

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

**Avantages d'utiliser la motilité de type *swarming* chez la bactérie
*Pseudomonas aeruginosa***

Par
May Landry

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
Maître ès sciences (M. Sc.)
En Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Salim Timo Islam INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	François Malouin Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	Eric Déziel INRS-Institut Armand-Frappier

« Si vous savez que vous êtes sur la bonne voie, si vous avez cette connaissance intérieure, alors personne ne peut vous décourager... peu importe ce qu'ils disent. »

-Barbara McClintock

RÉSUMÉ

Les comportements sociaux font partie intégrale de la vie en communauté et les microorganismes n'échappent pas à cette règle. Les bactéries sont des organismes unicellulaires préférant généralement la vie en communauté et ayant la capacité de communiquer entre elles à l'aide de molécules de signalisation. Ce mode de communication est nommé *quorum sensing* et est employé autant par les bactéries à Gram-négatif qu'à Gram-positif. Le *quorum sensing* régule différents comportements sociaux chez les bactéries, dont certains types de motilité. Les bactéries sont capables de se déplacer de nombreuses façons, qu'il s'agisse d'un déplacement individuel tel que par la motilité de type *swimming* ou d'un déplacement de groupe tel que les motilités de types *twitching* ou *swarming*.

Dans cette étude, l'organisme étudié est *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit d'un pathogène opportuniste à Gram-négatif que l'on retrouve dans différents environnements tels que le sol, les milieux aqueux mais aussi les milieux hospitaliers. Il est notamment impliqué dans de nombreuses infections telles que chez les individus au système immunitaire affaibli ou chez les grands brûlés ayant des plaies importantes. Il est surtout connu pour son implication dans l'infection des voies respiratoires des individus atteints de fibrose kystique, une maladie héréditaire létale. Cet organisme est aussi reconnu car il peut se déplacer en utilisant trois types de motilité différents, soit le *swarming*, le *twitching* et le *swimming*. La motilité de type *swarming* est un mode de déplacement social qui se caractérise par un mouvement rapide et coordonné d'une colonie bactérienne. Cette motilité se produit sur la surface d'un environnement semi-solide. La bactérie *P. aeruginosa* peut réaliser cette motilité dans des conditions standard de laboratoire. Le *swarming* est étudié depuis de nombreuses années mais les avantages évolutifs derrière ce déplacement sont encore peu connus. Nous avons donc proposé différents objectifs permettant d'approfondir les connaissances sur cette motilité et plus spécialement sur les avantages qui sont apportés à la bactérie.

Cette étude a mis en évidence que la motilité *swarming* est influencée par la concentration nutritionnelle de son environnement. En effet, un milieu trop pauvre en nutriments causera une diminution importante de la surface recouverte par la colonie dans les conditions étudiées. Dans le cas contraire, un milieu très riche causera aussi une diminution de la motilité, ce qui indiquerait que la colonie n'a pas à se déplacer autant pour combler ses besoins nutritionnels. Un

environnement minimal apportant une source de carbone et d'azote est préférable pour effectuer une motilité *swarming*. Ainsi, les résultats indiquent qu'une colonie en *swarming* n'ira pas s'aventurer sur un milieu pauvre pour aller à la recherche de nutriments mais préférera rester au niveau d'un environnement riche. Différentes sources d'azote ont aussi été testées et le NH_4Cl est préféré au NaNO_3 qui induit un changement du patron de motilité.

Des co-cultures de *P. aeruginosa* avec une espèce bactérienne aussi retrouvée au niveau des poumons des personnes atteintes de fibrose kystique, *Burkholderia cenocepacia* ont été étudiées. Cet objectif a permis d'aborder le thème des colonies polymicrobiennes en *swarming* et d'en apprendre plus sur les bénéfices compétitifs de cette motilité. Quoique la souche *B. cenocepacia* K56-2 soit non motile dans les conditions testées, lorsqu'elle se retrouve en co-culture avec la souche sauvage de *P. aeruginosa* PA14, elle démontre alors une motilité de type *swarming*, vraisemblablement en utilisant PA14 pour se déplacer. Cette «collaboration» a été approfondie en utilisant des souches dérivées de PA14, soit les mutants $\Delta pilA$, *fliC*- et $\Delta pilA fliC$ -. Un plan de répartition des différentes souches dans le patron de la colonie *swarming* a été établi et il semblerait que K56-2 agisse en tant que « *hitchhiker* » lorsqu'elle est combinée à PA14. Ainsi, deux souches non-motiles lorsqu'elles sont cultivées séparément peuvent le devenir lorsqu'elles se retrouvent ensemble sur un milieu *swarming*. Il en est donc ainsi lorsque K56-2 se retrouve co-cultivée avec PA14 *fliC*-, $\Delta pilA fliC$ - et *cupA fliC*-.

Un dernier objectif a permis d'étudier le phénomène de résistance aux antibiotiques chez les bactéries en *swarming*. En effet des travaux réalisés dans notre laboratoire ont démontrés que PA14 est plus résistante aux antibiotiques lorsqu'elle se retrouve dans un milieu *swarming*. Nous avons donc démontré que des concentrations sous-inhibitrices de tobramycine influencent non seulement la motilité mais aussi le phénotype de la colonie. En augmentant la concentration d'antibiotique, il a été possible d'observer un élargissement des dendrites d'une colonie en *swarming*, ainsi que l'apparition d'une bordure plus opaque. Des tests de cytométrie ont été réalisés pour étudier la composition de ces bordures en les comparant avec les centres des dendrites. Les résultats obtenus ne démontrent pas une grande différence entre les zones prélevées.

Ces différents résultats ont donc permis d'approfondir nos connaissances sur la motilité de type *swarming* ainsi que sur les avantages apportés à *P. aeruginosa* lors de ce mode de déplacement.

REMERCIEMENTS

Lors de ces deux dernières années, la vie a su mettre sur mon chemin des gens incroyables qui m'ont non seulement aidé dans mon cheminement académique mais qui m'ont aussi permis de devenir la personne que je suis. J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Eric Déziel de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci d'avoir non seulement cru en moi mais aussi de m'avoir encouragé à me dépasser. Merci pour ta passion contagieuse et pour ta grande disponibilité. Merci d'avoir fait de moi une microbiologiste.

Un immense merci à Marie-Christine, ma bonne fée. Tu es non seulement une collègue indispensable mais aussi une amie incroyable. Merci pour ton soutien autant scientifique que psychologique. J'aimerais aussi remercier Audrey-Anne, ma jumelle cosmique pour tous nos fous rires mais aussi pour les quelques larmes ici et là, merci d'être toujours là pour moi.

Merci à mes collègues qui ont rendu ces deux années excessivement enrichissantes. Un gros merci à Charles, Pauline, Sophie, Sarah et Alison pour toutes nos conversations divertissantes, surtout le vendredi durant la corvée de *tips*. Merci à tous les membres du laboratoire, passés et présents pour votre accueil et votre amitié. Merci aussi à tous mes amis du troisième étage qui ont rendu ses deux années mémorables.

Un merci très spécial à mon amie Soleil, merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'encourager et de me remettre les pieds sur terre quand je m'emballe un peu trop. Merci de m'inciter à sortir de ma zone de confort et d'avoir confiance en moi depuis toutes ces années.

Finalement, un grand merci à mes parents et mes grands-parents d'avoir toujours cru en moi peu importe le projet que j'entreprenais. Merci pour vos encouragements et votre confiance sans limite. Merci aussi pour votre soutien psychologique, monétaire et alimentaire. Un merci particulier à Agathe qui est arrivée dans ma vie à un moment où j'en avais bien besoin. Merci pour ta présence thérapeutique et ton amour inconditionnel.

TABLE DES MATIÈRES

<u>SRÉSUMÉ</u>	V
<u>REMERCIEMENTS</u>	VII
<u>TABLE DES MATIÈRES</u>	IX
<u>Liste des figures</u>	XIII
<u>Liste des tableaux</u>	XVI
<u>Liste des abréviations</u>	XVII
1 REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 LA MULTICELLULARITÉ.....	1
1.1.1 <i>La sociomicrobiologie</i>	1
1.2 LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE (<i>QUORUM SENSING</i>)	2
1.2.1 <i>Chez les bactéries à Gram-Négatif</i>	2
1.2.2 <i>Chez les bactéries à Gram positif</i>	4
1.3 LA MOTILITÉ BACTÉRIENNE.....	4
1.3.1 <i>Swimming</i>	5
1.3.2 <i>Twitching</i>	6
1.3.3 <i>Swarming</i>	6
1.4 LES RHAMNOLIPIDES.....	7
1.4.1 <i>Le concept de bien public et des tricheurs</i>	9
1.4.2 <i>La prudence métabolique</i>	10
1.5 RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	10
1.5.1 <i>La résistance adaptative</i>	11
1.5.2 <i>La résistance intrinsèque</i>	12
1.5.3 <i>La résistance acquise</i>	12
1.5.4 <i>Les autres effets des antibiotiques</i>	12
1.6 LES BIOFILMS.....	13
1.6.1 <i>Pathogénicité associée aux biofilms</i>	13
1.7 LA FIBROSE KYSTIQUE.....	14
1.7.1 <i>Écosystème des voies respiratoires</i>	15
1.7.2 <i>Mutations fréquentes</i>	16
1.8 LA BACTÉRIE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	17
1.8.1 <i>La motilité</i>	17

1.8.2	<i>Les infections nosocomiales</i>	17
1.8.3	<i>Résistance aux antibiotiques</i>	18
1.8.4	<i>Pili de type IV</i>	19
1.8.5	<i>Pili Cup</i>	20
1.8.6	<i>Flagelle</i>	21
1.9	LE GENRE <i>BURKHOLDERIA</i>	22
1.9.1	<i>Les BCC</i>	22
1.9.2	<i>Les pili chez Burkholderia</i>	23
1.9.3	<i>Flagelle</i>	23
1.9.4	<i>Le quorum sensing</i>	24
1.9.5	<i>Motilité</i>	25
1.10	PROBLÉMATIQUE	26
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
2.1	SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE	28
2.2	LE SWARMING COMME MODE EXPLORATOIRE.....	29
2.2.1	<i>Pré-cultures</i>	29
2.2.2	<i>Milieux swarming</i>	29
2.2.3	<i>Protocole de swarming</i>	30
2.2.4	<i>Cinétiques de recouvrement</i>	30
2.2.5	<i>Mesure du ratio de surface recouverte en pixels</i>	30
2.2.6	<i>Géloses à deux concentrations nutritionnelles</i>	31
2.2.7	<i>Mesures des dendrites exploratrices</i>	31
2.2.8	<i>Source d'azote préférentielle</i>	32
2.3	LES CO-CULTURES.....	32
2.3.1	<i>Réalisation du double mutant $\Delta pilAflIC$- Gm^R</i>	32
2.3.1.1	Test de susceptibilité à la gentamycine.....	32
2.3.1.2	Extraction d'ADN	32
2.3.1.2	Dialyse de l'ADN.....	33
2.3.1.3	Préparation de cellules compétentes	33
2.3.1.4	Transformation par électroporation	33
2.3.1.5	Vérification par colonies PCR	34
2.3.2	<i>Inoculation des co-cultures</i>	35
2.3.3	<i>Récupération de la biomasse</i>	35
2.3.4	<i>Protocole d'UFC en gouttes</i>	36
2.3.5	<i>Réalisation du double mutant PA14 $cupAflIC$-</i>	37

2.3.5.1	Amplification par PCR.....	37
2.3.5.2	Clonage.....	39
2.3.5.3	Vérification de l'insert.....	40
2.3.5.4	Transformation de PA14 <i>cupA</i> - et pEASY- <i>fliC</i>	41
2.3.5.5	Vérification de la conjugaison.....	42
2.3.6	<i>Swarming</i> en ajoutant des rhamnolipides à K56-2.....	42
2.4	LA RÉSISTANCE À LA TOBRAMYCINE.....	43
2.4.1	Milieux.....	43
2.4.2	Concentrations d'antibiotique.....	43
2.4.3	Mesures.....	43
2.4.4	Récupération de la biomasse.....	44
2.4.5	Baflight™.....	44
2.4.6	Cytométrie en flux.....	45
3	RÉSULTATS.....	47
3.1	LE SWARMING EN FONCTION DES CONDITIONS NUTRITIONNELLES.....	47
3.1.1	Cinétiques de recouvrement.....	47
3.1.2	Géloses à deux concentrations nutritionnelles.....	50
3.1.3	Source d'azote préférentielle de PA14.....	53
3.2	LES CO-CULTURES.....	54
3.2.1	<i>P. aeruginosa</i> VS <i>B. cenocepacia</i>	54
3.2.2	Co-cultures des mutants PA14 <i>swarming</i> et K56-2.....	56
3.2.3	Co-cultures des mutants des pili <i>cup</i> avec K56-2.....	63
3.2.4	<i>Swarming</i> et <i>swimming</i> de la souche PA14 <i>cupA</i> fliC-.....	68
3.2.5	<i>Swarming</i> K56-2 additionné de rhamnolipides.....	70
3.3	LA RÉSISTANCE À LA TOBRAMYCINE.....	71
3.3.1	<i>Swarming</i> avec ajout de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine.....	71
3.3.2	Effets de la tobramycine sur la largeur des dendrites.....	72
3.3.3	Observations au binoculaire des dendrites.....	73
3.3.4	Baflight™.....	73
3.3.5	Cytométrie en flux.....	74
4	DISCUSSION.....	78
4.1	LE SWARMING EN FONCTION DES CONDITIONS NUTRITIONNELLES.....	78
4.1.1	Cinétiques de recouvrement.....	79
4.1.2	La concentration nutritionnelle affecte la surface recouverte en <i>swarming</i>	79

4.1.3	<i>Pétris à deux concentrations nutritionnelles</i>	81
4.1.4	<i>Le swarming est limité par la disponibilité des sources de carbone</i>	82
4.1.5	<i>Les dendrites « exploratrices » ne sont pas différentes des autres</i>	83
4.1.6	<i>Source d'azote préférentielle</i>	83
4.2	LES CO-CULTURES.....	85
4.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa et Burkholderia cenocepacia</i>	85
4.2.2	<i>PA14 rhlA- n'induit pas de motilité avec K56-2</i>	86
4.2.3	<i>Co-cultures entre mutants swarming</i>	86
4.2.4	<i>Co-culture de PA14 fliC- et K56-2</i>	87
4.2.5	<i>Co-culture de PA14 ΔpilA et K56-2</i>	88
4.2.6	<i>Co-culture de ΔpilAfliC- et K56-2</i>	88
4.2.7	<i>Mutants des pili cup chez PA14</i>	89
4.2.8	<i>Double mutant PA14 cupAfliC--</i>	90
4.2.9	<i>Coopération et compétition bactérienne</i>	90
4.3	LA RÉSISTANCE À LA TOBRAMYCINE	93
4.3.1	<i>Les bactéries en swarming sont plus résistantes aux antibiotiques</i>	93
4.3.2	<i>L'ajout de tobramycine dans le milieu affecte la largeur des dendrites</i>	94
4.3.3	<i>Il n'y a pas plus de bactéries mortes au pourtour des dendrites qu'au centre</i>	95
4.3.4	<i>Possibles raisons de l'accumulation de biomasse au niveau des bordures</i>	96
4.3.5	<i>Hypothèses sur l'augmentation de la résistance en swarming</i>	97
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	99
6	RÉFÉRENCES	103
7	ANNEXES	114
	ANNEXE I : RECETTES DES DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE BACTÉRIENNE	114
	ANNEXE II : OPÉRONS CUP	115

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du système de QS chez les bactéries à Gram-négatif.	3
Figure 2 : Représentation des différents types de motilité retrouvés.....	5
Figure 3. Représentation de différents patrons de la motilité de type <i>swarming</i>	7
Figure 4. Voie de synthèse des rhamnolipides	9
Figure 5. Présence des bactéries pathogènes chez les patients atteints de fibrose kystique à travers les années.....	15
Figure 6 : Schéma représentant les 3 systèmes d'assemblage des pili de type IV chez <i>P. aeruginosa</i>	20
Figure 7. Microscopie des fimbriae de type cup et représentation graphique de ceux-ci.	21
Figure 8. Microscopie électronique de <i>B. cepacia</i> exprimant les pili <i>Cbl</i> de type II	23
Figure 9 : Système de QS chez les BCC.....	24
Figure 10 : Gel d'agarose 1% démontrant les fragments du gène <i>fliC</i> amplifiés.	39
Figure 11 : Carte du plasmide pEASY®-T1 de Transgene Biotech.....	40
Figure 12 : Gel d'agarose 1% permettant de confirmer les insert du gène <i>fliC</i> dans le plasmide pEASY-T1.	41
Figure 13 : Mesures de la largeur des dendrites du <i>swarming</i> avec tobramycine	44
Figure 14 : Photo prise à la 24 ^e heure d'incubation à 30°C de la souche PA14 sur milieu <i>swarming</i> à concentration nutritionnelle de 0,8x.	48
Figure 15 : Représentation graphique des moyennes des ratios de surface en pixels des différentes concentrations nutritionnelles testés.	49
Figure 16 : Graphique de comparaison des moyennes des surfaces totales recouvertes par une colonie <i>swarming</i> à 30°C et 34°C après 24h.	50
Figure 17 : <i>Swarming</i> de PA14 sur Pétris à 2 concentrations de carbone.	51
Figure 18 : Distance parcourue des dendrites des souches PA14 et PA14 « explorateur » sur Pétri à deux concentrations de carbone (50/50).	52
Figure 19 : <i>Swarming</i> de PA14 sur M9DCAA avec différentes sources d'azote.....	53
A. PA14 sur milieu M9DCAA avec NH ₄ Cl comme source d'azote. B. PA14 sur milieu M9DCAA avec NaNO ₃ comme source d'azote. Les Pétris ont été incubés à 34°C pour 20 heures.....	53
Figure 20 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 et <i>Burkholderia cenocepacia</i> K56-2 individuellement et co-cultivés sur milieu M9DCAA.	54

Figure 21 : UFC de PA14 et K56-2 lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	55
Figure 22 : Co-culture de <i>P. aeruginosa rhIA-</i> et <i>B. cenocepacia</i> K56-2.	56
Figure 23: Co-culture de <i>P. aeruginosa</i> PA14 <i>fliC-</i> et <i>B. cenocepacia</i> K56-2.....	56
Figure 24: UFC de PA14 <i>fliC-</i> et K56-2 lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	57
Figure 25: Co-culture entre <i>P. aeruginosa</i> PA14 <i>fliC-</i> et <i>B. cenocepacia</i> K56-2 <i>rhIA-</i>	58
Figure 26 : UFC de PA14 <i>fliC-</i> et K56-2 <i>rhIA-</i> lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	59
Figure 27 : Co-cultures des souches PA14 Δ <i>pilA</i> , K56-2 et K56-2 <i>rhIA-</i> en conditions <i>swarming</i>	60
Figure 28 : UFC de PA14 Δ <i>pilA</i> et K56-2 et K56-2 <i>rhIA-</i> lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	60
Figure 29: Pétris <i>swarming</i> avec la souche PA14 Δ <i>pilA</i> <i>fliC-</i> ainsi que la souche K56-2 sur milieu M9DCAA.	61
Figure 30 : UFC de PA14 Δ <i>pilA</i> <i>fliC-</i> et K56-2 lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	62
Figure 31 : Co-culture des souches PA14 <i>cupA-</i> et K56-2 sur milieu <i>swarming</i> M9DCAA incubé à 30°C pour 20 heures.	63
Figure 32 : UFC de PA14 <i>cupA-</i> et K56-2 lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	64
Figure 33 : Souches PA14 <i>cupB-</i> et K56-2 en co-culture 1 :1 sur milieu M9DCAA à 0,5% d'agar.	65
Figure 34 : UFC de PA14 <i>cupB-</i> et K56-2 lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	66
Figure 35 : PA14 <i>cupC-</i> mis en co-culture à 1 :1 avec K56-2 sur milieu M9DCAA 0,5%.....	67
Figure 36 : UFC de PA14 <i>cupC-</i> et K56-2 lors d'une co-culture en <i>swarming</i>	68
Figure 37 : Essai de <i>swarming</i> des transformants PA14 <i>cupA</i> <i>fliC-</i>	69
.....	69
Figure 38 : Essais en <i>swimming</i> des transformants PA14 <i>cupA</i> <i>fliC-</i> et PA14 WT.....	69
Figure 39 : <i>Swarming</i> avec la souche K56-2 avec ajout de rhamnolipides	70
Figure 40 : Résultats de l'ajout de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine dans le milieu M9DCAA 0,5%.	71
Figure 41: Mesures des largeurs des dendrites de PA14 à l'aide du logiciel Photoshop.....	72
Figure 42 : Portions de dendrites de PA14 sur milieu M9DCAA photographiés à l'aide du binoculaire.....	73
Figure 43: Microscopie en épifluorescence obtenue suite à une coloration Baclight™ de <i>P. aeruginosa</i> PA14 prélevée d'une bordure de dendrite en <i>swarming</i> sans ajout de tobramycine.	74
Figure 44 : Dénombrement par cytométrie en flux des centres des dendrites.....	75
Figure 45 : Dénombrement par cytométrie en flux des bordures des dendrites	75

Figure 46 : Dénombrement par cytométrie en flux au centre des dendrites 76
Figure 47 : Dénombrement par cytométrie en flux des bordures des dendrites 77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude	28
Tableau 2 : Amorces utilisées dans la vérification du double mutant PA14 Δ pilA <i>fliC</i> - GmR par colonies PCR.	34
Tableau 3 : Amorces utilisées dans la création du double mutant PA14 <i>cupA-fliC</i> -.	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
BCC	« <i>Burkholderia cepacia</i> complex »
CAA	Acides casaminés
DO	Densité optique
FK	Fibrose kystique
LB	« Lysogeny Broth »
O/N	« Overnight »
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
QS	« Quorum sensing »
TSB	« Tryptic soy broth »
UFC	Unité formatrice de colonies

1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La multicellularité

L'avènement de la multicellularité a permis aux microorganismes de faire le saut du monde microscopique vers celui macroscopique (Lyons *et al.*, 2015). Le concept de multicellularité microbienne repose sur deux facteurs importants soit, le contact entre les organismes pour permettre la formation d'une nouvelle communauté ainsi que la communication intercellulaire visant à coordonner les activités de cette nouvelle entité (Lyons *et al.*, 2015). Les organismes d'une entité multicellulaire démontrent une spécialisation ainsi qu'une répartition des tâches de la communauté. Dans l'environnement, les microorganismes vont former des communautés multicellulaires plutôt que d'opter pour un mode de vie individuel (Bernier *et al.*, 2016). Ce nouveau mode de vie apporte de nombreux avantages à la communauté tels que la résistance aux stress autant physiques que chimiques tels que les variations de températures, le pH, la pression osmotique ainsi que le dessèchement (Lyons *et al.*, 2015). La multicellularité permet aussi une meilleure acquisition des ressources ainsi qu'une colonisation de l'environnement plus efficace (Lyons *et al.*, 2015, Shapiro, 1998). Des désavantages sont aussi associés à ce mode de vie tel que l'augmentation des coûts énergétiques dû à la grande production de molécules d'adhésion et de communication (West *et al.*, 2006). Dans certain cas, l'augmentation de la taille de la colonie ainsi que la forte adhésion entre les cellules cause une limitation des mouvements individuels (West *et al.*, 2006). Un bon exemple de multicellularité serait le biofilm bactérien, décrit plus en détail à la section 1.6. Un autre exemple démontrant un phénomène de multicellularité est la colonie en *swarming* de *Pseudomonas aeruginosa*, ce concept est décrit à la section 1.8.1.

1.1.1 La sociomicrobiologie

La sociomicrobiologie est un domaine qui permet d'étudier les interactions microbiennes à l'intérieur d'une communauté composée d'une ou plusieurs espèces (Parsek *et al.*, 2005, Xavier, 2016). Il s'agit donc de l'étude des comportements sociaux associés à la multicellularité (Shapiro, 1998). Les bactéries démontrent une vie sociale coordonnée en utilisant des interactions entre les membres d'une colonie pouvant ainsi influencer leur reproduction et même leur survie (Boyle *et al.*, 2017, Robinson *et al.*, 2008). L'intérêt pour la complexité des communautés poly-

microbiennes et leurs interactions est en plein essor. Il est proposé de plus en plus que ces interactions soient responsables notamment de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et d'infections plus persistantes (O'Brien *et al.*, 2017).

1.2 La communication intercellulaire (*quorum sensing*)

Le *quorum sensing* est un mode de communication bactérien agissant à l'aide de molécules de signalisation et basé sur l'atteinte d'un seuil critique de concentration de ces molécules (Parsek *et al.*, 2005, Turan, 2017). Ce mode de communication est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes, notamment ceux responsables de la synthèse de facteurs de virulence (Crespi, 2001). Le *quorum sensing* a été observé pour la première fois dans les années 1970 chez l'organisme *Aliivibrio fischeri* (auparavant *Vibrio fischeri*), une bactérie marine bioluminescente lorsqu'elle est présente à haute densité (Donabedian, 2003, Nealson *et al.*, 1970). La production de molécules de signalisation par la bactérie agit comme système de détection permettant de suivre la progression de la densité de la population dans son environnement (Fuqua *et al.*, 1994). Ces molécules produites par une synthase s'accumulent donc dans l'espace extracellulaire de manière continue. Lorsque la densité bactérienne augmente, les molécules auto-inductrices se retrouvent à haute concentration et éventuellement atteignent un seuil critique (*quorum*) causant une boucle d'activation menant à la régulation de différents gènes (Fuqua *et al.*, 1994, Turan, 2017).

1.2.1 Chez les bactéries à Gram-Négatif

Le *quorum sensing* des bactéries à Gram-négatif utilise des molécules auto-inductrices appartenant à la famille des *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHL) (Turan, 2017). On les retrouve chez plus de 25 espèces telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *A. fischeri* et chez plusieurs genres tels que *Rhizobium* (Turan, 2017). La production de ces molécules est régulée à l'aide d'un système de type LuxI/LuxR. La synthase LuxI produit un AHL qui s'accumule dans l'environnement de la bactérie. Lorsqu'il y a atteinte d'une concentration critique (*quorum*) dans la cellule, la protéine LuxR reconnaît la molécule AHL et interagit avec elle pour ensuite réguler la transcription de différents gènes cibles (Parsek *et al.*, 2005, Turan, 2017) (Fig.1). La bactérie *P. aeruginosa* possède deux systèmes de *quorum sensing* médiés par des AHL. Le premier système se nomme *las* et fonctionne avec la molécule de signalisation nommée *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) (Diggle *et al.*, 2007, Venturi, 2006). Le

second système se trouve en aval du premier et dépend donc de celui-ci pour son fonctionnement. Il s'agit du système *rhl* qui est activé par le *N*-(butanoyl)-L-homoserine lactone (C₄-HSL) (Diggle *et al.*, 2007; Venturi, 2006). Ces deux systèmes sont intimement liés et sont associés à la régulation d'une variété de comportements tels que la synthèse de facteurs de virulence et de compétition, de composés favorisant la croissance et affectant la structure des biofilms ainsi que la production de molécules tensioactives permettant la motilité de type *swarming* (voir 1.3.3) (Diggle *et al.*, 2007, Venturi, 2006). Finalement, un troisième système de *quorum sensing* distinct est aussi présent chez *P. aeruginosa*, basé sur la production de molécules de la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines, incluant les signaux intercellulaires 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) et 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (*Pseudomonas* Quinolone Signal; PQS) (Deziel *et al.*, 2004, McKnight *et al.*, 2000). L'utilisation du *quorum sensing* permettrait aux bactéries présentes chez un hôte d'évader aux défenses du système immunitaire de celui-ci jusqu'à l'atteinte d'une densité critique leur permettant alors d'envahir et d'établir une infection (Eberl, 2006).

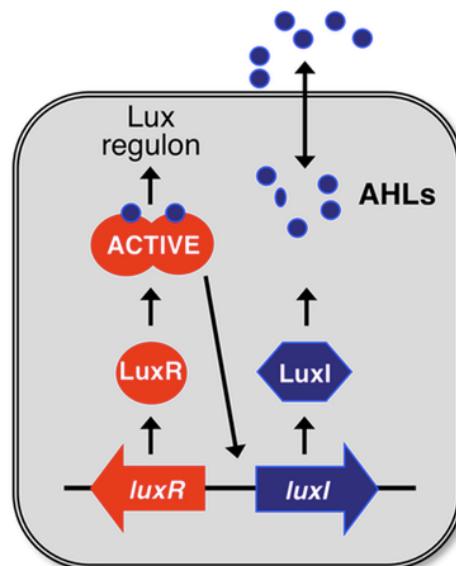


Figure 1 : Schéma du système de QS chez les bactéries à Gram-négatif.

La synthase LuxI produit des molécules auto-inductrices de type *N*-acyl-L-homosérine lactone qui diffusent dans le milieu extracellulaire. Lorsque la densité de population devient assez grande, la quantité d'AHL augmente et activera la protéine régulatrice LuxR qui s'active et peut ainsi aller réguler différents gènes cibles, incluant *luxI*, ce qui produit une boucle de rétroaction positive. Figure tirée d' (Abisado *et al.*, 2018).

1.2.2 Chez les bactéries à Gram positif

Le *quorum sensing* des bactéries à Gram positif utilise des molécules de signalisation nommées peptides auto-inducteurs (AIP) faisant partie d'un système de régulation à deux composantes (Turan, 2017). Ce système de régulation est composé d'un régulateur de réponse intracellulaire et d'un récepteur histidine kinase situé à l'extérieur de la membrane permettant ainsi de détecter les signaux dans l'environnement (Turan, 2017). Le système à deux composantes va recevoir le signal lorsque la concentration d'AIP atteint un seuil, tel que chez les bactéries à Gram négatif (Parsek *et al.*, 2005). S'ensuit alors un relais de signalisation par phosphorylation qui permet l'activation et l'expression des gènes régulés par le *quorum sensing* (Parsek *et al.*, 2005).

1.3 La motilité bactérienne

Certaines bactéries peuvent se déplacer de différentes façons dans leur environnement. La motilité est un élément important de la survie bactérienne car celle-ci peut opter pour un mode de vie motile au lieu de sessile (Verstraeten *et al.*, 2008). Elles sont ainsi capable de se déplacer en réponse à un environnement non adapté à leurs besoins ce qui leur permet d'améliorer leurs conditions de vie (Harshey, 2003, Henrichsen, 1972). Différents modes de déplacements ont été identifiés au fil des années tels que le *swimming*, le *twitching* et le *swarming*. Ceux-ci seront décrit plus en détail ci-dessous (fig.2).

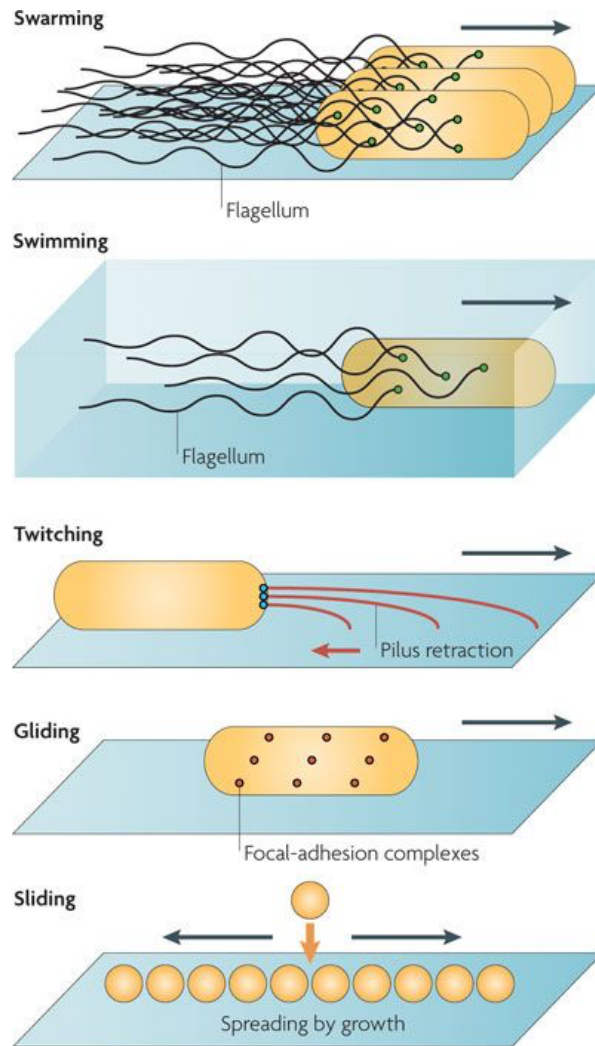


Figure 2 : Représentation des différents types de motilité retrouvés.

Le **swarming** est une motilité de groupe sur une surface semi-solide et nécessite la présence d'un ou plusieurs flagelles fonctionnels. Le **swimming** est une motilité bactérienne individuelle se produisant dans un milieu liquide et nécessite aussi l'implication d'un flagelle fonctionnel. Le **twitching** est un mode de déplacement de groupe se produisant sur une surface solide à l'aide des pili de type IV qui s'attachent à la surface et se rétractent, permettant ainsi à la bactérie de se déplacer. Deux autres types de motilité sont démontrés soit le **gliding** et le **sliding**, ceux-ci ne seront pas appliqués par le système modèle étudié et ne seront donc pas discutés. Image tirée de (Kearns, 2010).

1.3.1 *Swimming*

La motilité de type *swimming* est un mode de déplacement bactérien individuel nécessitant la présence d'au moins un flagelle fonctionnel. Celui-ci permet la motilité bactérienne dans un milieu liquide ou à très faible viscosité (0,3% d'agar) (Harshey, 2003, Kearns, 2010). La rotation du flagelle permet à la bactérie de réagir à la présence de gradients chimiques et ainsi d'effectuer une réponse de chimiotactisme en s'éloignant ou en se rapprochant d'un endroit spécifique

(Partridge *et al.*, 2013). Les bactéries en *swimming* vont se déplacer par une suite de mouvements nommés « run » et « tumble ». Le mouvement « run » est représenté lorsque la cellule se déplace à l'aide de son flagelle dans une direction parallèle à son axe le plus long. La cellule va par la suite s'immobiliser et décrire un mouvement irrégulier sur place nommé « tumble ». Elle reprendra son déplacement « run » dans une nouvelle direction par la suite (Berg, 2003). La structure et le fonctionnement des flagelles sont décrit plus en détail aux sections 1.8.6. et 1.9.3.

1.3.2 Twitching

La motilité de type *twitching* est un mode de déplacement sur une surface solide qui nécessite l'action de pili de type IV. Ceux-ci vont agir par un mouvement d'extension et de rétractation permettant ainsi un déplacement sur la surface (Harshey, 2003, Kearns, 2010). Ce mouvement peut être retrouvé autant sur des surfaces organiques qu'inorganiques telles que les gels d'agar, les cellules épithéliales, le plastique, le verre et le métal (Harshey, 2003). Les cellules sont capables de se déplacer individuellement mais il est commun de les voir se déplacer en radeaux et s'aligner les unes contre les autres (Burrows, 2012). On retrouve ce type de motilité chez plusieurs organismes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Myxococcus xanthus* (Kaiser, 2000). Ce type de motilité aiderait les cellules bactériennes à se déplacer dans les tissus infectés (Wall *et al.*, 1999). Le fonctionnement et la composition des pili de type IV sont décrit plus en détails à la section 1.8.4.

1.3.3 Swarming

La motilité de type *swarming* est caractérisée par un mouvement rapide (de 2 à 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$) et coordonné d'une population bactérienne sur une surface semi-solide, par exemple une gélose solidifiée avec 0,5% d'agar (Kearns, 2010, Tremblay *et al.*, 2008). Cette méthode de déplacement permet de coloniser rapidement un environnement fournissant ainsi un apport constant en nutriments (Fraser *et al.*, 1999, Harshey, 2003). Pour réaliser ce type de motilité, la bactérie doit posséder deux caractéristiques indispensables, soit la présence d'un ou de plusieurs flagelles fonctionnels ainsi que la production d'un agent mouillant (Kohler *et al.*, 2000, Verstraeten *et al.*, 2008). Les cellules *swarmers* peuvent subir une différenciation cellulaire et se retrouver allongées et hyperflagellées. Cette différenciation pourrait être liée à la détection de la viscosité du milieu ou en réponse à différents signaux nutritionnels (Harshey, 2003, Kohler *et al.*, 2000). Ces changements morphologiques seraient surtout retrouvés chez les cellules *swarmers* robustes,

soit les organismes pouvant se déplacer sur des surfaces allant jusqu'à 2% d'agar. On retrouve parmi les *swarmers* robustes des espèces comme *Proteus mirabilis* et *Vibrio parahaemolyticus* (Mattingly *et al.*, 2018). Il existe aussi un second groupe, les *swarmers* tempérés qui doivent généralement produire des surfactants permettant d'abaisser la tension de surface et ainsi se déplacer. On retrouve parmi ces surfactants notamment la surfactine produite par *Bacillus subtilis* et les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*. Ces derniers seront discutés plus en détail dans la prochaine section (Mattingly *et al.*, 2018).

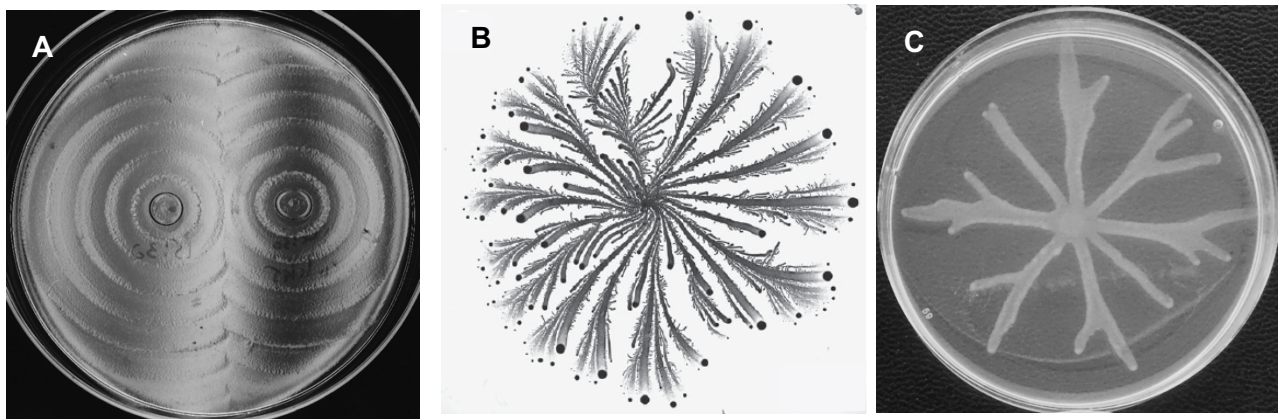


Figure 3. Représentation de différents patrons de la motilité de type *swarming*.

A. Swarming de deux colonies de *P. mirabilis* côte à côte sur un médium à 2% d'agar. Image tirée de (Rauprich *et al.*, 1996). **B.** Colonie de *Paenibacillus vortex* sur milieu peptone pour 6 jours. Image tirée de (Shklarsh *et al.*, 2012). **C.** Swarming de *P. aeruginosa* sur un milieu gélosé à 0,5% (Photo : May Landry).

1.4 Les rhamnolipides

Plusieurs bactéries réalisant la motilité *swarming* vont synthétiser un agent mouillant permettant de diminuer la tension de surface et facilitant ainsi le déplacement. Nous retrouvons parmi ces molécules les rhamnolipides, molécules amphipathiques produites par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Le biosurfactant de *P. aeruginosa* est composé d'une ou deux molécules de rhamnose rattachées à un complexe d'acide gras β -hydroxydecanoyl-B-hydroxydecanoate (HAA) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Déziel *et al.*, 2003, Kohler *et al.*, 2000). La production de ce biosurfactant est régulée par le *quorum sensing* tel que décrit précédemment. La biosynthèse des rhamnolipides est possible grâce aux gènes *rhIA*, *rhIB* et *rhIC*. Le gène *rhIA* est impliqué dans la synthèse du précurseur (HAA) (Déziel *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2008), le gène *rhIB* code pour une rhamnosyltransférase qui catalyse la réaction de transfert permettant d'obtenir les mono-rhamnolipides (Ochsner *et al.*, 1994). Le gène *rhIC* permet l'ajout

d'une seconde molécule de rhamnose et donc la création des di-rhamnolipides (Rahim *et al.*, 2001). La voie de synthèse des rhamnolipides est illustrée à la figure 4. Ces molécules peuvent avoir aussi de nombreux rôles autres que leur implication dans la motilité bactérienne.

Les rhamnolipides sont considérés notamment comme facteurs de virulence, molécules antimicrobiennes et modulateurs de la réponse immunitaire (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Les biosurfactants peuvent aussi faciliter l'acquisition de nutriments tels que des composés hydrophobes en augmentant leur solubilité, les rendant donc plus disponibles pour les bactéries (Beal *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 1995). Les rhamnolipides sont aussi impliqués dans la motilité de type *swarming* tel que décrit plus haut (1.3.3). Les di-rhamnolipides agissent en attirant les cellules *swarmers* tandis que les HAA sont des répulsifs efficaces (Tremblay *et al.*, 2007). Les mono-rhamnolipides agissent alors comme agent mouillant permettant le déplacement des cellules sur la surface. Les travaux de Tremblay *et al.* (2007) proposent que les différents congénères des rhamnolipides ont des rôles variés menant à l'obtention du patron dendritique reconnu chez *P. aeruginosa*. L'implication des rhamnolipides dans la ramification du patron *swarming* chez *P. aeruginosa* est décrit plus en détails à la section 1.8.1.

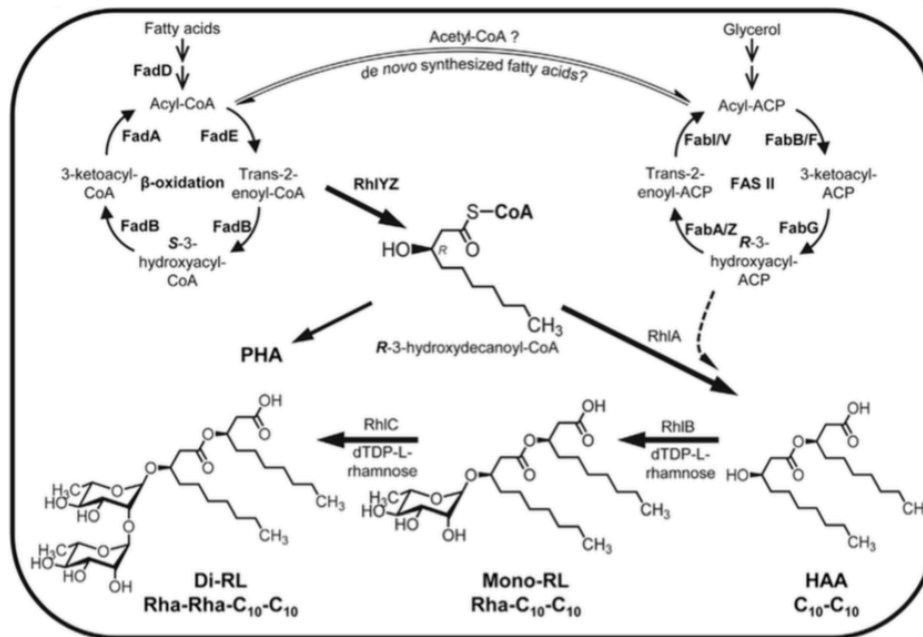


Figure 4. Voie de synthèse des rhamnolipides

Le gène *rhlA* est responsable de la conversion de 2 molécules de β -Hydroxyacyl-ACP en HAA. Les rhamnosyltransférases *rhlB* et *rhlC* ont par la suite la tâche d'ajouter les molécules de rhamnose produisant ainsi les mono et di-rhamnolipides. Schéma tiré de (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014).

1.4.1 Le concept de bien public et des tricheurs

Les rhamnolipides sont produits en très grande quantité par la bactérie *P. aeruginosa*. Ceux-ci peuvent représenter plus de 20% de la biomasse totale de la colonie bactérienne (Boyle *et al.*, 2017). Lorsque les rhamnolipides se retrouvent dans l'environnement, ils deviennent donc accessibles à tous et sont alors considérés comme un bien public qui peut être exploité. Le bien public est un concept originaire du domaine de l'économie qui indique qu'une ressource est accessible à tous les individus d'une population, peu importe qui est responsable de sa production (Boyle *et al.*, 2017, Xavier, 2016). Le bien public est alors à risque d'être utilisé par des individus «tricheurs» (*cheaters*) sans qu'ils aient besoin de dépenser d'énergie pour le produire (Diggle *et al.*, 2007, Hibbing *et al.*, 2010b). Si la production du bien public est coûteuse pour l'organisme, il y a aura donc une forte pression sélective de la part des tricheurs à l'exploiter et ainsi économiser leurs ressources énergétiques (Xavier, 2016). On peut retrouver un exemple concret de ce concept notamment dans les poumons des personnes atteintes de fibrose kystique. On y isole la bactérie *P. aeruginosa* sauvage mais aussi des souches mutantes dans le gène *lasR* codant pour un régulateur transcriptionnel du *quorum sensing*. Celui-ci est impliqué dans la

régulation de la production de nombreux facteurs de virulence comme les protéases, le cyanure d'hydrogène et la pyocyanine (D'Argenio *et al.*, 2007, Hibbing *et al.*, 2010a). La bactérie sans *LasR* fonctionnel ne produira pas de protéases extracellulaires mais pourra se servir de celles produites par ses voisins *P. aeruginosa* sauvages. Cette économie lui permettra d'avoir un taux de croissance plus rapide que ses confrères sauvages (Hibbing *et al.*, 2010a).

1.4.2 La prudence métabolique

Un phénomène découlant de la présence des tricheurs peut aussi être observé, soit la prudence métabolique. Il s'agit d'un mécanisme de régulation qui permet de protéger l'utilisation des biens publics par les tricheurs (Boyle *et al.*, 2017), ce qui évite la disparition de la communauté par manque de génotype sauvage. Différents biens publics sont prisés par les tricheurs tels que les protéases, les sidérophores et les rhamnolipides. Ces derniers ne sont pas exploitables grâce à la prudence métabolique (Xavier *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* évite de gaspiller ses ressources métaboliques précieuses en exprimant les gènes responsables de la biosynthèse des rhamnolipides seulement lorsque la colonie est assez peuplée et que les individus ont un surplus de carbone disponible (Boyle *et al.*, 2017). Au contraire, si la quantité de carbone disponible dans l'environnement est trop faible, l'expression des gènes *rhl* sera inhibée (Boyle *et al.*, 2017).

1.5 Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène d'actualité car celui-ci prends de l'ampleur rapidement (Spellberg, 2014). L'avènement des antibiotiques dans le domaine de la médecine a été un moment décisif dans l'avenir de la santé humaine car il était désormais possible de traiter de nombreuses infections auparavant incurables (Spellberg, 2014). La surutilisation de ces nouveaux traitements a cependant eu un effet négatif sur la santé publique, soit l'apparition de la résistance aux antibiotiques. Non seulement les microorganismes ont acquis une résistance à certains antibiotiques, plusieurs ont aussi commencé à démontrer une résistance multiple (Irazoki *et al.*, 2017). Le phénomène de multirésistance aux antibiotiques n'est pas unique aux espèces issues des environnements hospitaliers. Certaines souches bactériennes environnementales, par exemple isolées de la rhizosphère de nombreuses plantes démontrent une forte résistance aux antibiotiques. Cette résistance pourrait être dû à une compétition locale élevée, à la présence d'antibiotiques dans la rhizosphère mais aussi au transfert horizontal de gènes qui serait stimulé (Berg *et al.*, 2005).

Différents mécanismes sont utilisés par les microorganismes pour résister aux antibiotiques. Parmi ceux-ci nous retrouvons entre autre l'utilisation d'enzymes telles que les β -lactamases pour inactiver les molécules antibiotiques (Fernandez *et al.*, 2012, Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). Des mutations peuvent aussi se produire et affecter la cible intracellulaire de l'antibiotique. La bactérie peut aussi utiliser des pompes à efflux en expulsant les molécules antibiotiques de manière très efficace. Un dernier mécanisme retrouvé est la modification de la membrane cellulaire permettant de limiter les interactions de celle-ci avec l'antibiotique. Cette modification peut aussi agir sur les porines membranaires et permet donc de limiter la pénétration des molécules antimicrobiennes (Fernandez *et al.*, 2012, Hancock *et al.*, 2000). Ces différents mécanismes peuvent agir individuellement ou en synergie avec d'autres pour augmenter l'efficacité de la résistance.

1.5.1 La résistance adaptative

La résistance adaptative se produit après le premier contact d'un microorganisme avec un antibiotique à des concentrations sous-inhibitrices dans un environnement donné (Butler *et al.*, 2010, Daikos *et al.*, 1991). La présence de ces concentrations faibles sont souvent dues à des gradients en réponse à la présence de biofilm, comme par exemple dans les voies respiratoires des personnes atteintes de fibrose kystique (Linares *et al.*, 2006). Cette forme de résistance ne mène pas à la sélection de mutants résistants, mais permet à la bactérie de s'adapter temporairement à la présence de ces antibiotiques. Cette forme de résistance est instable et réversible (Butler *et al.*, 2010, Daikos *et al.*, 1991). Les travaux de Lai *et al.* (2009) démontrent un bel exemple que la résistance est temporaire notamment chez la bactérie *P. aeruginosa* en *swarming*. La colonie en *swarming* ne montre pas de variation dans son patron même suite à l'ajout de disques avec antibiotiques sur le milieu de culture. Les cellules de l'extrémité des dendrites ont été prélevées et ré-inoculées en milieu liquide. Les cellules planctoniques ainsi obtenues redeviennent susceptibles aux antibiotiques démontrant que cette résistance est temporaire et survient dans une situation particulière.

1.5.2 La résistance intrinsèque

Lorsqu'un microorganisme présente une résistance à un composé antibiotique sans jamais avoir été en contact avec celui-ci, on dit alors qu'il s'agit d'une résistance intrinsèque. Dans ce cas, les caractéristiques de l'organisme lui permettent de limiter l'efficacité des antibiotiques (Fernandez *et al.*, 2012). On retrouve parmi ces caractéristiques notamment la faible perméabilité de la membrane externe ainsi que l'action constitutive des pompes à efflux (Fernandez *et al.*, 2012, Hancock *et al.*, 2000). Cette résistance est donc transmise verticalement à la génération suivante (Fernandez *et al.*, 2012).

1.5.3 La résistance acquise

Dans certains cas, un microorganisme susceptible à un antibiotique à l'origine peut devenir résistant. Cette résistance acquise peut s'obtenir en intégrant du nouveau matériel génétique tel qu'un plasmide ou un transposon. Une autre façon d'acquérir cette résistance est par le résultat de mutations spontanées, par exemple survenues lors de la réplication du génome de l'organisme. Cette forme de résistance peut être transmise à la génération suivante (Fernandez *et al.*, 2012, Hancock *et al.*, 2000). Le concept de compromis évolutif (*trade-off*) indique que l'acquisition de la résistance a un coût sur un autre trait chez la bactérie touchée (Ferenci, 2016). Différents exemples sont rapportés tels que l'augmentation de la résistance induit une diminution de l'acquisition des nutriments en influençant la taille des porines (Ferenci, 2016).

1.5.4 Les autres effets des antibiotiques

Les molécules antibiotiques sont surtout connues pour leur utilisation dans les traitements pour éradiquer des infections bactériennes, mais ce n'est pas leur seul effet. Dans des études récemment publiées, il a été démontré que l'utilisation d'antibiotiques à des concentrations sous-inhibitrices ne causerait pas nécessairement l'éradication des pathogènes compétiteurs mais pourrait influencer leur croissance de manière favorable. L'ajout de tobramycine à des concentrations sous-inhibitrices augmente la formation de certains biofilms bactériens (Linares *et al.*, 2006). Dans l'optique où un composé antimicrobien démontre une action contraire à son effet initialement désiré, il est intéressant de s'attarder au phénomène d'hormèse. Les composés hormétiques induisent des réponses contraires en fonction de la dose reçue qui peut être soit forte ou faible (Linares *et al.*, 2006). Ainsi, une dose très faible peut induire des effets bénéfiques tandis

qu'une dose très concentrée peut être dangereuse et même létale. Un exemple concret de l'effet hormétique des antibiotiques a été rapporté par les travaux de Mathieu *et al.* (2016). Des concentrations sous-inhibitrices d'ampicilline ont démontré avoir un effet hormétique sur des cultures d'*E. coli*. Les bactéries ont démontré une augmentation de leur métabolisme, de leur transcription et de leur capacité à réparer les dommages et à se protéger. Étant donné la variation constante de la présence d'antibiotiques dans un environnement, la réponse hormétique jouerait un rôle important dans l'augmentation de la résistance chez les bactéries (Mathieu *et al.*, 2016). Les antibiotiques peuvent aussi affecter l'expression de différents gènes au sein d'une communauté microbienne (Davies, 2007, Yim *et al.*, 2007). La transcription de certains gènes bactériens pourrait donc être stimulée ou diminuée suite à l'utilisation de concentrations très faibles d'antibiotiques (Goh *et al.*, 2002).

1.6 Les biofilms

Les biofilms représentent une communauté hétérogène complexe composée d'une seule ou plusieurs espèces microbiennes pouvant se développer sur un éventail de surfaces tant biotiques qu'abiotiques (Lindsay *et al.*, 2006, Mah *et al.*, 2001). Les bactéries peuvent ainsi s'attacher à une surface et par la suite s'encapsuler dans une matrice protectrice de substances polymériques extracellulaires, une caractéristique clé de la vie en biofilm (Costerton *et al.*, 1999, Lai *et al.*, 2009, Mah *et al.*, 2001). Cette forme de vie permet aux bactéries de se protéger des conditions souvent changeantes et difficiles de leur environnement (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Elles se trouvent aussi mieux défendues contre la sécheresse, les défenses immunitaires de l'hôte, les molécules antimicrobiennes et peuvent aussi favoriser l'acquisition des nutriments (Drenkard, 2003). Tel que mentionné précédemment à la section 1.4.1, les bactéries profitent des biens publics présents dans leur environnement. Les cellules vivant dans le biofilm partagent entre-elles de nombreuses molécules telles que des enzymes et des sidérophores (Xavier *et al.*, 2007).

1.6.1 Pathogénicité associée aux biofilms

Les biofilms sont reconnus comme étant très résistants aux antibiotiques. Dans certains cas, les biofilms peuvent démontrer une résistance jusqu'à 1000 fois plus importante que chez les cellules planctoniques (Hoiby *et al.*, 2010, Nickel *et al.*, 1985). Une problématique majeure des biofilms est leur formation sur le matériel médical tel que les cathéters, les lentilles cornéennes et

les implants orthopédiques (Mah *et al.*, 2001). Ceux-ci sont aussi retrouvés en grande partie dans les robinets et drains hospitaliers favorisant ainsi leur croissance (Costerton *et al.*, 1999, Lalancette *et al.*, 2017). Les biofilms sont aussi présents dans le domaine de la santé buccale. Une centaine d'espèces ont été associées à la plaque dentaire et à la formation des biofilms causant entre autre la carie et la gingivite (O'Toole *et al.*, 2000, Parsek *et al.*, 2004). Les biofilms sont associés à de nombreuses infections nosocomiales telles que rapportées par Costerton *et al.* (1999). On retrouve parmi les pathogènes des espèces telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Ce dernier et son implication particulière dans les infections nosocomiales sera abordé à la section 1.8.2. (Costerton *et al.*, 1999, Mah *et al.*, 2001)

1.7 La fibrose kystique

La fibrose kystique est une maladie héréditaire autosomale récessive très importante. Il s'agit de la maladie génétique létale la plus commune chez les Caucasiens (Lipuma, 2010). Elle est due à un défaut génétique de la protéine régulatrice de la conductance transmembranaire. Celle-ci est responsable du transport des ions à la surface apicale des cellules épithéliales des voies respiratoires (Gilligan, 1991). Les patients souffrant de fibrose kystique présentent une forte accumulation de mucus pulmonaire (*sputum*) qui prédispose à la colonisation polymicrobienne des voies respiratoires. Les microorganismes présents dans cette communauté démontrent une résistance accrue face aux traitements antibiotiques traditionnels (Limoli *et al.*, 2017, Linares *et al.*, 2006). Les infections chroniques causent une forte réponse inflammatoire qui mène éventuellement à la destruction des tissus respiratoires et à une diminution de leur fonctionnement (Yang *et al.*, 2011). Les patients atteints sont donc co-infectés par une communauté bactérienne diverse tout au long de leur vie, qu'il s'agisse de bactéries, de virus ou même d'organismes fongiques (Harrison, 2007, Limoli *et al.*, 2017).

1.7.1 Écosystème des voies respiratoires

Les voies respiratoires sont un système ouvert permettant l'entrée et l'établissement de nombreux microorganismes (Yang *et al.*, 2011). Le tractus pulmonaire se transforme en véritable écosystème dynamique composé de multiples espèces bactériennes aérobies et anaérobies (O'Brien *et al.*, 2017). Des mutations de la protéine régulatrice de la conductance transmembranaire causent une diminution sérieuse de l'efficacité des défenses immunitaires innées de l'hôte (Hartl *et al.*, 2012). Chez les patients atteints, l'augmentation de la viscosité du mucus pulmonaire rend l'élimination des pathogènes difficile. Les poumons deviennent donc colonisés par plusieurs espèces bactériennes tel que démontré à la figure 5 (Harrison, 2007, Knowles *et al.*, 2002).

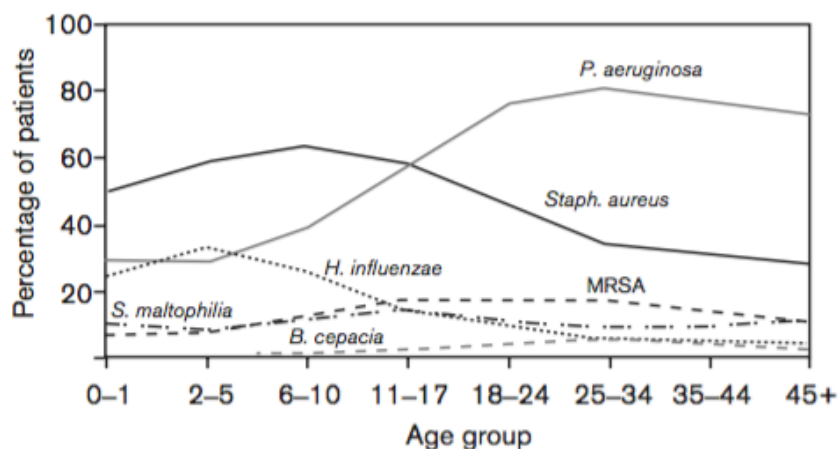


Figure 5. Présence des bactéries pathogènes chez les patients atteints de fibrose kystique à travers les années.

Données recueillies par la fondation de la fibrose kystique (2004) démontrant la prévalence des différents pathogènes pulmonaires au cours de la vie des patients. Image tirée de (Harrison, 2007)

Malgré cette forte colonisation, seulement quelques espèces sont régulièrement associées à la fibrose kystique (Yang *et al.*, 2011). Différentes études ont démontré la présence de plus d'une douzaine de genres bactériens présents dans les poumons des patients atteints de cette maladie (Carmody *et al.*, 2015, Harrison, 2007, Price *et al.*, 2013). On y retrouve les espèces *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cenocepacia* et d'autres BCC (*Burkholderia Cepacia* Complex) (Bragonzi *et al.*, 2012, Harrison, 2007, Price *et al.*, 2013). Les interactions entre ces bactéries seraient autant synergiques qu'antagonistes et cette dynamique permettrait l'évolution de la population au fil de la vie des individus atteints (Harrison, 2007). Un phénomène observé lors de la présence de certaines BCC est le syndrome *cepacia*. Les individus

colonisés par cette espèce peuvent ne démontrer aucun signe particulier et soudainement exprimer une pneumonie nécrosante menant à une septicémie (Baldwin *et al.*, 2007, Sajjan *et al.*, 2000). On retrouve aussi au sein des infections des voies respiratoires le groupe *Streptococcus milleri* (Sibley *et al.*, 2008). Ce groupe est composé de *S. intermedius*, *S. anginosus* et *S. constellatus* (Whiley *et al.*, 1990). Il a été démontré par une étude de Price *et al.* (2016) que la présence de tobramycine cause une augmentation de la formation de biofilm par *P. aeruginosa* et *S. constellatus* chez les patients atteints de fibrose kystique. On retrouve aussi dans les voies respiratoires des espèces fongiques et virales (Lipuma, 2010). Le champignon filamenteux *Aspergillus fumigatus* y est présent et serait la cause d'une réponse inflammatoire allergique chronique (Lipuma, 2010). D'autres espèces fongiques telles que *Scedosporium*, *Exophiala dermatitidis* et *Candida* sp. sont aussi présents (Lipuma, 2010). Des espèces virales sont aussi retrouvées telles que le virus syncytial respiratoire (RSV) et l'Influenza (Lipuma, 2010).

1.7.2 Mutations fréquentes

Les pathogènes présents dans les voies respiratoires sont constamment soumis à des pressions sélectives environnementales et à divers traitements médicaux. Ces pressions causent alors des modifications au niveau des phénotypes observés (Harrison, 2007, Yang *et al.*, 2011). Une de ces modifications est la transition vers un phénotype mucoïde de la bactérie *P. aeruginosa* suite à la perte du gène *mucA* (Hancock *et al.*, 2000, Hogardt *et al.*, 2010). L'émergence de mutants mucoïdes est associée à la détérioration du fonctionnement pulmonaire et aussi à une augmentation des dommages tissulaires (Hogardt *et al.*, 2010). Le changement vers ce phénotype mucoïde indique généralement un point de non-retour où l'infection pulmonaire ne peut être éradiquée (Govan *et al.*, 1996, Hancock *et al.*, 2000). Les mutations retrouvées chez *P. aeruginosa* au niveau des voies respiratoires démontrent aussi une perte de motilité et un accroissement de sa résistance aux antibiotiques (Sibley *et al.*, 2008).

Un autre gène fréquemment inactivé chez *P. aeruginosa* est *lasR*. Celui-ci code pour un régulateur transcriptionnel du système QS permettant l'expression de facteurs de virulence (D'Argenio *et al.*, 2007). Le gène *lasR* a été préalablement décrit à la section 1.4.1. Une des particularités des souches mutantes *lasR* est sa croissance plus rapide que la souche sauvage dans certaines conditions, notamment avec l'ajout de phénylalanine, d'isoleucine et de tyrosine (D'Argenio *et al.*, 2007). Ce trait est important car les sécrétions des individus atteints de fibrose kystique sont très riches en acides aminés (Barth *et al.*, 1996). Cette caractéristique pourrait

conférer un avantage conséquent lors d'infections chroniques surtout en présence d'autres organismes (Hibbing *et al.*, 2010a).

1.8 La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste à Gram-négatif causant des infections chez les individus immunocompromis, les grands brûlés ainsi que chez les individus atteints de fibrose kystique (Jelsbak *et al.*, 2007, Lipuma, 2010). L'infection des voies respiratoires causée par *P. aeruginosa* chez ces derniers est responsable du déclin du fonctionnement pulmonaire et mène à la mortalité (Lyczak, 2002). On la retrouve aussi dans les sols et les environnements humides tels que les systèmes de plomberie des édifices (Bedard *et al.*, 2016). Cette bactérie est retrouvée sous forme de bacille et porte un flagelle polaire permettant à la cellule de se déplacer dans les milieux aqueux (Kearns, 2010, Kohler *et al.*, 2000). Une des majeures problématiques liée à ce microorganisme est sa résistance intrinsèque aux antibiotiques (Morita *et al.*, 2014). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié en Février 2017 une liste des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques. La bactérie *P. aeruginosa* se retrouve parmi les organismes pour lesquels il est critique de développer de nouveaux antibiotiques (Organisation Mondiale de la Santé 2018).

1.8.1 La motilité

P. aeruginosa est une bactérie pouvant réaliser trois types de motilité, soit le *swimming*, le *twitching* et le *swarming* (Kohler *et al.*, 2000). Sa capacité à se déplacer de toutes ces façons est due à la présence de flagelle fonctionnel, de pili de type IV mais aussi de la production d'un agent mouillant (rhamnolipides) permettant d'abaisser la tension de surface au pourtour de la colonie (Tremblay *et al.*, 2010). Chez cette bactérie, le *swarming* montre un patron dendritique bien défini (Fig. 3C). La présence de ce patron particulier serait dû à la sécrétion de surfactants tel que décrit en détails à la section 1.4. Pour initier une infection aiguë, par exemple chez des individus atteints de fibrose kystique, la motilité est requise (Smith *et al.*, 2006).

1.8.2 Les infections nosocomiales

Les risques d'infections nosocomiales causées *P. aeruginosa* sont accrues chez les patients immunodéprimés mais aussi chez ceux montrant des plaies extensives telles que chez

les grands brûlés (Lipuma, 2010, Moradali *et al.*, 2017). Les infections acquises en milieu hospitalier sont aussi fréquentes chez les patients traités par ventilation mécanique ou portant des cathéters veineux ou urinaires (Hall-Stoodley *et al.*, 2004, Hancock *et al.*, 2000). De plus, *P. aeruginosa* est retrouvée au niveau des robinets et drains hospitaliers, ce qui augmente les risques d'infections nosocomiales (Lalancette *et al.*, 2017). De nombreux organismes sont couramment associés aux infections nosocomiales dont *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *P. aeruginosa* (Costerton *et al.*, 1999). D'autres espèces environnementales opportunistes sont aussi impliquées dans ces infections (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

1.8.3 Résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa est un pathogène bien connu pour sa résistance à de nombreux antibiotiques. Cette résistance intrinsèque serait dû en particulier à sa membrane externe relativement imperméable ainsi qu'à la présence de pompes à efflux (Hancock *et al.*, 2000, Lai *et al.*, 2009). La structure de la membrane des bactéries à Gram-négatif est primordiale dans le phénomène de résistance. La membrane externe est composée d'une bicouche asymétrique de phospholipides (feuillet périplasmique) et de lipopolysaccharides (feuillet externe) (Beveridge, 1999, Hancock *et al.*, 2000). Celle-ci porte de nombreuses porines formant des canaux aqueux permettant la diffusion de molécules hydrophiles telles que les antibiotiques (Hancock *et al.*, 2000). On retrouve aussi l'implication de systèmes de pompes à efflux permettant la résistance chez *P. aeruginosa* dont MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY-OprnM et MexEF-OprN (Homa *et al.*, 2018). Une des pompes majeure impliquée dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques est MexAB-OprM (Li *et al.*, 2000).

Un autre mécanisme de résistance est dû à la présence de β -lactamases périplasmiques. Celles-ci permettent la dégradation par hydrolyse des β -lactames (Hancock *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* utilise une stratégie visant la tolérance aux antibiotiques. La présence de composés antibiotiques cause une adaptation au stress et permet de produire des cellules persistantes et tolérantes (Viducic *et al.*, 2017). La présence de ces cellules tolérantes est la cause principale des infections récurrentes de *P. aeruginosa* (Viducic *et al.*, 2017). La forte multi-résistance aux antibiotiques de cet organisme ainsi que sa capacité d'adaptation rend donc les traitements très difficiles (Fernandez *et al.*, 2010, Hancock *et al.*, 2000). Le phénomène de résistance aux antibiotiques est approfondi à la section 1.5.

1.8.4 Pili de type IV

Les pili de type IV sont des filaments protéiques pouvant atteindre un diamètre maximal de 6 nm et une longueur moyenne de 5 μ m (Giltner *et al.*, 2012, Merz *et al.*, 2002). Les filaments sont formés de monomères de la protéine PilA en un assemblage hélicoïdal et sont présents aux pôles de la cellule (Anyan *et al.*, 2014, Kang *et al.*, 1997, Wall *et al.*, 1999). Ces pili sont généralement impliqués dans la motilité bactérienne nommée *twitching* (voir section 1.3.2). Lors de cette motilité, les pili s'étirent et se rétractent pour permettre à la cellule de glisser sur une surface sans utiliser son ou ses flagelles. Cette rétractation impliquerait la dépolymérisation de la base du filament qui lui permettrait de se fondre à la membrane cellulaire (Merz *et al.*, 2002). Les pili de type IV seraient aussi impliqués dans la motilité *swarming* chez *P. aeruginosa*. Lorsqu'une souche ne possède pas de pili IV ($\Delta pilA$) celle-ci démontre un phénotype *hyperswarmer* (Anyan *et al.*, 2014). D'autres études ont rapportées que le mutant *pilA*- démontre une diminution importante du *swarming* contrairement à ce qui a été observé par Anyan *et al.* (2014), (Burrows, 2012, Jean-Pierre, 2017, Kohler *et al.*, 2000).

Les pili de type IV sont capables de soutenir une tension très forte dû aux liaisons hydrophobes et ioniques entre les sous-unités des pilines (Kaiser, 2000). Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes d'assemblages des pili de type IV sont retrouvés (voir fig.6). Les deux sous-familles majeures sont les IVa et IVb. Une troisième sous-famille se nomme IVb-Tad pour « *tight adherence pili* » (Burrows, 2012). Les systèmes de type IVb et IVb-Tad ne seraient pas impliqués dans la motilité bactérienne car ceux-ci ne possèdent pas un orthologue de PilT, une ATPase impliquée dans la rétraction du pili (Burrows, 2012).

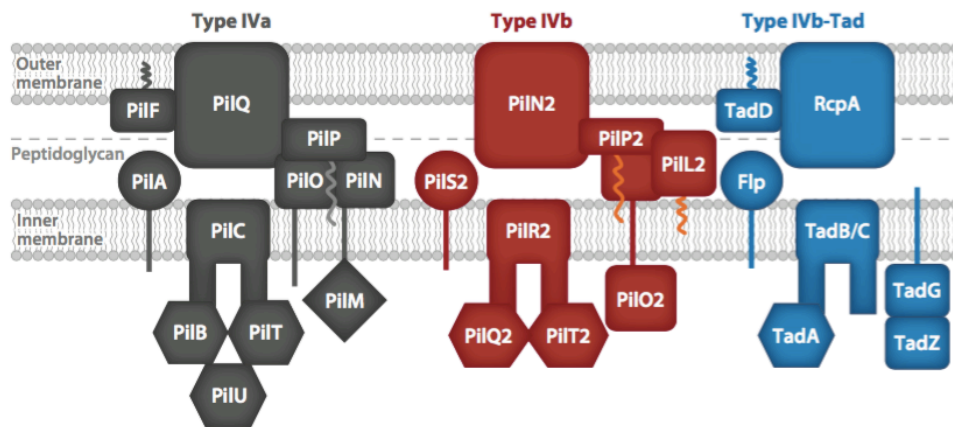


Figure 6 : Schéma représentant les 3 systèmes d'assemblage des pili de type IV chez *P. aeruginosa*. Les pili de types IVa et IVb représentent les 2 sous-familles majeures de pili. Les pili IVb-Tad sont nommés ainsi pour « tight adherence pili ». *P. aeruginosa* est la seule souche à comporter les 3 systèmes de pili IV simultanément. Image tirée de l'article de Burrows, 2012.

1.8.5 Pili Cup

Les pili de type *cup* tirent leur nom de « *chaperone usher pathway* ». Cette voie de synthèse contient les composantes nécessaires pour permettre l'assemblage des sous-unités de pilines permettant la formation de pili de type fimbriae à la surface des bactéries à Gram négatif (Vallet *et al.*, 2004). Trois éléments sont nécessaires pour permettre l'assemblage des pili *cup*, soit une protéine de la membrane externe (*usher*), une chaperonne périplasmique ainsi qu'une sous-unité de fimbriae (Giraud *et al.*, 2012). Les gènes *cup* sont regroupés en opérons (voir Annexe II). Chez *P. aeruginosa*, il y a présence de cinq opérons, soit *cupA*, *cupB*, *cupC*, *cupD* et *cupE* mais seulement *cupA* serait nécessaire pour permettre la formation de biofilms sur les surfaces abiotiques (Vallet *et al.*, 2004, Vallet *et al.*, 2001). L'opéron *cupA* est aussi impliqué dans l'organisation structurelle des biofilms indépendamment aux pili de type IV (Vallet *et al.*, 2001). L'opéron *cupD* est retrouvé seulement chez PA14 et se trouve sur l'ilot de pathogénicité PAPI-1 acquis horizontalement (Mikkelsen *et al.*, 2013, Vallet *et al.*, 2004, Vallet *et al.*, 2001). L'opéron *CupD* est impliqué dans l'augmentation de l'attachement des cellules et serait donc un facteur important de la formation de biofilm (Mikkelsen *et al.*, 2013). Chaque opéron est composé de gènes codants pour une chaperonne, un *usher* et au moins une sous-unité de piline (Giraud *et al.*, 2012). Les rôles de ce type de pili dans la motilité bactérienne reste inconnue et très peu étudiée.

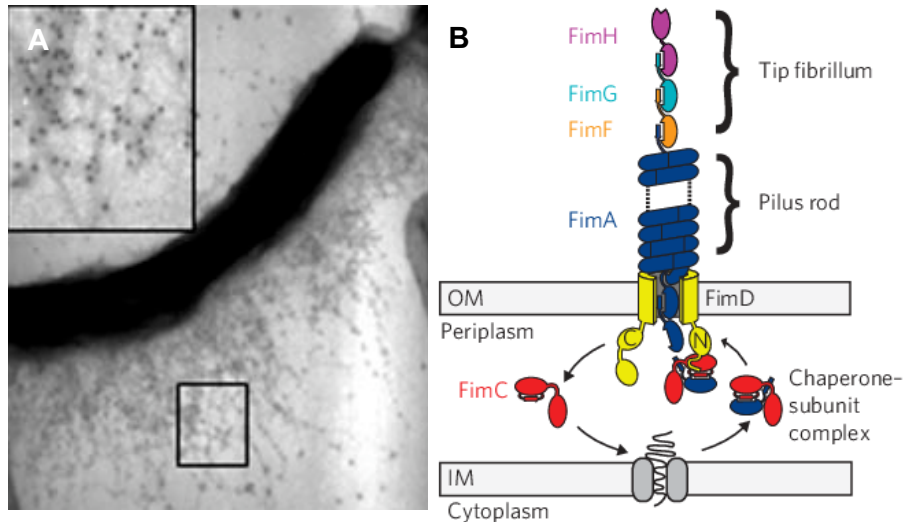


Figure 7. Microscopie des fimbriae de type cup et représentation graphique de ceux-ci.

A. Image microscopique (x20 000) des fimbriae péritriches de type *cup* B et C chez *P. aeruginosa* PAO1 Δ *pilA* Δ *fliC*. Des particules d'or couplées à des anticorps spécifiques de *CupC1* ont été utilisés. Image tirée de (Ruer *et al.*, 2007). **B.** Représentation graphique du modèle d'assemblage cup chez *E. coli*. Ici FimC agit en tant que chaperonne amenant les sous-unités de pilines à l'usher FimD situé dans la membrane externe. Ce dernier permet la translocation des sous-unité FimA hors du périplasm et permet l'assemblage des fimbriae. Image tirée de (Crespo *et al.*, 2012)

1.8.6 Flagelle

Les flagelles sont des longs filaments hélicoïdaux qui permettent aux bactéries de se déplacer dans des environnements aqueux (Berg, 2003). Ceux-ci peuvent être péritriches, c'est-à-dire retrouvés en répartition uniforme à la surface de la cellule comme chez *E. coli* ou monotriches c'est-à-dire à un pôle de la cellule tel que chez *P. aeruginosa* (Berg, 2003, Kearns, 2010). Les flagelles sont composés de multiples sous-unités de flagellines avec à leur base un moteur encastré dans la membrane de la cellule. Ce moteur permet la rotation du flagelle soit dans un sens horaire ou antihoraire. Le changement de direction de la rotation va influencer la direction de déplacement de la bactérie dans son environnement dû au chimiotactisme (Berg, 2003). Les flagelles sont nécessaires pour la motilité bactérienne de *P. aeruginosa* lorsque celle-ci effectue du *swarming* ou du *swimming*.

1.9 Le genre *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* a été décrit pour la première fois en 1992 par Yabuuchi et collègues et regroupe environ une centaine d'espèces à ce jour (Eberl *et al.*, 2016, Yabuuchi *et al.*, 1992). Les organismes présents dans ce genre sont retrouvés à différents endroits dans l'environnement tel que dans l'eau, le sol et plus spécialement au niveau de la rhizosphère (Eberl *et al.*, 2016, Vial *et al.*, 2011). Cette zone située à proximité des racines de plantes est un réservoir naturel de nombreuses espèces dû à une abondance de nutriments (Berg *et al.*, 2005). Parmi le genre *Burkholderia*, on retrouve des espèces phytopathogènes telles que *B. cepacia*, responsable de la pourriture molle des oignons ainsi que *B. caryophylli* et *B. gladioli* (Eberl *et al.*, 2016). D'autres espèces sont responsables d'infections animales et humaines importantes et sont discutées plus en détail dans la section suivante portant sur les BCC.

1.9.1 Les BCC

Le *Burkholderia cepacia Complex* (BCC) est un regroupement bactérien complexe auquel de nombreuses espèces s'ajoutent à chaque année (De Smet *et al.*, 2015, Tuanyok, 2017). Ces espèces sont reliées génétiquement et capables de coloniser de nombreuses niches écologiques autant environnementales qu'animales (Castillo-Juarez *et al.*, 2015, Eberl *et al.*, 2016, Vial *et al.*, 2011). On y retrouve des espèces très efficaces pour promouvoir la croissance et la santé des plantes et pouvant aussi intervenir dans la biorestauration des sols en dégradant de nombreux polluants récalcitrants (Eberl *et al.*, 2016, Vial *et al.*, 2011). On retrouve aussi au sein de ce groupe des pathogènes opportunistes tels que *B. cenocepacia* et *B. multivorans* pouvant causer des infections chroniques chez les personnes atteintes de fibrose kystique mais aussi chez les individus au système immunitaire déficient (Eberl *et al.*, 2016, Loutet *et al.*, 2010). Toutes les souches retrouvées au sein des BCC ont été isolées du sputum d'individus atteint de fibrose kystique sauf *B. ubonensis* qui est considérée non pathogène et présente dans les sols (Eberl, 2006, Lipuma, 2010, Price *et al.*, 2017). On retrouve au sein des BCC des espèces telles que *B. cepacia*, *B. cenocepacia* et *B. ambifaria* (Eberl *et al.*, 2016). La versatilité des BCC lorsqu'il est question du choix d'environnement pourrait s'expliquer par leur génome en multiréplicon ainsi que la présence de nombreuses séquences d'insertion (Mahenthiralingam *et al.*, 2005, Vial *et al.*, 2011).

1.9.2 Les pili chez *Burkholderia*

On retrouve 5 sortes de pili chez les BCC mais un seul est associé aux souches épidémiques soit les pili câble ou *cbl*, nommés en fonction de leur apparence ressemblant à un câble torsadé (Sajjan *et al.*, 1995; Mahenthiralingam *et al.*, 2005). *B. cenocepacia* possède ces pili *cbl* agissant comme facteur de virulence (Cheung *et al.*, 2007, Mahenthiralingam *et al.*, 2005). Ceux-ci sont différents des pili de type IV chez *P. aeruginosa* car ils induisent l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires sans impliquer le système de sécrétion de type III (Cheung *et al.*, 2007). Les pili *cbl* sont larges (2 à 4 nm) et se trouvent sur toute la surface de la cellule (péritriches)(Sajjan *et al.*, 1995). Les pili *cbl* sont associés à une adhésine de 22 kDa, nécessaire pour l'adhésion de l'organisme à la mucine présente chez un hôte (Sajjan *et al.*, 1995). Des gènes codants pour les pili de type IV ont été retrouvés chez la bactérie *B. dolosa* PC543, ainsi que deux zones codantes pour des homologues des pili Tad présents chez *P. aeruginosa* et décrit plus en détails à la section 1.8.4 (Bernier *et al.*, 2017).

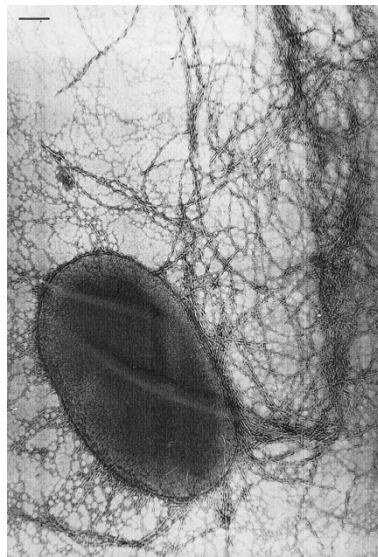


Figure 8. Microscopie électronique de *B. cepacia* exprimant les pili *Cbl* de type II
Répartition péritriche des pili *cbl* chez *B. cepacia*. Échelle = 0,1 μ m. Image tirée de Sajjan *et al.* (1995)

1.9.3 Flagelle

Les membres des BCC expriment 2 types de flagellines. Le type I de 55 kDa et le type II de 45 kDa (Mahenthiralingam *et al.*, 2005, Urban *et al.*, 2004). Les flagelles sont impliqués non seulement dans la motilité mais aussi dans l'adhérence aux cellules épithéliales, dans la formation de biofilms ainsi que dans la réponse inflammatoire (Mahenthiralingam *et al.*, 2005, O'Toole *et al.*,

2000, Urban *et al.*, 2004). Chez *B. cenocepacia*, on retrouve un seul long flagelle polaire impliqué dans la motilité mais aussi dans la réponse immunitaire chez l'hôte (Urban *et al.*, 2004).

1.9.4 Le quorum sensing

Tous les membres des BCC codent pour au moins un système de *quorum sensing*. Tel que décrit plus haut (section 1.2), le *quorum sensing* est un mode de communication bactérien qui utilise des molécules chimiques comme signaux (Castillo-Juarez *et al.*, 2015, Eberl, 2006). Le système de *quorum sensing* des espèces du genre *Burkholderia* est composé d'une synthèse d'AHL CepI et d'un régulateur transcriptionnel CepR représenté à la figure 9 (Castillo-Juarez *et al.*, 2015, Eberl, 2006).

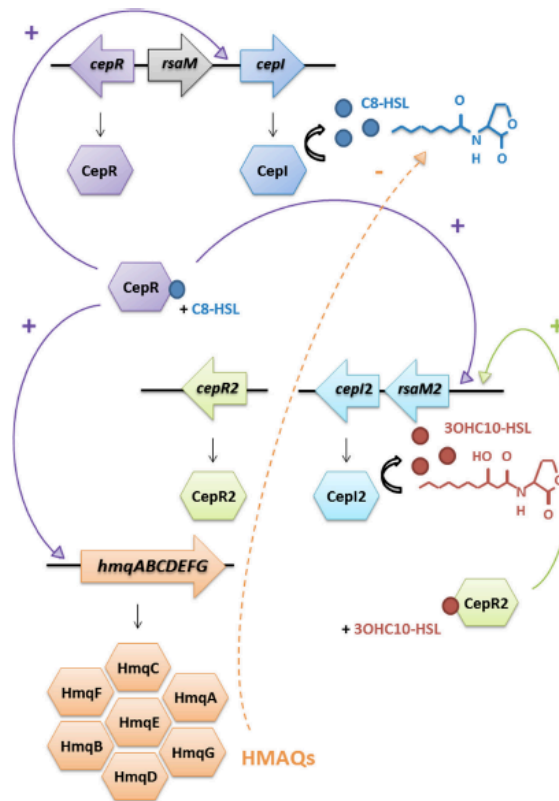


Figure 9 : Système de QS chez les BCC

Schéma représentant les différents gènes impliqués dans la communication cellulaire de type *quorum sensing* utilisant les acyl-homosérines lactones comme molécules de signalisation chez *B. ambifaria*. Le système CepI/CepR est aussi impliqué dans l'activation de l'opéron *hmqABCDEFG* responsable de la synthèse des HMAQ. Image tirée des travaux de (Chapalain *et al.*, 2017).

Le QS chez les BCC est impliqué notamment dans la formation de biofilm, de sidérophores, de protéases extracellulaires et de métabolites antifongiques (Eberl, 2006, Mahenthiralingam *et al.*, 2005). Le système CepIR affecte aussi la motilité *swarming* chez *B. cenocepacia* ainsi que les différents mécanismes associés à la colonisation d'hôtes lors d'infections (Eberl, 2006, Mahenthiralingam *et al.*, 2005).

1.9.5 Motilité

Étant donné la présence de flagelles chez une majorité des BCC, celles-ci peuvent réaliser une motilité de type *swimming* tel que chez *B. cepacia* (Tomich *et al.*, 2002, Urban *et al.*, 2004). Pour réaliser une motilité *swarming*, il a été décrit à la section 1.3.3 que deux caractéristiques sont indispensables. En effet, non seulement le microorganisme doit posséder un ou plusieurs flagelles fonctionnels, celui-ci doit aussi pouvoir produire un agent mouillant (surfactant) permettant d'abaisser la tension de surface (Henrichsen, 1972, Kearns, 2010). Différentes espèces de *Burkholderia* ont démontré une capacité à réaliser le *swarming*. C'est le cas notamment pour *B. thailandensis* (Dubeau, 2009) et *B. glumae*, un pathogène des plants de riz (Nickzad *et al.*, 2015). En effet, ces deux espèces produisent un agent mouillant, des rhamnolipides.

1.10 Problématique

La motilité de type *swarming* est étudiée depuis de nombreuses années mais les buts associés à ce mode de déplacement sont inconnus. Cette motilité est observée en conditions contrôlées en laboratoires mais son rôle dans d'autres environnements reste obscur. Étant donné que le mode de vie multicellulaire est favorisé par les microorganismes dans les écosystèmes naturels, et dans plusieurs infections, l'étude des différentes caractéristiques de ce mode de vie est primordial (Bernier *et al.*, 2016). De plus, la motilité bactérienne est effectuée par de nombreux organismes et leur permet de coloniser un environnement beaucoup plus efficacement (Harshey, 2003). La motilité peut aussi être impliquée dans les infections aigües des voies respiratoires chez les individus souffrant de fibrose kystique (Smith *et al.*, 2006). Il est donc important d'étudier en détail la motilité *swarming* pour en savoir plus sur ses raisons d'être ainsi que son implication au sein d'environnements variés. Des hypothèses ont été émises quant aux différentes raisons de l'utilisation de cette motilité, notamment par la bactérie *P. aeruginosa*. Différentes avenues de recherche ont donc été proposées dans l'optique d'approfondir nos connaissances sur cette motilité. La recherche décrite dans ce mémoire comporte 3 objectifs distincts permettant d'étudier les avantages de l'utilisation de la motilité *swarming* chez la bactérie *P. aeruginosa*.

Le premier objectif repose sur l'hypothèse que la motilité *swarming* permettrait à un organisme d'aller puiser les ressources nutritionnelles de son environnement de manière plus efficace. La variation de la concentration nutritionnelle du milieu devrait donc influencer la surface totale recouverte par une colonie *swarmer* soit en l'augmentant suite à une baisse de nutriments et en la diminuant lorsque les nutriments sont présents en plus fortes concentrations.

Le second objectif aborde le concept de co-infections bactériennes chez les patients atteints de fibrose kystique. Ceux-ci démontrent une colonisation des voies respiratoires par différentes espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa*, *S. aureus* et différentes espèces de BCC (Bragonzi *et al.*, 2012, Limoli *et al.*, 2017). L'hypothèse a donc été proposée que la motilité *swarming* de *P. aeruginosa* lui apporte un bénéfice compétitif face aux espèces présentes. Une espèce compétitive a été ciblée, soit *B. cenocepacia* qui se trouve aussi au niveau des poumons des personnes atteintes de FK.

Le troisième objectif aborde la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* en *swarming*. Ce pathogène opportuniste est reconnu comme étant très résistant aux antibiotiques.

Le laboratoire Déziel a précédemment rapporté que le *swarming* permet d'augmenter cette résistance (Lai *et al.*, 2009). De plus, des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques stimuleraient cette motilité chez certaines espèces bactériennes (Liu *et al.*, 2018). Nous avons donc étudié les modifications apportées au *swarming* par l'ajout de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine, un aminoglycoside utilisé dans le traitement des infections de *P. aeruginosa* chez les individus atteints de fibrose kystique (Ranieri, 2018).

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches bactériennes utilisées dans cette étude

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude

Souches	#ED	Phénotype/génotype	Source
<i>P. aeruginosa</i>			
PA14 WT	14	Souche sauvage	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 <i>rhIA</i> -	1	PA14_19100::MAR2xT7, Gm ^R	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>fliC</i> -	13	PA14_50290::MAR2xT7, Gm ^R	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 Δ <i>pilA</i>	3398	PA14 Δ <i>pilA</i>	Labo R. Baldini
PA14 Δ <i>pilA</i> <i>fliC</i> -	3463	PA14 Δ <i>pilA</i> <i>fliC</i> ::MrT7, Gm ^R	Cette étude
PA14 :: <i>gfpmut3</i>	2725	Souche sauvage avec intégration chromosomique <i>attTn7</i> de la protéine fluorescente <i>gfpmut3</i>	(Jean-Pierre, 2017)
PA14 <i>cupA</i> -	3560	PA14 <i>cupA3</i> ::MrT7, Gm ^R ID : PA14NR 30364	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>cupB</i> -	3561	PA14 <i>cupB3</i> ::MrT7, Gm ^R ID : PA14NR 55040	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>cupC</i> -	3562	PA14 <i>cupC3</i> ::MrT7, Gm ^R ID : PA14NR 33483	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>cupA</i> <i>fliC</i> --	3695	PA14 <i>cupA-fliC</i> --::pEASY, Carb ^R	Cette étude
<i>Burkholderia cenocepacia</i>			
K56-2	325	Souche FK, Canada	(Darling <i>et al.</i> , 1998)
K56-2 <i>rhIA</i> -	2107	K56-2 <i>rhIA</i> ::pKNOCK, Tc ^R , Tet ^R	Labo E. Déziel
Plasmides			
pEASY®-T1		Trans Gene 3928 pb Kan ^R Amp ^R	Transgen Biotech

2.2 Le *swarming* comme mode exploratoire

2.2.1 Pré-cultures

Les souches bactériennes utilisées pour les pré-cultures sont conservées à -80°C dans des tubes cryogéniques dans un milieu additionné de glycérol 15% stérile. Pour lancer une pré-culture, une petite quantité de glace est prélevée dans le tube congelé à l'aide d'un embout à pipette stérile. L'embout est par la suite déposé dans un tube de culture en borosilicate stérile contenant 3 ml de milieu, généralement un milieu riche tel que le *tryptic soy broth* (TSB). Le tube de culture est par la suite incubé toute la nuit à 37°C dans un tambour rotatif TC-7 (New-Brunswick Canada).

Pour le protocole de *swarming*, les pré-cultures doivent être diluées à une $\text{D.O}_{600} = 3,0$. Pour se faire, 1 ml de la pré-culture est déposée dans un tube microcentrifuge de type Eppendorf stérile de 1,5 ml. Elle est ensuite centrifugée à 17 000 g pour 1 minute. Le surnageant est retiré délicatement et le culot est resuspendu dans un volume de 1 ml de PBS 1x stérile. Le PBS est préparé à une concentration 10x et contient des concentrations finales de NaCl 1.37M, du KCl 27 mM, du Na_2HPO_4 100 mM et du KH_2PO_4 18 mM. Ceci permet d'obtenir 1 litre de PBS 10 x qui sera par la suite autoclavé et dilué à la concentration désirée soit 1x. La D.O_{600} est par la suite mesurée à l'aide de spectrophotomètre (Nanodrop ND-100). La pré-culture ainsi lavée au PBS 1x une fois et est ensuite diluée pour atteindre une $\text{D.O}_{600} = 3,0$ dans du PBS 1x stérile.

2.2.2 Milieux *swarming*

Le milieu de culture utilisé pour le *swarming* est le M9DCAA, tel que défini par Tremblay et Déziel (2008). Il est composé de 20 mM NH_4Cl , 12 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 8,6 mM NaCl et 0,5% de « casamino acids » (CAA) (Difco) (Jean-Pierre, 2017, Tremblay *et al.*, 2008). Lorsque les poudres sont bien dissoutes, du Bacto agar 0,5% (Difco) est ajouté et le milieu est autoclavé. Après stérilisation, le milieu est laissé à refroidir sur une plaque agitatrice jusqu'à ce qu'il soit facile à manipuler sans gants de protection. Les solutions de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1mM et le Dextrose 11mM stérile sont ajoutées (Tremblay *et al.*, 2008). Ces solutions sont préparées préalablement à des concentrations respectives de 1M, 1M et 1,1M. Les solutions

de $\text{MgSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$ et de $\text{CaCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ sont autoclavées tandis que le dextrose est filtré à l'aide d'un filtre 0,2 μm .

2.2.3 Protocole de *swarming*

Lorsque le milieu est complété, il peut être coulé dans les boîtes de Pétri à raison de 20 ml par boîte. Les boîtes sont disposées dans une enceinte biologique à flux laminaire et doivent rester ouvertes jusqu'au séchage complet, soit 75 minutes. Lorsque le temps de séchage est terminé, 5 μl de la suspension bactérienne à $\text{D.O}_{600} = 3,0$ (voir 2.2.1.) sont déposés au centre des géloses. Il est important de ne pas abimer la surface de la gélose à l'aide de l'embout de pipette lorsque la goutte est déposée. Les boîtes sont ensuite refermées et inversées. Celles-ci sont placées dans un sac plastique étanche de type *ziploc* et mis en incubation soit à 30°C ou à 34°C pour une durée de 18 à 20 heures. Le sac plastique est utilisé pour garder l'humidité des boîtes de pétris.

2.2.4 Cinétiques de recouvrement

Pour effectuer les cinétiques de recouvrement d'une colonie en *swarming*, les géloses sont scellées individuellement à l'aide de « parafilm » pour préserver l'humidité. Les boîtes de Pétri sont ensuite disposées sur un fond noir et l'appareil photo est installé sur un trépied à proximité. La caméra (Panasonic Lumix ZS60) est réglée au mode « time lapse » et permet de prendre une photo toutes les 30 minutes pour une durée totale de 24 heures. Il est important de laisser la lumière allumée dans la pièce d'incubation.

2.2.5 Mesure du ratio de surface recouverte en pixels

La mesure de surface recouverte s'effectue à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CS5. Les images sont analysées en mesurant la surface totale du pétri en pixels à l'aide de l'outil « lasso magnétique ». La surface recouverte par la colonie en *swarming* est analysée de la même façon et mesurée en pixels aussi. Le ratio de surface recouverte est obtenu en calculant les pixels recouverts par la colonie divisée par les pixels totaux du pétri. Ces données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel de statistiques GraphPad Prism 6.

2.2.6 Gélases à deux concentrations nutritionnelles

Pour effectuer les tests de pétris à deux concentrations nutritionnelles, le milieu *swarming* tel que décrit plus haut est utilisé. Un côté de la gélose sera composé du milieu original comportant les sources de carbone, soit le dextrose et les « casamino acids » (CAA) (Difco). Le second milieu ne comporte pas ces acides aminés ni le dextrose. Pour pouvoir les différencier, le milieu pauvre en source de carbone est coloré à l'aide de quelques μl de bleu de méthylène 1% en fonction du volume total de milieu. Une faible coloration est recherchée. Le milieu nutritionnel est coulé en premier dans des grandes boîtes de Pétri (Sarstedt, 150 mm x 20 mm) à raison de 50 ml par pétri. Celui-ci est laissé à sécher 15 minutes dans la hotte à flux laminaire. Lorsque le séchage est terminé, la gélose est coupée en son centre à l'aide d'une lamelle de microscope stérile. La moitié de la gélose du pétri est alors retirée et jetée. La seconde moitié d'agar sans source de carbone est coulée et une mince couche doit recouvrir l'agar déjà présent. Ceci permet d'avoir une surface bien lisse pour permettre la motilité bactérienne étudiée. Les pétris sont ensuite laissés à sécher pour un total de 75 minutes dans l'enceinte de sécurité biologique. Les pétris sont ensuite refermés et inoculés.

Pour ce test, différents modes d'inoculations sont utilisés. En premier lieu, une goutte de 5 μl de suspension bactérienne diluée à $D.O_{600} = 3,0$ est inoculée du côté avec source de carbone. Une goutte de 5 μl est aussi inoculée sur la partie sans source de carbone. Pour observer le gradient nutritionnel, un écouvillon stérile à embout de coton est trempé légèrement dans la suspension bactérienne et un trait est tiré d'un côté à l'autre de la gélose recouvrant les deux concentrations nutritionnelles. Les pétris sont ensuite placés dans des sacs plastiques hermétiques et inversés. Ceux-ci sont incubés à 30°C pour 18 à 20 heures.

2.2.7 Mesures des dendrites exploratrices

Après le temps d'incubation adéquat, les pétris sont photographiés. Ensuite, la distance parcourue par les dendrites est mesurée à l'aide d'une règle (cm). La mesure est effectuée à partir de la médiane du pétri qui délimite les deux concentrations nutritionnelles. Les données sont compilées et analysées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 6 et Excel.

2.2.8 Source d'azote préférentielle

Deux sources d'azote ont été testées pour observer si une de celles-ci serait préférentiellement utilisée par *P. aeruginosa* en *swarming* et si ce changement affecterait le déplacement de la colonie. La première source est celle retrouvée dans le milieu M9DCAA traditionnellement utilisé, soit le NH_4Cl à 20 mM. La seconde source d'azote est le NaNO_3 utilisé à la même molarité finale soit 20 mM. Pour effectuer le test, le milieu M9DCAA est réalisé selon le protocole décrit ci-haut en remplaçant le NH_4Cl par le NaNO_3 . Les deux milieux sont soumis au même protocole de *swarming*. Les pétris sont inoculés par une suspension bactérienne lavée une fois et diluée à l'aide de PBS 1x à une $\text{D.O}_{600} = 3,0$. Les pétris sont ensuite incubés à 30°C pendant 20 heures. Des photos des pétris sont ensuite prises le lendemain.

2.3 Les co-cultures

2.3.1 Réalisation du double mutant $\Delta pilA$ *fliC*- Gm^R

Puisque ce mutant n'était pas disponible dans la collection du laboratoire, il a été réalisé en suivant la méthode de Choi (2006). Cette méthode permet de réaliser une électroporation efficace de matériel génétique dans une souche de *P. aeruginosa*.

2.3.1.1 Test de susceptibilité à la gentamycine

Pour réaliser le double mutant $\Delta pilA$ *fliC*-, des tests de sélection sur antibiotique ont été réalisés en premier lieu. Pour se faire, les deux souches PA14 *fliC* (Gm^R) et PA14 $\Delta pilA$ ont été lancées en pré-cultures tel que décrit plus haut. Celles-ci ont été étalées par méthode d'épuisement sur gélose LB + gentamycine (Gm) à différentes concentrations soit 30 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$. Ces géloses ont été incubés à 37°C O/N. Ce test a révélé que la concentration à choisir pour effectuer la sélection des transformants est de 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine.

2.3.1.2. Extraction d'ADN

L'ADN a été obtenu en utilisant une trousse d'extraction de la marque Transgene soit le « easyPure Genomic DNA kit ». Les cellules bactériennes ayant poussées en TSB O/N sont centrifugées à 12 000 x *g* pour 1 minute. Le surnageant est retiré et 100 μl de tampon de lyse est

ajouté au culot. Un volume de 20 μl de protéinase K et 20 μl de RNase A est aussi ajouté. Après une période d'incubation de 15 minutes, 100 μl de tampon de liaison est ajouté puis s'en suit une incubation de 10 minutes. Les suspensions sont ensuite centrifugées à 12 000 x g pendant 1 minute sur une colonne. Suite à plusieurs étapes de filtration sur la colonne il est possible de récupérer l'ADN génomique pur.

2.3.1.2 Dialyse de l'ADN

Pour retirer le plus de sels possibles à l'ADN obtenu à l'étape précédente, une dialyse doit être réalisée. Les sels doivent être retirés en majorité pour obtenir une faible conductivité de l'échantillon. Ceci est primordial pour éviter la formation d'arcs et ainsi obtenir une électroporation réussie (Saraswat *et al.*, 2013). Pour se faire, une boîte de Pétri est remplie avec de l'eau MilliQ stérile. Un filtre 0,0025 μm (Millipore) est ensuite déposé à la surface de l'eau avec le côté brillant vers le haut. Une goutte de 20 μl d'ADN est déposée sur le filtre en faisant bien attention de ne pas toucher la surface du filtre avec l'embout de pipette. L'ADN est ainsi laissé pour 2 heures à dialyser. La goutte est ensuite récupérée et congelée à -20°C (Silhavy *et al.*, 1984).

2.3.1.3 Préparation de cellules compétentes

Une pré-culture de PA14 $\Delta pilA$ lancée au préalable la veille est distribuée en 4 tubes eppendorfs de 1,5 mL stériles. Ceux-ci sont centrifugés 2 minutes à 17 000 g, puis le surnageant est retiré. Le culot est par la suite lavé à 2 reprises avec 1 ml de sucrose 200 mM à température pièce. Lors du second lavage, les culots sont resuspendus dans un total combiné de 100 μl de sucrose 300 mM (Choi *et al.*, 2006).

2.3.1.4 Transformation par électroporation

Dans une cuvette à électroporation de 2 mm, ajouter 500 ng d'ADN préalablement dialysé et 100 μl de cellules électrocompétentes. L'électroporation se fait à l'aide d'un Electroporator Eppendorf modèle 2510. Après avoir réalisé l'électroporation (réglages : 25 μF ; 200 Ω ; 2,5 Kv), le produit est récupéré et resuspendu dans 1 ml de milieu LB à température pièce. Le produit transformé est ensuite incubé à 37°C pour 2 heures avec agitation. Les cellules sont récupérées par centrifugation et 900 μl du surnageant est retiré. Le culot est resuspendu dans le 100 μl restant

de milieu. La suspension complète est alors étalée sur gélose LB + Gm 100 µg/ml et incubée à 37°C pour 24 heures (Choi *et al.*, 2006).

2.3.1.5 Vérification par colonies PCR

Pour vérifier que les transformants sont bien des doubles mutants PA14Δ*pilA**fliC*- Gm^R, un protocole de PCR sur colonies est utilisé. Les colonies obtenues sur les géloses LB+Gm 100 sont lancées en pré-cultures tel que décrit auparavant. Par la suite, 500 µl de cette pré-culture est récupérée dans un tube eppendorf 1,5 ml stérile. Les cellules sont centrifugées à 17 000 g pour 1 minute et le surnageant est retiré. Un volume de 250 µl de PBS est utilisé pour resuspendre le culot. La suspension est chauffée à 100°C pendant 5 minutes puis déposée sur glace 5 minutes. Les bactéries sont centrifugées à nouveau à vitesse maximale (17 000 x g) pour 1 minute et l'ADN nécessaire au PCR se retrouve à ce moment dans le surnageant.

Pour la réaction PCR, un « master mix » est préparé. Pour chaque réaction (échantillon) il faudra préparer 3.75 µl de Taq polymérase, 37.5 µl de tampon Taq, 7.5 µl de dNTP (10 mM), 15 µl d'amorce sens et anti-sens, 37.5 µl de DMSO, 228.75 µl d'eau mili-Q et 2 µl d'ADN. Deux paires d'amorces ont été utilisées (tableau 2) pour confirmer la délétion du gène *pilA* et l'insertion du transposon dans le gène *fliC*.

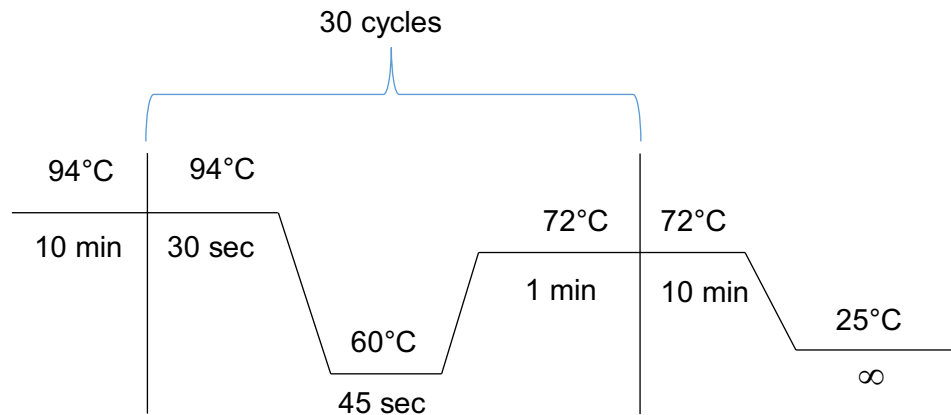
Tableau 2 : Amorces utilisées dans la vérification du double mutant PA14Δ*pilAfliC*- Gm^R par colonies PCR.**

Les amorces ont été dessinées à l'aide du site Primer3 et ont ensuite été commandées chez Alpha ADN Montréal. Les amorces sont représentées par les flèches oranges du schéma.

Amorce	Séquence 5' à 3'	Fragment
ML_ <i>fliC</i> -_F	CGGGAGGGCTAAAGAAAATC	363 pb (taille avec transposon 59 pb)
ML_ <i>fliC</i> -_R	TTGAGGTCGTTGGAAGAAGC	
ML_ <i>pilA</i> -_F	ATTGGGAGTGGTCGCATAAG	970 pb (430 pb si délétion)
ML_ <i>pilA</i> -_R	TGCCATCCTCCTGCTATTTTC	

Le schéma illustre la structure génétique de deux gènes. Le gène *fliC* (1001 pb) est représenté par une barre horizontale. Une section rouge au centre indique l'insertion d'un transposon (T). Des flèches oranges pointent vers l'intérieur de la barre, indiquant les sites de liaison des amorces. Le gène *pilA* (1540 pb) est représenté par une barre horizontale en dessous. Une section rouge au centre indique une délétion. Des flèches oranges pointent vers l'intérieur de la barre, indiquant les sites de liaison des amorces.

Le programme PCR utilisé était le suivant pour un total de 30 cycles. Un gel d'agarose 1% a ensuite été utilisé pour vérifier les mutants $\Delta pilA$ en utilisant une échelle de poids moléculaire de 1 Kb. Pour les transformants *fliC*⁻, un gel d'agarose de 2% a été utilisé ainsi qu'une échelle de poids moléculaire de 100 pb. Les gels ont été migrés à 120 V pour une durée d'une heure avant d'être photographiés à l'aide du gel-doc.



2.3.2 Inoculation des co-cultures

Les tests de co-culture ont été réalisés sur le milieu *swarming* M9DCAA. Les pré-cultures des souches soumises en co-cultures sont diluées à une $D.O_{600} = 3,0$ tel que décrit à la section 2.2.1. Un volume de 50 μ l de chaque souche est prélevé et celles-ci sont mélangées dans un tube 1,5 mL stérile au dernier moment précédant l'inoculation. Un volume de 5 μ l de ce mélange à $D.O_{600} = 3,0$ est inoculé en faisant bien attention de ne pas abimer la surface de la gélose à l'aide de l'embout de pipette. Les Pétris sont ensuite mis en incubation dans des sacs de plastique hermétiques à 30°C pendant 18 à 20 heures.

2.3.3 Récupération de la biomasse

Après l'incubation des Pétris de co-culture, la biomasse a été recueillie pour procéder au protocole de décompte des unités formatrices de colonie (UFC). Pour se faire, 3 régions sont prélevées sur chaque boîte de Pétri, soit le centre de la colonie, la région intermédiaire du patron *swarming* ainsi que l'extrémité des dendrites. Pour normaliser la prise de biomasse, des embouts

stériles de p200 sont utilisés. L'embout est utilisé comme emporte-pièce pour prélever un coupon d'agar portant la biomasse de la colonie *swarmer*. Au préalable, des eppendorfs stériles de 1,5 ml sont remplis avec 1 ml de PBS 1x stérile. Un coupon est déposé dans chaque tube et additionné de PBS. Ils sont ensuite vortexés pour quelques secondes permettant ainsi à la biomasse de se détacher de l'agar et à la dissolution de celui-ci. Cette suspension bactérienne est ensuite utilisée pour réaliser le protocole des UFC en gouttes, décrit dans la section suivante (2.3.4).

2.3.4 Protocole d'UFC en gouttes

Un volume de 100 µl de la suspension obtenue à l'étape précédente est prélevé et déposé dans un puits de la première colonne d'une plaque 96 puits stérile. Cette étape est répétée pour chaque réplicat et le reste des puits de la plaque sont rempli de 90 µl de PBS 1x stérile. Des dilutions décimales en série sont ensuite réalisées. Un volume de 10 µl est prélevé dans le premier puits et déposé dans le second. Il est important de bien resuspendre les cellules à l'aide de la pipette. Un volume de 10 µl est ensuite repris et transféré dans le puits suivant. La plaque complète est préparée de cette façon afin d'obtenir des dilutions en série jusqu'à 10⁻¹¹. Il est aussi bien important de changer d'embout entre chaque échantillon.

En débutant avec les dilutions les plus élevées, un volume de 5 µl est déposé sur une gélose LB agar. Les gouttes sont ensuite laissées à sécher pour environ 30 à 45 minutes dans une enceinte biologique. Pour pouvoir différencier les UFC de *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia*, les géloses utilisés pour réaliser les gouttes sont additionnées d'antibiotiques. Pour sélectionner *P. aeruginosa*, le triclosan (25 µg/ml) est utilisé et pour sélectionner *B. cenocepacia* la polymyxine (15 µg/ml) est ajoutée aux géloses LB. Les boîtes de Pétris sont ensuite mises en incubation à 30°C pour 20 heures. Le lendemain, les colonies apparues sont comptées et compilées. Il est ensuite possible de calculer les UFC par ml.

$$= \frac{(nb \text{ de colonies} * \text{facteur de dilution})}{\text{Volume inoculé en mL}}$$

2.3.5 Réalisation du double mutant PA14 *cupA**fliC*-

Pour approfondir les études de co-cultures, un double mutant PA14 *cupA**fliC*- a été réalisé à l'aide d'une méthode de *T/A cloning* utilisant un vecteur pEASY®-T1 de Transgene Biotech.

2.3.5.1 Amplification par PCR

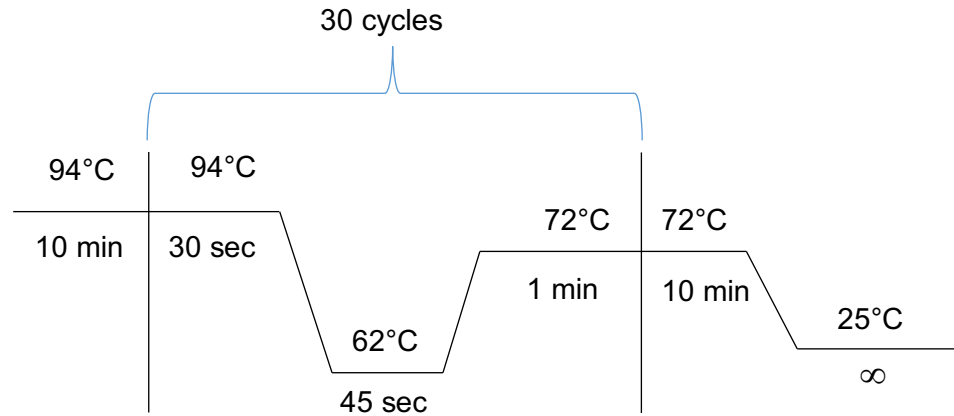
Pour effectuer le double mutant PA14 *cupA*-*fliC*-, la méthode de disruption du gène par recombinaison homologue a été effectuée. L'objectif est d'insérer un plasmide suicide dans le gène *fliC*- dans une souche PA14 *cupA*- Gm^R obtenu de la banque de mutants par transposons (Liberati *et al.*, 2006). En premier lieu il s'agit d'amplifier un fragment assez important du gène cible, dans ce cas-ci *fliC*. Le gène *fliC* a été amplifié par PCR en utilisant les amorces décrites au tableau 3.

Tableau 3 : Amorces utilisées dans la création du double mutant PA14 *cupA*-*fliC*-.

Les amorces ont été dessinées à l'aide du site Primer3 et ont ensuite été commandées chez Alpha ADN Montréal. Celles-ci permettent d'amplifier un fragment de 746 pb dans la séquence du gène *fliC* chez *P. aeruginosa*.

Amorce	Séquence 5' à 3'
ML_ <i>fliC</i> -_F_746	GCGGTCAGGTGAAGAACATC
ML_ <i>fliC</i> -_R_746	GAAGTCGGTGTCCTTGATGC

Le protocole d'amplification PCR est le même que décrit à la section 2.3.1.5. Le programme PCR utilisé est décrit ci-dessous. Les étapes ont été répétées pour un total de 30 cycles.



Un gel d'agarose 1% a ensuite été réalisé pour vérifier la taille du fragment amplifié, celui-ci est représenté à la figure 10.

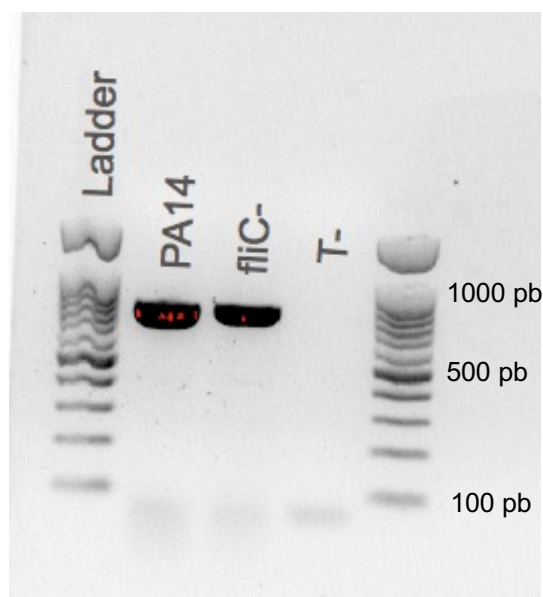


Figure 10 : Gel d'agarose 1% démontrant les fragments du gène *fliC* amplifiés.

L'échelle de poids moléculaires est de 100 pb. La taille du fragment amplifié est de 746 pb. Les colonnes PA14 et *fliC*- démontrent la présence d'amplification du fragment visé et servent de témoin positif.

Le gel représenté à la figure 10 aurait pu être migré plus longtemps pour permettre de mieux déterminer la taille du fragment amplifié.

2.3.5.2 Clonage

Le produit amplifié est ensuite cloné dans le vecteur commercial pEASY-T1 représenté à la figure 8 (T/A cloning). Un volume de 1 μ l de vecteur est déposé dans un tube eppendorf et additionné d'environ 20 ng de fragment amplifié. Ce mélange est incubé à 37°C pendant 15 minutes puis déposé sur glace. À ce moment, le produit amplifié du gène *fliC* est cloné dans le plasmide. Celui-ci pourra par la suite être transformé dans des cellules compétentes (*Trans1-T1 phage persistant chemically competent cells*). Pour se faire, le produit obtenu est mélangé à 25 μ l de ces cellules et est incubé sur glace pendant 30 minutes. Ce mélange est ensuite soumis à une température de 42°C pour 30 secondes et remis sur glace pour 2 minutes. Un volume de 250 μ l de TSB à température pièce est ajouté et le mélange est incubé à 37°C pendant 1 heure avec agitation à 200 rpm. À ce moment, les cellules compétentes devraient avoir intégré le plasmide. Pour vérifier que la transformation a bien fonctionné, les cellules transformées sont étalées sur des géloses LB additionnées de carbénicilline à 100 μ g/ml et de 40 μ l de X-gal (20 mg/ml). Les cellules sont étalées sur ces géloses sélectives et incubées à 37°C pour la nuit. Ce protocole

permet de sélectionner les colonies ayant le plasmide avec notre insert en se basant sur une sélection bleu/blanc. Les colonies blanches sont positives et les bleues négatives.

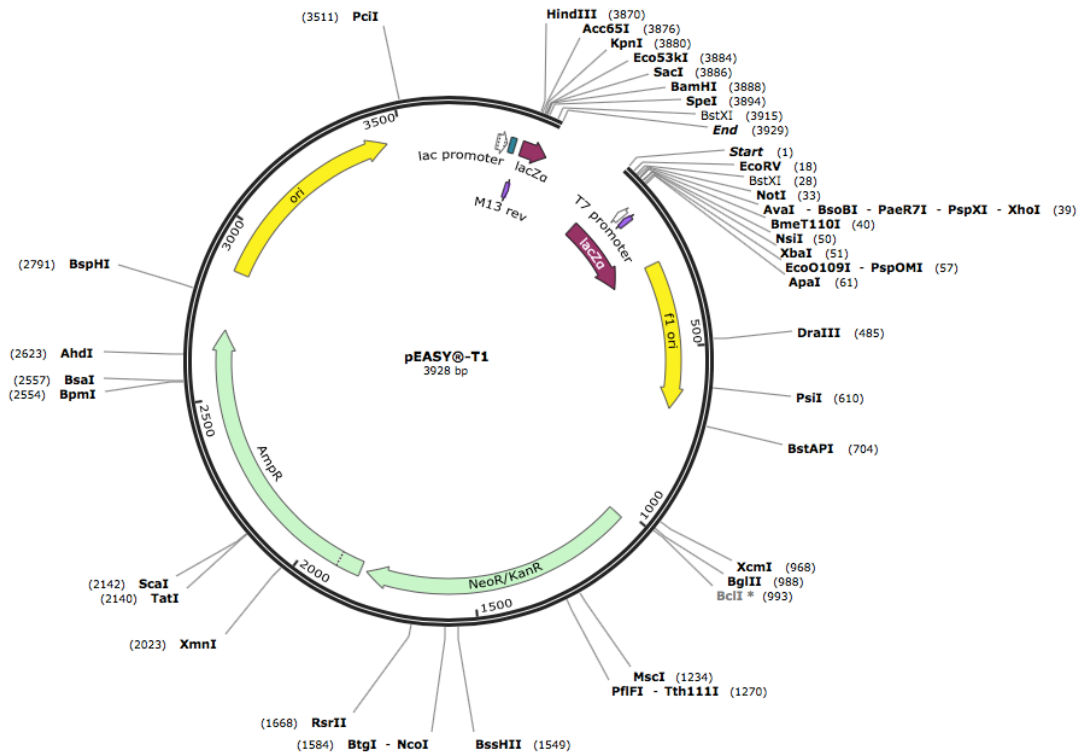


Figure 11 : Carte du plasmide pEASY®-T1 de Transgene Biotech
Représentation du plasmide utilisé pour réaliser le double mutant *cupAflIC-* dans la souche PA14 *cupA-*.

2.3.5.3 Vérification de l'insert

Pour s'assurer que notre insert se trouve bien dans le plasmide, nous sélectionnons cinq colonies blanches à tester ainsi qu'une bleue comme témoin négatif. Ces colonies sont repiquées dans 3 ml de TSB + carbénicilline 100 µg/ml et incubées à 37°C O/N. Celles-ci sont par la suite soumises à une mini-prep pour extraire l'ADN plasmidique (Favorprep™ Plasmid extraction mini kit). Une digestion par deux enzymes de restrictions est ensuite réalisée. Les enzymes choisies se trouvent de chaque côté de l'insert dans le plasmide et ne se retrouvent pas dans le fragment inséré. Les enzymes BamHI et XbaI sont mélangées avec l'ADN plasmidique ainsi que du tampon de digestion (10x fast digestion buffer) et de l'eau milli-Q. Les échantillons sont incubés sur un bloc chauffant à 37°C pendant 15 minutes. Les produits non digérés et digérés sont ensuite migrés

sur un gel d'agarose de 1% pendant 1 heure à 120 V (figure 12). Une échelle de poids moléculaire de 1 Kb est utilisée.

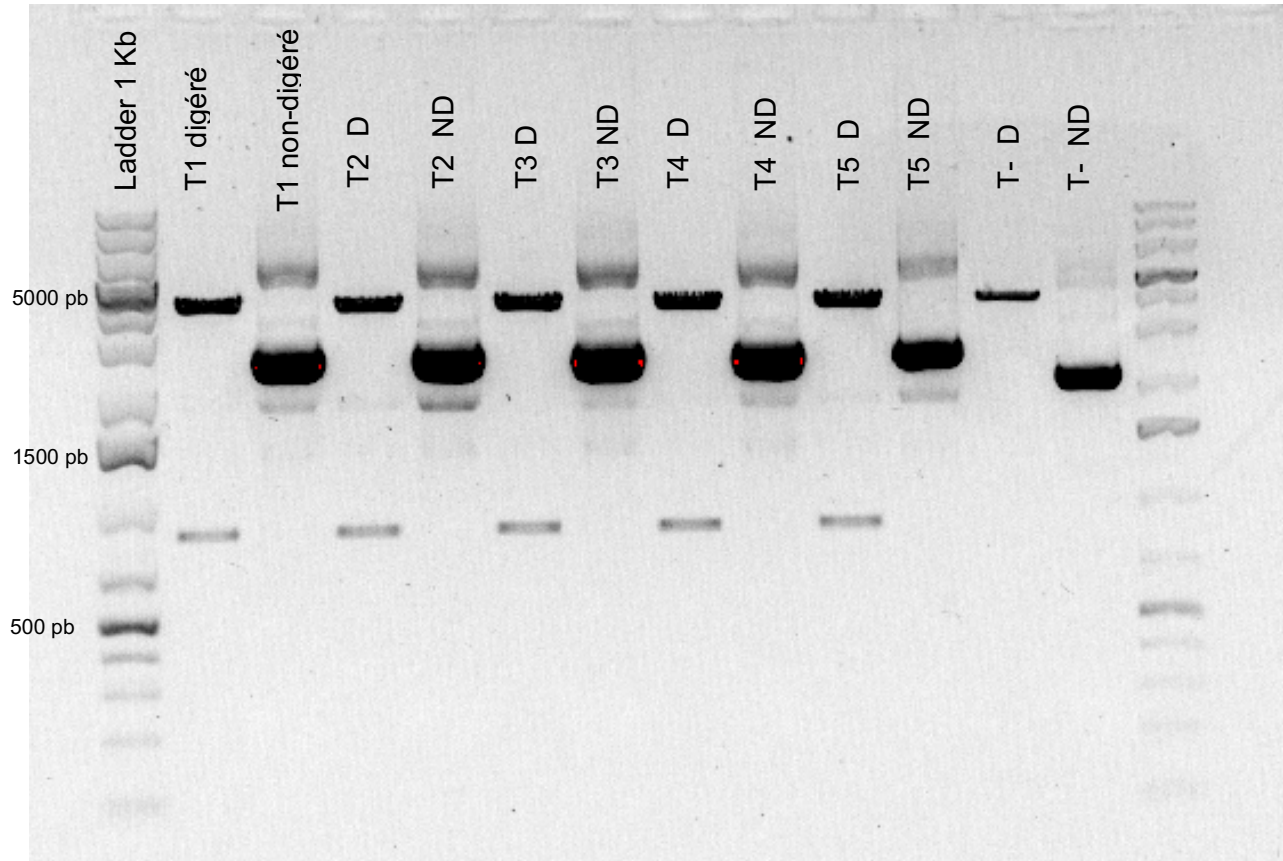


Figure 12 : Gel d'agarose 1% permettant de confirmer les insert du gène *fliC* dans le plasmide pEASY-T1.

L'échelle de poids moléculaire utilisée est de 1 Kb plus. Les échantillons digérés et non digérés ont été migrés à 120 V pendant 1 heure. Tous les échantillons digérés montrent deux bandes bien distinctes correspondant à l'insert *fliC*- d'une taille attendue d'environ 877 pb (fragments + amorces + enzymes de restrictions).

2.3.5.4 Transformation de PA14 *cupA*- et pEASY-*fliC*

La transformation s'effectue selon la méthode d'électroporation déjà mentionnée à la section 2.3.1.4. Cette suspension bactérienne est étalée sur gélose avec antibiotique de sélection, soit carbénicilline 250 µg/m.

2.3.5.5 Vérification de la conjugaison

La vérification a été faite en deux étapes. En premier, les colonies positives ont été testées par colonie PCR tel que décrit à la section 2.3.1.5. Le gène amplifié était celui de la résistance à la kanamycine présent sur le plasmide pEASY®-T1. Le fragment amplifié avait une taille attendue de 573 pb. Un total de 3 transformants ont démontré une amplification similaire au témoin positif, soit la souche *E. coli* SM10 portant le plasmide. Ces candidats ont été congelés à -80°C pour effectuer la seconde étape de la confirmation.

En second lieu, les transformants ont été testés en *swarming* selon le protocole décrit à la section 2.2.3. Un second test a aussi été réalisé en milieu *swimming*. Celui-ci est similaire au milieu *swarming* décrit en section 2.2.2. mais contient une plus faible concentration d'agar soit 0,25%. Les Pétris *swimming* sont laissés à sécher 15 minutes avant d'être inoculés. L'embout sans coton d'un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne préalablement diluée à D.O₆₀₀ = 3,0 tel que décrit dans le protocole. L'écouvillon est ensuite piqué au centre de la gélose. Les géloses *swimming* sont incubées à 30°C dans un sac plastique hermétique sans retourner les Pétris étant donné leur très faible viscosité.

2.3.6 *Swarming* en ajoutant des rhamnolipides à K56-2

Le test de *swarming* est réalisé avec la souche *B. cenocepacia* K56-2 préparée tel que décrit à la section 2.1.2. Le protocole de *swarming* est ensuite réalisé tel qu'expliqué plus haut à la section 2.1.4 en utilisant le milieu M9DCAA à 0,5% d'agar (Bacto). Avant d'inoculer la souche au centre de la gélose, une goutte de 5 µl de méthanol (MeOH) ou de 5 µl de rhamnolipides (stock dans méthanol à 10 000 ppm/µl) est déposée au centre. Les rhamnolipides utilisés proviennent de Jeneil Biosurfactant Co. (Lot # 050629). Ce stock est composé notamment de C₈, C₁₀ et C₁₂. La goutte de rhamnolipides ou de méthanol est laissée à sécher pour une dizaine de minutes. Par la suite, la suspension bactérienne à D.O₆₀₀ = 3,0 est inoculée au centre de la goutte préalablement séchée. Les Pétris sont ensuite incubés à 30°C pendant 20 heures.

2.4 La résistance à la tobramycine

2.4.1 Milieux

Le milieu utilisé pour ces tests est le M9DCAA, tel que décrit dans la section 2.2.2.

2.4.2 Concentrations d'antibiotique

Différentes concentrations sous-inhibitrices de tobramycine sont ajoutées au milieu M9DCAA lorsque celui-ci est suffisamment refroidi. Ces concentrations ont été choisies en se basant sur les travaux de Linares *et al.* (2006). Les concentrations testées étaient 0 µg/ml, 0,005; 0,008; 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 et 2,0 µg/ml. Les stock d'antibiotiques utilisés sont gardés à -20°C en petits aliquots.

2.4.3 Mesures

Le protocole utilisé pour effectuer le *swarming* de ce test est le même qu'expliqué à la section 2.2.3. Les Pétris sont incubés à 30°C pour une durée de 20 heures dans des sacs plastique hermétiques.

Après incubation, la mesure de la largeur des dendrites est effectuée. Des photos sont prises des pétris additionnés des différentes concentrations d'antibiotiques. Ces images sont ensuite analysées par le logiciel Photoshop en utilisant l'outil règle. La largeur des dendrites est mesurées en pixels à une distance égale du centre de la colonie et de la bordure des pétris tel que démontré à la figure 13. Un total de 8 mesures sont effectuées par Pétri. Les dendrites mesurées sont choisies de manière aléatoire.

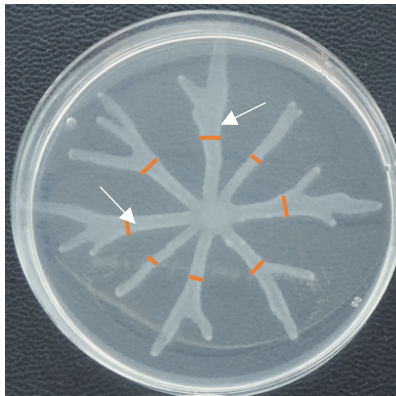


Figure 13 : Mesures de la largeur des dendrites du *swarming* avec tobramycine

Les mesures à l'aide du logiciel photoshop sont effectuées aux régions indiquées par les traits oranges. Ces mesures sont prises en pixels à l'aide de l'outil règle. Les flèches blanches indiquent les deux zones où sont prélevés les cellules pour les tests en cytométrie, soit la bordure et le centre de la dendrite. Les zones prélevées correspondent à la distance médiane de la dendrite de son centre à son extrémité.

2.4.4 Récupération de la biomasse

En prévision des analyses en cytométrie, la biomasse des pétris de *swarming* doit être récupérée. Pour se faire, deux régions distinctes sont échantillonnées, soit les bordures des dendrites ainsi que leur centre (flèches blanches fig. 13). Les régions prélevées sont situées à distance égale du centre de la colonie et des extrémités des dendrites. Les cellules sont prélevées à l'aide d'un embout de pipette (p200) stérile. L'embout est utilisé pour récupérer délicatement les cellules en touchant à un seul endroit soit la bordure ou le centre de la dendrite. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume de 1 ml de solution saline (0,85%). La solution saline est utilisée préférentiellement au PBS 1x car les ions phosphate de ce dernier peuvent causer une réaction croisée avec le Baclight™. Cette suspension bactérienne est vortexée et ensuite diluée à l'aide de solution saline 0,85% à un ratio 1 :10. Ces échantillons sont gardés à température pièce et sont ensuite utilisés dans la même journée pour effectuer les analyses en cytométrie à flux.

2.4.5 Baclight™

La méthode LIVE/DEAD®Baclight™ est utilisée pour observer en microscopie à épifluorescence la viabilité des bactéries présentes dans un échantillon. Un ensemble de deux fluorophores sont utilisés soit le SYTO9® et l'iodure de propidium. Le premier interagit avec les membranes bactériennes intactes ou non en diffusant dans celles-ci. Dès sa liaison avec l'ADN,

le SYTO9® le colore en vert et marque donc la totalité des cellules d'un échantillon. Le second fluorophore utilisé est l'iodure de propidium. Celui-ci est un agent intercalant de l'ADN et pénètre les cellules avec une membrane abimée. Sa liaison permet une coloration rouge indiquant que la cellule marquée est morte (Berney *et al.*, 2007, Boulos *et al.*, 1999).

Un entonnoir de verre Millipore de 15 ml de diamètre à fond plat est nettoyé trois fois à l'éthanol 95% suivi de quatre lavages à l'eau Milli-Q. Un sous-filtre (Millipore AAWG02500) de 0,8 µm et 25 mm de diamètre est fixé à l'entonnoir. On y ajoute un filtre noir 0,22 µm 25 mm de diamètre (Whatman Cyclopore 7063-2502) en déposant la surface lustrée vers le haut. Le montage est placé sur un dispositif à aspiration.

L'échantillon prélevé contenant la suspension bactérienne est additionné de 3 µl du mélange des deux fluorophores (SYTO9® et iodure de propidium) puis vortexés. L'échantillon est incubé dans le noir pour 15 minutes et transféré dans l'entonnoir. Celui-ci est filtré à très faible aspiration et l'entonnoir est par la suite rincé à l'aide d'eau saline stérile (0,85%). Le filtre noir est récupéré à l'aide de pinces stériles et déposé sur une lame de microscope humidifiée. Une goutte d'huile d'immersion Baclight™ est déposée directement sur le filtre puis recouverte d'une lamelle. La lame est observée immédiatement au microscope à épifluorescence à grossissement 1000X. Les bactéries vivantes sont visibles colorées en vert et les mortes sont rouges.

2.4.6 Cytométrie en flux

Les mesures à l'aide du cytomètre (BD Accuri™ C6) ont été réalisées à l'École Polytechnique de Montréal. Celles-ci sont séparées en deux décomptes, soit le décompte des cellules totales (TCC) et le décompte des cellules viables (ICC). Le décompte des cellules totales permet de déterminer la présence de bactéries dans l'échantillon et de les différencier des débris. Le décompte des cellules viables permet de déterminer quelle proportion des bactéries présentes sont intactes et endommagées dans l'échantillon. La détection de la viabilité cellulaire est possible grâce à l'utilisation de fluorophores soit le SYBR-Green (SG) et l'iodure de propidium (PI). Le premier colore les cellules en vert et indique donc la totalité de cellules présentes dans un échantillon. Le second détecte les bactéries ayant une membrane abimée et la colore en rouge indiquant ainsi les cellules mortes.

Un volume de 500 μl des suspensions bactériennes préalablement diluées 1:10 à l'aide de la solution saline 0,85% sont utilisés pour cette étape. Le 500 μl est déposé dans un tube d'analyse et chauffé dans un bloc à 37°C pour 3 minutes. Pour le décompte des cellules totales, un volume de 5 μl de SYBR Green I est ajouté au tube. Pour le décompte des cellules viables, un volume de 5 μl de SG/PI est ajouté à l'échantillon pour une concentration finale de 6 μM . Les tubes sont ensuite agités au vortex et incubés à la noirceur à 37°C pour 10 minutes. Les échantillons sont lus à l'aide du cytomètre. La rapidité du flux a été déterminée à 66 $\mu\text{l}/\text{min}$. Un cycle de lavage unique a été réalisé entre les échantillons des différentes concentrations. Les données sont obtenues en nombres d'évènements rencontrés dans un échantillon total (Berney *et al.*, 2007).

3 RÉSULTATS

3.1 Le *swarming* en fonction des conditions nutritionnelles

3.1.1 Cinétiques de recouvrement

Pour déterminer l'influence de la concentration nutritionnelle du milieu de culture sur le *swarming* de *P. aeruginosa*, des cinétiques de motilité ont été réalisées. Le protocole de *swarming* décrit en section 2.2.3 a été effectué et des images ont été prises à tous les 30 minutes pour une durée totale de 24 heures. Les différentes concentrations nutritionnelles sont relevées dans les tableaux de l'annexe I.

La figure 14 représente la mise en place des Pétris pour la prise de photos lors de la cinétique. L'ajout de fond noir permet une meilleure vue des contrastes et du patron *swarming* sur la gélose. Les Pétris sont fermés étanchement grâce au parafilm ce qui permet de garder l'humidité élevée. Cette disposition est utilisée pour toutes les concentrations nutritionnelles. Il est possible de voir que la colonie en *swarming* est contrastante avec le fond et a donc permis de réaliser les analyses facilement. Cette figure permet aussi d'illustrer la variabilité inhérente à toutes expériences de *swarming*, ce phénotype étant très sensible à de nombreux facteurs environnementaux (Tremblay et Déziel, 2008).

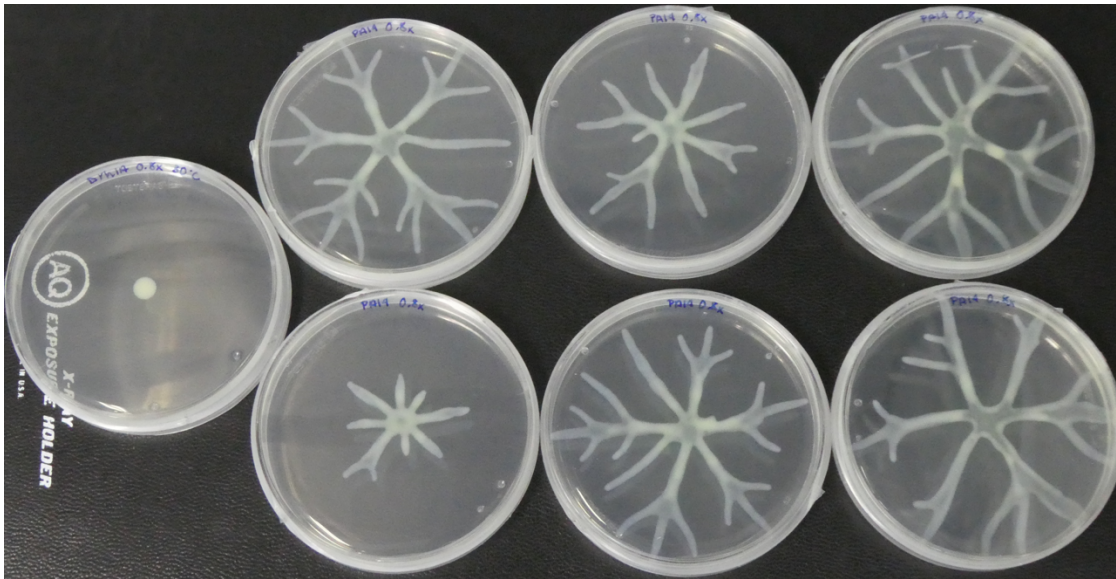


Figure 14 : Photo prise à la 24^e heure d'incubation à 30°C de la souche PA14 sur milieu *swarming* à concentration nutritionnelle de 0,8x.

Les Pétris sont déposés à l'envers sur un carton noir. Un total de 6 réplicats sont mesurés avec un témoin négatif (PA14 *rhlA*-) à gauche de l'image. Des photos sont prises aux 30 minutes pendant 24 heures pour un total de 48 photos par concentration nutritionnelle.

Les courbes des surfaces recouvertes par une colonie *swarmer* de PA14 sur différentes concentrations nutritionnelles sont représentées à la figure 15. La concentration traditionnellement utilisée dans le laboratoire est de 1x (voir annexe I) , soit celle qui démontre la plus grande surface recouverte. Il est aussi possible d'observer que les concentrations plus élevées (4x) et plus diluées (0,4x) sont celles qui démontrent la plus petite surface recouverte. La motilité semble s'accélérer entre les 10 et 15 heures d'incubation coïncidant avec la phase exponentielle de croissance . Un total de 48 images ont été analysées par concentration nutritionnelle et 6 réplicats ont été réalisés. Les moyennes ainsi que la déviation standard sont représentées à la figure suivante.

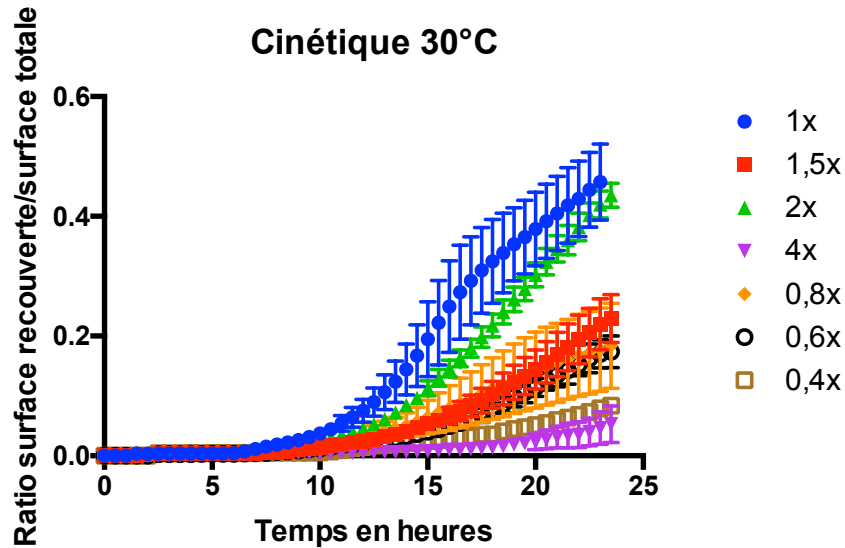


Figure 15 : Représentation graphique des moyennes des ratios de surface en pixels des différentes concentrations nutritionnelles testées.

Les Pétris *swarming* de la souche PA14 ont été incubés à 30°C pour 24 heures avec la prise d'une photo tous les 30 minutes. La surface de la colonie a été divisée par la surface totale de la boîte de pétri pour obtenir un ratio en pixels. Les variations des concentrations nutritionnelles sont reportées en annexe I. n=6. Les analyses statistiques (moyenne, SD) ont été réalisées à l'aide de Graphpad Prism7.

Le test de *swarming* sur différentes concentrations nutritionnelles a aussi été réalisé à 34°C, soit la température la plus utilisée lors des expériences de *swarming* du laboratoire. La plus grande surface recouverte à 34°C se produit sur un milieu à concentration nutritionnelle 2x, soit le double du milieu traditionnel (figure 16). La plus grande surface recouverte à 30°C se retrouve sur le milieu 1x et 2x. Une diminution du recouvrement est observable à une concentration de 1,5x pour les deux températures. Les expériences à 34°C ont été réalisées avant celles à 30°C. Les expériences de recouvrement de surface devaient se faire à 34°C initialement. Suite à des travaux, l'accès à la pièce à 34°C a été impossible et les expériences suivantes ont été réalisées à 30°C. Les concentrations très diluées ou très concentrées démontrent une diminution importante de la surface recouverte. Cette différence est analysée dans le graphique suivant de la figure 16.

Comparaison surfaces totales

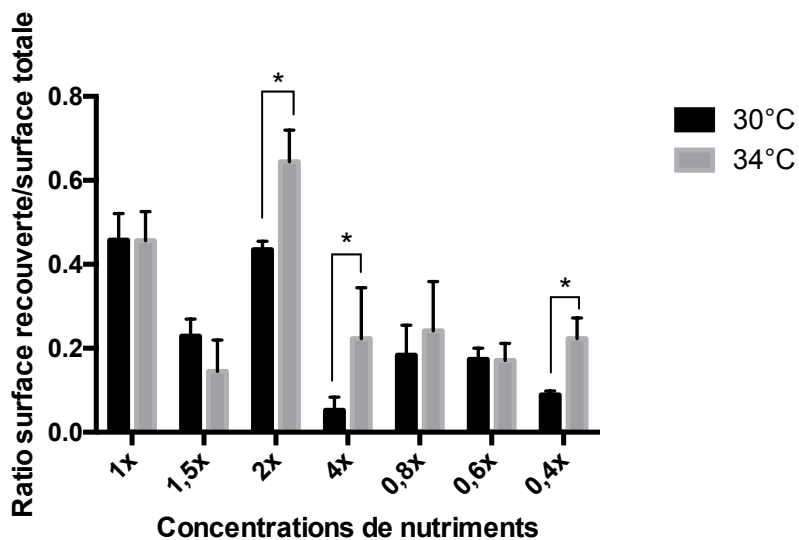


Figure 16 : Graphique de comparaison des moyennes des surfaces totales recouvertes par une colonie *swarming* à 30°C et 34°C après 24h.

Analyses réalisées avec les données des mesures de surfaces totales recouvertes aux deux températures testées. Les analyses statistiques (moyenne, SD et comparaisons multiples) ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. (* = $p \leq 0,05$). N=6.

Les surfaces totales recouvertes par les colonies *swarmers* de PA14 à deux températures ont été comparées dans le graphique ci-haut. Le milieu 1x montre une surface recouverte identique aux deux températures (30°C et 34°C) puis s'en suit une baisse de couverture pour le milieu 1,5x. La surface recouverte sur un milieu à concentration 2x est significativement différente entre les deux températures testées. Il en est de même pour les concentrations 4x et 0,4x. La température 34°C montre une plus grande couverture de surface pour ces concentrations.

3.1.2 Géloses à deux concentrations nutritionnelles

Pour approfondir l'hypothèse que la bactérie *P. aeruginosa* voit sa motilité stimulée lors d'une baisse de concentration nutritionnelle, des Pétris à deux concentrations de source de carbone ont été réalisés (figure 17). D'un côté, la gélose composée du milieu *swarming* M9 modifié contenait des CAA et du dextrose tandis que l'autre côté n'en contenait pas. Ce test a été réalisé pour permettre d'observer les capacités exploratoires des bactéries en *swarming* lorsqu'elles sont confrontées à un changement d'environnement.

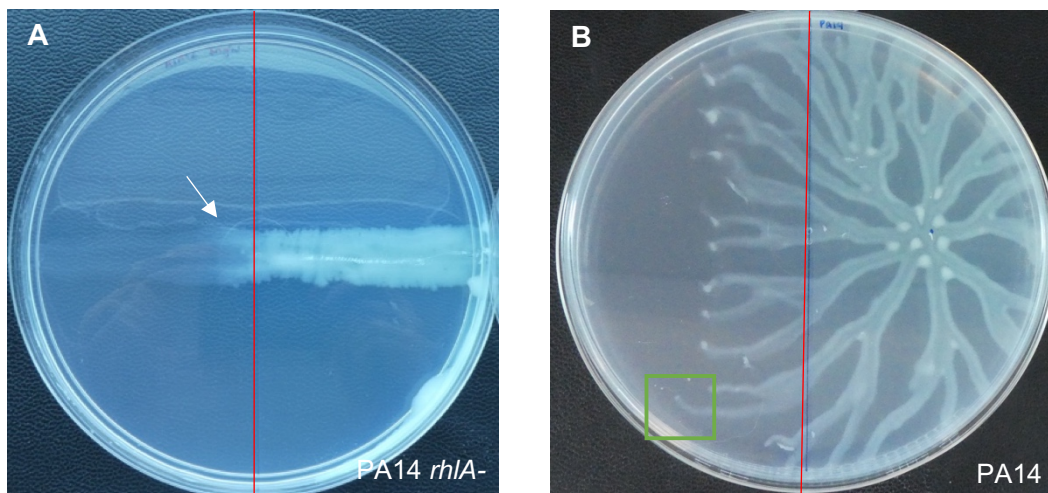


Figure 17 : Swarming de PA14 sur Pétris à 2 concentrations de carbone.

Les Pétris ont été séparés en 2 parties dont un côté composé de milieu avec source de carbone (dextrose et CAA) et le second ne comportant pas de carbone. Les Pétris ont été incubés 48h à 30°C. **A** : Un trait de suspension bactérienne de PA14 *rhIA-* a été inoculé en traversant le gélose. La flèche blanche représente l'endroit où la croissance diminue de façon importante. **B** : PA14 a été inoculée du côté avec source de carbone. L'encadré en vert représente une dendrite nommé « exploratrice ».

Les Pétris *swarming* à deux concentrations de source de carbone ont été inoculés de différentes façons pour permettre d'observer les réponses de la motilité face à ses changements d'environnements. L'inoculation utilisant PA14 *rhIA-* (Figure 17A) sous forme de trait traversant les deux concentrations nutritionnelles permet d'observer jusqu'où environ la source de carbone diffuse dans la gélose vers le côté pauvre en carbone. La bactérie PA14 *rhIA-* montre un peu de croissance même du côté avec moins de carbone mais la majorité de sa biomasse se trouve du côté avec source de carbone ou près de la frontière entre les deux milieux (flèche blanche sur figure 17A). Une goutte de 5 µl de suspension bactérienne de PA14 a aussi été inoculée du côté avec carbone et incubée à 30°C pendant 48 heures. On constate que les dendrites qui traversent vers le côté sans source de carbone s'arrêtent toutes environ au même niveau. Une des dendrites (encadré en vert de la figure 17B) représente une « exploratrice » qui semble pouvoir poursuivre son chemin plus loin vers le milieu pauvre en carbone. Les dendrites exploratrices ont été observées à plusieurs reprises dans les réplicats. Celles-ci ont été inoculées sur des nouvelles géloses à deux concentrations du côté avec source de carbone et incubées à 30°C pour 48 heures. La distance parcourue en centimètres des dendrites de la souche PA14 ainsi que des dendrites « exploratrices » inoculées sont représentés à la figure 18.

Distance parcourue des dendrites sur pétris 50/50

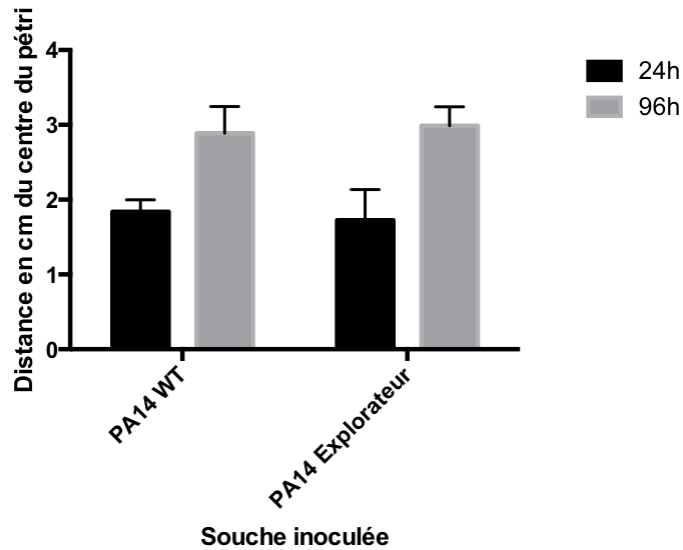


Figure 18 : Distance parcourue des dendrites des souches PA14 et PA14 « explorateur » sur Pétri à deux concentrations de carbone (50/50).

Le graphique représente la distance moyenne parcourue en centimètres par les dendrites de PA14 inoculées sur une gélose à deux concentrations de carbone. La mesure a été prise à partir de la frontière centrale du Pétri (représentée par une ligne rouge dans la figure 14b). Les mesures ont été effectuées à l'aide de 4 dendrites exploratrices pour 2 temps d'incubation soit 24 heures et 96 heures à 30°C.

Les distances parcourues ont été mesurées à partir de la ligne centrale du Pétri où les deux concentrations nutritionnelles se rejoignent. Après une incubation de 24 heures à 30°C, PA14 WT et PA14 « explorateurs » avaient parcouru la même distance, soit une moyenne de 2 cm. Après 96 heures d'incubation à 30°C, les deux souches ont démontré la même distance parcourue, soit une moyenne d'environ 3 cm. La différence de distance parcourue entre les souches n'est pas significativement différente. Cela suggère que les dendrites exploratrices ne seraient pas le fruit de mutations.

3.1.3 Source d'azote préférentielle de PA14

La source d'azote normalement présente dans le milieu *swarming* M9DCAA (NH_4Cl) a été substituée pour le NaNO_3 à la même molarité (0,02 M). Les milieux ont été préparés de la même façon et incubés à 34°C pour une durée de 20 heures (fig. 19). Une incubation de 20 heures permet d'observer une grande surface recouverte tout en préservant l'aspect des dendrites.

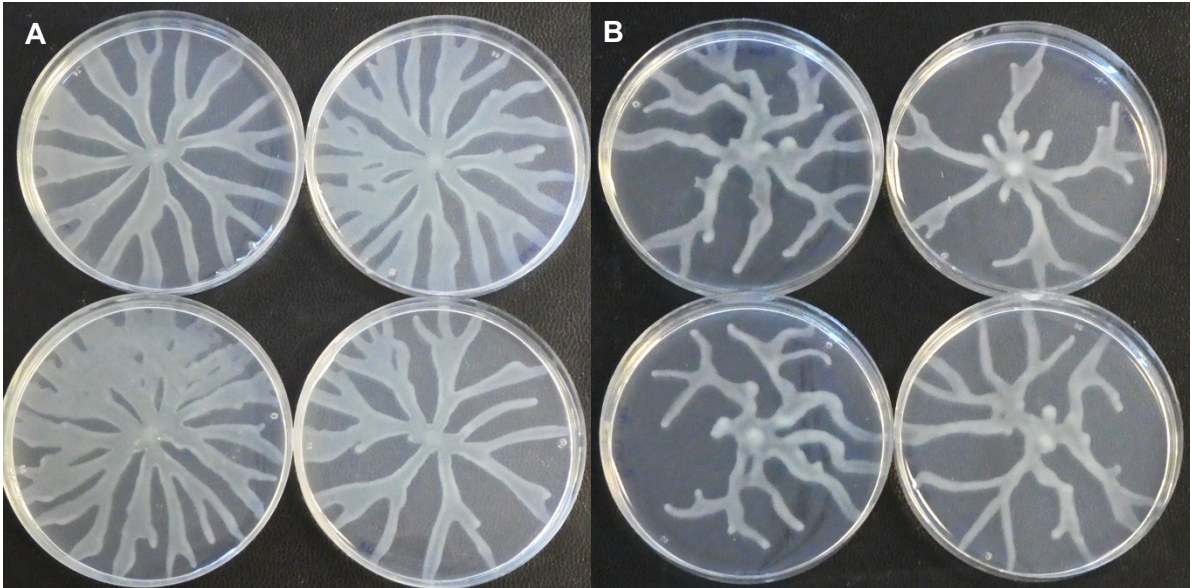


Figure 19 : *Swarming* de PA14 sur M9DCAA avec différentes sources d'azote
A. PA14 sur milieu M9DCAA avec NH_4Cl comme source d'azote. B. PA14 sur milieu M9DCAA avec NaNO_3 comme source d'azote. Les Pétris ont été incubés à 34°C pour 20 heures.

On observe une variation importante du phénotype de *swarming* pour la souche PA14 sur le milieu avec NaNO_3 . Le changement de source d'azote semble causer une désorganisation du patron *swarming*. Les dendrites sont alors irrégulières et torsadées. Le nombre de ramifications présentes au niveau de la colonie est aussi diminué. Sur le milieu additionné de NaNO_3 , les petites dendrites émergentes du centre de la colonie semblent démontrer une accumulation de biomasse à leur extrémité. Une légère accumulation de biomasse est aussi visible aux bords des dendrites sur le milieu avec NaNO_3 . D'autres expériences faisant varier les nutriments individuellement ont aussi été réalisées. Étant donné la forte variation des résultats, ceux-ci ne sont pas présentés. Le *swarming* est très sensible aux changements d'humidité ou de température ce qui pourrait expliquer ces difficultés.

3.2 Les co-cultures

Les espèces bactériennes colonisent en abondance les poumons des individus atteints de fibrose kystique. D'un point de vue social, les interactions entre ces différentes espèces sont peu connues. Deux des espèces les plus fréquemment retrouvées dans cet écosystème ont été choisies, soit *P. aeruginosa* PA14 et *B. cenocepacia* K56-2. Ces souches ont été mises en co-cultures dans un milieu *swarming* dans l'optique de déterminer si la motilité apporte un bénéfice évolutif à PA14, une souche *swarmer* bien connue. Des souches mutantes des différents gènes nécessaires à la motilité ont aussi été étudiées.

3.2.1 *P. aeruginosa* VS *B. cenocepacia*

PA14 VS K56-2

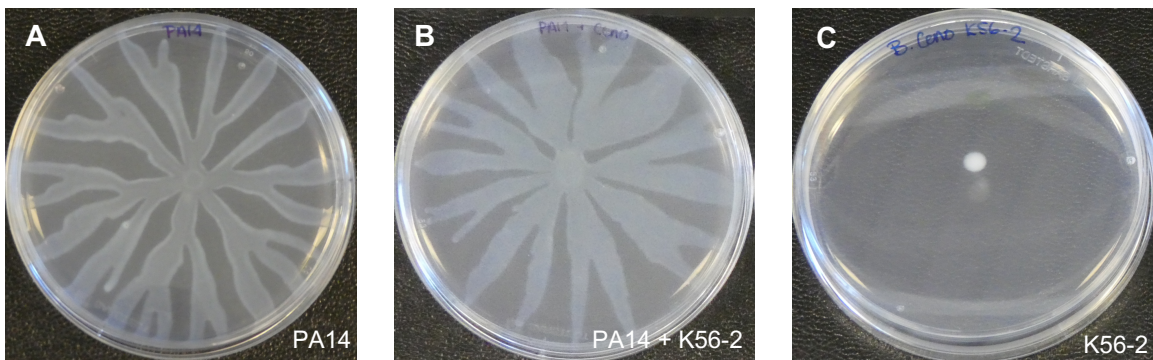


Figure 20 : *Pseudomonas aeruginosa* PA14 et *Burkholderia cenocepacia* K56-2 individuellement et co-cultivés sur milieu M9DCAA.

Les pré-cultures de chaque souche ont été lavées et diluées à une DO_{600} 3,0 à l'aide de PBS. Les suspensions bactériennes ont été mélangées à un ratio 1:1 et inoculées à raison de 5 μ l au centre de la gélose. Les Pétris ont été incubés à 30°C pour 20h. **A** : *P. aeruginosa*. **B** : *P. aeruginosa* et K56-2 mélangés 1:1. **C** : K56-2.

La souche K56-2 n'est pas capable d'effectuer une motilité sur le milieu M9DCAA contrairement à la souche sauvage PA14 (fig.20). Le mélange des deux souches à un ratio 1:1 ($DO_{600} = 3,0$) change le patron de *swarming* de façon importante. Les dendrites sont en effet plus larges et la biomasse s'y trouvant semble répartie plus uniformément que chez la souche sauvage PA14 seule. Chez PA14, la bordure des dendrites semble plus densément peuplée contrairement à son centre.

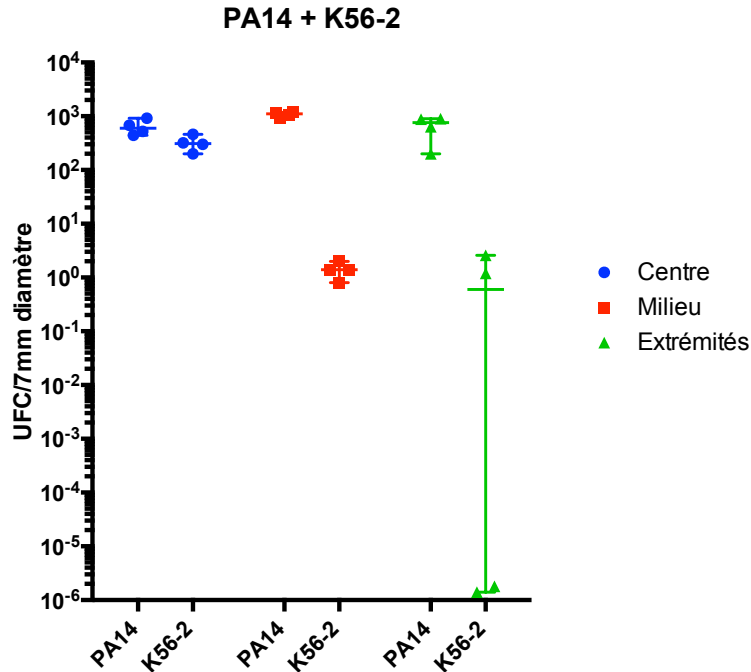


Figure 21 : UFC de PA14 et K56-2 lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Un total de 3 zones ont été échantillonnées soit le centre de la colonie, le milieu des dendrites et les extrémités. Le milieu est mesuré comme la distance médiane entre le centre de la colonie et l'extrémité des dendrites. Les souches PA14 et K56-2 ont été inoculées à l'origine à un ratio 1:1. Un total de 4 répliqués a été réalisé. La médiane et l'étendue des données sont représentées dans la figure.

Les UFC réalisées lors des co-cultures en *swarming* de PA14 et K56-2 démontrent une répartition assez stable de PA14 dans tout le patron et d'une concentration de K56-2 au centre de la colonie. Malgré l'incapacité de K56-2 à se déplacer seule sur le milieu M9DCAA, celle-ci montre un déplacement dans les dendrites jusqu'aux extrémités en présence de PA14.

PA14 *rhIA*- VS K56-2

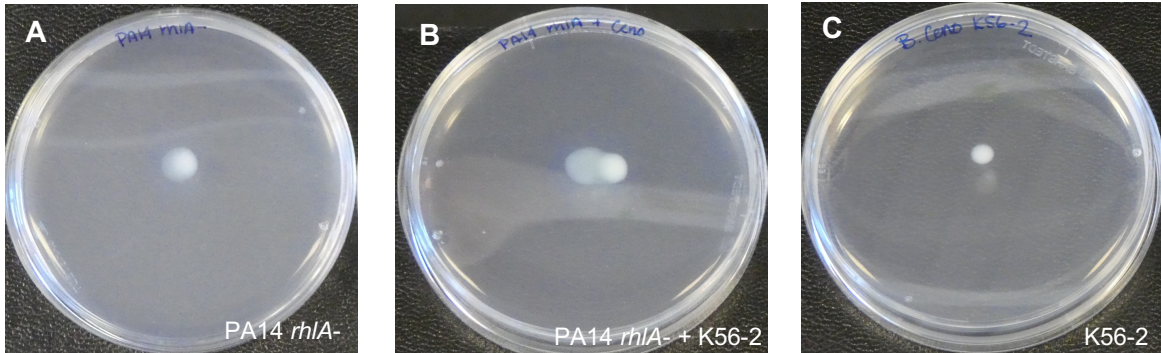


Figure 22 : Co-culture de *P. aeruginosa rhIA*- et *B. cenocepacia* K56-2.

Les pré-cultures de chaque souche ont été lavées et diluées à une $DO_{600} = 3,0$ à l'aide de PBS 1x. Les suspensions bactériennes ont été mélangées à un ratio 1 :1 et inoculées à raison de 5 μ l au centre des géloses. Les Pétris ont été incubés à 30°C pour 20h. **A** : *P. aeruginosa* PA14 *rhIA*-. **B** : Mélange 1:1 de PA14 *rhIA*- et K56-2. **C** : *B. cenocepacia* K56-2.

Les souches PA14 *rhIA*- et K56-2 ont été mélangées en co-cultures. La figure 22 montre que les deux souches séparées ne démontrent pas de motilité *swarming* (A et C). La souche PA14 *rhIA*- ne produit pas de rhamnolipides et ne peut donc pas se déplacer même si elle possède la seconde caractéristique nécessaire, soit un flagelle fonctionnel (Kohler *et al.*, 2000). Lorsque les souches se trouvent mélangées à un ratio 1 :1 ($DO_{600} = 3,0$), elles ne démontrent pas non plus de motilité *swarming* sur le milieu M9DCAA. Cela indique que la simple présence de PA14 n'est pas suffisante pour induire le *swarming* de K56-2.

3.2.2 Co-cultures des mutants PA14 *swarming* et K56-2

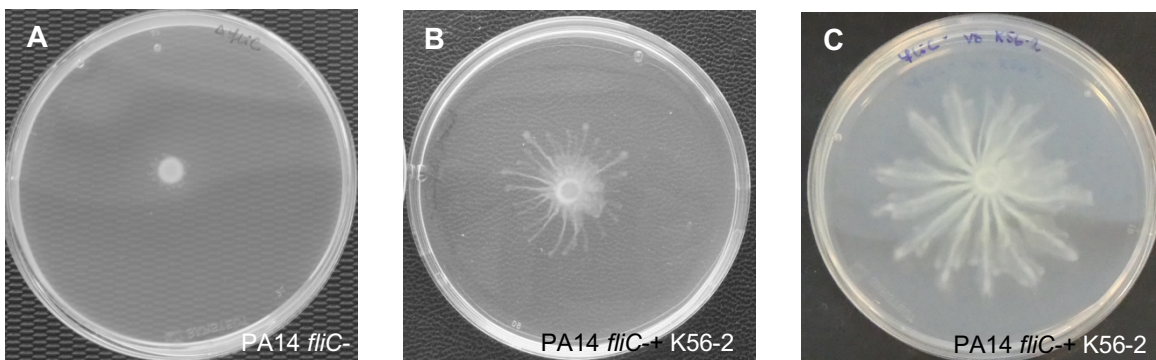


Figure 23: Co-culture de *P. aeruginosa* PA14 *fliC*- et *B. cenocepacia* K56-2.

Les pré-cultures de chaque souche ont été lavées et diluées à une $DO_{600} = 3,0$ à l'aide de PBS. Les suspensions bactériennes ont été mélangées à un ratio 1 :1 et inoculées à raison de 5 μ l au centre des géloses. Les Pétris ont été incubés à 30°C à des temps variables **A** : *P. aeruginosa* PA14 *fliC*- **B** : Mélange 1 :1 de PA14 *fliC*- et K56-2 pour 24h **C** : Pétri représenté en B et laissé incubé 48h.

La souche PA14 *fliC*⁻ seule est incapable de réaliser la motilité *swarming* sur le milieu M9DCAA. Celle-ci porte une mutation au niveau du gène codant pour la flagelline de type B et donc ne possède pas de flagelle fonctionnel requis pour la motilité (Kohler *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré dans les figures précédentes que la souche K56-2 seule ne réalise pas de motilité sur le milieu M9DCAA utilisé. La figure 23B démontre qu'un mélange à ratio 1:1 de chaque souche induit une motilité qui pourrait s'apparenter à du *swarming*. Celle-ci représente le patron obtenu après une incubation de 24 heures à 30°C. Le centre est dense et les dendrites sont très fines et ne couvrent pas une grande distance. La figure 20C représente le patron obtenu après 48 heures d'incubation à 30°C. Les dendrites sont plus longues et sont plutôt diffuses. Les deux souches individuellement ne peuvent se déplacer mais lorsqu'elles se retrouvent mélangées ensemble elles deviennent capable de réaliser un type de motilité. En comparaison avec la figure 22, ceci suggère que l'élément manquant à K56-2 et fourni par PA14 est l'agent mouillant, en l'occurrence les rhamnolipides. Le mutant *rhlA*⁻ n'induit pas le *swarming* de K56-2 (voir Fig. 22B).

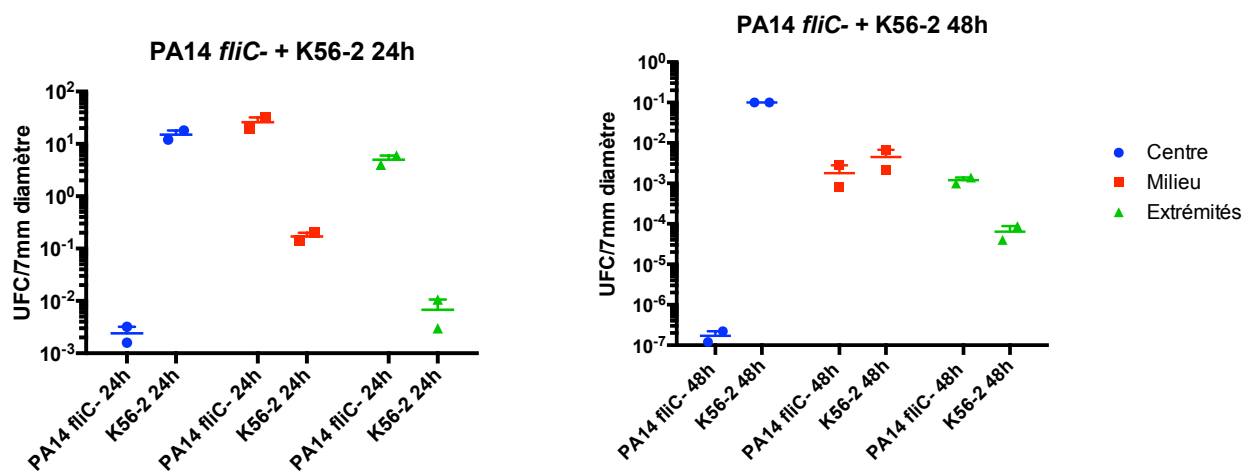


Figure 24: UFC de PA14 *fliC*⁻ et K56-2 lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Les souches PA14 *fliC*⁻ et K56-2 ont été inoculées à l'origine à un ratio 1 :1. Un total de 4 réplicats a été réalisé. La médiane et l'étendue des données sont représentées dans la figure. Les données ont été prélevées à 24h et 48 d'incubation à 30°C.

Après une incubation de 24h sur le milieu M9DCAA, il est possible d'observer que les cellules vivantes de PA14 *fliC*⁻ se trouvent de manière plus importante dans les dendrites qu'au centre de la colonie. La majorité des cellules de K56-2 se trouve au centre de la colonie. Après 48 heures d'incubation, il est possible de voir que K56-2 a rattrapé PA14 *fliC*⁻ au niveau des

dendrites et de l'extrémité de celles-ci. Il est important de rappeler ici que les deux souches individuelles sur le milieu M9DCAA ne démontrent pas de motilité *swarming* dans ces conditions expérimentales mais peuvent se déplacer lorsqu'elles se retrouvent ensemble.

PA14 *fliC*- VS K56-2 *rhIA*-

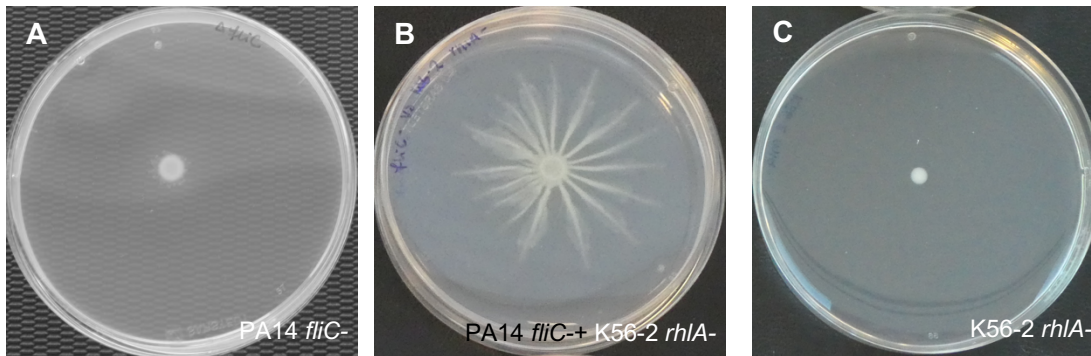


Figure 25: Co-culture entre *P. aeruginosa* PA14 *fliC*- et *B. cenocepacia* K56-2 *rhIA*-.

Les pré-cultures de chaque souche ont été lavées et diluées à une DO_{600} 3,0 à l'aide de PBS 1x. Les suspensions bactériennes ont été mélangées à un ratio 1 :1 et inoculées à raison de 5 μ l au centre des géloses. Les Pétris ont été incubés à 30°C pour 24 heures. **A.** Souche *P. aeruginosa* PA14 *fliC*- sur le milieu M9DCAA. **B.** Mélange à un ratio 1:1 des deux souches sur pétri M9DCAA. **C.** Souche K56-2 *rhIA*- sur milieu M9DCAA incubée à 30°C pour 20 heures.

Un test de co-culture entre la souche PA14 *fliC*- et K56-2 *rhIA*- a été réalisé, tel qu'illustré à la figure 25. Une motilité se produit sur le milieu M9DCAA lorsque les deux souches se retrouvent en co-culture. Le centre de la colonie est bien défini et les dendrites sont plutôt minces et diffuses. La biomasse semble plus importante sur une fine ligne au centre des dendrites. La surface recouverte est bien moindre que chez la souche sauvage PA14 (Fig. 20A). La différence entre la figure 23B et 25B est frappante. Les dendrites représentées sur l'image 23B sont très fines et courtes en comparaison avec celles retrouvées à la figure 25B. Dans les deux cas, PA14 *fliC*- se retrouve en abondance aux extrémités de ces dendrites (voir figure 24 et 26).

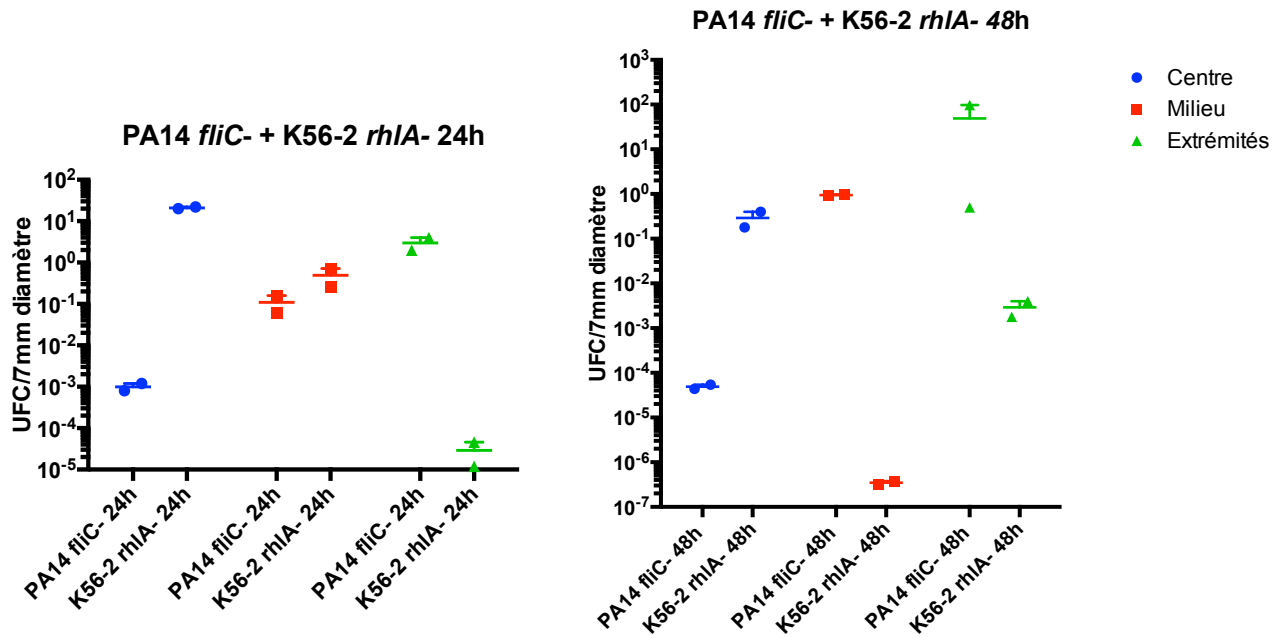


Figure 26 : UFC de PA14 *fliC*- et K56-2 *rhlA*- lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Les souches PA14 *fliC*- et K56-2 *rhlA*- ont été inoculées à l'origine à un ratio 1:1. Un total de 4 répliquats a été réalisé. La médiane et l'étendue des données sont représentées dans la figure. Les données ont été prélevées à 24h et 48h d'incubation à 30°C.

Le mélange des deux souches PA14 *fliC*- et K56-2 *rhlA*- démontre une répartition des cellules ressemblant à la figure 24. En effet, après 24 heures d'incubation, PA14 se retrouve majoritairement dans les dendrites et à l'extrémité de celles-ci. La majorité de K56-2 se trouve plus concentrée au centre de la colonie ainsi qu'au milieu des dendrites. Très peu de cellules de K56-2 sont retrouvées aux extrémités des embranchements. Après 48 heures, on observe une forte diminution de la présence de K56-2 au milieu des dendrites et une légère augmentation de celle-ci aux extrémités. La répartition de PA14 est sensiblement la même qu'à 24 heures d'incubation mais nous notons une faible diminution de celle-ci aux extrémités du patron dendritique. L'abondance des cellules vivantes de PA14 est frappante étant donné l'incapacité de celle-ci à se déplacer seule sur le milieu M9DCAA.

PA14 $\Delta pilA$ VS K56-2 et K56-2 $rhIA$ -

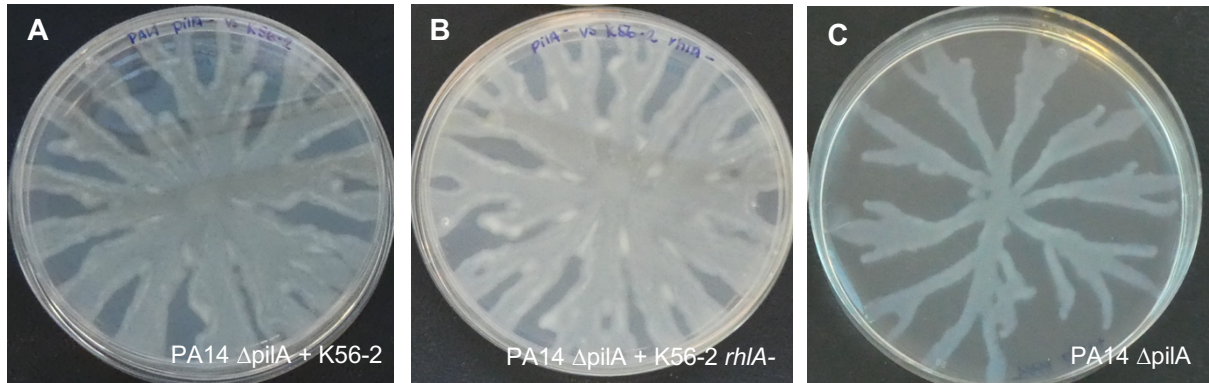


Figure 27 : Co-cultures des souches PA14 $\Delta pilA$, K56-2 et K56-2 $rhIA$ - en conditions *swarming*.

A. Co-culture des souches PA14 $\Delta pilA$ et K56-2 sur milieu M9DCAA incubée à 30°C pour 20 heures. **B.** Co-culture des souches PA14 $\Delta pilA$ et K56-2 $rhIA$ - sur milieu M9DCAA incubée à 30°C pour 20 heures. **C.** PA14 $\Delta pilA$ seule sur M9DCAA incubée à 30°C pour 20 heures.

Le mélange entre la souche *hyperswarmer* PA14 $\Delta pilA$ et K56-2 ou K56-2 $rhIA$ - montre une couverture importante de la surface totale du pétri. La séparation entre les dendrites est beaucoup moins évidente car la biomasse est très dense. On constate une petite accumulation de biomasse blanchâtre à divers endroits de la colonie.

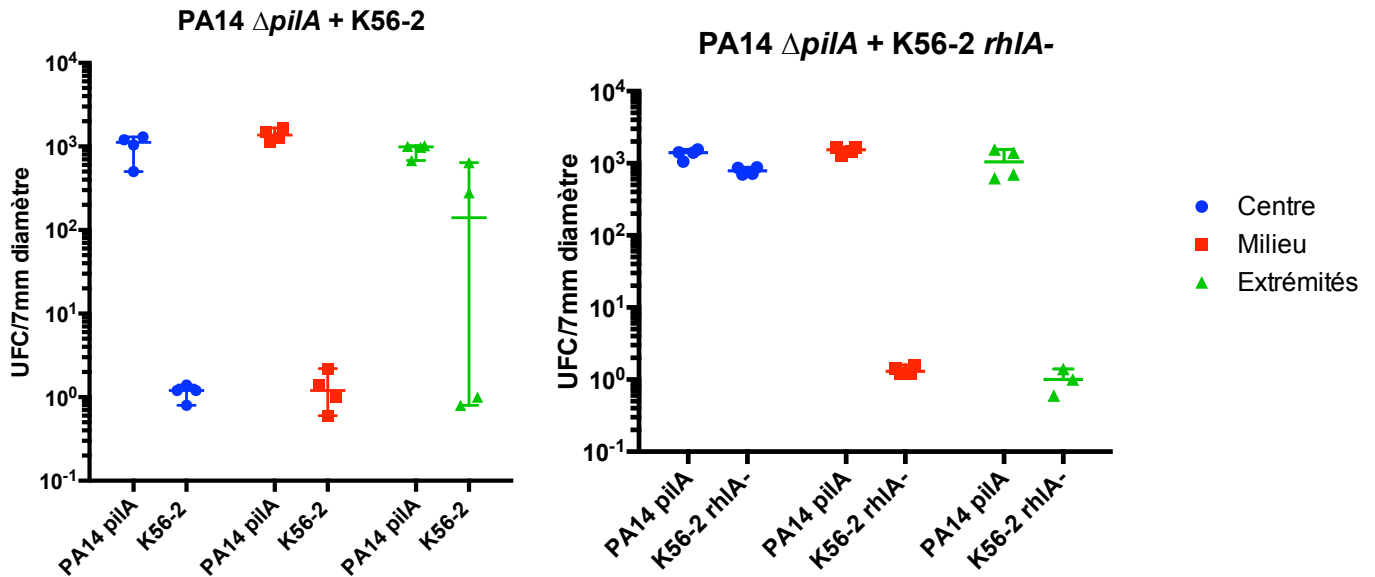


Figure 28 : UFC de PA14 $\Delta pilA$ et K56-2 et K56-2 $rhIA$ - lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Les souches PA14 $\Delta pilA$, K56-2 et K56-2 $rhIA$ - ont été inoculées à l'origine à un ratio 1:1. Un total de 4 réplicats a été réalisé. La médiane et la répartition des données sont représentées dans la figure.

Lors du mélange des souches PA14 $\Delta pilA$ et K56-2, la répartition des deux microorganismes est très hétérogène. Nous retrouvons la souche mutante de *P. aeruginosa* à une densité assez régulière aux différents endroits de la colonie. Il en est de même pour le mélange entre PA14 $\Delta pilA$ et K56-2 *rhIA*-. La souche de *B. cenocepacia* K56-2 démontre une plus forte présence dans les extrémités des dendrites lorsqu'elle se trouve en présence de PA14 $\Delta pilA$. Pour ce qui est de K56-2 *rhIA*-, celle-ci regroupe la majorité de ses cellules vivantes au centre de la colonie. Sa répartition dans les dendrites et à leur extrémité est négligeable.

PA14 $\Delta pilAfliC$::MrT7 VS K56-2

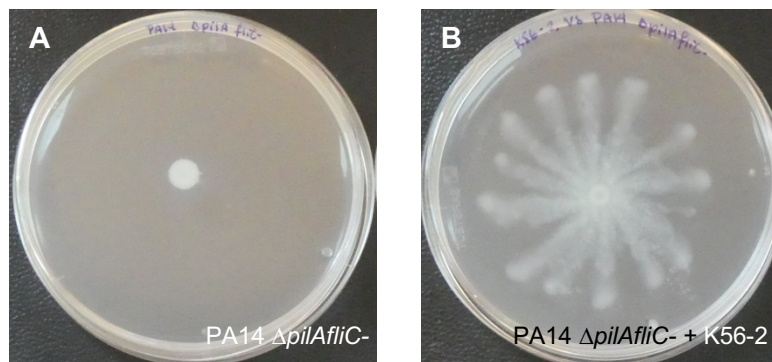


Figure 29: Pétris *swarming* avec la souche PA14 $\Delta pilAfliC$ - ainsi que la souche K56-2 sur milieu M9DCAA.

A. Souche PA14 $\Delta pilAfliC$ - ::MrT7 réalisée dans le cadre de cette étude et inoculée sur gélose M9DCAA 0,5% d'agar. **B.** Co-culture de la souche PA14 $\Delta pilAfliC$ - et K56-2 sur milieu *swarming* 0,5%. Les géloses ont été incubées à 30°C pour 20 heures.

Le double mutant PA14 $\Delta pilAfliC$ - ne démontre aucune motilité sur le milieu *swarming* M9DCAA, tel qu'attendu. Par contre, lorsque ce double mutant se retrouve en co-culture avec la souche K56-2, un patron de *swarming* diffus est observable tel que sur l'image B de la figure 29. Les dendrites sont légèrement plus courtes que celles de la souche sauvage PA14 après le même temps d'incubation. Les dendrites sont plutôt larges et semblent être plus densément peuplées au centre et aux extrémités. Des dendrites uniques sont originaires du centre, il n'y pas de ramifications supplémentaires observables contrairement à la souche sauvage.

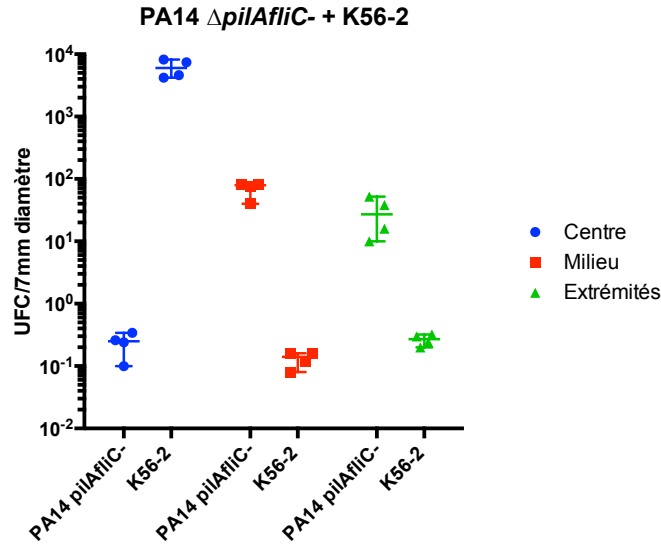


Figure 30 : UFC de PA14 $\Delta pilAflIC-$ et K56-2 lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Les souches PA14 $\Delta pilAflIC-$ et K56-2 ont été inoculées à l'origine à un ratio 1 : 1. Un total de 4 réplicats a été réalisé. La médiane et l'étendue des données sont représentées dans la figure.

La répartition du double mutant PA14 $\Delta pilAflIC-$ dans le patron de co-culture avec K56-2 est représenté à la figure 30. Au centre de la colonie, la souche la plus densément peuplée est K56-2. Ce ratio change drastiquement au milieu des dendrites où les cellules vivantes les plus présentes sont celles du double mutant, non-motile lorsqu'il est seul sur le milieu M9DCAA en conditions de *swarming*. Le double mutant est aussi beaucoup plus abondant que la souche K56-2 au niveau de l'extrémité des dendrites. Ce résultat est inattendu étant donné l'incapacité du double mutant à réaliser la motilité *swarming* lorsque celui-ci est seul sur le milieu M9DCAA.

3.2.3 Co-cultures des mutants des pili *cup* avec K56-2

PA14 *cupA* + K56-2

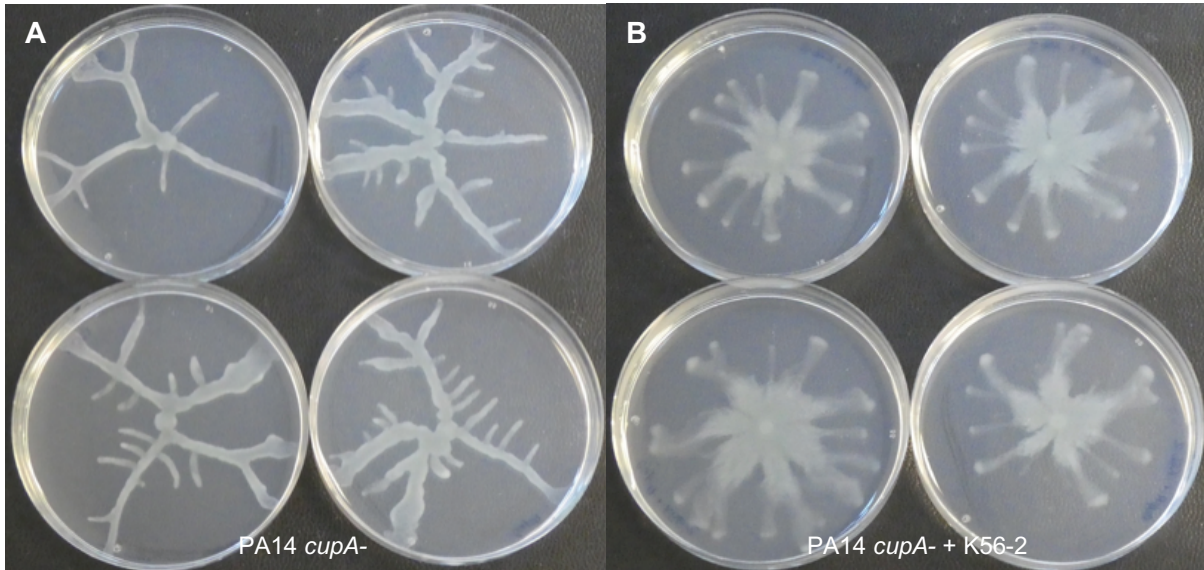


Figure 31 : Co-culture des souches PA14 *cupA*- et K56-2 sur milieu *swarming* M9DCAA incubé à 30°C pour 20 heures.

A. PA14 *cupA*- seul sur M9DCAA 0,5%. **B.** PA14 *cupA*- mis en co-culture à un ratio 1:1 avec K56-2 sur milieu M9DCAA 0,5% d'agar.

Le mutant *cupA*- de PA14 montre un patron de *swarming* très différent de la souche sauvage sur le milieu *swarming* à 0,5% d'agar (Fig. 31A). Celle-ci réalise un patron dendritique désorganisé où de nombreuses ramifications sont observées. Sur chaque réplicat on retrouve environ 4 dendrites principales suivies par de nombreuses petites ramifications s'effectuant à 90°. Lorsque cette souche se retrouve en co-culture avec K56-2 (Fig. 31B) le patron *swarming* change de manière importante. Nous retrouvons alors un patron de style dendritique mais beaucoup plus diffus et ne démontrant pas de ramifications importantes. La zone entourant le centre de la colonie semble plus densément peuplée ainsi que l'extrémité des dendrites. La surface recouverte est moindre qu'avec la souche sauvage.

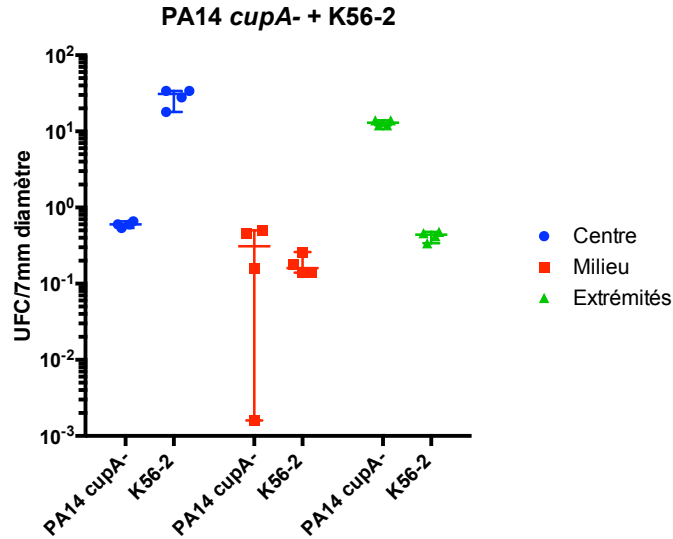


Figure 32 : UFC de PA14 *cupA*- et K56-2 lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Les souches PA14 *cupA*- et K56-2 ont été inoculées à l'origine à un ratio 1 :1. Un total de 4 répliquats a été réalisé. La médiane et l'étendue des données sont représentées dans la figure.

La répartition de la biomasse de PA14 *cupA*- semble se concentrer aux extrémités des dendrites. La souche K56-2 montre une plus grande présence de cellules vivantes au centre de la colonie que le mutant *cupA*-. La répartition de K56-2 au centre des dendrites et à leur extrémité est assez similaire. La présence de PA14 *cupA*- au milieu des dendrites est assez variable mais se rapproche de celle de K56-2.

PA14 *cupB*+ K56-2

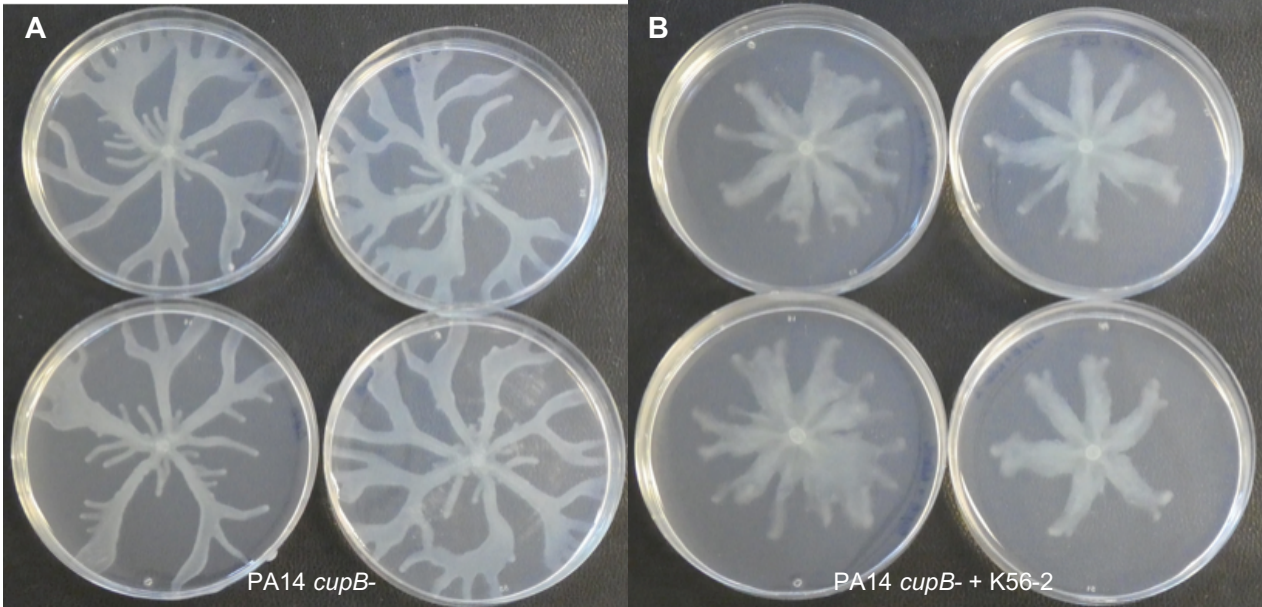


Figure 33 : Souches PA14 *cupB*- et K56-2 en co-culture 1 :1 sur milieu M9DCAA à 0,5% d'agar. Les pétris ont été incubés à 30°C pendant 20 heures. **A.** Souche PA14 *cupB*-. **B.** Co-culture en ratio 1 :1 des souches PA14 *cupB*- et K56-2.

Le patron de PA14 *cupB*- ressemble à celui de la souche sauvage sur le même milieu mais offre tout de même des différences importantes. Les dendrites majeures semblent plus larges que celles de la souche sauvage (voir par ex. Fig. 20A). De plus, des petites dendrites sont aussi observées avec comme origine le centre de la colonie. Celles-ci s'apparentent à celles observés chez la souche PA14 *cupA*- (voir fig. 31). Les extrémités des dendrites sont aussi plus larges et montrent de nombreuses ramifications justes avant d'entrer en contact avec le bord du pétri. Lorsque PA14 *cupB*- est co-inoculée avec K56-2, le patron observé est bien différent des souches seules. Le *swarming* obtenu est diffus avec des dendrites larges et beaucoup plus courtes. Les bactéries semblent bien réparties dans tout le patron mais le centre de la colonie semble plus opaque. Les extrémités des dendrites démontrent aussi une légère accumulation de biomasse plus dense.

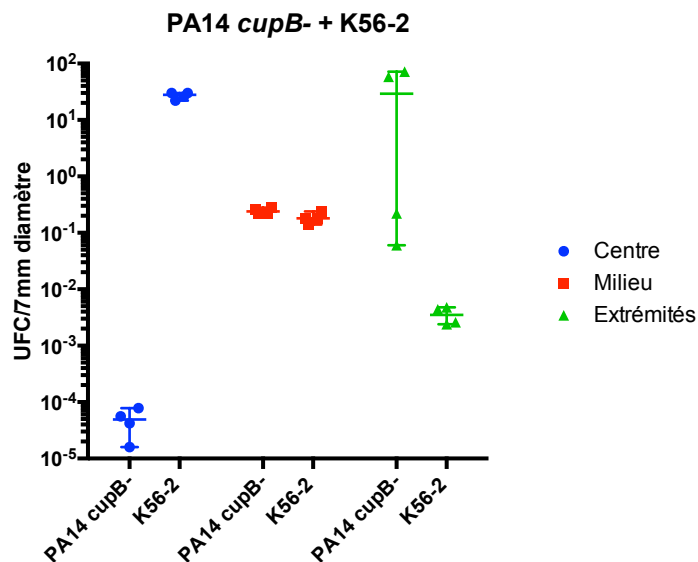


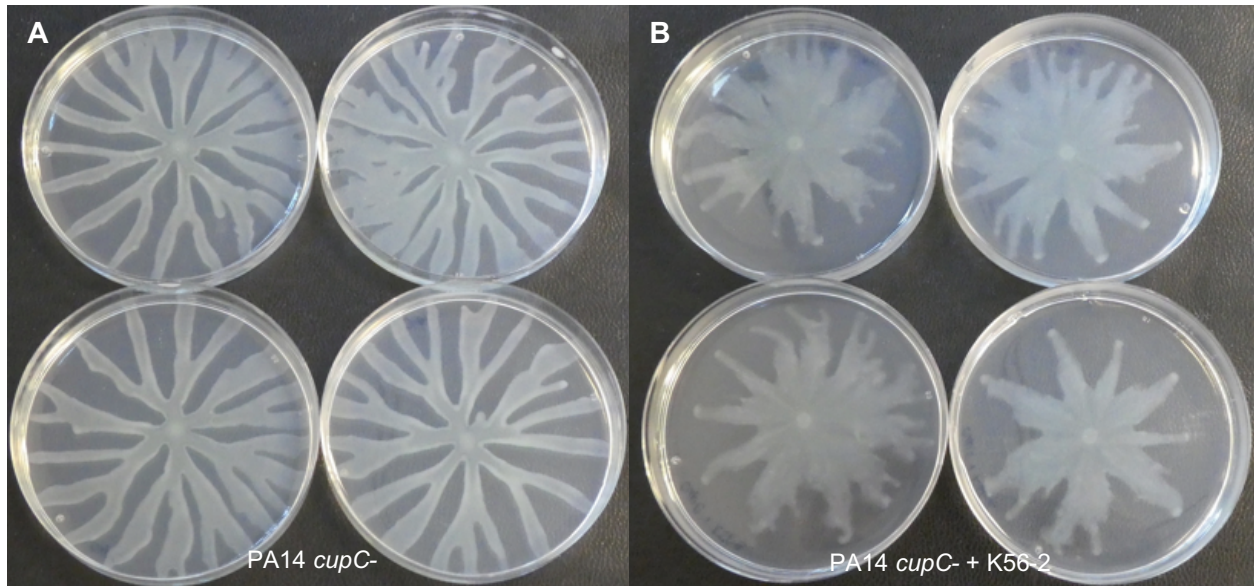
Figure 34 : UFC de PA14 *cupB*- et K56-2 lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Les souches PA14 *cupB*- et K56-2 ont été inoculées à l'origine à un ratio 1 :1. Un total de 4 répliquats a été réalisé. La médiane et l'étendue des données sont représentées dans la figure.

Le patron de répartition du mutant *cupB*- ressemble beaucoup à celui du mutant *cupA*- à la figure précédente (fig. 32). La présence de *P. aeruginosa cupB*- semble concentrée au milieu des dendrites ainsi qu'à leur extrémité. Le centre de la colonie est majoritairement occupé par K56-2 et très peu de cellules vivantes de PA14 *cupB*- y sont retrouvées. Les deux espèces sont présentes de manière égale au milieu des dendrites. Aux extrémités de celles-ci, PA14 montre une plus grande abondance mais K56-2 est tout de même présent.

PA14 *cupC*- VS K56-2

Figure 35 : PA14 *cupC*- mis en co-culture à 1 :1 avec K56-2 sur milieu M9DCAA 0,5%.



Les souches sont incubées à 30°C pour 20 heures. **A.** PA14 *cupC*-. **B.** PA14 *cupC*- et K56-2 en co-culture.

L'image A de la figure 35 montre le *swarming* obtenu par la souche PA14 *cupC*- sur le milieu M9DCAA à 0,5% d'agar. Le patron s'apparente beaucoup à celui de la souche sauvage de PA14 sur le même milieu. Lorsque la souche PA14 *cupC*- se trouve en co-culture avec K56-2, le patron *swarming* change de façon notable. La colonie qui en résulte est diffuse et ne montre pas de dendrites aussi distincte que la souche sauvage. La forme étoilée montre des petites dendrites qui se ramifient aux extrémités de la colonie. La surface recouverte est aussi moindre que celle de la souche sauvage.

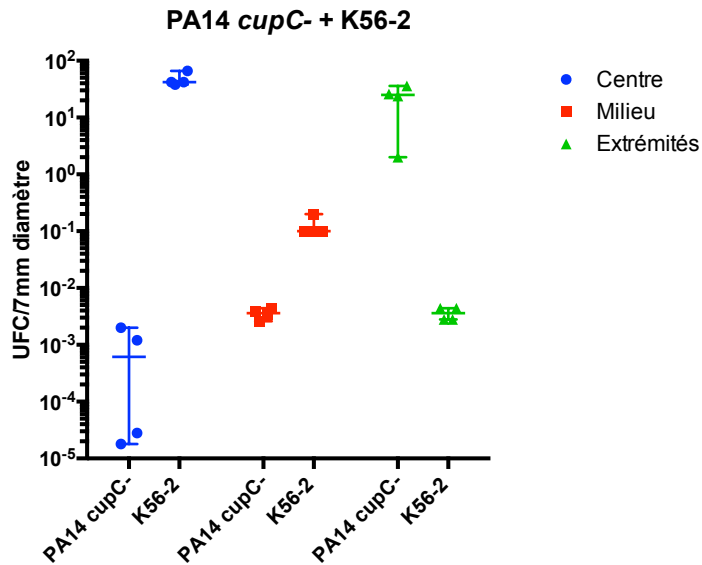


Figure 36 : UFC de PA14 *cupC*⁻ et K56-2 lors d'une co-culture en *swarming*.

Les UFC ont été réalisées à l'aide de coupons d'agar de 7 mm de diamètre prélevés sur un patron *swarming* sur milieu M9DCAA. Les souches PA14 *cupC*⁻ et K56-2 ont été inoculées à l'origine à un ratio 1 :1. Un total de 4 répliquats a été réalisé. La médiane et l'étendue des données sont représentées dans la figure.

Lors de la co-culture en *swarming* de PA14 *cupC*⁻ et K56-2, le centre de la colonie est majoritairement occupé par K56-2. Au milieu des dendrites, K56-2 montre une présence légèrement plus importante que PA14. Les cellules vivantes de PA14 *cupC*⁻ sont très présentes aux extrémités des dendrites et surpassent K56-2.

3.2.4 *Swarming* et *swimming* de la souche PA14 *cupAfl*⁻

Pour vérifier les possibles mutants obtenus suite à la transformation, ceux-ci ont été soumis à un test de *swarming* et de *swimming*. Les transformants sont représentés à la figure 37 sur un milieu *swarming* M9DCAA.

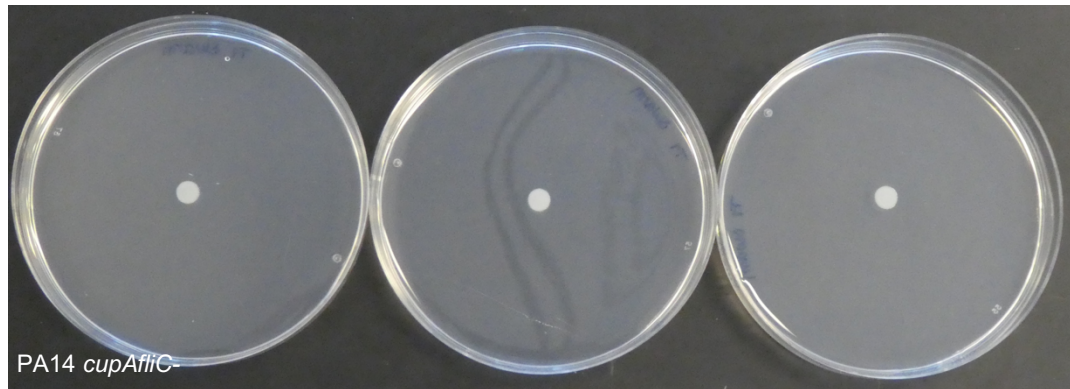


Figure 37 : Essai de *swarming* des transformants PA14 *cupAflIC-*

Les 3 transformants ont été testés sur milieu *swarming* M9DCAA et incubés à 30°C pendant 20 heures.

Étant donné la double mutation réalisée, le phénotype attendu était un mutant non *swarmer* dû à l'absence de flagelle fonctionnel. C'est ce phénotype qui est observable à la figure 37, ce qui confirme donc que la mutation est possiblement bonne. Un second test doit être réalisé pour confirmer, soit un protocole de *swimming* (fig.38).

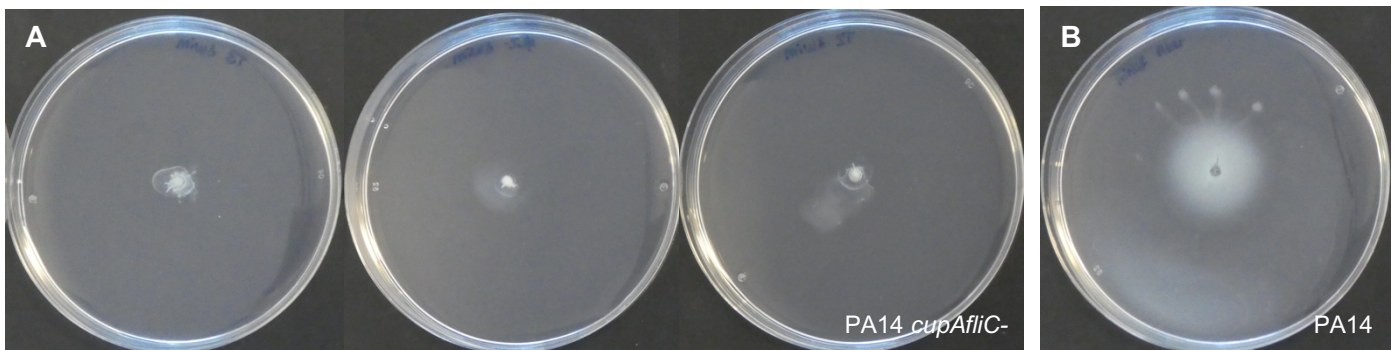


Figure 38 : Essais en *swimming* des transformants PA14 *cupAflIC-* et PA14 WT

Les 3 transformants ont été testés aussi en milieu M9DCAA *swimming* à 0,25% d'agar (A). La souche sauvage PA14 a été utilisée comme témoin positif du *swimming* (B). Les géloses ont été incubées à 30°C 20 heures.

Le double mutant PA14 *cupAflIC-* ne devrait pas pouvoir réaliser le *swimming* et ceci est démontré à la figure 38. Les 3 transformants ne démontrent pas la capacité de cellules *swimmers* contrairement à la souche sauvage qui démontre un halo caractéristique de cette motilité (fig.38B). Des petites dendrites sont présentes à la surface de la gélose de l'image B. Ceci se produit lorsque les cellules sortent de l'agar et *swarment* à la surface de l'agar.

3.2.5 *Swarming* K56-2 additionné de rhamnolipides

Pour observer si la souche K56-2 est capable de se déplacer en utilisant seulement des rhamnolipides, ceux-ci ont été ajoutés au lieu d'inoculation des bactéries à un volume de 5 μ l (10 000 ppm/ μ l). Les rhamnolipides utilisés proviennent de la compagnie Jeneil Biosurfactant Co. (Lot #050629). Ceux-ci sont composés de C₈, C₁₀ et C₁₂C₁₂.



Figure 39 : *Swarming* avec la souche K56-2 avec ajout de rhamnolipides

A. K-56-2 sur milieu *swarming* incubé à 30°C pendant 20h additionnée de 5 μ l MeOH comme témoin négatif.

B. Souche K56-2 inoculée sur milieu *swarming* et incubée à 30°C pendant 20h. La souche était additionnée à son point d'inoculation de rhamnolipides laissés sécher 10 minutes, 5 μ l à 10 000 ppm / μ l.

La souche K56-2 est incapable de réaliser la motilité *swarming* sur le milieu M9DCAA. Il en est de même pour le témoin négatif A de la figure 39 qui démontre que K56-2 ne peut se déplacer avec l'ajout de 5 μ l de méthanol. Lorsque K56-2 est additionné de rhamnolipides en son lieu d'inoculation, cette souche démontre alors une motilité qui s'apparente au *swarming* de par sa forme portant des dendrites peu définies.

3.3 La résistance à la tobramycine

La résistance aux antibiotiques est une problématique grandissante dans le domaine de la microbiologie. Ce troisième objectif aborde le thème de la résistance aux antibiotiques, plus particulièrement à la tobramycine, d'une colonie bactérienne de *P. aeruginosa* PA14 en *swarming*. Différents tests ont été réalisés pour permettre d'approfondir nos connaissances sur les avantages de la motilité *swarming* lorsqu'un organisme se trouve dans un milieu avec antibiotique.

3.3.1 *Swarming* avec ajout de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine

Pour débiter les tests de résistance aux antibiotiques, différentes concentrations sous-inhibitrices de tobramycine ont été ajoutées au milieu *swarming* M9DCAA. La souche PA14 de *P. aeruginosa* a ensuite été inoculée sur ces géloses.

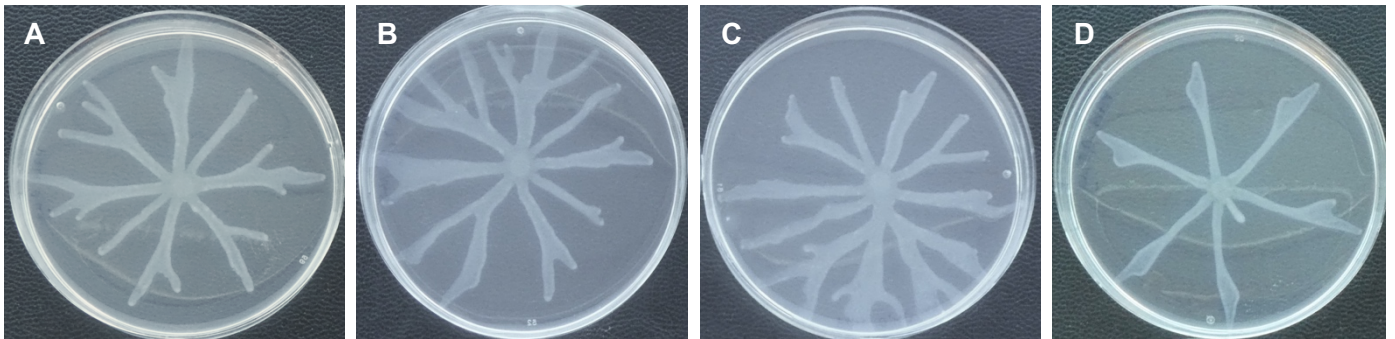


Figure 40 : Résultats de l'ajout de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine dans le milieu M9DCAA 0,5%.

A. PA14 sur milieu sans antibiotique, incubation à 30°C pendant 20 heures. **B.** PA14 sur tobramycine 0,05 µg/ml. **C.** 0,1 µg/ml. **D.** 0,8 µg/ml. CMI = 256 µg/ml.

L'ajout d'antibiotique affecte la forme du *swarming* surtout lorsque les concentrations sont plus élevées. Il est possible d'observer une perte de ramification des dendrites lorsqu'une concentration de 0,8 µg/ml de tobramycine est présente. La bactérie *P. aeruginosa* démontre une CMI pouvant aller au-delà de 256 µg/ml. Les concentrations plus faibles, soit 0,05 et 0,1 µg/ml affectent légèrement le patron de ramification. La plus grande différence semble se trouver au niveau de la largeur des dendrites qui s'élargissent avec une augmentation de concentration de tobramycine. Cette différence est subtile mais celle-ci sera étudiée plus en détail à la section 4.3.2.

3.3.2 Effets de la tobramycine sur la largeur des dendrites

Étant donné que l'ajout de tobramycine semble affecter la largeur des dendrites, celles-ci ont été mesurées. Un total de 8 mesures par pétri ont été réalisées et celles-ci se trouvaient à une distance égale entre le centre de la colonie et les extrémités des dendrites. Les dendrites mesurées ont été sélectionnées de manière aléatoire si la colonie en comportait plus que 8.

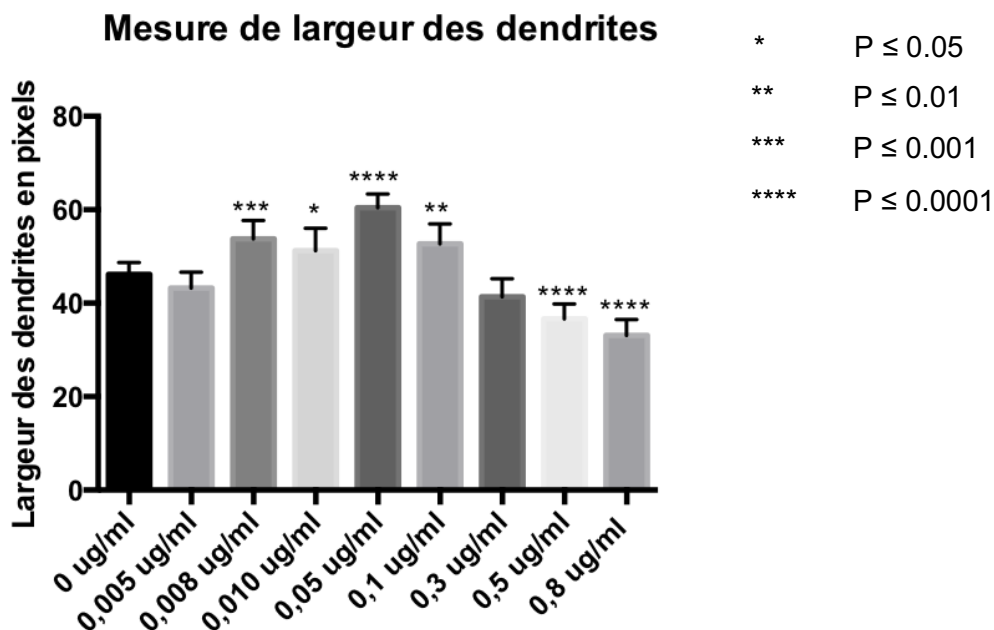


Figure 41: Mesures des largeurs des dendrites de PA14 à l'aide du logiciel Photoshop.

Un test de comparaison multiple de Dunnet a été réalisé et chaque concentration d'antibiotique a été comparée à celle du témoin, soit 0 $\mu\text{g/ml}$. CMI = 256 $\mu\text{g/ml}$.

La largeur des dendrites est représentée en pixels dans la figure 41. Celles-ci démontrent une augmentation significative de leur largeur en lien avec l'ajout d'antibiotique jusqu'à une concentration de 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Lorsque les concentrations de tobramycine sont plus élevées que 0,05 $\mu\text{g/ml}$, les dendrites subissent une diminution de largeur pour se retrouver plus mince que le témoin à 0 $\mu\text{g/ml}$. À une concentration de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, la largeur des dendrites n'est pas différente de celle du témoin sans antibiotique.

3.3.3 Observations au binoculaire des dendrites

Des observations supplémentaires ont été réalisées pour observer si seulement la largeur des dendrites était affectée par l'ajout d'antibiotiques. À l'aide d'un binoculaire, des photos ont été prise de zones précises des dendrites.

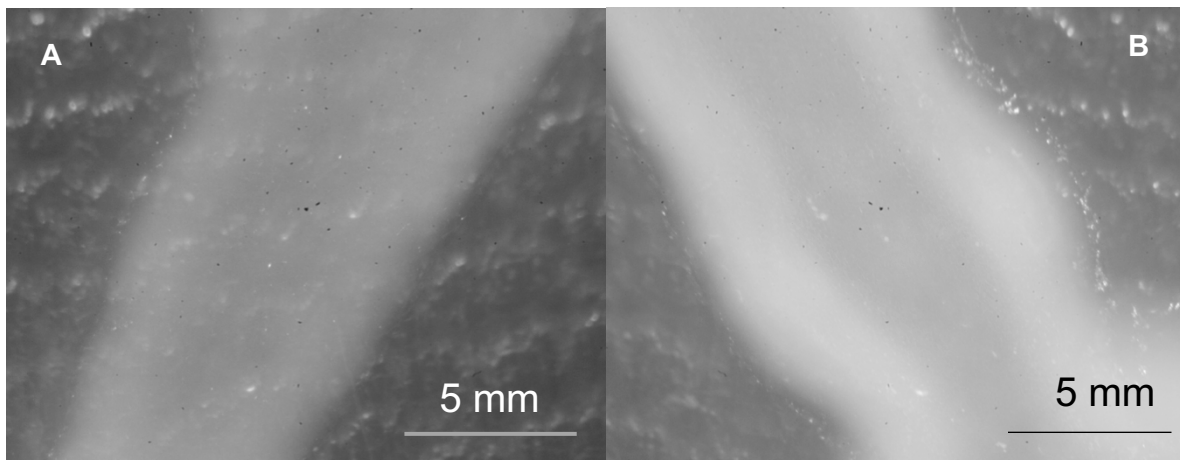


Figure 42 : Portions de dendrites de PA14 sur milieu M9DCAA photographiés à l'aide du binoculaire. A. Dendrite sur milieu sans tobramycine. B. Dendrite sur milieu avec 0,5 µg/ml de tobramycine.

La figure 42 montre que sans l'ajout d'antibiotique dans le milieu, la dendrite de la colonie *swarmer* montre une bordure légèrement plus opaque que le centre. Les cellules semblent bien dispersées dans l'entièreté de la dendrite. Lorsque le milieu est additionné de 0,5 µg/ml de tobramycine, une accumulation bactérienne semble se produire sur les bordures de la dendrite. Les pourtours sont plus opaques que le centre et semblent plus épais. La composition de ces bordures reste inconnue.

3.3.4 Baclight™

Pour approfondir l'étude de la composition de la bordure des dendrites, l'utilisation du Baclight™ a été proposée. Cette méthode permet de différencier les bactéries mortes et vivantes en utilisant des colorants spécifiques. Cette méthode est détaillée à la section 2.4.5.

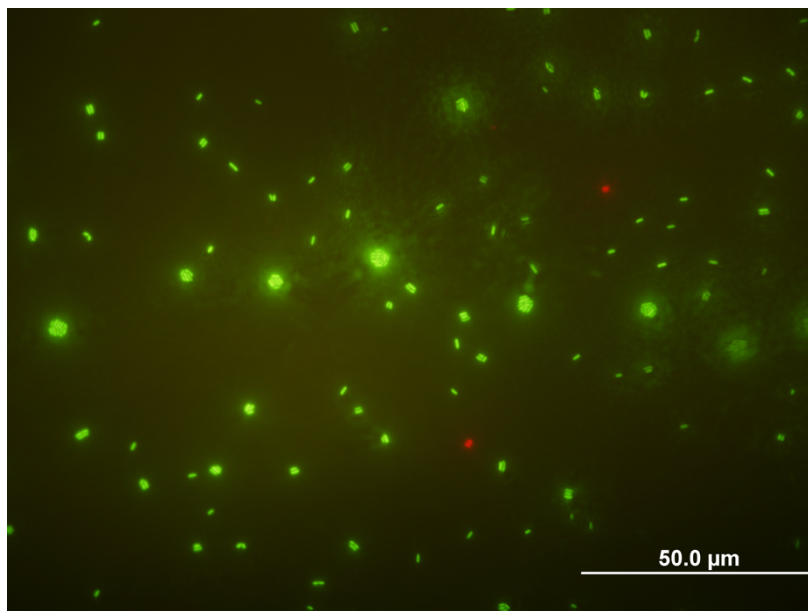


Figure 43: Microscopie en épifluorescence obtenue suite à une coloration Baclight™ de *P. aeruginosa* PA14 prélevée d'une bordure de dendrite en *swarming* sans ajout de tobramycine. La biomasse a été resuspendue dans 1 ml de solution saline (NaCl 0.85%) et traitée avec le kit de viabilité cellulaire Live/Dead™ (L-7012). L'image a été prise à 1000x.

L'image obtenue à l'aide de la méthode Baclight™ permet d'observer que la plupart des bactéries présentes dans l'échantillon sont vivantes, seulement deux bactéries sont colorées en rouge et sont donc mortes. On distingue des agrégats cellulaires, ce qui se produit souvent avec *P. aeruginosa* en microscopie. Un seul échantillon a été traité avec la méthode Baclight™. Une seconde méthode de détection des bactéries vivantes et mortes a été utilisée, soit la cytométrie en flux. La méthode du Baclight™ requiert beaucoup de travail pour réaliser un seul échantillon. La cytométrie en flux a donc été priorisée étant donné sa rapidité et sa fiabilité.

3.3.5 Cytométrie en flux

La cytométrie a été réalisée pour confirmer l'hypothèse que les bordures des dendrites sont composées majoritairement de cellules mortes sacrifiées lorsqu'il y a ajout de tobramycine dans le milieu *swarming*. Les figures 44 et 45 représentent les premiers résultats obtenus suite aux analyses en cytométrie réalisées à la polytechnique de Montréal.

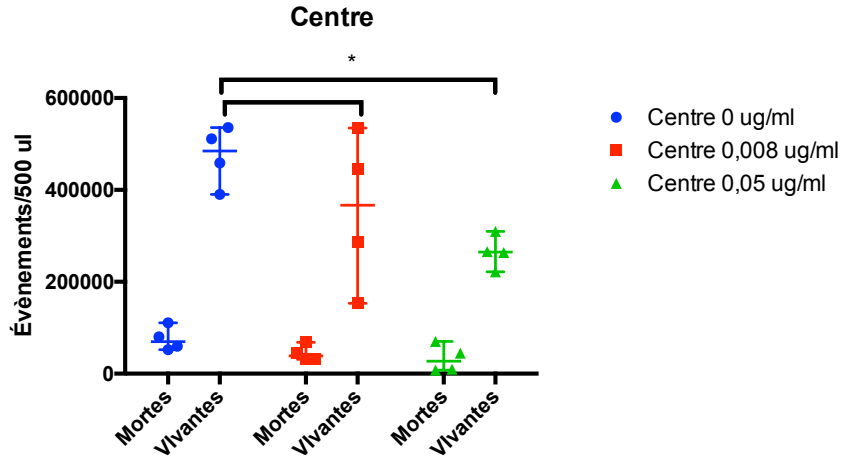


Figure 44 : Dénombrement par cytométrie en flux des centres des dendrites

Les évènements représentent le nombre de cellules présentes dans un échantillon de 500 µl. Un total de 3 conditions ont été testées. Les milieux ont été additionnés de 0 µg/ml, 0,008 µg/ml et 0,05 µg/ml de tobramycine. (* = $p \leq 0,05$).

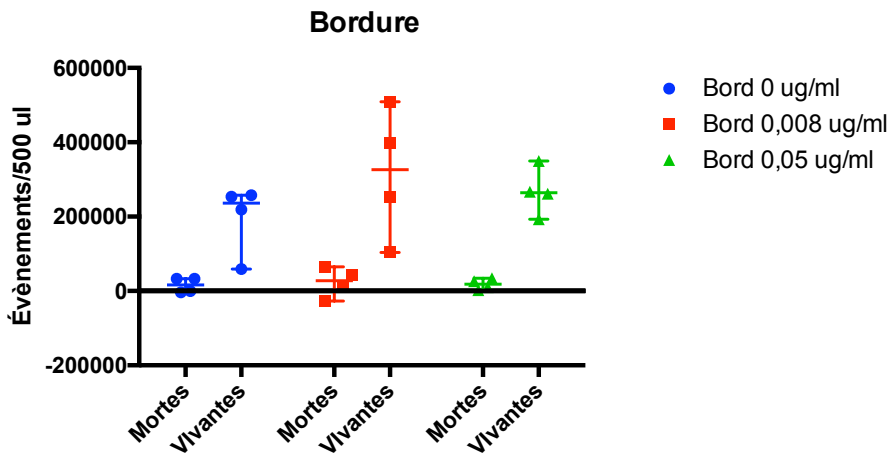


Figure 45 : Dénombrement par cytométrie en flux des bordures des dendrites

Les évènements représentent le nombre de cellules présentes dans un échantillon de 500 µl. Un total de 3 conditions ont été testées. Les milieux ont été additionnés de 0 µg/ml, 0,008 µg/ml et 0,05 µg/ml de tobramycine.

Les premiers essais en cytométrie en flux (fig. 44 et 45) ont été réalisés avec les échantillons de 500 µl non dilués. Il a été possible de déterminer à l'aide de ces tests que l'ajout d'antibiotique dans le milieu *swarming* M9DCAA n'augmente pas la quantité de bactéries mortes au niveau des bordures des dendrites. Au centre des dendrites, la présence de bactéries vivantes

diminue. Un test statistique de Dunnet permet de déterminer que les différences entre l'ajout de 0,008 $\mu\text{g/ml}$ de tobramycine et le milieu sans antibiotique ne sont pas significatives ($p > 0.05$). Ce test est utilisé pour permettre une comparaison multiple entre une moyenne témoin (sans antibiotique) et les moyennes de différents groupes (différentes concentrations d'antibiotique). Un test de Tukey aurait aussi pu être utilisé pour permettre la comparaison de toutes les moyennes entre-elles. Le même test permet d'observer une différence significative entre le milieu sans antibiotique et le milieu additionné de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (* = $p \leq 0,05$). Pour les mesures des bordures des dendrites, l'ajout d'antibiotique n'affecte pas de manière significative la présence de bactéries mortes. Étant donné la forte saturation des événements obtenus dans le « *gating* » du cytomètre, un second test a été réalisé en diluant les échantillons à un ratio 1:10.

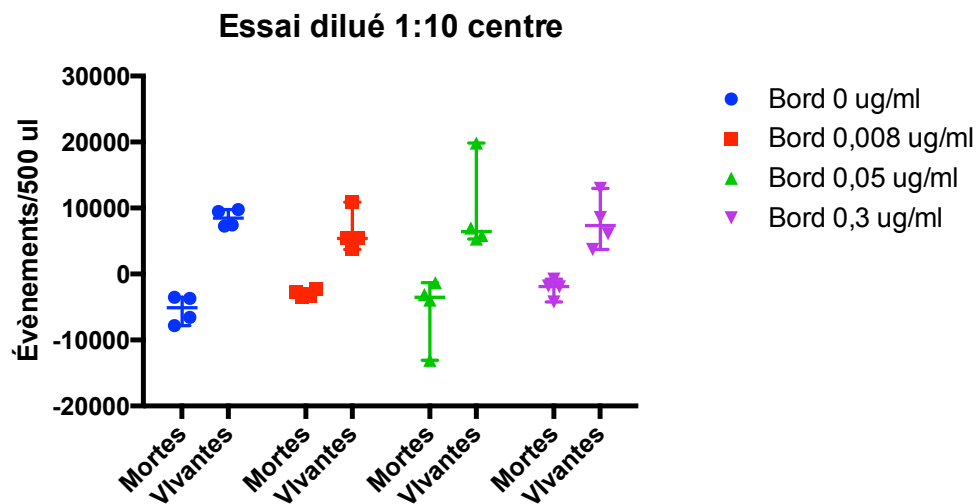


Figure 46 : Dénombrement par cytométrie en flux au centre des dendrites

Les événements représentent le nombre de cellules présentes dans un échantillon de 500 μl . Un total de 4 conditions ont été testées en 4 réplicats. Les milieux ont été additionnés de 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,008 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 $\mu\text{g/ml}$ et 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de tobramycine.

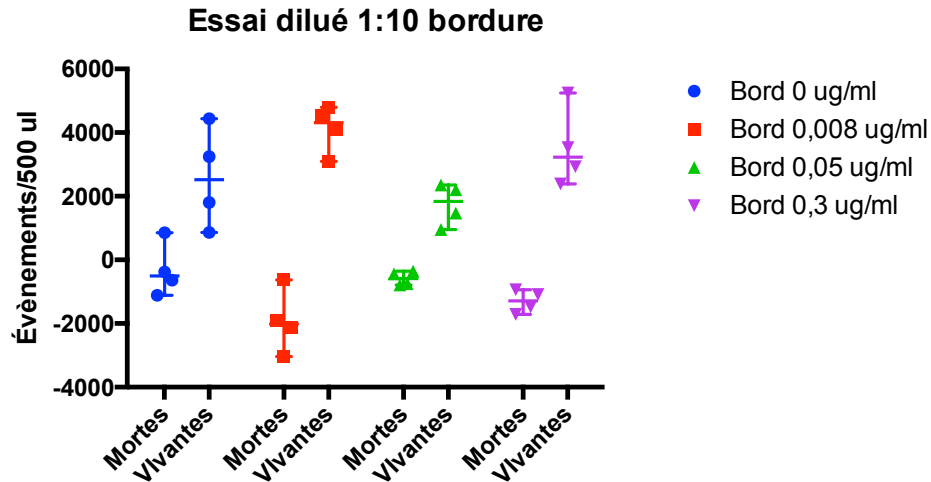


Figure 47 : Dénombrement par cytométrie en flux des bordures des dendrites

Les évènements représentent le nombre de cellules présentes dans un échantillon de 500 µl. Un total de 4 conditions ont été testées en 4 réplicats. Les milieux ont été additionnés de 0 µg/ml, 0,008 µg/ml, 0,05 µg/ml et 0,3 µg/ml de tobramycine.

Lors du deuxième essai, les échantillons ont été dilués à un ratio 1:10 à l'aide de solution saline stérile (0,85%). Le nombre d'évènements enregistrés est moins saturé que les essais non dilués. Il est aussi observable que les données représentant les bactéries mortes sont négatives. Ces données négatives sont possibles étant donné la variation entre les lectures des bactéries totales et des bactéries vivantes. Selon les résultats obtenus, les données sont très variables. Pour les données provenant des centres des dendrites, les quantités de bactéries mortes et vivantes ne sont pas significativement différentes du milieu sans antibiotique ($p > 0.05$). Il en est de même pour les données des bordures des dendrites. L'importance des données négatives sera discutée plus en détail à la section 4.3.

4 DISCUSSION

4.1 Le *swarming* en fonction des conditions nutritionnelles

La motilité de type *swarming* consiste en un mouvement rapide et coordonné d'une colonie bactérienne sur une surface (Kearns, 2010, Tremblay *et al.*, 2008). Dans le cas de notre bactérie d'intérêt, *P. aeruginosa*, la surface sur laquelle celle-ci se déplace doit être semi-solide, soit composée de 0,5% d'agar. Pour pouvoir se déplacer dans ces conditions, la bactérie doit posséder deux caractéristiques indispensables soit un flagelle fonctionnel et être capable de produire un agent mouillant (surfactant) (Kohler *et al.*, 2000, Verstraeten *et al.*, 2008). La production de cet agent mouillant, dans le cas de *P. aeruginosa* les rhamnolipides, permet d'abaisser la tension de surface et de faciliter ainsi le déplacement des bactéries dans leur environnement (Déziel *et al.*, 2003, Kearns, 2010). La capacité de pouvoir réaliser un tel déplacement doit apporter un avantage à la bactérie car la motilité *swarming* est coûteuse énergétiquement (Xavier *et al.*, 2011).

Le premier objectif de ce travail repose sur l'hypothèse que la motilité *swarming* est bénéfique pour la communauté bactérienne qui l'utilise. Ce type de motilité permettrait à un organisme d'aller puiser les ressources nutritionnelles présentes dans son environnement de manière plus efficace. Il a donc été proposé d'étudier la variation de la concentration de ces ressources ainsi que la surface totale recouverte par une colonie *swarmer* dans nos conditions. Selon nos hypothèses, la surface totale recouverte par la colonie serait augmentée suite à la baisse de la concentration des nutriments. Les bactéries devraient donc démontrer une plus grande motilité pour aller à la recherche de conditions nutritives favorables et ainsi permettre la survie de la communauté. Inversement, l'augmentation de la concentration nutritionnelle de l'environnement devrait donc diminuer la surface totale recouverte par la colonie. Étant donné l'apport plus grand en ressources, les bactéries n'auraient pas à se déplacer autant pour obtenir la nourriture nécessaire et démontreraient alors une motilité réduite. L'utilisation de cette méthode de déplacement (*swarming*) permettrait de coloniser un environnement rapidement, ce qui permet aussi d'avoir un apport nutritionnel constant (Fraser *et al.*, 1999, Harshey, 2003).

4.1.1 Cinétiques de recouvrement

La première étape de cet objectif était d'optimiser la réalisation des cinétiques de croissance de la souche *P. aeruginosa* en *swarming* sur un milieu M9DCAA. Les premiers tests ont permis de déterminer le nombre maximal de pétris pouvant être photographiés et analysés, soit un total de 6 (fig.14). Ceux-ci devaient être fermés étanchement à l'aide de parafilm pour permettre de garder l'humidité à l'intérieur. Normalement, lors d'un protocole de *swarming*, les pétris sont placés dans des sacs plastiques avec fermeture de type Ziploc. Ceci ne permettait pas d'avoir des images claires des colonies. Il a aussi été déterminé que les pétris devaient être photographiés à l'envers, soit l'agar vers la caméra. Il était ainsi possible d'éviter la formation de condensation sur le couvercle et les images étaient plus claires. La faible coloration du milieu M9DCAA permettait aussi de bien voir les bactéries en croissance sur celui-ci.

4.1.2 La concentration nutritionnelle affecte la surface recouverte en *swarming*

Après optimisation de la méthode de prise d'images, il a été possible de débiter les cinétiques de croissance en *swarming*. Tel que démontré à la section 3.1.1, les cinétiques de recouvrement ont été réalisées sur des milieux à concentrations différentes, soit de 10x à 0,4x. Tous les nutriments retrouvés dans le milieu M9DCAA étaient variés sauf la concentration d'agar qui restait toujours à 0,5% (Annexe I). Les cinétiques ont été réalisées à deux températures soit 30°C et 34°C. Ces températures ont été choisies car elles permettent à la colonie de *swarmer* sur presque l'entièreté de la gélose dans un délai de 20 heures ce qui correspond à une nuit (Tremblay *et al.*, 2008). La reproductibilité des patrons *swarming* sont aussi très stables à ces températures.

La figure 15 permet d'observer les courbes de surfaces recouvertes par une colonie *swarmer* de PA14 sur différentes concentrations nutritionnelles à 30°C. La concentration nutritionnelle qui démontre la plus grande surface recouverte est le milieu 1x, soit le milieu M9DCAA traditionnellement utilisé dans le laboratoire (Tremblay, 2011, Tremblay *et al.*, 2008). À une concentration de 1.5x, nous retrouvons une baisse de surface totale recouverte qui est ensuite augmentée à une concentration de 2x. La surface recouverte sur le milieu 2x s'apparente fortement au milieu 1x ce qui est inattendu.

La figure 16 démontre les surfaces totales finales atteintes après 24 heures d'incubation à 30°C et 34°C. La même tendance de croissance s'observe aux deux températures. Dans les deux

cas les milieux 1x et 2x montrent une bonne croissance tandis que le milieu 1,5x indique une baisse de couverture. Dans le cas de l'incubation à 34°C, le milieu 2x induit une plus grande croissance que sur le milieu 1x, ce qui est étonnant étant donné la baisse de croissance sur le milieu 1,5x. La croissance à 34°C est plus importante et plus rapide qu'à 30°C car l'activité métabolique des bactéries est plus élevée à des températures plus chaudes (Tremblay *et al.*, 2008).

Selon nos hypothèses, une diminution de la concentration nutritionnelle aurait dû stimuler la motilité *swarming* et ainsi «forcer» les bactéries à aller à la recherche d'un environnement plus favorable. Ce phénomène n'a pas été observé mais plutôt son contraire. Une baisse de la concentration nutritionnelle a induit une diminution de la surface recouverte, ce qui en toute logique est un phénomène attendu. La croissance bactérienne est dépendante de la présence de source d'azote et de carbone. *P. aeruginosa* doit avoir accès à une source d'azote qui est ici représentée par les acides aminés (CAA) et le NH₄Cl (Kohler *et al.*, 2000, McKnight *et al.*, 2000, ShROUT *et al.*, 2006). L'étude de Kohler *et al.*, (2000) indique qu'une diminution notable de la présence d'acides aminés n'induit pas la motilité *swarming*. Il en est de même pour la source de carbone, représentée ici par le dextrose. Dans les poumons des individus atteints de fibrose kystique, les acides aminés sont utilisés comme source de carbone par *P. aeruginosa* (Palmer *et al.*, 2007). En réponse aux facteurs environnementaux des voies respiratoires, *P. aeruginosa* peut adapter son mode de vie pour lui permettre de survivre (Bragonzi *et al.*, 2009).

Un autre facteur à considérer est que la production de rhamnolipides est influencée par la disponibilité des sources de carbone (Xavier *et al.*, 2011). Les biosurfactants sont produits uniquement quand la source de carbone est disponible en surplus dans l'environnement de la bactérie et ceux-ci sont un élément essentiel à la motilité. Cette tactique permet à la bactérie de remplir ses fonctions métaboliques avant de procéder à la production de biens coûteux (Xavier *et al.*, 2011). De plus, les rhamnolipides sont un bien public utilisé par les «cheaters» *rhlA*-capables de se déplacer lorsque mis en présence du surfactant (Tremblay *et al.*, 2007). Les rhamnolipides sont donc produits après l'atteinte de la phase stationnaire des cellules (Abisado *et al.*, 2018, Nickzad, 2016). La limitation de la quantité d'azote disponible peut activer la production de rhamnolipides, sans pour autant en produire une plus grande quantité au final (Mattingly *et al.*, 2018). Une étude intéressante pourrait être réalisée en mesurant la production de rhamnolipides sur les différentes concentrations nutritionnelles testées, autant sur un milieu solide, *swarming* et

liquide. Ces données pourraient être prises à des moments précis permettant ainsi la réalisation d'une cinétique de production de surfactant en de multiples conditions.

L'augmentation de la concentration nutritionnelle mène à une baisse de la surface recouverte par la colonie *swarming*, validant partiellement notre hypothèse. Celle-ci exposait que l'augmentation de la concentration nutritionnelle diminuerait la motilité car la colonie n'aurait pas à se déplacer pour acquérir des nutriments. La motilité *swarming* est surtout observée sur des milieux pauvres tels que M8 (M9 sans NH₄Cl), M9 et Médium Basal 2 (Kohler *et al.*, 2000, Overhage *et al.*, 2008, Tremblay *et al.*, 2008). Lorsque PA14 se trouve en conditions *swarming* sur un milieu plus riche tel que le LB ou BHI, celle-ci ne démontre pas une motilité aussi conséquente et surtout pas de ramifications (Shubham *et al.*, 2018). Ces observations sont intéressantes car en milieu liquide, les conditions riches sont les plus favorables à la croissance bactérienne (Shubham *et al.*, 2018). Ceci pourrait donc illustrer que *P. aeruginosa* s'adapte à son environnement qu'il soit liquide ou solide pour lui permettre de survivre et de proliférer.

L'augmentation de la concentration nutritionnelle pourrait aussi affecter le pH du milieu. La motilité de PA14 est plus efficace sur un milieu au pH entre 5 et 9 (Tremblay *et al.*, 2008). Il serait aussi possible qu'à des concentrations élevées de certains nutriments deviennent toxiques pour la cellule. Une autre explication à la diminution de la motilité sur un milieu M9DCAA concentré pourrait être la présence d'une trop forte quantité de sels. Une concentration trop élevée en sels pourrait affecter l'osmolarité de la cellule et donc sa survie. Pour vérifier cette information, des cultures sur géloses solides (1,5% d'agar) ainsi qu'en milieu liquide pourraient être réalisées en faisant varier les nutriments de la même façon. Ceci permettrait de déterminer si la concentration nutritionnelle de l'environnement affecte seulement la croissance ou joue un rôle important dans la motilité. Des courbes de croissances en liquide pourraient être réalisées à l'aide de l'appareil Bioscreen pour valider cette observation.

4.1.3 Pétris à deux concentrations nutritionnelles

Pour approfondir l'hypothèse d'une possible motilité sur un milieu pauvre en nutriments, des géloses à deux concentrations nutritionnelles ont été réalisées tel que démontré à la figure 17 de la section 3.1.2. Seules les sources de carbone ont été retirées dans le milieu pauvre, soit les CAA et le dextrose. Il est tout de même possible d'observer une croissance bactérienne sur le

côté pauvre, très probablement dû à la diffusion des éléments nutritifs dans le milieu étant donné sa faible viscosité.

Des tests préalables ont été réalisés en utilisant des pétris à gradients nutritionnels. Les résultats obtenus n'étaient pas concluants dû à la grande diffusion des nutriments dans l'agar à faible viscosité. Le *swarming* nécessite un protocole bien précis notamment au niveau de la température du milieu avant d'être coulé ainsi que du temps de séchage qui doit être respecté. Ces paramètres doivent donc être conservés lors de la réalisation des gradients. Le premier milieu était coulé en déposant la boîte de Pétri en angle pour obtenir une couche graduellement plus fine d'agar au fond. Celle-ci était laissée à sécher 15 minutes avant de remettre le Pétri à plat et d'y ajouter l'autre milieu sans source de carbone. Pour obtenir un gradient précis, les temps de séchage ont dû être optimisés pour éviter un milieu trop sec ou trop liquide. Malgré différents tests de temps de séchage, le *swarming* observé sur ces gradients n'était pas reproductible.

L'atteinte d'une surface de gélose lisse a aussi posé problème lors de la réalisation des gradients. Une légère variation au niveau de la surface de l'agar a empêché les bactéries de se déplacer. Il est impératif que la surface de l'agar soit complètement lisse car si la colonie *swarmer* atteint un obstacle physique, elle ne le franchira pas mais fera demi-tour. Ce phénomène a été observé lorsque l'agar démontrait des irrégularités ou lorsque la surface n'était pas au niveau.

4.1.4 Le *swarming* est limité par la disponibilité des sources de carbone

Après une incubation de 48 heures à 30°C, les dendrites de la colonie *swarmer* de la souche PA14 atteignent toutes une barrière invisible du côté pauvre du pétri (fig. 17b). Il semble que les dendrites ne s'aventurent pas plus loin possiblement dû à la trop faible concentration de source de carbone essentielle à l'exécution de cette motilité (Harshey, 2003). Sur un milieu minimal non additionné d'acides aminés, le *swarming* peut avoir lieu si du dextrose est présent (Kohler *et al.*, 2000). Les acides aminés sont une des sources les plus importantes de carbone et d'azote, soit des nutriments essentiels à la croissance bactérienne (Yang *et al.*, 2015). Le manque de nutriments affecterait donc la motilité *swarming* étant donné que celle-ci est coûteuse en énergie. Cette motilité nécessite l'implication de force proton-motrice permettant le fonctionnement flagellaire en continu au niveau des dendrites (Tremblay *et al.*, 2010).

4.1.5 Les dendrites « exploratrices » ne sont pas différentes des autres

Lors des tests à l'aide des pétris à deux concentrations nutritionnelles, certaines dendrites se sont démarquées. Celles-ci nommées « exploratrices » démontraient la capacité de se déplacer plus loin que les autres sur le milieu sans source de carbone (fig. 17b). Ces dendrites ont donc été reprises et inoculées sur des nouveaux pétris à deux concentrations, afin de vérifier l'hypothèse qu'il s'agissait de mutants ayant développé de nouvelles aptitudes. La distance parcourue par ces colonies « exploratrices » a été mesurée et ces données sont représentées à la figure 18. Il n'y a aucune différence entre les dendrites régulières et les « exploratrices », celles-ci peuvent parcourir la même distance, soit environ 3 cm après 96 heures d'incubation à 30°C. Il est possible que ces dendrites exploratrices aient pu se déplacer plus loin dû au rebondissement des rhamnolipides sur la paroi du pétri. En effet, la production de rhamnolipides a pu s'accumuler entre la colonie et la paroi du pétri ce qui peut faciliter le déplacement des bactéries. Pour ce qui est des dendrites exploratrices retrouvées plus au centre du pétri, celles-ci auraient pu être poussées plus loin par la production de rhamnolipides de ses voisines. Il serait aussi possible que ces bactéries vont plus loin simplement car elles sont poussées par l'accumulation de biomasse derrière elles.

4.1.6 Source d'azote préférentielle

Dans le milieu M9DCAA traditionnellement utilisé pour la motilité *swarming*, une des sources d'azote est le NH_4Cl (Tremblay *et al.*, 2008). Celui-ci a été remplacé dans le milieu M9DCAA par le NaNO_3 à la même molarité. Il y a l'apparition d'une désorganisation du patron dendritique de la colonie de PA14 lorsque le NaNO_3 est utilisé (fig. 19B). La surface recouverte ne semble pas affectée par le changement de source d'azote. Une étude démontre que la présence de NH_4Cl induit une meilleure croissance de la souche PG201 de *P. aeruginosa* en milieu liquide que l'ajout de NaNO_3 (Déziel *et al.*, 2003). Cette étude rapporte aussi que l'expression du gène *rhlA-lacZ* de cette même souche est plus importante sur un milieu *swarming* additionné de NaNO_3 . Étant donné la préférence de *P. aeruginosa* pour le NH_4Cl , l'augmentation de la production de surfactant pourrait signifier qu'elle cherche à tout prix à se déplacer vers un environnement plus favorable à sa croissance.

Une explication pour la désorganisation de patron dendritique serait l'influence de la source d'azote sur la production de rhamnolipides. Tel que mentionné précédemment, la présence d'azote et de carbone est nécessaire à la synthèse des rhamnolipides. Ceux-ci sont composés d'une ou deux molécules de L-rhamnose associée à un acide 3-hydroxyalkanoïque (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Déziel *et al.*, 2003). Les mono-rhamnolipides (mono-RL) sont utilisés comme agent mouillant permettant la motilité *swarming* de la colonie (Tremblay *et al.*, 2007). Les di-rhamnolipides (di-RL) eux sont utilisés comme attractant et stimulent la formation du patron dendritique bien distinct de la colonie PA14 en *swarming*. Les HAA agissent comme répulsifs et permettent l'éloignement des dendrites (Tremblay *et al.*, 2007). Cette action d'attraction-répulsion serait la cause majeure de la formation du patron dendritique observé dans nos conditions. Une modification au niveau des ratios de production de ces molécules pourrait sûrement modifier le patron et causer une désorganisation telle qu'observée lors de l'ajout de NaNO₃. Il pourrait y avoir une augmentation de la production des rhamnolipides qui s'accumulent à la bordure du pétri et cause les dendrites arrondies observées à la figure 19b. La modification de ces ratios pourrait aussi affecter le taux de ramification observé, qui est moindre que sur le milieu avec NH₄Cl. Ceci pourrait être expliqué par exemple par une diminution de la production de HAA. La présence des différents congénères pourrait être mesurée en prélevant des zones de *swarming* sur milieu semi-solide et en soumettant ces échantillons à la méthode de purification et d'analyses proposée par Tremblay *et al.* (2007).

Ce premier objectif nous a permis d'observer la motilité *swarming* de *P. aeruginosa* dans des conditions nutritionnelles variables. Il nous a été possible de déterminer qu'un milieu pauvre en nutriment ne stimule pas la motilité mais plutôt la réduit de façon importante. Un milieu riche en nutriments démontre aussi une diminution de la surface recouverte, ce qui était attendu. Il a aussi été démontré qu'une souche PA14 en *swarming* ne va pas s'aventurer vers un environnement pauvre en nutriments mais va plutôt concentrer ses efforts sur un milieu riche. Les milieux *swarming* trop riches en nutriments indiquent aussi une diminution de la surface recouverte, indiquant possiblement une toxicité du milieu concentré. La variation de la source d'azote présente dans le milieu M9DCAA influence le patron dendritique de *P. aeruginosa* en *swarming*. L'étude du comportement de *P. aeruginosa* en milieux à différentes conditions nutritionnelles pourrait permettre de prédire son comportement en fonction de son site d'infection. L'étude de l'acquisition de ressources nutritionnelles chez ce pathogène pourrait être un sujet d'intérêt étant donné la prévalence de cet organisme dans le domaine hospitalier.

4.2 Les co-cultures

La complexité des communautés poly-microbiennes est un sujet d'actualité qui se penche sur les interactions des différentes espèces de microorganismes d'un environnement distinct. Les microorganismes peuvent coexister de manière stable ou être en constante compétition pour les ressources disponibles. De nombreuses stratégies sont employées par les bactéries pour faciliter l'acquisition de ressources et favoriser leur survie dans un environnement donné. On retrouve parmi ces stratégies notamment la motilité, la production d'antibiotique et la communication permettant de coordonner les actions d'une communauté (Hibbing *et al.*, 2010b). Les études démontrent que les interactions entre les organismes pathogènes d'une même communauté influenceraient la virulence, la résistance aux antibiotiques mais aussi la progression d'une maladie, notamment la fibrose kystique (O'Brien *et al.*, 2017).

Les voies respiratoires des individus atteints de fibrose kystique représentent un écosystème diversifié. Cette diversité est discutée plus en détail à la section 1.7.1 de la revue de littérature. On y retrouve entre autres la bactérie *P. aeruginosa*, organisme central de cette étude. Nous nous sommes questionnés sur les possibles avantages de la motilité *swarming* lorsque cet organisme se retrouve en co-culture avec des compétiteurs, plus spécifiquement avec *B. cenocepacia* K56-2.

4.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia*

P. aeruginosa et *B. cenocepacia* ont été choisies dû à leur cohabitation fréquente au niveau des voies respiratoires des patients atteints de fibrose kystique (Costello *et al.*, 2014, Govan *et al.*, 1996). Lorsqu'elles sont retrouvées ensembles, *B. cenocepacia* augmente la formation de biofilm par *P. aeruginosa* en augmentant sa biomasse (Bragonzi *et al.*, 2012). On observe aussi ces deux organismes dans le sol et plus spécialement en étroite collaboration avec le système racinaire (rhizosphère) de nombreuses plantes (Mahenthiralingam *et al.*, 2008). Étant donné que ces deux espèces sont capables de réaliser une motilité *swarming* en conditions précises, nous nous sommes questionnés sur les possibles interactions entre ces organismes en *swarming* dans nos conditions.

Le mélange des deux souches sauvages des organismes (PA14 et K56-2) a ouvert la porte à plusieurs questions. Pourquoi un tel changement de phénotype de *swarming* est observé lors des

co-cultures des deux bactéries (Fig.20). Étant donné l'élargissement des dendrites et la biomasse qui semble plus diffuse, nous avons investigué la répartition des deux organismes dans le patron. La réalisation de la méthode des UFC a été réalisée pour permettre de déterminer la localisation des différentes souches mais aussi leur abondance. Nous avons alors observé que le centre était composé des deux souches de façon assez égale mais que PA14 devenait majoritaire au niveau du milieu des dendrites et de leurs extrémités. Pour K56-2, cette souche non motile initialement dans nos conditions se retrouvait aussi dans le patron *swarming* au milieu des dendrites. Celle-ci peut se retrouver même aux extrémités des ramifications du *swarming*. Il est donc possible que PA14 apporte un élément nécessaire à K56-2 pour que celle-ci se déplace. Il est connu que *B. cenocepacia* est motile dû à la présence de flagelle polaire mais aussi grâce à la production d'un surfactant (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Urban *et al.*, 2004). Toutefois, elle ne semble pas pouvoir se déplacer sur le milieu M9DCAA dans nos conditions (Fig. 20C). K56-2 pourrait bénéficier de la production de rhamnolipides par PA14 et ainsi utiliser ses flagelles pour se déplacer.

4.2.2 PA14 *rhIA*- n'induit pas de motilité avec K56-2

Des tests de co-cultures entre PA14 *rhIA*- et K56-2 dans nos conditions sont relatés à la figure 19. Les deux souches qui ne *swarment* pas individuellement ne le sont pas non plus lorsqu'elles se retrouvent mélangées en un ratio 1 :1. PA14 *rhIA*- ne peut se déplacer car elle ne produit pas d'agent mouillant. Ceci pourrait donc expliquer la motilité de K56-2 lorsqu'elle se trouve en présence d'une souche productrice de rhamnolipides comme PA14. Pour confirmer cette observation, K56-2 a été soumise à des conditions de *swarming* en ajoutant des rhamnolipides directement sur la gélose (10 000 ppm). L'ajout de surfactant (fig.39) permet à la souche K56-2 de se déplacer dans nos conditions. Il est possible que le milieu pauvre en nutriments ne permette pas la production importante de surfactant chez K56-2. En effet, une étude portant sur la motilité des *Burkholderia* utilise un milieu riche tel que le milieu NBG (Nutrient Broth additionné de glucose) pour observer le *swarming* (Lewenza *et al.*, 2002).

4.2.3 Co-cultures entre mutants *swarming*

P. aeruginosa possède un autre appendice locomoteur, les pili de type IV impliqués dans la motilité de type *twitching* (Kearns, 2010). Celle-ci s'effectue sur des surfaces solides et implique l'extension et la rétraction des pili permettant ainsi le déplacement des cellules (Kearns, 2010). Cette motilité est décrite plus en détail à la section 1.3.2. L'implication de ces appendices

locomoteurs dans la motilité *swarming* est controversée. Les travaux de Kohler *et al.* (2000) recensent une incapacité à *swarm* du mutant *pilA*- de la souche *P. aeruginosa* PAO1. Ils suggèrent que les pili de type IV assisteraient le flagelle lors de la motilité et pourrait agir comme détecteur de la viscosité du milieu. Une étude de Overhage *et al.* (2007) vient aussi appuyer cette observation. Néanmoins, des travaux indiquent que *P. aeruginosa* PA14 ne nécessite pas la présence de pili de type IV pour faire du *swarming* (Rashid *et al.*, 2000, Toutain *et al.*, 2005). De plus, un mutant $\Delta pilA$ de PAO1 démontre un phénotype *hyperswarmer* selon les travaux de Anyan *et al.* (2014).

4.2.4 Co-culture de PA14 *fliC*- et K56-2

La souche *fliC*- est déficiente en flagelle fonctionnel car ce gène code pour la flagelline de type B, la sous-unité principale formant la structure des filaments (Spangenberg *et al.*, 1996). PA14 *fliC*- n'est donc pas motile, tel qu'observable à la figure 23. Lorsque les deux souches d'intérêt sont mélangées à un ratio 1:1 et incubées pendant 24 heures, on observe un patron de *swarming* bien particulier présentant des dendrites très fines (fig. 23b). Après 24 heures, la souche K56-2 est surtout retrouvée au centre de la colonie et PA14 *fliC*- a été capable de se déplacer dans les dendrites et jusqu'aux extrémités. Ce résultat était inattendu étant donné que les deux souches séparément ne font pas de *swarming* sur le milieu M9DCAA dans nos conditions. Après une incubation de 48 heures, les dendrites sont plus développées et on peut y retrouver autant PA14 *fliC*- que K56-2.

Une étude effectuée dans notre laboratoire a démontré qu'un mutant PA14 *fliC*- est réparti dans un patron *swarming* lorsqu'il se retrouve en co-culture avec PA14 (Jean-Pierre, 2017). Le mutant *fliC*- se trouve majoritairement au centre de la colonie mais environ 30% des dendrites sont composés de celle-ci (Jean-Pierre, 2017). Un résultat similaire a donc été observé ici en co-culture avec K56-2. Le mutant *fliC*- nécessiterait un facteur extérieur remplaçant l'utilisation de son flagelle. Nous avons émis l'hypothèse que PA14 pourrait utiliser ses pili de type IV pour s'accrocher à la souche K56-2, qui à son tour profite de la production de rhamnolipides par PA14 pour pouvoir se déplacer. Il s'agirait donc d'une situation de collaboration plutôt que de compétition entre les deux souches.

4.2.5 Co-culture de PA14 $\Delta pilA$ et K56-2

Les pili de type IV seraient impliqués dans la promotion des interactions cellules-cellules et faciliteraient le mouvement de groupe d'une colonie *swarmer* (Anyan *et al.*, 2014). Les pili sont distribués sur toute la surface de la cellule et leur implication pourrait ralentir l'expansion de la colonie motile dû aux interactions pili-pili (Anyan *et al.*, 2014). Une souche mutante PA14 $\Delta pilA$ démontre un phénotype *hyperswarmer* en recouvrant la surface totale d'un pétri plus rapidement qu'une souche sauvage (Anyan *et al.*, 2014). Lorsque le mutant $\Delta pilA$ se trouve mélangé à une souche sauvage de *B. cenocepacia* K56-2, cette dernière se retrouve majoritairement à l'extrémité des dendrites. Elle se retrouve aussi au centre de la colonie et au milieu des dendrites mais se trouve supplantée par la présence de PA14. Lorsque la souche PA14 $\Delta pilA$ est mélangée à K56-2 *rhlA*⁻, cette dernière se concentre surtout au centre de la colonie et montre une très faible présence à travers le patron dendritique. Cette observation démontre donc que l'implication des pili de type IV dans la motilité *swarming* n'a pas une incidence énorme étant donné la présence de K56-2 dans tout le patron. Un autre mécanisme d'attachement pourrait être impliqué dans l'organisation et la répartition des souches dans le patron dendritique. Chez *P. aeruginosa*, il existe 3 systèmes d'assemblage des pili de type IV (voir section 1.8.4) (Burrows, 2012). La mutation $\Delta pilA$ se situe dans le système IVa seulement qui est impliqué dans la formation et l'organisation des biofilms bactériens (Burrows, 2012). Il serait intéressant de vérifier des mutants au niveau des autres systèmes (IVb et IVb-Tad) pour vérifier notre hypothèse de l'attachement de PA14 à K56-2 à l'aide de ces appendices locomoteurs. Un mutant *tadA*⁻ est présentement en cours d'étude dans le laboratoire. Il serait intéressant d'approfondir nos connaissances dans l'implication de ces 3 systèmes dans la motilité *swarming* de *P. aeruginosa* étant donné qu'il s'agit de la seule espèce qui exprime ces systèmes (Burrows, 2012). L'utilisation de bactéries motiles pour transporter d'autres organismes est un phénomène nommé « hitchhiking » qui est discuté plus bas à la section 4.2.9.

4.2.6 Co-culture de $\Delta pilA fliC$ - et K56-2

Pour approfondir les observations réalisées à l'aide des souches PA14 *fliC*⁻ et $\Delta pilA$, un double mutant de ces deux gènes a été réalisé. Tel qu'observable à la figure 29, le double mutant est non-motile dans nos conditions, tel qu'attendu car celui-ci ne possède pas de flagelle fonctionnel (Kearns, 2010). Ce qui est inattendu est la motilité observée lorsque ce mutant est co-cultivé avec K56-2 (Fig. 29b). Les UFC ont permis de situer les différentes souches dans ce patron

dendritique diffus. Le centre est majoritairement composé de la souche K56-2 mais les milieux et extrémités des dendrites sont colonisées majoritairement par le double mutant PA14 $\Delta pilA fliC$ -. Ce dernier résultat est intrigant, quand on considère que PA14 nécessite K56-2 pour se déplacer. Ces observations ont été effectuées après une incubation de 24 heures. L'organisation spatiale des deux souches est très variable durant ce temps d'incubation. Il serait intéressant de réaliser des cinétiques d'UFC telles que pour les co-cultures de PA14 *fliC*- et K56-2. Selon nos hypothèses, il serait possible que K56-2 utilise les rhamnolipides produits par PA14 pour se déplacer en *swarming* et ainsi paver un chemin pour le double mutant. Celui-ci pourrait donc, en s'accrochant d'une façon inconnue à K56-2, suivre le chemin tracé par cette dernière. Après avoir franchi une assez grande distance, PA14 pourrait alors éliminer K56-2 en utilisant différents produits tels que le cyanure d'hydrogène (Bernier *et al.*, 2016). Cette hypothèse pourrait être approfondie en réalisant une co-culture en *swarming* d'un mutant *hcn* chez PA14 et de K56-2. Les UFC pourraient ensuite être réalisées et l'effet de la perte de production du cyanure serait connue. Des tests préliminaires sont en cours dans le laboratoire Déziel en utilisant une souche PA14 *hcnA*- (Liberati *et al.*, 2006).

4.2.7 Mutants des pili *cup* chez PA14

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer la motilité du double mutant en présence de la souche K56-2 est son possible attachement avec un autre type de pili, les pili *cup*. Tel que mentionné à la section 1.8.5, les pili *cup* sont situés à la surface des bactéries à Gram négatif. Ces pili sont régulés par 5 opérons chez *P. aeruginosa* (Vallet *et al.*, 2004, Vallet *et al.*, 2001). Il a donc été proposé d'observer le phénotype en *swarming* de mutants au niveau de 3 de ces opérons, soit *cupA*-, *cupB*- et *cupC*- en utilisant les mutants disponibles dans la banque Liberati *et al.* (2006). L'organisation des 5 opérons *cup* est illustrée à l'annexe II. Des trois mutants, *cupA3*- et *cupB3*- sont ceux qui démontrent un phénotype de *swarming* très différent de la souche sauvage PA14. Les opérons *cup* n'ont pas été rapporté comme impliqué dans la motilité de type *swarming*. La variation dans le patron de la souche *cupA3*- pourrait être dû à l'implication de cet opéron dans la formation de biofilms sur les surfaces abiotiques et dans l'organisation structurelle de ceux-ci (Vallet *et al.*, 2004). Le mutant *cupC3*- est celui qui montre un patron dendritique s'apparentant le plus à la souche sauvage de PA14 (fig. 35a). Les UFC des co-cultures des mutants *cup* avec la souche *B. cenocepacia* K56-2 ont permis de situer les 2 organismes dans le patron de *swarming*. Dans les trois cas, le mélange des deux souches cause un changement important du patron *swarming*. Les dendrites sont beaucoup plus larges et la biomasse s'y

retrouvant semble plus diffuse. Lors du mélange de K56-2 aux différents mutants *cup*, le patron de répartition des souches est assez similaire dans les 3 situations. Le centre est surtout composé de K56-2. Au niveau des dendrites, les deux souches sont retrouvées de manière égales sauf pour le mutant *cupC3-* qui démontre plus de K56-2 à cet endroit. Les extrémités des dendrites sont surtout composées de PA14. Il est tout de même remarquable que même si les extrémités sont composées majoritairement des mutants *cup* de PA14, on y retrouve aussi la souche K56-2 qui, rappelons-le ici, ne peut pas se déplacer en swarming lorsque cultivée seule sur ce milieu de culture. Lorsque PA14 est mélangée à K56-2, les dendrites ainsi que leurs extrémités sont beaucoup plus densément peuplées par PA14 (10^3) que par K56-2 (10^0). Lorsque K56-2 se trouve en présence du mutant PA14 *cupA3-*, cette répartition est plus égale dans tout le patron. Il serait possible que la perte de *cupA3-* cause une désorganisation de la population en *swarming* ce qui affecterait non seulement la surface recouverte mais aussi la croissance bactérienne.

4.2.8 Double mutant PA14 *cupAflIC-*

Pour vérifier le rôle possible d'un pili *cup* dans le «hitchhiking» de PA14 sur K56-2 en swarming, un double mutant PA14 *cupAflIC-* a été construit. La confirmation de ce mutant est démontré aux figures 37 et 38. Les essais de *swarming* en co-cultures sont présentement en cours et permettront de déterminer le rôle de l'opéron *cupA* dans la motilité bactérienne. Si le double mutant *cupAflIC-* montre une motilité jusqu'aux extrémités des dendrites, ceci indiquera que l'opéron *cup* ne joue pas un rôle dans l'attachement des cellules entre-elles. Le mutant non motile *cupAflIC-* pourrait se déplacer d'une autre façon. Ce dernier pourrait être tout simplement poussé par les cellules environnantes présentes à forte densité. La souche K56-2 agirait donc comme radeau permettant le déplacement des cellules voisines non-motiles.

4.2.9 Coopération et compétition bactérienne

Dans la nature, de nombreux organismes en utilisent d'autres pour se déplacer. Ceci peut être observé entre autre chez les insectes (Shklarsh *et al.*, 2012). Cette méthode de transport en commun est aussi démontrée à une plus petite échelle, celle des microorganismes. Il existe quelques exemples documentés de bactéries motiles transportant des microorganismes sessiles. La bactérie à Gram positif *Paenibacillus vortex* se déplace en *swarming* sur des surfaces solides à l'aide de ses flagelles. Cette dernière peut aussi transporter avec elle un organisme sessile tel qu'*E. coli* lorsque ce dernier exprime des bêta-lactamases (Finkelshtein *et al.*, 2015). Cette étroite

collaboration permet à *P. vortex* de découvrir de nouvelles niches tandis que son associé détoxifie l'environnement des molécules antibiotiques présentes telles que l'ampicilline. Cette association a été catégorisée comme mutualiste car *P. vortex* utilisera le mécanisme de dégradation des bêta-lactames lorsqu'il en aura besoin (Finkelshtein *et al.*, 2015). Il est important de mentionner que lorsque les deux organismes se trouvent séparés sur un milieu additionné d'ampicilline, *P. vortex* démontre un *swarming* réduit et *E. coli* est sessile. Lorsque les deux organismes sont inoculés à un ratio égal sur un milieu additionné d'antibiotique, il leur est alors possible de coloniser l'entièreté de la gélose en 72h (Finkelshtein *et al.*, 2015). *P. vortex* est aussi impliquée dans une autre situation de co-motilité sur surface solide : lorsque *P. vortex* est co-inoculée avec *Xanthomonas perforans*, les deux organismes se déplacent ensemble sur une surface gélosée ou même à la surface d'une feuille de plant de tomate (Hagai *et al.*, 2014).

La bactérie *P. vortex* est aussi capable de collaborer avec *Aspergillus fumigatus*, une espèce fongique retrouvée dans la rhizosphère des plantes (Ingham *et al.*, 2011). Les conidies d'*A. fumigatus* peuvent être transportées par une colonie *swarmer* de *P. vortex* sur une distance allant jusqu'à 30 cm. Les conidies non-motiles se retrouvent emprisonnées dans la colonie dû à la forte densité cellulaire et à l'interactions entre les nombreux flagelles. Celles-ci profitent donc d'un déplacement vers des environnements bénéfiques à leur germination tout en aidant *P. vortex* à traverser des obstacles en agissant comme des ponts (Shklarsh *et al.*, 2012). Il a aussi été démontré que *P. vortex* peut transporter des microbilles (1 à 20 μm de diamètre) lorsqu'elle se déplace en *swarming* (Shklarsh *et al.*, 2012). Ces observations permettent donc de déterminer qu'une colonie bactérienne en *swarming* forme une communauté organisée créant des associations bénéfiques avec d'autres organismes.

Une association entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* a aussi été rapportée. Ces deux organismes sont retrouvés au niveau des voies respiratoires des individus atteint de fibrose kystique (Limoli *et al.*, 2017). Chez les patients plus jeunes, *S. aureus* serait le pathogène principal. Il sera accompagné éventuellement par *P. aeruginosa* qui deviendra majoritaire au niveau des poumons (Limoli *et al.*, 2017). Certains auteurs ont décrit les interactions entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* comme étant soit parasitiques (Mashburn *et al.*, 2005), compétitives (Harrison, 2007), ou même synergiques (Hoffman *et al.*, 2006, Pastar *et al.*, 2013). Il a aussi été récemment étudié par l'équipe du laboratoire Burrows (2017) qu'une colonie de *P. aeruginosa* en *twitching* peut transporter avec elle des cellules de *S. aureus* non motiles (Burrows, 2017). Ceci

pourrait donc impliquer les pili de type IV dans le transport d'une souche non-motile (K56-2) par une souche motile telle que PA14.

Tel que mentionné plus haut, la souche K56-2 pourrait débiter sa motilité à l'aide de l'abondance de rhamnolipides sur la surface. Par la suite, PA14 non-motile (soit *fliC*- ou le double mutant $\Delta pilA fliC$ -) s'accrocherait à l'aide d'un appendice présent à sa surface pour suivre le patron établi par K56-2. Un autre scénario pourrait être que c'est K56-2 qui accroche PA14 à l'aide de ses pili, considérant que *P. aeruginosa* est bénéfique car il fournit l'agent mouillant nécessaire à K56-2 pour se déplacer. Les *Burkholderia* portent à leur surface des pili *cbl* tel que décrit à la section 1.9.2. Ceux-ci sont impliqués dans l'attachement aux cellules épithéliales ainsi que dans la virulence de l'organisme (Cheung *et al.*, 2007, Sajjan *et al.*, 1995). Pour vérifier cette hypothèse, il suffirait de tester un mutant *cbl* chez *B. cenocepacia* K56-2 et de le soumettre à une co-culture avec un double mutant PA14 $\Delta pilA fliC$ -. Si les pili *cbl* sont impliqués dans l'attachement de PA14 lui permettant de se déplacer, le mélange avec le mutant *cbl* devrait restreindre PA14 au centre de la colonie.

Finalement, il est possible que les souches de PA14 non motiles peuvent se déplacer dans le patron de *swarming* dû à un effet de groupe. Les bactéries environnantes pourraient agir comme une foule densément peuplée et entraîner avec elles les souches non-motiles. Cette hypothèse se base sur la présence des « hitchhikers » dans la littérature comme *P. vortex* qui transporte soit des conidies non motiles ou des microbilles (Shklarsh *et al.*, 2012). L'utilisation de souches fluorescentes et de microscopie pourrait permettre d'approfondir ces observations. Des tests sont présentement en cours de développement dans le laboratoire.

Ce deuxième objectif de recherche a permis d'approfondir nos connaissances des co-cultures entre *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia* dans une situation de *swarming*. Ces deux organismes sont retrouvés notamment au niveau des voies respiratoires des individus atteints de fibrose kystique (Bernier *et al.*, 2016, Tomlin *et al.*, 2001). Nous avons pu observer les différentes répartitions des souches étudiées lorsque celles-ci sont en conditions *swarming*. Nos expériences ont permis d'observer que deux souches individuellement non-motiles peuvent se déplacer lorsqu'elles se trouvent en co-culture dans nos conditions. Ces résultats pourraient nous permettre d'en apprendre plus sur les interactions entre ces organismes lorsqu'ils se retrouvent dans les poumons des patients FK ou dans un environnement permettant la motilité bactérienne.

4.3 La résistance à la tobramycine

4.3.1 Les bactéries en *swarming* sont plus résistantes aux antibiotiques

La tobramycine est un antibiotique de la classe des aminoglycosides et est produite par la bactérie *Streptomyces tenebrarius* (Hoffman et al., 2005). Cette classe d'antibiotiques bactéricides à large spectre voit ses débuts en 1944 avec l'arrivée de la streptomycine. S'en suit rapidement la découverte de la kanamycine, la gentamycine et la tobramycine (Krause et al., 2016, Mingeot-Leclercq et al., 1999). Les aminoglycosides sont utilisés majoritairement dans les traitements des infections par les bacilles à Gram négatif (Babic et al., 2010). Ces molécules agissent notamment en se liant au site A sur l'ARN ribosomal 16S du ribosome 30S et affectent la synthèse des protéines bactériennes (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Les protéines aberrantes ainsi produites vont s'insérer dans la membrane externe et causer un défaut de perméabilité qui affectera la survie de la bactérie. Les aminoglycosides représentent une classe majeure d'antibiotiques utilisés dans le traitement des infections des voies respiratoires par *P. aeruginosa* (Barclay et al., 1996).

Des travaux réalisés antérieurement dans notre laboratoire ont permis de déterminer que les bactéries en *swarming* sont plus résistantes aux antibiotiques, notamment *P. aeruginosa* (Lai et al., 2009). *P. aeruginosa* en *swarming* démontre une CMI allant au-delà de 256 µg/ml pour l'antibiotique tobramycine (Lai et al., 2009). Les tests réalisés soumettaient *P. aeruginosa* à l'ajout d'antibiotique sur un disque de papier ou sur une bandelette *E-test* à proximité de la colonie. De plus, la présence de tobramycine stimule la motilité *swimming* et *swarming* de *P. aeruginosa* mais le mécanisme derrière cette stimulation est inconnu (Linares et al., 2006). Nous avons donc étudié l'effet de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine sur le *swarming* à l'aide de la souche PA14 sur un milieu M9DCAA en l'ajoutant directement dans l'agar. De telles expériences ont aussi été réalisées chez d'autres espèces bactériennes telles que *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* et *Bacillus subtilis* (Butler et al., 2010, Irazoki et al., 2017).

Lors de la présente étude, nous avons démontré que la souche sauvage PA14 peut faire du *swarming* sur un milieu M9DCAA additionné de différentes concentrations sous-inhibitrices de tobramycine (fig.40). *P. aeruginosa* en *swarming* possède une résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques (Lai et al., 2009). Cette résistance, tel que mentionné à la section 1.5, serait partiellement due à la membrane externe très imperméable (Fernandez et al., 2012,

Hancock *et al.*, 2000). L'activité des pompes à efflux de type RND (*Resistance-nodulation-cell division*) jouent un rôle important dans la résistance intrinsèque et acquise des bactéries à Gram-négatif (Kumar *et al.*, 2005). Ces pompes auraient pu être impliquées dans la résistance en *swarming* de *P. aeruginosa*, mais il en a été démontré autrement par les travaux de Lai *et al.* (2009). Des souches mutantes de pompes à efflux de type RND ont été réalisées dans cette étude, telles que *mexA*-, *mexC*- *mexE*-, *mexY*- et *mexW*-. Ces mutants PA14 ne démontraient pas de différence dans leur motilité *swarming* en présence d'antibiotique. Ceci indique donc que ces pompes ne sont pas impliquées dans la résistance aux antibiotiques de PA14 en *swarming* (Lai *et al.*, 2009)

Un facteur pouvant expliquer la motilité bactérienne sur milieu additionné d'antibiotique serait la forte densité cellulaire. Butler et collègues (2010) ont rapporté qu'une forte densité de population était directement liée à une survie bactérienne élevée. La présence de nombreuses cellules dans la colonie *swarmer* pourrait alors permettre un remaniement constant de la population. Les cellules seraient en contact avec la surface toxique pendant seulement une courte période. Cette constante réorganisation pourrait prouver un certain comportement altruiste des individus tel qu'observé chez des communautés sociales plus complexes (Butler *et al.*, 2010). Il est aussi possible que d'autres antibiotiques agissant sur les ribosomes aient le même effet de stimulation de la motilité bactérienne que la tobramycine (Liu *et al.*, 2018). La stimulation de la motilité dû à l'ajout d'antibiotique dans le milieu pourrait causer un environnement de stress. La colonie pourrait donc utiliser sa capacité de *swarming* pour stimuler le déplacement des bactéries vers un environnement plus favorable.

4.3.2 L'ajout de tobramycine dans le milieu affecte la largeur des dendrites

Suite aux tests d'ajout d'antibiotiques dans le milieu *swarming*, des concentrations sous-inhibitrices allant jusqu'à 0,8 µg/ml de tobramycine ont été testées. Ces valeurs ont été déterminées suite à des tests préliminaires utilisant différentes concentrations sous-inhibitrices de tobramycine en se basant sur les travaux de Lai *et al.* (2009). Les dendrites des colonies se trouvant en contact avec une présence plus élevées d'antibiotiques semblaient plus larges. En effet, cette différence est subtile mais observable à la figure 40. Des mesures à l'aide de Photoshop ont été réalisées et illustrées dans le graphique de la figure 41.

Suite à l'observation d'une accumulation importante de biomasse à la bordure des dendrites (fig. 41), nous avons émis l'hypothèse que celle-ci serait composée majoritairement de cellules mortes. L'ajout d'antibiotique dans le milieu créerait des conditions de stress pour la colonie qui devrait trouver une façon de se protéger pour continuer à coloniser l'environnement. L'élargissement des dendrites serait dû à une mort importante des cellules au niveau des bordures. Celles-ci permettraient donc l'établissement d'un « rempart » protégeant les bactéries très actives métaboliquement du centre de la dendrite (Tremblay *et al.*, 2010). Cette hypothèse est basée sur les observations réalisées par Butler et collègues (2010). Dans ces travaux, des tests de fluorescence ont permis de situer les cellules vivantes et mortes dans une colonie *swarming* chez *B. subtilis*. Les bactéries mortes se trouvaient majoritairement en contact avec le milieu gélosé contenant l'antibiotique. Les bactéries vivantes étaient réparties dans le reste de la colonie (Butler *et al.*, 2010). Dans cette optique, les bactéries mortes pourraient non seulement protéger celles qui continuent de se déplacer, mais aussi possiblement leur servir de source nutritionnelle.

4.3.3 Il n'y a pas plus de bactéries mortes au pourtour des dendrites qu'au centre

Pour approfondir l'hypothèse que les bordures des dendrites sont composées majoritairement de bactéries mortes, nous avons procédé à des analyse par cytométrie en flux en collaboration avec Émilie Bédard de la polytechnique de Montréal (chaire de recherche en eau potable, laboratoire de Michèle Prévost). Lors du premier essai, il n'y avait pas de différence entre le milieu avec ou sans antibiotique au niveau des bordures des dendrites (fig. 45). Une différence est observable au centre des dendrites lorsque le milieu est additionné de 0,05 µg/ml de tobramycine. À la figure 44, il y a une différence significative de bactéries vivantes entre les deux conditions. Étant donné le nombre élevé d'évènements dans chaque échantillon, ceux-ci ont été dilués à un ratio 1 :10 à l'aide de solution saline stérile (0,85%) pour les prochains essais. Le second essai à l'aide des échantillons dilués n'a pas donné les résultats escomptés. Il est possible de voir qu'autant au niveau des bordures ou des centres des dendrites, l'ajout d'antibiotique n'affecte pas la présence de bactéries mortes. On observe aussi des données négatives importantes. Après avoir discuté avec des membres du laboratoire à la polytechnique, différentes hypothèses ont été émises quant à la présence de ces données négatives. Des données négatives faibles sont généralement un indice que toutes les bactéries présentes dans l'échantillon sont vivantes. Une grande variation au niveau des données pourrait indiquer que la méthode de prélèvement est trop aléatoire. Il est vrai que l'utilisation d'un embout p200 stérile

pour resuspendre la biomasse n'est pas très précis. Il serait nécessaire de développer une méthode plus normalisée quant au prélèvement des cellules. Il est tout de même difficile de prélever des cellules précisément à un endroit de la dendrite étant donné la petite taille de celle-ci. Il se pourrait aussi que le programme utilisé pour la lecture au cytomètre n'était pas approprié pour cette souche. Ce programme est normalement utilisé pour différentes souches environnementales telles que les *Legionella*. Une autre hypothèse expliquant les difficultés de lecture serait la formation d'agrégats par *Pseudomonas aeruginosa*. Tel qu'observé lors de la coloration Baclight™ (fig. 43), les cellules forment des agrégats très facilement. Une meilleure homogénéisation des échantillons pourrait être nécessaire. Pour réduire la formation d'agrégat, il est aussi recommandé d'ajouter de l'EDTA à l'échantillon. Toutefois, l'ajout d'EDTA a été démontré comme ayant une influence sur la perméabilité de la membrane ce qui pourrait affecter les résultats de coloration aux fluorochromes (Nescerecka *et al.*, 2016). Somme toute, selon les experts consultés au laboratoire de la polytechnique, les résultats obtenus ne représentent pas des données concluantes. Pour rendre ce test plus performant, il serait nécessaire d'effectuer un programme de lecture personnalisé en fonction des conditions de culture de l'organisme. Cette optimisation pourrait permettre de réaliser différentes études sur les bactéries motiles mais aussi possiblement en biofilms.

4.3.4 Possibles raisons de l'accumulation de biomasse au niveau des bordures

Suite aux résultats obtenus, nous pouvons affirmer que l'accumulation de biomasse apparente au niveau des bordures des dendrites n'est pas composée de bactéries mortes. Différentes hypothèses concernant la formation de cette bordure ont été émises. Des concentrations sous-inhibitrices de tobramycine induisent la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1 et chez des isolats cliniques d'*E. coli* (Hoffman *et al.*, 2005). Ceci serait dû à l'implication du gène *arr* (*aminoglycoside response regulator*). Cette formation de biofilm se trouve à atteindre un niveau 3,4 fois plus élevé que le témoin négatif lorsqu'il y a addition de 0,3 µg/ml de tobramycine dans un milieu Mueller-Hinton (Hoffman *et al.*, 2005). La bordure apparente pourrait donc n'être en fait qu'une réponse à la présence d'antibiotique dans l'environnement qui causerait une accumulation de biofilm. La présence de biofilm pourrait aussi expliquer pourquoi les bordures des dendrites semblaient plus épaisses. Étant donné qu'il n'y a pas plus de cellules mortes au niveau de la bordure mais possiblement une augmentation de la production d'EPS, il serait intéressant de vérifier la production de ces composés sur un milieu *swarming* en présence de différentes concentrations d'antibiotiques.

L'implication des molécules de glucanes périplasmiques a aussi été étudiée lors d'ajout d'antibiotiques chez *P. aeruginosa*. Celles-ci pourraient interagir physiquement avec la tobramycine en la séquestrant dans le périplasme, lui empêchant donc d'atteindre son site d'action (Mah *et al.*, 2003). Il s'agirait donc d'un second mécanisme de résistance aux antibiotiques utilisé chez les bactéries en biofilm, autre que l'utilisation de gradients de diffusion. Une mutation au niveau du gène *ndvB* chez *P. aeruginosa* inhibe la formation de glucanes et rend la colonie plus sensible aux antibiotiques sans affecter la motilité flagellaire (Mah *et al.*, 2003). Il serait intéressant de tester ce mutant *ndvB* en conditions *swarming* et réaliser des analyses en cytométrie. Étant donné la diminution de résistance à la tobramycine, le patron observé aurait pu être bien différent ainsi que la répartition des cellules vivantes et mortes au niveau des ramifications de la colonie *swarmer*.

L'utilisation de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine peut stimuler la croissance bactérienne contrairement aux attentes (Linares *et al.*, 2006). Dans le cas présent, l'antibiotique serait considéré comme un composé hormétique. Le phénomène d'hormèse se base sur le fait qu'un même composé peut avoir des effets différents à des concentrations variables (voir 1.5.4). Tel que démontré, des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques peuvent stimuler la motilité tandis que des quantités plus élevées peuvent être létales (Linares *et al.*, 2006). Des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques peuvent aussi être responsables d'une augmentation de la fréquence de mutations chez *P. aeruginosa* (Linares *et al.*, 2006).

4.3.5 Hypothèses sur l'augmentation de la résistance en *swarming*

Pour étudier plus en profondeur la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en *swarming*, différentes expériences pourraient être réalisées. Une des raisons pour lesquelles *P. aeruginosa* peut effectuer une motilité *swarming* dans un environnement additionné d'antibiotique est sa résistance intrinsèque. La membrane externe de cette bactérie est particulièrement imperméable et la présence de pompes à efflux très actives permet d'augmenter la résistance de manière importante (Hancock *et al.*, 2000, Lai *et al.*, 2009). Il a été démontré dans une étude de Overhage et collègues (2008) que les gènes impliqués dans la régulation des pompes à efflux chez *P. aeruginosa* sont surexprimés en *swarming*. Ces gènes, *mexG*, *mexH* et *mexD* sont exprimés environ 3 fois plus que chez la bactérie en milieu liquide.

L'organisation des colonies *swarming* en 3D est très peu étudiée. L'utilisation de marqueurs fluorescents tel qu'utilisés par Butler et collègues (2010) pourrait être une méthode permettant d'en apprendre plus sur l'organisation d'une colonie *swarming* en temps réel. Ceux-ci suite à un prélèvement de cellules motiles utilisaient un système de coloration live/dead (SYTO9 et Pi) tel que décrit à la section 2.4.5. Les cellules étaient par la suite visualisées en microscopie à contraste de phase. La présence d'antibiotique pourrait affecter l'organisation de la colonie en ayant un effet sur les appendices locomoteurs tels que les flagelles ou les pili de type IV. Il serait intéressant d'en apprendre plus sur la répartition des organismes dans un patron *swarming*. Il serait aussi possible d'observer si des patrons précis de motilité sont retrouvés dans la communauté bactérienne et suivre ces déplacements lors de changements d'environnements.

Cet objectif a permis d'observer différentes caractéristiques morphologiques se développant chez des colonies *swarmers* de *P. aeruginosa*. L'ajout de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine cause une augmentation de la largeur et de l'épaisseur des dendrites dans un patron *swarming*. Une observation plus poussée a aussi indiqué une accumulation de biomasse au niveau de la bordure des dendrites. Après avoir émis l'hypothèse que cette bordure était composée de cellules mortes sacrifiées pour la survie de celles se trouvant au centre, des tests de cytométrie ont été effectués. Cette hypothèse a été infirmée en démontrant que les bordure ne sont pas composées majoritairement de cellules mortes, peu importe la concentration d'antibiotique ajoutée. L'étude de l'ajout d'antibiotique dans un environnement ainsi que la réponse de la colonie bactérienne à cet ajout pourrait permettre d'en apprendre plus sur les comportements sociaux surtout en milieu hospitalier et chez les patients infectés par *P. aeruginosa*.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette étude était d'en apprendre plus sur les raisons poussant la bactérie *P. aeruginosa* à réaliser une motilité de type *swarming*. Nous voulions également déterminer si l'utilisation de ce type de motilité apporte des avantages particuliers à la bactérie. La motilité de type *swarming* est étudiée depuis de nombreuses années mais sa véritable fonction reste nébuleuse. C'est pourquoi trois objectifs distincts ont été proposés pour permettre d'élargir nos connaissances sur cette forme de déplacement social.

Dans un premier temps, la motilité *swarming* de *P. aeruginosa* PA14 a été testée en la soumettant à une variation des concentrations nutritionnelles du milieu M9DCAA. Notre première hypothèse stipulant que la diminution de la concentration nutritionnelle du milieu devait stimuler la motilité a été démentie en partie. Un milieu plus dilué en nutriments a induit une diminution de la motilité dans nos conditions. Ceci est possiblement explicable par la nécessité d'un apport adéquat en carbone et en azote pour permettre la motilité (Shrout *et al.*, 2006). Pour pouvoir se déplacer en *swarming*, la bactérie doit posséder deux caractéristiques indispensables, soit la présence d'au moins un flagelle fonctionnel et la production d'un agent mouillant (Kearns, 2010, Kohler *et al.*, 2000). L'utilisation de la motilité *swarming* par un organisme est très coûteuse énergétiquement. La cellule doit donc pouvoir répondre à ses besoins métaboliques basaux avant de s'aventurer vers un nouvel environnement (Kohler *et al.*, 2000). Il est donc logique qu'une diminution trop importante de la concentration nutritionnelle réduise la motilité de l'organisme qui pourrait entrer dans un état de survie. Il serait intéressant de mesurer la production de rhamnolipides par une colonie *swarmer* de PA14 en variant la concentration nutritionnelle. Une concentration nutritionnelle basale où la production est assez forte pour induire la motilité pourrait être déterminée.

Cependant, une augmentation conséquente de la concentration nutritionnelle du milieu affecte également le *swarming*. À des concentrations trop élevées, la motilité est réduite de façon significative. Ces observations confirment nos hypothèses concernant la motilité dans un milieu très riche. La motilité de *P. aeruginosa* est surtout observée en milieux minimaux (Kohler *et al.*, 2000, Overhage *et al.*, 2008, Tremblay *et al.*, 2008). Tel que discuté à la section 4.1, un milieu trop riche pourrait possiblement être toxique pour la cellule en comportant par exemple des concentrations trop élevées de sels ou en modifiant le pH de manière trop drastique. Il serait

intéressant d'observer les différents mécanismes de réponse aux stress chez PA14, tels que le facteur sigma *rpoS*. Il aurait aussi été intéressant d'observer les variations de pH en fonction des concentrations nutritionnelles et de l'implication de ces variations sur la motilité. Ces variations pourraient être indiquées par la présence d'un colorant changeant de couleur en réponse au pH. Les conditions pourraient aussi être testées en liquide et le pH serait observé à l'aide de bandelettes. La motilité *swarming* peut donc être définie comme un mode de déplacement exploratoire seulement lorsque les conditions nutritionnelles du milieu sont adéquates. L'hypothèse initiale a donc été confirmée et infirmée en même temps.

Un deuxième objectif a permis d'étudier le phénomène d'interaction des bactéries en milieu *swarming*. Cette approche a été proposée étant donné la grande diversité de microorganismes retrouvés au sein des voies respiratoires des patients FK. Parmi les organismes retrouvés dans les poumons on retrouve entre autre *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia*. Des tests de co-cultures en *swarming* ont été réalisés pour en apprendre plus sur les interactions entre ces deux organismes, mais aussi pour observer si la motilité *swarming* confère un avantage compétitif à *P. aeruginosa*. Une découverte importante est que *B. cenocepacia* n'est pas motile dans les conditions testées mais le devient lorsqu'elle se retrouve en présence de PA14. Des comptes microbiens ont permis de situer les deux souches dans le patron *swarming* observé. Des essais utilisant le mutant non motile PA14 *fliC*- et *B. cenocepacia* K56-2 ont permis d'observer un retour de la motilité *swarming* lorsque ces souches sont mélangées à un ratio égal 1:1. Les différentes observations réalisées lors de cet objectif ont révélées que la relation entre *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia* serait de nature coopérative en milieu *swarming* plutôt que compétitive. Il est intrigant d'imaginer ce qui arrive dans les voies respiratoires des individus atteints de fibrose kystique. Une seconde hypothèse serait que les deux organismes puissent interagir en utilisant des appendices situés à leur surface, tels que les pili de type IV chez *P. aeruginosa* ou les pili *cbI* chez *B. cenocepacia*. Étant donné la présence de trois systèmes d'assemblages de pili de type IV chez *P. aeruginosa*, il serait intéressant d'étudier l'implication de chacun de ceux-ci en réalisant des mutants au niveau des différents systèmes. Ces mutants sont présentement en cours d'étude. Il serait aussi captivant d'en apprendre plus sur le rôle des pili *cbI* dans la motilité bactérienne. Ceux-ci sont associés en grande partie à l'attachement des bactéries aux cellules épithéliales. L'étude des interactions entre ces deux pathogènes est primordiale dans la compréhension des infections polymicrobiennes qui sont d'une importance grandissante. Nous croyons qu'il est nécessaire d'aborder les infections bactériennes en tant que communautés diversifiées. La coopération et la compétition font partie intégrale des comportements sociaux et il est primordial

de voir les infections d'un point de vu plus global pour permettre de comprendre leur pathogénicité sous des angles nouveaux. Des études sur des interactions avec d'autres pathogènes retrouvés au sein des voies respiratoires pourraient aussi être réalisées, notamment avec des espèces fongiques telles qu'*Aspergillus fumigatus*.

Le dernier objectif aborde la question de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* en milieu *swarming*. les bactéries en *swarming* sont plus résistantes aux antibiotiques et ce de manière conséquente (Lai *et al.*, 2009). Non seulement les communautés en *swarming* sont plus résistantes mais celles qui se trouvent en biofilm aussi (O'Toole *et al.*, 2000, Partridge *et al.*, 2018). L'ajout de concentrations sous-inhibitrices de tobramycine augmente la largeur et l'épaisseur des dendrites du patron *swarming* causant une accumulation de biomasse aux bords de celles-ci. Nous avons vérifié l'hypothèse que cette bordure pourrait être composée majoritairement de bactéries agissant ainsi comme un rempart protecteur des cellules métaboliquement actives à l'intérieur des dendrites. Des tests de cytométrie, ont révélés que ces bordures ne sont pas composées de bactéries mortes. Le fait que la production d'EPS est plus grande en présence d'antibiotiques (Hoffman *et al.*, 2005) pourrait également suggérer une hypothèse alternative. Les bordures des dendrites pourraient être composées de ces EPS produits en réponse aux antibiotiques dans le milieu. La mesure de ces EPS pourrait être réalisée en milieu *swarming* en ajoutant différentes concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques. Des mesures pourraient être prises à différents temps permettant d'observer une cinétique de production d'EPS en réponse à la présence de tobramycine. L'utilisation de colorants tels que le rouge Congo, le bleu Aniline et le calcofluor ajoutés au milieu *swarming* pourraient indiquer la présence d'EPS en différentes conditions (Hawkins *et al.*, 2017).

Les résultats présentés dans ce mémoire permettent d'obtenir un portrait global du comportement de *P. aeruginosa* en *swarming*. Les nombreuses facettes de cette motilité ont été étudiées en plusieurs conditions nutritionnelles mais aussi dans un contexte de compétition polymicrobienne. Ces différents axes permettent d'en apprendre plus sur les conditions de survie de cet organisme. En allant plus loin dans nos connaissances sur l'environnement de *P. aeruginosa*, il serait envisageable de mieux comprendre son mode de vie et ses implications au niveau des infections. Deux aspects sont essentiels à considérer lors des infections par cette bactérie, soit sa capacité d'interaction avec d'autres organismes mais aussi sa grande résistance à de multiples antibiotiques. Il est primordial d'en apprendre plus sur les infections polymicrobiennes et comment ces interactions modulent l'avenir des individus infectés. L'étude

de cette forme de déplacement et son implication dans la colonisation de nouveaux environnements par exemple au niveau du sol ou sur du matériel médical est un projet d'envergure. En caractérisant cette motilité, nous pourrions concevoir de nouvelles solutions pour mieux traiter les infections causées par *P. aeruginosa*.

6 RÉFÉRENCES

- Abdel-Mawgoud AM, Lepine F & Deziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology* 86(5):1323-1336.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2014) A Stereospecific Pathway Diverts B-Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants. *Chemistry and Biology* 21:9.
- Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA & Chandler JR (2018) Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio* 9(3).
- Anyan ME, Amiri A, Harvey CW, G. T, Morales-Soto N, Driscoll CM, Alber MS & Shrout JD (2014) Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(50):6.
- Babic F, Venturi V & Maravic-Vlahovicek G (2010) Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhlI/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate. *BMC Infect Dis* 10:148.
- Baldwin A, Mahenthalingam E, Drevinek P, Vandamme P, Govan JR, Wayne DJ, LiPuma JJ, Chiarini L, Dalmastri C, Henry DA, Speert DP, Honeybourne D, Maiden MCJ & Dowson CG (2007) Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis* 13(3):458-461.
- Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST, Thornley PE, Pattermore PK & Grimwood K (1996) Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemoth* 37(6):1155-1164.
- Barth AL & Pitt TL (1996) The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology* 45(2):110-119.
- Beal R & Betts WB (2000) Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology* 89(1):158-168.
- Bedard E, Prevost M & Deziel E (2016) *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *Microbiologyopen* 5(6):937-956.
- Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* 7(11):1673-1685.
- Berg HC (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72:19-54.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU & Egli T (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73(10):3283-3290.
- 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. *American Society for Microbiology* 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.

- Beveridge TJ (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology* 181(16):4725-4733.
- Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J & Desjardins R (1999) LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37(1):77-86.
- Boyle KE, Monaco HT, Deforet M, Yan J, Wang Z, Rhee K & Xavier J (2017) Metabolism and the evolution of social behavior. *Molecular biology and evolution* 10.1093/molbev/msx174.
- Bragonzi A, Farulla I, Paroni M, Twomey KB, Pirone L, Lore NI, Bianconi I, Dalmastrì C, Ryan RP & Bevivino A (2012) Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PloS one* 7(12):e52330.
- Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Di Serio C, Doring G & Tummeler B (2009) *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med* 180(2):138-145.
- Burrows LL (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual review of microbiology* 66:493-520.
- Burrows LL (2017) *Staph crowd surfs with Pseudomonas*. <https://npjbiofilmscommunity.nature.com/users/7121-lori-l-burrows/posts/14864-irresistible-force-meets-moveable-object> (Consulté le 28 Novembre 2018)
- Butler MT, Wang Q & Harshey RM (2010) Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8):3776-3781.
- Carmody LA, Zhao J, Kalikin LM, LeBar W, Simon RH, Venkataraman A, Schmidt TM, Abdo Z, Schloss PD & LiPuma JJ (2015) The daily dynamics of cystic fibrosis airway microbiota during clinical stability and at exacerbation. *Microbiome* 3:12.
- Castillo-Juarez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, Tomas M, Perez-Eretza B, Garcia-Contreras SJ, Wood TK & Garcia-Contreras R (2015) Role of quorum sensing in bacterial infections. *World journal of clinical cases* 3(7):575-598.
- Chapalain A, Groleau MC, Le Guillouzer S, Miomandre A, Vial L, Milot S & Deziel E (2017) Interplay between 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinoline and N-Acyl-Homoserine Lactone Signaling in a *Burkholderia cepacia* Complex Clinical Strain. *Frontiers in microbiology* 8:1021.
- Cheung KJ, Li G, Urban TA, Goldberg JB, Griffith A, Lu FQ & Burns JL (2007) Pilus-mediated epithelial cell death in response to infection with *Burkholderia cenocepacia*. *Microbes and infection* 9(7):829-837.
- Choi K-H, Schweizer, H. P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites : example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols* 1(1).
- 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. *J Microbiol Methods* 64(3):391-397.
- 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* 160(Pt 7):1474-1487.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.

- Crespi BJ (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* 16(4):178-183.
- Crespo MD, Puorger C, Scharer MA, Eidam O, Grutter MG, Capitani G & Glockshuber R (2012) Quality control of disulfide bond formation in pilus subunits by the chaperone FimC. *Nat Chem Biol* 8(8):707-713.
- D'Argenio DA, Wu MH, Hoffman LR, Kulasekara HD, Deziel E, Smith EE, Nguyen H, Ernst RK, Freeman TJL, Spencer DH, Brittnacher M, Hayden HS, Selgrade S, Klausen M, Goodlett DR, Burns JL, Ramsey BW & Miller SI (2007) Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Molecular Microbiology* 64(2):512-533.
- Daikos GL, Lolans VT & Jackson GG (1991) First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35(1):117-123.
- Darling P, Chan M, Cox AD & Sokol PA (1998) Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 66(2):874-877.
- Davies J (2007) Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep* 8(7):616-621.
- De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JE, 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.
- Deziel E, Lepine F, Milot S, He JX, Mindrinos MN, Tompkins RG & Rahme LG (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5):1339-1344.
- Déziel E, Lépine F, Milot S & Villemur R (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149:9.
- Diggle SP, Griffin AS, Campbell GS & West SA (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450(7168):411-414.
- Donabedian H (2003) Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *The Journal of infection* 46(4):207-214.
- Drenkard E (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and infection* 5(13):1213-1219.
- Dubeau D, Déziel, E., Woods, D. E., Lépine F. (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology* 2(263):12.
- Eberl L (2006) Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *International Journal of Medical Microbiology* 296(2-3):103-110.
- Eberl L & Vandamme P (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Res* 5.

- Ferenci T (2016) Trade-off Mechanisms Shaping the Diversity of Bacteria. *Trends in microbiology* 24(3):209-223.
- Fernandez L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I & Hancock RE (2010) Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(8):3372-3382.
- Fernandez L & Hancock RE (2012) Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 25(4):661-681.
- 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.
- Fraser GM & Hughes C (1999) Swarming motility. *Current opinion in microbiology* 2(6):630-635.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176(2):269-275.
- Gilligan PH (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4(1):35-51.
- Giltner CL, Nguyen Y & Burrows LL (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(4):740-772.
- Giraud C & de Bentzmann S (2012) Inside the complex regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chaperone usher systems. *Environmental Microbiology* 14(8):1805-1816.
- Goh EB, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG & Davies J (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):17025-17030.
- Govan JR & Deretic V (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60(3):539-574.
- Hagai E, Dvora R, Havkin-Blank T, Zelinger E, Porat Z, Schulz S & Helman Y (2014) Surface-motility induction, attraction and hitchhiking between bacterial species promote dispersal on solid surfaces. *The ISME journal* 8(5):1147-1151.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2(2):95-108.
- Hancock RE & Speert DP (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* 3(4):247-255.
- Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153(Pt 4):917-923.
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual review of microbiology* 57:249-273.
- Hartl D, Gaggari A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, Greene C, McElvaney G, Mall M & Doring G (2012) Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 11(5):363-382.
- Hawkins JP, Geddes BA & Oresnik IJ (2017) Common dyes used to determine bacterial polysaccharides on agar are affected by medium acidification. *Can J Microbiol* 63(6):559-562.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36(4):478-503.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR & Peterson SB (2010a) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* 8(1):15-25.

- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR & Peterson SB (2010b) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8(1):15-25.
- Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA & Miller SI (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436(7054):1171-1175.
- Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW & Miller SI (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52):19890-19895.
- Hogardt M & Heesemann J (2010) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International journal of medical microbiology : IJMM* 300(8):557-562.
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S & Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35(4):322-332.
- Horna G, Lopez M, Guerra H, Saenz Y & Ruiz J (2018) Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports* 8(1):16463.
- 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.
- Irazoki O, Campoy S & Barbe J (2017) The Transient Multidrug Resistance Phenotype of *Salmonella enterica* Swarming Cells Is Abolished by Sub-inhibitory Concentrations of Antimicrobial Compounds. *Frontiers in microbiology* 8:1360.
- 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*. *INRS*:214.
- 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.
- Kaiser D (2000) Bacterial motility: How do pili pull? *Current Biology* 10(21):R777-R780.
- Kang PJ, Hauser AR, Apodaca G, Fleiszig SMJ, WienerKronish J, Mostov K & Engel JN (1997) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. *Molecular Microbiology* 24(6):1249-1262.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8(9):10.
- Knowles MR & Boucher RC (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109(5):571-577.
- 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.
- Krause KM, Serio AW, Kane TR & Connolly LE (2016) Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(6).
- Kumar A & Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 57(10):1486-1513.
- Lai S, Tremblay J & Déziel E (2009) Swarming motility: a multicellular behavior conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology* 11(1):10.

- Lalancette C, Charron D, Laferriere C, Dolce P, Deziel E, Prevost M & Bedard E (2017) Hospital Drains as Reservoirs of *Pseudomonas aeruginosa*: Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis Genotypes Recovered from Faucets, Sink Surfaces and Patients. *Pathogens* 6(3).
- Lewenza S, Visser MB & Sokol PA (2002) Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* 48(8):707-716.
- Li XZ, Zhang L & Poole K (2000) Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 45(4):433-436.
- Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T & Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2833-2838.
- Limoli DH, Whitfield GB, Kitao T, Ivey ML, Davis MR, Jr., Grahl N, Hogan DA, Rahme LG, Howell PL, O'Toole GA & Goldberg JB (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes Coexistence with *Staphylococcus aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection. *MBio* 8(2).
- Linares JF, Gustafsson I, Baquero F & L MJ (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS* 103(51):6.
- Lindsay D & von Holy A (2006) Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection* 64(4):313-325.
- Lipuma JJ (2010) The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 23(2):299-323.
- Liu Y, Kyle S & Straight PD (2018) Antibiotic Stimulation of a *Bacillus subtilis* Migratory Response. *mSphere* 3(1).
- Loutet SA & Valvano MA (2010) A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. *Infect Immun* 78(10):4088-4100.
- Lyczak JB, Cannon, C. L., Pier, G. B (2002) Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *American Society for Microbiology* 15(2):29.
- Lyons NA & Kolter R (2015) On the evolution of bacterial multicellularity. *Current opinion in microbiology* 24:21-28.
- Mah TF & O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* 9(1):34-39.
- Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS & O'Toole GA (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426(6964):306-310.
- Mahenthiralingam E, Baldwin A & Dowson CG (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of applied microbiology* 104(6):1539-1551.
- Mahenthiralingam E, Urban TA & Goldberg JB (2005) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology* 3(2):144-156.
- Mashburn LM, Jett AM, Akins DR & Whiteley M (2005) *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *Journal of bacteriology* 187(2):554-566.

- Mathieu A, Fleurier S, Frenoy A, Dairou J, Bredeche MF, Sanchez-Vizuete P, Song X & Matic I (2016) Discovery and Function of a General Core Hormetic Stress Response in *E. coli* Induced by Sublethal Concentrations of Antibiotics. *Cell Rep* 17(1):46-57.
- Mattingly AE, Weaver AA, Dimkovikj A & Shrout JD (2018) Assessing Travel Conditions: Environmental and Host Influences On Bacterial Surface Motility. *Journal of bacteriology* 10.1128/JB.00014-18.
- McKnight SL, Iglewski BH & Pesci EC (2000) The *Pseudomonas quinolone* signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 182(10):2702-2708.
- Merz AJ & Forest KT (2002) Bacterial surface motility: Slime trails, grappling hooks and nozzles. *Current Biology* 12(8):R297-R303.
- Mikkelsen H, Hui KL, Barraud N & Filloux A (2013) The pathogenicity island encoded PvrSR/RcsCB regulatory network controls biofilm formation and dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Molecular Microbiology* 89(3):450-463.
- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y & Tulkens PM (1999) Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43(4):727-737.
- Moradali MF, Ghods S & Rehm BH (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7:39.
- Morita Y, Tomida J & Kawamura Y (2014) Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in microbiology* 4:422.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of bacteriology* 104(1):313-322.
- Nescerecka A, Hammes F & Juhna T (2016) A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. *J Microbiol Meth* 131:172-180.
- Nickel JC, Ruseska I, Wright JB & Costerton JW (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 27(4):6.
- Nickzad A, Déziel, E. (2016) Adaptive Significance of Quorum Sensing-Dependant Regulation of Rhamnolipids by Integration of Growth Rate in *Burkholderia glumae*: A Trade-Off between Survival and Efficiency. *Frontiers in microbiology* 7(1215):9.
- Nickzad A, Lépine F & Déziel E (2015) Quorum Sensing Control's Swarming Motility of *Burkholderia glumae* through Regulation of Rhamnolipids. *PLoS one* 10(6):10.
- 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'Toole G, Kaplan HB & Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology* 54:49-79.
- Ochsner UA, Fiechter A & Reiser J (1994) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* 269(31):19787-19795.
- Organisation Mondiale de la Santé (2018) *L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques.* <http://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Consulté le 20 Juillet)

- 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.
- Overhage J, Lewenza S, Marr AK & Hancock RE (2007) Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *Journal of bacteriology* 189(5):2164-2169.
- Palmer KL, Aye LM & Whiteley M (2007) Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *Journal of bacteriology* 189(22):8079-8087.
- Parsek MR & Fuqua C (2004) Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of bacteriology* 186(14):4427-4440.
- Parsek MR & Greenberg EP (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology* 13(1):27-33.
- Partridge JD, Ariel G, Schvartz O, Harshey RM & Be'er A (2018) The 3D architecture of a bacterial swarm has implications for antibiotic tolerance. *Scientific reports* 8(1):15823.
- Partridge JD & Harshey RM (2013) Swarming: flexible roaming plans. *Journal of bacteriology* 195(5):909-918.
- Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, Patel SB, Chen J, Valdes J, Stojadinovic O, Plano LR, Tomic-Canic M & Davis SC (2013) Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PloS one* 8(2):e56846.
- Price EP, Sarovich DS, Webb JR, Hall CM, Jaramillo SA, Sahl JW, Kaestli M, Mayo M, Harrington G, Baker AL, Sidak-Loftis LC, Settles EW, Lummis M, Schupp JM, Gillece JD, Tuanyok A, Warner J, Busch JD, Keim P, Currie BJ & Wagner DM (2017) Phylogeographic, genomic, and meropenem susceptibility analysis of *Burkholderia ubonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 11(9):e0005928.
- 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.
- Price KE, Naimie AA, Griffin EF, Bay C & O'Toole GA (2016) Tobramycin-Treated *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Enhances *Streptococcus constellatus* 7155 Biofilm Formation in a Cystic Fibrosis Model System. *Journal of bacteriology* 198(2):237-247.
- Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS & Soberon-Chavez G (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhIC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40(3):708-718.
- Rahme 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.
- Ranieri M, Whitchurch, C., Burrows, L. (2018) Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Current opinion in microbiology* 45:5.
- Rashid MH & Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4885-4890.

- Rauprich O, Matsushita M, Weijer CJ, Siegert F, Esipov SE & Shapiro JA (1996) Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *Journal of bacteriology* 178(22):6525-6538.
- Robinson GE, Fernald RD & Clayton DF (2008) Genes and social behavior. *Science* 322(5903):896-900.
- Ruer S, Stender S, Filloux A & de Bentzmann S (2007) Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: Functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *Journal of bacteriology* 189(9):3547-3555.
- Sajjan U, Wu Y, Kent G & Forstner J (2000) Preferential adherence of cable-piliated *Burkholderia cepacia* to respiratory epithelia of CF knockout mice and human cystic fibrosis lung explants. *Journal of medical microbiology* 49(10):875-885.
- Sajjan US, Sun L, Goldstein R & Forstner JF (1995) Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: nucleotide sequence of the cblA major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. *Journal of bacteriology* 177(4):1030-1038.
- Saraswat M, Grand RS & Patrick WM (2013) Desalting DNA by drop dialysis increases library size upon transformation. *Biosci Biotechnol Biochem* 77(2):402-404.
- Shapiro JA (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual review of microbiology* 52:81-104.
- Shklarsh A, Finkelshtein A, Ariel G, Kalisman O, Ingham C & Ben-Jacob E (2012) Collective navigation of cargo-carrying swarms. *Interface Focus* 2(6):786-798.
- 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. *Mol Microbiol* 62(5):1264-1277.
- Shubham J, Mohammed Ameen K, Kotian H, Divakar B, Deep P, Ayushi M, Manoj M V & Varsha S (2018) Two-component systems regulate swarming in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *bioRxiv* 445015.
- Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Duan K, Norgaard JC & Surette MG (2008) A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39):15070-15075.
- Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW & Cold Spring Harbor Laboratory. (1984) *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. xv, 303 p., 301 p. of plates p
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R & Olson MV (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22):8487-8492.
- Spangenberg C, Heuer T, Burger C & Tummeler B (1996) Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* 396(2-3):213-217.
- Spellberg B (2014) The future of antibiotics. *Crit Care* 18(3):228.
- Tomich M, Herfst CA, Golden JW & Mohr CD (2002) Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 70(4):1799-1806.
- 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.

- Tremblay J (2011) Caractérisation de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*.
- Tremblay J & Déziel E (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of Basic Microbiology* 48:7.
- Tremblay J & Déziel E (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 11(587):15.
- Tremblay J, Richardson AP, Lepine F & Deziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental Microbiology* 9(10):2622-2630.
- Tuanyok A, Mayo, M., Scholz, H., Hall, C. M., Allender, C. J., Kaestli, M., Ginther, J., Spring-Pearson, S., Bollig, M. C., Stone, J., K., Settles, E. W., Busch, J. D., Sidak-Loftis, L., Sahl, J. W., Thomas, A., Kreutzer, L., Georgi, E., Gee, J.E., Bowen, R. A., Ladner, J. T., Lovett, S., Koroleva, G., Palacios, G., Wagner, D. A., Currie, B. J., Keima, P. (2017) *Burkholderia humptydoensis* sp. nov., a New Species Related to *Burkholderia thailandensis* and the Fifth Member of the *Burkholderia pseudomallei* Complex. *Applied and Environmental Microbiology* 83(5):10.
- Turan NB, Chormey, D. S., Büyükpınar, Ç., Engin, G. O. and Bakirdere, S. (2017) Quorum sensing: Little talks for and effective bacterial coordination. *Trends in Analytical Chemistry* 91:11.
- Urban TA, Griffith A, Torok AM, Smolkin ME, Burns JL & Goldberg JB (2004) Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. *Infect Immun* 72(9):5126-5134.
- Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Camara M, Ventre I, Lory S, Lazdunski A, Williams P & Filloux A (2004) Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *Journal of bacteriology* 186(9):2880-2890.
- 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.
- Venturi V (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS microbiology reviews* 30(2):274-291.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J & Michiels J (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology* 16(10):496-506.
- 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.
- Viducic D, Murakami K, Amoh T, Ono T & Miyake Y (2017) RpoN Promotes *Pseudomonas aeruginosa* Survival in the Presence of Tobramycin. *Frontiers in microbiology* 8:839.
- Wall D & Kaiser D (1999) Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology* 32(1):1-10.
- West SA, Griffin AS, Gardner A & Diggle SP (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 4(8):597-607.
- Whiley RA, Fraser H, Hardie JM & Beighton D (1990) Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri* group". *J Clin Microbiol* 28(7):1497-1501.
- Xavier JB (2016) Sociomicrobiology and Pathogenic Bacteria. *Microbiol Spectr* 4(3).
- Xavier JB & Foster KR (2007) Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(3):876-881.

- Xavier JB, Kim W & Foster KR (2011) A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 79(1):21.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T & Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* Gen-Nov and Transfer of 7 Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group-li to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia-Cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) Comb-Nov. *Microbiology and Immunology* 36(12):1251-1275.
- Yang, Pollard AM, Höfler C, Poschet G, Wirtz M, Hell R & and Sourjik V (2015) Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. *Molecular microbiology* 96(6):10.
- Yang L, Jelsbak L & Molin S (2011) Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. *Environ Microbiol* 13(7):1682-1689.
- Yim G, Wang HH & Davies J (2007) Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362(1483):1195-1200.
- Zhang YM & Miller RM (1995) Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of N-Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 61(6):2247-2251.
- 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.

7 ANNEXES

ANNEXE I : Recettes des différents milieux de culture bactérienne

Milieu M9DCAA

PRODUITS	POIDS MOLÉCULAIRE (g/mol)	CONCENTRATION FINALE	g/L
NH ₄ Cl	53,49	0,02 M	1,07
Na ₂ HPO ₄	268,07	0,012 M	1,70
KH ₂ PO ₄	136,10	0,022 M	2,99
NaCl	58,44	0,0086 M	0,50
CAA	-	0,5%	5,00
BACTO AGAR	-	0,5%	5,00

Solutions ajoutées après autoclave :

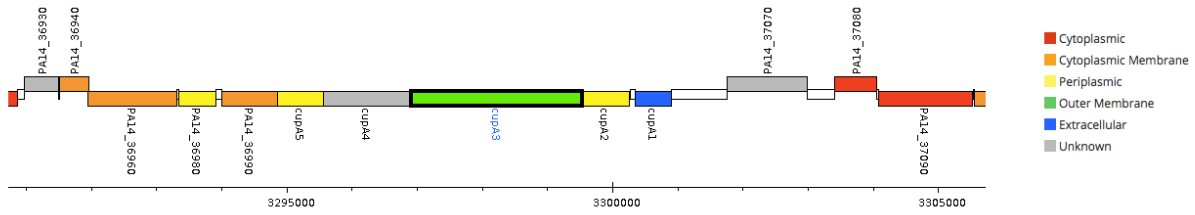
PRODUITS	POIDS MOLÉCULAIRE (g/mol)	[SOL. MÈRE]	[FINALE]
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	120,33	1,0 M	0,001 M
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	147,02	1,0 M	0,001 M
Dextrose	180,16	1,1 M	0.011 M

Variations de concentrations pour l'objectif 1(2.2.2)

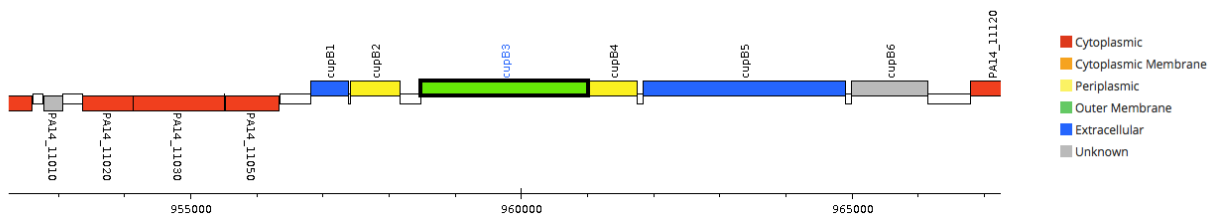
PRODUITS	CONCENTRATIONS (g/200 mL)						
	0,4x	0,6x	0,8x	1x	1,5x	2x	4x
NH ₄ Cl	0,0856	0,1284	0,1712	0,214	0,321	0,428	0,856
Na ₂ HPO ₄	0,136	0,204	0,272	0,34	0,51	0,68	1,36
KH ₂ PO ₄	0,2392	0,3588	0,4784	0,598	0,897	1,196	2,392
NaCl	0,04	0,06	0,08	0,1	0,15	0,2	0,4
CAA	0,4	0,6	0,8	1	1,5	2	4
BACTO AGAR	1	1	1	1	1	1	1
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	80 µL	120 µL	160 µL	200 µL	300 µL	400 µL	800 µL
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	80 µL	120 µL	160 µL	200 µL	300 µL	400 µL	800 µL
DEXTROSE	800 µL	1,2 ml	1,6 ml	2 ml	3 ml	4 ml	8 ml

ANNEXE II : Opérons *cup*

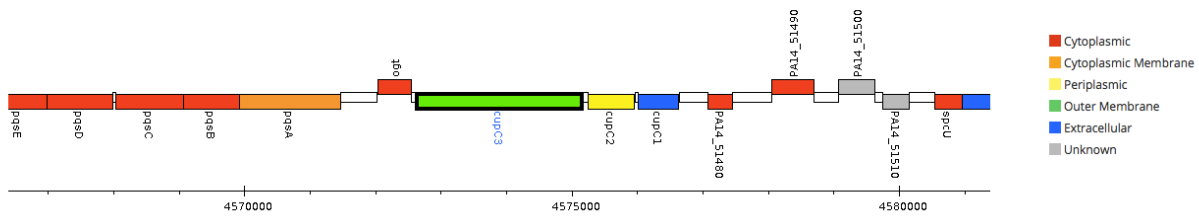
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, PA14_37030 (cupA3)



Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, PA14_11080 (cupB3)



Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, PA14_51450 (cupC3)



Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, PA14_59760 (cupD5)

