or that the surface spreading phenotype we observe is not swarming *per se*. Interestingly, the colony pattern of the *rhIB-* mutant is distinct from the *rhIA-* and the WT, while *rhIC-* is similar to the WT under all conditions tested. Therefore, it appears that HAA, mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids would each contribute differently to the surface group behaviour pattern of *P. aeruginosa*.

Swarming motility was already reported to be affected by the brand of agar used to conduct the assays. Traces of furan-2-carboxylic acid were found to reduce the spread of swarming colonies

of *Pseudomonas collierea*, this molecule was present in variable quantities between different agar brands (Hara *et al.*, 2012). Certain agar brands used for *E. coli* and *Salmonella typhimurium* did not allow for a strong swarming motility phenotype compared to others (Harshey & Matsuyama, 1994). For *P. aeruginosa*, the use of different agar brands caused alteration in the swarming pattern (Leech & Mattick, 2006; Rashid & Kornberg, 2000). We asked ourselves if the consensus that rhamnolipids are essential for swarming on agar still holds true on various agar brands. We assessed the swarming phenotype of PA14 *rhIA*, *rhIB* and *rhIC*, along the wild-type, on these media. Figure 4.6 shows that none of the different agar brands allowed for the spread of the rhamnolipid-null *rhIA*-mutant. Furthermore, loss of either *rhIB* or *rhIC* has a similar impact on the swarming on various agar gels, despite altered phenotypes of the wild-type. We conclude that changing the type of gelling agent changes more drastically the motility phenotype of *P. aeruginosa* than the brands. Still, the brand of agar clearly affects the swarming patterns, and this should be considered when comparing independent studies.

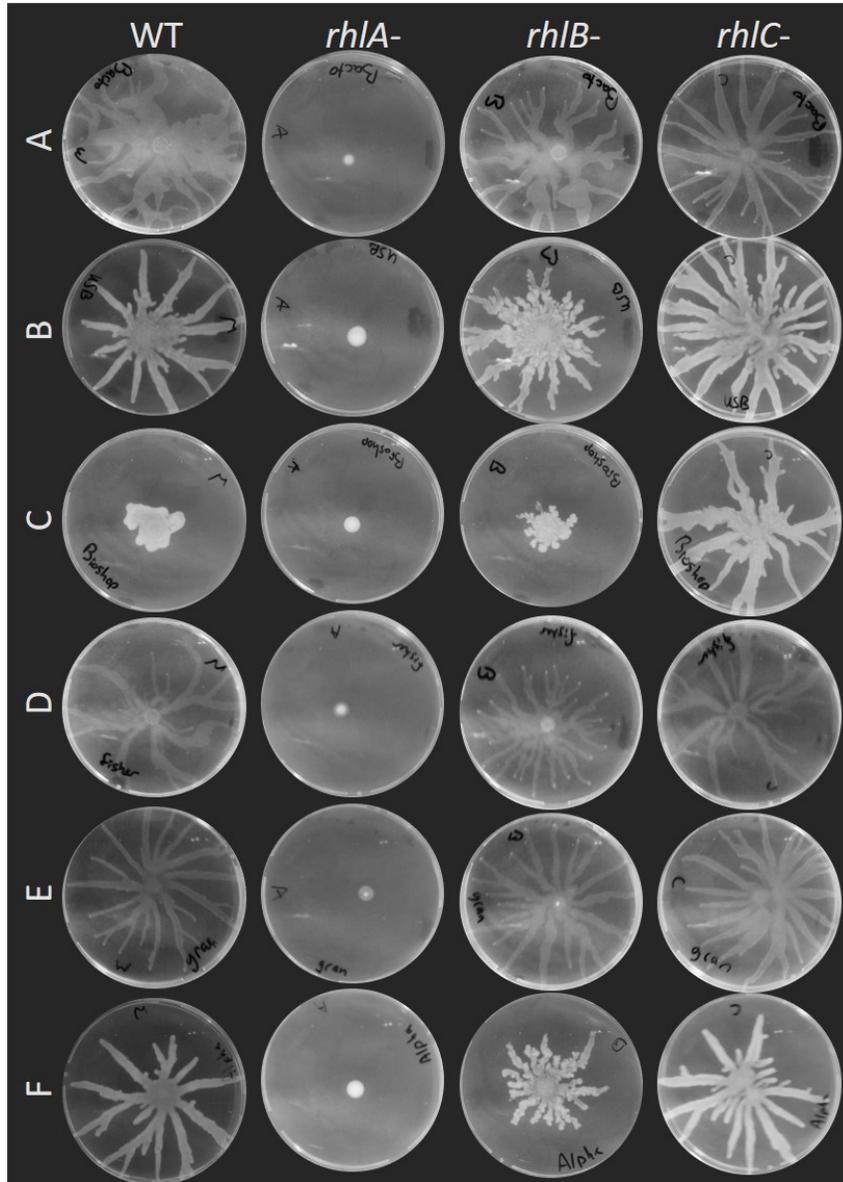


Figure 4.6 Swarming assay of PA14 WT, *rhlA*-, *rhlB*- and *rhlC*- mutants on M9DCAA media solidified with different agar brands.

A Bacto™ Agar (Difco). **B** Agar, bacteriological (USB). **C** Agar, bacteriological grade (Bioshop). **D** Agar (Fisher). **E** Granulated agar (Difco). **F** Agar, bacteriological (Alpha Biosciences). Each image is representative of three biological replicates.

There is a precedent for such *RhlA*-independent surface motility: *P. aeruginosa* surfing motility was characterized as a flagellum-dependent motility that is conducted on culture medium supplemented with mucin, highly O-glycosylated proteins produced by epithelial tissues. In these conditions, *P. aeruginosa* spreads in a circular pattern independent of production of rhamnolipids (Yeung *et al.*, 2012). This phenotype was proposed to be due to the lubricant action of mucin, since addition of the surfactant Tween 20 had a similar effect. To determine if motility of the *rhlA*-

mutant present here consists of surfing, we tested the surface motility of a double *lasR-rhIR*-mutant on gellan and carrageenan (Figure 4.5). Loss of these two genes—which are required for surfing (Yeung *et al.*, 2012)—did not prevent the surface spreading under our conditions, indicating that surfing is not the phenotype we observe.

One explanation would be that gels produced with gellan gum and carrageenan possess different surface tensions compared to agar. Indeed, we routinely noticed that drops of bacterial suspension spread a lot more on gellan gum and carrageenan gels compared to agar after inoculation, in the same manner that Figure 4.7 shows the spread of a drop of coloring agent on each gel surface. This spreading likely also explains the differences in colony sizes of the $\Delta fliC$ mutant between agar and the other gelling agents (Figure 4.5). Such differences in surface properties, or the addition of an external wetting agent (mucin or surfactant), could explain the ability to spread across surfaces without the need to release a wetting agent like rhamnolipids. Studies have reported that addition of surfactants into the swarming agar affects surface motility on agar (Yang *et al.*, 2017; Yeung *et al.*, 2012).

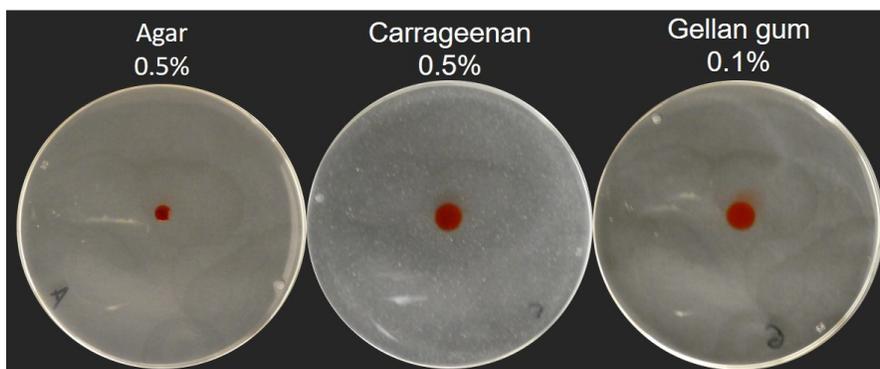


Figure 4.7 Spreading of aqueous coloring agent drops onto swarming gels.

A 5 μ L drop of 1% Red Congo spreads more when spotted onto a carrageenan or gellan gum gels, compared to an agar gel. Pictures were taken five minutes after the drop was added.

Multiple forces were described as important factors to induce branching instabilities and finger-like colony morphologies during bacterial swarming colony growth. Volumetric expansion relies on the mass buildup to push down on the colony, causing a passive expansion that can lead to uneven distribution of bacteria and the formation of finger-like protrusion (Giverso *et al.*, 2016). In a similar manner, chemotactic expansion relies on the detection of nutrients available on the vicinity and the diffusion of these nutrients that will lead to the formation of a dendritic pattern (Giverso *et al.*, 2016). Swarming of *P. aeruginosa* is considered to not require chemotaxis: transcriptomic analysis of swarm population indicated that chemotaxis genes were downregulated

(Harshey & Partridge, 2015; Tremblay & Déziel, 2010). Also, *P. aeruginosa* tendrils can move towards nutrient-depleted zones (Fauvart *et al.*, 2012). For biosurfactant-producing bacterial species like *P. aeruginosa*, tensioactive molecules are also involved in shaping the colony in a branched pattern as the result of surface tension gradients induced by the surfactants (Caiazza *et al.*, 2005; Fauvart *et al.*, 2012; Trinschek *et al.*, 2018). The latter mechanism is the most important in dictating the swarming morphology of *P. aeruginosa*: we have shown that HAA and rhamnolipids contribute to tendril formation by a combined effect of attraction and repulsion (Tremblay *et al.*, 2007). Indeed, the presence of HAA repels incoming tendrils, while di-rhamnolipids attracts them. Thus, it makes sense that *rhIA*- mutants, if allowed to spread, would do so in a circular pattern. However, spreading patterns between a *rhIA*- mutant on gellan gum is still slightly different from the one on carrageenan. The former has a flower-shaped pattern with a smooth edge while the latter displays tiny tendrils on its edges (Figure 4.8). This is interesting since, apart from rhamnolipids, no other factors are known to induce tendrils in *P. aeruginosa*. Using alternative gelling agents like carrageenan might allow us to discover other mechanism that coordinates the colony expansion of *P. aeruginosa* during surface motility.

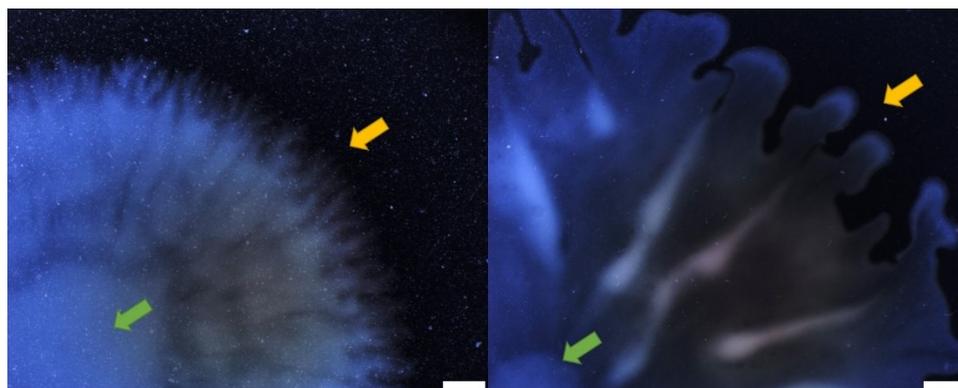


Figure 4.8 Darkfield images of colony border of PA14 *rhIA*- mutant on alternative gelling agents.

Carrageenan 0.5% (left) and gellan gum 0.1% (right). Yellow arrows point towards colony border, green arrows point towards colony center. Images were taken with Olympus SZX16 stereomicroscope. White scale bars represent 2 mm.

Another type of motility called sliding has been reported in *P. aeruginosa*, but this motility requires the production of a surfactant and does not require the flagellum (Holscher & Kovacs, 2017). Since surface motility is essentially abolished in the $\Delta fliC$ mutants for all gelling agents tested, this indicates that all forms of spread in these conditions depend on the flagellum. This suggests that the motility highlighted here is not sliding. Also, for media solidified by carrageenan and gellan gum, production of a wetting agent is no longer necessary. In the literature, swarming is defined as a social surface motility requiring a functional flagellum and the production of a wetting agent

(Kearns, 2010). Thus, the question remains: should these surface motilities be categorized as swarming in conditions where alleviating the surface tension is not required?

Apart from the impact of the gelling agent that we underline here, medium composition has been reported to impact the surface motility behaviour of *P. aeruginosa*. The contribution to swarming of multiple two-components systems was shown to be dependent on medium composition (Kollaran *et al.*, 2019). Both *lasRrhIR* and *rhIAB* double mutants were able to spread in a similar fashion to the WT on FAB medium with glutamate, as opposed to the same medium with glucose or succinate (Shrout *et al.*, 2006). Surface hardness and the osmolarity of the gel are two additional parameters that were reported to affect the swarming motility of *P. aeruginosa* (Kamatkar & Shrout, 2011; Yang *et al.*, 2017). Both parameters are tied to the medium composition: gel properties of carrageenan and gellan gum change depending on the pH and salt concentrations of the medium (Datta *et al.*, 2011; Giavasis *et al.*, 2000); osmolarity is dependent on the concentration of soluble molecules (salts, nutrients) in the gel (Yang *et al.*, 2017). In all, these parameters interact with each other and influence the surface behaviour of *P. aeruginosa*.

Agar was first used for the fabrication of culture media in 1882. Since then, it has become the primary gelling agent used in routine microbiology research (Das *et al.*, 2015). Most of our knowledge on bacterial behaviour comes from assays conducted on agar-based media. Alternatives to agar as the main gelling agent have been increasingly popular over the last decades, mainly for the purpose of isolating new bacterial species (Hara *et al.*, 2009; Nyonyo *et al.*, 2013; Stott *et al.*, 2008; Tamaki *et al.*, 2009; Tamaki *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2018). However, very few reports discuss the effect of alternative gelling agents on microbial surface behaviours. Gellan gum was found to more rapidly induce the differentiation of cyanobacterial *Nostoc* species into their motile hormogonium state (Nishizuka & Hashidoko, 2018). Some isolates from the Siberian soil were more motile on plates solidified with gellan gum (Hara *et al.*, 2009). Carrageenan was used to highlight the peculiar, snake-like spread of *Vibrio alginolyticus* (Bottcher *et al.*, 2016). Oftentimes, the motile phenotype described in these reports is “swarming in the broad sense” described by Henrichsen, i.e. any form of surface spreading (Henrichsen, 1972). Here, we show that changing the gelling agent has a pronounced impact on surface motility behaviour displayed by *P. aeruginosa*.

4.6 Conclusions

To explore the impact of the wetting agents produced by *P. aeruginosa* on swarming motility, we used alternative gelling agents—gellan gum and carrageenan—instead of agar, to solidify our

swarming medium. We found that simply changing the gelling agent has a profound impact on the surface spreading pattern of *P. aeruginosa*. Although all forms of surface motility appear dependant on the presence of a functional flagellum, loss of the wetting agent rhamnolipids did not impact these motile phenotypes in the same way as swarming. Therefore, we should always consider the gelling agent used as part of the factors to be considered when investigating bacterial social surface phenotypes and impact of exoproducts on microbial behaviour. Maybe we need to revise our definition of swarming motility to consider conditions where production of a wetting agent is not required.

4.7 Acknowledgments

We kindly thank Pr Barbara Kazmierczak (Yale) for providing plasmid pEX18Gm- Δ *fliC*. We also thank Julien Tremblay for constructing the *rhIC*- mutant.

4.8 Résultats complémentaires: Conditions physicochimiques influençant la motilité de surface.

Cette section contient des résultats liés à la thématique de l'article 1. Ils n'y ont pas été intégrés parce qu'ils ne cadraient pas dans l'histoire de l'article 1, ou ont été produits après sa publication. Les travaux montrés ici traitent de l'impact des conditions de culture sur l'étalement sur une surface.

4.8.1 Détails expérimentaux pour les résultats supplémentaires

4.8.1.1 Souches utilisées et conditions de croissances

Les souches utilisées lors des expérimentations présentées dans cette section sont regroupées dans la Table 4.2. Les souches bactériennes utilisées sont cultivées de routine dans du Tryptic Soy Broth (TSB, Difco), ou Tryptic Soy Agar (TSA, Alpha Biosciences) à 37°C.

Table 4.2 Souches utilisées dans cette section

Nom	Détails	Numéro ED	Références
PA14 WT	Souche sauvage de PA14	ED14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 $\Delta pilA$	Mutant incapable de produire ses pili de type IV	ED3398	(Morin & Déziel, 2021)
PA14 $\Delta pilA rhlA$ -	Sans pili de type IV ni rhamnolipides	ED3885	Cette étude
PA14 $rhlA$ -	Mutant incapable de produire des rhamnolipides et HAA (<i>rhlA::MrT7</i>)	ED1	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 $\Delta fliC$	Mutant sans flagelle	ED3956	(Morin & Déziel, 2021)
PA14 $\Delta pilA \Delta fliC$	Sans pili ni flagelle	ED4010	(Morin <i>et al.</i> , 2022)
PA14 $\Delta pilA \Delta fliC rhlA$ -	Sans pili, flagelle, ni rhamnolipides	ED4468	Cette étude
PA14 $\Delta pilA \Delta fliC \Delta rsmA$	Sans pili ni flagelle, et une délétion de <i>rsmA</i>	ED4594	Cette étude
PA14 $\Delta pilA \Delta fliC rhlA$ - $\Delta rsmA$	Sans pili, flagelle, ni rhamnolipides, et une délétion de <i>rsmA</i>	ED4595	Cette étude

4.8.1.2 Essai de motilité

Les essais de motilité sont basés sur la méthode décrite à la section 3.2. Certaines modifications sont effectuées concernant l'agent gélifiant utilisé, le type de milieu et sa composition. Ces détails sont clairement indiqués dans les figures présentées et leur légende respective.

Le milieu M9DCAA est utilisé en majorité lors de ces expérimentations et est modifié par l'ajout ou non de CaCl₂ (à une concentration finale de 1 mM). Ce composé est aussi parfois substitué par du MgCl₂ (concentration finale de 1 mM) et de l'AlNa(SO₄)₂ (concentration finale de 25 µM).

Le milieu BSM (Basal Salts Medium) est également utilisé. Sa composition finale est K₂HPO₄ (18,6 mM), NaH₂PO₄ (7,2 mM), NH₄Cl (37 mM), acide nitrilotriacétique (520 µM), MgSO₄ (810 µM), FeSO₄ (43 µM), MnSO₄ (20 µM), ZnSO₄ (10 µM), CoSO₄ (6,5 µM), acide casaminés (0,5 g/L), extrait de levure (0,5 g/L) et dextrose (4 g/L). Le milieu est préparé par le mélange de solutions stock 100X stérilisées à l'autoclave.

L'utilisation de la gomme de gellan (0,1 %) et la carraghénane (0,5 %) permet la conception d'un milieu qui ne requiert pas la production de surfactant par *P. aeruginosa* pour obtenir du *swarming*.

4.8.1.3 Transfert de la mutation *rhlA::MrT7*.

L'insertion du transposon présent dans le gène *rhlA* (*rhlA::MrT7*) a été transférée vers les souches $\Delta pilA$ et $\Delta pilA \Delta fliC$ par transformation d'une préparation du chromosome entier. L'ADN génomique d'une souche contenant le transposon est extrait et purifié. Cet ADN est transformé

dans les cellules des souches receveuses par électroporation (Choi *et al.*, 2006). Brièvement, 6 mL de culture de chaque souche receveuse est cultivé durant la nuit à 37°C. Chaque culture est centrifugée à 10 000 x g pendant deux minutes pour récupérer les cellules. Le surnageant est retiré et remplacé par une solution de 300 mM de saccharose stérile. Cette étape de lavage est répétée une seconde fois. Les cellules sont culotées puis resuspendues dans 100 µL d'une solution de 300 mM de saccharose. Un maximum de 5 µL d'ADN donneur pur est ajouté à la suspension bactérienne puis le mélange est placé dans une cuvette d'électroporation avec une chambre d'une largeur de 2 mm. La suspension subit une tension électrique de 2,5 kV, puis est immédiatement transférée dans 1 mL de bouillon nutritif (TSB ou LB). La culture est incubée à 37°C pendant au moins une heure pour permettre aux bactéries de récupérer. Après cette étape, la culture est centrifugée pour culoter les cellules, qui sont par la suite étalées sur une gélose sélective : un milieu TSA contenant une concentration finale de 15 µg/mL de gentamicine. Les géloses sont incubées à 37°C durant la nuit. Les colonies qui croissent sur la gélose sont réétalées sur gélose TSA-Gentamicine pour confirmer la présence du marqueur de sélection. La perte du gène *rhIA* produit un phénotype facilement confirmé par la vaporisation d'huile minérale colorée autour d'une colonie pour révéler la présence ou absence de rhamnolipides extracellulaires (Burch *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2020).

4.8.1.4 Délétion du gène *rsmA*

La délétion du gène *rsmA* se fait par échange allélique en utilisant le vecteur suicide pEX18Ap- $\Delta rsmA$ (pSR09). Le plasmide est transféré par conjugaison d'une souche donneuse de *Escherichia coli* SM10 vers les souches receveuses PA14 $\Delta pilA \Delta fliC$ et $\Delta pilA \Delta fliC rhIA^-$, basée sur une méthode publiée (Hmelo *et al.*, 2015). La conjugaison est effectuée en lavant des précultures de la souche donneuse et receveuse, qui sont par la suite mélangées ensemble dans une goutte de 100 µL de TSB placée sur la surface d'une gélose TSA incubée à 37°C pendant 4 à 6 heures. Les cellules sont ensuite récupérées, culotées, puis étalées sur un milieu sélectif : TSA contenant 300 µg/mL de carbénicilline pour sélectionner l'insertion par recombinaison homologues du vecteur suicide dans la souche receveuse et 25 µg/mL de triclosan pour contre-sélectionner la souche d'*E. coli* donneuse. Les géloses sont incubées durant la nuit à 37°C. Les conjugants obtenus sont récoltés de la gélose sélective puis incubés en bouillon pendant la nuit pour favoriser un deuxième événement de recombinaison homologue pour expulser du génome le plasmide inséré. Ce dernier contient le gène *sacB*, qui permet une contre-sélection par l'ajout de saccharose dans une gélose de sélection. La perte du plasmide peut donc être assuré par

une deuxième ronde de sélection sur milieu gélosé contenant de la tryptone (10 g/l), de l'extrait de levure (5 g/L) et du saccharose (10%). Les seconds recombinants ont perdu le plasmide et potentiellement le gène ciblé. La perte du gène est validée par amplification PCR du gène avec les amorces SR_RsmA-L-F-EcoRI 5'-ATGCGAATTCCTTCACGGTGCATCGCAACG-3' et SR_RsmA-R-R-HindIII 5'-AGCTAAGCTTTGACGACGGGGCCGCGTT-3' (Robitaille, 2020).

4.8.2 Les rhamnolipides ne sont pas le seul facteur contrôlant la formation des dendrites.

Les mutants incapables de produire des rhamnolipides sur gomme de gellane et carraghénane forment une bordure ondulée lors de leur expansion (Figure 4.8). Ceci est un indicateur que des facteurs autres que les rhamnolipides peuvent influencer la forme de la colonie. L'existence de ce ou ces facteur(s) est d'autant plus mise en évidence par la formation de dendrite qui est possible pour un mutant $\Delta pilA$ *rhIA*⁻. En effet, la perte du gène *pilA* cause l'adoption d'un patron de dispersion particulier caractérisé par la formation de dendrites très minces et étroitement collées. La Figure 4.9 montre l'aspect filamenteux des dendrites de ces mutants, présents malgré la perte du gène *rhIA*⁻.

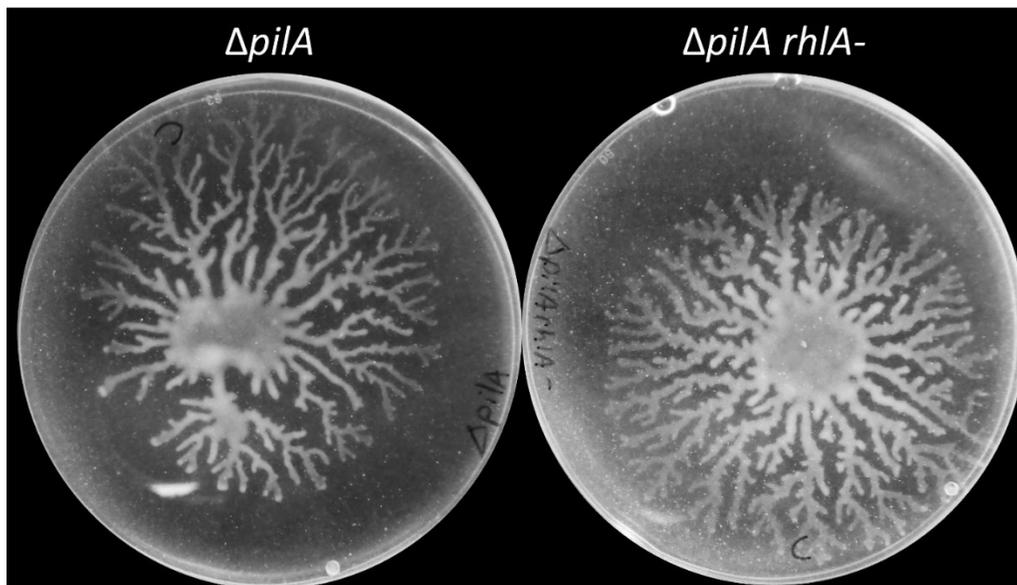


Figure 4.9 Formation de dendrites par un mutants $\Delta pilA$ *rhIA*⁻

Essai *swarming* sur gélose gélifiée avec de la carraghénane. La perte du gène $\Delta pilA$ induit la formation de dendrites minces (gauche), qui sont maintenues avec la mutation additionnelle du gène *rhIA* (droite). Ceci indique que dans ces conditions, un facteur autre que les rhamnolipides peut induire la formation de dendrites.

4.8.3 L'absence de calcium induit une motilité de surface flagelle-indépendante

Les caractéristiques de surfaces conférées par le type d'agent gélifiant utilisé est un facteur important qui influence la dispersion d'une colonie en *swarming*. Il est aussi très connu que les conditions nutritives du milieu ont un impact aussi important. Dans le cadre des essais de *co-swarming* (voir section 5, 2^e article), un milieu appelé BSM a été utilisé dans le but d'induire la production d'agent surfactant chez *Burkholderia cenocepacia* K56-2. De façon surprenante, la souche contrôle PA14 $\Delta fliC$ se déplaçait par elle-même dans ces conditions (Figure 4.10). Cette motilité est rhamnolipides-dépendante, puisqu'un mutant *rhlA*- est incapable de se déplacer dans ces conditions (Figure 4.10). De plus, la délétion additionnelle du gène *pilA* semble exacerber cette motilité. Le milieu BSM semble défavorable à la motilité de la souche sauvage, permettant à un mutant sans flagelle de s'étendre presque autant, un fort contraste avec le milieu M9DCAA utilisé normalement (Figure 4.11).

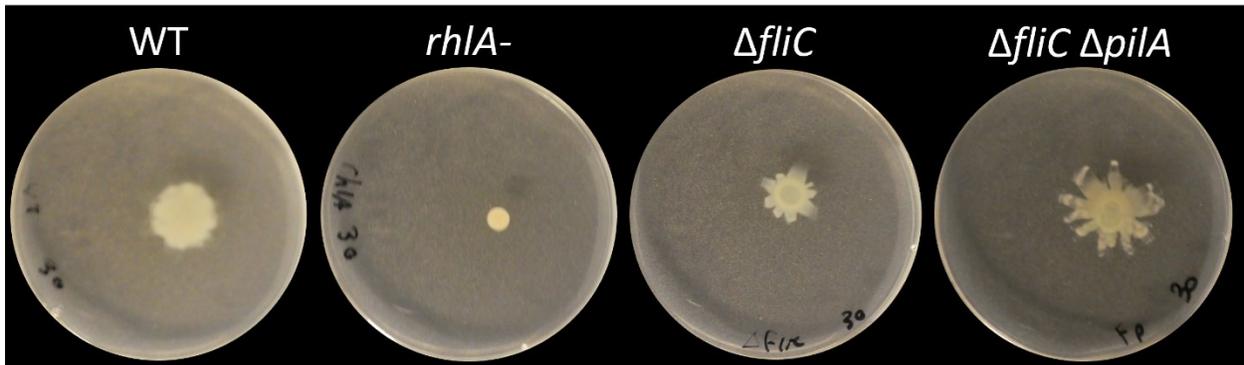


Figure 4.10 Motilité de mutants de PA14 sur milieux BSM

Un essai *swarming* est effectué sur milieu BSM gélifié avec de l'agar, à 37°C. La perte du flagelle ($\Delta fliC$) dans cette condition ne semble pas empêcher la colonie de s'étendre en formant de petites dendrites.

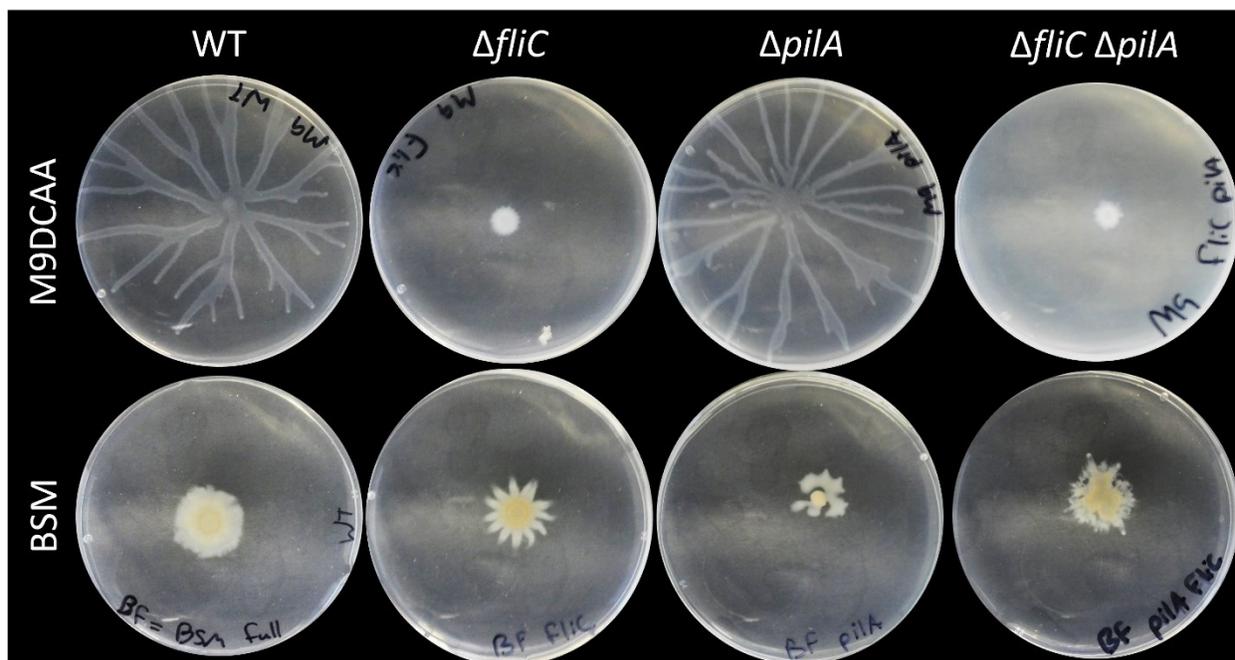


Figure 4.11 Comparaison entre le phénotype d'étalement sur les milieux M9DCAA et BSM pour divers mutants.

Divers mutants de *P. aeruginosa* PA14 ont été inoculés sur gélose *swarming* gélifié avec agar contenant soit le milieu M9DCAA standard (en haut), soit le milieu BSM. L'incubation a été faite à 37°C. L'utilisation du BSM induit la motilité d'un mutant sans flagelle ($\Delta fliC$), mais a un impact négatif sur la souche WT (comparé au M9DCAA).

Une motilité flagelle-indépendante et rhamnolipides-dépendante a déjà été reportée pour *P. aeruginosa* : le *sliding* (Murray & Kazmierczak, 2008). Des essais préliminaires ont tenté d'élucider la différence au niveau des éléments nutritifs entre les deux milieux qui peuvent expliquer l'induction de ce *sliding*. La Table 4.3 montre la comparaison sommaire entre la composition du milieu M9DCAA et celle du BSM. Les différents composants de ces deux milieux ont été regroupés en trois groupes : la base tamponnée, les métaux traces et les sources de carbone. Des milieux hybrides contenant la base BSM avec un des groupes de composant du milieu M9DCAA ont été évalués dans leur capacité à induire le *sliding*. L'impact des métaux semblent être le plus important pour induire cette motilité (Figure 4.12).

Table 4.3 Comparaison de la composition nutritive entre les milieux M9DCAA et BSM

Milieu	M9DCAA		BSM	
Base Tampon	NH ₄ Cl	20 mM	NH ₄ Cl	37 mM
	Na ₂ -HPO ₄	12 mM	K ₂ -HPO ₄	19 mM
	K-H ₂ PO ₄	22 mM	Na-H ₂ PO ₄	7 mM
	NaCl	8.6 mM	NaCl	0 mM
Métaux	Métaux*	Ca, Mg	Métaux*	Mg, Fe, Mn, Zn, Co
Source de carbone	Acides casaminés	0.5 %	Acides casaminés	0.05 %
	Extrait de levure	0 %	Extrait de levure	0.05 %
	Dextrose	11 mM	Dextrose	22 mM
	Acide nitrilotriacétique	0 mM	Acide nitrilotriacétique	0.5 mM

La composition est séparée en trois groupes : les composants de la base tamponnée (vert), les métaux traces (orange) et les sources de carbone (bleu). (*) ces métaux sont présents sous forme de traces (moins de 1 mM), la composition est donc caractérisée par leur présence et absence.

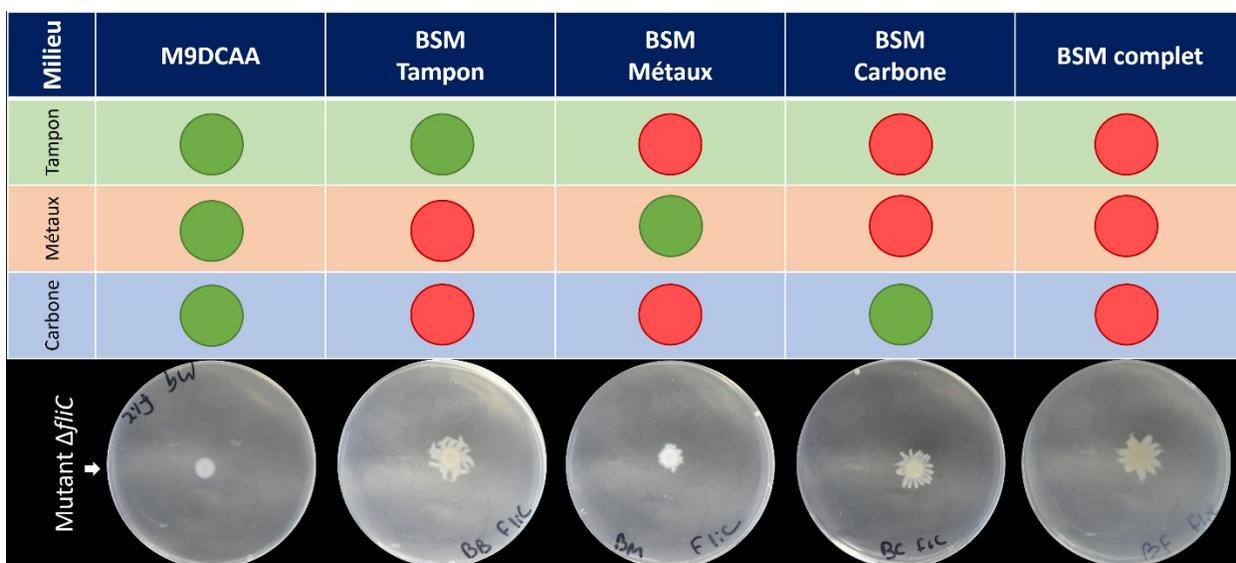


Figure 4.12 Comparaison de la dispersion induite pour le mutant aflagellaire $\Delta fliC$ pour divers milieux hybrides.

Le mutant $\Delta fliC$ a été inoculé sur divers milieux dont la composition est décrite dans la partie du haut. Les pastilles vertes indiquent que la composition de ce groupe appartient au M9DCAA, les pastilles rouges indiquent une appartenance au BSM. Sous chaque colonne se trouve le phénotype du mutant $\Delta fliC$ dans ces conditions. BSM Tampon : milieu BSM avec la base tamponnée du M9DCAA. BSM Métaux : milieu BSM avec les métaux traces du M9DCAA. BSM Carbone : milieu BSM avec les sources de carbone du M9DCAA. Détails de la composition se trouvent dans la Table 4.3. L'incubation est faite à 37°C.

Le *sliding* rapporté par Murray et Kazmierczak en 2008 a été observé chez un mutant $\Delta pilA \Delta fliC$ de la souche PAO1 sur un milieu basé sur la recette du M8 (Murray & Kazmierczak, 2008). Une différence notable entre leurs conditions expérimentales et les nôtres est l'absence de calcium dans leur milieu (aussi absent dans le BSM). Le milieu M9DCAA est normalement complété avec 1 mM final de $CaCl_2$. En comparant le phénotype d'un tel mutant dans nos conditions standards, ainsi que le même milieu sans l'ajout de calcium, nous observons qu'un mutant $\Delta pilA \Delta fliC$ de PA14 active ce type de locomotion dans le milieu M9DCAA sans calcium (Figure 4.13). La présence ou absence de calcium a très peu d'impact sur la motilité du WT. Ce *sliding* requiert la sécrétion de rhamnolipides dans ces conditions, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'expansion lorsque le gène *rhlA* est inactivé.

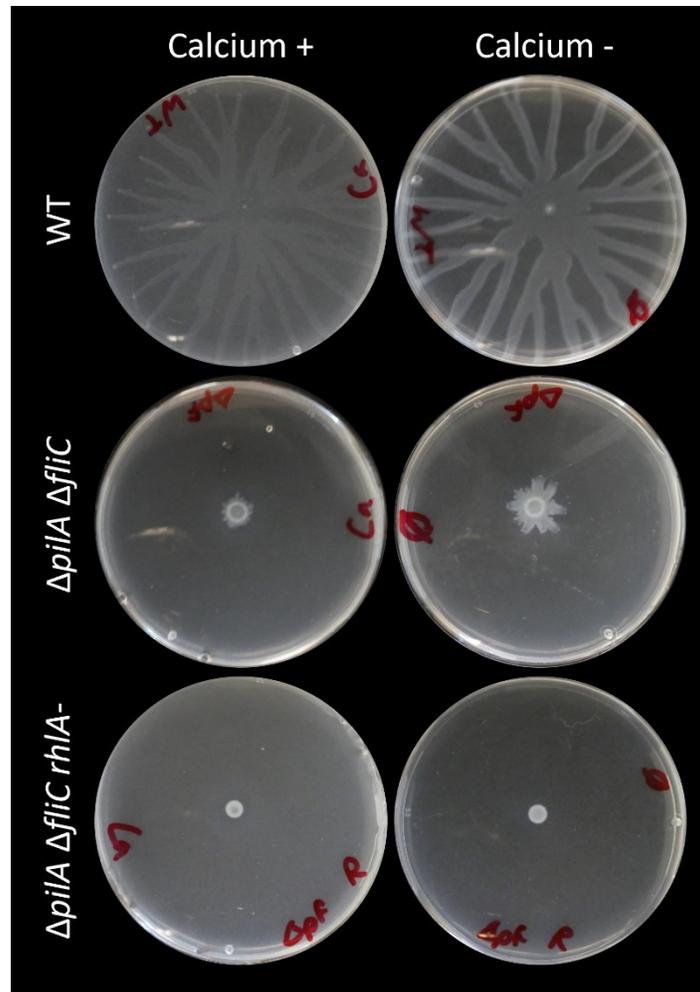


Figure 4.13 L'absence de calcium induit le *sliding* d'un mutant $\Delta pilA \Delta fliC$

La motilité de PA14 WT, PA14 $\Delta pilA \Delta fliC$ et PA14 $\Delta pilA \Delta fliC rhlA-$ a été évaluée sur milieux M9DCAA-agar standard (avec calcium) et M9DCAA sans calcium, après environ 20 heures à 37°C. L'absence de calcium induit l'expansion de la colonie sans flagelle ni pili de type IV, qui sont les deux appendices locomoteurs connus de *P. aeruginosa*. Cette expansion maintient une forme étoilée caractéristique à cause de la sécrétion de rhamnolipides. Cette observation a été répétée plusieurs fois.

Le *sliding* est souvent caractérisé par une expansion passive causée par l'accumulation de biomasse qui ne peut s'épandre en hauteur (expansion volumétrique). Il existe aussi une forme de motilité dépendante de la production de surfactant où la force qui permet l'expansion sont les gradients de tension de surface : nommée *surfing*. Pour discriminer entre le *sliding* et le *surfing*, nous pouvons utiliser la gomme de gellane pour créer des conditions qui ne requièrent pas de contrer la tension de surface. La Figure 4.14 montre que l'expansion d'un mutant $\Delta pilA \Delta fliC rhlA-$ est possible sur un milieu gélifié avec la gomme de gellane. Nous pouvons donc déduire de ces observations que l'expansion de ce mutant est indépendante des gradients de tension de surface produits par la sécrétion de rhamnolipides. Le phénomène observé est donc bel et bien du *sliding*.

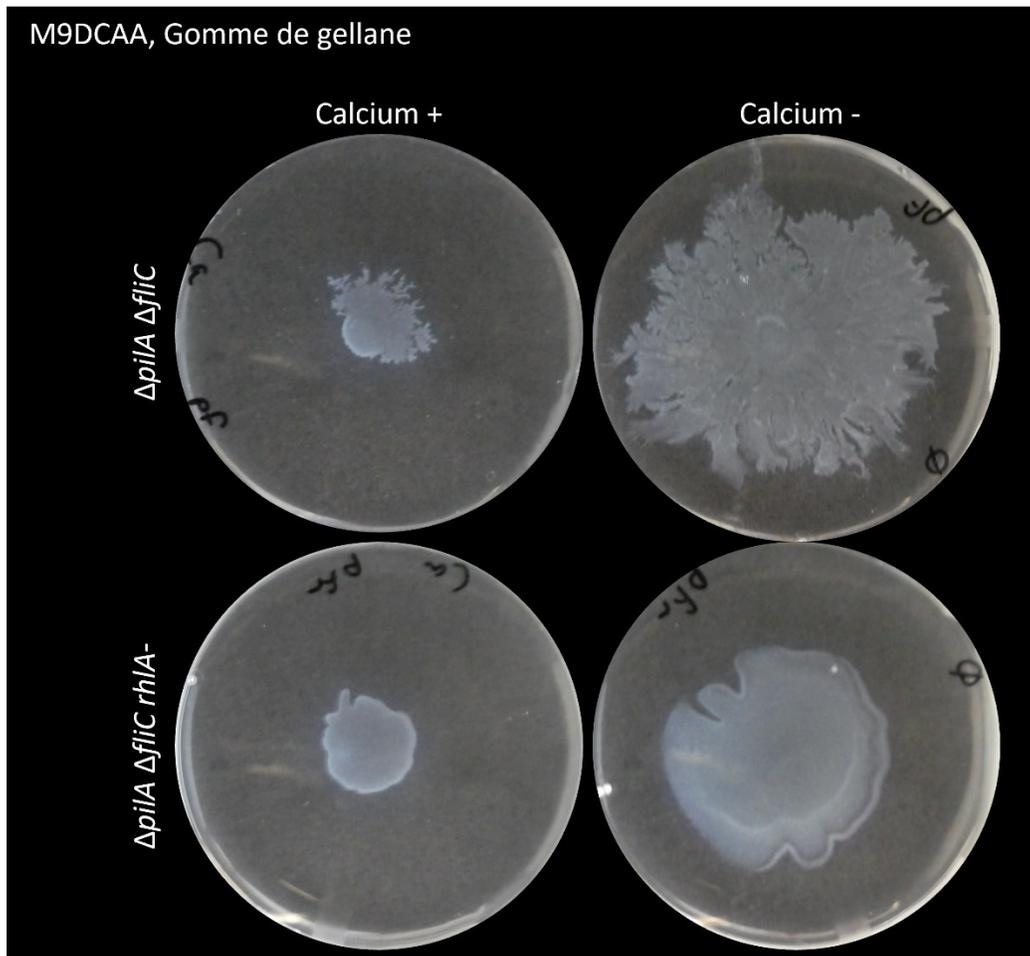


Figure 4.14 L'expansion en *sliding* est possible sans production de rhamnolipides sur milieux gélifié à la gomme de gellane.

Un essai de motilité a été conduit avec les mutants PA14 $\Delta pilA \Delta fliC$ et PA14 $\Delta pilA \Delta fliC rhlA-$ sur milieu M9DCAA gélifié avec la gomme de gellane. Les conditions incluent l'ajout de calcium ($CaCl_2$, condition standard) et sans ajout de calcium. Le mutant $\Delta pilA \Delta fliC rhlA-$ maintient un gain de motilité en absence de calcium malgré son incapacité de produire des rhamnolipides. La perte de la production de rhamnolipides entraîne cependant l'absence de dendrites.

Pour confirmer le tout, le calcium du milieu M9DCAA a été remplacé par un autre ion, soit le magnésium ou l'aluminium. Le choix est basé sur le fait que le calcium et le magnésium sont deux ions divalents de la même classe (alcalino-terreux) alors que le calcium et l'aluminium ont tous les deux la capacité d'interagir avec les rhamnolipides, l'aluminium ayant une affinité environ 100 fois plus élevée que le calcium (Ochoa-Loza *et al.*, 2001). La Figure 4.15 montre que remplacer le calcium par le magnésium ne permet pas de maintenir la répression du *sliding*. L'activation du *sliding* en absence de calcium semble donc lié à l'ion Ca^{2+} lui-même et non pas à cause d'un changement de pression osmotique ou d'intégrité de la matrice du gel lié à l'absence d'un sel.

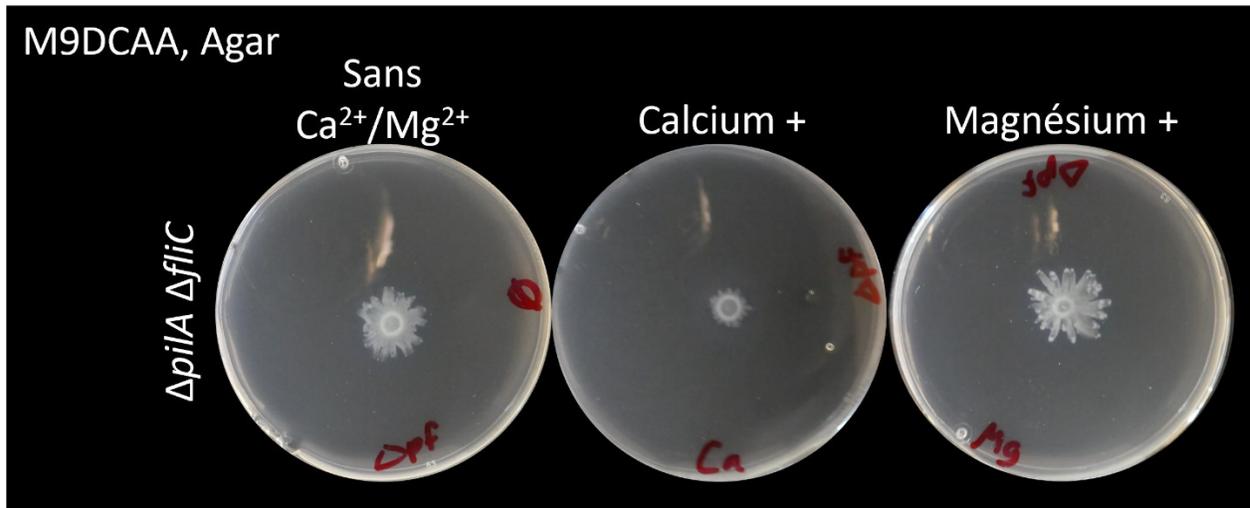


Figure 4.15 L'ajout de MgCl_2 n'a pas le même impact physiologique que l'ajout de CaCl_2 .

Essai de motilité sur milieu M9DCAA gélifié avec de l'agar, en croissance pendant environ 20 heures à 37°C. Le milieu contient soit du CaCl_2 (1 mM), soit du MgCl_2 (1 mM), soit aucun des deux. Le magnésium n'a pas le même impact sur la motilité que le calcium.

L'impact de l'interaction entre les rhamnolipides et le calcium peut également être infirmé. Dans des conditions rhamnolipides dépendantes, comme sur un gel d'agar, l'ajout d'aluminium a bel et bien un effet similaire à l'ajout de calcium (Figure 4.16). Cependant, cet effet n'est pas visible dans des conditions rhamnolipides-indépendante (gomme de gellane), où l'ajout de l'aluminium n'a pas cet effet (Figure 4.16). Nous pouvons donc en conclure que l'aluminium réduit la motilité en affectant les propriétés des rhamnolipides, alors que le calcium contrôle l'induction du sliding par une fonction physiologique spécifique.

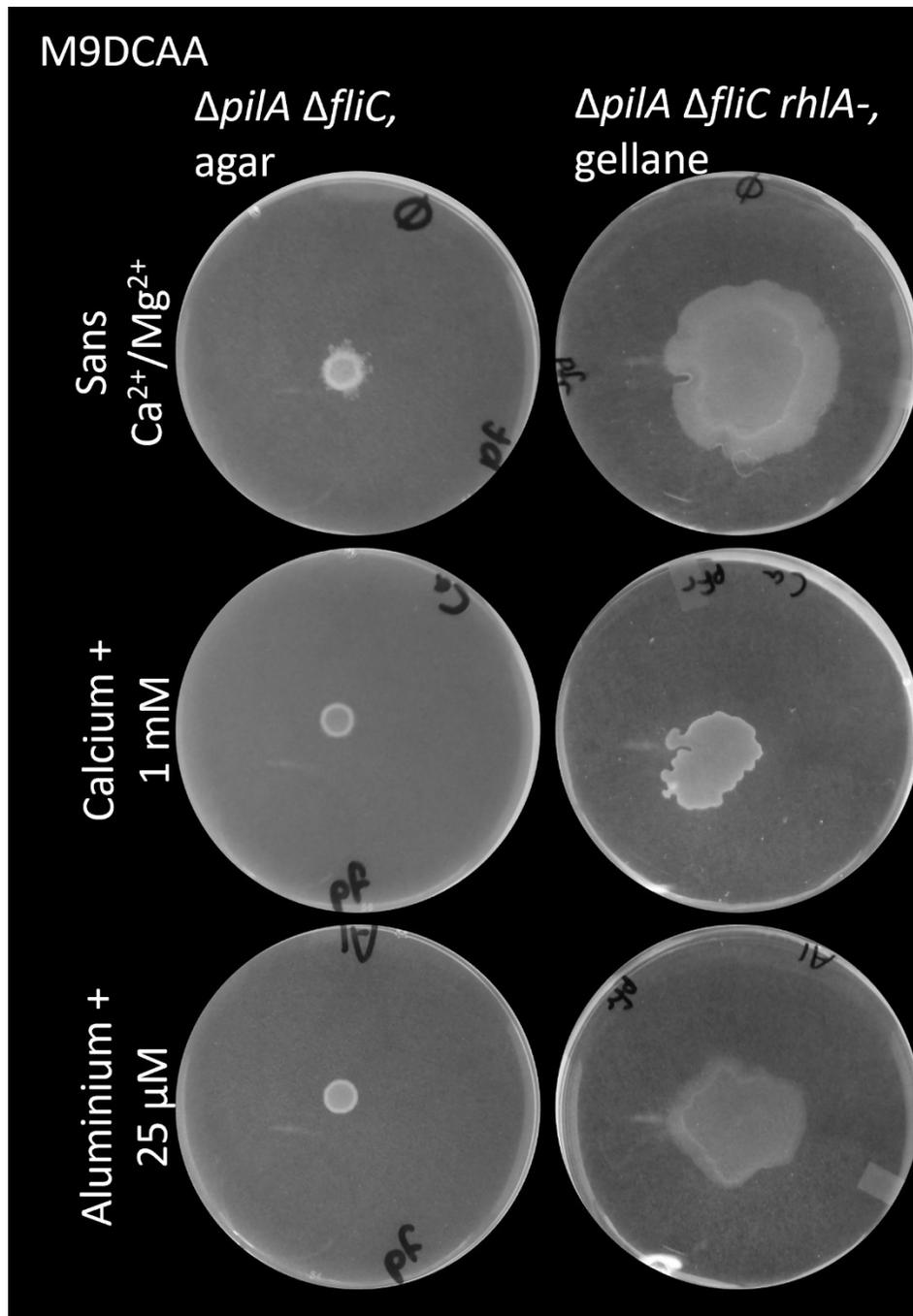


Figure 4.16 La contribution de l'aluminium à la motilité de surface est rhamnolipides-dépendante.

Essai de motilité des souches $\Delta pilA \Delta fliC$ sur agar (colonne de gauche) et $\Delta pilA \Delta fliC rhlA-$ sur gomme de gellane (colonne de droite). L'essai est effectué à 37°C pendant environ 20 heures. Sur agar (conditions rhamnolipides-dépendantes), l'ajout d'aluminium [$AlNa(SO_4)_2$ 25 μM] réduit le sliding comme le $CaCl_2$ (1 mM). Cependant, ce n'est pas le cas sur gellane, où les rhamnolipides ne sont pas requis pour l'étalement et où l'ajout d'aluminium a très peu d'impact sur la motilité.

4.8.4 L'apport de la voie Gac/Rsm dans le contrôle du *sliding*

Les seules données publiées concernant le *sliding* chez *P. aeruginosa* suggèrent un contrôle de cette motilité par la voie Gac/Rsm : un mutant *gacA*- (activé par GacS) dans cette étude a un *sliding* accru contrairement à un mutant *retS*- (antagoniste de GacS, voir Figure 1.10) (Murray & Kazmierczak, 2008). Ce contrôle a été évalué dans nos conditions expérimentales en ajoutant la délétion complète du gène *rsmA* aux souches mutantes $\Delta pilA \Delta fliC$ et $\Delta pilA \Delta fliC rhlA$ - pour produire un triple et un quadruple mutant, respectivement. RsmA est le régulateur global de la transition entre la vie motile et la vie sessile, la perte de RsmA est généralement associée à une perte de motilité (Mikkelsen *et al.*, 2011b). La Figure 4.17 montre que la perte de RsmA cause une grande réduction du *sliding* dans les conditions standards (sur agar), ce qui correspond aux observations rapportées dans la littérature (Murray & Kazmierczak, 2008). Cependant, la perte de RsmA n'induit pas une réduction du *sliding* dans des conditions rhamnolipides-indépendantes (gomme de gellane). En fait, la morphologie semble se complexifier lorsque le gène *rsmA* est inactif, passant d'une colonie ronde et lisse ($\Delta pilA \Delta fliC rhlA$ -) à une colonie compartimentée et ondulée ($\Delta pilA \Delta fliC rhlA$ - $\Delta rsmA$) (Figure 4.17).

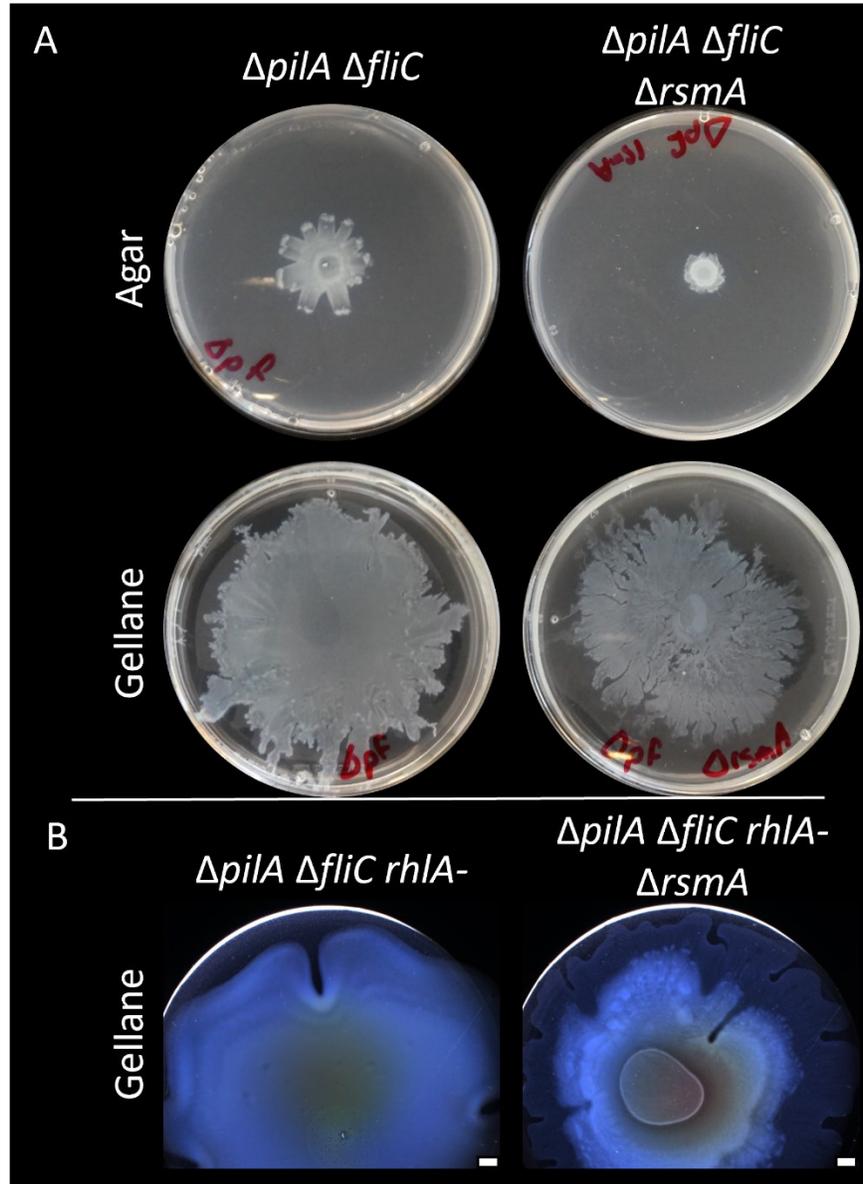


Figure 4.17 Contribution du régulateur RsmA dans l'induction du *sliding*

Essai de motilité effectué sur milieu M9DCAA sans calcium, en croissance à 37°C pendant environ 20 heures. **A** Images de géloses entières prises avec un appareil photo. La perte de RsmA réduit grandement l'étalement en swarming sur agar (haut), mais a très peu d'impact sur un milieu gélifié avec la gomme de gellane (bas). **B** Images prise au stéréomicroscope. Croissance sur milieu M9DCAA gélifié avec de la gellane. La perte de RsmA produit une morphologie plus complexe (droite), qui est autrement très lisse (gauche). Les petites barres blanches représentent une échelle de 2 mm.

4.9 Discussion

Les résultats présentés dans le présent chapitre proposent que les comportements de surface que *P. aeruginosa* peut adopter sont très variés et sont intimement liés aux paramètres physicochimiques du milieu de culture. Ceci n'est pas un nouveau concept : les conditions expérimentales utilisées dans les diverses études publiées sur le *swarming* n'utilisent pas toutes les mêmes conditions de culture. Il n'est pas rare que deux articles publiés aient des conclusions différentes quant à l'impact d'un système de régulation sur le *swarming*. Le meilleur exemple de ceci concerne l'implication des pili de type IV sur le *swarming*. Plusieurs travaux relèvent l'importance de ces appendices pour le *swarming* (Kohler *et al.*, 2000; Leech & Mattick, 2006). Mes propres observations en laboratoire montrent que la perte de ces pili a très peu d'impact sur la motilité de type *swarming* de *P. aeruginosa* en milieu M9DCAA, mais qu'un mutant $\Delta pilA$ a un gros défaut d'étalement sur milieu BSM. Mes travaux révèlent principalement que l'agent gélifiant – utilisé pour la conception des milieux semi-solides – a un impact critique sur le comportement de surface de *P. aeruginosa* : dans le cas présent en enlevant le besoin de l'action tensioactive des rhamnolipides. De plus, l'absence de calcium permet à PA14 d'activer une motilité appelée *sliding* pour se déplacer sans flagelle. D'autant plus intéressant, ces deux paramètres (absence de calcium et agent gélifiant alternatif) ont des effets additifs et peuvent être combinés pour obtenir des conditions d'étude où les bactéries s'étaient sans besoin de flagelle, pili, ni rhamnolipides. Ces conditions uniques ouvrent la porte sur une étude plus large du comportement de surface de *P. aeruginosa*. Cependant, ces conditions de croissances n'ont pas été développées pour se rapprocher des conditions physiologiques d'un hôte ou d'un autre environnement spécifique. Il est donc difficile de tirer un parallèle quant à l'impact de ces travaux sur la pathogénèse de *P. aeruginosa*, ou le comportement de cette bactérie dans la nature.

4.9.1 Utilisation des agents gélifiants

L'agar est de loin l'agent gélifiant le plus utilisé en microbiologie. Et pour de bonnes raisons : il forme des gels clairs, stables et rarement dégradés par des microorganismes. De plus, il est facile d'utilisation avec ses points de fusion et gélification à environ 85°C et 40°C, respectivement (Das *et al.*, 2015). D'autres agents gélifiants sont utilisés dans des conditions où l'agar n'est pas approprié parce que l'organisme d'étude dégrade l'agar, ou pour des milieux de culture à haute température et/ou pH extrêmes (Childers *et al.*, 1992; Datta *et al.*, 2011). Pour ces raisons, des agents gélifiants autre que l'agar sont parfois utilisés pour isoler de nouveaux microorganismes (Nyonyo *et al.*, 2013; Stott *et al.*, 2008; Tamaki *et al.*, 2005). Il existe tout de même quelques rares

exemples dans la littérature où les agents gélifiants alternatifs ont été utilisés pour explorer le phénotype de certaines bactéries. La carraghénane a été utilisée par Bottcher et ses collègues (2016) pour mettre en évidence les particularités de la motilité de type *swarming* de la bactérie *Vibrio alginolyticus*. Dans cette étude, la carraghénane est spécifiquement choisie pour reproduire une surface modèle similaire aux algues rouges infectées par *V. alginolyticus* (Bottcher *et al.*, 2016). Dans une autre étude, la gomme de gellane a été comparée à l'agar quant à leurs impacts sur la motilité des hormogonies d'une cyanobactérie du genre *Nostoc*. Une gélose constituée de gellane induisait une plus rapide différenciation en la forme hormogonie de la cyanobactérie et une plus forte motilité de cette dernière (Nishizuka & Hashidoko, 2018).

Le polyacrylamide a aussi été utilisé dans quelques études phénotypiques d'organismes modèles mésophiles. Ceci est dû à la possibilité pour l'acrylamide de former des gels où la rigidité du gel n'est pas corrélée à la taille des pores de la matrice : en contrôlant le ratio entre l'acrylamide et la bis-acrylamide dans le gel. Une étude présente un lien entre la rigidité du gel et l'expansion d'une colonie en biofilm (Asp *et al.*, 2022). Dans ce cas, l'augmentation de la rigidité semble faciliter l'expansion en augmentant les microdéformations du gel causés par les bactéries. Ces déformations locales seraient causées par un gradient de pression osmotique autour de la colonie induit par la sécrétion d'EPS, permettant l'étalement du biofilm (Asp *et al.*, 2022; Srinivasan *et al.*, 2019).

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai utilisé l'agar, la carraghénane et la gomme de gellane pour explorer leur impact sur la motilité de surface de *P. aeruginosa*. J'ai aussi réalisé des essais préliminaires avec la gomme de xanthane et l'isabgol (enveloppe de graines de psyllium) (Das *et al.*, 2015; Sahay, 1999). Malheureusement, ces deux agents gélifiants n'ont pas de propriété intéressante pour former de bons gels : la gomme de xanthane a un pouvoir gélifiant beaucoup trop faible pour former des gels stables, alors que l'isabgol forment des gels opaques qui rendent leur observation et leur utilisation difficiles. Il existe plusieurs autres agents gélifiants que je n'ai pas évalués. L'un d'eux est la gomme de guar – un polysaccharide extrait d'une légumineuse – dont l'utilisation a déjà été publiée (Jain *et al.*, 2005).

L'agar a été rapidement adopté pour les études microbiologiques suivant son introduction par Fanny et Walther Hesse en 1881 au profit de la gélatine (Hitchens & Leikind, 1939). Selon moi, il est intéressant d'imaginer un monde où un autre agent gélifiant aurait été suggéré à cette époque. Ceci aurait profondément changé les observations et les connaissances sur les bactéries obtenues depuis.

4.9.2 Différences entre l'agar, la carraghénane et la gomme de gellane

L'agar est un mélange de polysaccharides du type galactane extrait d'algues rouges des genres *Gelidium* et *Gracilaria*. Ce mélange est constitué principalement de deux oligo-disaccharides (Chi *et al.*, 2012). L'agarose est composé de répétitions du disaccharide agarobiose [β -(1,4)-D-galactose- α -(1,3)-L-galactose] et de quelques répétitions de porphyrobiose [β -(1,4)-D-galactose- α -(1,3)-L-galactose-6-sulfate]. Le deuxième oligo-disaccharide, la porphyrane, est plus riche en porphyrobiose qu'en agarobiose. Le ratio agarose/porphyrane qui compose l'agar change beaucoup selon l'algue choisie pour la production (Chi *et al.*, 2012; Hehemann *et al.*, 2010). Les conditions de croissance et les méthodes d'extraction ont aussi un grand impact sur ces proportions. Par exemple, l'agarose commercial utilisé en biologie moléculaire contient virtuellement aucune porphyrane. Étrangement, l'agarose de grade moléculaire permet la motilité de surface rhamnolipides-indépendante observée avec la gellane et la carraghénane (données non montrées). Malheureusement, la porphyrane ne semble pas être disponible sur le marché, ou atteint des prix de l'ordre de 100\$/g. Il serait donc difficile de comparer cette observation avec de la porphyrane pure ou des ratio précis d'agarose/porphyrane. Selon les observations que j'ai effectuées, seul l'utilisation de l'agar semble mener à un besoin des rhamnolipides, il se peut donc que ce besoin soit lié aux caractéristiques d'un gel qui inclus la porphyrane.

La carraghénane est aussi un mélange de galactanes isolés à partir de certaines espèces d'algues rouges, entre autres des genres *Condrus* ou *Gigartina*. Sa structure est très similaire à l'agar, avec comme principale différence le changement du α -L-galactose pour un α -D-galactose dans la chaîne principale (Usov, 1998). Cette chaîne contient aussi un plus grand nombre de groupement sulfate que l'agar. Le degré de sulfatation est désigné par une lettre grecque, dont κ -carraghénane, ι -carraghénane et λ -carraghénane qui en contiennent une, deux et trois groupement sulfates par répétition de disaccharides, respectivement. Le degré de sulfatation influence le pouvoir gélifiant de ce polymère (Usov, 1998). Dans le cadre du projet actuel, le mélange de carraghénane utilisé est composé en majorité de κ -carraghénane. J'ai réalisé des essais préliminaires avec de la κ -carraghénane pure (Sigma), mais cet agent gélifiant ne semblait pas capable de permettre la croissance de *P. aeruginosa* dans nos conditions (données non montrées).

La gomme de gellan est un polymère riche en glucose extrait de bactéries du genre *Sphingomonas*, principalement *Sphingomonas elodea* (Giavasis *et al.*, 2000). La structure de ce polymère contient des répétitions de β -(1,3)-D-glucose- β -(1,4)-D-acide glucuronique- β -(1,3)-D-glucose- α -(1,4)-L-rhamnose. La structure du gel formé par la gomme de gellane est très

dépendante de la concentration en cation (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} et Na^{+}) dans la solution, et ne forme aucun gel dans de l'eau distillée. C'est une des raisons pour laquelle l'activation du *sliding* par l'absence de calcium a été validée sur gomme de gellane en remplaçant par du magnésium, pour compenser la contribution de l'ion Ca^{2+} à la matrice du gel. Dans le cas de cette activation, remplacer le CaCl_2 par le MgCl_2 a le même effet sur le phénotype que l'absence de ces deux sels. Ceci suggère que l'effet sur le *sliding* dépend d'un effet physiologique du calcium directement et non d'une perturbation de la structure du gel.

Les caractéristiques physiques d'un gel sont cruciales pour permettre à une population bactérienne de s'étaler sur leur surface. Dans le cas de nos propres conditions expérimentales, la concentration d'agar, le temps de séchage des géloses et même la marque d'agar sont des éléments à prendre en compte pour réaliser des essais de motilité qui sont reproductibles et consistants (Harshey & Matsuyama, 1994; Morin & Déziel, 2021; Tremblay & Déziel, 2008). Mes travaux présentent la différence de phénotype causée par l'utilisation de différentes marques d'agar, qui ont été rapportée dans d'autres études auparavant (Hara *et al.*, 2012; Harshey & Matsuyama, 1994; Leech & Mattick, 2006). Différentes marques d'agar ont des variations physicochimiques à cause de leur niveau de pureté. Un bon exemple de cela a été publié par Hara et ses collègues en 2012, qui ont démontré que la présence d'une molécule contaminante (l'acide furan-2-carboxylique) varie entre les marques d'agar. Cette molécule influence grandement la motilité de surface de *Pseudomonas colliera* et d'autres espèces bactériennes qu'ils ont testés (Hara *et al.*, 2012). Tel mentionné précédemment, ces différentes marques d'agar peuvent aussi posséder un ratio agarose/porphyrane différent les uns des autres. À voir les différences subtiles qui existent entre différentes préparations commerciales d'agar, il n'est pas surprenant que d'autres agents gélifiants produisent des gels d'autant plus différents et permettent ainsi de mettre en évidence des modes de déplacement variés et inconnus chez les bactéries.

Est-ce que ces gels alternatifs permettent de mieux représenter les surfaces naturelles que les bactéries colonisent? En fait, je crois que ce n'est pas le cas. Ces agents gélifiants maintiennent principalement une utilité d'étude en tant que modèle de laboratoire. Une observation effectuée sur agar qui demeure vraie lorsqu'évaluée avec d'autres gels est donc renforcée. C'est le cas de la formation de dendrites dépendantes des rhamnolipides, qui est observée sur les trois gels testés. Malgré le fait que les rhamnolipides perdent leur nécessité au niveau de l'induction du *swarming* sur carraghénane et sur gomme de gellane, ils maintiennent leur importance dans le patron de dispersion dendritique qu'adopte *P. aeruginosa* PA14.

4.9.3 Contribution de la surface à la motilité

Le modèle actuel d'étalement d'une colonie bactérienne implique principalement les échanges d'eau entre la colonie et le gel, soit par la pression capillaire (*swarming*) ou la pression osmotique (biofilm) (Srinivasan *et al.*, 2019). Une augmentation de la concentration d'agar ou du temps de séchage réduit cette disponibilité de l'eau (Yang *et al.*, 2017). De plus, la concentration en micro- et macronutriments influencent la capacité de rétention d'eau d'un gel, une forte concentration en soluté va réduire l'étalement d'une colonie en *swarming* (Yang *et al.*, 2017). Les travaux de Asp (2022) soulignent la contribution distincte entre la rigidité et la taille des pores d'une matrice en utilisant un gel de polyacrylamide où ces paramètres sont indépendants (Asp *et al.*, 2022). En effet, la rigidité et la taille des pores d'un gel d'agar changent en concert selon la concentration, alors qu'un gel de polyacrylamide peut avoir un de ces deux paramètres changer de façon indépendante en changeant la concentration d'acrylamide (modification de la rigidité) et la bis-acrylamide (modification de la taille des pores). Une matrice semble devoir être assez rigide pour permettre une interaction forte entre les bactéries et le substrat, mais des tailles de pores suffisamment large pour faciliter les échanges des liquides entre la colonie et le gel (Asp *et al.*, 2022).

4.9.4 Contribution des nutriments à la motilité

Les travaux du laboratoire Déziel effectués par Julien Tremblay représentent une caractérisation étendue de l'effet des nutriments sur la motilité de surface (Tremblay, 2007; Tremblay & Déziel, 2008). Ces travaux soulignent l'importance de la présence de certains sucres, acide aminés et sels pour obtenir un *swarming* reproductible, menant à la conception du milieu M9DCAA utilisé de routine pour évaluer le *swarming*. Une limite des travaux de Julien Tremblay est son utilisation exclusive de PA14 sauvage. Je complète ses observations par l'utilisation de souches mutantes ayant perdu leur flagelles, pili ou rhamnolipides. Certaines conditions qui affectent la motilité de la souche sauvage ne semblent pas toujours affecter ces mutants de façon équivalente. C'est le cas du milieu BSM qui réduit beaucoup l'étalement de la souche WT, mais permet aux mutants $\Delta fliC$ et $\Delta pilA \Delta fliC$ de se déplacer en *sliding*. En plus de son manque de calcium, le milieu BSM contient des métaux supplémentaires – notamment le fer et le cobalt – qui ont un impact négatif sur le *swarming* (Tremblay, 2007). Le *sliding* ne semble pas être affecté par la présence de ces métaux. Nous avons toujours supposé que l'effet physiologique du fer sur le *swarming* était dû à la réduction de la production des biosurfactants par le fer qui est connue (Déziel *et al.*, 2003; Glick *et al.*, 2010). En revanche, le *sliding* a aussi besoin de surfactants en

conditions BSM-agar. L'effet du fer sur le *swarming* ne s'explique donc pas seulement par une réduction de l'expression des gènes de synthèse des rhamnolipides. Cette action pourrait s'expliquer par l'impact du fer sur le régulon partagé de Hfq et RsmA, ou par l'action du contrôle par le di-GMPc (Frangipani *et al.*, 2014; Gebhardt *et al.*, 2020; Sonnleitner *et al.*, 2018).

J'ai aussi effectué des essais préliminaires sur ces différentes conditions de motilité (BSM/M9DCAA et Agar/Gellane) avec la bactérie *Burkholderia cenocepacia* K56-2 (données non montrées). Cette dernière peut effectuer du *swarming* comme *P. aeruginosa*, mais pas sur le milieu M9DCAA-Agar (voir section 5). Ceci est dû à une faible production de son agent tensioactif dans ces conditions (Bernier *et al.*, 2017; Morin *et al.*, 2022). L'utilisation de la gomme de gellane permet à *B. cenocepacia* de se déplacer indépendamment de ses biosurfactants en milieu M9DCAA, comme c'est le cas pour *P. aeruginosa* (données non montrées). La souche K56-2 peut aussi se déplacer sur BSM-agar de façon *rhlA*-dépendante, elle peut donc produire son surfactant dans ces conditions et induire son *swarming* (données non montrées).

4.9.5 Classification des types de motilité

La première catégorisation des motilités de surface bactérienne date de plus de 50 ans et est encore valide aujourd'hui (Henrichsen, 1972). Les travaux de Jorgen Henrichsen se basait non seulement sur l'aspect macroscopique des colonies en étalement, mais aussi sur l'aspect microscopique du mouvement individuel des bactéries au sein de la communauté et sur les appendices cellulaires qui permettent le mouvement. Il a notamment distingué la motilité *gliding* et le *sliding* – deux motilités d'apparence appendice-indépendante – avant même la découverte des systèmes d'adhésines impliquées dans le *gliding* d'espèces comme *Myxococcus xanthus* (en 1979 par Hodgkin et ses collègues) (Spormann, 1999). Seul le nom de motilité *darting* – décrivant l'expulsion de cellules d'un agrégat, observé pour *Staphylococcus* sp. – n'est plus utilisée de nos jours (Henrichsen, 1972; Shrout, 2015).

Le *swarming* de *P. aeruginosa* a originalement été décrit comme une motilité de surface qui nécessitait un flagelle, des pili et le *quorum sensing* (biosurfactants) (Kohler *et al.*, 2000). Il est maintenant clair que le *swarming* de *P. aeruginosa* ne requiert pas directement les pili, tel montré par mes travaux. Je démontre aussi que le besoin de produire des rhamnolipides dépend des conditions d'études. Alors comment devrions-nous définir le *swarming* et les motilités en général? Il serait possible de nommer chaque forme de motilité avec un terme distinct pour faciliter les communications. Un exemple de ce paradigme est l'utilisation des termes *walking* et *crawling* pour décrire le *twitching* vertical et horizontal, respectivement (Burrows, 2012; Conrad *et al.*,

2011). Cette dénomination a l'avantage de plus précisément véhiculer une forme de motilité voulue, mais risque le problème d'utiliser un nombre exagéré de mots pour décrire des motilités similaires.

Selon moi, les motilités devraient être décrites selon l'appendice principal qui est requis pour le déplacement. Dans cet ordre d'idée, le *swarming* est une motilité de surface flagelle-dépendante, les pili et les biosurfactants deviennent des éléments facilitant l'expansion selon les conditions du milieu. La motilité Rhl-indépendante/flagelle-dépendante sur carraghénane/gellane que je décris par mes travaux serait donc considérée du *swarming*. La motilité Rhl-indépendante/flagelle-dépendante sur milieu contenant de la mucine – qui a été nommée *surfing* – serait également considérée comme du *swarming* (Yeung *et al.*, 2012). Cela ouvre aussi la question : est-ce que le flagelle est simplement un élément facilitant pour le *sliding* ? Je ne crois pas qu'il y ait de bonnes ou mauvaises réponses à une telle question. Il est important de se rappeler que les bactéries ne définissent pas leur propre motilité (elles ne réfléchissent pas). Cette nomenclature est créée par *nous* pour faciliter les communications.

4.10 Perspectives

La plus grande lacune des travaux présentés dans ce chapitre est que l'exploration des différentes motilités n'a pas été assez approfondies au niveau moléculaire. Des analyses de transcriptomique globale pour comparer les profils de transcription entre plusieurs conditions offriraient un meilleur aperçu des similarités et différences entre ces modes de vie. Comparer par exemple :

- la motilité de PA14 WT et *rhlA*- sur carraghénane ou gellane pour identifier l'influence des rhamnolipides sur le programme génétique en terme de motilité.
- la régulation génique entre des colonies non-motiles ($\Delta fliC$) entre la croissance sur agar et gellane pour avoir un portrait des changements métaboliques causés par l'utilisation de la gellane.
- le profil transcriptionnel entre les cellules de la pointe et du centre d'une colonie *swarming* versus les mêmes population en *sliding*. Ceci pourrait servir à mieux distinguer ces deux populations, s'il y a lieu.
- une colonie PA14 WT avant le déclenchement du *swarming* versus une colonie $\Delta fliC$ *pre-sliding*. Ceci pourrait identifier les différences de régulation génique qui mènent à l'initiation du *sliding*.

Je considère que l'utilisation de la gomme de gellane en particulier est un outil intéressant pour mieux caractériser la motilité d'un mutant avec un défaut de *swarming* sur agar. L'utilisation de cet agent gélifiant est assez simple, forme des gels clairs et permettrait de distinguer entre un défaut flagellaire ou de production de surfactants. Il serait intéressant d'investiguer davantage l'analyse physicochimique de ces milieux pour mieux les caractériser. Par exemple, il est possible de mesurer plusieurs paramètres structuraux d'un gel comme sa tension de surface (mesure d'angle de contact), sa rigidité, sa rétention d'eau, etc. il est aussi possible de mesurer la présence d'éléments traces par des techniques de spectrométrie de masse.

5 2^e CHAPITRE DE RÉSULTATS : INTÉRACTIONS INTERBACTÉRIENNES DURANT LE SWARMING

(Article 2) Surface Motility Favors Codependent Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*

La motilité de surface favorise une interaction co-dépendante entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia*

Auteurs

Charles D. Morin, May Landry, Marie-Christine Groleau, et Eric Déziel

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique (INRS), Laval (Québec), H7V 1B7, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

mSphere

Publication : 7 juillet 2022

<https://doi.org/10.1128/msphere.00153-22>

Contribution des auteurs :

Charles Morin : Conception et réalisation des expérimentations. Analyses des résultats. Rédaction et correction du manuscrit.

May Landry : Conception initiale des expérimentations et mise au point.

Marie-Christine Groleau : Conception des expérimentations, encadrement et révision du manuscrit.

Eric Déziel : Conception des expérimentations. Analyse des résultats et encadrement. Révision du manuscrit. Obtention du financement.

Lien entre l'article ou les articles précédents et le suivant :

Les deux articles utilisent le *swarming* pour caractériser le comportement de surface de *P. aeruginosa*. Dans le cas suivant, l'étude se fait en mélangeant deux espèces bactériennes lors de la préparation des essais.

5.1 Résumé en français

Les interactions interbactériennes sont cruciales pour définir l'ensemble d'une communauté bactérienne. Les deux bactéries pathogènes opportunistes *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia* sont connues pour être des colonisatrices fréquentes des poumons d'individus atteints de fibrose kystique. En utilisant le modèle de motilité de type *swarming* pour caractériser les interactions possibles entre les deux bactéries, une coopération intéressante a été observée. Pour *swarmer*, les bactéries doivent exprimer un flagelle fonctionnel et produire des agents tensioactifs. Les souches *P. aeruginosa* PA14 et *B. cenocepacia* K56-2 sont toutes les deux capables de faire du *swarming*. Cependant, K56-2 ne se déplace pas dans les conditions de cultures utilisées pour PA14 à cause d'un défaut de production de biosurfactant dans ces conditions. Nous avons observé qu'en *co-swarming*, PA14 peut fournir les agents tensioactifs nécessaires pour que K56-2 puisse se déplacer en *swarming*. De plus, K56-2 permet à un mutant afflagellé de PA14 de se déplacer dans la colonie en *swarming*. Il semblerait donc que *P. aeruginosa* soit capable de « faire du pouce » et de se déplacer conjointement avec *B. cenocepacia*.

5.2 Abstract

Interactions between different bacterial species shape bacterial communities and their environments. The opportunistic pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* both can colonize the lungs of individuals affected by cystic fibrosis. Using the social surface behavior called swarming motility as a study model, we noticed intricate interactions between *B. cenocepacia* K56-2 and *P. aeruginosa* PA14. While strain K56-2 does not swarm under *P. aeruginosa* favorable swarming conditions, co-inoculation with a nonmotile PA14 flagellum-less $\Delta fliC$ mutant restored spreading for both strains. We show that *P. aeruginosa* provides the wetting agent rhamnolipids allowing K56-2 to perform swarming motility, while aflagellated PA14 appears to “hitchhike” along with K56-2 cells in the swarming colony.

5.3 Importance

Pseudomonas aeruginosa and *Burkholderia cenocepacia* are important opportunistic pathogens often found together in the airways of persons with cystic fibrosis. Laboratory cocultures of both species often ends with one taking over the other. We used a surface motility assay to study the social interactions between populations of these bacterial species. Under our conditions,

B. cenocepacia cannot swarm without supplementation of the wetting agent produced by *P. aeruginosa*. In a mixed colony of both species, an aflagellated mutant of *P. aeruginosa* provides the necessary wetting agent to *B. cenocepacia*, allowing both bacteria to swarm and colonize a surface. We highlight this peculiar interaction where both bacteria set aside their antagonistic tendencies to travel together.

5.4 Introduction

Studying polymicrobial communities and their complexity is a priority question in microbiology (van Gestel & Kolter, 2019). Social interactions between multiple bacterial species in a shared environment can be either collaborative or competitive. These interactions can have major effects on the community, notably on growth and survival (Boyle *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2008). Polymicrobial interactions can be responsible for the increase in antibiotic resistance and the development of persistent infections (O'Brien & Fothergill, 2017). The airways of people with cystic fibrosis (CF) constitutes a very diverse polymicrobial environment. CF is an hereditary autosomal recessive disease where affected individuals become more likely to develop chronic endobronchial infections (Lipuma, 2010). The diverse CF airways ecosystem is composed of bacteria, viruses, and fungi (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Among the bacterial species associated with CF colonization in patients are *Pseudomonas aeruginosa*, and members of the *Burkholderia cepacia* complex (Bragonzi, 2010; Harrison, 2007; Lipuma, 2010; Price *et al.*, 2013). *P. aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic pathogen infecting immunocompromised individuals and patients with defective barrier defenses (Morin *et al.*, 2021). When chronically infecting in CF lungs, it induces a lethal decline in respiratory function (Jelsbak *et al.*, 2007; Lipuma, 2010). The polar flagellum of *P. aeruginosa* promotes different motilities such as swimming and swarming (Kearns, 2010; Kohler *et al.*, 2000). Swarming motility consists of a rapid coordinated group movement on a semisolid surface (typically 0.5 % agar) and requires a functional flagellum and the production of a surfactant acting as a wetting agent (Kearns, 2010; Morin & Déziel, 2021; Tremblay *et al.*, 2007). The wetting agent produced by *P. aeruginosa* to achieve swarming motility consists of rhamnolipids, extracellular metabolites whose synthesis is regulated by quorum sensing (Déziel *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2000; Ochsner *et al.*, 1996; Zhu & Rock, 2008). *Burkholderia* species can be isolated from diverse environments such as plant rhizosphere, water, and soil in general (Eberl & Vandamme, 2016; Vial *et al.*, 2011). *Burkholderia cenocepacia* is a Gram-negative flagellated member of the ever-expanding *Burkholderia cepacia* complex which regroups more than 20 species (De Smet *et al.*, 2015; Tuanyok *et al.*, 2017). *B. cenocepacia* is also able to swarm on semisolid media (Bernier *et al.*, 2017; Huber *et al.*, 2001).

Interactions between both opportunistic pathogens have been investigated: *B. cenocepacia* stimulates biofilm production by *P. aeruginosa* by intensifying its biomass (Bragonzi, 2010). When both species are cocultured in vitro, *P. aeruginosa* can outcompete or inhibit *B. cenocepacia* due to the release of distinct toxic compounds such as hydrogen cyanide (Bernier *et al.*, 2016; Bragonzi, 2010; Tomlin *et al.*, 2001). Rhamnolipids from *P. aeruginosa* also affect the colony shape of *B. cenocepacia* and promote its swarming (Bernier *et al.*, 2017). Here, to gain knowledge on collaboration and competition between saprophytes that are also opportunistic pathogens, which could be relevant for understanding progression of infectious colonization and multispecies pathogenesis, we investigated interactions between *P. aeruginosa* PA14 and *B. cenocepacia* K56-2 in a swarming colony using surface motility as a behavioral study system.

5.5 Results

5.5.1 *B. cenocepacia* K56-2 can exploit rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* PA14 to achieve a swarming behavior.

P. aeruginosa PA14 and *B. cenocepacia* K56-2 are both motile bacteria capable of performing swarming motility on semisolid media. They both possess two essential characteristics to swarm: a functional flagellum and the production of a surfactant. But while swarming motility of K56-2 is observed on nutrient broth plus 0.5 % glucose media (Bernier *et al.*, 2017), it is unable to spread on M9-based swarming media with dextrose and casamino acids—which is used for *P. aeruginosa*—and rather remains at the inoculation site (Figure 5.1). *B. cenocepacia* possesses a *rhl* operon homologous to the one from *B. thailandensis* and *B. glumae*, which directs the production of rhamnolipids in these two species (Bartell *et al.*, 2014; Dubeau *et al.*, 2009; Nickzad *et al.*, 2015). A mutant of *B. cenocepacia* K56-2 in the first gene of the operon causes a loss of swarming motility on swarming-permissive nutrient media (Figure 5.2). It is thus very likely that this operon is responsible for the production of a surfactant, although we have not been able to identify its structure yet. Because it appears that production of the unidentified surfactant of K56-2 is deficient under *P. aeruginosa* swarming conditions (Figure 5.2), we aimed to complement the swarming defect of K56-2 by adding exogenous rhamnolipids or co-inoculating with rhamnolipid-producing *P. aeruginosa*. Adding rhamnolipids on top of the semisolid gel prior to the inoculation allowed K56-2 to spread on the surface (Figure 5.1B).

Because strain K56-2 can use rhamnolipids from PA14 to swarm by itself, we hypothesized that K56-2 would swarm alongside PA14 on M9DCAA swarming media. We thus conducted co-swarming assays by mixing K56-2 with PA14. When K56-2 is mixed with PA14, it causes a

noticeable alteration in the swarm pattern compared to wild type PA14 alone (Figure 5.1A). However, when a rhamnolipid-deficient *rhIA*- mutant of *P. aeruginosa* is instead co-inoculated with K56-2, no swarming is observed, as would be expected if the production of a wetting agent is a requirement for swarming motility under these conditions.

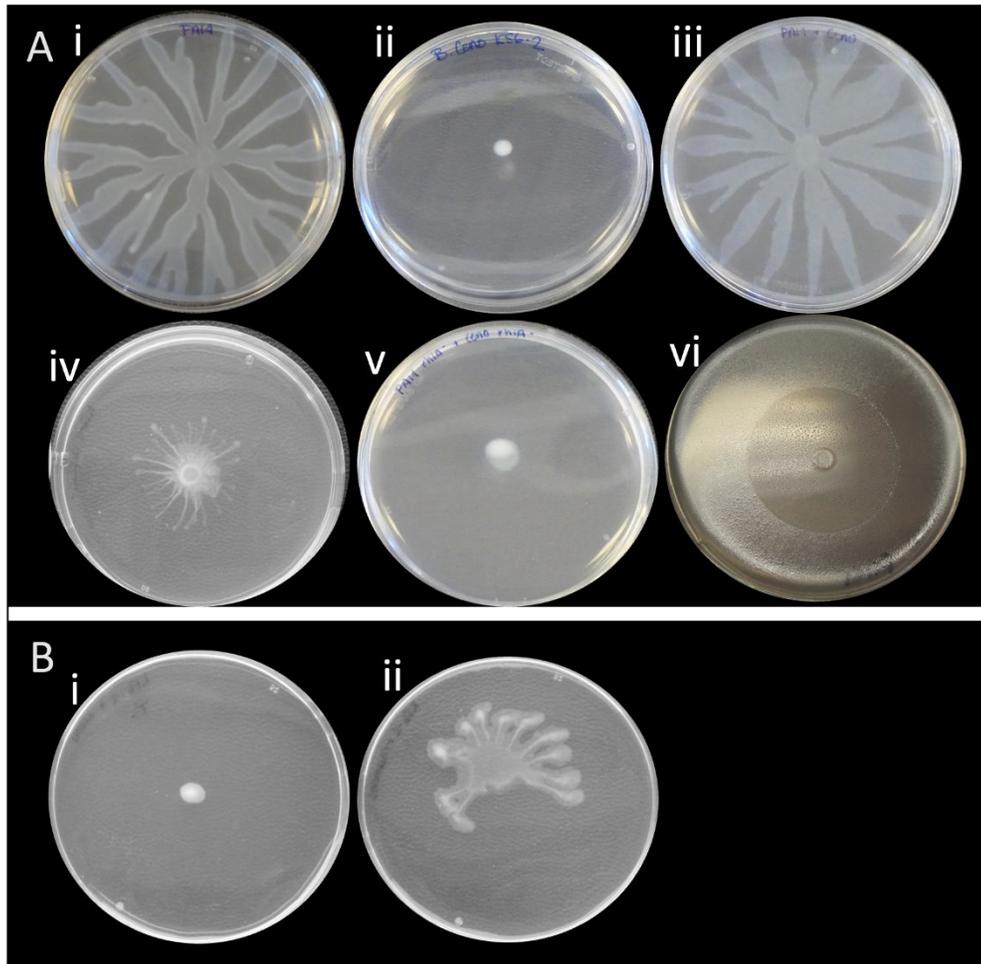


Figure 5.1 Co-swarming of *P. aeruginosa* PA14 and *B. cenocepacia* K56-2.

Swarming on M9DCAA semisolid medium at 30°C: (i) *P. aeruginosa* PA14 alone; (ii) *B. cenocepacia* K56-2 alone; (iii) mixed 1:1 population of *P. aeruginosa* PA14 and *B. cenocepacia* K56-2; (iv) PA14 $\Delta fliC$ with K56-2; (v) PA14 *rhIA*- with K56-2; (vi) oil vaporization highlights the biosurfactant diffusion zone produced by nonmotile PA14 $\Delta fliC$ mutant. (B) K56-2 on M9DCAA semisolid medium supplemented with (i) methanol or (ii) with rhamnolipids (dissolved in methanol).

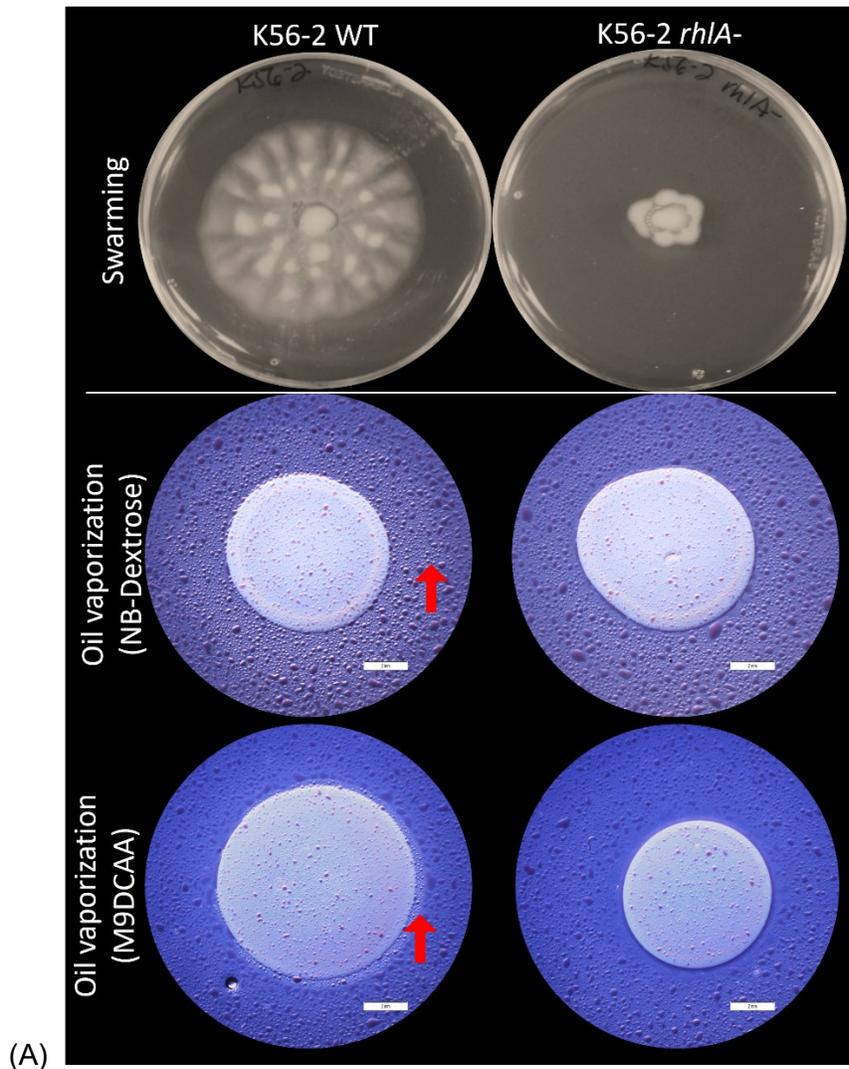


Figure 5.2 *Burkholderia cenocepacia* K56-2 can swarm and produces an unidentified surface-active agent.

TOP Swarming of wildtype K56-2 and *rhlA*- mutant when grown overnight on semi-solid NB supplemented with dextrose with 0.5 % agar. BOTTOM Oil vaporization after growth on NB-Dextrose + 1.5 % agar or M9DCAA medium + 1.5 % agar reveals a zone of diffusible surface-active molecules.

5.5.2 Nonflagellated PA14 $\Delta fliC$ mutant can spread in a swarm when co-inoculated with K56-2.

Providing exogenous rhamnolipids promotes the swarming of K56-2 alone, while adding K56-2 to a PA14 swarm changes its spreading pattern. This suggests comigration between both species. Because a flagellum-null mutant ($\Delta fliC$) of *P. aeruginosa* produces its wetting agents rhamnolipids while still being unable to swarm alone (Figure 5.1A, vi), we reasoned that mixing PA14 $\Delta fliC$ with K56-2 would allow the latter to swarm. Indeed, swarming is observed when this mutant is co-

inoculated with K56-2, suggesting that the $\Delta fliC$ strain provides rhamnolipids necessary for K56-2 to swarm (Figure 5.1A, iv).

To better understand how two strains unable to swarm when grown separately can produce a swarming colony when cultured together, we labeled PA14 and its $\Delta fliC$ mutant with the mCherry fluorescent protein. Unexpectedly, when the PA14 $\Delta fliC$ mutant is co-inoculated with K56-2, it can spread throughout the swarm tendrils, although it remains absent from the tendril tips (Figure 5.3B), in contrast with wild-type PA14 in co-swarming (Figure 5.3A). This was confirmed with higher magnification using stereomicroscopy (Figure 5.3C to F). We failed to precisely image K56-2 tagged with green fluorescent protein (GFP) due to high background green fluorescence from PA14. To circumvent this limitation, we used confocal laser scanning microscopy (CLSM) to confirm the position of both bacterial species in the same tendril. Figure 5.4 shows the localization of both species in a tendril during co-swarming. Under these conditions, PA14 is prevailing at the tendril tips and leads the way while K56-2 appears to border the tendrils as if being pushed by PA14. When the nonflagellated PA14 mutant co-swarms with K56-2, the latter is more abundant at the tips and leads the tendrils, while PA14 $\Delta fliC$ trails behind. Both species also appear to be segregated into two distinct populations, with little overlap between them. It is unclear how PA14 follows K56-2 in the swarm without its flagellum.

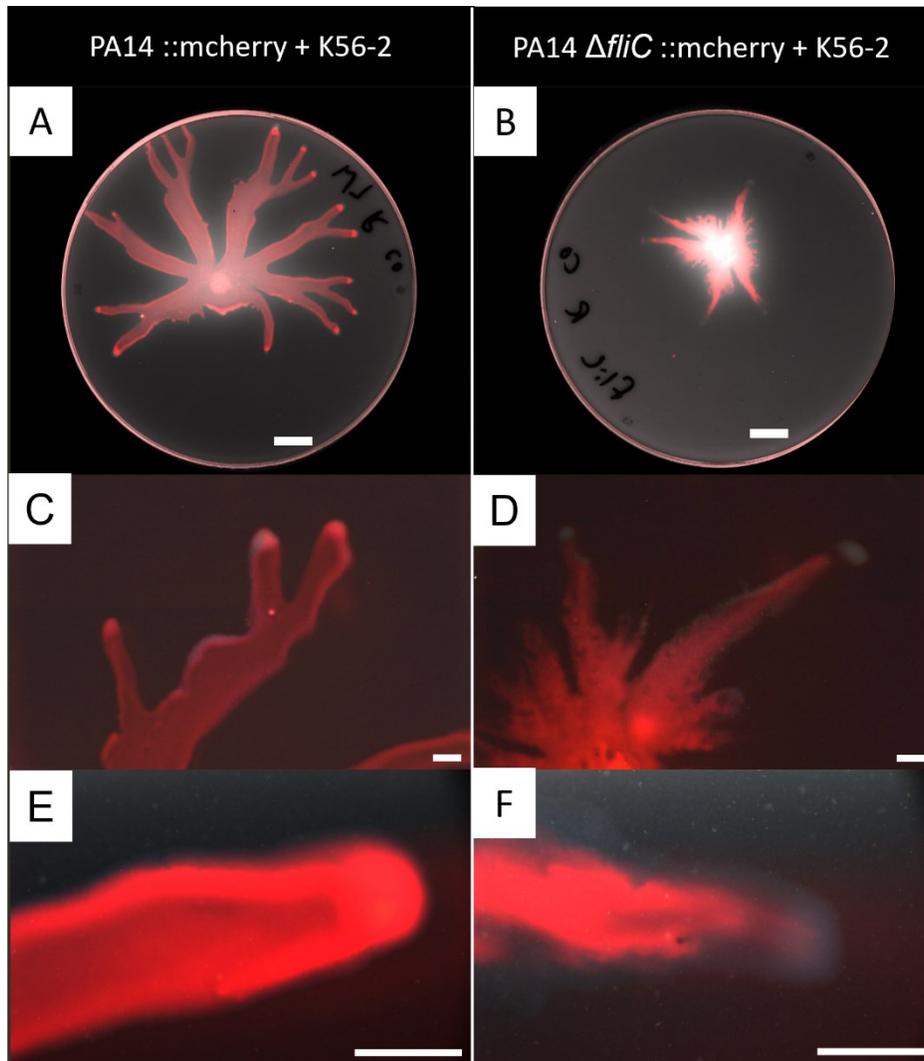


Figure 5.3 Localization of fluorescently labeled *P. aeruginosa* PA14 in a co-swarm with *B. cenocepacia* K56-2

After overnight growth at 37°C. Left: PA14 (red) with K56-2 (1:1 ratio). Right: PA14 $\Delta fliC$ (red) with K56-2 (1:1 ratio). (A-B) Images taken with Typhoon FLA9000 (white scale bar = 1 cm). Red color shows mCherry-labeled PA14 against the autofluorescence measured in the green channel shown as grayscale. (C, D) and (E, F) Images taken with an Olympus SZX16 stereomicroscope at 3.5X and 14X magnification, respectively (white scale bar = 2 mm). Red is the mCherry-labeled PA14 against the whole colony visualized in darkfield.

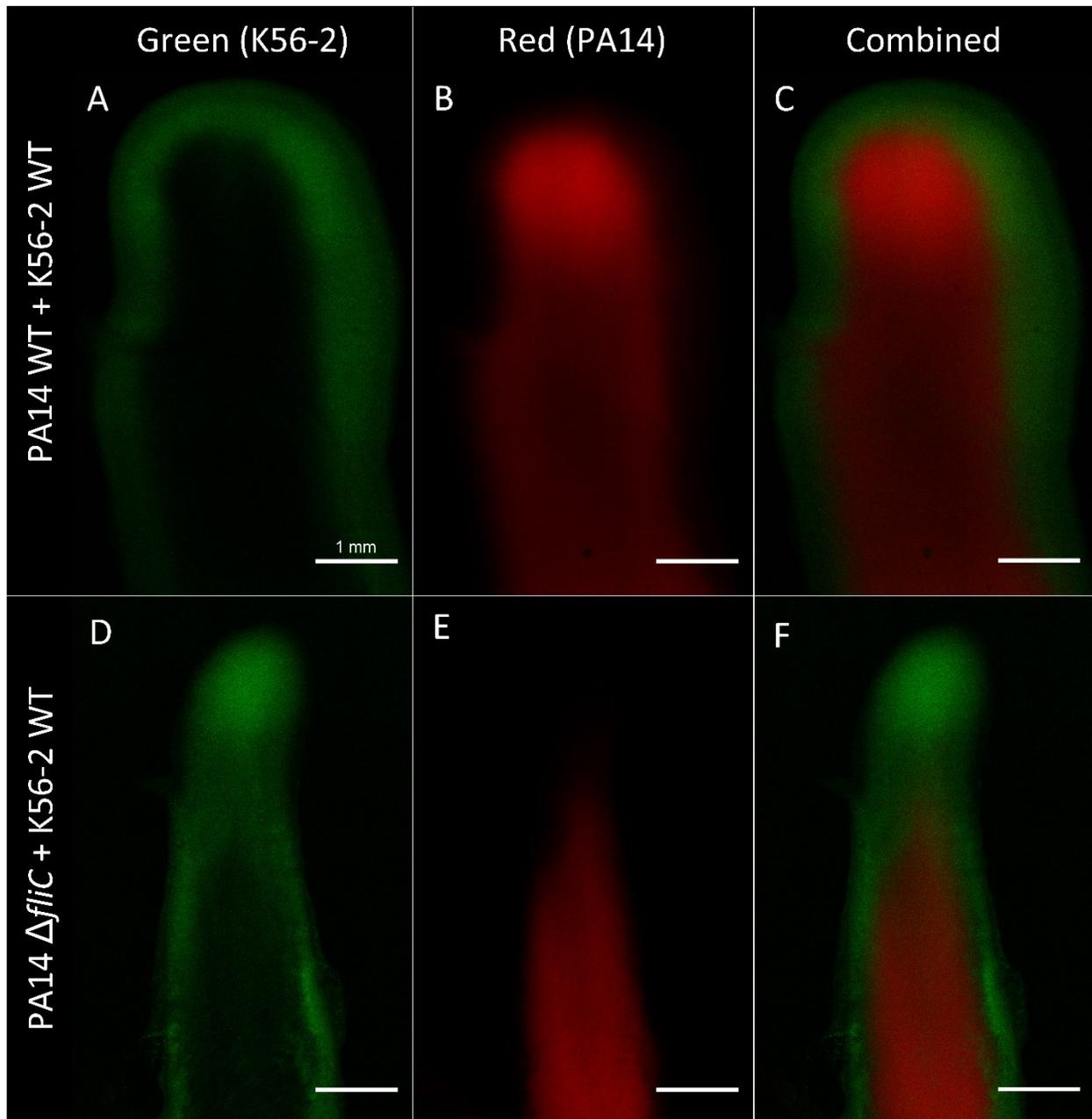


Figure 5.4 CLSM imaging of *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* co-swarming.

Images acquired after overnight growth at 37°C on semisolid M9DCAA medium, from a tendril-bearing agar pad. PA14 is labeled with mCherry and K56-2 with eGFP (green) Top: PA14 and K56-2. Bottom: PA14 $\Delta fliC$ with K56-2. Scale bar = 1 mm.

5.5.3 Investigating the appendages required for interactions between *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* in a swarming colony.

To determine which *P. aeruginosa* cellular appendage plays a role in the interaction between PA14 and K56-2, we assessed the co-swarming potential of the PA14 $\Delta fliC$ mutant lacking either the type IV pili (T4P), the CupA fimbriae, and/or the Tad pili. These appendages were selected

based on their general importance in surface motility and attachment (Bernier *et al.*, 2017; Kohler *et al.*, 2000). The absence of any of these appendages did not cause a loss of bacterial movement of the PA14 $\Delta fliC$ mutant in co-swarming with K56-2, although the lack of T4P altered the shape of the swarming pattern (Figure 5.5). These results could not support a model of interaction through a specific appendage. To investigate this hypothesis further, we assessed the ability of *P. aeruginosa* swarming cells to carry inert fluorescent polystyrene beads. While PA14 alone or combined with K56-2 were able to move the beads along, a mixture of PA14 $\Delta fliC$ and K56-2 was unable to do so (Figure 5.6).

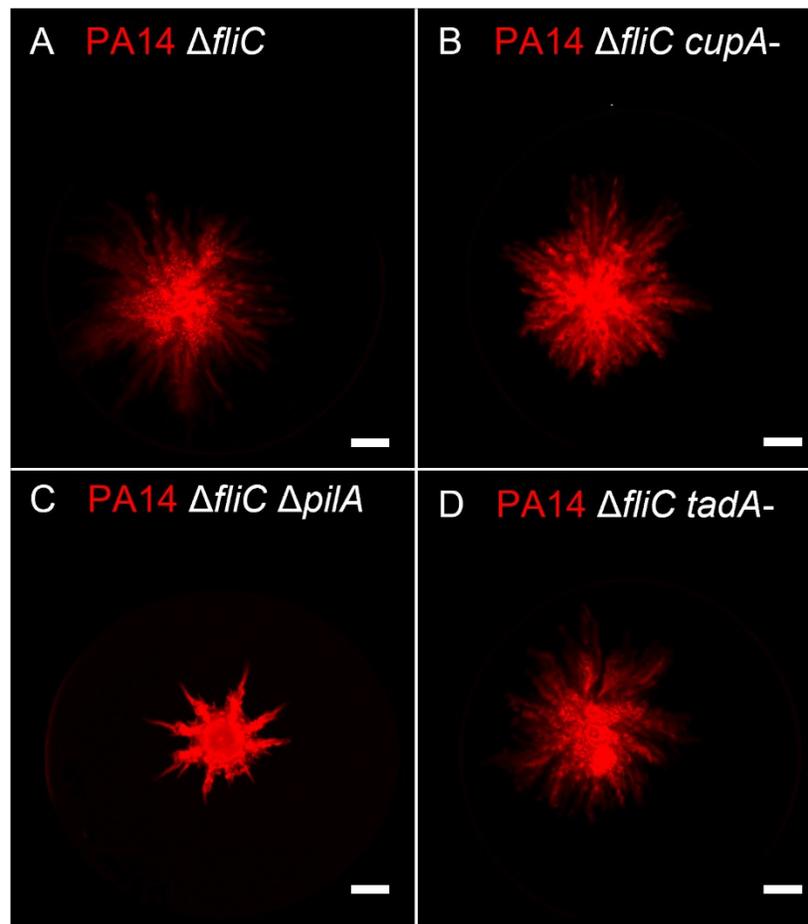


Figure 5.5 Co-swarming between *B. cenocepacia* K56-2 and *P. aeruginosa* PA14 aflagellated double mutants.

Whole plate fluorescent scans of K56-2 with PA14 tagged with mCherry (red) were taken after overnight growth at 37°C on semisolid swarming M9DCAA medium. (A) $\Delta fliC$, (B) $\Delta fliC cupA-$, (C) $\Delta fliC \Delta pilA$, (D) $\Delta fliC tadA-$. PA14 is tagged with mCherry (red). White scale bar = 1 cm.

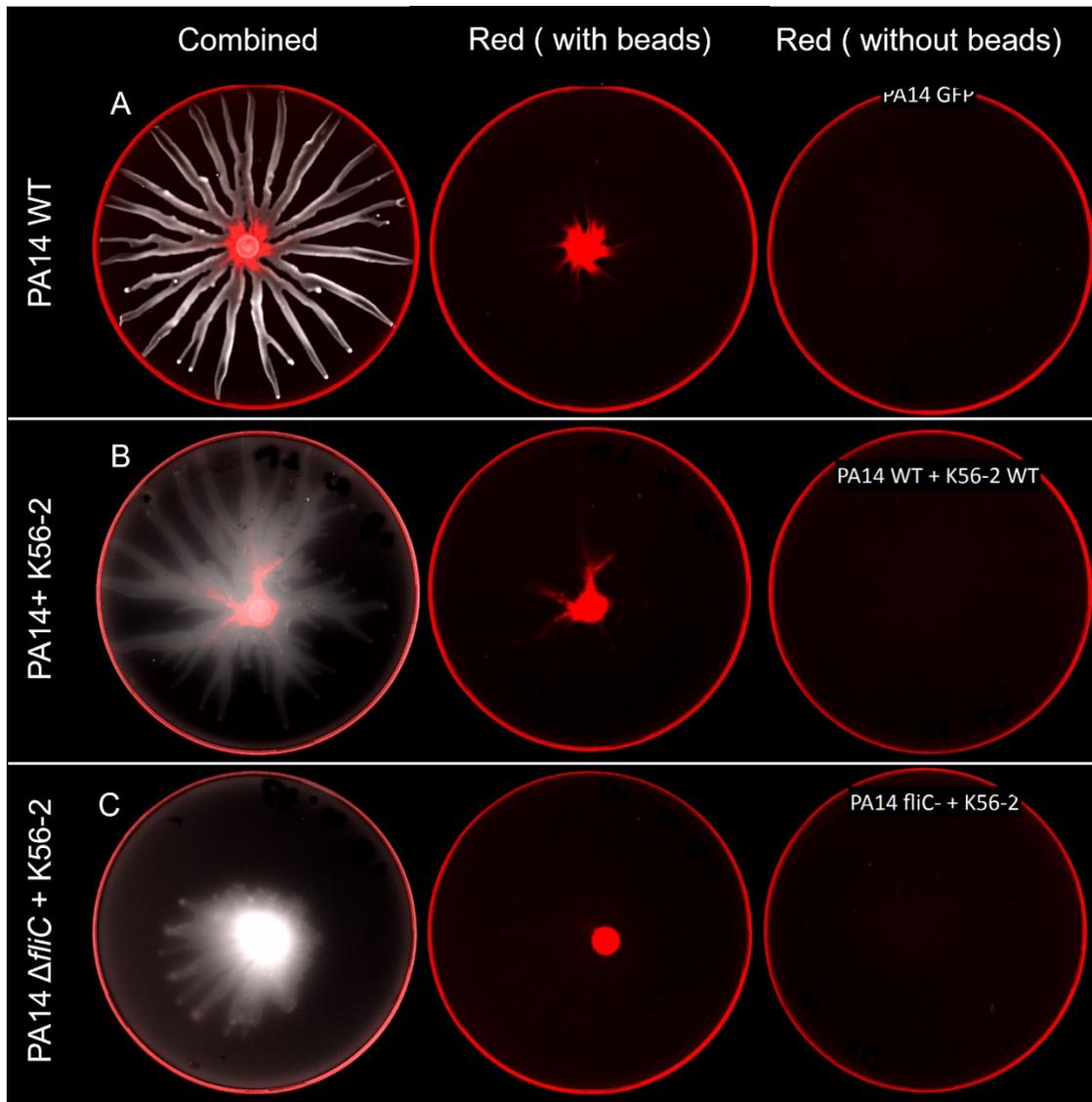


Figure 5.6 Localization of fluorescent polystyrene beads during co-swarming of *B. cenocepacia* K56-2 and *P. aeruginosa* PA14.

An equal part of a suspension of 0.2 % red fluorescent 1 mm polystyrene beads were added to the bacterial suspension prior to inoculation (i.e., PA14:K56-2:Beads 1:1:1). Whole plate scans were taken after overnight growth at 37°C on semisolid M9DCAA. (A) PA14 alone, (B) PA14 with K56-2, (C) PA14 Δ *fliC* with K56-2.

5.6 Discussion

P. aeruginosa and *B. cenocepacia* are both environmental bacteria also recognized as opportunistic pathogens that can colonize the airways of people with cystic fibrosis. Both bacteria are motile and capable of swimming and swarming motilities. Under our experimental conditions for swarming assays, *P. aeruginosa* spreads across the surface of the agar gel to reach the border of the plate by forming a characteristic dendritic pattern; *B. cenocepacia* K56-2 is unable to spread in this fashion. Still, it can swarm on rich nutrient agar medium (Bernier *et al.*, 2017).

B. cenocepacia possesses a polar flagellum and produces a yet-unidentified surfactant—both of which are required to swarm on agar. We found that K56-2 is unable to produce its surfactant on M9DCAA agar plates, resulting in a defect in swarming motility. We confirmed that lack of surfactant production is the limiting factor for swarming by supplementing exogenous rhamnolipids onto the surface of the agar gel and noting that it promoted swarming of *B. cenocepacia*. Accordingly, Bernier *et al.* demonstrated that the addition of spent supernatant of *P. aeruginosa* or of purified di-rhamnolipids into the medium allowed K56-2 to swarm on M9CAA (Bernier *et al.*, 2017). One striking difference here is the ability of K56-2 to form a dendritic swarm pattern under our conditions. This might be caused by the difference in the source of rhamnolipids used, but more likely by the mode of application: we added the rhamnolipids on the surface of the agar in the middle of the plate, producing a diffusion gradient, instead of being homogeneously mixed into the medium prior to pouring into the plates. Rhamnolipids are responsible for the dendritic swarm pattern often displayed by *P. aeruginosa* (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007), and we know that this pattern requires this surfactant diffusion gradient (Tremblay *et al.*, 2007). Our findings demonstrate that K56-2 is proficient at using rhamnolipids from PA14 to swarm. Co-inoculating strains K56-2 and PA14 induced a remarkable modification of the swarm pattern compared with PA14 alone, translating into broader tendrils with a more uniform appearance, i.e., no presence of bulky tendril borders. In a study where a nonmotile *E. coli* was added to a swarming *Acinetobacter baylyi*, the swarm pattern changed because of cell collision and the slowing down of the swarm front, leading to a flower-like pattern instead of the circular pattern of *A. baylyi* alone (Xiong *et al.*, 2020). Our microscopic observations suggest that the pattern deformation of the co-swarming between PA14 and K56-2 could result from *B. cenocepacia* segregation at the border of the tendril, causing a slowing-down of the swarm. Under our conditions, an aflagellated PA14 ($\Delta fliC$) mutant is incapable of swarming motility. However, it still retained the ability to move along in a swarm of *B. cenocepacia* K56-2 when co-inoculated. We hypothesized that *P. aeruginosa* translocates in the swarm by anchoring to K56-2 using one of its multiple cell appendages such as pili (type IVa, type IVb, tad) and cup fimbriae (CupA, CupB, CupC, CupD) (Burrows, 2012). We tested double mutants harboring a *fliC* deletion combined with either the inactivation of CupA (*cupA3-*), Tad pilus (*tadA-*), or type IVa pilus ($\Delta pilA$). None of these double mutants were hampered in their ability to co-swarm with K56-2. It could be that another appendage is used or that a combination participates in this interaction. We used fluorescent carboxylated-polystyrene beads to assess the ability of the swarm to carry around nonmotile particles. Our reasoning was that beads could be either actively transported by the bacteria (lagging behind the swarm front) or passively pushed by the movement of the swarm

(being pushed aside by the swarm front). Similar beads were shown to be displaced by *P. aeruginosa* during swimming motility (Samad *et al.*, 2017). We observed that PA14 alone, and in co-swarming with K56-2, was able to move the beads through the tendrils. However, this displacement was abolished in the co-swarming with PA14 $\Delta fliC$ and K56-2. This suggests that transportation of the beads through the swarm cannot happen at the same time or that the flagellum acts as the adhesin for the beads because it is known to be important for the initial attachment on polystyrene surfaces during biofilm formation (O'Toole & Kolter, 1998). *P. aeruginosa* spread alongside *B. cenocepacia* could also be explained by *Burkholderia* triggering another type of motility from *P. aeruginosa* called sliding. Indeed, Murray and Kazmierczak reported a type of flagellum-independent motility called sliding that relies on rhamnolipids (Murray & Kazmierczak, 2008). They highlighted that this motility required the sensor kinase RetS. It would make sense that such motility could be triggered by K56-2 via a RetS-dependent pathway because the presence of *Burkholderia thailandensis* was also reported to trigger the activity of RetS in *P. aeruginosa* (LeRoux *et al.*, 2015). We thus explored this possibility; however, co-swarming assays we conducted with $\Delta fliC$ *retS*- double mutants did not hinder the ability of PA14 to move in co-swarming (data not shown). Because the co-swarming of both K56-2 and PA14 $\Delta fliC$ requires rhamnolipids, it remains a possibility that PA14 simply follows the trail of K56-2 using this sliding motility mode. Unfortunately, very little is known about the mechanisms of sliding motility of *P. aeruginosa*.

There are some reports of motile bacteria carrying nonmotile microorganisms as cargo. *Paenibacillus vortex* was reported to carry β -lactamase producing *E. coli* (Finkelshtein *et al.*, 2015). In this case, *E. coli* serves as a shield against β -lactam antibiotics by continuously secreting β -lactamases into the swarming medium. *P. vortex* also displays the ability to carry around conidia of *Aspergillus fumigatus* (Ingham *et al.*, 2011). This allows the conidia to spread and form mycelium which can further be exploited by *P. vortex* to cross gaps in the medium. *P. aeruginosa* was also shown to co-swarm with *Burkholderia cepacia*, which resulted in the ability to reach gentamicin-replete zones which were otherwise lethal (Venturi *et al.*, 2010). Our assays highlighted that *B. cenocepacia* K56-2 facilitates the spreading of an aflagellated mutant of *P. aeruginosa* PA14, while benefiting from rhamnolipids production by the latter.

B. cenocepacia and *P. aeruginosa* can both colonize the lung environment of cystic fibrosis patients (Jones, 2019). In lab growth assays, *P. aeruginosa* will often antagonize *B. cenocepacia* through the production of toxic effectors (e.g., hydrogen cyanide) and through competition for nutrients (mainly iron through pyoverdine) (Bernier *et al.*, 2016; Costello *et al.*, 2014; Leinweber

et al., 2017). However, they coexist in the swarming colony. Transcription of genes coding for some toxic effectors and competition factors such as hydrogen cyanide and siderophores is reduced in a swarming colony under our conditions (Jean-Pierre, 2017; Tremblay & Déziel, 2010). This could contribute to explain why *B. cenocepacia* is able to thrive in the presence of *P. aeruginosa* when they swarm together. Interestingly, we did not observe a single species tendrils breaking off in the co-swarming setting, although we know that K56-2 can spread by itself in the presence of rhamnolipids alone.

5.7 Conclusion

In this study, we highlight a peculiar interaction in multispecies swarming conditions where *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* can colonize a surface alongside each other. In this setting, cooperation seems to have precedence over competition: *P. aeruginosa* provides the surfactant needed by *B. cenocepacia* to spread across the surface whereas a nonmotile mutant of *P. aeruginosa* is in return able to spread, helped by the presence of the motile *B. cenocepacia* cells. The mechanism by which this “hitchhiking” of *P. aeruginosa* occurs remains to be elucidated. This study provides new insights on another complex interaction between microbial species during social motility. The interactions between different bacterial species in a structured environment provides a condition favorable to interrogate bacterial social events.

5.8 Materials and Methods

5.8.1 Strains, plasmids, and growth conditions.

Bacteria and plasmids used in this study are listed in Table 5.1. They are all derived from two parental strains, *P. aeruginosa* PA14 and *B. cenocepacia* K56-2 (Darling *et al.*, 1998; Rahme *et al.*, 1995). Bacteria were cultivated in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco) in a TC-7 roller drum (New Brunswick Scientific).

Table 5.1 Strains/plasmids used in this study

Strains/plasmids	collection iD #	Phenotype/genotype	Reference
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
PA14	14	UCBPP-PA14 wild type strain	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 <i>rhIA</i> -	1	<i>rhIA</i> ::MrT7, Gm ^R	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 Δ <i>fliC</i>	3956	PA14 Δ <i>fliC</i>	This study
PA14 Δ <i>pilA</i>	3398	PA14 Δ <i>pilA</i>	Provided by R. Baldini (University of São Paulo)
PA14 Δ <i>pilA</i> Δ <i>fliC</i>	3463	PA14 Δ <i>pilA</i> Δ <i>fliC</i>	This study
PA14 <i>cupA</i> -	3560	PA14 <i>cupA3</i> ::MrT7, Gm ^R	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>tadA</i> -	3561	PA14 <i>tadA</i> ::MrT7, Gm ^R	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 Δ <i>fliC</i> <i>cupA</i> -	3562	PA14 Δ <i>fliC</i> <i>cupA3</i> ::MrT7, Gm ^R	This study
PA14 Δ <i>fliC</i> <i>tadA</i> -	3690	PA14 Δ <i>fliC</i> <i>tadA</i> ::MrT7, Gm ^R	This study
PA14 (mCherry)	3663	PA14 <i>attTn7</i> ::mini-Tn7-mCherry, Gm ^R	This study
PA14 Δ <i>fliC</i> (mCherry)	4005	PA14 Δ <i>fliC</i> <i>attTn7</i> ::mini-Tn7-mCherry, Gm ^R	This study
PA14 Δ <i>pilA</i> Δ <i>fliC</i> (mCherry)	4306	PA14 Δ <i>pilA</i> Δ <i>fliC</i> <i>attTn7</i> ::mini-Tn7- mCherry, Gm ^R	This study
PA14 Δ <i>fliC</i> <i>cupA</i> - (mCherry)	4307	PA14 Δ <i>fliC</i> <i>tadA</i> ::MrT7 <i>attTn7</i> ::mini-Tn7- mCherry, Gm ^R	This study
PA14 Δ <i>fliC</i> <i>tadA</i> - (mCherry)	4308	PA14 Δ <i>fliC</i> <i>cupA</i> ::MrT7 <i>attTn7</i> ::mini- Tn7-mCherry, Gm ^R	This study
<i>Burkholderia cenocepacia</i>			
K56-2	325	CF strain	(Darling <i>et al.</i> , 1998)
K56-2 eGFP	4022	K56-2 <i>attTn7</i> ::mini-Tn7-eGFP, Kan ^R	This study
<i>Escherichia coli</i>			
HB101 pRK2013 (helper strain)	642	Plasmid: pRK2013	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
EPMAX10B-pir116 Δ asd Δ trp::Gmrmob-Kanr	4398	Plasmid: pUC18R6KT-mini-Tn7T-P _{S12} - eGFP-Km ^R	(Norris <i>et al.</i> , 2010)
Plasmids			
pUC18R6KT-mini-Tn7T- P _{S12} -eGFP-kan		Integration vector for miniTn7 element containing eGFP and kanamycin resistance cassette	(Norris <i>et al.</i> , 2010)
pEX18Gm- Δ <i>fliC</i>		pEX18Gm suicide vector for allelic exchange deletion of <i>fliC</i> gene	(Murray & Kazmierczak, 2008)
pTNS3		Transposase expression vector	(Choi & Schweizer, 2006)
pUC18-mini-Tn7-mCherry- Gm ^R		suicide vector for insertion of mCherry tagged Tn7 transposon	(Zhao <i>et al.</i> , 2013)
pRK2013		Contains RK2 transfer genes	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)

5.8.2 Motility assays.

Swarming motility assays were performed using M9DCAA semisolid medium with an agar concentration of 0.5 % (Tremblay & Déziel, 2008). The medium was poured in 100-mm Petri dishes and dried for 25 min under laminar flow of a biosafety cabinet. Overnight bacterial cultures were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and diluted to final OD₆₀₀ of 3.0; OD₆₀₀ was measured with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). For single-strain swarming, 5 µL of bacterial suspension was directly inoculated at the center of an agar plate. For dual-strain swarming, cells were mixed at a 1:1 ratio (based on OD₆₀₀) and 5 µL of this mixed suspension was inoculated at the center of the plates. Plates were incubated overnight at 30°C or 37°C. Pictures were taken after incubation using a Panasonic ZS70 Lumix digital camera. At least three replicates were prepared for each assay.

5.8.3 Swarming with added rhamnolipids or plastic beads.

A mix of purified *P. aeruginosa* rhamnolipids was obtained from Jeneil Biosurfactant Co. (JBR-599, lot #050629). This mixture containing 51 % monorhamnolipids, 45 % dirhamnolipids, and 3-hydroxy fatty acids was dissolved in methanol at a concentration of 10 g/L (Schellenberger *et al.*, 2021). A 5 µL drop was spotted onto the center of a swarming agar plate prepared as described above, with methanol only used as a mock control. Methanol and rhamnolipids were left to dry for 10 min prior to inoculation with the bacterial suspension over the dried spot. For assays including plastic beads, fluorescent 1 µm diameter carboxylated-polystyrene beads (FluoroSpheres, Invitrogen) were premixed with bacterial suspensions. The bead stock was washed with sterile water and diluted to a final concentration of 0.2 % (wt/vol). A volume of 5 µL of bead suspension was added to the bacterial suspension.

5.8.4 Generation of a $\Delta pilA \Delta fliC$ double mutants.

The *fliC* gene was deleted in a PA14 $\Delta pilA$ background by allelic exchange using vector pEX18Gm- $\Delta fliC$ as described in a previous study (Morin & Déziel, 2021). Briefly, PA14 recipient cells received the vector via mating with an *E. coli* donor strain. First recombinants were selected on TSA with 15 mg/mL gentamicin, second recombinant were counter-selected on Tryptone Yeast agar with 10 % sucrose. Potential $\Delta fliC$ were confirmed for their ability to swim in 0.3 % soft agar.

5.8.5 Fluorescence labeling of PA14 with mCherry.

Wild-type PA14 and two isogenic mutants ($\Delta fliC$ and $\Delta pilA \Delta fliC$) were labeled with mCherry at a single chromosomal site using pUC18T-miniTn7-PA1/04/03- mCherry-Gm^R (pBT277) (Zhao *et al.*, 2013). Both the Tn7-bearing vector and a transposase-expressing vector (pTNS3) were transferred into the recipient strains by electrotransformation (Choi *et al.*, 2006). Cells that integrated the fluorescent marker were selected on TSA with 15 mg/mL gentamicin and confirmed for their ability to express the mCherry fluorescent protein using a Typhoon FLA 9000 imaging system (GE Healthcare). The gentamicin resistance cassette was flipped by electrotransformation of the pFLP3a plasmid containing the FLP-recombinase into the newly produced fluorescent cells.

5.8.6 Inactivation of *cupA* and *tadA* genes in fluorescent cells.

Further deletion of *cupA* and *tadA* genes was done with the transfer of transposon insertion from the PA14 transposon library (Liberati *et al.*, 2006). Genomic DNA from *cupA*::Mar2xT7 and *tadA*::Mar2xT7 mutants was extracted and transferred into the recipient $\Delta fliC$ attTn7::mCherry background. Transformants were selected on TSA medium with 15 mg/mL gentamicin.

5.8.7 Fluorescent labeling of *B. cenocepacia* K56-2.

Strain K56-2 was labeled with fluorescent protein eGFP from a Tn7 delivery vector (Norris *et al.*, 2010). The Tn7-bearing vector (pUC18R6KT-mini-Tn7T-PS12-eGFP-Km^R) was transferred into the recipient cell via quad-mating between recipient (K56-2), donor *E. coli*, helper *E. coli*, and transposase-bearing vector. Briefly, all four strains were grown overnight, diluted, and freshly grown for 4 h at 37°C. A volume of 1 mL of cell each suspension was pelleted, washed, and mixed before being spot inoculated onto a TSA plate. The suspension droplet was grown overnight; the resulting growth was spread onto TSA medium with 1,600 mg/mL kanamycin to select labeled K56-2. Acquired fluorescence was confirmed using the Typhoon FLA 9000.

5.8.8 Fluorescent imaging of PA14 and K56-2 co-swarming.

Fluorescent-labeled strains of PA14 and K56-2 were co-inoculated under swarming conditions as described above. Whole plates were then scanned using the Typhoon FLA 9000 with LPR filter and 532 nm wavelength laser for mCherry detection and BGP1 filter and 473 nm laser for green fluorescence, although subject to interference by *P. aeruginosa* autofluorescence. Close-up of tendrils were visualized with an Olympus Stereoscope using darkfield for the swarming colony and RFP filter for the fluorescence. Tendrils tips were visualized with a Zeiss LSM 780 CLSM.

Agar pads bearing a tendril tip were carefully cut from the agar gel with a scalpel and placed onto a 3.5-mm coverslip-bottom dish. A section of 4.25 mm by 8.50 mm was imaged using a 20X objective in tile acquisition mode with a resolution of 10,240 pixels by 20,480 pixels (0.415 μm per pixels). Images were processed using Zeiss Zen Black Edition.

5.9 Résultats complémentaires : Interactions interbactérienne

Cette section contient des résultats liés à la thématique de l'article 2, c'est-à-dire les interactions bactériennes en condition de *swarming*. Ils n'ont pas été intégrés à l'article 2 puisqu'ils ne cadraient pas dans l'histoire de l'article, ou ont été produits après sa publication.

5.9.1 Détails expérimentaux

5.9.1.1 Souches utilisées et conditions de croissance.

Les souches utilisées dans les travaux de cette section se retrouvent dans le Table 5.2. Celles-ci sont cultivées de routine dans du Tryptic Soy Broth (TSB) à 37°C.

Table 5.2 Souches utilisées pour les travaux supplémentaires du Chapitre 2.

<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14			
Nom	Détails	Numéro du stock	Référence
PA14 WT	Souche de référence UCBPP-PA14	ED14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 WT ::mCherry	Souche sauvage marquée avec la protéine fluorescente mCherry	ED3663	(Morin <i>et al.</i> , 2022)
PA14 <i>rhIA</i> -	Mutant d'insertion <i>rhIA</i> ::Gm ^R	ED1	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 Δ <i>fliC</i>	Mutant sans flagelle	ED3956	(Morin & Déziel, 2021)
PA14 Δ <i>fliC</i> ::mCherry	Sans flagelle, marqué avec mCherry	ED401	(Morin <i>et al.</i> , 2022)
Δ <i>pilA</i> Δ <i>fliC</i> <i>rhIA</i> -	Triple mutant non-motile	ED4468	Cette étude
Δ <i>rsmA</i> <i>rhIA</i> -	Délétion de <i>rsmA</i> et insertion dans <i>rhIA</i> (<i>rhIA</i> ::Sp ^R)	ED3589	(Robitaille, 2020)
Δ <i>rsmY</i> Δ <i>rsmZ</i>	Double délétion des pARN	ED1998	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
Autres espèces			
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	Souche de référence	ED66	(Zeigler <i>et al.</i> , 2008)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LMG 958	Souche de référence	ED3697	(Carmody <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	Souche de référence	ED3410	(Silby <i>et al.</i> , 2009)
<i>Serratia marcescens</i> LMG 2792	Isolat environnemental	ED3696	ATCC 13880
<i>Proteus mirabilis</i> LSPQ3700	Isolat clinique	ED2226	ATCC 12453
<i>Burkholderia cenocepacia</i> K56-2	Souche de référence	ED325	(Garcia-Romero & Valvano, 2020)
<i>Burkholderia multivorans</i> CEP0781	Isolat fibrose kystique	ED360	(Coulon <i>et al.</i> , 2019)

5.9.1.2 Essai de motilité de type *swarming*

Les essais de motilité de type *swarming* ont été réalisés tels que décrits à la section 3.2 en utilisant les conditions standards (milieu M9DCAA et agar comme agent gélifiant). Les inoculations avec un mélange de deux espèces sont effectuées en mélangeant des suspensions bactériennes de chaque espèce (ajustée à une densité optique à 600 nm de 3.0) à un ratio 1:1. Une goutte de 5 μ L est placée au centre de la gélose. Pour les inoculations côte-à-côte, une

goutte de 5 μ L de chaque suspension bactérienne individuelle est placée l'une à côté de l'autre, espacées d'environ 2 cm.

Lorsqu'un trait est tracé sur une gélose avec une colonie bactérienne, une goutte de 10 μ L de suspension bactérienne ou d'extrait est préalablement placée sur le trait. La gélose est inclinée pour faire glisser la goutte le long du trait. Ceci maximise les chances qu'une dendrite rencontre le trait (comparativement à une inoculation ponctuelle). La goutte en trait est laissée sécher complètement en laissant la gélose sans couvercle sous l'enceinte de sécurité biologique.

Un coupon de papier est utilisé pour concentrer un extrait au-delà de la solubilité du composé. Dans ce cas, des coupons de papier absorbant sont coupés en ligne mince et une quantité précise de composé est placé peu à peu en laissant évaporer le solvant.

5.9.1.3 Visualisation des zones « mouillées » (zones de rhamnolipides)

Après l'incubation des géloses *swarming*, une brume de fines gouttelettes d'huile minérale peut être vaporisée sur la surface de la gélose. L'huile forme de petites gouttelettes dont la taille est liée à la tension de surface autour de colonie, ce qui est directement lié à la présence des rhamnolipides. L'huile contient le colorant Sudan IV (couleur rouge), qui facilite la visualisation des zones en augmentant le contraste. L'image est prise en présence d'une lumière intense : soit hors d'une boîte à photo en présence d'un reflet, soit à l'aide d'un stéréomicroscope Olympus SZX16 en mode lumière oblique.

5.9.1.4 Production d'extrait cellulaire total

Pour produire les extraits qui causent de l'évitement en *swarming*, la souche choisie est cultivée durant la nuit dans du TSB. La préculture est utilisée pour inoculer 50 mL de milieu Lysogeny Broth (LB, Alpha Biosciences) dans un flacon Erlenmeyer de 250 mL. Un volume de 250 μ L (1/200 du volume final) est utilisé pour inoculer le milieu LB. La fiole est incubée dans une chambre à température contrôlée à 37°C sous agitation à 200 rpm pendant six heures. Après l'incubation, la culture est transférée dans des tubes de centrifugation de 50 mL (maximum 25 mL de culture par tube). Un volume de 10 mL de chloroforme est ajouté à la culture. Les tubes sont vortexés de 20 à 30 secondes pour bien lyser les cellules. Ensuite, les extraits sont centrifugés à 3700 x g pendant 10 minutes pour bien séparer les phases. La phase aqueuse (celle du dessus) est récoltée puis stérilisée à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,22 μ m en polyéthères. L'extrait

filtré est ensuite concentré par ultrafiltration à l'aide d'un Centricon™ avec une taille de pore de 100 kDa (Millipore). L'extrait final peut être concentré jusqu'à un facteur de 200 X.

5.9.1.5 Séparation des extraits cellulaires sur gradient

Les extraits aqueux cellulaires après la lyse au chloroforme et la filtration sont séparés davantage par leur densité sur un gradient de densité Optiprep™ (Millipore). Le gradient est créé à partir de dilution de la solution de base (Optiprep 60%) pour obtenir sept concentrations différentes (voir Table 5.3) selon la méthode décrite par (Bauman & Kuehn, 2006). Un montage avec une pipette Pasteur attachée à un support vertical de laboratoire en métal a été utilisé. La pointe de la pipette est descendue jusqu'au fond d'un tube d'ultracentrifugation de 50 mL. Les volumes successifs de chaque concentration sont ajoutés au gradient via la pipette Pasteur, allant du moins dense au plus dense (Table 5.3). La pipette Pasteur est retirée doucement, le tube est scellé avec du parafilm et est laissé à 4°C pour minimum 24 heures (max 1 semaine) pour linéariser le gradient. Pour séparer l'extrait concentré, ce dernier est déposé doucement sur le dessus du gradient avec une micropipette. Le tube est placé dans l'ultracentrifugeuse Sorvall mTX 150 (ThermoFisher) et centrifugé à 100 000 x g pendant 16 h à 4 C. Après l'étape de centrifugation, des fractions de 1 mL sont prélevées doucement avec une micropipette de 1000 µL à partir du haut.

Table 5.3 Concentration et volume d'Optiprep utilisés pour produire le gradient de centrifugation

Concentration d'Optiprep	Volume d'Optiprep dilué
45 %	2 mL
40 %	2 mL
35 %	2 mL
30 %	3 mL
25 %	2 mL
20 %	1 mL

5.9.2 Interactions diverses avec d'autres espèces bactériennes

Dans le cadre de mes travaux sur le *co-swarming* entre *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia*, j'ai évalué le comportement de *co-swarming* entre PA14 et d'autres espèces bactériennes diverses. Le but était d'observer la capacité d'un mutant aflagellé de *P. aeruginosa* à se déplacer dans une colonie comme il le peut avec K56-2. Les espèces bactériennes testées étaient : *Burkholderia cenocepacia* K56-2, *Burkholderia multivorans* CEP0781, *Stenotrophomonas maltophilia* LMG958, *Serratia marcescens* LMG2792, *Proteus mirabilis* LSPQ3700, *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 et *Bacillus subtilis* PY79. La Figure 5.7 présente les combinaisons d'espèces

qui ont eu le plus grand impact sur la motilité de PA14. Lorsque combiné avec PA14, *S. maltophilia* et *P. mirabilis* ont un très léger impact sur l'étalement de *P. aeruginosa* (marqué en fluorescence rouge). En contrepartie, *S. marcescens* domine complètement la surface de la gélose en séquestrant *P. aeruginosa* au centre et en recouvrant la quasi-totalité de l'espace disponible. Autre résultat intéressant : toutes les espèces sauf *S. maltophilia* ont la capacité de favoriser le déplacement de PA14 $\Delta fliC$. Il est important de noter que toutes les autres espèces testées sont incapables de se déplacer seules dans les conditions de *swarming* de PA14 (Figure 5.8), ce qui indique que la présence de PA14 n'a pas d'effet notable sur le déplacement de *S. maltophilia* et *P. mirabilis*, alors qu'elle active fortement le déplacement de *S. marcescens*.

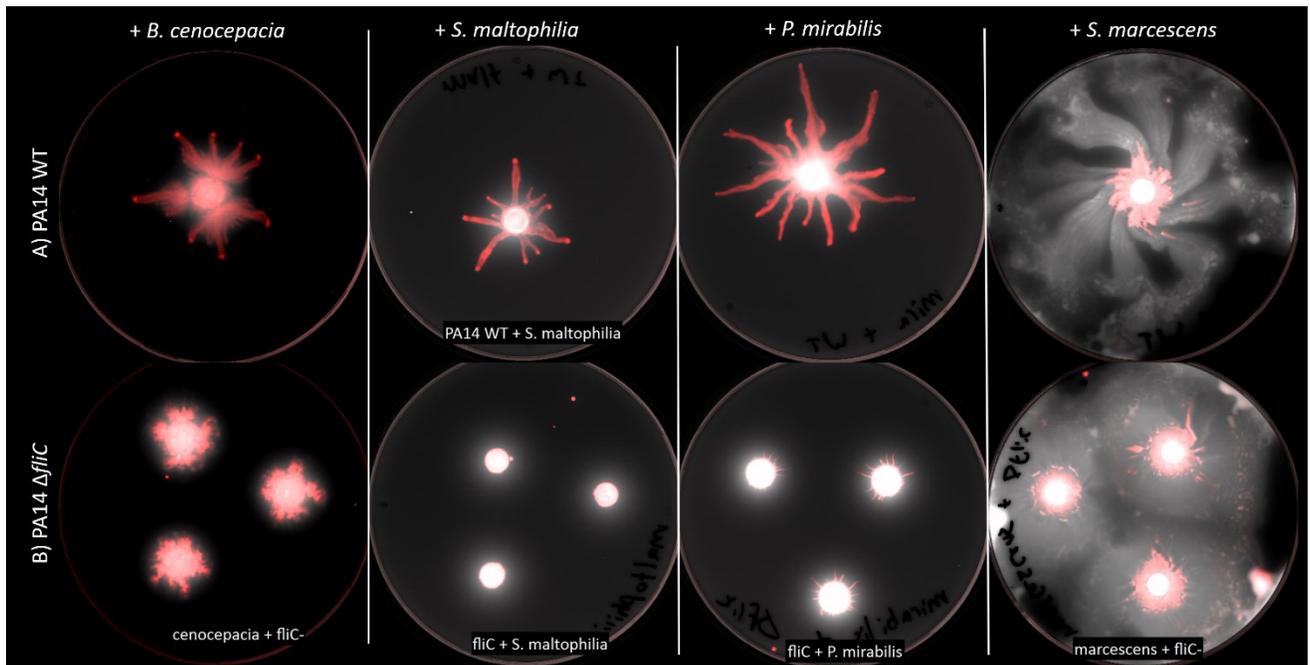


Figure 5.7 Co-swarming entre *P. aeruginosa* et plusieurs espèces bactériennes.

Essai de co-swarming entre PA14 (rouge) et *Burkholderia cenocepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens*. A) PA14 WT partage le même site d'inoculation avec l'autre espèce, B) PA14 $\Delta fliC$ partage le même site d'inoculation avec l'autre espèce. Culture d'environ 18h à 37°C. Capture de géloses entières au Typhoon FLA 9000, canal rouge présenté en rouge, canal vert présenté en gris.

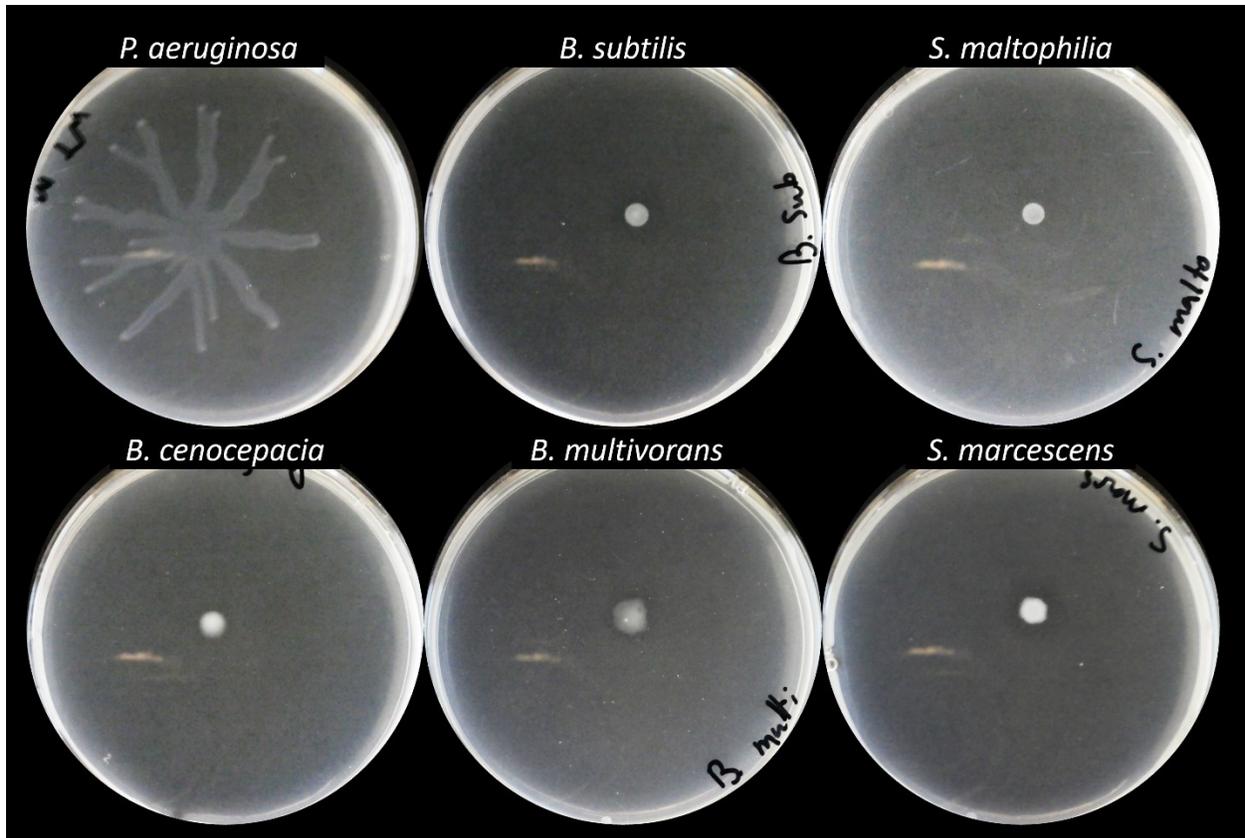


Figure 5.8 Swarming seul pour *P. aeruginosa* PA14 et d'autres espèces bactériennes

Essai de *swarming* pour *P. aeruginosa* PA14, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia multivorans* et *Serratia marcescens*. Culture d'environ 18h à 37°C sur milieu M9DCAA-Agar. Seul PA14 peut se déplacer en *swarming* dans ces conditions.

Les essais co-*swarming* sont enclenchés en pré-mélangeant les deux suspensions bactériennes avant de les déposer sur la gélose. Une autre façon d'évaluer une interaction entre deux espèces bactériennes dans ces conditions est de les inoculer à deux endroits différents sur la gélose (inoculation côte-à-côte). De cette façon, une espèce motile comme *P. aeruginosa* commence à se déplacer vers la colonie avoisinante et interagit donc après avoir débuté son *swarming*. Des essais d'inoculation côte-à-côte avec les mêmes autres espèces montrent les mécanismes d'interactions mise en place entre les colonies d'espèces différentes semblent très variés. Lorsque visualisé à la lumière visible, la méthode ne permet pas de discriminer la présence des deux espèces lorsqu'elles se rencontrent ; dans tous les cas, PA14 effectue son *swarming* normalement, atteint la colonie avoisinante, semble se mélanger et poursuit son déplacement avec une altération dans le patron d'étalement. En délimitant la présence de PA14 marqué avec la protéine fluorescente mCherry et visualisant la gélose en mode fluorescence, on remarque des différences subtiles quant à la façon dont les bactéries se mélangent. En fait, PA14 semble se

mélanger très peu avec son voisin. La présence de *P. aeruginosa* permet d'activer la motilité de *B. multivorans* sans que les deux espèces se mélangent. Dans le cas de *B. cenocepacia* et *S. marcescens*, PA14 ne pénètre pas dans la colonie voisine, mais la contourne de très près et entraîne avec elle des bactéries de l'autre espèce. *P. aeruginosa* est capable de pénétrer jusqu'au centre d'une colonie de *S. maltophilia*, mais la présence de cette dernière a très peu d'impact sur le déplacement de PA14.

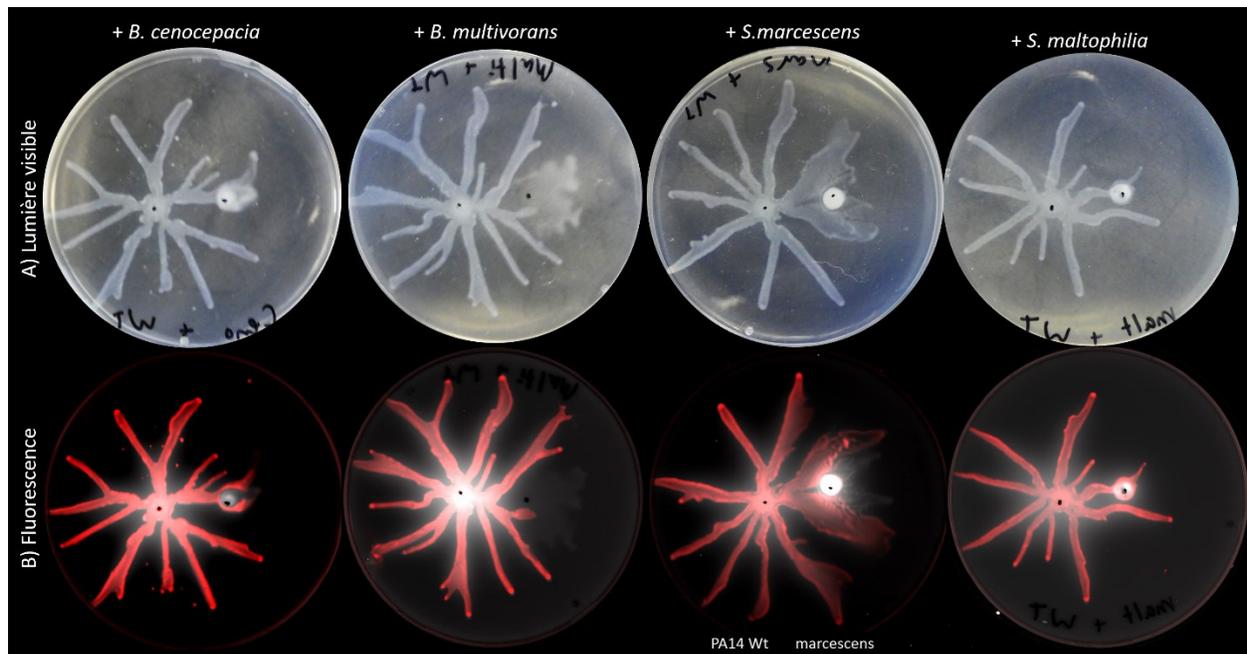


Figure 5.9 Swarming avec deux espèces côte-à-côte.

P. aeruginosa (à gauche) se déplace en *swarming* vers l'espèce voisine (à droite), soit : *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*. En A), photo prise avec une caméra numérique (lumière visible). En B), la même gélose visualisée avec un scan à fluorescence. En rouge est représenté PA14::mCherry, en gris est représenté les bactéries non marquées (autofluorescence verte)

Des autres espèces bactériennes évaluées dans ces conditions, *P. fluorescens* et *B. subtilis* ont virtuellement aucun impact sur le déplacement de *P. aeruginosa* lorsqu'elles sont mélangées, mais vont causer un évitement des dendrites de PA14 qui approche lorsqu'elles sont inoculées côte-à-côte (Figure 5.10).

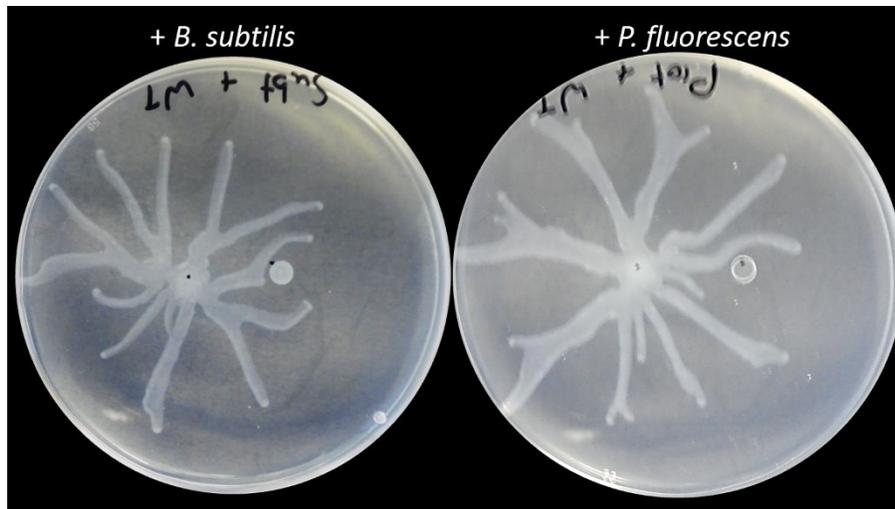


Figure 5.10 Évitement du *swarming*.

P. aeruginosa (à gauche) se déplace en *swarming* vers l'espèce voisine (à droite), soit : *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens*. Photo prise avec une caméra numérique (lumière visible).

5.9.3 Évitement intra-espèce en *swarming*

La capacité à causer le détournement d'une dendrite approchant n'est pas limitée aux autres espèces bactériennes : *P. aeruginosa* PA14 va activement repousser une autre colonie *swarming* de PA14. Cette répulsion est possible grâce à la sécrétion de rhamnolipides, en particulier les HAA, et est bien caractérisé dans la littérature (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). Il existe un autre mécanisme non caractérisé qui peut repousser les dendrites en approche. Ce mécanisme a initialement été identifié et reproduit par plusieurs anciens étudiants du laboratoire Déziel (Tremblay, 2007). Généralement, une colonie *rhIA*⁻ ne peut repousser des dendrites avoisinantes, ainsi ces derniers pénètrent dans la colonie *rhIA*⁻. Ce n'est pas le cas lorsque la mutation *rhIA*⁻ est couplée avec une mutation Δ *rsmA* ; ce mutant conserve l'habileté à repousser une colonie en approche. La Figure 5.11 montre la différence entre les deux mutants.

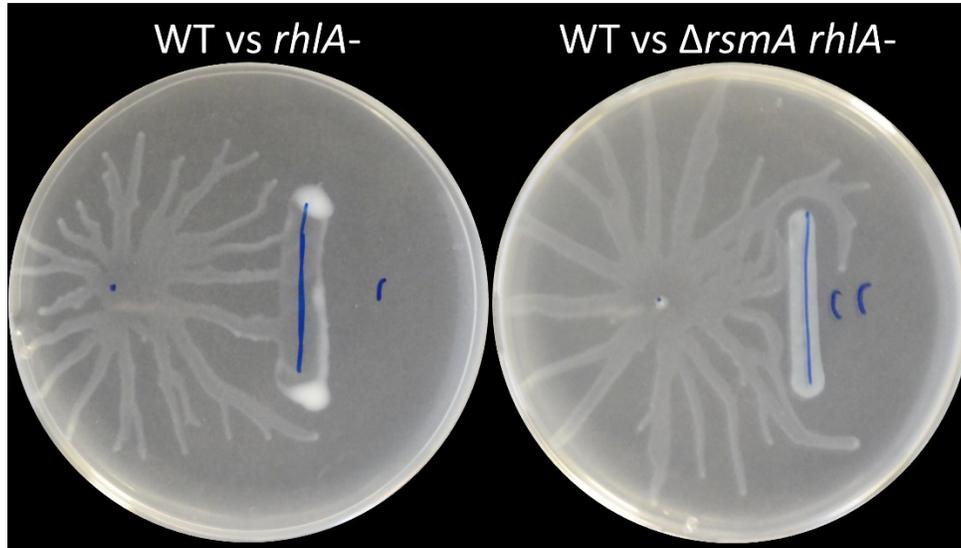


Figure 5.11 Évitement des dendrites en swarming.

Une colonie *swarming* WT se déplace vers une *rhlA*- (gauche) et *rsmA rhlA*- (droite). La mutation supplémentaire dans *rsmA* provoque un évitement de la colonie motile

J'ai posé deux hypothèses pour expliquer le phénomène : (1) Les rhamnolipides sécrétés par la colonie motile sont bloqués et détournés seulement par la présence d'un mutant *rsmA rhlA*-, forçant la colonie WT à la contourner ; (2) L'évitement est causé par la sécrétion d'une molécule extracellulaire contrôlée par la voie Gac/Rsm. Pour tester la première hypothèse, j'ai révélé la limite du front de diffusion des rhamnolipides sécrétés par la colonie WT par une vaporisation à l'huile minérale colorée avec du Sudan IV (rouge). Cette vaporisation révèle que le front de dispersion ne peut traverser aucune des deux colonies mutantes (Figure 5.12). La différence majeure entre les deux mutants testés est que la colonie WT peut pénétrer la colonie *rhlA*-, mais pas le double mutant *ΔrsmA rhlA*- (Figure 5.13). Le même essai a été effectué avec une colonie non-motile triple mutante *ΔpilA ΔfliC rhlA*- : ce mutant ne possède pas la capacité de repousser les dendrites qui approchent, mais empêche tout de même la pénétration des dendrites WT (Figure 5.14). Ces observations semblent écarter l'hypothèse 1 puisque les rhamnolipides diffusent de la même façon face aux différents mutants.



Figure 5.12 Limite du front de diffusion des rhamnolipides

Une colonie WT se déplace vers une colonie *rhlA*- (haut) et *rsmA rhlA*- (bas). La position du front de diffusion des rhamnolipides est révélée par une vaporisation à l'huile colorée au Sudan IV. Des traits rouges mettent en évidence cette limite. La barre blanche représente une échelle de 2 mm. Chaque image représente un composite de deux images prise avec un stéréomicroscope Olympus SZX16, capturées en mode Oblique.

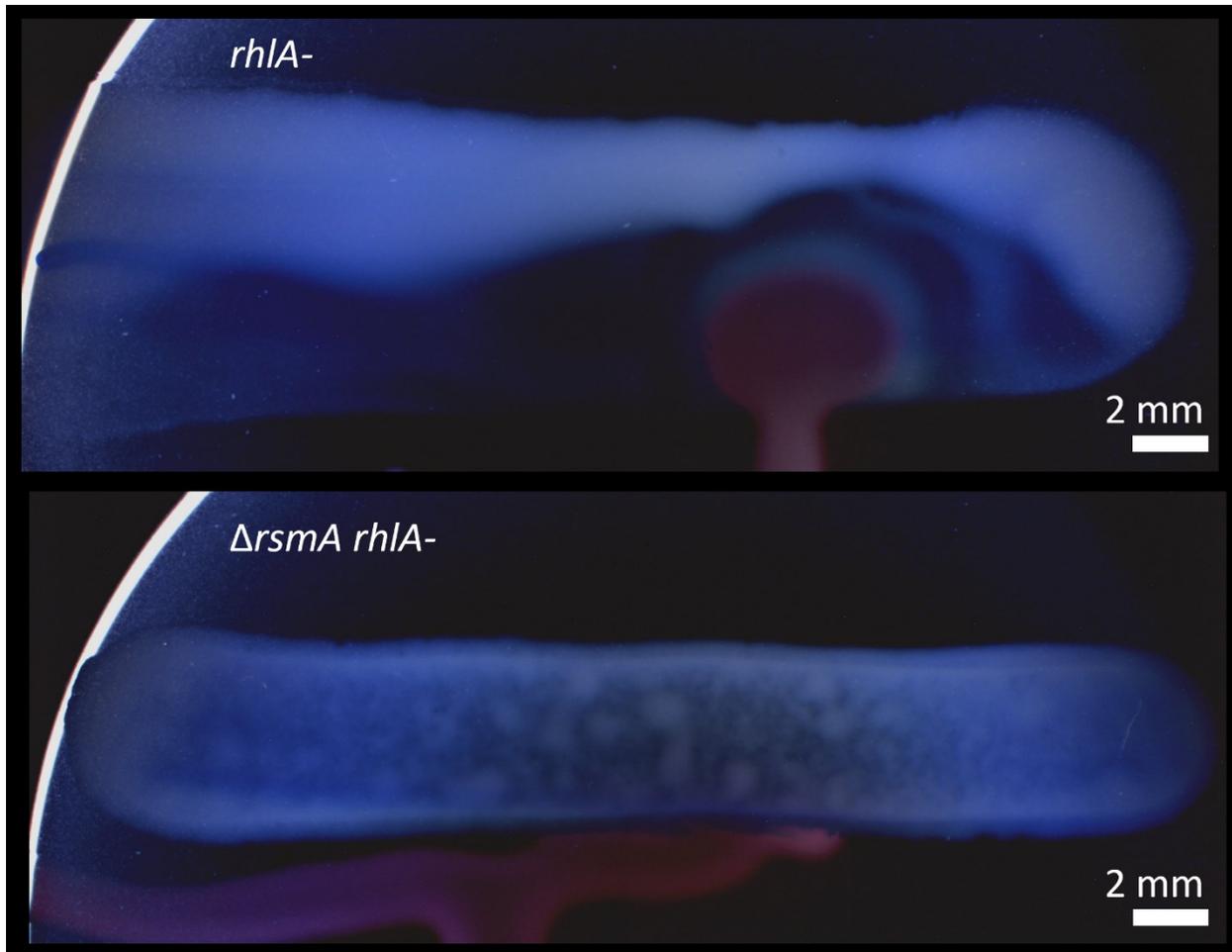


Figure 5.13 Interaction d'une dendrite de PA14 WT avec une colonie non-motile.

PA14 WT (marqué en rouge avec mCherry) se déplace vers une colonie non-motile : *rhlA*- (haut) et *rsmA rhlA*- (bas). Il s'agit des mêmes géloses présentées à la Figure 5.12. L'image est une fusion d'un canal en Darkfield avec un canal rouge. Capturé par stéréomicroscopie avec un appareil Olympus SZX16.

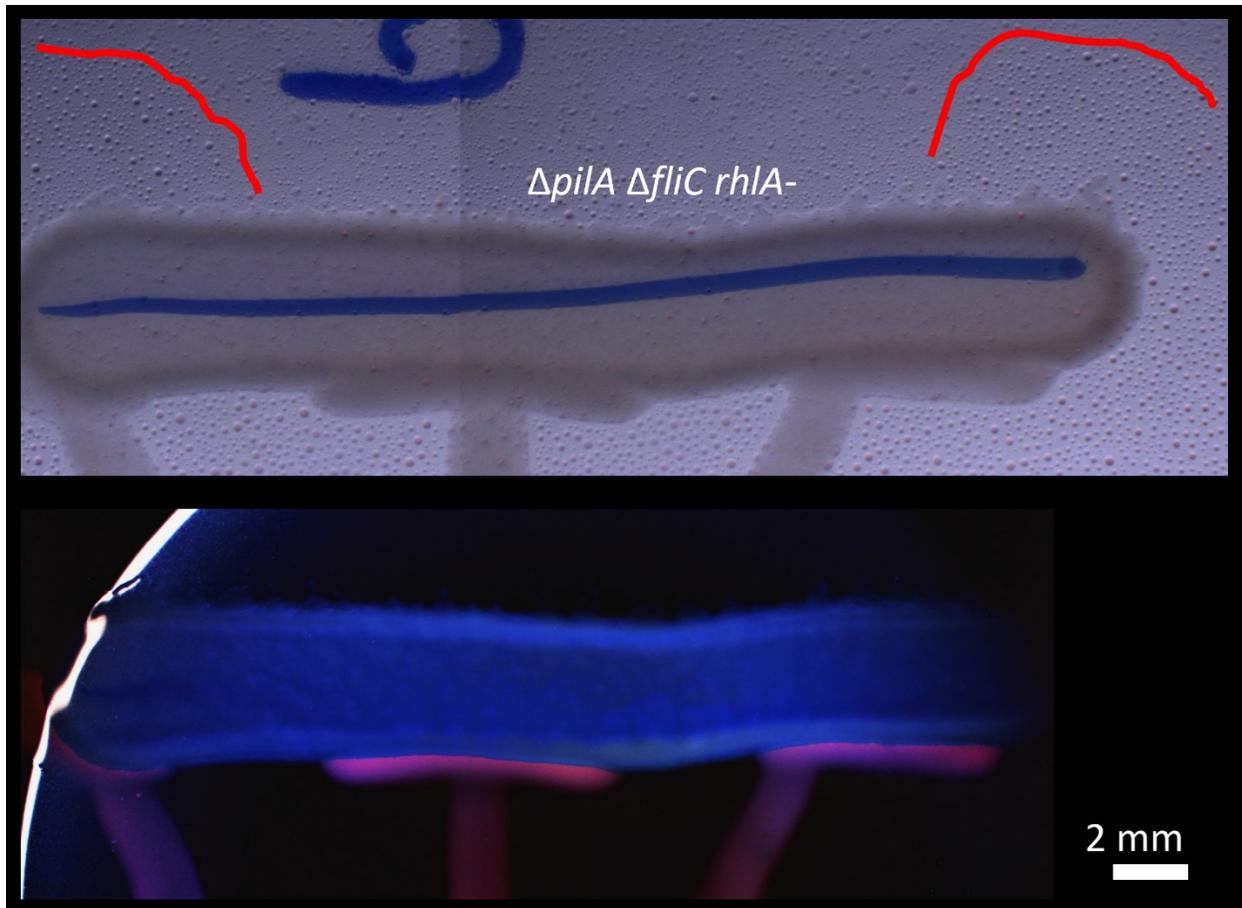


Figure 5.14 Interaction entre une colonie motile de PA14 et une colonie non-motile $\Delta pilA \Delta fliC rhlA-$.

PA14 WT se déplace vers la colonie non-motile du mutant $\Delta pilA \Delta fliC rhlA-$. En haut, le front de diffusion de rhamnolipides ne traverse pas la colonie (traits rouges). En bas, PA14 WT (marqué en rouge avec mCherry) n'est pas repoussé par la colonie non-motile, mais ne la pénètre pas non plus. Images capturées en mode Oblique (en haut) et en darkfield (en bas). Barre blanche représente une échelle de 2 mm.

L'hypothèse 2 propose qu'une molécule sous le contrôle de RsmA est sécrétée par la colonie non-motile. Cette molécule serait responsable de l'évitement des dendrites en approche. Puisque la zone d'évitement est mince (environ 2 mm), le signal diffuse peu dans la gélose et serait fort probablement une petite molécule hydrophobe ou une grosse particule protéique (ou des vésicules). Deux candidats potentiels ont été évalués : la contribution des polyamines et de la pyocine de type R.

Les polyamines sont de petites molécules qui s'accumulent dans le cytoplasme et sont libérées dans l'environnement immédiat de la cellule lors de sa lyse à cause d'un stress. Des travaux récents ont montré le rôle de ces molécules comme signal de stress lors d'une infection par un phage, le tout étant contrôlé par la voie Gac/Rsm (de Mattos *et al.*, 2022). La méthode d'extraction utilisée dans ces travaux implique la lyse avec du chloroforme d'une culture dense de

P. aeruginosa et la récolte de la phase aqueuse contenant les polyamines. La même méthode a été employée ici avec le mutant $\Delta rsmA rhlA$ -, qui ne peut produire de rhamnolipides et devrait surproduire des polyamines. Le potentiel d'induire un évitement a également été évalué pour la phase hydrophobe (chloroforme) et du surnageant sans lyse cellulaire. Il semble que l'évitement soit causé par un facteur intracellulaire hydrosoluble libéré par la lyse des cellules (Figure 5.15). Il est à noter que l'utilisation du chloroforme cause par lui-même l'évitement de la colonie de PA14 WT en approche.

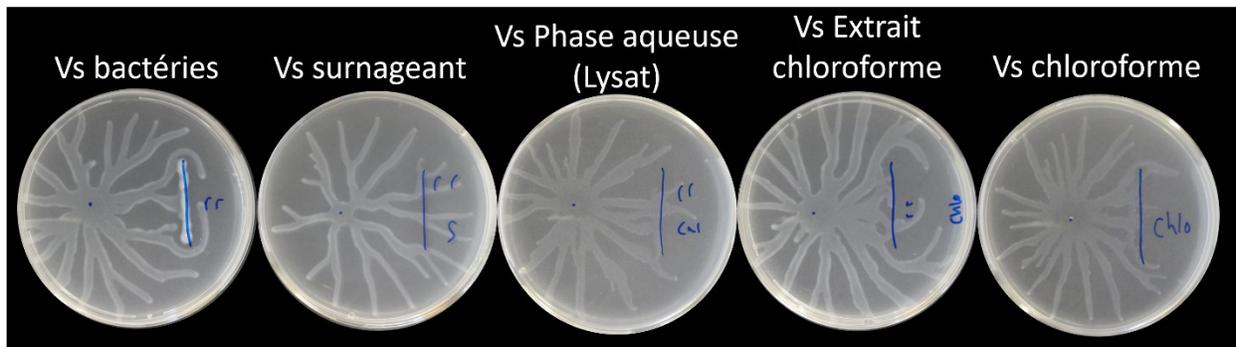


Figure 5.15 Évitement cause par divers extraits de PA14 $\Delta rsmA rhlA$ -.

Une colonie swarming de PA14 WT approche un mutant $\Delta rsmA rhlA$ - (trait bleu). De gauche à droite : des cellules vivantes, le surnageant filtré, des cellules lysées au chloroforme (phase aqueuse), des cellules lysées au chloroforme (phase organique) et du chloroforme seulement. Un évitement est causé par la phase aqueuse de l'extrait cellulaire. Un évitement est également causé par l'utilisation du chloroforme seul.

Pour vérifier que cet évitement était bien causé par la présence de polyamines, des solutions pures de spermidine et putrescine ont été préparées. C'est deux molécules ont été identifiées comme les principales polyamines produites par *P. aeruginosa* (de Mattos *et al.*, 2022). Cependant, l'utilisation des polyamines pures n'a pas causé d'évitement de *swarming* comparé aux témoins : de l'eau et une solution de sucrose (Figure 5.16).

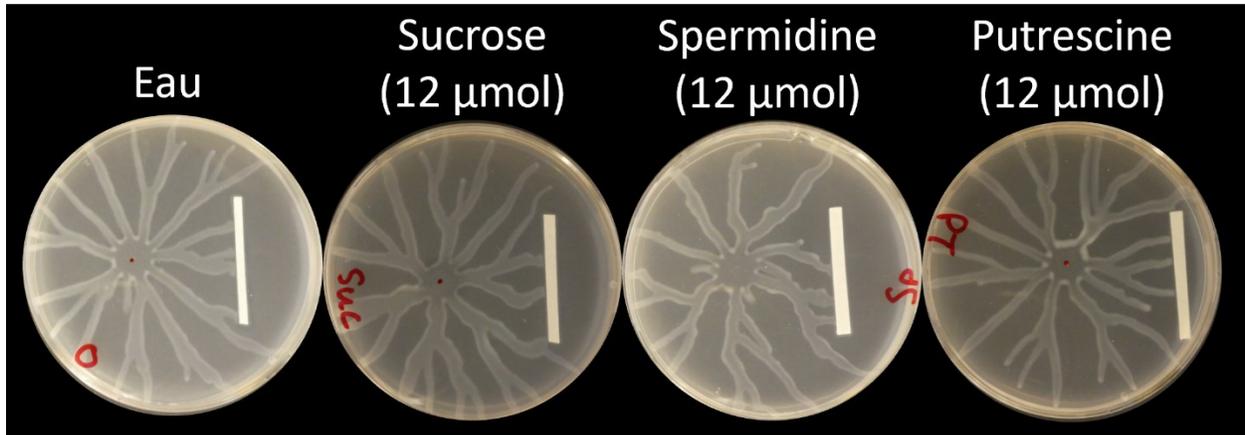


Figure 5.16 Évitement causé par les polyamines

Une colonie de PA14 WT approche un coupon de papier absorbant imbibé d'eau, de sucrose (12 μmol), de spermidine (12 μmol) ou de putrescine (12 μmol). Aucun évitement notable est provoqué par l'une de ces conditions.

Le rôle de la pyocine de type R a été évalué à cause de son implication dans les cascades de stress de *P. aeruginosa*. Ces bactériocines sont libérées par la lyse des cellules suites à un stress et sont toxiques pour les bactéries de la même espèce (Penterman *et al.*, 2014). Ce sont de grosse particule protéique qui diffusent peu dans les environs des colonies qui les produisent. La production de pyocine se fait par la culture en présence de quantité sous-inhibitrice d'un antimicrobien qui cause des dommages à l'ADN, comme la ciprofloxacine (Brazas & Hancock, 2005). L'extrait d'une souche incapable de produire sa pyocine de type R suite à l'insertion d'un transposon Tn5 ($\Delta hptB gacA::MrT7 prt::Tn5$) a été comparé à un extrait de la souche WT, suite à leur induction par l'ajout de ciprofloxacine (Figure 5.17 A-D). Selon ces essais, cette pyocine ne semble pas être impliquée dans l'évitement en *swarming*. De plus, une comparaison entre un extrait de la souche *rhIA*- induite par la ciprofloxacine et non-induite suggère également que la pyocine de type R n'a pas d'impact sur cet évitement. L'extrait a été concentré au Centricon (Millipore) avec une limite de 100 kDa. Indépendamment de l'induction à la ciprofloxacine, l'extrait concentré est capable de causer un évitement (Figure 5.17 E-H). La souche $\Delta hptB gacA::MrT7 prt::Tn5$ comporte des mutation additionnelles dans *hptB* et *gacA* qui sont probablement responsables d'un léger évitement dans ces conditions.

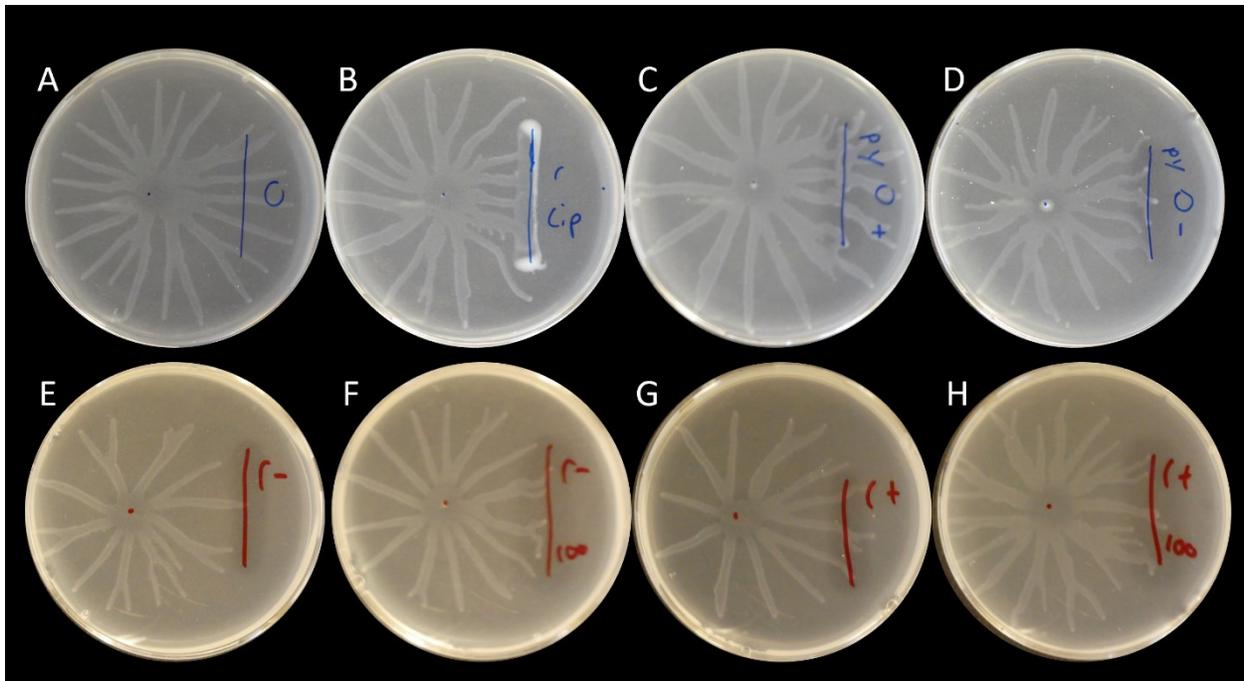


Figure 5.17 Essai d'évitement avec des extrait de pyocine de type R.

Une colonie de PA14 WT en swarming face à une condition d'évitement. (A-D) La colonie approche des extraits contenant potentiellement des pyocine de type R (trait bleu) : **A** eau seulement, **B** une colonie *rhIA*- traitée avec une concentration sous-inhibitrice de ciprofloxacine, **C** un extrait d'une souche capable de produire sa pyocine (PA14 WT) induite à la ciprofloxacine, **D** un extrait d'une souche incapable de produire sa pyocine R ($\Delta hptB gacA :: MrT7 prt :: Tn5$) induite à la ciprofloxacine. (E-H) La colonie approche des extraits de la souche *rhIA*- induit ou non à la ciprofloxacine, concentrés ou non au Centricon 100 kDa (trait rouge) : **E** extrait non induit et non concentré, **F** extrait non induit et concentré, **G** extrait induit et non concentré, **H** extrait induit et concentré. Expérience faite deux fois en triplicat.

Pour confirmer la masse moléculaire du signal d'évitement, un extrait cellulaire a été successivement filtré avec des Centricon de limite de masse différents : 100 kDa, 30 kDa et 10 kDa. Les diverses fractions ont été évaluées pour leur potentiel répulsif. Seule la fraction retenue par le filtre de 100 kDa maintient l'activité d'évitement. Les autres fractions n'ont plus cet effet. Ceci suggère donc que la molécule qui cause l'effet d'évitement a une masse moléculaire sous forme native de plus de 100 kDa.

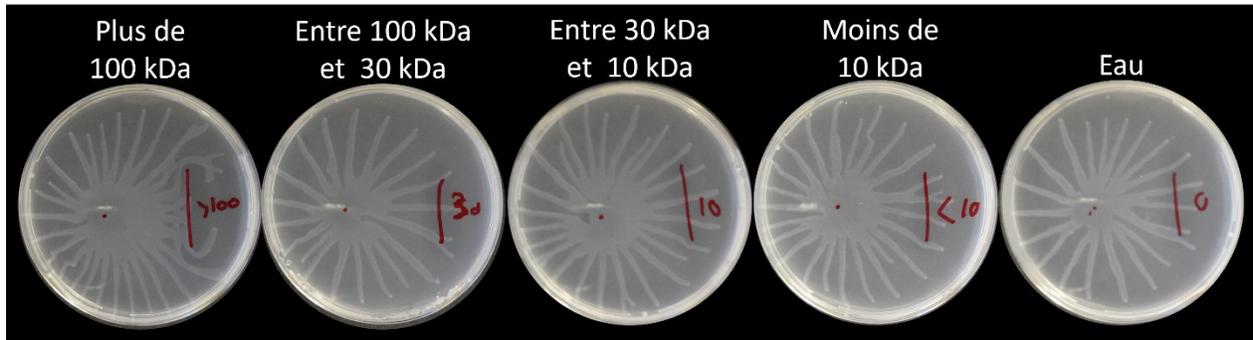


Figure 5.18 Fractions de diverses masses moléculaires capable de causer l'évitement.

Fractions de diverses masses moléculaires d'un extrait causant l'évitement d'une colonie swarming en approche. L'extrait est successivement filtré avec des limites de 100 kDa, 30 kDa et 10 kDa. Seule la fraction de plus de 100 kDa est active.

Un extrait cellulaire lysé avec du chloroforme peut alors être concentré avec un filtre de 100 kDa pour augmenter son effet. Ceci facilite aussi la potentielle purification du signal qui cause l'évitement. Une tentative de purification a été faite grâce à l'ultracentrifugation sur un Gradient Optiprep™ (Millipore). Le gradient a été séparé en 12 fractions suite à la centrifugation, chacune étant concentrées par filtration à 100 kDa et lavées avec de la saline. L'activité de chaque fraction a été évaluée en *swarming*.

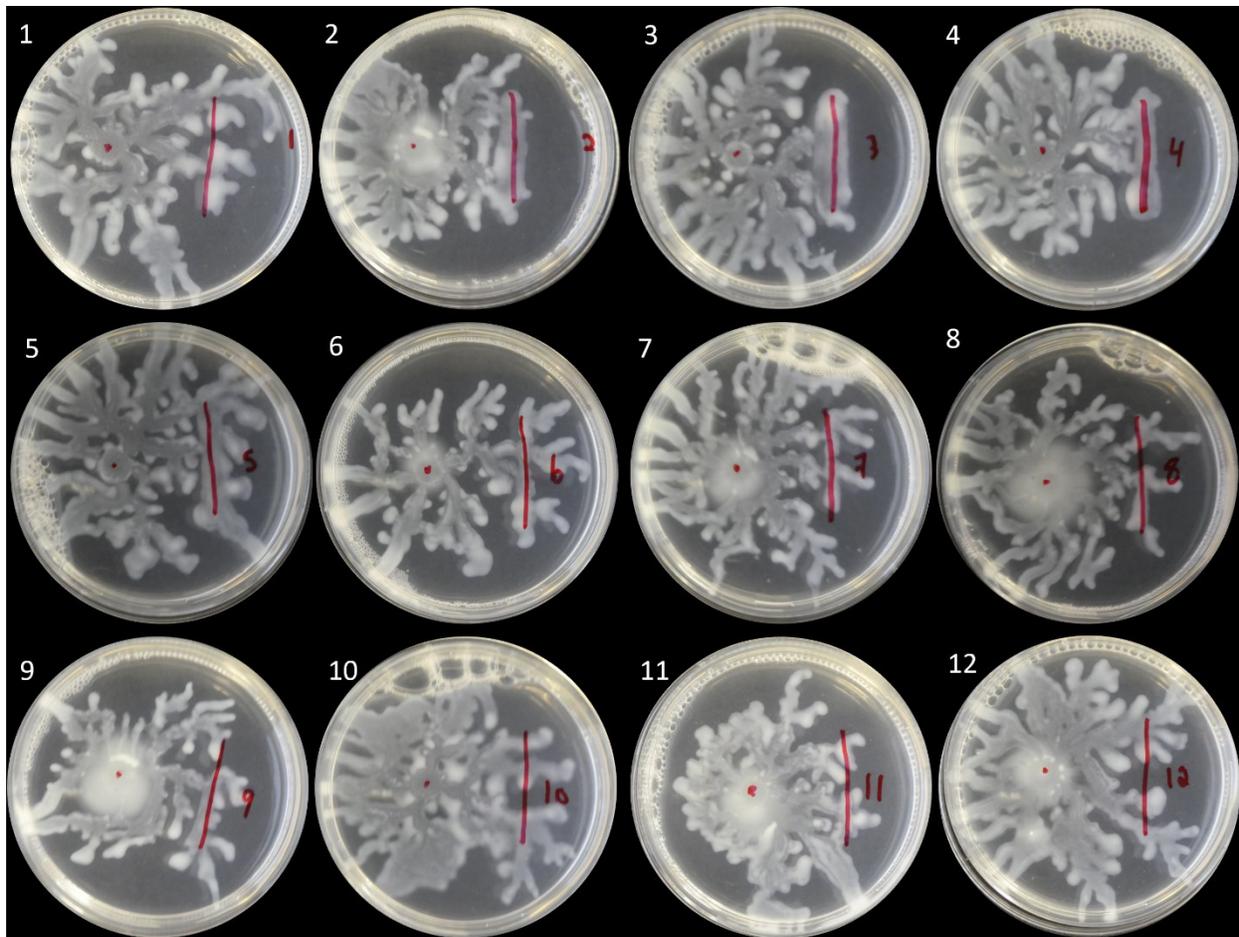


Figure 5.19 Extrait d'évitement purifié sur gradient

L'activité des fractions ont été évaluées en *swarming*. PA14 WT approche un étalement de l'extrait (trait rouge). Chaque extrait sont numérotés de 1 à 12 selon l'ordre de prélèvement à partir du haut de gradient. Malgré l'aspect différent de ce *swarming*, les fractions 2, 3 et 4 ont clairement bloqué l'expansion de la colonie.

Dans leur ensemble, les fractions 2, 3 et 4 sont celles qui maintiennent leur effet répulsif. Ces fractions ont été visualisées par microscopie électronique à transmission (TEM), surtout pour confirmer l'absence de pyocines. Les fractions contenaient une grande quantité de fibres flagellaires, mais virtuellement aucune pyocine de type R ou F (données non montrées). Pour comparaison, la fraction 5 a aussi été visualisée, mais avait un aspect similaire aux trois autres fractions testées. Les pyocines ne semblent donc pas impliquées dans l'évitement des dendrites d'une colonie *swarming* – du moins, les pyocines de type R et F qui sont visibles par microscopie électronique. Il est important de noter que je n'ai fait cette étape de purification sur gradient et l'observation de ces fractions qu'une seule fois. Ceci constitue donc des essais préliminaires.

5.9.4 L'évitement en *swarming* implique potentiellement les protéines Hcp

Le signal d'évitement est vraisemblablement produit en plus grande quantité dans un mutant $\Delta rsmA$ (Figure 5.11). Pour confirmer le rôle de RsmA dans le contrôle de ce signal, un extrait du mutant $\Delta rsmA rhIA-$ a été comparé à un extrait d'un mutant $\Delta rsmY \Delta rsmZ$. Ce dernier possède une régulation par RsmA plus forte à cause du manque de titration causé par l'absence des petits ARN inhibiteurs *RsmY* et *RsmZ*. Les extraits obtenus ont été testés en *swarming* : l'extrait du double mutant $\Delta rsmY \Delta rsmZ$ semble avoir une capacité répulsive réduite comparativement à $\Delta rsmA rhIA-$ (Figure 5.20). Ce résultat semble confirmer le rôle direct de RsmA dans la régulation de ce signal d'évitement.

Les deux extraits ont été séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Quelques bandes de protéines sont présentes seulement dans l'extrait $\Delta rsmA rhIA-$ (Figure 5.20). Elles ont migré à une position similaire à la bande de 20 kDa de l'échelle de masse moléculaire. Cette hauteur de taille correspond à la masse des protéines Hcp : Hcp2, HcpA, HcpB et HcpC ont une taille de 19.1 kDa, alors que Hcp1 et Hcp3 ont une taille de 17.8 kDa. Ces dernières sont des protéines sécrétées par le système de sécrétion de type VI, qui est directement réprimés par RsmA. J'émetts donc l'hypothèse que cet évitement implique ces protéines Hcp. Deux bandes supplémentaires a environ 40 kDa et 55 kDa sont aussi visibles seulement chez le mutant $\Delta rsmA rhIA-$. Une bande plus intense chez le mutant $\Delta rsmY \Delta rsmZ$ (à 50 kDa) correspond possiblement à la flagelline, puisque ce mutant est hyper-motile (Jean-Pierre *et al.*, 2016). Je précise que j'utilise un gel dénaturant, ce qui explique la présence de protéines plus petites que 100 kDa après la filtration : ces protéines sont nativement présentent sous forme d'oligomères.

Il est important de noter que je n'ai pas réussi à répéter cette observation : mes extractions suivantes ont toutes menées à un évitement pour le double mutant $\Delta rsmY \Delta rsmZ$. Ceci signifie que la présence du facteur d'évitement est très sensible aux conditions de croissance ; j'ai dû changer de matériel d'incubation entre le premier essai et les suivants à cause d'un bris d'appareil. Obtenir des extraits reproductibles permettrait de faire des analyses protéomiques pour identifier ce signal.

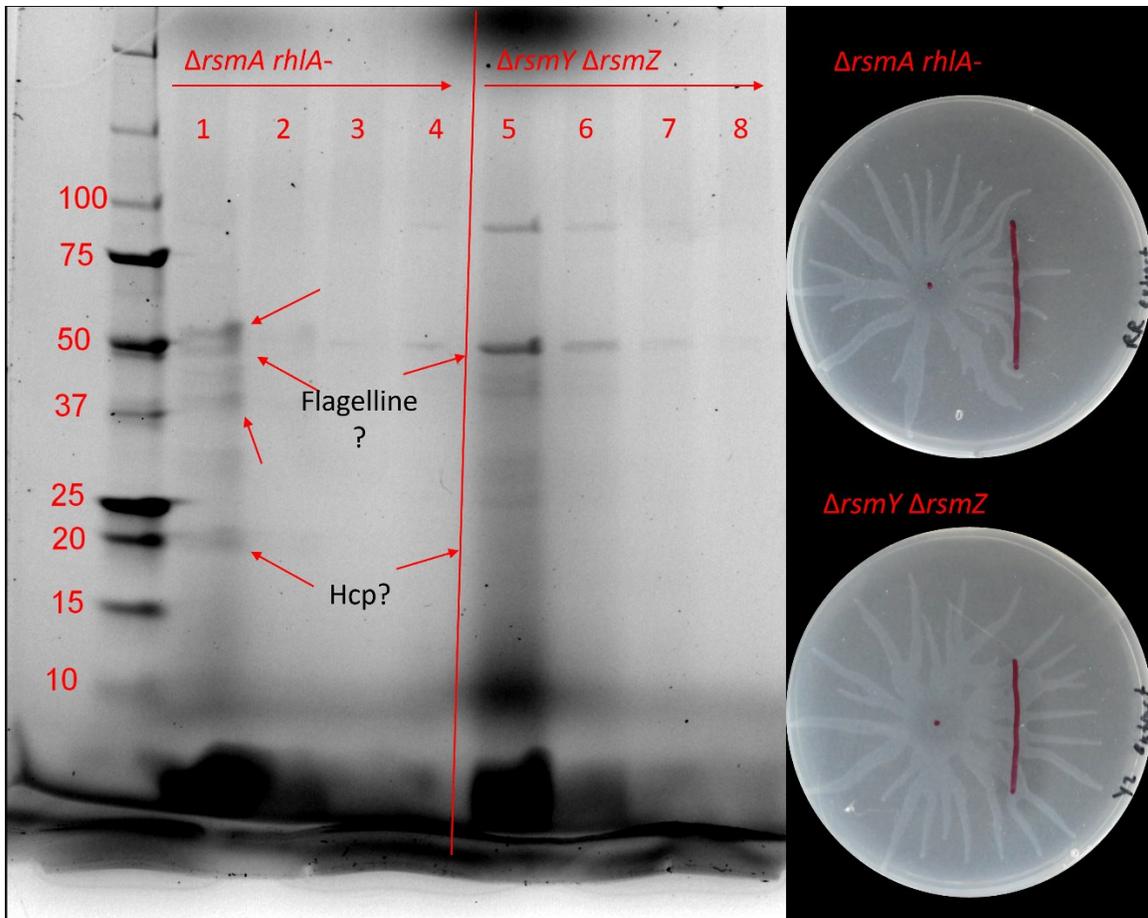


Figure 5.20 Gel dénaturant des extraits causant ou non de l'évitement en *swarming*.

Les extraits causant de l'évitement (produits par $\Delta rsmA rhlA-$) et aucun évitement (par $\Delta rsmY \Delta rsmZ$) ont été placés sur gel dénaturant SDS-PAGE (à gauche) et sur gélose *swarming* (à droite). Gel : les puits 1 à 4 notent la présence de l'extrait de $\Delta rsmA rhlA-$, les puits 5 à 8 la présence de l'extrait $\Delta rsmY \Delta rsmZ$. Une dilution en série de $\frac{1}{4}$ pour chaque puit (de gauche à droite). Plusieurs bandes sont différentes entre les deux extraits (flèches rouges) : à environ 20 kDa (Hcp2-A-B-C ont une taille de 19.1 kDa), 50 kDa (correspond à la flagelline) et deux bandes à environ 40 et 55 kDa. *Swarming* : 10 μ L d'extrait pour $\Delta rsmA rhlA-$ (haut) et $\Delta rsmY \Delta rsmZ$ (bas) a été étalé sur le trait rouge. Une colonie *swarming* WT s'est développée pendant 20 heures à 37°C sur milieu M9DCAA.

5.10 Discussion: Interactions interbactériennes durant le *swarming*

5.10.1 Le *swarming* chez les autres espèces bactériennes

Les essais co-*swarming* ont pu mettre en évidence les différentes interactions qui existent entre différentes espèces bactériennes, soit : *Bacillus subtilis* PY79, *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958, *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, *Serratia marcescens* LMG 2792, *Proteus mirabilis* LSPQ3700, *Burkholderia cenocepacia* K56-2 et *Burkholderia multivorans* CEP0781. Toutes les espèces bactériennes qui ont été mélangées avec *P. aeruginosa* PA14 dans le cadre des essais de co-*swarming* sont des espèces bactériennes capables d'effectuer la motilité de type *swarming* lorsque les conditions leur conviennent. Cependant, ce n'est pas le cas pour les conditions

optimisées pour *P. aeruginosa* qui ont été utilisées : le milieu M9DCAA. En effet, aucune de ces espèces n'est motile en *swarming* dans ces conditions. Dans le cas de *B. cenocepacia*, mes travaux montrent que ce défaut est lié à une production insuffisante de ses agents mouillants sur M9DCAA-agar (Bernier *et al.*, 2016; Morin *et al.*, 2022). Pour les autres espèces, il est surprenant d'en observer aucune capable de *swarmer* sur M9DCAA. Par exemple, *S. maltophilia* est capable de faire du *swarming* sur milieu similaire contenant des acides casaminés et du dextrose (Martinez *et al.*, 2015). La souche de cette espèce que j'ai utilisée est non seulement incapable de *swarmer* par elle-même dans nos conditions, mais sa présence ne semble pas influencer le patron de déplacement de PA14 WT et ne permet pas d'effectuer du co-*swarming* avec PA14 $\Delta fliC$. Ceci est en contraste direct avec l'impact de la présence de *S. marcescens* sur le co-*swarming* : celle-ci active de façon impressionnante sa motilité de type *swarming* en présence de PA14 WT et $\Delta fliC$ et semble même supprimer la motilité de cette dernière. Ces deux espèces ont fait partie de mes premières rondes d'essais exploratoires pour le co-*swarming* avec d'autres espèces que *B. cenocepacia*. Le choix de ces souches était basé sur le fait que : ces deux espèces sont elles aussi impliquées dans la colonisation des poumons d'individus atteints de fibrose kystique (Jones, 2019) ; ces deux espèces et *P. aeruginosa* étaient ciblées par un recensement de la présence de pathogènes opportunistes dans le milieu hospitalier impliquant notre laboratoire (Bourdin *et al.*, 2023) ; ces deux espèces sont capables de *swarming* (Harshey & Partridge, 2015; Martinez *et al.*, 2015). Les deux souches évaluées ont été sélectionnées par hasard parmi notre banque de souches congelées. Néanmoins, le phénotype de co-*swarming* induit par *S. maltophilia* et *S. marcescens* est très divergent entre eux et *B. cenocepacia*, les mécanismes derrière ces interactions devront être investigués davantage dans le cadre de futurs travaux.

5.10.2 Le partage des ressources

Les travaux présentés dans ce chapitre mettent en évidence la capacité d'autres espèces bactériennes d'utiliser les ressources communes de PA14, notamment ses molécules extracellulaires tensioactives. Dans une culture de *P. aeruginosa* pure, la production de rhamnolipides est favorisée dans des conditions où le carbone est en excès (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Ce contrôle métabolique élimine la possibilité d'impact négatif sur la croissance de la production d'une grande quantité de métabolites riches en carbone, puisque dans tous les cas la croissance est déjà limitée par le manque d'un autre élément nutritif (Boyle *et al.*, 2017). Ceci empêche également la possibilité que ce bien commun soit exploité par des « tricheurs », puisque le gain métabolique à ne pas produire les rhamnolipides est minimisé par ce contrôle métabolique

(Boyle *et al.*, 2017). Il est possible en revanche que d'autres espèces bactériennes puissent « truquer » *P. aeruginosa* via des signaux interbactériens en la forçant à produire ses rhamnolipides dans des conditions non optimales, par exemple en influençant le quorum sensing du système Rhl. Le partage inter-espèce des signaux de *quorum sensing* comme les AHL est bien connu. Par exemple, *S. maltophilia* est capable de détecter la présence des AHL de *P. aeruginosa* pour activer son *swarming* (Martinez *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* et *B. cepacia* peuvent s'échanger leur AHL, influençant leurs phénotypes (Lewenza *et al.*, 2002; Riedel *et al.*, 2001). Cette potentielle communication entre les espèces que j'ai étudiées n'a pas été évaluée dans notre contexte expérimental. Notre laboratoire a récemment observé de façon préliminaire une potentielle activation de l'opéron *rhlAB* de *P. aeruginosa* par la présence de certaines bactéries, dont *B. cenocepacia* K56-2 (données non montrées).

5.10.3 L'évitement

Malgré leur incapacité de faire du *swarming* seul et à affecter le *swarming* de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* Pf0-1 et *B. subtilis* PY79 sont toutes les deux capables de causer l'évitement d'une colonie motile de PA14 en approche. Le mécanisme derrière cette répulsion est inconnu, mais est bien connu entre deux colonies de *P. aeruginosa*. On sait que la production de HAA est capable à elle seule de repousser les dendrites d'une colonie en approche (Tremblay *et al.*, 2007). Puisque les HAA diffusent assez loin dans un gel suite à leur sécrétion, cet évitement se fait à plus de 1 cm de la colonie productrice (Tremblay, 2011; Tremblay *et al.*, 2007).

Mis à part l'importance des HAA pour cet effet, un autre signal de répulsion existe chez *P. aeruginosa*, causant un évitement très proche de 1 à 3 mm. Ce signal a initialement été mis en évidence chez un double mutant $\Delta hptB rhIA-$, puis $\Delta rsmA rhIA-$ (Robitaille, 2020; Tremblay, 2011). Ces mutants sont non seulement capables de repousser le *swarming* en approche, mais également insensibles à la sécrétion de rhamnolipides aux alentours – c'est-à-dire que les bactéries ne se décalent pas dans la colonie en présence de biosurfactants. Mes travaux montrent aussi qu'un triple mutant $\Delta pilA \Delta fliC rhIA-$ est insensible aux rhamnolipides environnants. Je propose donc que cet effet observé où une colonie non-motile se réorganise en présence d'une vague de rhamnolipides requiert les flagelles. Ceci est consistant avec l'observation de l'augmentation de la motilité locale sur gélose lorsque les biosurfactants sont présents (Deforet, 2023). Ceci pourrait également expliquer pourquoi une colonie *swarming* peut pénétrer une colonie *rhIA-*, mais pas une colonie $\Delta pilA \Delta fliC rhIA-$: les flagelles donneraient une certaine « fluidité » à la colonie en laissant les bactéries se déplacer localement.

Quelle est la nature du signal d'évitement à courte distance ? Les travaux préliminaires de Julien Tremblay avaient corrélé cet évitement par la surexpression des protéines Hcp (aiguille du SST6) chez un mutant $\Delta hptB rhlA$ - (Tremblay, 2011). Cette hypothèse était basée sur des essais de protéomique chez ce mutant, mais aussi sur l'implication d'homologue de Hcp dans la reconnaissance du soi chez *Proteus mirabilis* (Gibbs & Greenberg, 2011). Plusieurs mécanismes de reconnaissance de soi existent, notamment : le *quorum sensing* (associé au PQS chez *P. aeruginosa*), le SST6, les systèmes d'inhibition contact-dépendantes (ne s'applique pas ici parce que non sécrété) et la libération de phages (Song *et al.*, 2019; Troselj *et al.*, 2018). J'ai aussi considéré le rôle des polyamines et des pyocines à cause de leur implication dans la signalisation de stress (de Mattos *et al.*, 2022; Matsui *et al.*, 1993; Penterman *et al.*, 2014). Les données que j'ai obtenues semblent favoriser l'implication du SST6, surtout considérant le rôle que joue le SST6 dans le *swarming* (sera discuté à la section 7.4.3).

5.11 Perspectives

Mes travaux sur le co-*swarming* entre *P. aeruginosa* et d'autres espèces bactériennes offre un regard sur les différentes interactions qui peuvent prendre place dans une communauté bactérienne complexe. Les avantages d'utiliser un modèle de motilité de type *swarming* pour faire cette étude sont : la facilité d'utiliser le modèle comparativement à une étude *in situ* dans l'environnement ou un modèle animal ; la présence d'une « pression sélective », soit la colonisation de la gélose, qui requiert une série d'éléments qui peuvent être partagés entre les bactéries pour être réalisée ; l'implication d'un phénotype macroscopique, qui permet d'avoir un aperçu des changements globaux à l'ensemble de la colonie comme une modification de la forme, taille ou vitesse de colonisation. La plus grande limite est l'incompatibilité de ce modèle aux conditions *in situ* naturelles, contrairement à un modèle de biofilm en chambre à flux qui se rapproche beaucoup plus de conditions comme la colonisation des conduits d'évier. Je crois qu'il y a un grand potentiel d'utiliser le *swarming* pour identifier des interactions qui surviennent entre des bactéries partageant des niches écologiques similaires. Il serait intéressant aussi de confirmer ces observations dans des modèles d'infection animale. Par exemple, mesurer l'impact de la perte du flagelle ou des rhamnolipides sur la mortalité d'un modèle simple comme la drosophile par PA14, et voir si un mélange avec K56-2 a un effet synergétique sur la virulence.

Dans le cadre de mes travaux, je n'ai malheureusement pas identifié le mécanisme qui permet à *P. aeruginosa* de se déplacer en co-*swarming* avec *B. cenocepacia*. Il se peut que ce mécanisme soit associé à une interaction directe par un appendice de PA14 ou K56-2, ou l'induction du *sliding*

de PA14 par K56-2. Il serait intéressant de tester quelques mutants supplémentaires pour identifier un potentiel mécanisme d'activation du *sliding*. Dans le cas où un mutant serait incapable de faire du *sliding*, évaluer son potentiel à co-swarmmer avec K56-2. Un bon candidat pour un tel essai serait le triple mutant $\Delta pilA \Delta fliC \Delta rsmA$, mais il serait aussi possible de tester un mutant surproducteur de di-GMPc comme *wspF*- (donc $\Delta pilA \Delta fliC wspF$ -).

Je n'ai pas effectué le co-swarming dans les conditions M9DCAA-agar, où K56-2 est capable de *swarmmer* sans produire son agent mouillant. Il serait intéressant de suivre la position des deux espèces dans ces conditions avec marquage fluorescent. Il est possible que le co-swarming s'effectue seulement parce que K56-2 doit attendre la production de biosurfactant par PA14 sur agar.

Je crois qu'il y a un bon potentiel pour explorer les mécanismes de contrôle des systèmes de *quorum sensing* de PA14 en présence d'autres bactéries. La production de biosurfactant étant un facteur limitant pour le *swarming* sur agar, et étant régulé par le régulateur du *quorum sensing* RhIR, il serait facile de cribler pour des espèces bactériennes activant le *swarming* d'un mutant des synthèses *lasI*-/*rhII*- de PA14, par exemple.

Avec l'étude sur l'écologie microbienne des éviers en milieu hospitalier (Bourdin *et al.*, 2023), il y a un panel impressionnant de souches de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* et *S. marcescens* disponibles au laboratoire Déziel. Toutes les trois ont été co-isolées dans un même environnement et ont un potentiel d'avoir des phénotypes intéressants en *swarming*.

Pour l'étude des communautés, il sera nécessaire d'avoir des outils adaptés pour suivre des populations diverses marquées avec des fluorophores, avec une résolution spatiale et temporelle précise. Un scanner comme le Typhoon permet de prendre des images d'une gélose entière, mais numériser une seule gélose prend de 5 à 10 minutes. Le microscope confocal à balayage laser offre la meilleure résolution ET séparation des couleurs, mais requiert encore plus de temps de préparation des lames et d'acquisition d'image. La meilleure alternative serait la stéréomicroscopie, cependant l'appareil que nous avons sur place (Olympus SZX16) n'est ni motorisé, ni capable de maintenir des conditions de croissance adéquate (température et humidité). La motorisation est vraiment le seul problème qui empêche d'effectuer de l'imagerie « *timelapses* » précis, nécessitant de changer les canaux et les filtres manuellement entre chaque lecture. L'emploi d'un appareil de tomographie optique comme un *in vivo imaging system* de type IVIS pourrait être une alternative viable pour quelques essais. Affiner les techniques d'imagerie utilisées donnerait des données plus justes, plus précises et avec une composante temporelle qui manque à mes travaux.

6 3^e CHAPITRE DE RÉSULTATS : IDENTIFICATION DE CIBLES DE RÉGULATION DE RsmA

(Article 3) *In vitro* RNA pull-down reveals uncharacterized binding targets of RsmA from *Pseudomonas aeruginosa*

Un *pull-down* d'ARN *in vitro* révèle de nouvelles cibles de liaison pour le régulateur RsmA

Auteurs

Charles D. Morin, Jonathan Perreault et Eric Déziel

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique (INRS), Laval (Québec), H7V 1B7, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

BioRxiv

Soumission : À venir

DOI : N/A

Contribution des auteurs :

Charles Morin : Conception et réalisation des expérimentations. Analyses des résultats. Rédaction et correction du manuscrit.

Jonathan Perreault et Eric Déziel : Conception des expérimentations. Analyse des résultats et encadrement. Révision du manuscrit. Obtention du financement.

Lien entre l'article ou les articles précédents et le suivant :

Cette étude porte sur la caractérisation de l'activité du régulateur global RsmA. Cette protéine est fortement impliquée dans le contrôle de la motilité de type *swarming*, un point central de ma thèse.

6.1 Résumé en français

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un microorganisme très versatile capable d'infecter les personnes avec des défenses immunitaires affaiblies. Cette bactérie régule son adaptation à son milieu par une voie de régulation appelée Gac/Rsm, qui agit par le régulateur global RsmA. Pour identifier différentes nouvelles cibles de cette protéine liant l'ARN, nous avons employé une méthode de type *pull-down* pour séparer les cibles de liaison de RsmA d'un mélange synthétique d'oligonucléotides comportant chaque région 5'UTR prédites de *P. aeruginosa* PA14. Au total, 91 différentes 5'UTR cibles ont été enrichies de façon significative comparativement aux niveaux de base. Plusieurs de ces cibles ont déjà été identifiées dans des analyses de ChIP-seq précédemment publiées, dont des gènes du système de sécrétion de type VI, et d'autres cibles de RsmA connues comme *cafA* et *siaC*. Les autres cibles identifiées par notre méthode sont présentement non caractérisées. Nos résultats permettent donc d'étendre la vaste régulon de RsmA.

6.2 Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a versatile opportunistic pathogen. One of the main gene expression regulation systems in this bacterium is the Gac/Rsm pathway acting through the global posttranscriptional regulator RsmA. To shed additional light onto the mRNA targets of RsmA, we conducted an *in vitro* RNA pull-down assay using a synthetic oligonucleotide bank of all *Pseudomonas aeruginosa* PA14 predicted 5'UTR sequences. In total, 91 different 5'UTR targets were bound by RsmA above background level, including several of which already identified in previously published Chromatin Immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) assays. Of note, genes implicated in the Type VI Secretion System, other known targets of RsmA like *cafA* and *siaC* along with many previously unknown gene products were bound by RsmA. Our results expand the vast regulon of RsmA with new targets that will need to be validated.

6.3 Introduction

Pseudomonas aeruginosa thrive in its environmental niches by finely tuning the expression of multiple secretion systems, cell appendages and metabolic pathways (Crone *et al.*, 2020; Moradali *et al.*, 2017). These virulence factors give an edge to *P. aeruginosa* when competing with other microorganisms, scavenging resources, or facing predators. Since *P. aeruginosa* is an opportunist pathogen, these tools also help it invade its broad range of hosts, including humans

(Moradali *et al.*, 2017; Morin *et al.*, 2021). One of the key regulatory systems implicated in the control of these virulence factor is the Gac/Rsm pathway (Francis *et al.*, 2017).

The Gac/Rsm pathway is comprised of the GacS/GacA two-component system and the RsmY/RsmZ/RsmA regulatory cascade (Francis *et al.*, 2017). After responding to a still unidentified cue, the histidine kinase GacS activates through phosphorylation the response regulator GacA (Latour, 2020). The latter is the main transcriptional activator of the sRNAs RsmY and RsmZ (Brencic *et al.*, 2009). Both sRNAs then bind to, and sequester, the global regulator RsmA (Janssen *et al.*, 2018b).

RsmA is key to the Gac/Rsm pathway regulation. This protein acts as a post-transcriptional regulator on a multitude of mRNA targets (Chihara *et al.*, 2021; Gebhardt *et al.*, 2020; Gerovac *et al.*, 2021; Heurlier *et al.*, 2004). Its main function is recognized to be as a translational repressor, binding mRNAs around their Ribosome Binding Sites (RBS) and preventing translation of bound mRNA (Schubert *et al.*, 2007). This binding happens atop hairpin structures with the ANGA consensus sequence as part of a loop (Chihara *et al.*, 2021; Schubert *et al.*, 2007). This coincides well with RBS sequences being rich in A/G nucleotides (Ma *et al.*, 2002). The sRNA RsmY and RsmZ both possess multiple of these ANGA hairpins to act as decoy and prevent RsmA from binding mRNA targets (Janssen *et al.*, 2018b). The amount of free RsmA protein present in the cytoplasm of *P. aeruginosa* cells determines the outcome of its regulation. RsmA also works in tandem with a homologue protein called RsmN (Marden *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2018).

RsmA regulates the production of multiple proteins associated with lifestyle transition and secondary metabolites production (Brencic & Lory, 2009; Burrowes *et al.*, 2006; Heurlier *et al.*, 2004; Pessi *et al.*, 2001). Notably, RsmA directly represses the adoption of a sessile lifestyle by preventing the expression of exopolymer synthesis operons implicated in biofilm formation (Irie *et al.*, 2019; Irie *et al.*, 2010), binds to transcripts associated with all three gene clusters of the Type VI Secretion System (Allsopp *et al.*, 2017), and indirectly promotes bacterial flagellar motility (Heurlier *et al.*, 2004; Irie *et al.*, 2019). Indeed, when using swarming motility as a study model, completely deleting the *rsmA* gene leads to strong defect in the ability of *P. aeruginosa* to spread on a surface (Heurlier *et al.*, 2004).

To acquire a more comprehensive, and potentially less biased, knowledge of the array of mRNA targeted by the regulatory protein RsmA, we conducted an *in vitro* pull-down assay using a synthetic pool of all predicted 5'UTRs found in *P. aeruginosa* PA14. This approach is novel in that 5'UTR binding is not linked to the level of transcription of these potential targets and could lead to the identification of new RNA targets that are simply poorly expressed under laboratory

conditions. Our results indicate that the regulatory impact of RsmA is broad, with many potential mRNA targets still needing to be characterized.

6.4 Materials and Methods

6.4.1 Producing a bank of *in vitro* synthesized PA14 5'UTR DNA

Predicted 5'UTR regions of *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (PA14) were obtained as a Comma Separated File using the RiboGap V2 database (Naghdi *et al.*, 2017). In short, a query was formulated by choosing “DNA_seq” and “locus_tag” in the CDS tab and “sequence” in the 5'UTR tab. For each of the obtained 5'UTR regions, a string of up to 105 nt from the 5'UTR was combined with the first 18 nt (six codons) of the directly downstream gene CDS. Each of these regions were flanked in 5' with the primer sequence of CM_OligoPool_F and in 3' with the sequence of CM_OligoPool_R for targeted PCR amplification. The maximal length of each oligonucleotide was 170 bases. All primers used in this study are listed in Table 6.1.

Table 6.1 Primers used in this study

Name	Sequence	Use
CM_OligoPool_F	ATTGTTATCCGCTCACAAAAGCTT	Oligo pool amplification
CM_OligoPool_R	AAACGACGGGATCAGCCTCGAG	Oligo pool amplification
CM_T7+OligoPool_F	TAATACGACTCACTATAGGGATTGTTATCCGCTCACAAAAGCTT	Adds T7 promoter to pool

A pool of all the sequences was synthesized by an oligo synthesis service (*Custom Array GenScript*). The obtained mixture was amplified using primers specific to the aforementioned flanking regions in a first round of PCR (Table 6.1).

6.4.2 *In vitro* transcription of the DNA pool

The DNA pool containing all the predicted 5'UTR regions of PA14 were transcribed into RNA using T7 RNA polymerase. First, a second round of PCR was used to add the T7 promoter upstream of the DNA sequences. Then, transcription was done using reagents described in (Naghdi *et al.*, 2017). The resulting RNA was purified by electrophoresis on denaturing 6 % polyacrylamide gel with 8 M urea. RNA was eluted from the gel with a 300 mM NaCl solution and ethanol precipitated. Three transcriptions were performed from three independent PCR

amplifications and pooled together to obtain the necessary amount of RNA and to reduce PCR amplification biases.

6.4.3 RsmA protein purification

RsmA protein was purified as described previously (Robitaille *et al.*, 2020b). In short, RsmA with a C-terminal 6xHis-tag was expressed in *Escherichia coli* BL21 using plasmid pET29a. Two liter of *E. coli* carrying the expression vector were grown in LB medium with 50 µg/mL kanamycin. Protein production was induced with a final concentration of 1 mM of IPTG. Cells were then pelleted at 15,000 x *g* for 30 minutes. Cell pellet was resuspended in Buffer A and lysed on ice by sonication (Branson Sonifier 450) using 10 x 1 second pulses (40 % ON/60 % OFF intervals) at power 8, repeated twice with 2 minutes waits in-between pulse sessions to cool-down. Cell lysate was clarified by high-speed centrifugation followed by filtration with 0.22 µm filters. RsmA was purified from the protein mixture using an AKTA FPLC System (GE Healthcare) and 5 mL HisTrap HP column (GE Healthcare). Protein fraction containing RsmA were identified using dot blots with 6xHis-tag targeting antibodies and were pooled and washed using 3k Da cut-off Centricon (Millipore). Proteins purity was assessed by SDS-PAGE and Coomassie Blue coloration. Final protein concentration was determined with Bradford reaction with a BSA standard curve.

6.4.4 RNA pull-down assay

In vitro pull-down assay was conducted using the purified RNA pool and RsmA proteins. The assay uses Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen) bound to 6xHis-tag RsmA to fish out its RNA targets. First, solutions and reagents were used based on the magnetic beads' supplier handbook. Proteins (360 pmol) were dissolved in Binding Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.05 % Tween 20) and 20 µL of magnetic beads were added, the mixture was then incubated on a rotator for 1 hour at 4°C. Tubes were placed on a magnetic rack to hold the beads while the liquid was removed, and new Interaction Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 350 mM KCl, 10 mM imidazole, 0.05 % Tween 20) was added along with the RNA pool (10 µL). Beads-proteins complexes and RNA were incubated on a rotator at room temperature for 1 hour. Tubes were placed back on the magnetic rack, the RNA solution was discarded, and beads were washed with clean Interaction Buffer, followed by vortexing. Washing step was repeated twice. Final wash was removed and 50 µL of Elution Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 250 mM imidazole, 300 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) was added to separate the proteins

from the beads. Finally, RNA was purified using TransZol reagent (TransGen Biotech) following the procedure from the supplier. The pull-down was done with three replicates for RsmA WT and a no protein control, and once for the untreated oligonucleotide pool.

6.4.5 Preparing the sample sequencing library

Final RNAs from the pull-down were retrotranscribed into DNA using the M-MuLV retrotranscription kit (New England Biolabs). Total cDNA was then PCR amplified with the original primers. Two subsequent PCR reactions were done to add the barcode on each sample to prepare for sequencing on the Illumina platform using the MiSeq 2x75 bp. Sequencing services were provided by CERMO-FC (UQAM, Montreal). Reads from each sample were obtained as paired-end fastQ files and subsequently processed.

6.4.6 Sequencing data analysis

Sequencing reads were processed through the Galaxy Project Web-based platform (www.usegalaxy.org). Read quality was assessed using the FastQC tool (Andrews, 2010). Reads were further trimmed on their 5' end to remove primer sequences (about 25 nt) using trimmomatic, also applying a quality cut-off of 20 (Bolger *et al.*, 2014). A pair-end alignment was then conducted using Bowtie2 on the *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 reference genome in local-sensitive mode with dovetailing and other default parameters (Langmead *et al.*, 2009). Read counts were measured with Htseq-count tool with a custom 5'UTR annotation file obtained from the RiboGap query (Anders *et al.*, 2015). Statistical differences in reads between RsmA, the no-protein control and the untreated pool were assessed with the DESeq2 tool using default parameters (Love *et al.*, 2014). There were no statistical differences in read levels between the no protein control and the untreated oligonucleotide pool. Every bound target with an adjusted P-value smaller than 0.1 was considered significantly different. Coverage of read depth was visualized with Bam Coverage Plotter (Lindenbaum, 2015).

6.5 Results and discussion

6.5.1 In vitro RNA pull-down assay reveals new potential binding targets of RsmA

We conducted an *in vitro* pull-down assay with an oligonucleotide bank of all predicted 5'UTR sequences from the *P. aeruginosa* PA14 genome. RsmA was used as bait to pull its binding targets from the pool of oligonucleotide. In total, 91 oligos were enriched at statistically significant levels (adjusted p-value > 0.1) in the RsmA pull-down compared to the background levels of the

untreated sample (Table 2). There were no statistical differences between the untreated sample and the no-protein control (see Fig. 1). Of note, these identified 5'UTR include targets such as multiple T6SS genes, *siaC* and *cafA*, all of which are known to be controlled in a RsmA-dependent manner (Allsopp *et al.*, 2017; Chihara *et al.*, 2021; Colley *et al.*, 2016). Around 30 % of the identified pulled-down RNAs were also found in one of the three previous ChIP-like methods that were used on *P. aeruginosa* with RsmA and/or RsmN (see Table 2) (Chihara *et al.*, 2021; Gebhardt *et al.*, 2020; Romero *et al.*, 2018).

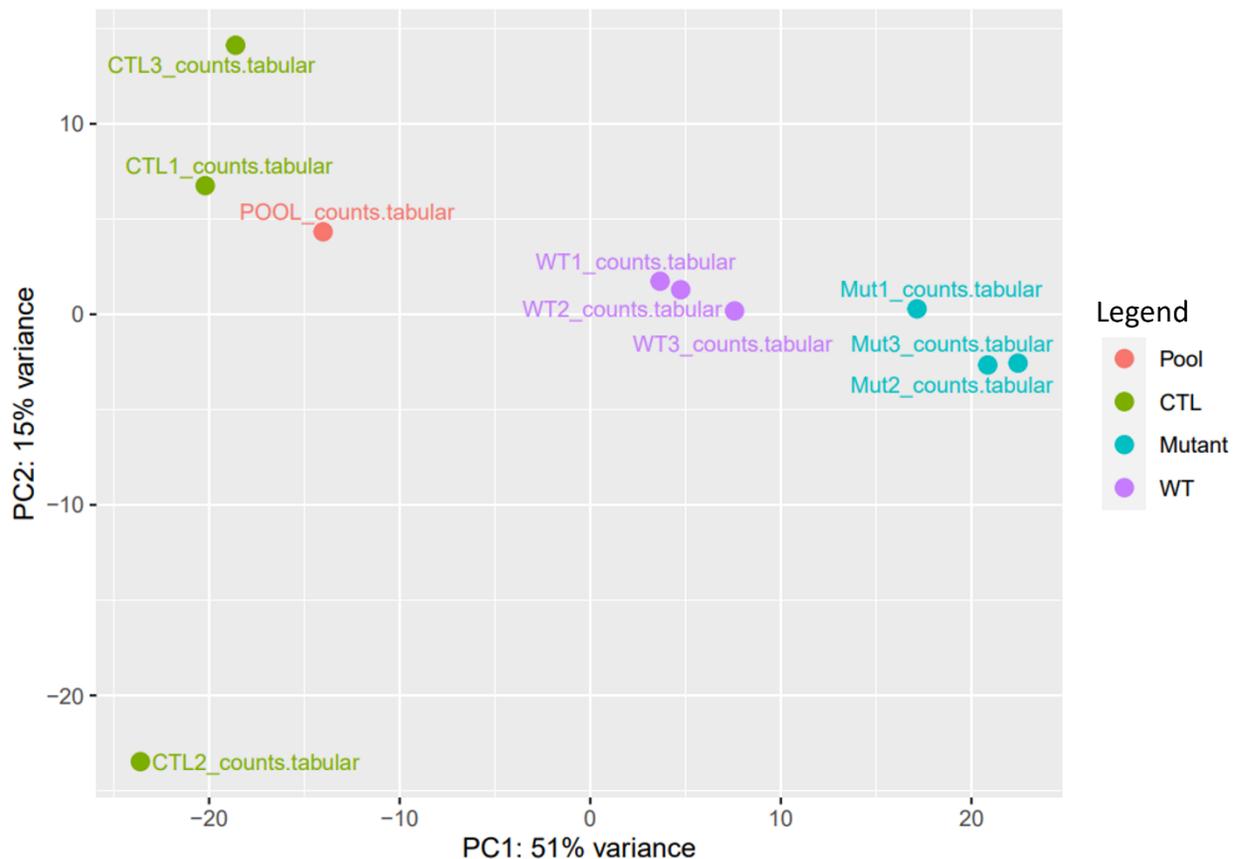


Figure 6.1. Principal component analysis of each pull-down sampling conditions

Plot shows the distance between each sample according to principal components PC1 (51% of variance) and PC2 (15% of variance). Colored dots represent distinct samples: **Red** Untreated oligonucleotide sample (pool); **Green** Control sample treated with protein-free beads (CTL); **Blue** Samples treated with RsmA_{R31S} (mutant) and **Purple** Samples treated with RsmA_{WT} (WT). Principal component analysis generated with DeSeq2.

The ChiPPAR-seq technique used by Gebhardt *et al.* (2020) highlighted 557 binding spots for RsmA throughout all the transcripts of *P. aeruginosa* PAO1. Most of these binding spots were in closed proximity with the translational start site (Gebhardt *et al.*, 2020). Another study by Chihara

et al. (2021) used a crosslinked pull-down approach with *P. aeruginosa* PAO1. They found 411 and 186 binding spots for RsmA and RsmN, respectively. For the 411 bound regions by RsmA, 99 of them were in the 5'UTR region of transcripts (Chihara *et al.*, 2021). Finally, Romero et al. (2018) used a pull-down method to map binding regions of RsmN to their respective transcripts, identifying 503 transcripts subject to RsmN binding (Romero *et al.*, 2018). Between all these genome-wide pull-down assays, few RNA targets overlap, indicating that methods used to obtain the data greatly affects the mRNA targets identified for RsmA. From the total RNA targets identified in our study, 62 % were not identified in these previously published Chip-seq data for RsmA or RsmN. These new potential binding regions will need to be validated experimentally.

6.6 Conclusions

In this study, we designed a fully *in vitro* pull-down assay to identify new mRNAs bound by RsmA. This method uncovered multiple binding targets for this global regulator. Some of these targets were already identified in previously published work; some are new targets that were not identified before. There are multiple possible reasons for this divergence: [1] we conducted this pull-down with *P. aeruginosa* PA14 genomic data, while the others were done in PAO1; [2] our *in vitro* conditions mean transcript binding is independent from their transcription levels (that is, theoretically all possible RNA targets are present, not only those that were transcribed); [3] *in vitro* assays are less representative of actual growth conditions. In all, our work proposes a wide range of new RsmA binding targets and further elaborates the crucial physiological role of RsmA.

6.7 Données supplémentaires de l'article 3

*Le tableau supplémentaire contenant toutes les données du *pull-down* est présenté en ANNEXE II.

7 4^E CHAPITRE DE RÉSULTATS : RÉGULATION DE LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING

7.1 Mise en contexte

P. aeruginosa adapte son mode de vie en employant plusieurs réseaux de régulation parallèles, entre autres la voie Gac/Rsm (voir section 1.2 et 1.3). L'implication de ces voies de régulation peut être mise en évidence par une méthode d'évolution dirigée en laboratoire, où une pression sélective est appliquée expérimentalement sur une population bactérienne. Une telle procédure a été utilisée dans le laboratoire Déziel pour identifier des voies de régulation capables de compenser le défaut de cette motilité qu'a un mutant $\Delta hptB$ (Robitaille *et al.*, 2020b). Cette expérience a notamment mené à une substitution dans la séquence protéique de RsmA (R31S). Cette mutation cause une augmentation de la capacité à effectuer le *swarming* chez la souche évoluée. Le contrôle de la traduction du transcrite de HcnA est aussi affecté par cette mutation. Ce type d'évolution a aussi permis de souligner la contribution sociale qu'a l'émergence de mutants du *quorum sensing* dans une population en *swarming* (Robitaille *et al.*, 2020a). J'ai employé la méthode de *pull-down* décrite à la section 6 pour identifier les cibles différemment liées entre RsmA_{WT} et RsmA_{R31S}.

J'ai utilisé cette méthode pour tenter d'élucider la cause du défaut de *swarming* des mutants *gacS*- de la banque de transposon, qui a été soulevé par les travaux de Fabrice Jean-Pierre (Jean-Pierre, 2017). En effet, le rôle théorique de GacS/GacA stipule que la perte de l'un de ces gènes doit libérer RsmA à cause d'une faible transcription de RsmY/RsmZ, donc activer le *swarming*. Cependant, les deux mutants *gacS*- de la banque de transposon de PA14 (iD : 47013 et iD : 42741) ont un défaut au niveau de leur motilité de type *swarming* dans nos conditions et plusieurs autres (Jean-Pierre, 2017; Kollaran *et al.*, 2019). Ceci est également vrai pour certains isolats *gacS*- obtenus de l'environnement de lignes d'eau d'unités dentaires : PPF-7 et Chir_D-144 (Vincent *et al.*, 2017).

7.2 Détails expérimentaux

7.2.1 Souches bactériennes utilisées dans cette section

Les souches bactériennes utilisées dans cette section sont présentées dans la Table 7.1.

Table 7.1: Souches bactériennes utilisées dans cette section

Nom de la souche	Détails	Lab	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
PA14 WT	UCBPP-PA14 sauvage	ED14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 $\Delta hptB$	Mutant de délétion de <i>hptB</i>	ED1214	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
$\Delta hptB$ <i>rsmA</i> _{R31S}	$\Delta hptB$ avec <i>RsmA</i> _{R31S} , qui a récupéré son <i>swarming</i>	ED3451	(Robitaille <i>et al.</i> , 2020b)
$\Delta hptB$ $\Delta rsmYZ$	$\Delta hptB$ avec délétion de <i>RsmY/Z</i> (<i>RsmA</i> _{WT} ⁺)	ED2833	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
$\Delta hptB$ <i>rsmA</i> _{R31S} $\Delta rsmYZ$	Délétion de <i>RsmY/Z</i> dans $\Delta hptB$ variant (<i>RsmA</i> _{R31S} ⁺)	ED4469	Cette étude
$\Delta 45700/10$ (Δ TPM)	Délétion de PA14_45700 et PA14_45710 chez PA14 sauvage	ED4604	Cette étude
$\Delta hptB$ $\Delta 45700/10$ (Δ TPM)	Délétion de PA14_45700 et PA14_45710 chez la souche $\Delta hptB$	ED4605	Cette étude
<i>RsmA</i> _{WT} ⁺ <i>hcnA::lux</i>	Fusion traductionnelle <i>hcnA</i> 5'UTR- <i>lux</i> dans <i>RsmA</i> _{WT} ⁺	ED4631	Cette étude
<i>RsmA</i> _{R31S} ⁺ <i>hcnA::lux</i>	Fusion traductionnelle <i>hcnA</i> 5'UTR- <i>lux</i> dans <i>RsmA</i> _{R31S} ⁺	ED4639	Cette étude
<i>RsmA</i> _{WT} ⁺ 45700:: <i>lux</i>	Fusion traductionnelle PA14_45700 5'UTR- <i>lux</i> dans <i>RsmA</i> _{WT} ⁺	ED4633	Cette étude
<i>RsmA</i> _{R31S} ⁺ 45700:: <i>lux</i>	Fusion traductionnelle PA14_45700 5'UTR- <i>lux</i> dans <i>RsmA</i> _{R31S} ⁺	ED4641	Cette étude
<i>RsmA</i> _{WT} ⁺ <i>recJ::lux</i>	Fusion traductionnelle <i>recJ</i> 5'UTR- <i>lux</i> dans <i>RsmA</i> _{WT} ⁺	ED4635	Cette étude
<i>RsmA</i> _{R31S} ⁺ <i>recJ::lux</i>	Fusion traductionnelle <i>recJ</i> 5'UTR- <i>lux</i> dans <i>RsmA</i> _{R31S} ⁺	ED4643	Cette étude
PA14 <i>gacS</i> -	Mutant transposon iD : 47013	ED1360	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>gacS</i> -	Mutant transposon iD : 42741	ED1359	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 $\Delta gacA$ <i>gacS</i> -	Délétion de <i>gacA</i> dans ED1360	ED2964	(Jean-Pierre, 2017)
PA14 <i>gacS</i> - dans WT	Transposon <i>gacS::MrT7</i> vers WT	ED4650	Cette étude
PA14 $\Delta gacS$	Délétion complète de <i>gacS</i>	ED4458	Cette étude
Isolat PFF-7	Isolat milieu hospitalier	ED2735	(Vincent <i>et al.</i> , 2017)
Isolat Chir_D-144	Isolat milieu hospitalier	ED2738	(Vincent <i>et al.</i> , 2017)
PA14 <i>gacS</i> - EV1	ED1360 évolué	ED4625	Cette étude
PA14 <i>gacS</i> - EV2	ED1360 évolué	ED4626	Cette étude
PA14 <i>gacS</i> - EV3	ED1360 évolué	ED4627	Cette étude
PA14 <i>gacS</i> - EV4	ED1360 évolué	ED4628	Cette étude
PA14 <i>gacS</i> - EV5	ED1360 évolué	ED4629	Cette étude
PA14 <i>gacS</i> - EV6	ED1360 évolué	ED4630	Cette étude
PA14 $\Delta pilA$ $\Delta fliC$ <i>rhlA</i> -	Triple mutant non-motile (PFR)	ED4468	Section 4.8.1.1
PA14 PFR EV 1-6	ED4468 évolué	ED4618	Cette étude
PA14 PFR EV2-7	ED4468 évolué	ED4619	Cette étude

PA14 Δ HSI I-II	Double mutant HSI	ED1220	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 Δ HSI I-III	Double mutant HSI	ED1221	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 Δ HSI II-III	Double mutant HSI	ED1222	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 <i>hcp2</i> -	Mutant <i>hcp2</i> -	ED3417	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>hcpC</i> -	Mutant <i>hcpC</i> -	ED3255	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>hcpB</i> -	<i>hcpB</i> ::MrT7 iD :26171	ED4606	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>tli4</i> -	Mutant sans protéine immunitaire pour Tle4	ED3205	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>tli5</i> -	Mutant sans protéine immunitaire pour Tle5	ED3209	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>vgrG6</i> -	Mutant gène en amont de <i>hcpB</i>	ED4611	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 PA14_69540	Mutant gène en amont de <i>hcpB</i>	ED4610	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 PA14_69520	Mutant gène en amont de <i>hcpB</i>	ED4608	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>Escherichia coli</i>			
SM10 pEX18Ap- Δ <i>rsmY</i>	Deletion de <i>rsmY</i>	ED1406	(Brencic <i>et al.</i> , 2009)
SM10 pEX18Ap- Δ <i>rsmZ</i>	Deletion de <i>rsmZ</i>	ED1402	(Brencic <i>et al.</i> , 2009)
HB101 pRK2013	Souche <i>helper</i>	ED642	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
DH5 α pVF-k- <i>lux</i>	pVF-k- <i>lux</i> (CTX backbone)	ED4651	(Korniakova <i>et al.</i> , 2021)
TransT1 pCTX-P1- <i>hcnA</i> :: <i>lux</i>	pVF-k- <i>lux</i> modifié avec <i>hcnA</i> 5'UTR	ED4596	Cette étude
TransT1 pCTX-P1-45700:: <i>lux</i>	pVF-k- <i>lux</i> avec PA14_45700 5'UTR	ED4598	Cette étude
TransT1 pCTX-P1- <i>recJ</i> :: <i>lux</i>	pVF-k- <i>lux</i> avec <i>recJ</i> 5'UTR	ED4599	Cette étude
SM10 pEX18Ap- Δ <i>gacS</i>	Pour la délétion complète de <i>gacS</i>	ED4002	Cette étude
SM10 pEX18Ap-ATPM	Pour la délétion de PA14_45700-45710	ED4603	Cette étude

7.2.2 Essai *pull-down* avec RsmA_{WT} et RsmA_{R31S}

Le *pull-down* a été effectué tel que décrit à la section 6.4. Les analyses comparatives des *reads* issus de cette expérience ont été effectuées grâce à la plateforme en ligne Galaxy (usegalaxy.org). Les *reads* ont été traités avec l'outil Trimmomatic pour retirer les régions d'amorces en 5' (d'une longueur de 25 nt) et pour appliquer un seuil de qualité de 25. Un alignement païré a ensuite été fait avec l'algorithme Bowtie2, en utilisant le génome de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 en mode local-sensible, le paramètre *dovetailing* est activé et les autres paramètres sont par défaut. Le décompte des *reads* pour chaque condition a été fait avec l'outil Htseq-count à l'aide d'un fichier d'annotation des régions 5'UTR obtenues via la plateforme RiboGap. Les analyses statistiques des comptes de *reads* entre RsmA_{WT} et RsmA_{R31S} ont été effectuées avec l'outil DESeq2 avec les paramètres par défaut. Chaque cible avec une différence de liaison significative entre les deux protéines (avec un P-value ajusté < 0.1) a été considéré

pour des analyses subséquentes. Ce seuil moins restreint a été choisi pour ne pas éliminer une cible potentiellement intéressante au début de la sélection.

7.2.3 Création des rapporteurs traductionnels luminescents

Des fusions traductionnelles pour quelques cibles du *pull-down* ont été insérées dans le plasmide pVF-k-*lux*. Ce plasmide est intégratif (plasmide CTX), possède un promoteur fort de l'intégron P1 et les gènes rapporteurs *luxCDABE* (Korniakova et al., 2021). Chaque région 5'UTR sélectionnée a été amplifiée en deux rondes à partir du génome de PA14 en utilisant les amorces présentées dans la Table 7.2. Le plasmide a été linéarisé avec les enzymes de restrictions AarI et SdaI (New England Biolabs). Les inserts ont été ligués dans le pVF-k-*lux* linéarisé par assemblage Gibson en utilisant le pEasy *Seamless Cloning and Assembly Kit* (TransBiotech). L'assemblage a été transformé dans une souche d'*E. coli* compétente TransT1 selon la procédure Chaud-Froid du manuel du fabricant. La production de lumière a été confirmée en utilisant le Cytation 3, la présence de l'insert a été validée par PCR et l'intégrité de la séquence a été vérifiée par séquençage haut-débit.

Table 7.2 Amorces utilisées pour les travaux de cette section

Name	Sequence	Use
CM_OligoPool_F	ATTGTTATCCGCTCACAAAAGCTT	Amplification des oligonucléotide
CM_OligoPool_R	AAACGACGGGATCAGCCTCGAG	Amplification des oligonucléotides
CM_T7+OligoPool_F	TAATACGACTCACTATAGGGATTGTTATCCGCTCACAAAAGCTT	Ajoute le promoteur T7 aux oligos
CM_FLA_del_UF	ATCCGGCTGCAGCGCCTGTCCTCTGTTG	Fragment UP pour l'échange allélique
CM_FLA_del_UR	ACGGCCGTAGGCCCAGAACAGCCCCAGCGCATAGAGCACAAAG AATGGCGAGTAGTCACCCTCGCGAAAT	Fragment UP pour l'échange allélique
CM_FLA_del_DNF	GACGGATCATTTCGCGAGCGGATGGCCCCGGCATTTCGCGAGG GTGACTACTCGCCATTCTTGTGCTCTATG	Fragment DOWN pour l'échange allélique
CM_FLA_del_DNR	ATCATGGGATCCAGAACGAGTCCGAAGACGA	Fragment DOWN pour l'échange allélique
CM_5UTRhcnA_F	TCCCGACTCTCTCACG	Amplifie 5UTR

CM_5UTR_hcnA_R	CTGGATATCGTGTGACGTTT	Amplifie 5UTR
CM_hcnA_lux_F	TCGACCCGGGCCATGGCCTGCAGGAGTCTATCCCGACTCTCTCACG	Homologie avec le plasmide
CM_LUX_hcnA_R	CCGTTAATAATGAATGAAATTTTTTTAGTCTGGATATCGTGTGA CGTTC	Homologie avec le plasmide
CM_5UTR_45700_F	TGGGTTCCCATTCATTCATTC	Amplifie 5UTR
CM_5UTR_45700_R	ACGCGTGATTGCAGACATC	Amplifie 5UTR
CM_LUX_45700_F	TCGACCCGGGCCATGGCCTGCAGGAGTCTATGGGTTCCCATTCATTCATTC	Homologie avec le plasmide
CM_LUX_45700_R	CCGTTAATAATGAATGAAATTTTTTTAGTACGCGTGATTGCAGACATC	Homologie avec le plasmide
CM_5UTR_recJ_F	TCGCCGCCGCGTTT	Amplifie 5UTR
CM_5UTR_recJ_R	GCGGGGTCGATACGCA	Amplifie 5UTR
CM_LUX_recJ_F	TCGACCCGGGCCATGGCCTGCAGGAGTCTATCGCCGCCGCGTTT	Homologie avec le plasmide
CM_LUX_recJ_R	CCGTTAATAATGAATGAAATTTTTTTAGTGCGGGGTCGATACGCA	Homologie avec le plasmide
CM_gacS_full_UPF	ATCCGGGGATCCGTTCAAGGATCTCGGCATCA	Fragment UP pour l'échange allélique
CM_gacS_full_UPR	CGCCGCCAGCGAGGCCAGCAGCATCGCCAGCATGCGTCGAGGAAGGTCAC	Fragment UP pour l'échange allélique
CM_gacS_full_DNF	ACCGGACGTGCGCGGGTGACCTTCTCGACGCATGCTGGCGATGCTGCT	Fragment DOWN pour l'échange allélique
CM_gacS_full_DNR	ATCATGAAGCTTAGTCGAGGCTGGTGGAAGA	Fragment DOWN pour l'échange allélique
CM_gacS_check_F	CGGTGACCTTCTCGACGC	Validation de la délétion
CM_gacS_check_R	CACGCCA-CAGTAGCGGGT	Validation de la délétion

7.2.4 Délétion de *rsmY* et *rsmZ* dans $\Delta hptB$ RsmA_{R31S}

La délétion des deux pARN dans le génome des souches $\Delta hptB$ et $\Delta hptB$ RsmA_{R31S} a été faite par échange allélique telle que décrit dans une étude précédente (Jean-Pierre *et al.*, 2016). Voir aussi section 7.2.7.

7.2.5 Transfert des rapporteurs traductionnels par conjugaison

Une fois conçu, les rapporteurs luminescents ont été transférés vers le génome de *P. aeruginosa* par conjugaison. La méthode emploie *E. coli* TransT1 contenant les plasmides 5'UTR-*luxCDABE*, une souche *E. coli* helper et les souches receveuses PA14 $\Delta hptB \Delta rsmY \Delta rsmZ$ RsmA_{WT} et $\Delta hptB \Delta rsmY \Delta rsmZ$ RsmA_{R31S}. Les souches sont cultivées durant la nuit dans 3 mL de LB avec antibiotiques respectifs, puis sont lavées avec du milieu frais. Elles sont ensuite mélangées en proportion 2 : 2 : 1 (donneuse : helper : receveuse) de leur volume de culture initial. La suspension bactérienne est alors déposée sous forme de goutte sur une gélose LA, puis incubée plus de cinq heures à 37°C. Les bactéries sont retirées de la gélose puis étalées sur une nouvelle gélose LA avec de la tétracycline (125 µg/mL) et au triclosan (25 µg/mL). La production de lumière des conjugants a été confirmée au Cytation 3.

7.2.6 Validation *in vivo* de la régulation de RsmA avec les rapporteurs traductionnels

Les souches contenant les rapporteurs traductionnels 5'UTR-*lux* ont été utilisées pour mesurer la capacité de régulation de RsmA_{WT} et RsmA_{R31S}. Chaque souche a été cultivée en LB durant la nuit, puis diluée 1/100 dans un tube de culture avec 3 mL de LB frais. Chaque essai mesurait l'activité de chaque souche en triplicata. Les tubes de culture ont été incubés à 37°C, puis des mesures de densité optique à 600 nm et de production de lumière (RLU, Unités de lumière relatif) ont été prises au Nanodrop 6000 et au Cytation 3, respectivement. Quatre points de lecture ont été pris durant la croissance des bactéries, après 3 heures, 4 heures, 5 heures et 7 heures de croissance. Les valeurs de RLU ont été normalisées par la densité optique puis placées sur un graphique en fonction de la densité optique grâce à Excel.

7.2.7 Délétion de PA14_45700 and PA14_45710 par échange allélique

Un vecteur suicide pEX18Ap a été employé pour la conception d'un outil de délétion de PA14_45700 et PA14_45710 à partir de la procédure publiée (Hmelo *et al.*, 2015). Des fragments d'homologie en amont et en aval de la région à déléter ont été amplifiés par PCR à partir du génome de PA14 avec les amorces présentées à la Table 7.2. Ce fragment a été conçu pour éliminer plus de la moitié de la séquence des deux gènes. Le fragment obtenu a été inséré dans le plasmide pEX18Ap par digestion enzymatique et ligation. Le plasmide avec l'insert a été transféré vers la souche de maintien *E. coli* DH5 α , puis vers la souche conjugative *E. coli* SM10.

Le vecteur pEX18 a été transféré vers les souches receveuses PA14 WT et PA14 $\Delta hptB$ par conjugaison (méthode décrite à la section 7.2.5). Les premiers recombinants sont sélectionnés sur LB avec 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbénicilline et 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triclosan. Puisque le plasmide pEX18Ap contient un gène *sacB*, il est possible de contre-sélectionner les cellules qui n'ont pas effectuées leur seconde recombinaison par l'utilisation de sucrose (dans un milieu tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, sucrose 10 % et agar 15 g/L). La perte de la région génomique ciblée chez les recombinants capables de croître sur sucrose est confirmée par PCR.

7.2.8 Construction pEX18- $\Delta gacS$ et délétion de ce gène dans PA14

Le vecteur suicide pour l'échange allélique de *gacS* a été fait à partir du vecteur de base pEX18Ap (Hmelo *et al.*, 2015). Pour ce faire, deux fragments d'homologies ont été amplifiés puis fusionnés par PCR (voir les amorces à la Table 7.2). Le fragment en amont a utilisé les amorces CM_ *gacS*_full_UPF et CM_ *gacS*_full_UPR. Le fragment en aval a utilisé les amorces CM_ *gacS*_full_DNF et CM_ *gacS*_full_DNR. La fusion des fragments a été faite avec les amorces CM_ *gacS*_full_UPF et CM_ *gacS*_full_DNR. L'insert a été digéré avec BamHI et HindIII (FastDigest, ThermoFisher) et ligué dans le vecteur avec la T4 ADN Ligase (Biobasic). Le vecteur a été transformé vers la souche d'*E. coli* SM10, sélectionné sur milieu TSA avec carbénicilline 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La souche SM10 avec le vecteur suicide a été utilisé pour effectuer l'échange allélique tel que décrit à la section 7.2.7. La mutation a été validée par amplification PCR avec les amorces CM_ *gacS*_check_F et CM_ *gacS*_check_R. La délétion retire un total d'environ 2200 nucléotides du gène *gacS*, d'un total de 2778.

7.2.9 Évolution *gacS*- et analyse des séquences par Breseq.

Le mutant *gacS*- (*gacS*::Mar2xT7, ED1360) a été inoculé sur gélose *swarming*, puis incubé à 37°C pendant 20 heures. Après cette période d'incubation, la colonie *swarming* ne s'est pas encore développée. Les géloses sont laissées à température de la pièce, jusqu'à l'apparition de dendrites « tardives » (généralement en moins d'une semaine). La pointe de ces dendrites est prélevée puis étalée sur milieu nutritive pour obtenir des colonies isolées. Quelques unes de ces colonies sont sélectionnées, cultivées en bouillon, puis évaluées en *swarming*. Chaque échantillon est conservé par congélation. Les clones évoluant qui ont récupéré leur *swarming* ont leur ADN génomique purifié puis séquencé.

Le séquençage du génome entier des évoluant a été fait par le service de séquençage SeqCenter (anciennement MiGS, Pittsburgh, PA, USA) par la méthode Illumina Mi-Seq. Les fichiers fastq contenant les *reads* et les notes de qualité sont directement utilisés par l'outil Breseq (Deatherage & Barrick, 2014). Cet outil effectue directement l'alignement via un fichier de référence par Bowtie2, et utilise les scores de qualité de chaque base pour effectuer les analyses statistiques permettant d'identifier les mutations entre la référence et la souche séquencée. L'outil peut également mettre à jour des données de référence à partir d'un nouveau séquençage. Nous avons récemment séquencé notre souche de PA14 WT (ED14). De plus, le mutant *gacS*- non évolué (la souche mère) a été séquencé. Ces données de séquençage ont pu produire des fichiers de référence pour les deux souches pour permettre des analyses comparatives précises.

7.3 Résultats

7.3.1 Le *pull-down* d'ARN révèle l'impact de la mutation R31S sur le contrôle des cibles de RsmA

Pour évaluer l'impact global qu'à la mutation R31S sur la liaison de RsmA à ses cibles, et ainsi pouvoir élucider le rôle de la mutation R31S dans le contrôle du *swarming*, j'ai employé une méthode de *pull-down in vitro* avec des oligonucléotides synthétiques représentant toutes les régions 5'UTR prédites de PA14. Au total, cette méthode a identifié 137 cibles d'ARN différemment liées entre RsmA_{WT} et RsmA_{R31S}. De celles-ci, 81 ont une plus grande affinité pour RsmA_{R31S} et 56 ont une affinité moindre. Une affinité augmentée indique potentiellement une traduction plus réprimée.

La liste complète de ces cibles est présente dans la Table 7.3 pour celles avec une plus grande affinité pour RsmA_{WT} et la Table 7.4 pour celles plus fortement liées à RsmA_{R31S}. L'ANNEXE III présente des données supplémentaires de cette analyse, incluant la présence des cibles dans d'autres études publiées utilisant une méthodologie type *pull-down* pour RsmA et/ou RsmN. Le *pull-down in vitro* a révélé une vaste gamme de différentes fonctions cellulaires qui sont potentiellement affectées par la mutation R31S, soit une augmentation ou une réduction de l'affinité par le variant de RsmA. Cependant, très peu de ces fonctions semblent liées à la motilité de type *swarming* à premier regard. Des transcrits liés plus fortement par RsmA_{R31S}, deux de ceux-ci codent pour des phosphatases acides (PA14_45700 et PA14_45710) présentes dans un des îlots génomiques flagellaires, un autre code la protéine du crochet flagellaire FlgK (PA14_50360) et un dernier pour un régulateur de réponse CheY (PA14_02260), potentiellement impliqué dans le chimiotaxisme. S'y trouve aussi plusieurs gènes liés au SST6, tant des effecteurs

que des gènes structuraux : *icmF2*, *tse5*, *tse6*, *dotU3*, *hsiJ3*, *pha2* et *hsiC3* (l'impact du SST6 est exploré à la section 7.3.1). Des cibles plus fortement liées par RsmA_{WT}, *algC* est important pour la physiologie de *P. aeruginosa* (Lizewski *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014). De plus, ces cibles incluent HptB et CafA, toutes les deux impliquées dans la régulation de la voie Gac/Rsm (Hsu *et al.*, 2008; Petrova & Sauer, 2010). À part ces gènes, les autres cibles n'ont pas de fonctions connues directement associées au contrôle de la motilité.

Table 7.3 Sommaire des gènes auxquelles les reads de leur 5'UTR sont plus abondants dans RsmA_{WT} que RsmA_{R31S}.

TAG (PA14)	Log2 FC (WT vs R31S)	TAG (PA01)	GENE DATA
PA14_70270	2.99	PA5322	<i>algC</i>
PA14_08460	2.92	PA0660	hypothetical
PA14_27650	2.76	N/A	hypothetical
PA14_59290	2.62	N/A	<i>pilQ2</i> , type IV B pili
PA14_26690	2.60	PA2890	<i>atuE</i> , enoyl-coa hydratase
PA14_26210	2.58	PA2926	<i>hisP</i> , histidine transport
PA14_65250	2.54	PA4939	<i>hisZ</i> , ATP phosphoribosyltransferase
PA14_71880	2.54	PA5444	conserved hypothetic
PA14_32340	2.48	PA2499	probable deaminase
PA14_10960	2.10	N/A	ferredoxin oxidoreductase subunit
PA14_23930	2.07	PA3107	<i>metZ</i> , o-succinylhomoserine sulfhydrylase
PA14_06350	2.04	PA0488	conserved hypothetic
PA14_66790	2.04	PA5054	heat shock protein HslU
PA14_48780	1.95	PA1200	conserved hypothetical
PA14_16220	1.81	PA3725	<i>recJ</i> , single strand DNA exonuclease
PA14_26340	1.79	PA2916	hypothetic
PA14_58010	1.73	PA4469	hypothetic
PA14_06310	1.72	PA0484	conserved hypothetic ACT-domain protein
PA14_71340	1.72	PA5404	hypothetic
PA14_54300	1.71	PA0772	<i>recO</i> DNA repair
PA14_21580	1.69	PA3283	conserved hypothetic
PA14_53370	1.68	PA0843	<i>plcR</i> , phospholipase accessory protein
PA14_41560	1.67	PA1779	assimilatory nitrate reductase
PA14_47970	1.67	PA1255	<i>lhpA</i> , hydroxyproline epimerase
PA14_06790	1.64	PA0521	cytochrome c oxidase (next to <i>nir</i>)
PA14_13340	1.60	PA3909	extracellular nuclease <i>eddB</i>
PA14_18140	1.54	PA3569	<i>mmsB</i> , hydroxyisobuyrate dehydrogenase
PA14_70280	1.53	PA5323	<i>argB</i> , acetylglutamate kinase
PA14_01690	1.53	PA0138	probable ABC permease
PA14_10590	1.42	PA4127	<i>hpcG</i> , hydratase

PA14_12850	1.38	PA3944	conserved hypothetic acetyltransferase
PA14_38710	1.36	PA1995	hypothetic
PA14_28560	1.36	PA2750	hypothetic
PA14_38290	1.33	PA2029	hypothetic
PA14_41490	1.33	PA1785	<i>nasT</i>
PA14_02130	1.30	PA0170	hypothetic
PA14_10670	1.29	PA4119	<i>aph</i> , aminoglycoside phosphotransferase
PA14_34050	1.27	PA2366	hsiC3
PA14_56660	1.22	PA4356	<i>xenB</i> , xenobiotic reductase
PA14_44760	1.21	PA1522	xanthine dehydrogenase accessory factor X
PA14_36940	1.17	N/A	hypothetic
PA14_28950	1.17	PA2722	hypothetic
PA14_00360	1.16	PA0030	<i>cosX</i>
PA14_70360	1.14	PA5330	hypothetic
PA14_36650	1.13	PA2159	conserved hypotetic
PA14_39945	1.12	PA1901	<i>phzC2</i>
PA14_23170	1.07	PA3175	<i>hutE</i> , formimidoylglutamase
PA14_50630	1.06	PA1064	hypothetic
PA14_70730	1.06	PA5358	<i>ubiA</i> , hydroxybenzoate transferase
PA14_40610	1.00	PA1849	conserved hypthetic
PA14_56680	1.00	PA4358	<i>feoB</i> , ferrous iron transport
PA14_02420	0.94	PA0193	hypothetical
PA14_72230	0.93	PA5473	conserved hypothetic
PA14_32450	0.87	PA2489	probable AraC regulator
PA14_67140	0.61	PA5083	<i>dguB</i> , Rid2 subfamily protein
PA14_49780	0.57	PA1129	<i>fosA</i> , fosfomycin resistance protein

Table 7.4 Sommaire des gènes auxquelles les *reads* de leur 5'UTR sont plus abondants dans RsmA_{R31S} que RsmA_{WT}.

TAG (PA14)	Log ₂ FC WT vs R31S	TAG (PA01)	GENE DATA
PA14_06990	-5.68	PA0537	conserved hypothetical protein
PA14_19030	-4.14	PA3483	Hypothetical, next to Tse3 cluster
PA14_02260	-4.12	PA0179	2CS response regulator CheY
PA14_45700	-4.00	PA1451	Hypothetical_flagellar cluster (between <i>flhA</i> and B)
PA14_40740	-3.92	N/A	Hypothetical
PA14_45710	-3.72	PA1450	Hypothetical_flagellar cluster (between <i>flhA</i> and B)
PA14_29400	-3.71	PA2684	<i>tse5</i> , H1-T6SS effector
PA14_20460	-3.51	PA3371	hypothetical
PA14_33270	-3.42	PA2425	<i>pvdG</i>
PA14_04250	-3.36	PA0326	ABC transporter

PA14_42900	-3.35	PA1669	<i>icmF2</i> , T6SS
PA14_48115	-3.32	PA1246	<i>aprD</i> , alkanine protease secretion protein
PA14_24990	-3.26	PA3021	hypothetic
PA14_34110	-3.17	PA2362	<i>dotU3</i> , T6SS
PA14_36490	-3.12	PA2173	conserved hypothetic
PA14_28010	-3.01	PA2792	hypothetic
PA14_16780	-2.98	PA3679	hypothetic (cytochrome p450-like)
PA14_02960	-2.87	PA0238	hypothetic
PA14_54600	-2.87	PA0749	hypothetic
PA14_15820	-2.81	PA3758	N-acetylglucosamine-6-p deacetylase
PA14_62360	-2.79	PA4711	hypothetic
PA14_20800	-2.77	PA3345	<i>hptB</i> , histidine phosphotransfer protein
PA14_32880	-2.75	PA2454	hypothetic
PA14_32370	-2.73	PA2496	hypothetic
PA14_14060	-2.70	PA3860	AMP binding protein
PA14_28940	-2.65	PA2723	hypothetical
PA14_41170	-2.63	PA1806	<i>fabI</i> , ACP-linked protein
PA14_31510	-2.59	PA2554	probable short chain dehydrogenase
PA14_47370	-2.52	PA1303	signal peptidase
PA14_04340	-2.48	PA0333	hypothetical
PA14_01140	-2.47	PA0093	<i>tse6</i> , T6SS effector
PA14_07380	-2.47	PA0568	hypothetical
PA14_11420	-2.44	PA4054	<i>ribB</i> , GTP cyclohydrolase II
PA14_45070	-2.44	PA1496	probable potassium channel
PA14_46170	-2.42	PA1413	LysR regulator
PA14_63940	-2.41	PA4836	<i>cntL</i> ,
PA14_35800	-2.39	N/A	hypothetical, absent in PAO1
PA14_28570	-2.37	PA2749	<i>endA</i> , DNA endonuclease I
PA14_01170	-2.35	PA0096	next to <i>tse6</i>
PA14_06940	-2.34	PA0532	hypothetical
PA14_39320	-2.30	PA1948	ribose transporter protein
PA14_33330	-2.27	N/A	hypothetical , absent in PAO1
PA14_16200	-2.18	PA3727	hypothetical, close to <i>lasB</i>
PA14_60000	-2.13	N/A	hypothetical
PA14_01440	-2.12	PA0118	hypothetical
PA14_50570	-2.12	PA1069	hypothetical
PA14_05580	-2.11	PA0429	hypothetical, next to <i>mexAB-oprM</i>
PA14_00760	-2.08	PA0064	hypothetical
PA14_17110	-1.97	PA3652	<i>uppS</i> , UDP pyrophosphate synthase
PA14_71840	-1.96	PA5441	hypothetical

PA14_34820	-1.95	PA2304	regulatory protein AmbC
PA14_59880	-1.86	N/A	Hypothetical, absent in PAO1
PA14_34550	-1.86	PA2325	hypothetic
PA14_26090	-1.82	PA2934	<i>cif</i> , CFTR inhibitory factor
PA14_50360	-1.80	PA1086	<i>figK</i> , flagellar hook
PA14_47900	-1.76	PA1262	MFS transporter
PA14_34290	-1.71	PA2348	DszA family oxygenase
PA14_34100	-1.69	PA2363	<i>hsiJ3</i> , T6SS
PA14_51240	-1.66	PA1013	<i>purC</i>
PA14_22680	-1.65	PA3211	probable ABD transporter permease
PA14_34670	-1.61	PA2318	cupin superfamily protein
PA14_72180	-1.58	PA5469	<i>terC</i> , Membrane protein
PA14_01390	-1.57	PA0114	<i>senC</i> ,
PA14_18820	-1.54	PA3518	hypothetic
PA14_29680	-1.51	PA2661	hypothetic
PA14_42950	-1.51	PA1665	<i>fha2</i> , T6SS
PA14_58100	-1.42	PA4477	<i>cafA</i> , ribonuclease G
PA14_22240	-1.37	N/A	hypothetic,
PA14_53570	-1.36	N/A	integrase
PA14_31820	-1.32	PA2531	probable aminotransferase
PA14_62840	-1.29	PA4749	<i>glmM</i> , phosphoglucosamine mutase
PA14_69620	-1.25	PA5273	hypothetic
PA14_47210	-1.22	PA1317	<i>cyoA</i> , cytochrome O oxidase subunit II
PA14_16180	-1.12	PA3729	conserved hypothetic
PA14_69840	-1.12	PA5290	conserved hypothetic
PA14_00660	-1.07	PA0054	conserved, RNA phosphotransferase -like
PA14_32480	-1.04	PA2486	<i>ptrC</i> , type III repressor gene C
PA14_15530	-1.03	N/A	TrbK, Entry/Exclusion protein
PA14_53110	-1.03	PA0863	probable oxidoreductase
PA14_64680	-0.95	PA4894	<i>ureJ</i> , hypothetic
PA14_44640	-0.91	PA1531	hypothetic

Les deux phosphatases acides prédites (PA14_45700 et PA14_45710) possèdent un domaine TPM-phosphatase et une séquence 5'UTR plus fortement liée par RsmA_{R31S}. Un autre 5'UTR associé à RsmA_{R31S} par le pull-down est associé au gène PA14_06990, en amont d'une troisième TPM-phosphatase acide homologue (PA14_06980). Vu la présence de ces trois gènes codant pour des protéines similaires, la délétion de PA14_45700 et PA14_45710 a été effectuée par échange allélique dans le génome de PA14 WT et PA14 $\Delta hptB$. Le phénotype de motilité de type

swarming de ces nouveaux mutants a été évalué pour savoir si cette délétion affecte la motilité. Dans le cas des deux génotypes (sauvage et $\Delta hptB$), la perte de PA14_45700 et PA14_45710 n'a pas d'influence sur la colonisation d'une gélose en condition de *swarming* (Figure 7.1).

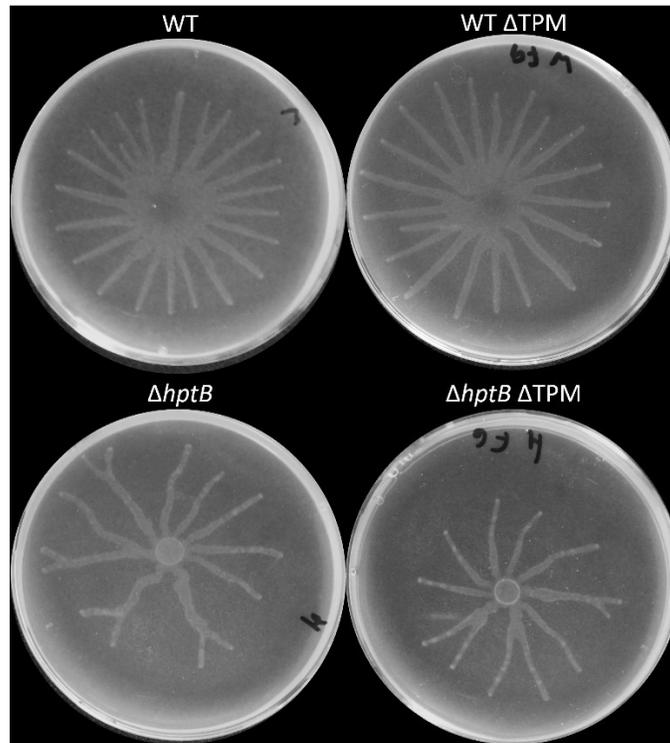


Figure 7.1: La délétion des deux phosphatases TPM PA14_45700 et PA14_45710 n'a pas d'impact sur le phénotype *swarming* de *P. aeruginosa* PA14.

L'essai *swarming* a été fait sur milieu M9DCAA semi-solide à 37°C, incubé durant la nuit. Les mutants ayant perdu les phosphatases prédites PA14_45700 et PA14_45710 (à droite) ne montrent pas de différence notable en motilité de *swarming* comparativement à leur génotype de base respectif (à gauche).

7.3.1.1 L'utilisation de rapporteurs traductionnels confirme l'impact de la mutation R31S *in vivo*.

Afin de confirmer les données obtenues par le *pull-down*, des fusions traductionnelles des gènes PA14_45700 (plus fortement lié par RsmA_{R31S}) et *recJ* (plus fortement liée par RsmA_{WT}) ont été conçues. Ces fusions ont été jointes à un promoteur fort (intégron P1) et un système rapporteur (opéron *luxCDABE*). Un tel rapporteur a également été construit pour la région 5'UTR de HcnA, puisque l'action régulatrice de RsmA_{WT} et RsmA_{R31S} est connue pour ce transcrite (Robitaille *et al.*, 2020b). Chaque construction a été insérée dans le génome de $\Delta hptB \Delta rsmY \Delta rsmZ$ (RsmA_{WT}⁺) et $\Delta hptB rsmA_{R31S} \Delta rsmY \Delta rsmZ$ (RsmA_{R31S}⁺). Ces mutants portent une double délétion pour les pARN RsmY et RsmZ pour réduire l'impact de leur homéostasie par la boucle de rétroaction entre

RsmA et ceux-ci (Corley *et al.*, 2022). De plus, l'ajout de ces rapporteurs n'a pas été réussi dans le génome d'une souche *rsmA*-.

La mesure de l'activité des rapporteurs *lux* en cinétique montre une tendance où la traduction des cibles plus fortement liées par RsmA_{R31S} est plus fortement réprimée par RsmA_{R31S} (Figure 7.2). Dans le cas de *recJ-lux*, qui est plus fortement lié par RsmA_{WT} dans le *pull-down*, la répression par l'une et l'autre des versions de RsmA est très similaire.

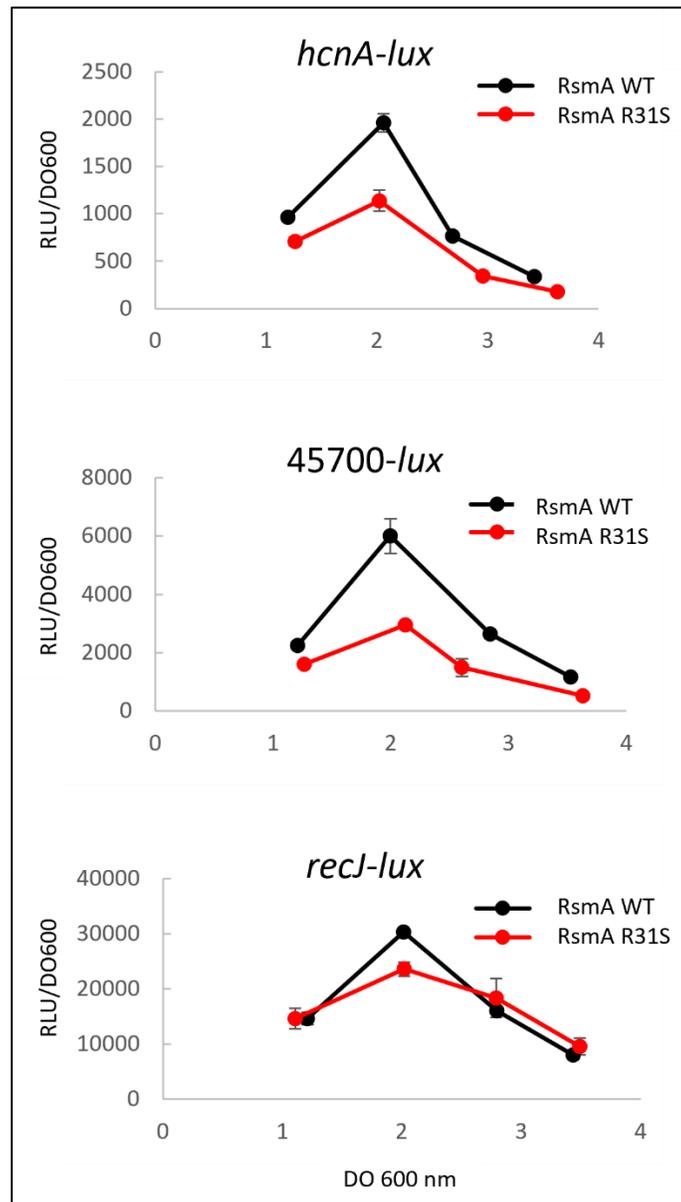


Figure 7.2 RsmA_{WT} and RsmA_{R31S} ont un impact différent sur la traduction de leurs cibles respectives identifiées par le *pull-down*

La cinétique a été effectuée en tube dans un volume de 5 mL de LB pendant 7 heures. Quatre mesures ont été prises à 3 heures, 4 heures, 5 heures et 7 heures. Le graphique montre l'intensité lumineuse relative (RLU) normalisée par la

densité optique à 600 nm en fonction de la densité optique (DO_{600nm}). (En haut) Rapporteur traductionnel *hcnA-lux*. (Au milieu) PA14_45700-*lux*. (En bas) *recJ-lux*. En noir est le mutant $\Delta hptB \Delta rsmY \Delta rsmZ$ ($RsmA_{WT}$) et en rouge $\Delta hptB rsmA_{R31S} \Delta rsmY \Delta rsmZ$ ($RsmA_{R31S}$). Les résultats présentés ici ont été réalisés par Marie-Christine Groleau.

7.3.1 L'importance de SST6 pour la motilité de type *swarming*

Les données de *pull-down* ont mis en évidence beaucoup de gènes du SST6 (*icmF2*, *tse5*, *tse6*, *dotU3*, *hsiJ3*, *fha2* et *hsiC3*) qui sont différemment régulés entre $RsmA_{WT}$ et $RsmA_{R31S}$. Plusieurs travaux passés par notre laboratoire ont mis en évidence l'importance du SST6 pour la motilité *swarming* (Robitaille, 2020; Tremblay, 2011). Cet effet est bien visible en comparant le phénotype de type *swarming* de doubles mutants pour chaque îlot de sécrétion (HSI I à III). Les simples mutants pour chaque HSI n'ont pas de défaut de motilité, suggérant une redondance entre les autres îlots. En général, le défaut le plus prononcé est présent chez les doubles mutants ayant perdu HSI-II (**Error! Reference source not found.**).

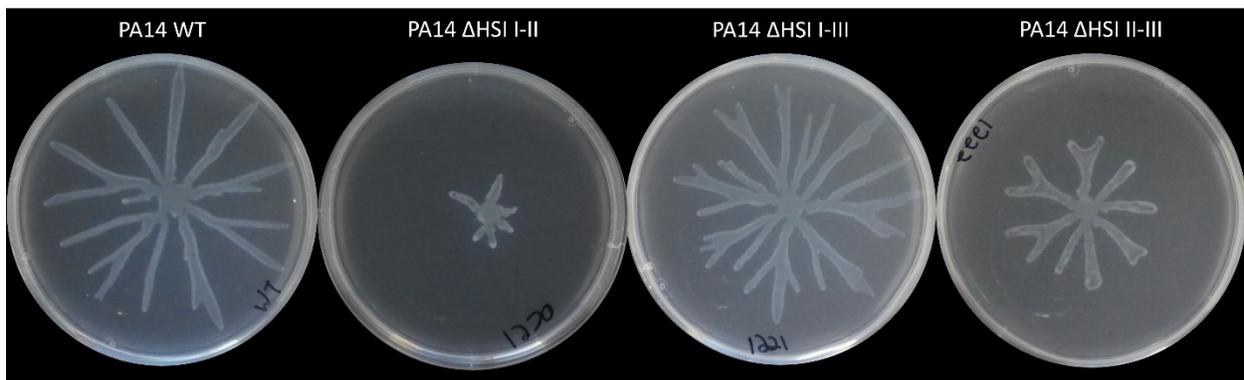


Figure 7.3 Swarming de doubles mutants HSI

Essai de *swarming* de mutants avec deux des trois îlots HSI inactivés par une délétion. Les souches ont été inoculées sur M9DCAA-agar puis incubées à 30°C pendant 20 heures. La perte conjointe de HSI I et III est la seule à ne pas causer de défauts.

Une implication prédominante du H2-SST6 permet de réduire la liste des potentiels effecteurs impliqués dans ce défaut. La motilité de surface de mutants ayant perdu les gènes *hcp2*, *hcpB* et *hcpC* (issus de la banque de transposon de PA14) a été testée pour évaluer leur implication dans le *swarming*. Ces gènes codent pour une protéine formant le tube sécrétoire du H2-SST6 (section 1.1.3.2). Les mutants de protéines d'immunité pour PldA (Tle4) et PldB (Tle5), *tli4*- et *tli5*- respectivement, ont également été testés pour confirmer leur phénotype (Robitaille, 2020). De façon surprenante, le mutant *hcpB*- a une abolition complète de son *swarming* (**Error! Reference source not found.**). Ce phénotype est le même pour les deux mutants *hcpB*::Mar2xT7 de la banque (données non montrées).

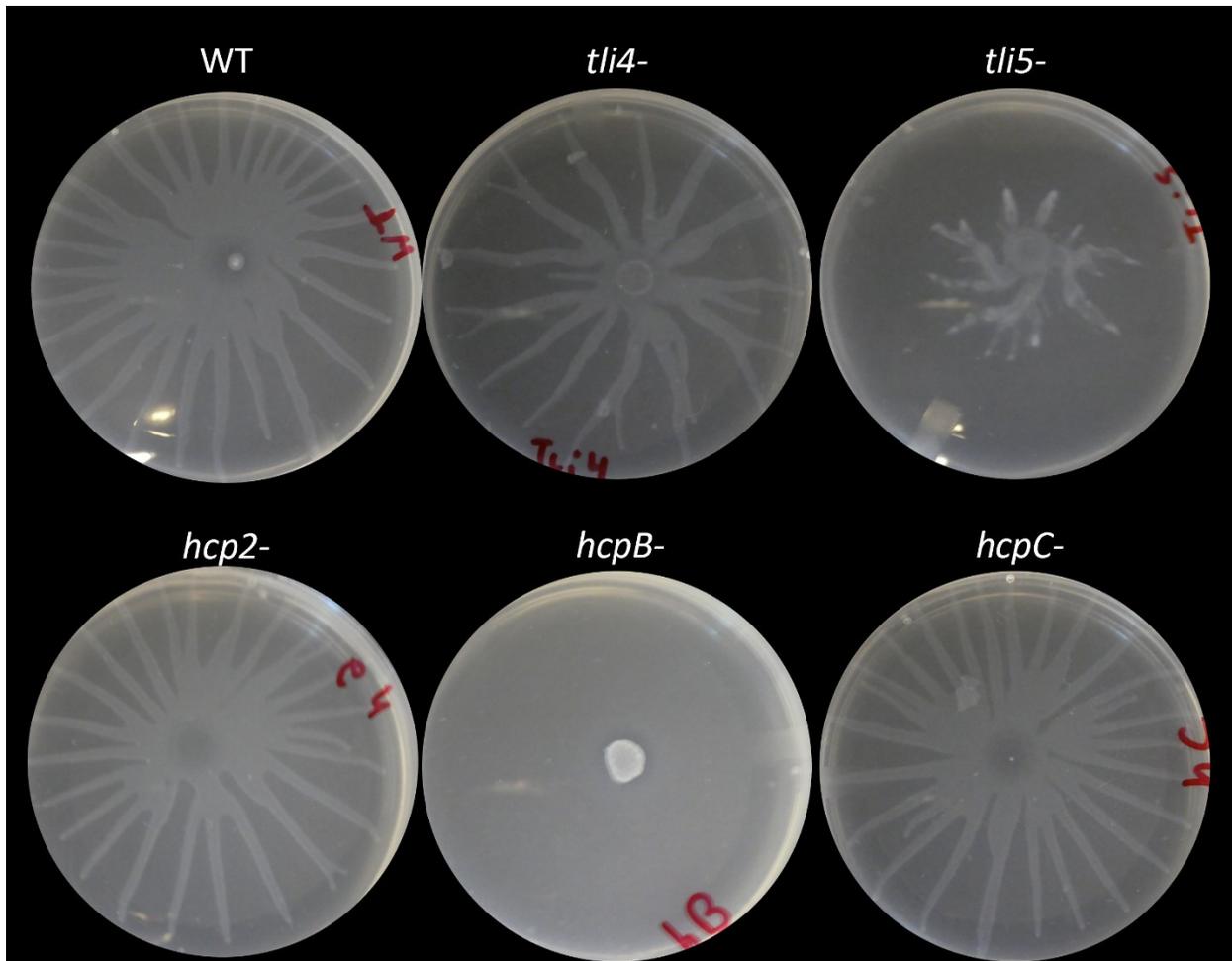


Figure 7.4 Swarming des mutant *hcp-*

Essai de motilité *swarming* sur M9DCAA-agar à 37°C pendant 20 heures. Le mutant *hcpB-* a un défaut majeur de motilité. C'est aussi le cas dans une moindre mesure pour *tli5-*.

Puisque les quatre protéines Hcp2 (Hcp2, HcpA, HcpB et HcpC) ont la même séquence protéique, une différence d'action sur le *swarming* s'expliquerait principalement par une différence des gènes avoisinants et par leur degré d'expression respective. En amont de *hcpB* (PA14_69560) se trouvent trois autres gènes qui semblent faire partie d'un opéron. Basé sur la structure d'autres opérons *hcp* (par exemple pour *hcpC*), ces gènes seraient : *vgrG6* (PA14_69550), une potentielle protéine immunitaire (PA14_69540) et une potentielle toxine (PA14_69520) (Figure 7.5). La comparaison du phénotype de *swarming* des potentiels effecteurs en amont de *hcpB* semble montrer qu'il n'y a pas d'impact notable de la perte de ces gènes sur le *swarming* (Figure 7.5).

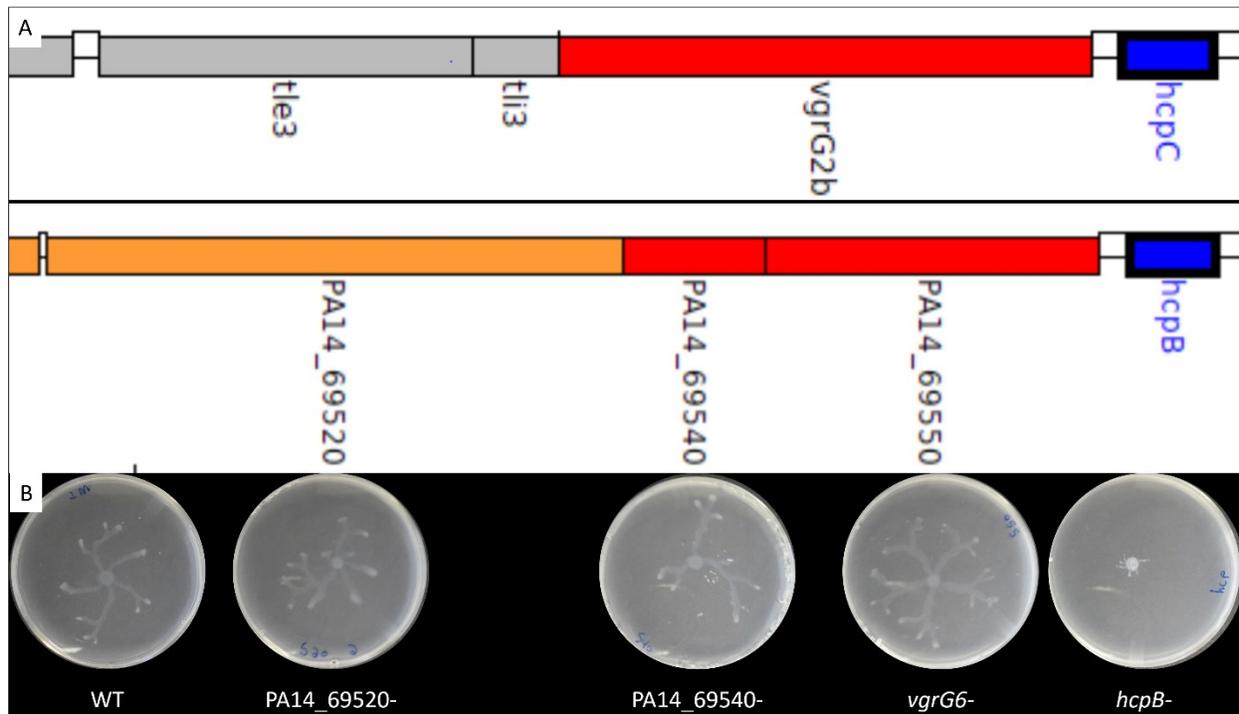


Figure 7.5 Phénotype en *swarming* des potentiels effecteurs dans la région génomique de *hcpB*.

A Région génomique de *hcpC* (en haut) et *hcpB* en bas). La région en amont de *hcpB* a une organisation similaire à celle de *hcpC* où PA14_69550 est *vgrG6*, PA14_69540 est une potentielle protéine d'immunité et PA14_69520 un potentiel effecteur. **B** Motilité de type *swarming* des mutants des gènes en amont de *hcpB*, comparés au WT et à *hcpB*-. Seul ce dernier a un défaut notable de motilité.

Il existe aussi la possibilité que les mutants *hcpB* ::Mar2xT7 de la banque portent des mutations supplémentaires dans leur génome qui cause le phénotype observé en *swarming*, comme j'ai trouvé au sujet des mutants *gacS* ::Mar2xT7 (Figure 7.6). Malheureusement, les tentatives de complémentation, de transfert génomique du transposon et de délétion du gène *hcpB* ont échouées. Ceci aurait pu confirmer que le phénotype de *hcpB*- est définitivement lié à la perte de ce gène ou une mutation non voulue. Il est important de noter que des essais préliminaires indiquent que *hcpB*- a un défaut de *swimming* et une accumulation de di-GMPc, tel que déterminé par l'utilisation d'un rapporteur P_{cdrA} -GFP (données non montrées). Encore une fois, il reste à confirmer si cet effet dépend de HcpB ou est la cause d'une mutation secondaire.

7.3.2 Le *swarming* permet l'évolution de propriétés pro-*swarming* chez le mutant *gacS*-.

Le *swarming* est un modèle d'étude intéressant et utile pour le comportement de surface. Une étudiante du laboratoire Déziel, Sophie Robitaille, a utilisé ce modèle pour effectuer différentes expériences d'évolutions dirigées en laboratoire. Ceci est possible par une apparente pression

sélective qui favorise l'émergence de caractères pro-*swarming* chez des mutants avec un défaut pour ce type de motilité. J'ai employé une évolution guidée de façon expérimentale pour élucider le défaut de motilité d'un mutant *gacS*⁻. La Figure 7.6 montre le défaut de *swarming* de plusieurs isolats avec une allèle mutée de GacS. Le défaut du mutant *gacS*⁻ de la banque est d'autant plus évident lorsque comparé à un mutant *gacA*⁻ ; de plus, l'ajout d'une mutation propre $\Delta gacA$ dans le génome du mutant *gacS*⁻ montre un effet additif des deux mutants – c'est-à-dire, un regain de *swarming* pour le double mutant (Figure 7.7). Cette observation va à l'encontre du consensus que le senseur GacS fonctionne de façon mutuellement exclusive avec le régulateur GacA

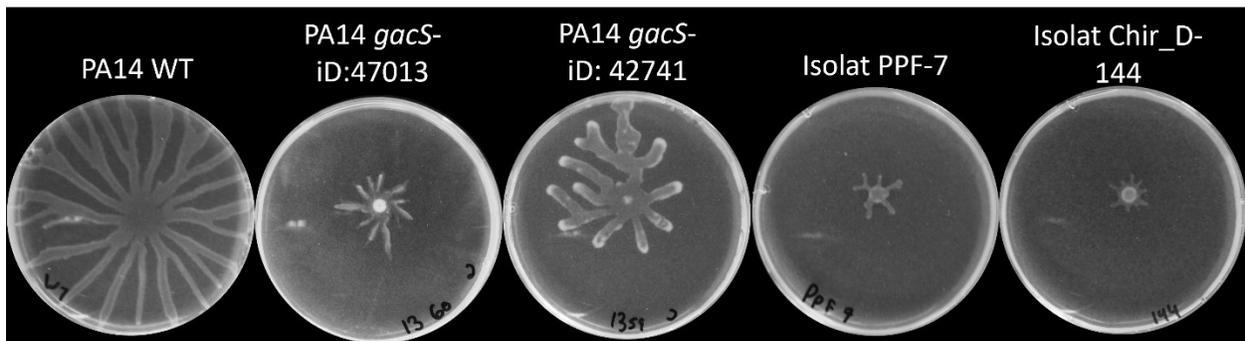


Figure 7.6 Swarming de multiples mutants *gacS*⁻ de *P. aeruginosa*.

Essai de *swarming* sur milieu M9DCAA, incubé à 37°C pendant 20 heures. Les souches testées sont (de gauche à droite) : PA14 WT ; deux mutants *gacS*⁻ de la banque de transposon PA14 *gacS*::Mar2xT7 (iD :47013), *gacS*::Mar2xT7 (iD :42741) ; les isolats *gacS*⁻ PPF-7 et Chir_D-144. Références : (Liberati *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2017). Tous les mutants *gacS*⁻ ont un défaut notable de *swarming* comparé à PA14 WT.



Figure 7.7 Swarming des mutants *gacA*⁻ et *gacS*⁻ montrent une différence de phénotype

Essai de motilité de type *swarming* de diverses souches sur milieu M9DCAA à 34°C pendant 44 heures. De gauche à droite : PA14 WT, PA14 *gacA*⁻, PA14 *gacS*⁻ et PA14 $\Delta gacA$ *gacS*⁻. Le mutant *gacA*⁻ présente un caractère *hyperswarmer* difficile à distinguer du WT. Le défaut de *gacS*⁻ est complété par l'ajout de la mutation $\Delta gacA$.

Pour identifier les facteurs qui influencent ce défaut de *swarming*, l'approche par évolution dirigée a été utilisée. Les pointes de dendrites qui commencent à apparaître après plus de 24 heures de croissance ont été récoltées avec un écouvillon puis étalées sur gélose nutritive. Jusqu'à huit

clones pour chacune des huit pointes de dendrites ont été sélectionnés, puis leur *swarming* a été évalué. Dès le premier passage de sélection, ces clones présentent en grande majorité un regain complet de leur *swarming*. La Figure 7.8 présente le phénotype de *swarming* pour six des évoluants (des clones purs).

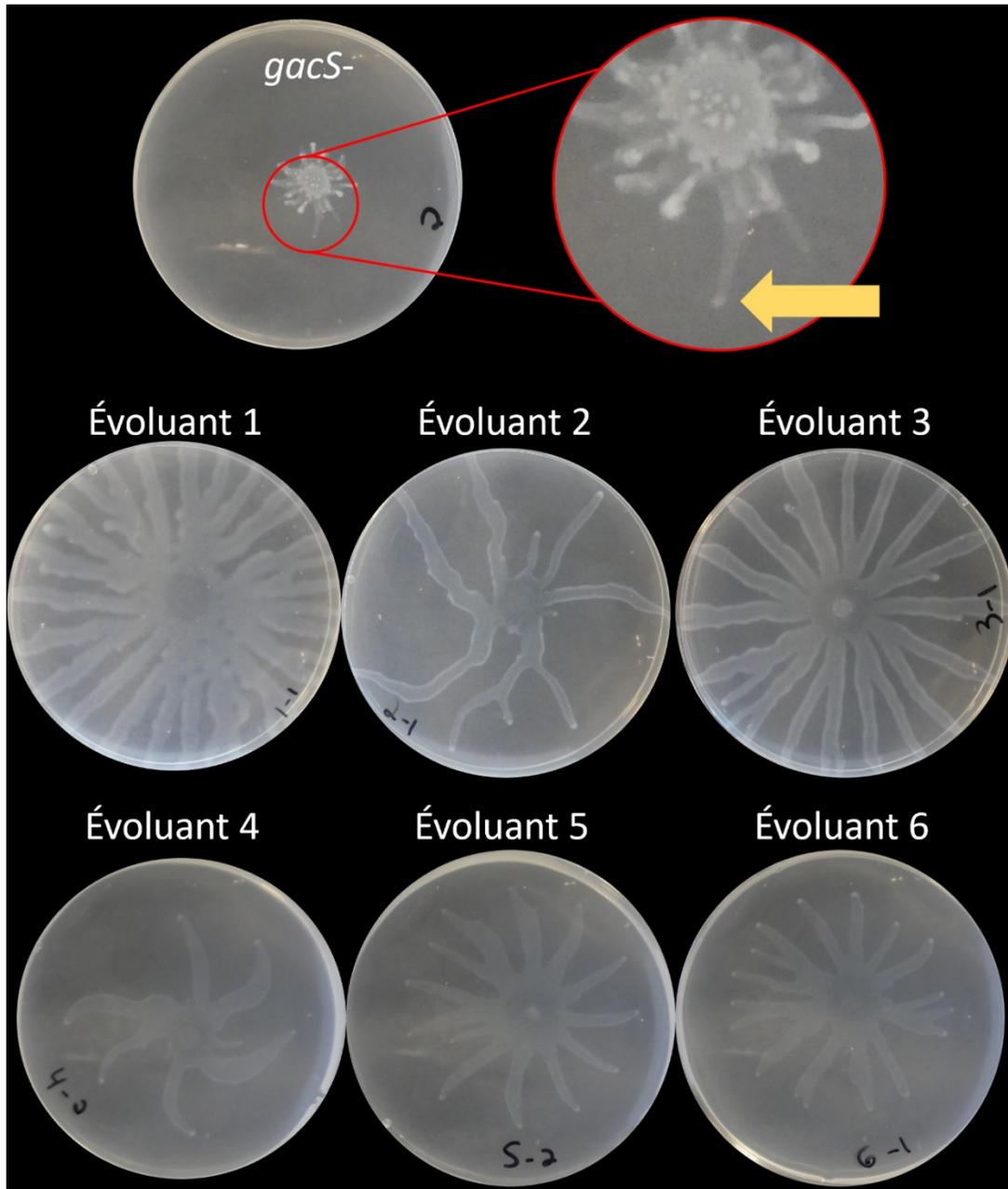


Figure 7.8 Comparaison du phénotype en *swarming* entre les divers évoluants *gacS-*.

Essai de motilité des évoluants. (En haut) Le mutant *gacS-* est inoculé sur gélose M9DCAA et incubé à 37°C pendant 20 heures, puis laissé à la température de la pièce pendant plus de 24 heures jusqu'à l'émergence de dendrites « tardifs » (flèche jaune). (En bas) Les divers évoluants de *gacS-* sont inoculés sur gélose M9DCAA, puis incubés pendant 20 heures à 37°C. Leurs différences de phénotype suggèrent l'acquisition de mutations distinctes.

Pour identifier la ou les mutation(s) cumulée(s) chez les différents clones, le séquençage de leur génome entier a été effectué. Six clones (1 à 6) ont été sélectionnés pour le séquençage, en plus du mutant *gacS*- non-évolué. La comparaison de génome s'est effectuée grâce à l'outil bio-informatique Breseq (Deatherage & Barrick, 2014). Chacun des évoluant a subi un seul changement ponctuel de nucléotide (SNP, *single nucleotide polymorphism*), la Table 7.5 présente la liste de ces mutations. Ces mutations incluent quatre d'entre elles affectant le complexe Pil-Chp (PilJ et ChpA), en plus d'une mutation dans *morA* (causant D1025G) et dans la région intergénique PA14_48310-320 (région promotrice, gènes inconnus).

Table 7.5 Liste des mutations ponctuelles pour chaque évoluant

Évoluant <i>gacS</i> -	Gène muté	Changement d'acide aminé
1	PA14_48310	Promoteur
2	<i>pilJ</i>	L321Q
3	<i>morA</i>	D1025G
4	<i>chpA</i>	E1049Q
5	<i>pilJ</i>	Q569E
6	<i>pilJ</i>	A596T

La trouvaille la plus intéressante de ce séquençage a été une mutation dans le génome de la souche *gacS*- non évoluée, dans le gène *morA* (menant à la substitution de A1109T). Puisque MorA est une protéine à double activité diguanylate cyclase et phosphodiesterase modulant le di-GMPc, cette mutation pourrait aisément expliquer le défaut de *swarming* du mutant *gacS*- (Choy *et al.*, 2004). Pour confirmer l'impact de cette mutation, le transposon de *gacS*- (*gacS*::Mar2xT7) a été transféré dans le génome de PA14 WT par électroporation et recombinaison homologue. De plus, une délétion du gène *gacS* complet a été effectués par échange allélique. Dans les deux cas, la mutation de *gacS* dans le *background* génétique du WT a mené à un *swarming* fort, équivalent à *gacA*- (Figure 7.9). Ceci suggère donc que la mutation causant A1109T dans MorA est la cause du défaut de *swarming* du mutant de la banque. Les mutations supplémentaires identifiées par l'évolution compensent donc l'activité de MorA aberrante.

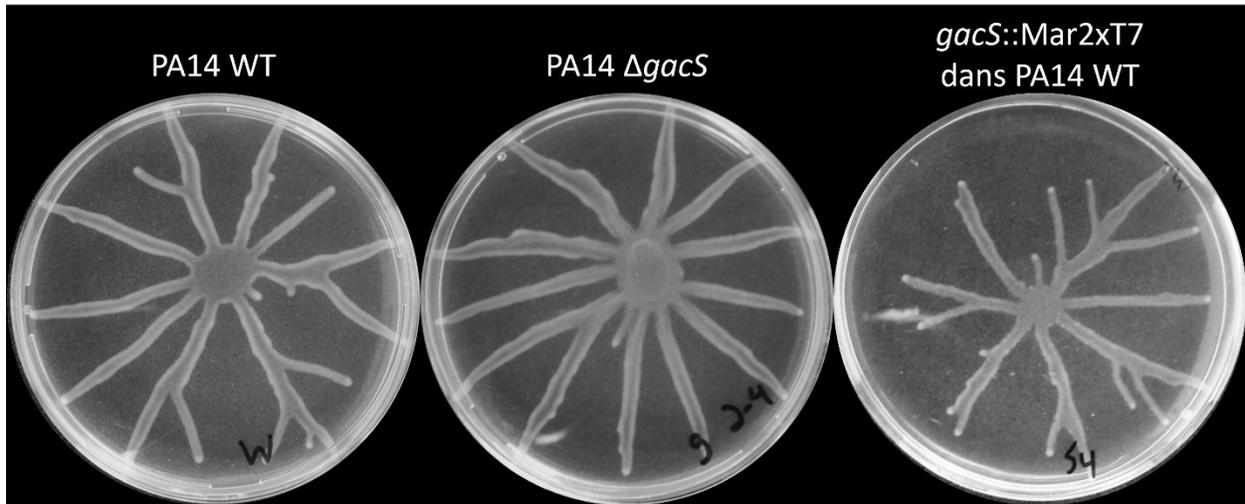


Figure 7.9 La perte de *gacS* dans le *background* génétique du WT ne cause pas de défaut de *swarming*.

Essai de *swarming* pour le mutant de délétion $\Delta gacS$ et le nouveau transformant *gacS::Mar2xT7*, comparé à PA14 WT. Les trois souches ont un phénotype de *swarming* similaire. Effectué sur M9DCAA à 37°C pendant 20 heures.

L'apparition de dendrites tardives ou *flares* a aussi permis d'obtenir des populations évoluant du triple mutant $\Delta pilA \Delta fliC rhIA$ - capables de s'étaler sur M9DCAA sans calcium avec agar. Les clones évoluant de cette lignée maintiennent leur caractère motile. Cependant, des analyses de séquençage pour ces souches n'ont pas été faites.

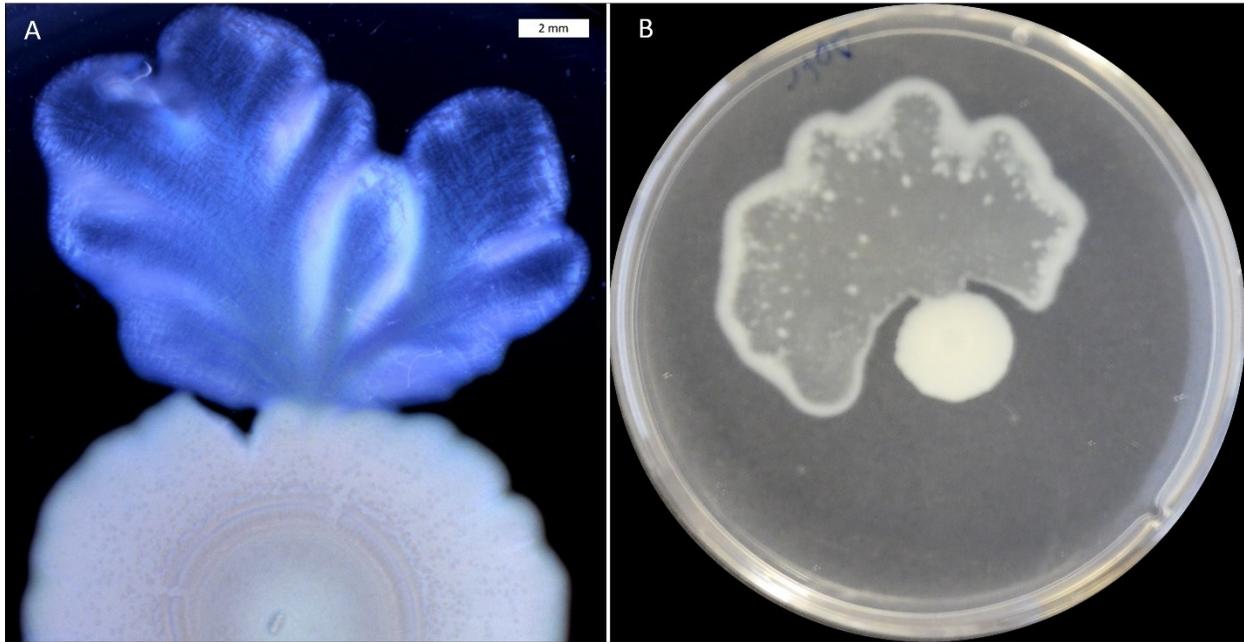


Figure 7.10 Apparition de dendrites tardives pour le triple mutant non-motile $\Delta pilA \Delta fliC rhIA^-$.

Des essais *swarming* standards ont été faits sur M9DCAA-agar sans calcium avec le triple mutant $\Delta pilA \Delta fliC rhIA^-$ à 37°C pendant 20 heures. Les géloses ont par la suite été laissées à température de la pièce pendant moins d'une semaine. Durant ce laps de temps, une excroissance motile est apparue. **A** Photo prise par stéréomicroscopie d'un *flare* (barre blanche = 2 mm). **B** Photo prise avec appareil photo numérique.

7.4 Discussion

7.4.1 L'impact de la mutation R31S sur la fonction de RsmA

La substitution de l'arginine 31 pour une sérine (R31S) de la protéine RsmA a été obtenue par une évolution dirigée en *swarming* pour un mutant $\Delta hptB$ (Robitaille *et al.*, 2020b). Cette mutation permet de récupérer un *swarming* robuste pour l'évoluant $\Delta hptB$ RsmA_{R31S}, alors qu'un simple mutant $\Delta hptB$ *swarme* très peu. Les travaux de *pull-down* que j'ai effectués montrent la gamme de cibles liées par RsmA et les différences de régulation qui existent entre RsmA_{WT} et RsmA_{R31S}. Au total, 137 régions 5'UTR sont différemment liées par les deux variants de cette protéine (81 plus fortement liées par RsmA_{R31S} et 56 plus liées par RsmA_{WT}). Parmi toutes ces cibles, seulement 37% sont retrouvées dans au moins une des trois récentes études de type ChIP-seq par RsmA et/ou RsmN (Chihara *et al.*, 2021; Gebhardt *et al.*, 2020; Romero *et al.*, 2018). Les raisons pour ces divergences sont multiples : [1] nous avons utilisé les données génomiques de la souche PA14 pour nos essais, alors que tous les ChIP-seq de RsmA ont été effectués chez la souche PAO1 ; [2] l'avantage d'une méthode *in vitro* est que les cibles sont identifiées indépendamment de leur transcription, permettant l'identification d'un plus large panel de nouvelles cibles qui sont peu transcrites en conditions de laboratoire ; [3] le désavantage d'une

méthode *in vitro* étant que les conditions expérimentales sont moins semblables à des conditions de croissance réelles. Une cible comme *recJ* n'a pas été identifiée par ces trois récents ChIP-seq de RsmA publiés (Chihara *et al.*, 2021; Gebhardt *et al.*, 2020; Romero *et al.*, 2018).

On peut donc postuler que les cibles plus liées par RsmA_{R31S} (donc plus réprimées) doivent être inactivées pour compléter le défaut de *swarming* de $\Delta hptB$, alors que les cibles moins liées doivent être sur-exprimées. Ceci assume évidemment la fonction prototypique connue de répresseur de la traduction qu'à RsmA.

Trois autres 5'UTR fortement plus représentées dans les cibles fortement liées par RsmAR31S sont les homologues de phosphatase à domaine TPM : PA14_45700, PA14_45710 et PA14_06980. Les deux premières sont présentes dans un des îlots flagellaires du génome, entre les gènes *flhA* et *flhB* ; la dernière est en amont du gène lié par RsmA (PA14_06990). Virtuellement rien n'est connu sur la fonction de ces phosphatases prédites : un homologue de séquence (BA41) identifié chez *Bizionia argentinensis* possède une activité NTPase/NDPase à large spectre (Cerutti *et al.*, 2017). Leur redondance fonctionnelle et leur potentielle régulation par RsmA indique qu'elles ont probablement un rôle important à jouer dans le métabolisme de *P. aeruginosa*. Cette fonction face au *swarming* n'est pas du tout évidente, surtout qu'un double mutant PA14_45700/PA14_45710 n'a pas de modification de *swarming*, autant dans les génotypes WT et $\Delta hptB$, peut-être dû avec de la redondance fonctionnelle avec la troisième phosphatase. Un autre gène qui peut effectuer la motilité flagellaire est PA14_02260, un régulateur de réponse Che-like potentiellement impliqué dans le chimiotaxisme et la virulence (Francis *et al.*, 2017). Il se peut que les trois phosphatases doivent être délétées pour avoir un impact physiologique sur le *swarming*, ou bien que ces gènes ne soient pas exprimés dans nos conditions.

Deux autres cibles de régulation confirmées pour RsmA sont différemment liées : HptB et CafA. L'aspect *in vitro* de cette expérience a permis d'identifier *hptB* comme cible moins inhibée par RsmA_{R31S}, mais *hptB* est évidemment absent du génome de l'évoluant *hptB* RsmA_{R31S}. Le gène *cafA* est non-seulement connu pour être réprimé par RsmA, mais aussi pour être impliqué dans le contrôle de l'expression de RsmZ (Chihara *et al.*, 2021; Petrova & Sauer, 2010). Ceci pourrait être un potentiel mécanisme via lequel RsmAR31S réduit la surexpression de RsmZ chez le mutant *hptB* sur une surface (Jean-Pierre *et al.*, 2016).

Au lieu de contrôler une cible cruciale pour le *swarming*, il se peut que les changements globaux de régulation influencent l'homéostasie de RsmA dans nos conditions d'étude. Il s'agit principalement d'un concept remarqué pour la régulation par la protéine Hfq, où le besoin d'une

seule protéine pour plusieurs fonctions cellulaires crée une forme de compétition entre les cibles (Sonnleitner *et al.*, 2018). Dans ce cas, la ou les cibles de RsmA importantes pour le contrôle du *swarming* n'auraient pas une affinité changée, mais la disponibilité de RsmA_{R31S} serait modifiée par son propre régulon.

7.4.2 Le *swarming* et l'évolution

Durant le *swarming*, une population dense de bactéries qui a été inoculée au centre d'une gélose s'étale vers l'extérieur coloniser la surface. Cette action donne un meilleur accès aux nutriments sur toute la surface de la gélose. Nous supposons que ce potentiel accès à plus de nutriments constitue un avantage sélectif : les cellules non-motiles restent au centre de la gélose et se divisent moins que les cellules motiles. Il s'agit probablement de la raison pour laquelle les conditions qui induisent le *swarming* favorisent si facilement l'apparition de mutations compensatoires dans le génome de souches avec des défaut de *swarming*. Ceci expliquerait aussi pourquoi virtuellement tous les clones isolés d'une pointe de dendrite évoluée produisent un meilleur *swarming* (données non montrées). Cette adaptation n'a pas été observée en culture liquide, du moins pas dans nos conditions (Robitaille *et al.*, 2020a). Le *swarming* est connu pour favoriser l'apparition de mutations dans le gène *fleN*, qui confère un phénotype polyflagellé *hyperswarmer* (Deforet *et al.*, 2014; van Ditmarsch *et al.*, 2013). Dans le cas de $\Delta hptB$, l'évolution dirigée a mis en évidence l'apparition de mutants *quorum sensing* (*lasR*) et de la voie Gac/Rsm (*gacA* et *rsmA*, en amont de HptB) (Robitaille *et al.*, 2020a; Robitaille *et al.*, 2020b). Dans le cas de *gacS*⁻, les mutations affectent principalement les voies des seconds messagers AMPc et di-GMPc, fort probablement en réponse à la mutation dans *morA* qui était déjà présente dans le génome de *gacS*::Mar2xT7. Cette mutation est probablement apparue durant la préparation de la banque (Liberati *et al.*, 2006). L'enzyme MorA est une diguanylate cyclase et phosphodiesterase à di-GMPc bifonctionnelle, fortement impliquée dans le contrôle de la transition motile-sessile (Choy *et al.*, 2004; Phippen *et al.*, 2014). De plus, l'apparition de mutations dans *morA* semble être assez fréquente dans les conditions de laboratoire (Scribner *et al.*, 2022). La substitution A1109T de MorA fait d'ailleurs partie des mutations relevées dans la littérature (Scribner *et al.*, 2022). Le résidu A1109 fait partie du domaine diguanylate cyclase de MorA (en amont du motif catalytique GGDEF), et puisque le di-GMPc est pro-biofilm, cette mutation cause probablement une plus grande synthèse de di-GMPc. Cette mutation fréquente est peut-être grandement favorisée dans un mutant GacS. Il serait intéressant de séquencer le génome du second mutant *gacS*::MrT7 (ED1359) – qui a un défaut moins prononcé en *swarming* – pour voir s'il possède lui aussi une mutation dans le gène *morA*. Il serait aussi

possible d'analyser les banques de séquences de génomes de *P. aeruginosa* pour noter la co-occurrence des mutations dans *gacS* et *morA*.

7.4.3 Le *swarming* et le SST6

Plusieurs résultats précédemment obtenus dans le laboratoire Déziel indiquent que le SST6 affecte la motilité de type *swarming* de PA14 (Robitaille, 2020; Tremblay, 2011). Les travaux de Sophie Robitaille en particulier mettent l'accent sur le fait que le H2-SST6 semble le plus important pour la motilité de type *swarming*, résultats que j'ai confirmé par mes travaux. De plus, je mets en évidence la perte quasi-totale de la motilité *swarming* de deux mutants par transposition dans le gène *hcpB*, issus de la banque de transposon de PA14 (Liberati *et al.*, 2006). HcpB fait partie des quatre Hcp (Hcp2-A-B-C) associés au H2-SST6. Malheureusement, les essais de complémentation avec une copie plasmidique du gène et les tentatives de création d'un mutant propre ont tous échoués. Il n'est donc pas possible d'écarter la possibilité que tout comme *gacS::MrT7*, le phénotype de *hcpB::MrT7* soit dû à une mutation secondaire dans le génome. Cette possibilité est accentuée par le fait que HcpB- a aussi un défaut de *swimming* et contient plus de di-GMPc intracellulaire que la souche sauvage (données non montrées). Le phénotype *swarming* du mutant *hcpB-* a été rapporté par une étude précédente, mais cette étude utilise le même mutant issu de la banque de transposon (Kilmury & Burrows, 2018). Je pose tout de même l'hypothèse que HcpB est le membre des Hcp2-A-B-C le plus exprimé en condition de *swarming*, et que la perte de cette protéine cause une suraccumulation dans le cytoplasme des effecteurs toxiques qui devraient être normalement exportés. Ceci expliquerait également pourquoi la mutation de ce gène a été si problématique.

De plus, un grand nombre de ces cibles différemment liées par RsmA_{WT} et RsmA_{R31S} sont associées au SST6 (huit cibles). Ces cibles se distribuent au sein des trois îlots de sécrétion. RsmA est connue pour être un régulateur principal du SST6, et ce dernier peut agir sur le *swarming*. Il y a donc une possibilité que l'impact de RsmA_{R31S} sur le *swarming* se fasse via la régulation du SST6.

7.4.4 Perspectives

Les travaux que je présente dans cette thèse offrent une vue d'ensemble des paramètres physico-chimiques qui sont importants pour coloniser une gélose. *P. aeruginosa* devra produire des rhamnolipides pour faire son *swarming* sur une gélose d'agar dans nos conditions ; elle ne semble pas avoir besoin de son flagelle pour s'étaler sur milieu sans calcium ajouté. Cependant,

j'ai observé que le triple mutant $\Delta pilA \Delta fliC rhIA$ - a développé des *flares* sur milieu M9DCAA sans calcium avec de l'agar. Ceci n'était pas simplement une adaptation phénotypique transitoire, puisque des clones isolés de ces *flares* maintenaient la capacité de se déplacer dans ces conditions (données non montrées). La caractérisation de ces clones reste à faire, principalement en séquençant leur génome. J'ai également effectué des essais préliminaires de *swarming* de mutants *quorum sensing* (*rhII*- et *rhIR*-, données non montrées). Le mutant *rhII*- – qui a un gros défaut de production de rhamnolipides – a une aussi une capacité de développer des *flares* en *swarming*. Dans ce cas, l'adaptation n'est pas maintenue chez des clones isolés de ces dendrites tardives. De plus, cette capacité dépend de LasI : un double mutant *lasI*- *rhII*- ne produit pas de *flares*. Tout ceci reste préliminaire et doit être validé

Concernant les résultats du *pull-down*, plusieurs cibles intéressantes doivent être explorées davantage. C'est le cas de CafA (qui peut agir sur RsmZ) et SiaC (PA14_02130). Cette dernière est une activatrice de l'activité diguanylate cyclase de SiaD (Chen *et al.*, 2020). Ces deux candidats sont bien placés pour avoir un impact sur le *swarming*, malheureusement les contraintes de temps ne m'ont pas permis d'explorer leur rôle dans ces conditions.

8 CONCLUSION GÉNÉRALE

La motilité de type *swarming* est un comportement social complexe qu'adopte *P. aeruginosa* et plusieurs autres espèces bactériennes pour coloniser une surface. Il est bien connu que *P. aeruginosa* doit exprimer un flagelle fonctionnel et produire des agents tensioactifs pour effectuer son *swarming* dans des conditions expérimentales standards. Mes travaux montrent bien que ce besoin de production de surfactants est le résultat de l'utilisation ubiquitaire d'agar pour les essais en laboratoire ; *P. aeruginosa* PA14 n'a pas besoin de produire ses agents mouillants lorsque d'autres agents gélifiants (gomme de gellane et carraghénane) sont utilisés. Je démontre également que l'étalement d'une colonie sur gélose semi-solide est indépendant de l'activité flagellaire dans des conditions sans ajout de Ca^{2+} dans le milieu : menant à une forme de dispersion nommée *sliding*. Plus intéressant encore, ces deux modifications aux conditions d'études – notamment l'utilisation de la gomme de gellane et l'absence de Ca^{2+} -- sont additives, rendant possible l'étalement d'une colonie de *P. aeruginosa* PA14 sans production de rhamnolipides, ni présence d'un flagelle et pili de type IV. Ces conditions expérimentales sont intéressantes pour étudier le comportement social de *P. aeruginosa* : principalement l'implication du *quorum sensing* au niveau du *swarming*, qui est difficile à étudier normalement à cause de l'importance du *quorum sensing* pour la production de rhamnolipides. L'observation d'une expansion notable pour une colonie triple mutantes $\Delta pilA \Delta fliC rhlA$ - représente au meilleur de mes connaissances, la première démonstration d'un tel comportement pour *P. aeruginosa*.

Le caractère social du *swarming* fait de cette motilité un modèle d'étude intéressant pour la caractérisation des interactions interbactériennes. Je démontre par mes travaux qu'une autre espèce bactérienne, *Burkholderia cenocepacia* K56-2, est capable d'utiliser la production des agents tensioactifs de PA14 pour se déplacer en *swarming* dans une coculture. Ce gain de motilité permet également le déplacement sans flagelle de PA14 dans des conditions qui requièrent normalement cet appendice. Le mécanisme qui permet ce déplacement n'est pas encore élucidé, mais il est fort possible que : [1] K56-2 active le *sliding* de PA14, ou [2] PA14 s'attache à K56-2 comme un bagage pour coloniser la surface sans flagelle. Cette interaction semble également assez spécifique, puisque d'autres espèces bactériennes comme *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia* n'ont pas cette capacité de facilement permettre le mouvement de PA14. Évidemment, la capacité qu'a K56-2 à promouvoir le déplacement aflagellé de *P. aeruginosa* ressemble beaucoup à l'effet du calcium sur le *sliding*. En réalité, PA14 semble très apte à s'étaler sur une surface sans son flagelle. Ceci est d'autant plus vrai lorsque nous

considérons la formation d'excroissances évoluées (*flares*), qui se développent à partir d'une colonie $\Delta pilA \Delta fliC rhIA-$. Une telle colonie mutante perd tous ses outils impliqués dans le déplacement (flagelle, pili et agents mouillants), mais peut tout de même acquérir un caractère motile (c'est-à-dire en expansion). Cette observation reste à être bien caractérisée pour en connaître la nature.

Un comportement complexe comme le *swarming* est en partie régulé par une voie de régulation appelée Gac/Rsm. Cette dernière implique les protéines GacS/GacA et RsmA pour contrôler l'alternance entre un mode de vie motile ou sessile. Sur une gélose, l'activation du *swarming* semble donner un avantage à la colonie, puisqu'il est souvent observé qu'un mutant déficient en *swarming* va évoluer dans ces conditions pour effectuer cette motilité. Cette forme d'évolution dirigée a été utilisée pour comprendre le défaut de *swarming* des mutants *gacS-* et $\Delta hptB$ (effectuée par Sophie). Malheureusement, l'utilisation d'une évolution dirigée pour *gacS-* n'était pas nécessaire puisque le phénotype de ce mutant est causé par une mutation secondaire dans le gène *morA*. Dans le cas de $\Delta hptB$, l'évolution a permis d'obtenir un variant de RsmA avec la substitution d'acide aminé R31S. J'ai développé un essai de type *pull-down* pour extraire d'un mélange d'oligonucléotides les séquences capables de lier RsmA_{WT}, ainsi que son variant RsmA_{R31S}. Les résultats de ce *pull-down* ont permis de mettre en lumière plusieurs cibles de liaison de RsmA inconnues avant ce jour, et de montrer la différence de régulation globale qui est causée par la mutation R31S.

Mes travaux ont continué la caractérisation du comportement social appelé *swarming*, qui a été entamée par Julien Tremblay et poursuivie par plusieurs étudiants gradués du laboratoire Déziel. Le but initial de mon projet de doctorat concernait beaucoup plus l'évolution de la voie Gac/Rsm en conditions motiles et sessiles. Cependant, des problèmes au niveau de la création d'outils moléculaires pour suivre et caractériser l'activité de RsmA ont ralenti le progrès sur cette facette du projet. J'ai tout de même eu la chance de publier deux observations intéressantes qui permettent de souligner la complexité du comportement de surface de *P. aeruginosa*, seul ou avec une autre espèce bactérienne.

9 BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Mawgoud AM, Lepine F, Deziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(5):1323-1336.
- Abdou L, Chou HT, Haas D, Lu CD (2011) Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 193(11):2784-2792.
- Adams DW, Pereira JM, Stoudmann C, Stutzmann S, Blokesch M (2019) The type IV pilus protein PilU functions as a PilT-dependent retraction ATPase. *PLoS Genetics* 15(9):e1008393.
- Ali-Ahmad A, Fadel F, Sebban-Kreuzer C, Ba M, Pelissier GD, Bornet O, Guerlesquin F, Bourne Y, Bordi C, Vincent F (2017) Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports* 7(1):11262.
- Allsopp LP, Wood TE, Howard SA, Maggiorcelli F, Nolan LM, Wettstadt S, Filloux A (2017) RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(29):7707-7712.
- An S, Wu J, Zhang LH (2010) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Appl Environ Microbiol* 76(24):8160-8173.
- Anda Jd, Kuchma SL, Webster SS, Boromand A, Lewis KA, Lee CK, Contreras M, Pereira VFM, Hogan DA, O'Hern CS, O'Toole GA, Wong GCL (2023) How individual *P. aeruginosa* cells with diverse stator distributions collectively form a heterogeneous macroscopic swarming population. *bioRxiv* 10.1101/2023.04.10.536285:2023.2004.2010.536285.
- Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31(2):166-169.
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom).
- Angelini TE, Roper M, Kolter R, Weitz DA, Brenner MP (2009) *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43):18109-18113.
- Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S, Ramphal R (2005) Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect Immun* 73(7):4395-4398.
- Asp ME, Ho Thanh MT, Germann DA, Carroll RJ, Franceski A, Welch RD, Gopinath A, Patteson AE (2022) Spreading rates of bacterial colonies depend on substrate stiffness and permeability. *PNAS Nexus* 1(1):pgac025.
- Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, Harwood CS (2012) The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Research* 40(15):7207-7218.
- Bartell JA, Yen P, Varga JJ, Goldberg JB, Papin JA (2014) Comparative metabolic systems analysis of pathogenic *Burkholderia*. *Journal of Bacteriology* 196(2):210-226.

- Bauman SJ & Kuehn MJ (2006) Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect* 8(9-10):2400-2408.
- Belas R (2014) Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology* 22(9):517-527.
- Bernier SP, Hum C, Li X, O'Toole GA, Magarvey NA, Surette MG (2017) *Pseudomonas aeruginosa*-Derived Rhamnolipids and Other Detergents Modulate Colony Morphotype and Motility in the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Bacteriology* 199(13).
- Bernier SP, Workentine ML, Li X, Magarvey NA, O'Toole GA, Surette MG (2016) Cyanide Toxicity to *Burkholderia cenocepacia* Is Modulated by Polymicrobial Communities and Environmental Factors. *Frontiers in Microbiology* 7:725.
- Bertrand JJ, West JT, Engel JN (2010) Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 192(4):994-1010.
- Bhagirath AY, Pydi SP, Li Y, Lin C, Kong W, Chelikani P, Duan K (2017) Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That Controls Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* 3(2):162-175.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114-2120.
- Bordi C, Lamy MC, Ventre I, Termine E, Hachani A, Fillet S, Roche B, Bleves S, Mejean V, Lazdunski A, Filloux A (2010) Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Molecular Microbiology* 76(6):1427-1443.
- Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR (2010) *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 75(4):827-842.
- Bottcher T, Elliott HL, Clardy J (2016) Dynamics of Snake-like Swarming Behavior of *Vibrio alginolyticus*. *Biophysical Journal* 110(4):981-992.
- Bourdin T, Benoit ME, Monnier A, Bedard E, Prevost M, Charron D, Audy N, Gravel S, Sicard M, Quach C, Deziel E, Constant P (2023) *Serratia marcescens* Colonization in a Neonatal Intensive Care Unit Has Multiple Sources, with Sink Drains as a Major Reservoir. *Appl Environ Microbiol* 10.1128/aem.00105-23:e0010523.
- Bouteiller M, Dupont C, Bourigault Y, Latour X, Barbey C, Konto-Ghiorgi Y, Merieau A (2021) *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. *International Journal of Molecular Sciences* 22(7).
- Boyle KE, Monaco HT, Deforet M, Yan J, Wang Z, Rhee K, Xavier JB (2017) Metabolism and the Evolution of Social Behavior. *Mol Biol Evol* 34(9):2367-2379.
- Bragonzi A (2010) Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 300(8):584-593.
- Brazas MD & Hancock RE (2005) Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(8):3222-3227.
- Brencic A & Lory S (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular Microbiology* 72(3):612-632.

- Brencic A, McFarland KA, McManus HR, Castang S, Mogno I, Dove SL, Lory S (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the *RsmY* and *RsmZ* regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology* 73(3):434-445.
- Broder UN, Jaeger T, Jenal U (2016) LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Microbiol* 2:16184.
- Burch AY, Shimada BK, Browne PJ, Lindow SE (2010) Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl Environ Microbiol* 76(16):5363-5372.
- Burrowes E, Baysse C, Adams C, O'Gara F (2006) Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152(Pt 2):405-418.
- Burrows LL (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology* 66:493-520.
- Burstein D, Satanower S, Simovitch M, Belnik Y, Zehavi M, Yerushalmi G, Ben-Aroya S, Pupko T, Banin E (2015) Novel type III effectors in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 6(2):e00161.
- Cai Q, Li Z, Ouyang Q, Luo C, Gordon VD (2016) Singly Flagellated *Pseudomonas aeruginosa* Chemotaxes Efficiently by Unbiased Motor Regulation. *MBio* 7(2):e00013.
- Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 187(21):7351-7361.
- Carmody LA, Spilker T, LiPuma JJ (2011) Reassessment of *Stenotrophomonas maltophilia* phenotype. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3):1101-1103.
- Carter MQ, Chen J, Lory S (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. *Journal of Bacteriology* 192(13):3249-3258.
- Cerutti ML, Otero LH, Smal C, Pellizza L, Goldbaum FA, Klinke S, Aran M (2017) Structural and functional characterization of a cold adapted TPM-domain with ATPase/ADPase activity. *Journal of Structural Biology* 197(3):201-209.
- Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, Fadel F, Filloux A, Sivaneson M, de Bentzmann S, Bordi C (2016) The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genetics* 12(5):e1006032.
- Chen G, Gan J, Yang C, Zuo Y, Peng J, Li M, Huo W, Xie Y, Zhang Y, Wang T, Deng X, Liang H (2020) The SiaA/B/C/D signaling network regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO Journal* 39(15):e105997.
- Cherrak Y, Flaugnatti N, Durand E, Journet L, Cascales E (2019) Structure and Activity of the Type VI Secretion System. *Microbiol Spectr* 7(4).
- Chi WJ, Chang YK, Hong SK (2012) Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 94(4):917-930.
- Chihara K, Barquist L, Takasugi K, Noda N, Tsuneda S (2021) Global identification of RsmA/N binding sites in *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* UV CLIP-seq. *RNA Biology* 10.1080/15476286.2021.1917184:1-16.
- Childers SE, Vargas M, Noll KM (1992) Improved Methods for Cultivation of the Extremely Thermophilic Bacterium *Thermotoga neapolitana*. *Appl Environ Microbiol* 58(12):3949-3953.

- Choi KH, Kumar A, Schweizer HP (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods* 64(3):391-397.
- Choi KH & Schweizer HP (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols* 1(1):153-161.
- Choudhury A, Saha S, Maiti NC, Datta S (2023) Exploring structural features and potential lipid interactions of *Pseudomonas aeruginosa* type three secretion effector PemB by spectroscopic and calorimetric experiments. *Protein Science* 32(4):e4627.
- Choy WK, Zhou L, Syn CK, Zhang LH, Swarup S (2004) MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology* 186(21):7221-7228.
- Cianfanelli FR, Alcoforado Diniz J, Guo M, De Cesare V, Trost M, Coulthurst SJ (2016) VgrG and PAAR Proteins Define Distinct Versions of a Functional Type VI Secretion System. *PLoS Pathogens* 12(6):e1005735.
- Coleman SR, Pletzer D, Hancock REW (2021) Contribution of Swarming Motility to Dissemination in a *Pseudomonas aeruginosa* Murine Skin Abscess Infection Model. *Journal of Infectious Diseases* 224(4):726-733.
- Colley B, Dederer V, Carnell M, Kjelleberg S, Rice SA, Klebensberger J (2016) SiaA/D Interconnects c-di-GMP and RsmA Signaling to Coordinate Cellular Aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* in Response to Environmental Conditions. *Frontiers in Microbiology* 7:179.
- Conrad JC, Gibiansky ML, Jin F, Gordon VD, Motto DA, Mathewson MA, Stopka WG, Zelasko DC, Shrout JD, Wong GC (2011) Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal* 100(7):1608-1616.
- Corley JM, Intile P, Yahr TL (2022) Direct Inhibition of RetS Synthesis by RsmA Contributes to Homeostasis of the *Pseudomonas aeruginosa* Gac/Rsm Signaling System. *Journal of Bacteriology* 204(3):e0058021.
- Costello A, Reen FJ, O'Gara F, Callaghan M, McClean S (2014) Inhibition of co-colonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia multivorans*. *Microbiology (Reading)* 160(Pt 7):1474-1487.
- Coulon PML, Groleau MC, Deziel E (2019) Potential of the *Burkholderia cepacia* Complex to Produce 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkyquinolines. *Front Cell Infect Microbiol* 9:33.
- Crone S, Vives-Florez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, Martinez-Garcia 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.
- Darling P, Chan M, Cox AD, Sokol PA (1998) Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 66(2):874-877.
- Das N, Tripathi N, Basu S, Bose C, Maitra S, Khurana S (2015) Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 6:698.
- Dasgupta N, Arora SK, Ramphal R (2000) *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 182(2):357-364.

- Datta S, Mody K, Gopalsamy G, Jha B (2011) Novel application of κ -carrageenan: As a gelling agent in microbiological media to study biodiversity of extreme alkaliphiles. *Carbohydrate Polymers* 85(2):465-468.
- de Mattos CD, Nemudryi A, Faith D, Bublitz DC, Hammond L, Kinnersley M, Schwartzkopf CM, Robinson AJ, Joyce A, Michaels LA, Brzozowski RS, Coluccio A, Xing D, Uchiyama J, Jennings LK, Eswara P, Wiedenheft B, Secor PR (2022) Bacterial threat assessment of bacteriophage infection is mediated by intracellular polyamine accumulation and Gac/Rsm signaling. *bioRxiv* :2022.2004. 2001.486733.
- De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JEA, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Kidd TJ, Kaestli M, Ginther JL, Wagner DM, Keim P, Bell SC, Jacobs JA, Currie BJ, Vandamme P (2015) *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 65(7):2265-2271.
- Deatherage DE & Barrick JE (2014) Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods in Molecular Biology* 1151:165-188.
- Deforet M (2023) Long-range alteration of the physical environment mediates cooperation between *Pseudomonas aeruginosa* swarming colonies. *Environmental Microbiology* 10.1111/1462-2920.16373.
- Deforet M, van Ditmarsch D, Carmona-Fontaine C, Xavier JB (2014) Hyperswarming adaptations in a bacterium improve collective motility without enhancing single cell motility. *Soft Matter* 10(14):2405-2413.
- Dekimpe V & Deziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology (Reading)* 155(Pt 3):712-723.
- Deme JC, Johnson S, Vickery O, Aron A, Monkhouse H, Griffiths T, James RH, Berks BC, Coulton JW, Stansfeld PJ, Lea SM (2020) Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. *Nat Microbiol* 5(12):1553-1564.
- 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(Pt 8):2005-2013.
- Diepold A & Wagner S (2014) Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiol Rev* 38(4):802-822.
- Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(12):7347-7351.
- Dobler L, Vilela LF, Almeida RV, Neves BC (2016) Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *New Biotechnology* 33(1):123-135.
- Doyle TB, Hawkins AC, McCarter LL (2004) The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 186(19):6341-6350.
- Dubeau D, Deziel E, Woods DE, Lépine F (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology* 9:263.

- Eberl L & Vandamme P (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Res* 5.
- Ellison CK, Kan J, Chlebek JL, Hummels KR, Panis G, Viollier PH, Biais N, Dalia AB, Brun YV (2019) A bifunctional ATPase drives tad pilus extension and retraction. *Sci Adv* 5(12):eaay2591.
- Fauvart M, Phillips P, Bachaspatimayum D, Verstraeten N, Franssaer J, Michiels J, Vermant J (2012) Surface tension gradient control of bacterial swarming in colonies of *Pseudomonas aeruginosa*. *Soft Matter* 8(1):70-76.
- Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T (2014) Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environmental Microbiology* 16(7):1961-1981.
- Ferreiro MD & Gallegos MT (2021) Distinctive features of the Gac-Rsm pathway in plant-associated *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* 23(10):5670-5689.
- Filloux A (2011) Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Frontiers in Microbiology* 2:155.
- Finkelshtein A, Roth D, Ben Jacob E, Ingham CJ (2015) Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *MBio* 6(3):e00074-00015.
- Francis VI, Stevenson EC, Porter SL (2017) Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 364(11).
- Francis VI, Waters EM, Finton-James SE, Gori A, Kadioglu A, Brown AR, Porter SL (2018) Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 9(1):2219.
- Frangipani E, Visaggio D, Heeb S, Kaever V, Camara M, Visca P, Imperi F (2014) The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 16(3):676-688.
- Fulcher NB, Holliday PM, Klem E, Cann MJ, Wolfgang MC (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Molecular Microbiology* 76(4):889-904.
- Garcia-Romero I & Valvano MA (2020) Complete Genome Sequence of *Burkholderia cenocepacia* K56-2, an Opportunistic Pathogen. *Microbiol Resour Announc* 9(43).
- Garnacho-Montero J & Amaya-Villar R (2022) The problem of multi-resistance in gram-negative bacilli in intensive care units: Treatment and prevention strategies. *Med Intensiva (Engl Ed)* 46(6):326-335.
- Gebhardt MJ, Kambara TK, Ramsey KM, Dove SL (2020) Widespread targeting of nascent transcripts by RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(19):10520-10529.
- Gerovac M, Wicke L, Chihara K, Schneider C, Lavigne R, Vogel J (2021) A Grad-seq View of RNA and Protein Complexes in *Pseudomonas aeruginosa* under Standard and Bacteriophage Predation Conditions. *MBio* 12(1).
- Giavasis I, Harvey LM, McNeil B (2000) Gellan gum. *Critical Reviews in Biotechnology* 20(3):177-211.
- Gibbs KA & Greenberg EP (2011) Territoriality in *Proteus*: advertisement and aggression. *Chem Rev* 111(1):188-194.

- Givero C, Verani M, Ciarletta P (2016) Emerging morphologies in round bacterial colonies: comparing volumetric versus chemotactic expansion. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 15(3):643-661.
- Glick R, Gilmour C, Tremblay J, Satanower S, Avidan O, Déziel E, Greenberg EP, Poole K, Banin E (2010) Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 192(12):2973-2980.
- Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A, Lory S (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* 23(2):249-259.
- Groleau MC, de Oliveira Pereira T, Dekimpe V, Déziel E (2020) PqsE Is Essential for RhlR-Dependent Quorum Sensing Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems* 5(3).
- Ha DG & O'Toole GA (2015) c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* Review. *Microbiol Spectr* 3(2):MB-0003-2014.
- Hara S, Hashidoko Y, Desyatkin RV, Hatano R, Tahara S (2009) High rate of N₂ fixation by East Siberian cryophilic soil bacteria as determined by measuring acetylene reduction in nitrogen-poor medium solidified with gellan gum. *Appl Environ Microbiol* 75(9):2811-2819.
- Hara S, Isoda R, Tahvanainen T, Hashidoko Y (2012) Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine the quality of solid agar plates for bacterial culture. *PLoS One* 7(7):e41142.
- Harrison EM, Carter ME, Luck S, Ou HY, He X, Deng Z, O'Callaghan C, Kadioglu A, Rajakumar K (2010) Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect Immun* 78(4):1437-1446.
- Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading)* 153(Pt 4):917-923.
- Harshey RM & Matsuyama T (1994) Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(18):8631-8635.
- Harshey RM & Partridge JD (2015) Shelter in a Swarm. *Journal of Molecular Biology* 427(23):3683-3694.
- He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM, Rahme LG (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(8):2530-2535.
- Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G (2010) Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* 464(7290):908-912.
- Hennes M, TAILLEUR J, Charron G, Daerr A (2017a) Active depinning of bacterial droplets: The collective surfing of *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(23):5958-5963.

- Hennes M, Tailleux J, Charron G, Daerr A (2017b) Reply to Kovacs et al.: Surfing or sliding: The act of naming and its implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(42):E8803-E8804.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews* 36(4):478-503.
- Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Camara M, Williams P, Haas D (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 186(10):2936-2945.
- Hickman JW & Harwood CS (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology* 69(2):376-389.
- Hitchens AP & Leikind MC (1939) The Introduction of Agar-agar into Bacteriology. *Journal of Bacteriology* 37(5):485-493.
- Hmelo LR, Borlee BR, Almlad H, Love ME, Randall TE, Tseng BS, Lin C, Irie Y, Storek KM, Yang JJ, Siehnel RJ, Howell PL, Singh PK, Tolker-Nielsen T, Parsek MR, Schweizer HP, Harrison JJ (2015) Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nature Protocols* 10(11):1820-1841.
- Holscher T & Kovacs AT (2017) Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environmental Microbiology* 19(7):2537-2545.
- Horna G & Ruiz J (2021) Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research* 246:126719.
- Hsu JL, Chen HC, Peng HL, Chang HY (2008) Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Biological Chemistry* 283(15):9933-9944.
- Huang H, Shao X, Xie Y, Wang T, Zhang Y, Wang X, Deng X (2019) An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 10(1):2931.
- Huangyutitham V, Guvener ZT, Harwood CS (2013) Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. *MBio* 4(3):e00242-00213.
- Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S, Eberl L (2001) The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology (Reading)* 147(Pt 9):2517-2528.
- Huber P (2022) ExlA: A New Contributor to *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 12:929150.
- Imberty A, Wimmerová M, Mitchell EP, Gilboa-Garber N (2004) Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes and Infection* 6(2):221-228.
- Ingham CJ, Kalisman O, Finkelshtein A, Ben-Jacob E (2011) Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium *Paenibacillus vortex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(49):19731-19736.

- Irie Y, Murina V, Hauryliuk V, Shingler V (2019) Hfq-assisted RsmA regulation is central to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm polysaccharide PEL expression. *bioRxiv* 10.1101/434555:434555.
- Irie Y, Starkey M, Edwards AN, Wozniak DJ, Romeo T, Parsek MR (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Molecular Microbiology* 78(1):158-172.
- Ishii E & Eguchi Y (2021) Diversity in Sensing and Signaling of Bacterial Sensor Histidine Kinases. *Biomolecules* 11(10).
- Jacobsen T, Bardiaux B, Francetic O, Izadi-Pruneyre N, Nilges M (2020) Structure and function of minor pilins of type IV pili. *Med Microbiol Immunol* 209(3):301-308.
- Jain R, Anjaiah V, Babbar SB (2005) Guar gum: a cheap substitute for agar in microbial culture media. *Letters in Applied Microbiology* 41(4):345-349.
- Janssen KH, Diaz M, Gode CJ, Wolfgang MC, Yahr TL (2018a) RsmV a small non-coding regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* that sequesters RsmA and RsmF from target mRNAs. 10.1101/315341.
- Janssen KH, Diaz MR, Golden M, Graham JW, Sanders W, Wolfgang MC, Yahr TL (2018b) Functional Analyses of the *RsmY* and *RsmZ* Small Noncoding Regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 200(11).
- Jean-Pierre F (2017) *Caractérisation de la régulation de la motilité de type swarming et des différences génétiques associées à la croissance bactérienne en surface ou en bouillon chez Pseudomonas aeruginosa*. Ph.D. (Université du Québec, Québec). 214 p
- Jean-Pierre F, Perreault J, Déziel E (2015) Complex autoregulation of the post-transcriptional regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 161(9):1889-1896.
- Jean-Pierre F, Tremblay J, Déziel E (2016) Broth versus Surface-Grown Cells: Differential Regulation of *RsmY/Z* Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB System. *Frontiers in Microbiology* 7:2168.
- Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thogersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagensen JA, Hoiby N, Molin S (2007) Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 75(5):2214-2224.
- Jiang F, Waterfield NR, Yang J, Yang G, Jin Q (2014) A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host & Microbe* 15(5):600-610.
- Jing X, Jaw J, Robinson HH, Schubot FD (2010) Crystal structure and oligomeric state of the RetS signaling kinase sensory domain. *Proteins* 78(7):1631-1640.
- Johnson S, Furlong EJ, Deme JC, Nord AL, Caesar JJE, Chevance FFV, Berry RM, Hughes KT, Lea SM (2021) Molecular structure of the intact bacterial flagellar basal body. *Nat Microbiol* 6(6):712-721.
- Jones AM (2019) Which pathogens should we worry about? *Paediatric Respiratory Reviews* 31:15-17.
- Julkowska D, Obuchowski M, Holland IB, Seror SJ (2004) Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology (Reading)* 150(Pt 6):1839-1849.

- Kamatkar NG & Shrout JD (2011) Surface hardness impairment of quorum sensing and swarming for *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* 6(6):e20888.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews: Microbiology* 8(9):634-644.
- Kearns DB, Chu F, Rudner R, Losick R (2004) Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Molecular Microbiology* 52(2):357-369.
- Kessler C, Mhatre E, Cooper V, Kim W (2021) Evolutionary Divergence of the Wsp Signal Transduction Systems in Beta- and Gammaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 87(22):e0130621.
- Kilmury SLN & Burrows LL (2018) The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR Two-Component System Regulates Both Twitching and Swimming Motilities. *MBio* 9(4).
- Kim SK & Lee JH (2016) Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology* 54(2):71-85.
- Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechere JC (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology* 182(21):5990-5996.
- Kollaran AM, Joge S, Kotian HS, Badal D, Prakash D, Mishra A, Varma M, Singh V (2019) Context-Specific Requirement of Forty-Four Two-Component Loci in *Pseudomonas aeruginosa* Swarming. *iScience* 13:305-317.
- Kong W, Chen L, Zhao J, Shen T, Surette MG, Shen L, Duan K (2013) Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Molecular Microbiology* 88(4):784-797.
- Korniakova V, Devinck A, Groleau MC, Déziel E, Perreault J (2021) Fluoride-Controlled Riboswitch-Based Dampening of Gene Expression for Cloning Potent Promoters. *Front Genet* 12:591543.
- Kovacs AT, Grau R, Pollitt EJG (2017) Surfing of bacterial droplets: *Bacillus subtilis* sliding revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(42):E8802.
- Kulasekara HD, Ventre I, Kulasekara BR, Lazdunski A, Filloux A, Lory S (2005) A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Molecular Microbiology* 55(2):368-380.
- Lai S, Tremblay J, Déziel E (2009) Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology* 11(1):126-136.
- Landry M (2018) *Avantages d'utiliser la motilité de type swarming chez la bactérie Pseudomonas aeruginosa*. Master's (Institut National de la Recherche Scientifique). 115 p
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10(3):R25.
- Lapouge K, Schubert M, Allain FH, Haas D (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology* 67(2):241-253.
- Latour X (2020) The Evanescent GacS Signal. *Microorganisms* 8(11).

- Laville J, Voisard C, Keel C, Maurhofer M, Defago G, Haas D (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(5):1562-1566.
- Lee CK, de Anda J, Baker AE, Bennett RR, Luo Y, Lee EY, Keefe JA, Helali JS, Ma J, Zhao K, Golestanian R, O'Toole GA, Wong GCL (2018) Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(17):4471-4476.
- Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG, Ausubel FM (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology* 7(10):R90.
- Lee J & Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6(1):26-41.
- Lee K & Yoon SS (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol* 27(6):1053-1064.
- Leech AJ & Mattick JS (2006) Effect of site-specific mutations in different phosphotransfer domains of the chemosensory protein ChpA on *Pseudomonas aeruginosa* motility. *Journal of Bacteriology* 188(24):8479-8486.
- Leinweber A, Fredrik Inglis R, Kummerli R (2017) Cheating fosters species co-existence in well-mixed bacterial communities. *ISME J* 11(5):1179-1188.
- LeRoux M, Kirkpatrick RL, Montauti EI, Tran BQ, Peterson SB, Harding BN, Whitney JC, Russell AB, Traxler B, Goo YA, Goodlett DR, Wiggins PA, Mougous JD (2015) Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *Elife* 4.
- Lestic B, Starkey M, He J, Hazan R, Rahme LG (2009) Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* 155(Pt 9):2845-2855.
- Lewenza S, Visser MB, Sokol PA (2002) Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* 48(8):707-716.
- Li Y, Chen L, Zhang P, Bhagirath AY, Duan K (2020) ClpV3 of the H3-Type VI Secretion System (H3-T6SS) Affects Multiple Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* 11:1096.
- Li Y, Heine S, Entian M, Sauer K, Frankenberg-Dinkel N (2013) NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *Journal of Bacteriology* 195(16):3531-3542.
- Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8):2833-2838.
- Lin J, Zhang W, Cheng J, Yang X, Zhu K, Wang Y, Wei G, Qian PY, Luo ZQ, Shen X (2017) A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nat Commun* 8:14888.
- Lindenbaum P (2015) Jvarkit: java utilities for bioinformatics. *GitHub*.

- Lipuma JJ (2010) The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2):299-323.
- Lizewski SE, Lundberg DS, Schurr MJ (2002) The transcriptional regulator *AlgR* is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 70(11):6083-6093.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12):550.
- Ma GL, Chandra H, Liang ZX (2020) Taming the flagellar motor of pseudomonads with a nucleotide messenger. *Environmental Microbiology* 22(7):2496-2513.
- Ma H, Bell J, Chen W, Mani S, Tang JX (2021) An expanding bacterial colony forms a depletion zone with growing droplets. *Soft Matter* 17(8):2315-2326.
- Ma J, Campbell A, Karlin S (2002) Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *Journal of Bacteriology* 184(20):5733-5745.
- Maier B, Potter L, So M, Long CD, Seifert HS, Sheetz MP (2002) Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25):16012-16017.
- Mancl JM, Ray WK, Helm RF, Schubot FD (2019) Helix Cracking Regulates the Critical Interaction between RetS and GacS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* 27(5):785-793 e785.
- Marden JN, Diaz MR, Walton WG, Gode CJ, Betts L, Urbanowski ML, Redinbo MR, Yahr TL, Wolfgang MC (2013) An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(37):15055-15060.
- Martinez P, Huedo P, Martinez-Servat S, Planell R, Ferrer-Navarro M, Daura X, Yero D, Gibert I (2015) *Stenotrophomonas maltophilia* responds to exogenous AHL signals through the LuxR solo SmoR (Smlt1839). *Front Cell Infect Microbiol* 5:41.
- Martinez S, Humery A, Groleau MC, Deziel E (2020) Quorum Sensing Controls Both Rhamnolipid and Polyhydroxyalkanoate Production in *Burkholderia thailandensis* Through ScmR Regulation. *Front Bioeng Biotechnol* 8:1033.
- Matsui H, Sano Y, Ishihara H, Shinomiya T (1993) Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. *Journal of Bacteriology* 175(5):1257-1263.
- Matsuyama T, Kaneda K, Ishizuka I, Toida T, Yano I (1990) Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. *Journal of Bacteriology* 172(6):3015-3022.
- McCarter LL & Gomelsky M (2015) Fifty ways to inhibit motility via cyclic di-GMP: the emerging *Pseudomonas aeruginosa* swarming story. *Journal of Bacteriology* 197(3):406-409.
- Meissner A, Wild V, Simm R, Rohde M, Erck C, Bredenbruch F, Morr M, Romling U, Haussler S (2007) *Pseudomonas aeruginosa* cupA-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate. *Environmental Microbiology* 9(10):2475-2485.
- Mikkelsen H, Ball G, Giraud C, Filloux A (2009) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS One* 4(6):e6018.

- Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A (2011a) The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* 6(12):e29113.
- Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A (2011b) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 13(7):1666-1681.
- Miller CL, Romero M, Karna SL, Chen T, Heeb S, Leung KP (2016) RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiology* 16(1):155.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BH (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:39.
- Morales-Soto N, Anyan ME, Mattingly AE, Madukoma CS, Harvey CW, Alber M, Déziel E, Kearns DB, Shrout JD (2015) Preparation, imaging, and quantification of bacterial surface motility assays. *J Vis Exp* 10.3791/52338(98).
- Morin C (2019) *Identification des mécanismes de surexpression du petit ARN RsmZ lorsque Pseudomonas aeruginosa se développe sur une surface*. Master of Sciences (Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, Quebec, Canada). 128 p
- Morin C, Landry M, Groleau MC, Déziel E (2022) Surface Motility Favors Codependent Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *mSphere* 7(4):e0015322.
- Morin CD & Déziel E (2021) Use of Alternative Gelling Agents Reveals the Role of Rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* Surface Motility. *Biomolecules* 11(10).
- Morin CD, Déziel E, Gauthier J, Levesque RC, Lau GW (2021) An Organ System-Based Synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Virulence* 12(1):1469-1507.
- Moscoso JA, Jaeger T, Valentini M, Hui K, Jenal U, Filloux A (2014) The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 196(23):4081-4088.
- Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environmental Microbiology* 13(12):3128-3138.
- Murray TS & Kazmierczak BI (2006) FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 188(19):6995-7004.
- Murray TS & Kazmierczak BI (2008) *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *Journal of Bacteriology* 190(8):2700-2708.
- Naghdi MR, Smail K, Wang JX, Wade F, Breaker RR, Perreault J (2017) Search for 5'-leader regulatory RNA structures based on gene annotation aided by the RiboGap database. *Methods* 117:3-13.
- Nickzad A, Lepine F, Déziel E (2015) Quorum Sensing Controls Swarming Motility of *Burkholderia glumae* through Regulation of Rhamnolipids. *PLoS One* 10(6):e0128509.
- Nishizuka H & Hashidoko Y (2018) Comparison of Nostoccean hormogonium induction and its motility on solid plates between agar and gellan gum at varying gel matrix concentrations. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 82(3):525-531.
- Norris MH, Kang Y, Wilcox B, Hoang TT (2010) Stable, site-specific fluorescent tagging constructs optimized for *Burkholderia* species. *Appl Environ Microbiol* 76(22):7635-7640.

- Nyonyo T, Shinkai T, Tajima A, Mitsumori M (2013) Effect of media composition, including gelling agents, on isolation of previously uncultured rumen bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 56(1):63-70.
- O'Brien S & Fothergill JL (2017) The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiology Letters* 364(15).
- O'Connor JR, Kuwada NJ, Huangyutitham V, Wiggins PA, Harwood CS (2012) Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Molecular Microbiology* 86(3):720-729.
- O'Neal L, Baraquet C, Suo Z, Dreifus JE, Peng Y, Raivio TL, Wozniak DJ, Harwood CS, Parsek MR (2022) The Wsp system of *Pseudomonas aeruginosa* links surface sensing and cell envelope stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119(18):e2117633119.
- O'Toole GA & Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30(2):295-304.
- Ochoa-Loza FJ, Artiola JF, Maier RM (2001) Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *J Environ Qual* 30(2):479-485.
- Ochsner UA, Hembach T, Fiechter A (1996) Production of rhamnolipid biosurfactants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 53:89-118.
- Ochsner UA & Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(14):6424-6428.
- Oglesby-Sherrouse AG & Vasil ML (2010) Characterization of a heme-regulated non-coding RNA encoded by the *prfF* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* 5(4):e9930.
- Oglesby AG, Farrow JM, 3rd, Lee JH, Tomaras AP, Greenberg EP, Pesci EC, Vasil ML (2008) The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *Journal of Biological Chemistry* 283(23):15558-15567.
- Ono K, Oka R, Toyofuku M, Sakaguchi A, Hamada M, Yoshida S, Nomura N (2014) cAMP signaling affects irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbes Environ* 29(1):104-106.
- Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock RE (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology* 190(8):2671-2679.
- Penterman J, Singh PK, Walker GC (2014) Biological cost of pyocin production during the SOS response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 196(18):3351-3359.
- Persat A, Inclan YF, Engel JN, Stone HA, Gitai Z (2015) Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(24):7563-7568.
- Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Haas D, Williams P (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 183(22):6676-6683.

- Petrova OE & Sauer K (2010) The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA rsmZ through CafA. *Journal of Bacteriology* 192(20):5275-5288.
- Phippen CW, Mikolajek H, Schlaefli HG, Keevil CW, Webb JS, Tews I (2014) Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. *FEBS Letters* 588(24):4631-4636.
- Ping L, Wu Y, Hosu BG, Tang JX, Berg HC (2014) Osmotic pressure in a bacterial swarm. *Biophysical Journal* 107(4):871-878.
- Price KE, Hampton TH, Gifford AH, Dolben EL, Hogan DA, Morrison HG, Sogin ML, O'Toole GA (2013) Unique microbial communities persist in individual cystic fibrosis patients throughout a clinical exacerbation. *Microbiome* 1(1):27.
- Qian C, Wong CC, Swarup S, Chiam KH (2013) Bacterial tethering analysis reveals a "run-reverse-turn" mechanism for *Pseudomonas* species motility. *Appl Environ Microbiol* 79(15):4734-4743.
- Qiu X, Gurkar AU, Lory S (2006) Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(52):19830-19835.
- Quentin D, Ahmad S, Shanthamoorthy P, Mougous JD, Whitney JC, Raunser S (2018) Mechanism of loading and translocation of type VI secretion system effector Tse6. *Nat Microbiol* 3(10):1142-1152.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219):1899-1902.
- Rashid MH & Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(9):4885-4890.
- Reinhart AA, Powell DA, Nguyen AT, O'Neill M, Djapgne L, Wilks A, Ernst RK, Oglesby-Sherrouse AG (2015) The *prfF*-encoded small regulatory RNAs are required for iron homeostasis and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 83(3):863-875.
- Rich JJ, Kinscherf TG, Kitten T, Willis DK (1994) Genetic-Evidence That the *gacA* Gene Encodes the Cognate Response Regulator for the Lema Sensor in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology* 176(24):7468-7475.
- Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Hoiby N, Givskov M, Molin S, Eberl L (2001) N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology (Reading)* 147(Pt 12):3249-3262.
- Robinson GE, Fernald RD, Clayton DF (2008) Genes and social behavior. *Science* 322(5903):896-900.
- Robitaille S (2020) *Une nouvelle perspective sur les facteurs favorisant la motilité de type swarming chez la bactérie Pseudomonas aeruginosa*. PhD (Institut National de la Recherche Scientifique, Laval (QC), Canada).
- Robitaille S, Groleau MC, Deziel E (2020a) Swarming motility growth favours the emergence of a subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutants. *Environmental Microbiology* 22(7):2892-2906.

- Robitaille S, Santos YLdl, Groleau M-C, Jean-Pierre F, Doucet N, Perreault J, Déziel E (2020b) An experimentally evolved variant of RsmA confirms its central role in the control of *Pseudomonas aeruginosa* social motility. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.203992>.
- Rojo F (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* 34(5):658-684.
- Romero M, Silistre H, Lovelock L, Wright VJ, Chan KG, Hong KW, Williams P, Camara M, Heeb S (2018) Genome-wide mapping of the RNA targets of the *Pseudomonas aeruginosa* riboregulatory protein RsmN. *Nucleic Acids Research* 46(13):6823-6840.
- Roy AB, Petrova OE, Sauer K (2012) The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. *Journal of Bacteriology* 194(11):2904-2915.
- Rudra B, Duncan L, Shah AJ, Shah HN, Gupta RS (2022) Phylogenomic and comparative genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: proposal to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraaeruginosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 72(11).
- Sahay S (1999) The use of psyllium (isubgol) as an alternative gelling agent for microbial culture media. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15(6):733-735.
- Samad T, Billings N, Birjiniuk A, Crouzier T, Doyle PS, Ribbeck K (2017) Swimming bacteria promote dispersal of non-motile staphylococcal species. *ISME J* 11(8):1933-1937.
- Sana TG, Berni B, Bleves S (2016) The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol* 6:61.
- Sangermani M, Hug I, Sauter N, Pfohl T, Jenal U (2019) Tad Pili Play a Dynamic Role in *Caulobacter crescentus* Surface Colonization. *MBio* 10(3).
- Schaffer JN & Pearson MM (2015) *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr* 3(5).
- Schellenberger R, Crouzet J, Nickzad A, Shu LJ, Kutschera A, Gerster T, Borie N, Dawid C, Cloutier M, Villaume S, Dhondt-Cordelier S, Hubert J, Cordelier S, Mazeyrat-Gourbeyre F, Schmid C, Ongena M, Renault JH, Haudrechy A, Hofmann T, Baillieux F, Clement C, Zipfel C, Gauthier C, Deziel E, Ranf S, Dorey S (2021) Bacterial rhamnolipids and their 3-hydroxyalkanoate precursors activate Arabidopsis innate immunity through two independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(39).
- Schirm M, Arora SK, Verma A, Vinogradov E, Thibault P, Ramphal R, Logan SM (2004) Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 186(9):2523-2531.
- Schubert M, Lapouge K, Duss O, Oberstrass FC, Jelesarov I, Haas D, Allain FH (2007) Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nature Structural & Molecular Biology* 14(9):807-813.
- Scribner MR, Stephens AC, Huong JL, Richardson AR, Cooper VS (2022) The nutritional environment is sufficient to select coexisting biofilm and quorum-sensing mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 10.1128/JB.00444-21:JB0044421.
- Shrout JD (2015) A fantastic voyage for sliding bacteria. *Trends in Microbiology* 23(5):244-246.

- Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M,Parsek MR (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology* 62(5):1264-1277.
- Silby MW, Cerdeno-Tarraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM, Zhang XX, Moon CD, Gehrig SM, Godfrey SA, Knight CG, Malone JG, Robinson Z, Spiers AJ, Harris S, Challis GL, Yaxley AM, Harris D, Seeger K, Murphy L, Rutter S, Squares R, Quail MA, Saunders E, Mavromatis K, Brettin TS, Bentley SD, Hothersall J, Stephens E, Thomas CM, Parkhill J, Levy SB, Rainey PB,Thomson NR (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* 10(5):R51.
- Silversmith RE, Wang B, Fulcher NB, Wolfgang MC,Bourret RB (2016) Phosphoryl Group Flow within the *Pseudomonas aeruginosa* Pil-Chp Chemosensory System: DIFFERENTIAL FUNCTION OF THE EIGHT PHOSPHOTRANSFERASE AND THREE RECEIVER DOMAINS. *Journal of Biological Chemistry* 291(34):17677-17691.
- Soberon-Chavez G, Lepine F,Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68(6):718-725.
- Sobrero PM & Valverde C (2020) Comparative Genomics and Evolutionary Analysis of RNA-Binding Proteins of the CsrA Family in the Genus *Pseudomonas*. *Front Mol Biosci* 7:127.
- Song S, Guo Y, Kim JS, Wang X,Wood TK (2019) Phages Mediate Bacterial Self-Recognition. *Cell Reports* 27(3):737-749 e734.
- Sonnleitner E & Blasi U (2014) Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genetics* 10(6):e1004440.
- Sonnleitner E, Prindl K,Blasi U (2017) The *Pseudomonas aeruginosa* CrcZ RNA interferes with Hfq-mediated riboregulation. *PLoS One* 12(7):e0180887.
- Sonnleitner E, Wulf A, Campagne S, Pei XY, Wolfinger MT, Forlani G, Prindl K, Abdou L, Resch A, Allain FH, Luisi BF, Urlaub H,Blasi U (2018) Interplay between the catabolite repression control protein Crc, Hfq and RNA in Hfq-dependent translational regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research* 46(3):1470-1485.
- Sorger-Domenigg T, Sonnleitner E, Kaberdin VR,Blasi U (2007) Distinct and overlapping binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq and RsmA proteins on the non-coding RNA *RsmY*. *Biochem Biophys Res Commun* 352(3):769-773.
- Spangenberg C, Heuer T, Burger C,Tummler B (1996) Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters* 396(2-3):213-217.
- Spormann AM (1999) Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3):621-641.
- Srinivasan S, Kaplan CN,Mahadevan L (2019) A multiphase theory for spreading microbial swarms and films. *Elife* 8.
- Stott MB, Crowe MA, Mountain BW, Smirnova AV, Hou S, Alam M,Dunfield PF (2008) Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environmental Microbiology* 10(8):2030-2041.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S,Olson MV (2000)

- Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-964.
- Sun E, Liu S, Hancock REW (2018) Surfing Motility: a Conserved yet Diverse Adaptation among Motile Bacteria. *Journal of Bacteriology* 200(23).
- Takhar HK, Kemp K, Kim M, Howell PL, Burrows LL (2013) The platform protein is essential for type IV pilus biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 288(14):9721-9728.
- Tamaki H, Hanada S, Sekiguchi Y, Tanaka Y, Kamagata Y (2009) Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environmental Microbiology* 11(7):1827-1834.
- Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, Kamagata Y (2005) Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl Environ Microbiol* 71(4):2162-2169.
- Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, Manoharan K, Daubaras M, Burrows LL, Howell PL (2013) PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. *Journal of Bacteriology* 195(10):2126-2135.
- Tan J, Zhang X, Wang X, Xu C, Chang S, Wu H, Wang T, Liang H, Gao H, Zhou Y, Zhu Y (2021) Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor. *Cell* 184(10):2665-2679 e2619.
- Tian M, Wu Z, Zhang R, Yuan J (2022) A new mode of swimming in singly flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119(14):e2120508119.
- Tomlin KL, Coll OP, Ceri H (2001) Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Canadian Journal of Microbiology* 47(10):949-954.
- Toutain CM, Zegans ME, O'Toole GA (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 187(2):771-777.
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N (2016) Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80(1):7-12.
- Tremblay J (2007) *Caractérisation de la motilité de type «swarming» chez Pseudomonas aeruginosa*. (Université du Québec, Québec). 198 p. p
- Tremblay J (2011) *Caractérisation de la motilité de type Swarming chez Pseudomonas aeruginosa*. Doctorat en biologie (Université du Québec, Québec). xvi, 258 p. p. Accès au document <http://espace.inrs.ca/id/eprint/302>
- Tremblay J & Déziel E (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of Basic Microbiology* 48(6):509-515.
- Tremblay J & Déziel E (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 11:587.
- Tremblay J, Richardson AP, Lépine F, Déziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental Microbiology* 9(10):2622-2630.
- Trinschek S, John K, Thiele U (2018) Modelling of surfactant-driven front instabilities in spreading bacterial colonies. *Soft Matter* 14(22):4464-4476.

- Troselj V, Cao P, Wall D (2018) Cell-cell recognition and social networking in bacteria. *Environmental Microbiology* 20(3):923-933.
- Tuanyok A, Mayo M, Scholz H, Hall CM, Allender CJ, Kaestli M, Ginther J, Spring-Pearson S, Bollig MC, Stone JK, Settles EW, Busch JD, Sidak-Loftis L, Sahl JW, Thomas A, Kreutzer L, Georgi E, Gee JE, Bowen RA, Ladner JT, Lovett S, Koroleva G, Palacios G, Wagner DM, Currie BJ, Keim P (2017) *Burkholderia humptydooensis* sp. nov., a New Species Related to *Burkholderia thailandensis* and the Fifth Member of the *Burkholderia pseudomallei* Complex. *Appl Environ Microbiol* 83(5).
- Turkina MV & Vikstrom E (2019) Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Innate Immunity* 11(3):263-279.
- Usov AI (1998) Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids* 12(3):301-308.
- Valentini M & Filloux A (2016) Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 291(24):12547-12555.
- Valentini M, Garcia-Maurino SM, Perez-Martinez I, Santero E, Canosa I, Lapouge K (2014) Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology* 160(Pt 10):2243-2252.
- Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA, Filloux A (2018) Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology* 41:15-20.
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(12):6911-6916.
- Valverde C, Heeb S, Keel C, Haas D (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology* 50(4):1361-1379.
- van de Velde F, Lourenco ND, Pinheiro HM, Bakker M (2002) Carrageenan: A food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. *Advanced Synthesis & Catalysis* 344(8):815-835.
- van Ditmarsch D, Boyle KE, Sakhtah H, Oyler JE, Nadell CD, Deziel E, Dietrich LE, Xavier JB (2013) Convergent evolution of hyperswarming leads to impaired biofilm formation in pathogenic bacteria. *Cell Reports* 4(4):697-708.
- van Gestel J & Kolter R (2019) When We Stop Thinking about Microbes as Cells. *Journal of Molecular Biology* 431(14):2487-2492.
- Venturi V, Bertani I, Kerenyi A, Netotea S, Pongor S (2010) Co-swarming and local collapse: quorum sensing conveys resilience to bacterial communities by localizing cheater mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 5(4):e9998.
- Verma A, Arora SK, Kuravi SK, Ramphal R (2005) Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect Immun* 73(12):8237-8246.

- Verma A, Schirm M, Arora SK, Thibault P, Logan SM, Ramphal R (2006) Glycosylation of b-Type flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: structural and genetic basis. *Journal of Bacteriology* 188(12):4395-4403.
- Vial L, Chapalain A, Groleau MC, Deziel E (2011) The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environmental Microbiology* 13(1):1-12.
- Vincent AT, Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG, Leduc A, Boyle B, Jean-Pierre F, Groleau MC, Deziel 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 Microbiology Ecology* 93(9).
- Vincent F, Round A, Reynaud A, Bordi C, Filloux A, Bourne Y (2010) Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environmental Microbiology* 12(6):1775-1786.
- Waksman G & Hultgren SJ (2009) Structural biology of the chaperone-usheer pathway of pilus biogenesis. *Nature Reviews: Microbiology* 7(11):765-774.
- Wang BX, Wheeler KM, Cady KC, Lehoux S, Cummings RD, Laub MT, Ribbeck K (2021) Mucin Glycans Signal through the Sensor Kinase RetS to Inhibit Virulence-Associated Traits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Biology* 31(1):90-102 e107.
- Wang S, Yu S, Zhang Z, Wei Q, Yan L, Ai G, Liu H, Ma LZ (2014) Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 80(21):6724-6732.
- Wettstadt S, Wood TE, Fecht S, Filloux A (2019) Delivery of the *Pseudomonas aeruginosa* Phospholipase Effectors PldA and PldB in a VgrG- and H2-T6SS-Dependent Manner. *Frontiers in Microbiology* 10:1718.
- Whitney JC, Beck CM, Goo YA, Russell AB, Harding BN, De Leon JA, Cunningham DA, Tran BQ, Low DA, Goodlett DR, Hayes CS, Mougous JD (2014) Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Molecular Microbiology* 92(3):529-542.
- Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26):9792-9797.
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE (2007) The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 189(18):6695-6703.
- Williams McMackin EA, Djapgne L, Corley JM, Yahr TL (2019) Fitting Pieces into the Puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Gene Expression. *Journal of Bacteriology* 201(13).
- Willis D, Hrabak E, Rich J, Barta T, Lindow S, Panopoulos N (1990) Isolation and characterization of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mutant deficient in lesion formation on bean. *Molecular plant-microbe interactions* 3(3):149-156.
- Wood TE, Howard SA, Wettstadt S, Filloux A (2019) PAAR proteins act as the 'sorting hat' of the type VI secretion system. *Microbiology (Reading)* 165(11):1203-1218.

- Workentine ML, Chang L, Ceri H, Turner RJ (2009) The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiology Letters* 292(1):50-56.
- Xiong L, Cao Y, Cooper R, Rappel WJ, Hasty J, Tsimring L (2020) Flower-like patterns in multi-species bacterial colonies. *Elife* 9.
- Yan J, Monaco H, Xavier JB (2019) The Ultimate Guide to Bacterial Swarming: An Experimental Model to Study the Evolution of Cooperative Behavior. *Annual Review of Microbiology* 73:293-312.
- Yang A, Tang WS, Si T, Tang JX (2017) Influence of Physical Effects on the Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal* 112(7):1462-1471.
- Yang L, Jelsbak L, Molin S (2011) Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. *Environmental Microbiology* 13(7):1682-1689.
- Yang XY, Li ZQ, She Z, Geng Z, Xu JH, Gao ZQ, Dong YH (2016) Structural analysis of *Pseudomonas aeruginosa* H3-T6SS immunity proteins. *FEBS Letters* 590(16):2787-2796.
- Yeung AT, Parayno A, Hancock RE (2012) Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 3(3).
- Zeigler DR, Pragai Z, Rodriguez S, Chevreux B, Muffler A, Albert T, Bai R, Wyss M, Perkins JB (2008) The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *Journal of Bacteriology* 190(21):6983-6995.
- Zhao K, Tseng BS, Beckerman B, Jin F, Gibiansky ML, Harrison JJ, Luijten E, Parsek MR, Wong GCL (2013) Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 497(7449):388-391.
- Zheng J, Feng JQ, Zhou L, Mbadanga SM, Gu JD, Mu BZ (2018) Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium. *World J Microbiol Biotechnol* 34(2):34.
- Zhou T, Huang J, Liu Z, Xu Z, Zhang LH (2021) Molecular Mechanisms Underlying the Regulation of Biofilm Formation and Swimming Motility by FleS/FleR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* 12:707711.
- Zhu K & Rock CO (2008) RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 190(9):3147-3154.
- Zhu S, Schniederberend M, Zhitnitsky D, Jain R, Galan JE, Kazmierczak BI, Liu J (2019) In Situ Structures of Polar and Lateral Flagella Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Journal of Bacteriology* 201(13).

10 ANNEXE I

10.1 Publications

Morin C & Déziel E (2019) *Identification des mécanismes de surexpression du petit ARN RsmZ lorsque Pseudomonas aeruginosa se développe sur une surface*. Master of Sciences (Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, Quebec, Canada). 128 p

Morin CD, Deziel E, Gauthier J, Levesque RC, Lau GW (2021) An Organ System-Based Synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Virulence* 12(1):1469-1507.

Morin CD & Deziel E (2021) Use of Alternative Gelling Agents Reveals the Role of Rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* Surface Motility. *Biomolecules* 11(10).

Morin C, Landry M, Groleau MC, Deziel E (2022) Surface Motility Favors Codependent Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *mSphere* 7(4):e0015322.

10.2 Communication

Charles Morin et Eric Déziel. (Juin 2019). Identification of a novel mechanism of the surface-induced overexpression of *RsmZ* in *Pseudomonas aeruginosa*. 69th Annual CSM Conference. Sherbrooke, Qc, Canada. Affiche (Travaux de maîtrise)

Charles Morin et Eric Déziel. (Novembre 2019). De nouveaux comportements de surface adoptés par *Pseudomonas aeruginosa* sont révélés par l'utilisation d'agents gélifiants alternatifs. Congrès Armand-Frappier. Saint-Sauveur, Qc, Canada. Affiche

Charles Morin, May Landry et Eric Déziel. (Juin 2021) Cooperative Social Behaviour between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. World Microbe Forum. Conférence virtuelle. Oral

Charles Morin, May Landry et Eric Déziel (Juin 2021) *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* cooperate during swarming motility. 70th Annual CSM Conference. Conférence virtuelle. Affiche

Charles Morin, May Landry et Eric Déziel. (Novembre 2021) Interactions sociales coopératives entre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia*. Congrès Armand-Frappier. Conférence virtuelle. Affiche.

Charles Morin et Eric Déziel. (Avril 2022). Use of alternative gelling agents highlights the role of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* surface motility. Pseudomonas conference. Atlanta, Ga, USA. Affiche

11 ANNEXE II

Table 11.1 Résultats supplémentaire de l'article 3: Liste de toutes les cibles statistiquement enrichies par RsmA comparativement au contrôle non traité.

Locus_tag PA14	P-value¹	Locus_tag PAO1	Gene data	ChIPPAR- seq²	Found in RsmN ChIP-seq³	Found in UV-ClIP- seq⁴	Found in at least one
PA14_01140	2.08E-38	PA0093	<i>tse6</i>	oui	non	non	oui
PA14_63940	2.22E-35	PA4836	<i>cntL</i>	non	non	non	non
PA14_35800	3.31E-32	N/A	Hypothetical protein	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_16200	9.76E-30	PA3727	Hypothetical protein	oui	non	oui	oui
PA14_32480	2.71E-29	PA2486	<i>ptrC</i>	non	non	non	non
PA14_41170	3.63E-21	PA1806	<i>fabI</i>	non	non	non	non
PA14_36375	6.86E-20	PA2180	Hypothetical protein	non	non	non	non
PA14_42900	3.35E-18	PA1669	<i>icmF2</i>	non	oui	non	oui
PA14_07380	2.99E-17	PA0568	Hypothetical protein	non	non	non	non
PA14_72180	6.12E-15	PA5469	<i>terC</i>	non	non	non	non
PA14_00760	9.39E-14	PA0064	Hypothetical protein	oui	non	non	oui
PA14_08460	9.39E-14	PA0660	Hypothetical protein	non	non	non	non

PA14_13690	2.17E-13	PA3882	Probable methyltransferase	non	non	non	non
PA14_70360	8.03E-12	PA5330	Hypothetical protein	oui	non	non (lie RsmN)	oui
PA14_35780	8.13E-11	N/A	Hypothetical protein	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_23930	1.82E-10	PA3107	<i>metZ</i>	non	non	non	non
PA14_49780	5.71E-10	PA1129	<i>fosA</i>	non	non	non	non
PA14_45700	3.1E-09	PA1451	Hypothetical, flagellar cluster	oui	non	oui	oui
PA14_69840	4.09E-09	PA5290	Probable magnesium chelatase	oui	oui	oui	oui
PA14_02130	1.13E-08	PA0170	<i>siaC</i>	non	oui	non	oui
PA14_31820	1.22E-08	PA2531	probable aminotransferase	non	oui	non	oui
PA14_04340	1.69E-08	PA0333	Hypothetical protein	oui	non	non	oui
PA14_50570	3.93E-08	PA1069	Hypothetical protein	oui	non	oui	oui
PA14_02960	5E-08	PA0238	Hypothetical protein	non	non	non	non
PA14_44640	9.42E-08	PA1531	Hypothetical protein	non	non	non	non
PA14_16180	1.31E-07	PA3729	conserved hypothetical	non	non	oui	oui
PA14_34110	1.57E-07	PA2362	dotU3	non	non	non	non

PA14_28940	3.99E-07	PA2723	hypothetical	oui	non	oui	oui
PA14_02830	8.58E-07	PA0230	<i>pcaB</i>	non	non	non	non
PA14_69620	9.02E-07	PA5273	Hypothetical protein	oui	non	oui	oui
PA14_16780	1.39E-06	PA3679	hypothetical cytochrome p450-like	oui	non	non	oui
PA14_26690	2.04E-06	PA2890	<i>atuE</i>	non	non	non	non
PA14_42950	5.96E-06	PA1665	<i>pha2</i>	non	non	oui	oui
PA14_64680	1.53E-05	PA4894	<i>ureJ</i>	non	non	non	non
PA14_19630	2.7E-05	PA3438	<i>folE1</i>	non	non	non	non
PA14_19030	3.58E-05	PA3483	Upstream of Tse3 cluster	oui (confirmé dans leur étude)	oui	non	oui
PA14_73170	5.16E-05	PA5549	<i>glmS</i>	non	non	non	non
PA14_34820	5.16E-05	PA2304	regulatory protein AmbC	non	non	non	non
PA14_66790	5.16E-05	PA5054	heat shock protein HslU	oui	oui	non	oui
PA14_06310	5.26E-05	PA0484	conserved hypothetic ACT-domain protein	non	non	non	non

PA14_00660	0.000107	PA0054	conserved, RNA phosphotransferase-like	oui	non	oui	oui
PA14_25740	0.000107	PA2962	tmk	no	no	no	no
PA14_58100	0.000138	PA4477	<i>cafA</i>	no	no	no (lie RsmN)	no
PA14_01380	0.000142	PA0113	probable cytochrome c oxidase assembly factor	no	yes	no	yes
PA14_02420	0.000252	PA0193	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_29680	0.00027	PA2661	Hypothetical protein	yes	no	no	yes
PA14_00360	0.000281	PA0030	<i>cosX</i>	no	no	no	no
PA14_67140	0.000486	PA5083	<i>dguB</i>	no	no	no	no
PA14_57980	0.000544	PA4466	probable phosphoryl carrier protein	no	no	no	no
PA14_65770	0.000647	PA4976	<i>aruH, aspC</i>	no	no	no	no
PA14_10670	0.000832	PA4119	<i>aph</i>	no	no	no	no
PA14_68780	0.000895	PA5207	Probable phosphate transporter	yes	yes	no	yes
PA14_26340	0.000966	PA2916	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_01110	0.000966	PA0091	<i>vgrG1a</i>	no	no	no	no

PA14_14810	0.001677	PA3808	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_28950	0.002004	PA2722	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_50620	0.00244	PA1065	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_26210	0.002708	PA2926	hisP	no	no	no	no
PA14_40740	0.002802	N/A	Hypothetical protein	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_37965	0.003464	PA2052	cynS	no	no	no	no
PA14_24500	0.003516	PA3062	pelC	no	no	no	no
PA14_37270	0.005585	PA2112	LamB/YcsF family	no	no	no	no
PA14_36940	0.005837	N/A	hypothetic	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_56890	0.006844	PA4207	MexI	no	no	no	no
PA14_43030	0.006844	PA1658	hsiC2	no	no	no	no
PA14_54300	0.007971	PA0772	RecO DNA repair	yes	no	no	yes
PA14_66760	0.008833	PA5052	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_47900	0.010233	PA1262	MFS transporter	no	yes	no	yes
PA14_32640	0.011545	PA2474	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_25520	0.012958	PA2980	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_64370	0.013552	PA4867	ureB	no	no	no	no

PA14_27490	0.023941	PA2829	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_14060	0.023941	PA3860	Probable AMP binding protein	no	no	no	no
PA14_56660	0.026683	PA4356	XenB, xenobiotic reductase	no	no	no	no
PA14_62770	0.026838	PA4745	nusA	no	no	no	no
PA14_47970	0.033105	PA1255	LhpA, hydroxyproline epimerase	no	no	no	no
PA14_34550	0.033224	PA2325	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_51260	0.039462	PA1011	Hypothetical protein	yes	no	no	yes
PA14_69230	0.045755	PA5242	ppk	no	no	yes	yes
PA14_18140	0.061042	PA3569	mmsB, hydroxyisobutyrate dehydrogenase	no	no	no	no
PA14_19410	0.063662	PA3455	Hypothetical protein	no	no	no	no
PA14_69510	0.065127	N/A	Hypothetical protein	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_27400	0.066716	PA2838	LysR family regulator	no	no	no	no
PA14_20120	0.072155	PA3399	Hypothetical protein	yes	no	no	yes
PA14_10960	0.072155	N/A	ferredoxin oxidoreductase subunit	N/A	N/A	N/A	N/A

PA14_33380	0.075362	PA2421	Hypothetical protein		no	no	no	no
PA14_61530	0.083509	PA4651	<i>cupE4</i>		no	no	no	no
PA14_61820	0.087506	PA4673	<i>engD</i>		no	yes (antisens)	no	no
PA14_06350	0.096237	PA0488	Hypothetical protein		no	no	no	no
PA14_39320	0.099252	PA1948	ribose transporter protein		no	no	no	no
PA14_41560	0.099252	PA1779	assimilatory nitrate reductase		no	yes	no	yes

1 Les P-value sont triés de plus petit au plus élevé

2 ChiPPAR-seq par (Gebhardt *et al.*, 2020)

3 Genome-wide mapping RsmN par (Romero *et al.*, 2018)

4 UV CLIP-seq par (Chihara *et al.*, 2021)

12 ANNEXE III

Table 12.1 Liste de toutes les cibles différentiellement enrichies RsmA_{WT} vs RsmA_{R31S}.

Locus_tag PA14	Locus_tag PAO1	Fold change (log2)	P- value adjusted	Gene data from Pseudomonas.com	ChIPPAR-seq	Found in RsmN ChIP-seq	Found in UV-ClIP-seq	Found in any
PA14_70270	PA5322	2.993	2.05E-03	algC	oui	non	non	oui
PA14_08460	PA0660	2.917	2.92E-24	hypothetical (NADPH quinone reductase?)	non	non	non	non
PA14_27650	N/A	2.759	6.88E-02	hypothetical	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_59290	N/A	2.624	3.20E-02	<i>pilQ2</i> , type IV B pili	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_26690	PA2890	2.602	9.39E-15	<i>atuE</i> , enoyl-coa hydratase	non	non	non	non
PA14_26210	PA2926	2.577	1.02E-08	<i>hisP</i> , histidine transport	non	non	non	non
PA14_65250	PA4939	2.544	7.01E-02	<i>hisZ</i> , ATP phosphoribosyltransferase	non	non	oui	oui
PA14_71880	PA5444	2.542	3.54E-02	conserved hypothetic	oui	non	non	oui
PA14_32340	PA2499	2.475	4.79E-02	probable deaminase	non, reduced expression in rsmA- (Table S2)	non	non	non
PA14_10960	N/A	2.103	1.30E-05	ferredoxin oxidoreductase subunit	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_23930	PA3107	2.072	6.30E-09	<i>metZ</i> , o-succinylhomoserine sulfhydrylase	non	non	non	non
PA14_06350	PA0488	2.044	2.59E-02	conserved hypothetic	non	non	non	non
PA14_66790	PA5054	2.043	6.49E-09	heat shock protein HslU	oui	oui	non	oui
PA14_48780	PA1200	1.948	2.25E-07	conserved hypothetical	non	non	non	non
PA14_16220	PA3725	1.811	7.80E-02	<i>recJ</i> , single strand DNA exonuclease	non	non	non	non
PA14_26340	PA2916	1.787	1.52E-02	hypothetic	non, increased expression in rsmA- (Table S2)	non	non	non
PA14_58010	PA4469	1.728	3.87E-02	hypothetic	non	non	non	non
PA14_06310	PA0484	1.725	9.13E-07	conserved hypothetic ACT-domain protein	non	non	non	non

PA14_71340	PA5404	1.717	6.91E-02	hypothetic	non	non	non	non
PA14_54300	PA0772	1.708	6.81E-02	<i>recO</i> DNA repair	oui	non	non	oui
PA14_21580	PA3283	1.694	1.74E-03	conserved hypothetic	non, increased expression in rsmA- (Table S2)	oui	non	oui
PA14_53370	PA0843	1.678	6.70E-03	<i>plcR</i> , phospholipase assessorry protein	non, increased expression in rsmA- (Table S2)	non	non	non
PA14_41560	PA1779	1.673	7.42E-04	assimilatory nitrate reductase	non	oui	non	oui
PA14_47970	PA1255	1.670	1.89E-04	<i>lhpA</i> , hydroxyproline epimerase	non	non	non	non
PA14_06790	PA0521	1.638	6.83E-02	cytochrome c oxiidase (next to nir)	non	oui	non	oui
PA14_13340	PA3909	1.602	3.84E-02	extracellular nuclease EddB	non	non	non	non
PA14_18140	PA3569	1.542	7.79E-04	<i>mmsB</i> , hydroxyisobuyrate dehydrogenase	non (increased expression in rsmA (Table S2))	non	non	non
PA14_70280	PA5323	1.530	3.02E-08	<i>argB</i> , acetylglutamate kinase	non	non	oui	oui
PA14_01690	PA0138	1.527	7.68E-03	probable ABC permease	non	non	non	non
PA14_10590	PA4127	1.421	1.19E-09	<i>hpcG</i> , hydratase	non, reduced expression in rsmA- (Table S2)	non	non	non
PA14_12850	PA3944	1.377	7.42E-02	conserved hypothetic acetyltransferase	non	oui	non	oui
PA14_38710	PA1995	1.364	6.95E-02	hypothetic	non	non	non	non
PA14_28560	PA2750	1.362	1.05E-02	hypothetic	non	non	non	non
PA14_38290	PA2029	1.333	4.04E-05	hypothetic	non	non	non	non
PA14_41490	PA1785	1.327	8.17E-03	<i>nasT</i>	non	non	non	non
PA14_02130	PA0170	1.297	6.17E-03	hypothetic	non, increased expression in rsmA- (Table S2)	oui	non	oui
PA14_10670	PA4119	1.286	6.39E-02	<i>aph</i> , aminoglycoside phosphotransferase	non	non	non	non
PA14_34050	PA2366	1.269	6.14E-02	<i>hsiC3</i>	non	oui	non	oui
PA14_56660	PA4356	1.216	9.84E-02	<i>xenB</i> , xenobiotic reductase	non, reduced expression in rsmA- (Table S2)	non	non	non
PA14_44760	PA1522	1.214	4.33E-02	xanthine dehydrogenase accessory factor X	non	oui	non	oui

PA14_36940	N/A	1.169	6.14E-03	hypothetic	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_28950	PA2722	1.169	9.34E-02	hypothetic	non	non	non	non
PA14_00360	PA0030	1.157	2.00E-04	CosX	non	non	non	non
PA14_70360	PA5330	1.136	2.50E-03	hypothetic	oui	non	non (binds RsmN)	oui
PA14_36650	PA2159	1.128	6.88E-02	conserved hypothetic	non	non	non	non
PA14_39945	PA1901	1.116	4.74E-02	phzC2	non	non	oui	oui
PA14_23170	PA3175	1.069	5.73E-03	<i>hutE</i> , formimidoylglutamase	non	non	non	non
PA14_50630	PA1064	1.057	4.93E-02	hypothetic	non	non	non	non
PA14_70730	PA5358	1.057	2.55E-03	<i>ubiA</i> , hydroxybenzoate transferase	non	non	non	non
PA14_40610	PA1849	1.003	9.56E-02	conserved hypthetic	non	non	non	non
PA14_56680	PA4358	0.998	5.47E-04	<i>feoB</i> , ferruos iron transport	non, reduced expression in rsmA- (Table S2)	non	non	non
PA14_02420	PA0193	0.941	3.29E-03	hpothetical	non	non	non	non
PA14_72230	PA5473	0.927	6.88E-02	conserved hypothetic	non	non	non	non
PA14_32450	PA2489	0.870	3.27E-02	probable Arac regulator	non	non	non	non
PA14_67140	PA5083	0.610	7.86E-02	<i>gguB</i> , Rid2 subfamily protein	non	non	non	non
PA14_49780	PA1129	0.569	9.92E-02	<i>fosA</i> , fosfomycin resistance protein	non	non	non	non
PA14_44640	PA1531	-0.910	1.33E-02	hypothetic	non	non	non	non
PA14_64680	PA4894	-0.953	2.61E-03	<i>ureJ</i> , hypothetic (urease cluster)	non	non	non	non
PA14_53110	PA0863	-1.027	9.56E-02	probable oxidoreductase	non	non	non	non
PA14_15530	N/A	-1.028	8.11E-02	<i>trbK</i> , Entry/Exclusion protein	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_32480	PA2486	-1.042	2.14E-02	<i>ptrC</i> , type III repressor gene C	non	non	non	non
PA14_00660	PA0054	-1.073	2.59E-02	conserved, RNA phosphotransferase -like	oui	non	oui	oui
PA14_69840	PA5290	-1.117	3.37E-03	conserved hypothetic (magnesium chelatase?)	oui	oui	oui	oui
PA14_16180	PA3729	-1.124	2.85E-03	conserved hypothetic	non	non	oui	oui
PA14_47210	PA1317	-1.216	2.54E-02	<i>cyoA</i> , cytochrome O oxidase subunit II	oui	non	non	oui
PA14_69620	PA5273	-1.246	2.05E-04	hypothetic	oui	non	oui	oui
PA14_62840	PA4749	-1.292	6.91E-02	<i>glmM</i> , phosphoglucosamine mutase	non	non	non	non

PA14_31820	PA2531	-1.321	1.40E-05	probable aminotransferase	non	oui	non	oui
PA14_53570	N/A	-1.363	8.91E-02	integrase (phage)	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_22240	N/A	-1.367	8.08E-04	hypothetic, phage?	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_58100	PA4477	-1.417	1.35E-05	<i>cafA</i> , cytoplasmic axial filament protein (ribonuclease G?)	non	non	non (binds RsmN)	non
PA14_42950	PA1665	-1.505	2.97E-06	<i>fha2</i> , (HIS-II)	non	non	oui	oui
PA14_29680	PA2661	-1.507	1.22E-09	hypothetic	oui (reduced binding in hfq- (table S4))	non	non	oui
PA14_18820	PA3518	-1.536	2.83E-02	hypothetic	non	oui	non	oui
PA14_01390	PA0114	-1.572	2.53E-02	<i>senC</i> ,	non (but found in Hfq CHIP when RsmA in present (Table S5))	non	non	non
PA14_72180	PA5469	-1.583	1.61E-08	Membrane protein TerC	non	non	non	non
PA14_34670	PA2318	-1.605	2.55E-03	cupin superfamily protein	non	oui	non	oui
PA14_22680	PA3211	-1.648	4.57E-02	probable ABD transporter permease	oui	non	non	oui
PA14_51240	PA1013	-1.657	1.68E-02	<i>purC</i>	oui	oui, antisens	non	oui
PA14_34100	PA2363	-1.687	2.54E-02	<i>hsiJ3</i>	non	non	non	non
PA14_34290	PA2348	-1.709	1.01E-03	DszA family oxygenase	non	non	non	non
PA14_47900	PA1262	-1.757	3.11E-08	MFS transporter	non, increased expression in rsmA- (Table S2)	oui	non	oui
PA14_50360	PA1086	-1.796	7.53E-06	<i>flgK</i> , flagellar hook	non	non	non	non
PA14_26090	PA2934	-1.821	3.06E-08	hydrolase, CFTR inhibitory factor Cif	non	non	non	non
PA14_34550	PA2325	-1.864	7.76E-08	hypothetic	non	non	non	non
PA14_59880	N/A	-1.865	7.89E-18	Hypothetical, absent in PAO1	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_34820	PA2304	-1.946	6.37E-11	regulatory protein AmbC	non	non	non	non
PA14_71840	PA5441	-1.965	1.06E-01	hypothetical	oui	non	non	oui
PA14_17110	PA3652	-1.974	2.95E-07	<i>uppS</i> , UDP pyrophosphate synthase	oui	non	oui	oui
PA14_00760	PA0064	-2.076	3.53E-18	hypothetical	oui	non	non	oui
PA14_05580	PA0429	-2.109	9.97E-02	hypothetical, next to <i>mexAB-oprM</i>	oui	non	non	oui
PA14_50570	PA1069	-2.116	4.45E-10	hypothetical	oui	non	oui	oui
PA14_01440	PA0118	-2.123	1.11E-04	hypothetical	non	oui	non	oui

PA14_60000	N/A	-2.129	1.44E-05	hypothetical	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_16200	PA3727	-2.177	8.47E-16	hypothetical, close to lasB	oui	non	oui	oui
PA14_33330	N/A	-2.268	5.34E-06	hypothetical , absent in PAO1	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_39320	PA1948	-2.303	2.56E-12	ribose transporter protein	non	non	non	non
PA14_06940	PA0532	-2.341	9.07E-08	hypothetical	non	non	non	non
					non, increased expression in rsmA- (Table S2)			
PA14_01170	PA0096	-2.354	5.46E-18	next to tse6		non	non	non
PA14_28570	PA2749	-2.369	3.18E-02	<i>endA</i> , DNA endonuclease I	non	non	non	non
PA14_35800	N/A	-2.395	1.04E-24	hypothetical, absent in PAO1	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_63940	PA4836	-2.410	6.67E-27	cntL, ??	non	non	non	non
PA14_46160	PA1414	-2.419	2.21E-02	ncRNA (with a predicted CDS)	non	non	non	non
PA14_45070	PA1496	-2.436	5.53E-02	probable potassium channel	non	non	non	non
PA14_11420	PA4054	-2.445	9.69E-03	<i>ribB</i> , GTP cyclohydrolase II	non	non	non	non
PA14_07380	PA0568	-2.466	7.20E-21	hypothetical	non	non	non	non
PA14_01140	PA0093	-2.468	2.43E-26	tse6	oui	non	non	oui
PA14_04340	PA0333	-2.479	3.79E-19	hypothetical	oui	non	non	oui
PA14_47370	PA1303	-2.519	1.33E-02	signal peptidase	non	non	non	non
					non (increased expression in rsmA (Table S2)			
PA14_31510	PA2554	-2.588	6.95E-02	probable short chain dehydrogenase		non	non	non
PA14_41170	PA1806	-2.631	4.36E-24	<i>fabI</i> , ACP-linked protein	non	non	non	non
PA14_28940	PA2723	-2.650	2.23E-22	hypothetical, genomic context differs from PAO1	oui	non	oui	oui
PA14_14060	PA3860	-2.702	5.63E-21	AMP binding protein	non	non	non	non
PA14_32370	PA2496	-2.727	5.38E-03	hypothetic (next to mexEF- <i>oprN</i> , DNA damage-inducible gene?)	non	non	non	non
PA14_32880	PA2454	-2.752	2.49E-02	hypothetic	oui	non	non	oui
PA14_20800	PA3345	-2.774	6.39E-02	hptB	oui	non	oui (binds RsmN too)	oui
PA14_62360	PA4711	-2.793	3.47E-03	hypothetic (iron-sulfur cluster-binding protein	non	non	non	non
PA14_15820	PA3758	-2.814	1.37E-11	N-acetylglucosamine-6-p deacetylase	non	non	non	non
PA14_54600	PA0749	-2.869	5.77E-06	hypothetical	oui	non	oui	oui

PA14_02960	PA0238	-2.873	2.50E-32	hypothetical	non	non	non	non
PA14_16780	PA3679	-2.980	6.71E-25	hypothetical (cytochrome p450-like)	oui	non	non	oui
PA14_28010	PA2792	-3.007	9.22E-03	hypothetic	oui (reduced binding in hfq- (table S4)	non	non	oui
PA14_36490	PA2173	-3.121	4.11E-02	conserved hypothetic	non	non	non	non
PA14_34110	PA2362	-3.170	2.34E-34	<i>dotU3</i> , T6SS (next to <i>icmf3</i>)	non	non	non	non
PA14_24990	PA3021	-3.264	5.30E-03	hypothetic	non (increased expression in <i>rsmA</i> (Table S2)	non	non	non
PA14_48115	PA1246	-3.325	1.26E-02	<i>aprD</i> , alkanine protease secretion protein	oui	non	oui	oui
PA14_42900	PA1669	-3.347	2.76E-38	<i>icmF2</i> , T6SS?	non	oui	non	oui
PA14_04250	PA0326	-3.361	2.76E-11	ABC transporter	non	non	non	non
PA14_33270	PA2425	-3.419	7.89E-03	<i>pvdG</i>	non (increased expression in <i>rsmA</i> (Table S2)	non	non	non
PA14_20460	PA3371	-3.505	3.18E-05	hypothetical	non, increased expression in <i>rsmA</i> - (Table S2)	non	non	non
PA14_29400	PA2684	-3.709	6.11E-04	<i>tse5</i> , HSI-I	oui	non	non	oui
PA14_45710	PA1450	-3.722	1.95E-03	Hypothetical_flagellar cluster (between <i>flhA</i> and B)	oui	non	oui	oui
PA14_40740	N/A	-3.917	1.88E-27	Hypothetical, absent in PAO1	N/A	N/A	N/A	N/A
PA14_45700	PA1451	-4.000	1.08E-53	Hypothetical_flagellar cluster (between <i>flhA</i> and B)	oui	non	oui	oui
PA14_02260	PA0179	-4.122	1.95E-03	2CS response regulator CheY?	oui (reduced binding in hfq- (table S4)	oui	non	oui
PA14_19030	PA3483	-4.140	4.90E-44	Hypothetical_upstream of Tse3 cluster	oui (confirmed in lab)	oui	non	oui
PA14_06990	PA0537	-5.679	3.64E-22	conserved hypothetical protein	oui	non	non	oui

