

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**IDENTIFICATION DES MÉCANISMES DE SUREXPRESSIION DU PETIT
ARN *RSMZ* LORSQUE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SE DÉVELOPPE
SUR UNE SURFACE**

Par
Charles Morin

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Examineur interne	Jonathan Perreault INRS – Centre Armand-Frappier
Examineur externe	Éric Massé Département de Biochimie Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	Eric Déziel INRS – Centre Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le professeur Eric Déziel, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir guidé durant ce projet de maîtrise. Tu as su trouver du temps parmi ton horaire chargé pour discuter et orienter mes travaux. Ton enthousiasme et ton ouverture font de toi un excellent directeur.

Merci aux membres du laboratoire Déziel. Votre soutien et votre bonne humeur créent une ambiance de travail fort agréable et accueillante. Un merci tout spécial à Marie-Christine pour les conseils trop nombreux pour être comptés. Je tiens à remercier également Sophie, Sarah, May et Audrey-Anne pour leur soutien moral et leur amitié.

Merci à ma famille pour leurs encouragements et un merci à ma copine avec qui j'ai partagé cette étape de ma vie.

RÉSUMÉ

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie retrouvée dans une vaste gamme de niches écologiques. Cette capacité à s'adapter et modifier son mode de vie lui est conférée par sa multitude de systèmes d'adaptation codés dans son génome. Parmi eux, plus de 60 senseurs kinases capables de détecter les stimuli environnementaux et d'activer divers régulateurs de réponse dans la cellule. Ces senseurs kinases et régulateurs de réponse constituent les systèmes à deux composantes (S2C). L'un de ces S2C est impliqué dans la voie de modulation du mode de vie de *P. aeruginosa*, le voie Gac/Rsm. En bref, le S2C GacS/GacA active la transcription des deux petits ARN non-codants (pARN) *RsmY* et *RsmZ*. À leur tour, ces pARN lient et séquestrent le régulateur global RsmA, le niveau de disponibilité de RsmA dictera alors quel mode de vie, motile ou sessile, la bactérie adoptera. De récents résultats obtenus dans le laboratoire Déziel ont mis en lumière une régulation de *RsmZ* indépendante du S2C GacSA : une surexpression de ce pARN observée seulement lorsqu'un double mutant $\Delta hptBgacA$ - est cultivée sur une surface versus en culture liquide (bactéries en suspension). Pour identifier les facteurs impliqués dans cette régulation, un criblage exploitant le transposon mini-Tn5 a été effectué. Plus de 20 gènes ont été identifiés comme ayant un potentiel effet régulateur sur la transcription de *rsmZ*. Des analyses subséquentes ont permis de montrer que la régulation surface-dépendante de *rsmZ* impliquerait la glycosyl transférase FgtA par un mécanisme toujours inconnu. De plus, le système de *quorum sensing* PQS serait impliqué dans la régulation de *RsmZ* via l'action de PqsE. Ce criblage a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes grâce auxquels *P. aeruginosa* module son pARN *RsmZ* pour s'adapter aux conditions environnantes.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa* ; Adaptation ; Régulation ; Criblage ; Voie Gac/Rsm ; *RsmZ*.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a versatile bacterium mainly studied as an important opportunistic human pathogen. It is characterized by its vast number of virulence factors, antibiotic resistance mechanisms and regulatory pathways encoded in its genome. One such system is the Gac/Rsm pathway, directed by the GacS/GacA two-component system. Following activation from the binding of a yet-unknown signal, the sensor kinase GacS activates the response regulator GacA, promoting the transcription of the small non-coding RNAs (sRNA) *RsmY* and *RsmZ*. Both sRNAs will bind to and sequester the global post-transcriptional regulator RsmA, which acts mainly as a translational repressor of mRNA involved in the adoption of a sessile lifestyle, such as biofilm formation. The Gac/Rsm pathway stands as the main player in the motile-to-sessile transition and plays a great role in the pathogenesis of *P. aeruginosa*. Previous results from our lab showed that a double $\Delta hptBgacA$ - mutant of *P. aeruginosa* PA14 overexpresses *RsmZ* specifically when grown on a surface, indicating the existence of a GacA-independent pathway that can induce surface-only expression of *RsmZ*. With the aim to identify unknown pathways capable of modulating *rsmZ* transcription, a screening using Tn5 transposon mutagenesis was conducted. Transposants were identified in multiple loci, but only an insertion in the glycosyl transferase *FgtA* affected *RsmZ* expression in a surface-dependent manner. Results suggest a complex multifactorial control of *RsmZ* and brings us closer to a better understanding of the surface adaptability of this important human pathogen.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Adaptation; Regulation; Screening; Gac/Rsm pathway; *RsmZ*.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT.....	VII
TABLE DES MATIÈRES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES ÉQUATIONS.....	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
1 REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	1
1.1.1 <i>Éléments génomiques</i>	1
1.1.2 <i>Un pathogène opportuniste</i>	2
1.1.3 <i>Une bactérie sociale</i>	3
1.1.4 <i>Les appendices cellulaires</i>	8
1.2 RÉGULATION GÉNIQUE.....	12
1.2.1 <i>Systèmes à deux composants</i>	12
1.2.2 <i>Facteurs sigma</i>	13
1.2.3 <i>Les petits ARN non codants</i>	15
1.2.4 <i>Les seconds messagers</i>	16
1.3 LA VOIE DE RÉGULATION GAC/RSM	17
1.3.1 <i>L'apex de la voie, le contrôle sur GacS</i>	18
1.3.2 <i>La face de la voie, l'intégration des signaux vers les pARN</i>	20
1.3.3 <i>La base de la voie, le niveau de titration de RsmA</i>	22
1.3.4 <i>Les acteurs oubliés</i>	22
1.4 D'AUTRES VOIES DE RÉGULATION	25
1.4.1 <i>La détection de surface</i>	25
1.4.2 <i>La répression catabolique CCR</i>	27
1.5 L'HISTIDINE PHOSPHOTRANSFÉRASE, HPTB.....	28
1.5.1 <i>Senseurs kinases interagissant avec HptB</i>	28

1.5.2	<i>Déficiences de swarming et contrôle surface-dépendant de RsmZ</i>	29
1.6	PROBLÉMATIQUE.....	31
1.6.1	<i>Hypothèse</i>	31
1.6.2	<i>Objectif</i>	31
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
2.1	BACTÉRIES ET CONDITIONS DE CULTURE.....	33
2.2	CONCEPTION DES AMORCES UTILISÉES.....	34
2.3	CONSTRUCTION DES SOUCHES MUTANTES ET COMPLÉMENTATIONS.....	35
2.4	CRIBLAGE PAR MUTAGÉNÈSE ALÉATOIRE AVEC LE TRANSPOSON MINI-TN5-KM	37
2.4.1	<i>Ajout du rapporteur P_{rsmZ}-lacZ dans le mutant PA14 $\Delta hptBgacA::MrT7$</i>	38
2.4.2	<i>Excision de la cassette de résistance du rapporteur</i>	38
2.4.3	<i>Transposition du mini-Tn5-Km</i>	39
2.4.4	<i>Culture et sélection des transposants</i>	40
2.4.5	<i>Évaluation qualitative et dosage de la β-galactosidase</i>	40
2.4.6	<i>Extraction d'ADN et amplification du site d'insertion du transposon</i>	44
2.4.7	<i>Identification du site d'insertion du transposon</i>	45
2.5	MOTILITÉ DE TYPE <i>SWARMING</i>	46
2.6	MOTILITÉ DE TYPE <i>SWIMMING</i>	46
2.7	EXTRACTION D'ARN ET RT-QPCR	47
2.8	DOSAGE B-GAL EN CINÉTIQUE	50
3	RÉSULTATS	51
3.1	CRIBLAGE PAR TRANSPOSITION ET GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA SUREXPRESSION DU PARN <i>RSMZ</i>	51
3.1.1	<i>Génération de la banque de transposants</i>	51
3.1.2	<i>Confirmation de l'expression de rsmZ par dosage de la β-gal en croissance sur une surface</i> <i>51</i>	
3.1.3	<i>Identification des gènes impliqués dans l'expression de rsmZ</i>	52
3.1.4	<i>Implication du génotype dans l'impact du transposon sur la transcription de RsmZ</i>	55
3.1.5	<i>Confirmation de l'impact des gènes dans le contrôle de RsmZ en conditions de culture</i> <i>planctonique</i>	57
3.1.6	<i>Confirmation de l'impact des gènes sur le contrôle de RsmZ et RsmY par RT-qPCR</i>	59
3.2	IMPORTANCE DE LA GLYCOSYLATION DU FLAGELLE POUR LA MOTILITÉ DE TYPE <i>SWARMING</i>	60

3.2.1	<i>Les mutants fgtA- présentent un phénotype de swarming particulier</i>	60
3.3	IMPORTANCE DU SYSTÈME DE <i>QUORUM SENSING</i> PQS DANS LA RÉGULATION DE <i>RsmZ</i>	62
3.3.1	<i>L'influence de la molécule PQS sur l'expression de RsmZ</i>	62
3.3.2	<i>L'expression en cis de PqsE complémente les mutants du criblage et favorise l'expression de RsmZ</i>	63
3.3.3	<i>L'impact de la délétion de pqsE dépend de la délétion de gacA</i>	64
3.3.4	<i>PqsE agit en parallèle avec GacA pour réguler rsmZ</i>	65
4	DISCUSSION	69
4.1	MISE EN PLACE DU CRIBLAGE	69
4.2	LA GLYCOSYL TRANSFÉRASE FGTA.....	70
4.3	LE RÉGULATEUR DE TRANSCRIPTION IHF.....	72
4.4	L'OPÉRON DE SYNTHÈSE DE PYOCINE (<i>PRT</i>).....	73
4.5	LE SYSTÈME DE <i>QUORUM SENSING</i> PQS	76
4.6	LES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE MÉTABOLISME	77
4.7	LES GÈNES LIÉS AU CONTRÔLE DE LA TRADUCTION	79
5	CONCLUSION	81
6	RÉFÉRENCES	83
7	ANNEXE I	99
8	ANNEXE II	103
9	ANNEXE III	107

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1 LISTE DES SOUCHES UTILISÉES DANS LE CADRE DE CETTE ÉTUDE.	33
TABLEAU 2.2 LISTE DES AMORCES UTILISÉES LORS DE CETTE ÉTUDE.....	34
TABLEAU 2.3 LISTE DES PLASMIDES UTILISÉS DURANT LE PROJET.	36
TABLEAU 3.1 GÈNES IDENTIFIÉS PAR LE CRIBLAGE CONSIDÉRÉS AYANT UN IMPACT SUR LA TRANSCRIPTION DE <i>rsmZ</i> DANS UNE SOUCHE $\Delta HPTBGACA::MRT7$	54
TABLEAU 7.1 TRANSPOSANTS OBTENUS GRÂCE AU CRIBLAGE	99
TABLEAU 9.1 LISTE COMPLÈTE DE TOUTES LES INSERTIONS DE TRANSPOSON IDENTIFIÉES.	107

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1.1 INTERCONNECTIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS SYSTÈMES DE <i>QUORUM SENSING</i> CHEZ <i>P. AERUGINOSA</i>	5
FIGURE 1.1.2 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU CYCLE DE FORMATION DE BIOFILM.....	6
FIGURE 1.1.3 APPARENCE DE LA MOTILITÉ DE TYPE <i>SWARMING</i> DE <i>P. AERUGINOSA</i> PA14.....	8
FIGURE 1.1.4 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'ASSEMBLAGE DU FLAGELLE.....	9
FIGURE 1.1.5 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU COMPLEXE DU PILUS DE TYPE IV.....	10
FIGURE 1.1.6 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES COMPLEXES DU SST3 (A) ET DU SST6 (B).....	11
FIGURE 1.2.1 REPRÉSENTATION DES STRUCTURES DES TROIS FAMILLES DE SENSEURS KINASES.	13
FIGURE 1.3.1 IMPLICATION DES SENSEURS KINASES PRINCIPAUX IMPLIQUÉS LORS DE LA TRANSDUCTION DES SIGNAUX VERS GACA.....	20
FIGURE 1.3.2 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA VOIE GAC/RSM ET DES PRINCIPALES VOIES CONVERGENTES, CONSTITUANT LA VOIE DE RÉGULATION DE L'ALTERNANCE EN UN MODE DE VIE MOTILE OU SESSILE.....	24
FIGURE 1.4.1 TRANSDUCTION DU SIGNAL DES PILI DE TYPE IV VERS LE COMPLEXE PIL-CHP.....	26
FIGURE 1.4.2 STRUCTURE DU COMPLEXE WSP.....	27
FIGURE 1.5.1 <i>SWARMING</i> DU MUTANT $\Delta HPTB$ ET COMPLÉMENTATION DU DÉFAUT PAR LA DÉLÉTION DE <i>RSMY</i> ET <i>RSMZ</i>	29
FIGURE 1.5.2 DIFFÉRENCE D'EXPRESSION DES PARN <i>RSMY</i> ET <i>RSMZ</i> SELON LES CONDITIONS DE CULTURE.....	30
FIGURE 2.4.1 SCHÉMA DE LA MÉTHODOLOGIE DU CRIBLAGE $Tn5::KM$	37
FIGURE 2.4.2 CALCUL DU FACTEUR DE CORRECTION 1.....	43
FIGURE 2.4.3 CALCUL DU FACTEUR DE CORRECTION 2.....	43
FIGURE 2.4.4 CALCUL DU FACTEUR DE CORRECTION 3.....	44
FIGURE 3.1.1 DOSAGE B-GAL AVEC LE RAPPORTEUR TRANSCRIPTIONNEL $P_{RSMZ-LACZ}$ CHEZ LES PRINCIPAUX TRANSPOSANTS EN CULTURE SUR GÉLOSE M9DCAA SOLIDE (1,5% AGAR).....	56
FIGURE 3.1.2 DOSAGE DE L'ENZYME B-GALACTOSIDASE PRODUITE PAR LE RAPPORTEUR TRANSCRIPTIONNEL $P_{RSMZ-LACZ}$ CHEZ LES SIMPLES MUTANTS CORRESPONDANTS AUX PRINCIPAUX TRANSPOSANTS EN CULTURE SUR MILIEU GÉLOSÉ SOLIDE (1,5% AGAR).....	57
FIGURE 3.1.3 DOSAGE DE L'ENZYME B-GALACTOSIDASE PRODUITE PAR LE RAPPORTEUR TRANSCRIPTIONNEL $P_{RSMZ-LACZ}$ CHEZ LES PRINCIPAUX TRANSPOSANTS EN CULTURE LIQUIDE.....	58
FIGURE 3.1.4 EXPRESSION RELATIVE DE SOUCHES ISSUES DU CRIBLAGE PAR RT-QPCR.....	60

FIGURE 3.2.1 MOTILITÉ DE TYPE <i>SWARMING</i> DES MUTANTS <i>FGTA</i> - CHEZ LE GÉNOTYPE SAUVAGE ET $\Delta HPTBGACA::MRT7$ AINSI QUE LES SOUCHES DE RÉFÉRENCES.....	61
FIGURE 3.2.2 COMPARATIF DE LA MOTILITÉ DE TYPE <i>SWIMMING</i> DES SOUCHES <i>FGTA</i> + ET <i>FGTA</i> -.....	62
FIGURE 3.3.1 IMPACT SUR LA TRANSCRIPTION DE <i>RSMZ</i> D'UN AJOUT DE 10PPM PQS.....	63
FIGURE 3.3.2 IMPACT SUR LA TRANSCRIPTION DE <i>RSMZ</i> DE LA SUREXPRESSON DE <i>PQSE</i> ,	64
FIGURE 3.3.3 ACTIVITÉ B-GAL REPRÉSENTANT LE NIVEAU DE TRANSCRIPTION DE <i>RSMZ</i> EN CONDITION DE CULTURE PLANCTONIQUE POUR LES SIMPLES DOUBLES MUTANTS $\Delta PQSE$, $\Delta GACA$ ET $\Delta HPTB$	65
FIGURE 3.3.4 CINÉTIQUE DE TRANSCRIPTION DE <i>RSMZ</i> POUR DES MUTANTS $\Delta GACA$ ET/OU $\Delta PQSE$	66
FIGURE 3.3.5 CINÉTIQUE DE CROISSANCE DES MUTANTS $\Delta GACA$ ET/OU $\Delta PQSE$ LORS DU DOSAGE B-GAL.....	67
FIGURE 4.4.1 ORGANISATION DE L'OPÉRON <i>PRT</i> ET DE LA STRUCTURE DE LA PYOCINE DE TYPE R.	75

LISTE DES ÉQUATIONS

ÉQUATION 2.4.1 FORMULE ORIGINALE POUR LE CALCUL DE L'ACTIVITÉ B-GAL.	41
ÉQUATION 2.4.2 FORMULE DE MILLER ADAPTÉE POUR LA MESURE DE L'ACTIVITÉ B-GAL EN PLAQUE 96- PUITS.....	42
ÉQUATION 2.7.1 FORMULE D'EXPRESSION RELATIVE PAR ANALYSE RT-QPCR	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-oxo-C ₁₂ -HSL	3-oxododecanoyl-homosérine lactone
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHL	Acyl-homosérine lactone
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
C ₄ -HSL	Butyryl-homosérine lactone
CCR	<i>Carbon catabolite repression</i>
DAP	Acide Diamino Pimélique
DGC	Diguanylate cyclase
di-GMPc	Di-guanosine monophosphate cyclique
DO	Densité optique
ECF	<i>Extracytoplasmic function</i>
HAA	Acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoïque
HCN	Cyanure d'hydrogène
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
H-NS	<i>Histone-like Nucleoid Structuring</i>
HPT	<i>Histidine phosphotransférase</i>
HSL	Homosérine lactone
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M9DCAA	Milieu M9 supplémenté en Dextrose et Acides Casaminés
ME	Membrane externe
MI	Membrane interne
Mpb	Millions de paires de bases
MrT7	Transposon MAR2xT7
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
nPCR	PCR niché
ONP	Ortho-nitrophénol
ONPG	Ortho-nitrophényl-β-D-galactopyrannoside
PAPI	<i>Pseudomonas aeruginosa Pathogenicity Island</i>
pARN	Petit ARN non-codant
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Réaction de polymérase en chaîne
PDE	Phosphodiesterase
PG	Peptidoglycane
PQS	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i> , 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline

PT4	Pilus de type 4
qPCR	PCR quantitatif
QS	<i>Quorum sensing</i>
RBS	<i>Ribosome binding site</i> , site de fixation du ribosome
RF	<i>Release factor</i> , facteur de relâchement
RT-PCR	PCR couplé à la transcription inverse
S2C	Système à deux composantes
SST2	Système de sécrétion de type 2
SST3	Système de sécrétion de type 3
SST6	Système de sécrétion de type 6
TCA (cycle)	<i>Tricarboxylic acid</i> (cycle), cycle de l'acide citrique
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> , région non traduite
VM	Vésicule membranaire
WT	<i>Wild type</i> , type sauvage
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
β-Gal	Bêta-galactosidase

1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram-négatif de la classe des gamma-protéobactéries. Comme les autres membres du genre *Pseudomonas*, elle se caractérise par une très forte présence dans un nombre varié de niches écologiques ; elle est retrouvée tant dans l'eau que dans les sols, ainsi que dans les installations humaines telles les canalisations d'eau courante (Bedard *et al.*, 2016; Mena & Gerba, 2009). Cette espèce bactérienne est également un pathogène opportuniste d'importance qui utilise sa grande capacité d'adaptation pour coloniser son hôte.

1.1.1 Eléments génomiques

Pseudomonas aeruginosa possède un génome plutôt grand pour une bactérie, avec plus de 6 millions de paires de bases (Mpb) (Stover *et al.*, 2000). Le génome de base (*core genome*) de *P. aeruginosa* est de 665 gènes, soit 1% de son pangénome — l'ensemble de tous les gènes retrouvés chez cette espèce (Freschi *et al.*, 2019). Dans ce génome se trouve des gènes permettant l'utilisation d'une panoplie de sources de carbone, l'expression d'une multitude de facteurs de virulence, de mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens et de voies de régulation (Stover *et al.*, 2000; Valot *et al.*, 2015). Etant retrouvés dans le génome de quasiment toutes les souches de l'espèce, autant environnementales que cliniques, ces éléments contribuent à l'adaptabilité de *P. aeruginosa* et sa dominance des diverses niches écologiques qu'elle peut coloniser.

Certains de ces facteurs de virulence et mécanismes de survie sont restreints à quelques souches de *P. aeruginosa*, localisés généralement sous forme de groupes et formant le génome accessoire. C'est le cas de certains gènes retrouvés chez la souche de référence PA14, originalement isolée de la peau d'un grand brûlé et possédant un génome légèrement plus grand que l'autre souche de référence PAO1 (Lee *et al.*, 2006a; Stover *et al.*, 2000). PA14 possède des traits de virulence supplémentaires comme les îlots de pathogénicité (PAPI, *Pseudomonas*

aeruginosa Pathogenicity Island) I et II retrouvés entre autres dans le génome de *P. aeruginosa* PA14, mais absents chez PAO1 (He *et al.*, 2004). Ces îlots influenceront le comportement de PA14, principalement son pouvoir pathogène et sa compétitivité dans une niche écologique, en codant pour des facteurs de virulence supplémentaires (Ferrara *et al.*, 2017; He *et al.*, 2004; Mikkelsen *et al.*, 2009).

1.1.2 Un pathogène opportuniste

La grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* lui permet de s'épanouir dans un grand répertoire d'environnements. Malheureusement pour nous, cette bactérie est un pathogène opportuniste capable de coloniser le corps de divers animaux, dont l'humain (Gellatly & Hancock, 2013). Les personnes avec des défenses immunitaires affaiblies, dont les personnes immunodéficientes, grands brûlés et les patients ayant subi une opération chirurgicale, sont particulièrement à risques de développer une infection par *P. aeruginosa* (Gellatly & Hancock, 2013). Ce pathogène est d'autant plus redoutable à cause de sa grande résistance aux agents antimicrobiens, rendant les infections causées par *P. aeruginosa* souvent difficiles à traiter. La grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* joue également un rôle très important dans sa pathogénicité (Moradali *et al.*, 2017; Valentini *et al.*, 2018). En effet, selon les conditions de la région colonisée par *P. aeruginosa*, cette dernière adaptera son mode de vie pour survivre de façon optimale aux détriments de son hôte. En adoptant un mode de vie motile, *P. aeruginosa* activera ses appendices de locomotion pour mieux envahir son environnement et exprimera plusieurs facteurs de virulence, causant ainsi des infections aiguës. D'autres part, en adoptant un mode de vie sessile, *P. aeruginosa* formera des communautés bactériennes complexes appelées biofilms. Dans cet état, *P. aeruginosa* est particulièrement résistant aux conditions adverses, incluant les défenses immunitaires de l'hôte et les traitements antibiotiques, et cause ainsi des infections chroniques très difficiles à traiter (Lee & Yoon, 2017; Mulcahy *et al.*, 2014). *P. aeruginosa* est très connu pour être l'un des microorganismes principaux responsables du haut taux de morbidité et de mortalité des personnes atteintes de la fibrose kystique. Cette maladie héréditaire provoque une altération du tissu épithélial des poumons et une surproduction de mucus. Ces conditions particulières sont très favorables à une colonisation par *P. aeruginosa* et la mise en place d'une infection chronique (Malhotra *et al.*, 2019).

1.1.3 Une bactérie sociale

P. aeruginosa adopte une panoplie de comportements sociaux différents, ce qui fait de cette bactérie un modèle d'étude parfait en sociomicrobiologie. Le comportement le plus étudié est le biofilm, où les bactéries de la communauté s'associent en sécrétant une matrice exopolymérique pour former une colonie solidement ancrée à une surface. Un autre comportement social, la motilité de type *swarming*, requiert la coordination des membres de la colonie pour se déplacer à grande vitesse sur une surface.

1.1.3.1 Le quorum sensing

La principale méthode que les bactéries ont acquise pour coordonner une action au niveau d'une population entière est le *quorum sensing* (QS). Chez les bactéries à Gram-négatif, le QS est souvent possible grâce à la synthèse d'une molécule signal de la famille des acyl-homosérine lactones (AHL) par une synthase de type LuxI. Une AHL est un composé diffusible qui se propage et s'accumule dans le milieu pour atteindre les cellules environnantes (Lee & Zhang, 2015). Une fois dans le cytoplasme, elle lie un régulateur transcriptionnel de type LuxR ; le complexe AHL-LuxR forme alors un homodimère avec un autre complexe. Cette forme homodimérique est active et agit sur la transcription de plusieurs gènes cibles. Les gènes régulés par le QS codent généralement pour des facteurs de virulence, des sidérophores et d'autres biens publics — métabolites qui profiteront à l'ensemble de la population bactérienne (Lee & Zhang, 2015). Généralement, le récepteur LuxR couplé à sa molécule signal active la transcription de sa synthase LuxI correspondante, permettant d'induire une boucle de rétroaction positive. Ainsi, au fur et à mesure que la densité cellulaire augmente, la production de la molécule signal et sa concentration dans le milieu et dans les cellules augmentera jusqu'à atteindre la concentration critique qui active la transcription des gènes ciblés par LuxR. Chez *P. aeruginosa*, il existe trois systèmes de *quorum sensing* connus (Lee & Zhang, 2015). Le système Las exploite l'AHL 3-oxododecanoyl-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL), le système Rhl utilise le butyryl-homosérine lactone (C₄-HSL). N'utilisant pas une AHL classique, le troisième système utilise le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) synthétisé par l'opéron *pqsABCDE* et le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (PQS, *Pseudomonas Quinolone Signal*), produit à partir de HHQ par l'enzyme PqsH (Déziel *et al.*, 2004). Ces trois systèmes de *quorum sensing* forment un réseau très hiérarchisé, l'un activant ou réprimant l'activité des autres,

formant ainsi un cycle de régulation complexe qui permet d'exercer un contrôle très précis sur les gènes régulés par le QS (Lee & Zhang, 2015). Il existe également un troisième récepteur de type LuxR chez *P. aeruginosa*. Ce dernier, nommé QscR, est orphelin — il ne fait pas parti d'un couple synthase-récepteur — mais peut tout de même lier des AHL à longue chaîne (10 à 14 carbones) incluant le 3-oxo-C₁₂-HSL (Figure 1.1.1) (Chugani *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006b).

Le premier système de QS à être généralement activé est le système Las, se situant au sommet de la hiérarchie des systèmes de QS. Une fois la concentration de 3-oxo-C₁₂-HSL dans les cellules suffisante, LasR pourra activer l'expression de plusieurs gènes dont *rhII*, *rhlR*, *lasI*, *rsaL*, *mvfR* (*pqsR*), *pqsH* (Schuster *et al.*, 2003). L'expression de *rhII/rhlR* et de *mvfR* induit les systèmes Rhl et PQS, respectivement (Lee & Zhang, 2015). L'expression de *lasI* favorise la mise en place de la boucle de rétroactivation du système Las alors que l'expression de *rsaL*, un répresseur de l'expression de *lasI*, freine cette rétroactivation pour empêcher une suraccumulation de 3-oxo-C₁₂-HSL (Figure 1.1.1) (Rampioni *et al.*, 2006).

Le système Rhl, une fois actif, active l'expression de ses cibles et réprime la transcription de *mvfR* et l'opéron *pqsABCDE* (Brouwer *et al.*, 2014). Les deux systèmes Rhl et PQS ont une grande importance dans la modulation fine de l'expression de plusieurs facteurs de virulence extracellulaires, dont les rhamnolipides, les phénazines (incluant la pyocyanine) et le cyanure d'hydrogène (HCN) (Maura *et al.*, 2016).

En plus de la hiérarchisation complexe des systèmes de QS, ceux-ci sont influencés par des facteurs externes qui modulent plus finement l'expression des cibles de chacun des récepteurs du QS. C'est le cas du contrôle de RhII par la protéase Lon, régulée par le complexe Crc-Hfq (Yang *et al.*, 2015). La protéine Crc est le répresseur traductionnel impliqué dans la voie de la répression catabolique du carbone (Sonnleitner *et al.*, 2018). Cette voie sert à réguler les fonctions métaboliques impliquées dans l'utilisation de diverses sources de carbone. Crc s'associe avec la chaperonne à ARN Hfq pour lier ses ARNm cibles et réprimer leur traduction (Sonnleitner *et al.*, 2018). Une de ces cibles est l'ARNm de la protéase Lon, qui une fois traduite est capable de dégrader la synthase RhII. Via ce mécanisme, le contrôle du métabolisme primaire est capable d'influencer la régulation du QS (Yang *et al.*, 2015). D'autres études ont mis en lumière des liens existants entre la régulation du *quorum sensing* et les cibles du régulateur Anr, impliqué dans la réponse aux conditions d'anoxie. De plus la régulation par les seconds

messagers (via l'action de la protéine Vfr, voir section 1.2.4) et la voie Gac/Rsm est liée à la régulation des gènes par le QS (Albus *et al.*, 1997; Croda-Garcia *et al.*, 2011; Lin Chua *et al.*, 2017; Pessi *et al.*, 2001).

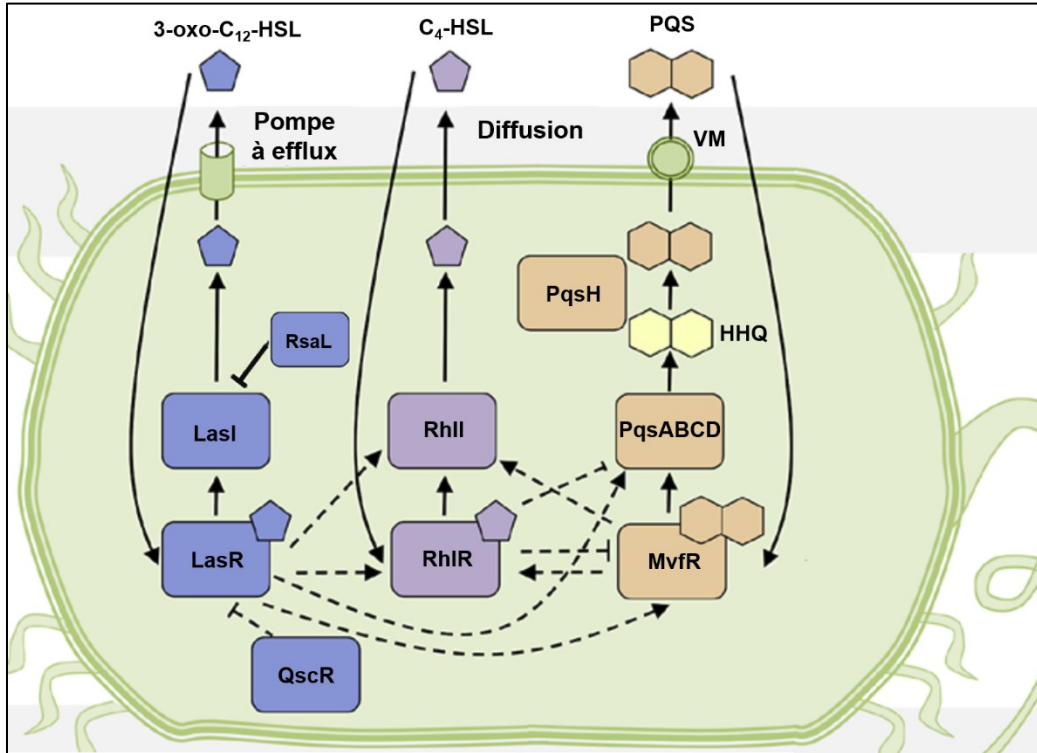


Figure 1.1.1 Interconnexions entre les différents systèmes de quorum sensing chez *P. aeruginosa*.

Les systèmes Las/Rhl/PQS influencent leurs niveaux d'actions entre eux. Les traits pleins indiquent une action directe, les traits pointillés une action indirecte. Les têtes de flèche pointues signifient une action positive, les têtes plates signifient une action négative. VM : Vésicule membranaire. Image adaptée de (Turkina & Vikstrom, 2019)

1.1.3.2 Le biofilm

Un biofilm est formé alors qu'une bactérie s'attache de façon irréversible sur une surface et commence à se multiplier sur cette surface (Fazli *et al.*, 2014). Les cellules immobiles commencent à sécréter une matrice exopolymérique constituée principalement d'exopolysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire (ADNe) (Fazli *et al.*, 2014; Jackson *et al.*, 2004; Vasseur *et al.*, 2005). Alors que le biofilm est en maturation, l'accumulation de cette matrice confère une structure complexe à la population, formant des macrocolonies. Les cellules qui forment ce biofilm de façon active ont adopté un mode de vie dit sessile (Moradali *et al.*, 2017).

La formation de biofilm se fait généralement en suivant une série d'étape (Figure 1.1.2). Tout d'abord, les bactéries planctoniques libres dans le milieu entrent en contact avec une surface via l'adhésion de leur flagelle et de leurs fibrilles polaires. Cet attachement initial est réversible et requiert que la bactérie fasse le choix, via l'intégration de divers signaux par ses systèmes de régulation, de commencer sa vie sur une surface (Lee *et al.*, 2018). Dans ce cas, la bactérie bascule en position parallèle à la surface et commence à produire sa matrice exopolymérique et à se diviser. Au fur et à mesure que le biofilm mature, la population bactérienne formera des structures de plus en plus complexes. Ces structures ont comme rôle de faciliter la distribution des nutriments au sein du biofilm. Suite à la détection de divers signaux, tel l'oxide nitrique (NO) ou des conditions nutritionnelles défavorables, certains membres de la communauté se libèrent du biofilm pour retourner à un style de vie planctonique jusqu'à leur contact avec une nouvelle surface (Kim & Lee, 2016).

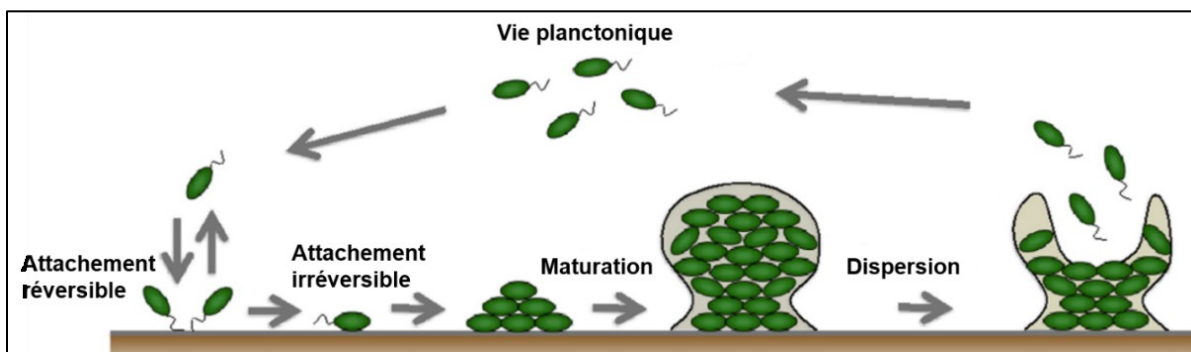


Figure 1.1.2 Représentation schématique du cycle de formation de biofilm.

Image adaptée de (Toyofuku *et al.*, 2016).

1.1.3.3 La motilité de type *swarming*

La formation de biofilm n'est pas le seul comportement social adopté par *P. aeruginosa*. Cette bactérie est également capable de se mouvoir sur une surface en coordonnant son effort avec les autres membres de sa communauté (Figure 1.1.3). Cette motilité appelée *swarming* requiert un flagelle fonctionnel comme appendice locomoteur et la production d'un agent mouillant pour réduire la tension de surface (Kearns, 2010; Kohler *et al.*, 2000). Cet agent mouillant produit par *P. aeruginosa* est un glycolipide amphiphile composée de chaînes aliphatiques et d'un ou deux rhamnoses (mono-rhamnolipides ou di-rhamnolipides, respectivement) (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Le précurseur des rhamnolipides, l'acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoïque (HAA)

agit également comme surfactant pour permettre le *swarming* (Déziel *et al.*, 2003). La synthèse de ces surfactants se fait grâce à une série de trois enzymes (RhlA, RhlB et RhlC) qui agissent l'une après l'autre pour convertir les HAA produits par RhlA en mono-rhamnolipides par RhlB, puis en di-rhamnolipides par RhlC (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Les trois gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* sont régulés par le système de QS Rhl (Wang *et al.*, 2014b).

L'apparence de la motilité de type *swarming* diffère beaucoup d'une espèce bactérienne, voire d'une souche à l'autre. Le patron de *swarming* de la souche PA14 de *P. aeruginosa* se caractérise par la formation de dendrites qui progressent rapidement sur la surface de l'agar (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay & Deziel, 2008). Cette formation de dendrites est dictée par les ratios HAA/rhamnolipides sécrétés par *P. aeruginosa*, les HAA agissant comme répulsifs et les di-rhamnolipides agissant comme attracteurs (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* requiert un milieu semi-solide à 0.5% d'agar et une balance de nutriments idéale pour bien effectuer son *swarming* (Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000; Tremblay & Deziel, 2008).

En plus de la motilité de type *swarming*, *P. aeruginosa* peut effectuer d'autres types de déplacement. Le *swimming* est un déplacement individuel effectué dans un milieu liquide ou visqueux (jusqu'à 0,3% d'agar) qui requiert seulement un flagelle fonctionnel (Vater *et al.*, 2014). Le *twitching* est une motilité impliquant un autre appendice que le flagelle, le pilus de type IV, capable de s'effectuer sur une surface très dure comme le polystyrène (Beatson *et al.*, 2002b; Déziel *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2016; Turnbull & Whitchurch, 2014). Le *sliding* est une motilité dite passive qui est possible grâce à l'empilement successif de bactérie au sein d'une colonie qui poussent les autres membres (Murray & Kazmierczak, 2008). Plus récemment, une motilité de surface flagelle-dépendante appelée *surfing* a été observée chez *P. aeruginosa* en croissance sur un milieu supplémenté en mucine. Cette motilité similaire au *swarming* a été observée chez un mutant incapable de produire des rhamnolipides et à des concentrations d'agar plus élevées que le *swarming* (Yeung *et al.*, 2012).

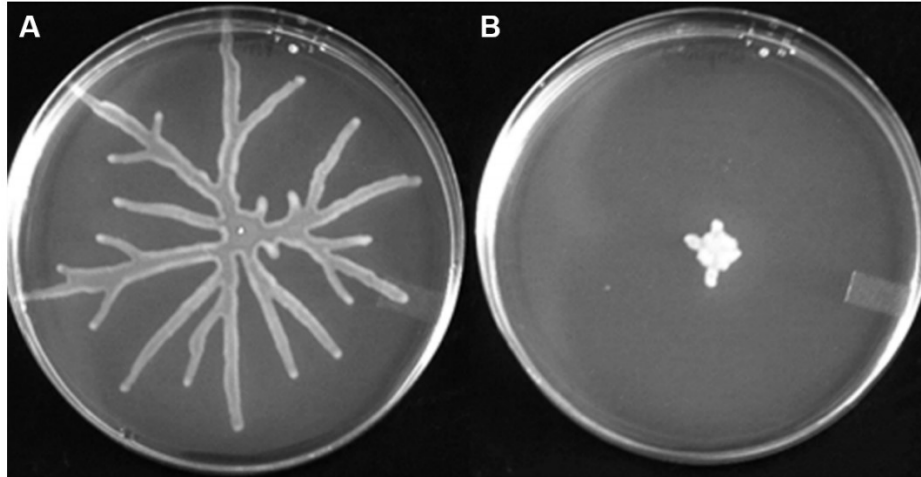


Figure 1.1.3 Apparence de la motilité de type *swarming* de *P. aeruginosa* PA14.

(A) Patron d'une colonie *swarming* de la souche sauvage, avec sa forme dendritique caractéristique. (B) Patron d'une colonie d'un mutant $\Delta hptB$, avec une déficience en *swarming*. Image adaptée de (Jean-Pierre *et al.*, 2016).

1.1.4 Les appendices cellulaires

P. aeruginosa a développé des structures protéiques présentes à la surface de sa cellule qui lui permettent d'interagir avec son environnement, incluant les autres organismes.

1.1.4.1 Le flagelle

Le flagelle est une structure protéique complexe dont le rôle principal est de transformer l'énergie de la bactérie en une force locomotrice capable de propulser la bactérie dans son milieu. Le flagelle est constitué de trois composantes principales, chacune formée de plusieurs protéines (Figure 1.1.4) (Belas, 2014). La fibre flagellaire est la partie externe du flagelle qui compose la queue. Cette fibre est un polymère constitué de plusieurs sous-unités de flagelline. Chez la souche PA14 de *P. aeruginosa*, c'est une flagelline de type b qui compose le flagelle, codée par le gène *fliC* (Spangenberg *et al.*, 1996). Le corps basal est formé d'un agencement de plusieurs protéines différentes servant à l'ancrage aux deux membranes de la bactérie, à la sécrétion de la fibre flagellaire et la production de la force de rotation du flagelle par le moteur (Belas, 2014). Ce moteur est composé d'un rotor et d'un stator. La fibre flagellaire est connectée au corps basal par une protéine crochet, qui transmet la force locomotrice et dicte l'orientation de la fibre flagellaire (Belas, 2014). *P. aeruginosa* possède un seul flagelle polaire et à la capacité

d'exprimer deux stators différents, les couples de protéines MotAB et MotCD (Kazmierczak *et al.*, 2015; Kuchma *et al.*, 2015; Toutain *et al.*, 2005). Alors que les deux stators ont la capacité de propulser la bactérie dans un liquide lors du *swimming*, seul le stator MotCD est capable de fournir une force suffisante pour propulser *P. aeruginosa* lors de son *swarming* (Kuchma *et al.*, 2015).

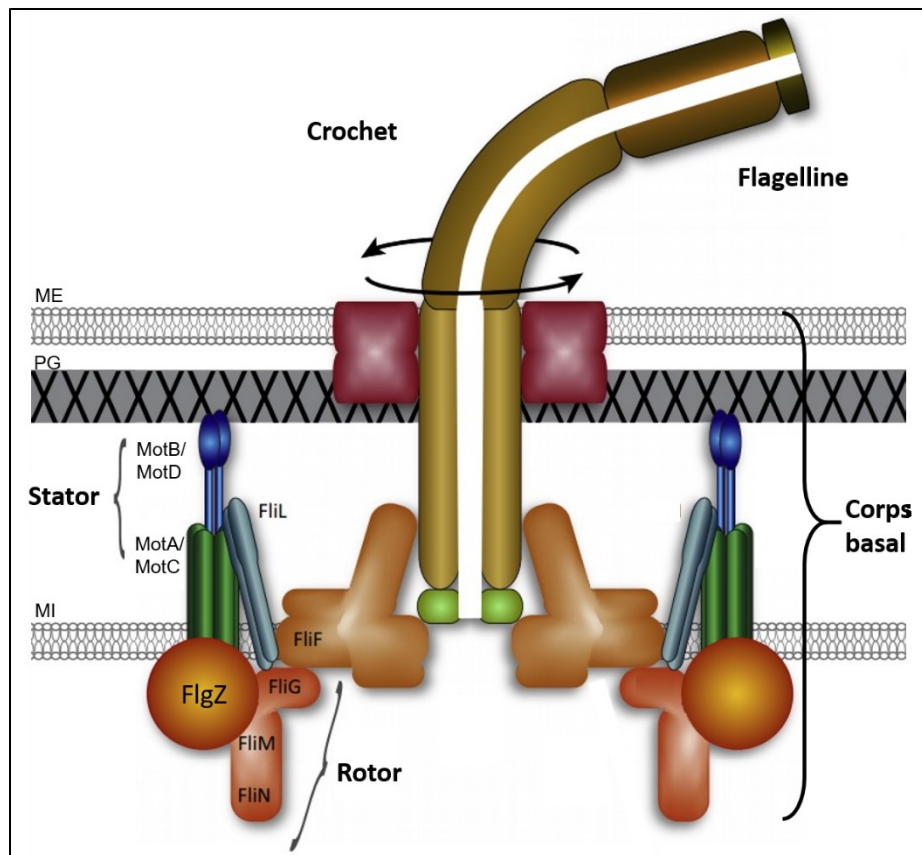


Figure 1.1.4 Représentation schématique de l'assemblage du flagelle.

Le stator (MotAB ou MotCD) et le rotor (FliG, FliM, FliN) s'assemblent avec d'autres protéines pour former le corps basal. La protéine crochet et les unités de flagellines forment la fibre flagellaire. La protéine FlgZ agit comme un frein au niveau du complexe Stator/Rotor pour contrôler l'activité du flagelle. ME : Membrane externe, PG : Peptidoglycane, MI : Membrane interne. Image adaptée de (Belas, 2014).

1.1.4.2 Les pili de type IV

Le pilus de type IV (PT4) est un autre complexe protéique impliqué dans la locomotion et le comportement de surface de *P. aeruginosa* (Brill-Karniely *et al.*, 2017; Mattick, 2002; O'Toole & Wong, 2016). Le complexe permet l'élongation et la rétraction de la fibre du pilus, générant une force très élevée capable de provoquer le déplacement de la bactérie ou d'attirer vers la

cellule une molécule ancrée au pilus (Figure 1.1.5) (Ellison *et al.*, 2018; Maier *et al.*, 2002; van Schaik *et al.*, 2005). Une adhésine située au sommet de la fibre du pilus est responsable de la forte adhésion à une surface organique ou inorganique (Beaussart *et al.*, 2014; Touhami *et al.*, 2006). Ces pili sont localisés en multiples copies aux pôles de la cellule lorsqu'ils sont exprimés (Cowles *et al.*, 2013; Mattick, 2002).

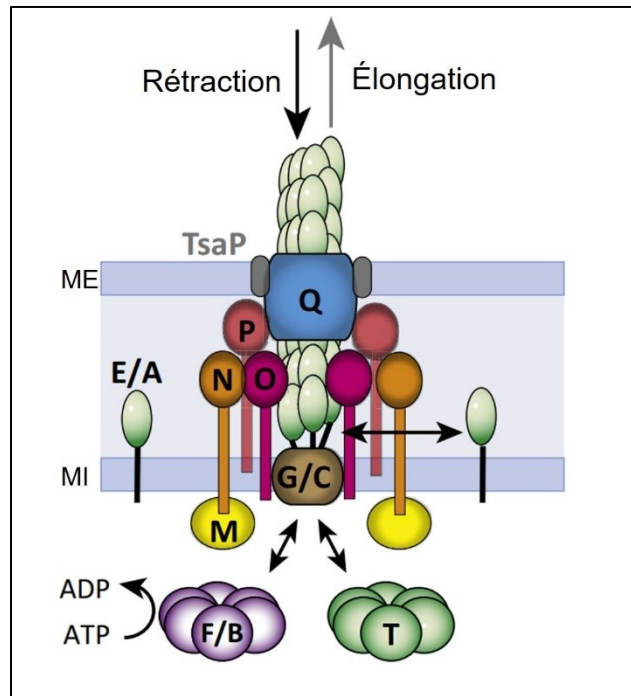


Figure 1.1.5 Représentation schématique du complexe du pilus de type IV.

ME : Membrane externe. MI : Membrane interne. Image adaptée de (Maier & Wong, 2015).

1.1.4.3 Les systèmes de sécrétion

P. aeruginosa possède plusieurs systèmes permettant la sécrétion des protéines extracytoplasmiques, incluant ses divers effecteurs toxiques (Figure 1.1.6 A). Le système de sécrétion de type III (SST3) est un appareil protéique semblable à une aiguille capable «d'injecter» des effecteurs cytotoxiques directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes de l'hôte que *P. aeruginosa* infecte (Galle *et al.*, 2012). Ces effecteurs, les exotoxines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY, sont capables de perturber les fonctions de signalisation causant une perturbation du cytosquelette et/ou la mort des cellules eucaryotes affectées par apoptose ou lyse (Galle *et al.*, 2012).

Le système de sécrétion de type VI (SST6) est un complexe protéique d'apparence similaire à une queue de phage (Figure 1.1.6 B) (Chen *et al.*, 2015). Il existe trois différents loci permettant la synthèse du SST6 chez *P. aeruginosa* nommés HSI-I produisant le H1-SST6, HSI-II produisant le H2-SST6 et HSI-III produisant le H3-SST6. Ces systèmes ont des cibles légèrement différentes l'un de l'autre. Le H1-SST6 est principalement impliqués dans la compétition avec les autres bactéries du milieu, alors que les systèmes H2 et H3 cibles les eucaryotes (Sana *et al.*, 2016). *P. aeruginosa* possède d'autres systèmes de sécrétion, comme le type II (SST2) similaire en structure aux pili de type IV (Ball *et al.*, 2002; Filloux, 2011).

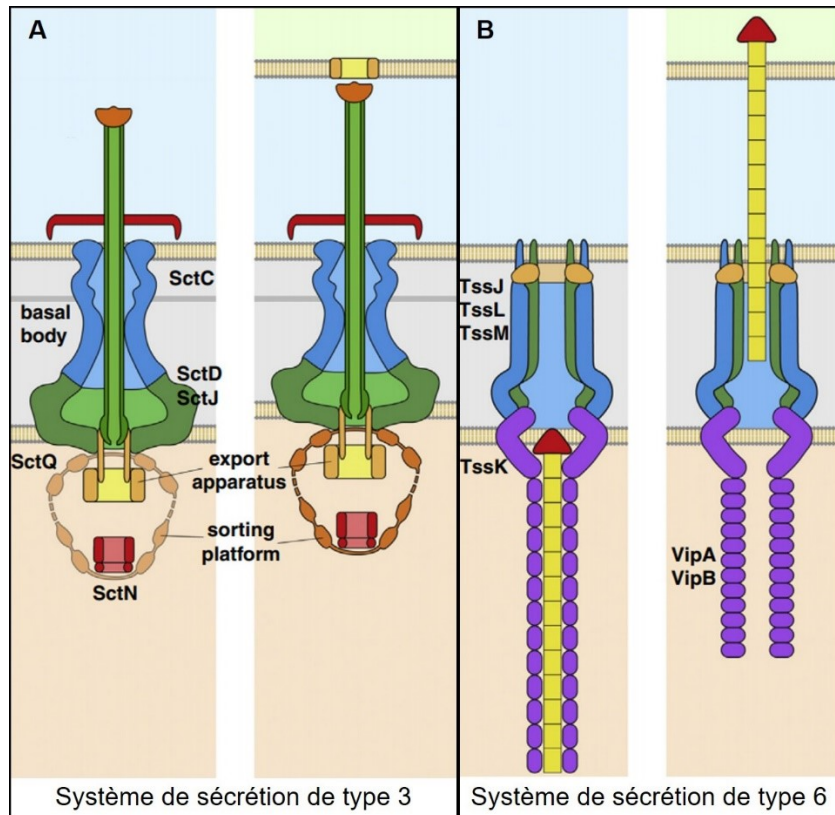


Figure 1.1.6 Représentation schématique des complexes du SST3 (A) et du SST6 (B).

Image adaptée de (Gold & Kudryashev, 2016)

1.2 Régulation génique

Pour se développer de façon optimale dans leur niche écologique, les bactéries régulent de façon précise l'expression de leurs gènes. C'est d'autant plus vrai pour *P. aeruginosa*, qui alloue près de 10% de son génome — d'une grande taille comparativement à d'autres bactéries — à des gènes de régulation (Stover *et al.*, 2000). Cette section révisé la majorité des mécanismes généraux de régulation des gènes.

1.2.1 Systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants (S2C) sont de manière générale constitués de deux éléments : un senseur histidine kinase et un régulateur de réponse (Mikkelsen *et al.*, 2011b; Rodrigue *et al.*, 2000). À la suite de la détection d'un signal particulier, le senseur kinase se dimérise ; cette étape permet la transphosphorylation du senseur kinase et le transfert d'un groupement phosphate vers le régulateur de réponse. Ce dernier s'active à la suite de la phosphorylation et agit dans la cellule comme effecteur pour induire une réponse face au signal détecté (Rodrigue *et al.*, 2000). Ces fonctions effectrices sont variées et dépendent du régulateur de réponse, allant des régulateurs transcriptionnels comme GacA (Brencic *et al.*, 2009) aux modulateurs de la concentration de seconds messagers comme la diguanylate cyclase PvrR (Mikkelsen *et al.*, 2009). Les voies de transduction de signal des S2C sont beaucoup plus simples que celles retrouvées chez les cellules eucaryotes, malgré tout un niveau de complexité accru semble se dessiner alors que les connaissances sur le fonctionnement des S2C se précisent (Rodrigue *et al.*, 2000). Les senseurs kinases connus sont classés parmi trois familles selon les domaines qu'ils possèdent (Figure 1.2.1) (Mikkelsen *et al.*, 2011b). Les senseurs classiques possèdent la structure la plus simple des trois et sont les plus répandus. Les senseurs non-orthodoxes possèdent deux domaines supplémentaires servant au transfert du groupement phosphate : un domaine receveur et un domaine histidine phosphotransférase (HPT). Ces domaines additionnels jouent un rôle important dans la convergence/divergence des signaux entre plusieurs senseurs kinases (Rodrigue *et al.*, 2000). Les senseurs hybrides ont eux aussi un domaine receveur supplémentaire, sans le domaine HPT retrouvé chez les non-orthodoxe. Cette fonction de domaine HPT est alors prise en charge par des protéines indépendantes, les protéines Hpt (Rodrigue *et al.*, 2000). Il existe trois protéines Hpt codées par le génome de *P. aeruginosa*,

HptA et HptC sont très peu connues et étudiées, mais aurait la capacité de réguler quelques fonctions liées à la virulence (Francis *et al.*, 2017; Rodrigue *et al.*, 2000). La protéine HptB est beaucoup plus connue que les deux autres à cause de son implication dans la voie Gac/Rsm (Bordi *et al.*, 2010; Jean-Pierre *et al.*, 2016).

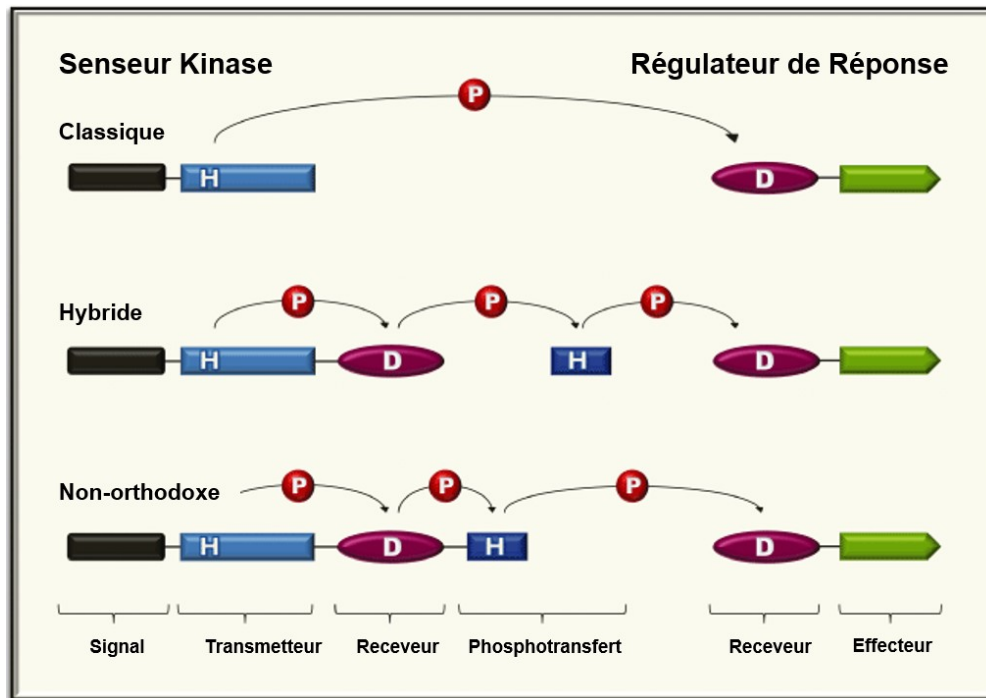


Figure 1.2.1 Représentation des structures des trois familles de senseurs kinases.

Image adaptée de (Mikkelsen *et al.*, 2011b).

1.2.2 Facteurs sigma

Les facteurs sigma (σ) sont des sous-unités dissociables et indépendantes du complexe de l'ARN polymérase bactérienne (Paget, 2015; Potvin *et al.*, 2008). Ces protéines reconnaissent une séquence d'ADN spécifique pour s'y lier et recruter l'ARN polymérase, activant ainsi la transcription du gène cible. Il existe plusieurs familles de facteurs sigma, chacune influençant des groupes de gènes précis. Les membres de la famille σ^{70} se sous-divisent en quatre groupes (Paget, 2015). Le groupe I contient les facteurs σ qui servent principalement à l'expression des gènes constitutifs chez la bactérie (Paget, 2015). Le groupe II contient les facteurs σ impliqués

dans le métabolisme de base et ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie (Paget, 2015). Le groupe III contient les facteurs σ impliqués dans la réponse aux chocs thermiques et dans le développement morphologique du microorganisme, comme la sporulation chez certaines espèces, et la synthèse d'appendices cellulaires (Paget, 2015). Le groupe IV représente une classe très diversifiée de facteur sigma dit ECF (*Extracytoplasmic Function*). Les membres de ce grand groupe régulent des fonctions spécifiques en réponse à divers signaux environnementaux (Paget, 2015). Une deuxième famille, σ^{54} , est différente de σ^{70} puisque sa liaison avec l'ADN requiert la présence d'ATP et une séquence consensus différente (Potvin *et al.*, 2008).

1.2.2.1 *RpoD et RpoH*

Le facteur sigma principal responsable du contrôle des gènes domestiques (*housekeeping genes*) se nomme RpoD (Potvin *et al.*, 2008). Ce facteur, permettant la transcription de tous les gènes impliqués dans les fonctions vitales de *P. aeruginosa*, est majoritairement actif durant la phase de croissance. Le facteur sigma RpoH est transcrit lors d'un choc thermique pour favoriser la mise en place de la réponse à une température non-favorable (Potvin *et al.*, 2008).

1.2.2.2 *RpoS*

Le facteur sigma RpoS est le régulateur principal de la transition vers la phase de latence et la réponse aux stress (Potvin *et al.*, 2008). De plus, ce facteur est capable de réguler l'action du QS en augmentant l'expression de *lasR* et de *rhlR* (Latifi *et al.*, 1996), et de moduler l'expression de plusieurs exoproduits comme le HCN et la pyoverdine (Schuster *et al.*, 2004). La transcription de *rpoS*, elle, est modulée principalement par le régulateur PsrA (Kojic & Venturi, 2001), et de façon moindre par le régulateur Vfr, alors que la protéase ClpXP est capable de réguler les niveaux de RpoS par sa dégradation (Bertani *et al.*, 2003).

1.2.2.3 *RpoN*

Le facteur RpoN est différent des autres facteurs sigma de *P. aeruginosa* puisqu'il fait partie de la famille σ^{54} (Potvin *et al.*, 2008). Il a initialement été identifié comme responsable du métabolisme et l'assimilation de l'azote. Cependant, un rôle lui a également été attribué dans la

résistance aux antibiotiques (Penaloza-Vazquez *et al.*, 2004; Viducic *et al.*, 2016; Viducic *et al.*, 2017; Viducic *et al.*, 2007), et la virulence de *P. aeruginosa* à cause de son implication dans le contrôle du QS (Cai *et al.*, 2015) et de la biogénèse du flagelle (Tsang & Hoover, 2014), des pili de type IV (Ishimoto & Lory, 1989) et de l'alginate (Damron *et al.*, 2012; Mohr *et al.*, 1990).

1.2.2.4 Les facteurs ECF

Les facteurs ECF sont des facteurs sigma hautement spécialisés, souvent sous le contrôle d'un élément régulateur comme un facteur anti-sigma (Paget, 2015). Ce dernier est capable de lier le facteur sigma et empêcher son action. Dix-neuf facteurs ECF sont prédits dans le génome de *P. aeruginosa* PAO1 (Potvin *et al.*, 2008). Par exemple, AlgU est un ECF régulant la transition vers un phénotype mucoïde (Ramsey & Wozniak, 2005). L'anti-sigma de AlgU est MucA et son gène est souvent muté chez des isolats issus d'individus atteints de fibrose kystique (Boucher *et al.*, 1997). L'absence de MucA permet l'action constitutive de AlgU, une surproduction d'alginate et donc un phénotype mucoïde (Ramsey & Wozniak, 2005). Deux autres facteurs ECF, PvdS et FpvI, régulent la production et l'assimilation du sidérophore pyoverdine, respectivement (Potvin *et al.*, 2008).

1.2.3 Les petits ARN non codants

Les petits ARN non codants (pARN) sont des molécules d'ARN dont la fonction principale ne sera pas de mener à la synthèse d'une protéine, mais de contrôler divers mécanismes de régulation chez la cellule (Sonnleitner & Haas, 2011; Storz *et al.*, 2011). Il existe deux types de pARN, ceux agissant en *cis* et ceux en *trans*. Les *cis*-pARN sont généralement produits par la transcription du brin opposé à un gène. Une longue séquence complémentaire à l'ARNm du gène en question permettra à ce *cis*-pARN de s'y lier et exercer son action, comme empêcher la traduction de l'ARNm (Brantl, 2007). Les *trans*-pARN quant à eux possèdent leur propre région génomique dédiée à leur transcription (Storz *et al.*, 2011). Une fois produit, les *trans*-pARN sont libres d'exercer leur régulation sur leur cible. Plusieurs pARN sont importants pour réguler les fonctions de *P. aeruginosa*. Le pARN *CrcZ* est impliqué dans le contrôle de la répression catabolique via une inhibition du régulateur Hfq (Sonnleitner *et al.*, 2009). D'autres pARN sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer (*PrrF1* et *PrrF2*) et l'acquisition de l'hème

(*PrrH*) et sont tous les trois codés par le même locus (Oglesby-Sherrouse & Vasil, 2010). Le pARN *PhrS* permet la traduction de MvfR (PqsR) en favorisant la disponibilité du site de fixation du ribosome de son ARNm (Sonnleitner & Haas, 2011). La transcription de *PhrS* est augmentée par le régulateur Anr en condition d'anoxie (Hammond *et al.*, 2015). Des pARN liés au système Gac/Rsm, dont *RsmY* et *RsmZ*, seront discutés dans la section sur le fonctionnement de Gac/Rsm (section 1.3) (Brencic *et al.*, 2009; Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016).

1.2.4 Les seconds messagers

Les seconds messagers sont des molécules signaux qui permettent de transmettre une information à l'intérieur de la cellule. L'utilisation des seconds messagers implique l'activation d'une synthase qui produit la molécule signal et des protéines capables de lier de façon spécifique ce signal pour générer une réponse dans la cellule.

1.2.4.1 L'AMP cyclique

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) est une molécule d'ATP ayant subi une cyclisation catalysée par une enzyme adénylate cyclase (Lory *et al.*, 2004). La modulation de l'activité des adénylates cyclases par diverses voies de régulation, dont la voie Pil-Chp (voir section 1.4.1.1), contrôle l'abondance du second messager AMPC dans la cellule (Fulcher *et al.*, 2010). Chez *P. aeruginosa*, l'AMPC a une importance dans le contrôle de l'expression des facteurs de virulence via la protéine Vfr, qui agit comme activateur transcriptionnel une fois liée à l'AMPC (West *et al.*, 1994). De plus, l'AMPC est impliqué dans le conditionnement des cellules planctoniques à l'attachement à une surface, via la production de vague d'AMPC cellulaire de plus en plus intense au fur et à mesure que les générations de cellules entrent en contact avec une surface (Lee *et al.*, 2018).

1.2.4.2 Le di-GMP cyclique

Le di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc) est un second messager constitué de deux molécules de GTP fusionnées ensemble par une diguanylate cyclase (DGC), puis éventuellement

dégradé par des phosphodiesterase (PDE) (Romling *et al.*, 2005). Ce second messager a un rôle très important au niveau de la régulation du cycle de formation de biofilm des bactéries (Ha & O'Toole, 2015). En général, les concentrations intracellulaires de di-GMPc sont plus élevées lorsque la cellule sécrète sa matrice exopolymérique et plus faible lorsque la cellule est planctonique (Ha & O'Toole, 2015). Il est maintenant plutôt accepté que le di-GMPc agit soit via des zones de concentration compartimentées (concentrations locales) qui fluctuent selon l'activité des diguanylate cyclases et phosphodiesterases à proximité dans la cellule (Ha & O'Toole, 2015). *P. aeruginosa* code dans son génome une quarantaine de DGC et PDE, chacune ayant des fonctions distinctes qui ne peuvent pas toujours être complétées par l'action d'une autre DGC/PDE (Ha & O'Toole, 2015). Par exemple, les PDE DipA et RbdA sont impliquées plus spécifiquement dans la dispersion du biofilm et requiert une concentration globale élevée de di-GMPc dans la cellule avant d'être active (Li *et al.*, 2014; Morgan *et al.*, 2006; Petrova *et al.*, 2015; Petrova & Sauer, 2012), ne pouvant donc pas être fonctionnelle lorsque la cellule est planctonique et motile (Wood, 2014). La concentration de di-GMPc peut être détectée par des protéines contenant un domaine PilZ, comme c'est le cas de la protéine HapZ (Xu *et al.*, 2016).

1.3 La voie de régulation Gac/Rsm

Tel qu'expliqué à la section 1.2.1, pour s'adapter à sa niche écologique, *P. aeruginosa* bénéficie de son grand nombre de senseurs kinases pour détecter les stimuli environnementaux. Ces senseurs permettent la modulation du métabolisme de la bactérie via l'action des régulateurs de réponse (Rodrigue *et al.*, 2000). Une des principales voies de régulation, qui module le mode de vie adopté par la bactérie, est la voie Gac/Rsm (Francis *et al.*, 2017; Mikkelsen *et al.*, 2011b). Le régulateur transcriptionnel GacA, sous le contrôle de son senseur kinase GacS, active la transcription des petits ARN non-codants *RsmY* et *RsmZ*. À leur tour, ces pARN lient et séquestrent le régulateur post-transcriptionnel RsmA (Francis *et al.*, 2017; Mikkelsen *et al.*, 2011b). RsmA, un homologue de CsrA chez *E. coli*, est un répresseur de la traduction de plusieurs ARNm cibles, principalement des gènes liés à un mode de vie statique et des gènes codant pour des exoproduits (Brencic & Lory, 2009). RsmA a la capacité de lier les nucléotides GGA situés au sommet d'une structure tige-boucle adoptée par ses nombreux ARNm cibles

(Heeb *et al.*, 2006; Janssen *et al.*, 2018b). RsmA agit sous forme d'homodimère et requiert deux sites GGA pour lier sa cible (Heeb *et al.*, 2006). Ces positions GGA sont généralement situées à proximité du site de fixation du ribosome (RBS, *Ribosome Binding Site*) ; une liaison de RsmA sur les tiges-boucles GGA bloque le RBS et la traduction de l'ARNm (Heeb *et al.*, 2006).

De la même façon, une liaison de RsmA au pARN *RsmY* ou *RsmZ* empêche cette liaison sur les ARNm ciblés par RsmA. Le niveau de disponibilité de RsmA dans la cellule, qui dépend entre autres de la concentration de *RsmY/RsmZ*, est le facteur décisif quant au mode de vie préférable pour *P. aeruginosa*, soit motile ou sessile (Francis *et al.*, 2017; Mikkelsen *et al.*, 2011b). La voie Gac/Rsm est également impliquée dans le contrôle du métabolisme secondaire et l'expression de facteurs de virulence. Étant une voie de régulation importante pour *P. aeruginosa*, beaucoup d'autres voie de régulation convergent vers la voie Gac/Rsm pour moduler plus finement la réponse de la bactérie envers diverses conditions de vie (Francis *et al.*, 2017).

1.3.1 L'apex de la voie, le contrôle sur GacS

Au sommet de la voie Gac/Rsm se trouve le senseur kinase GacS (Figure 1.3.1). Il s'agit d'un senseur non-orthodoxe qui possède un domaine receveur et HPT supplémentaires (Mikkelsen *et al.*, 2011b). À la suite de la détection d'un signal (encore inconnu), GacS forme un homodimère, se phosphoryle et transfère son phosphate vers le régulateur de réponse GacA. La protéine GacA phosphorylée est ainsi active et jouera son rôle d'activateur transcriptionnel dans la cellule.

Plusieurs autres senseurs kinase ont la capacité d'influencer le transfert de phosphate vers GacA (Figure 1.3.1). Le senseur hybride LadS répond à la concentration de Ca^{2+} et peut exploiter le domaine HPT de GacS pour induire une phosphorylation de GacA (Broder *et al.*, 2016; Chambonnier *et al.*, 2016). Chez la souche de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (PA14), le gène *ladS* est muté à la suite de la duplication d'un segment de son domaine senseur, qui crée une séquence aberrante et une perte de fonction comparativement à la copie du gène sauvage retrouvée entre autres chez l'autre souche de référence PAO1 (Mikkelsen *et al.*, 2011a). Cette mutation entraîne une augmentation de la virulence chez PA14 qui concorde avec le rôle de LadS dans la voie Gac/Rsm. La perte de LadS réduit l'expression des pARN, augmente la disponibilité de RsmA,

favorise l'adoption d'un mode de vie motile, induit l'expression du SST3 et accroît la virulence de *P. aeruginosa* (Jimenez *et al.*, 2012; Mikkelsen *et al.*, 2011a).

Le senseur RetS est un autre senseur hybride capable de moduler l'action de GacS. Celui-ci agit de façon inhibitrice en formant principalement un hétérodimère avec GacS, mettant ainsi fin au phosphorelais avec GacA (Goodman *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2009). Une récente étude effectuée par Francis et ses collaborateurs montre bien la complexité qui existe dans la relation entre RetS et GacS (Francis *et al.*, 2018). Grâce à sa liaison avec GacS, RetS peut soit voler les phosphates de GacS, ou bien déphosphoryler ou bloquer l'autophosphorylation de GacS, qui causera l'arrêt de fonction de GacS. Il est d'autant plus impressionnant que chacun des trois mécanismes d'inhibition de RetS affecte le dynamisme de RetS-GacS de façon différente, puisque des mutants incapables d'effectuer l'un ou l'autre de ses mécanismes n'ont pas tous le même phénotype lors d'essai de motilité de type *swarming* (Francis *et al.*, 2018). À l'interaction entre RetS et GacS s'ajoute un troisième senseur hybride, nommé PA1611, qui est capable de lier et inhiber l'action de RetS (Bhagirath *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2013). Les deux senseurs hybrides ont de plus la capacité d'échanger des phosphates avec la protéine HptB (Hsu *et al.*, 2008). Ce phosphorelais semble possible seulement de PA1611 vers HptB et de HptB vers RetS, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire à la régulation de RetS sur GacS.

Malgré l'importance de la régulation du S2C Gac dans l'établissement d'une infection par *P. aeruginosa*, très peu est connu au niveau des signaux perçus par les divers senseurs kinases impliqués. LadS répond à la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Broder *et al.*, 2016), GacS serait activé par un signal produit à forte densité cellulaire chez *P. protegens* (Heeb *et al.*, 2002) et RetS serait activé par le lysat cellulaire de *P. aeruginosa*, tué par une autre bactérie comme *Burkholderia thailandensis* (LeRoux *et al.*, 2015). Toutes ces propositions demeurent vagues quant à l'identité des signaux agissant sur la voie Gac/Rsm.

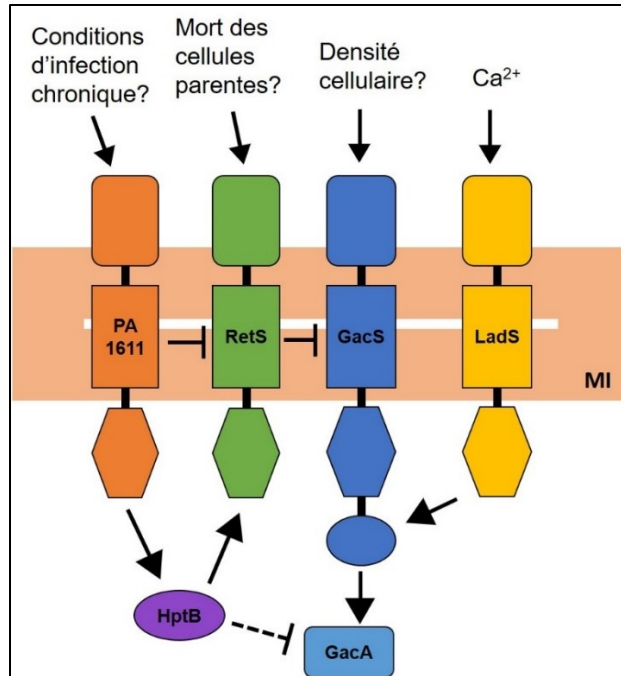


Figure 1.3.1 Implication des senseurs kinases principaux impliqués lors de la transduction des signaux vers GacA.

Le senseur non-orthodoxe GacS possède un domaine HPT (ovale) lui permettant de transmettre son phosphate vers GacA. LadS, RetS et PA1611 sont des senseurs hybrides sans domaine HPT. LadS exploite le domaine HPT de GacS pour phosphoryler GacA. RetS et PA1611 utilise la protéine HptB pour effectuer le phosphorelais. Les traits pleins indiquent une action directe, les trait pointillés une action indirecte. Les têtes de flèche pointues signifient une action positive, les têtes plates signifient une action négative. MI : Membrane interne.

1.3.2 La face de la voie, l'intégration des signaux vers les pARN

Le régulateur de réponse GacA est reconnu comme étant l'activateur principal de la transcription des pARN *RsmY* et *RsmZ* (Brencic *et al.*, 2009). Malgré le niveau de complexité de régulation de GacS, d'autres voies de régulation ont la capacité de réguler l'expression des gènes *rsmY* et *rsmZ* de façon GacA-dépendante ou -indépendante. Une protéine capable de lier le ribosome nommée SuhB module l'expression de *gacA* de façon indirecte (Li *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2015). Chez un mutant *suhB*⁻, la transcription de *gacA*, et par le fait même la transcription de *rsmY* et *rsmZ*, est augmentée sans agir sur *gacS* ni *retS* (Li *et al.*, 2017). Étant associée au ribosome, SuhB serait capable de moduler la vitesse de traduction, ce qui aurait un impact sur la transcription puisque ces deux procédés sont couplés chez les procaryotes. Le gène *suhB* possède une séquence similaire à d'autres gènes codant pour une enzyme inositol-1-monophosphatase selon la base de

données UniProtKB (www.uniprot.org), mais cette fonction n'a jamais été validée chez *P. aeruginosa*.

Il existe également des moyens de contourner la régulation de GacA. L'une de ces cascades de signalisation implique les protéines HptB (PA3345) et HsbR-HsbA (PA3346-PA3347) (Bhuwan *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2006). HsbR est un régulateur de réponse possédant à la fois une activité kinase (active lorsque HsbR est non phosphorylé) et phosphatase (active lorsque HsbR est phosphorylé) (Hsu *et al.*, 2008). À la suite du transfert d'un phosphate de HptB vers HsbR, sa fonction phosphatase s'active et retire un phosphate de la protéine anti-anti-facteur sigma HsbA, qui pourra alors lier et séquestrer l'anti-facteur sigma FlgM. Ce dernier agit normalement en bloquant l'action de FliA (Hsu *et al.*, 2008). Lorsque qu'un complexe HsbA-FlgM est formé, FliA est libre d'agir sur la transcription de ses gènes cibles, en particulier les gènes codant pour l'activité flagellaire. Une délétion de *hptB*, *hsbA* ou *hsbR* mène à une augmentation de la transcription du pARN *RsmY* de façon spécifique, et ce via un mécanisme de régulation encore mal compris (Bordi *et al.*, 2010). D'autres travaux effectués dans notre laboratoire montrent qu'une délétion de *hptB* augmente l'expression de *RsmY* et *RsmZ* alors que HsbA et HsbR n'ont pas un tel effet sur les pARN (Jean-Pierre *et al.*, 2016). Les deux études utilisent des souches de *P. aeruginosa* différentes (PAK et PA14) et des conditions de culture différentes. Il est bien connu que les diverses souches ont des différences marquées au niveau de certaines caractéristiques phénotypiques.

Plusieurs autres mécanismes semblent influencer l'expression et l'action de *RsmY* et *RsmZ* de façon indépendante l'un de l'autre (Figure 1.3.2). La chaperonne liant l'ARN Hfq peut lier *RsmY*, mais pas *RsmZ*, stabilisant le pARN (Sorger-Domenigg *et al.*, 2007). De son côté, la transcription de *RsmZ* est réprimée par la protéine H-NS (*Histone-like Nucleoid Structuring*) MvaT (Brencic *et al.*, 2009). Cette répression par les protéines H-NS serait réduite par le facteur de transcription BswR, capable de lier la région promotrice de *rsmZ* et de favoriser l'expression de *RsmZ*, supposément en bloquant la liaison du répresseur MvaT (Wang *et al.*, 2014a). Une régulation du nombre de transcrits de *RsmZ* peut également se faire via l'action de la ribonucléase CafA. Cette protéine est activée par le S2C BfiSR et dégrade le pARN *RsmZ* (Figure 1.3.2)(Petrova & Sauer, 2010). Bien que CafA soit prédite comme étant une ribonucléase G, son activité sur *RsmZ* n'a pas été démontrée *in vitro*.

1.3.3 La base de la voie, le niveau de titration de RsmA

Il semble que les signaux perçus par le S2C Gac et les voies convergentes ont tous pour but de moduler le niveau de disponibilité du régulateur post-transcriptionnel RsmA (Francis *et al.*, 2017). La titration de RsmA dépend de sa quantité dans la cellule, de la quantité des pARN *RsmY* et *RsmZ* ainsi que du nombre de transcrits des cibles de RsmA. RsmA peut d'ailleurs réguler sa propre traduction en liant son ARNm (Jean-Pierre *et al.*, 2015). Il est important aussi de noter que malgré l'action complémentaire de *RsmY* et *RsmZ*, les deux pARN ont des constantes d'affinité pour RsmA différentes et des niveaux d'expression différents dans le temps (Janssen *et al.*, 2018a; Janssen *et al.*, 2018b). Cette modulation indépendante de la quantité de *RsmY* et *RsmZ* dans la cellule joue probablement un rôle crucial dans la régulation fine de l'action de RsmA.

1.3.4 Les acteurs oubliés

Alors que les techniques d'analyse par bioinformatiques se sont perfectionnées, d'autres éléments homologues aux membres de la voie Gac/Rsm ont été identifiés. Ces nouveaux régulateurs sont cependant très peu intégrés dans les récentes études. Cette section fait un survol de ces acteurs qui devraient être considérés lors de l'étude de la voie Gac/Rsm.

1.3.4.1 *RsmN (RsmF), le frère de RsmA*

L'espèce *Pseudomonas protegens* possédait un homologue de RsmA nommé RsmE (Schubert *et al.*, 2007). Plus récemment deux groupes de recherche ont découvert un tel homologue chez *P. aeruginosa*. Nommé RsmN (pour « Nouveau ») (Morris *et al.*, 2013) et RsmF (« F » étant la lettre suivant « E ») (Marden *et al.*, 2013). Cette protéine est décrite comme ayant une structure et une fonction similaires à RsmA, malgré une séquence protéique différente. RsmN semble être capable de compléter un défaut de RsmA et un mutant ayant une double délétion de *rsmA* et *rsmN* possède un phénotype plus accentué qu'une délétion de *rsmA* seule (Marden *et al.*, 2013). RsmA et RsmN contrôlent un grand nombre de cibles communes, mais RsmN semble plus spécifique à des sites GGA situés sur des tiges-boucles plus stables (Schulmeyer *et al.*, 2016). L'affinité des deux protéines pour les pARN *RsmY* et *RsmZ* est également différente (Janssen *et al.*, 2018b).

1.3.4.2 *RsmW* et PA4570, le couple abandonné

Un troisième pARN similaire à *RsmY* et *RsmZ* a été identifié par bioinformatiques dans la région 3' non-traduite (UTR, *Untranslated Region*) d'un gène (PA4570) codant pour une protéine similaire à environ 50% avec RsmA et RsmN (Miller *et al.*, 2016). RsmW montre une capacité de lier RsmA *in vitro* ainsi qu'une complémentarité d'un double mutant *rsmY- rsmZ-* (Miller *et al.*, 2016). De façon particulière, l'expression de la région codant pour RsmW est augmentée chez des mutants *gacA-* et *rhlR-*. De plus, l'expression de *rsmW* est plus élevée à 37°C qu'à 28°C, la région en amont du site de transcription possède un site de liaison de RpoH, le facteur sigma lié à la réponse à des variations de température. La région de PA4570 ne possède pas de site de terminaison de transcription prédit, indiquant que la transcription de PA4570-RsmW est probablement liée (Miller *et al.*, 2016). Malgré quelques mentions dans les revues, seul l'article original traite de ces deux acteurs de la voie Gac/Rsm.

1.3.4.3 *RsmV*, le petit nouveau

Une plus récente étude a mis en lumière l'existence d'un quatrième pARN régulateur impliqué dans la voie Gac/Rsm (Janssen *et al.*, 2018a). Nommé RsmV, ce pARN possède sa propre région chromosomique et une affinité plus élevée pour RsmN *in vitro*, bien que cette affinité ne corrèle pas nécessairement avec l'affinité *in vivo* (Janssen *et al.*, 2018a). L'importance de RsmV et les conditions favorables à son expression sont encore inconnues.

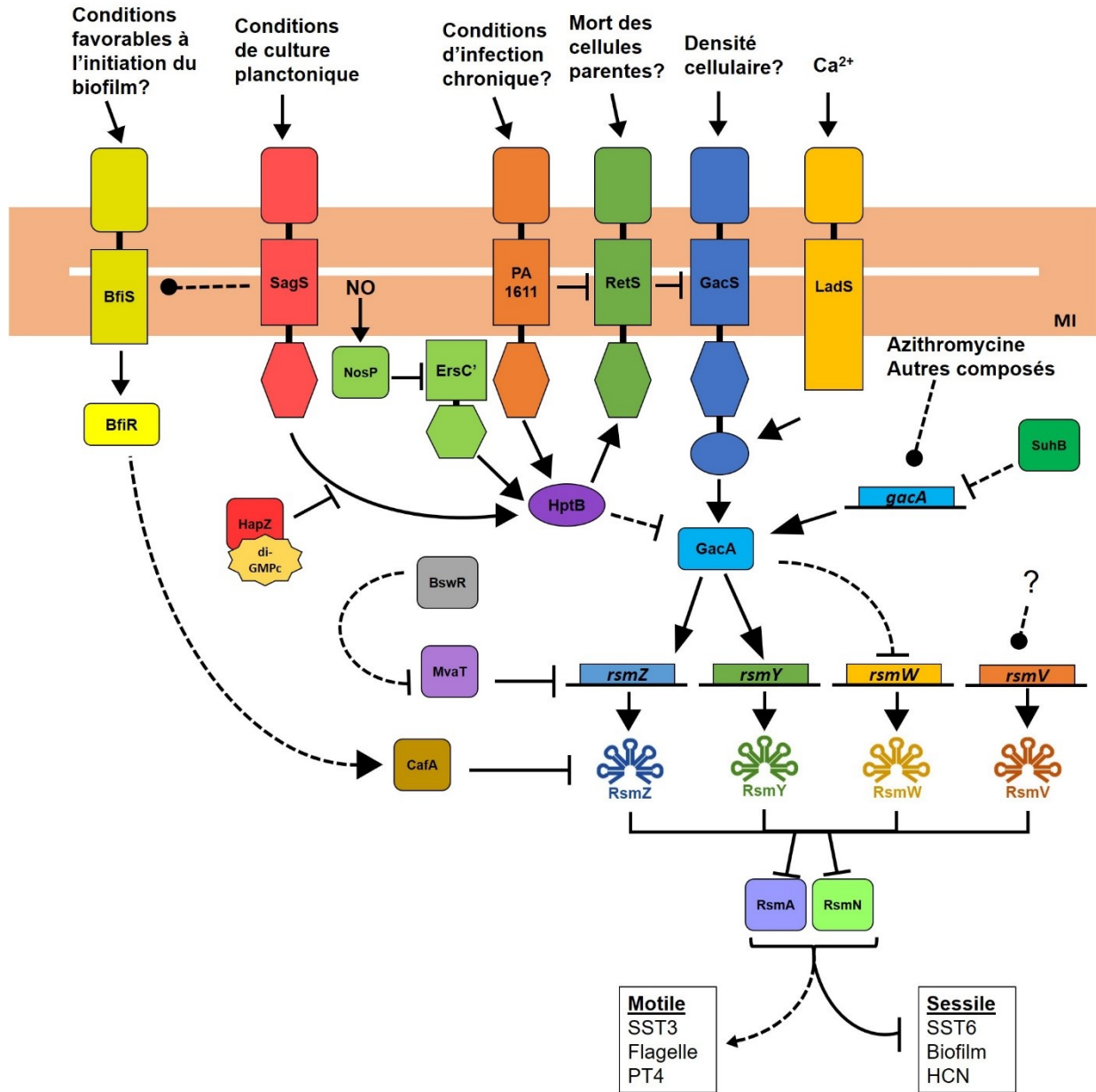


Figure 1.3.2 Représentation schématique de la voie Gac/Rsm et des principales voies convergentes, constituant la voie de régulation de l'alternance en un mode de vie motile ou sessile.

Les traits pleins indiquent une action directe, les traits pointillés une action indirecte. Les têtes de flèche pointues signifient une action positive, les têtes plates signifient une action négative, les têtes arrondies signifient une action positive ou négative. MI : Membrane interne. Le symbole étoilé lié à la protéine HapZ représente l'association de la molécule di-GMPc.

1.4 D'autres voies de régulation

1.4.1 La détection de surface

L'adaptation à une surface est cruciale pour l'adoption d'un mode de vie sessile et la formation d'un biofilm. Deux voies sont connues chez *P. aeruginosa* pour reconnaître la présence d'un substrat solide.

1.4.1.1 La voie Pil-Chp

Une cellule planctonique libre initie généralement son premier contact avec une surface via l'adhésion réversible de son flagelle et ses pili de type IV (PT4) (Belas, 2014; O'Toole & Wong, 2016). L'adhésion du pilus est connue pour activer la voie Pil-Chp (Figure 1.4.1), via une interaction proposée de la piline PilA et le senseur PilJ (Persat *et al.*, 2015). La rétraction du pilus semble être le signal qui active PilJ et le complexe Pil-Chp, activant ainsi l'adénylate cyclase CyaB et causant une augmentation de l'AMPc dans la cellule (Fulcher *et al.*, 2010). L'AMPc a la capacité de promouvoir la biogénèse des PT4 via le régulateur Vfr (Beatson *et al.*, 2002a). Les PT4, la voie Pil-Chp et la production de l'AMPc sont responsables du conditionnement à une surface (Lee *et al.*, 2018).

À la suite de cette cascade d'AMPc, l'association des pili avec la protéine PilY1 permettrait l'activation de la diguanylate cyclase SadC et une hausse de production de di-GMPc (Luo *et al.*, 2015). Cette association permettrait la transition vers un attachement irréversible, l'arrêt de la motilité et l'initiation du biofilm (O'Toole & Wong, 2016).

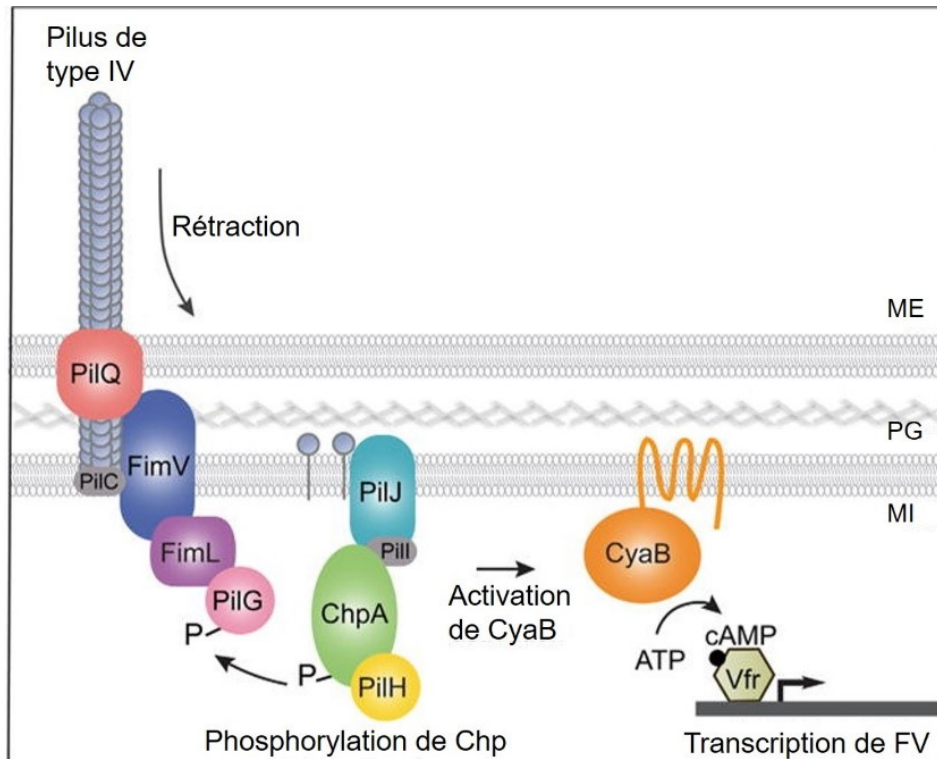


Figure 1.4.1 Transduction du signal des pili de type IV vers le complexe Pil-Chp.

ME : Membrane externe. PG : Peptidoglycane. MI : Membrane interne. FV : Facteurs de virulence. Image adaptée de (Inclan *et al.*, 2016)

1.4.1.2 La voie Wsp

Un autre complexe protéique est responsable de détecter un signal lié à un développement sur une surface chez *P. aeruginosa*. Nommé Wsp, ce complexe est similaire à un système de chimiotaxisme et regroupe les protéines WspA à WspF, et WspR, une diguanylate cyclase (DGC) (Figure 1.4.2) (Hickman *et al.*, 2005). Lorsque WspA détecte son signal inconnu, mais associé à la vie sur une surface, le signal est transduit via le complexe Wsp jusqu'à l'histidine kinase WspE (O'Connor *et al.*, 2012). Cette dernière phosphoryle et active WspR, qui se regroupe en grappe et produit le di-GMPc. Une hausse de di-GMPc par cette DGC favorise la transcription des opérons *psl* et *pel*, qui code pour les gènes impliqués dans la production d'exopolysaccharides (Hickman *et al.*, 2005). Les complexes Wsp sont principalement regroupés à la membrane interne, sur les côtés latéraux de la cellule bactérienne (Guvener & Harwood, 2007; O'Connor *et al.*, 2012).

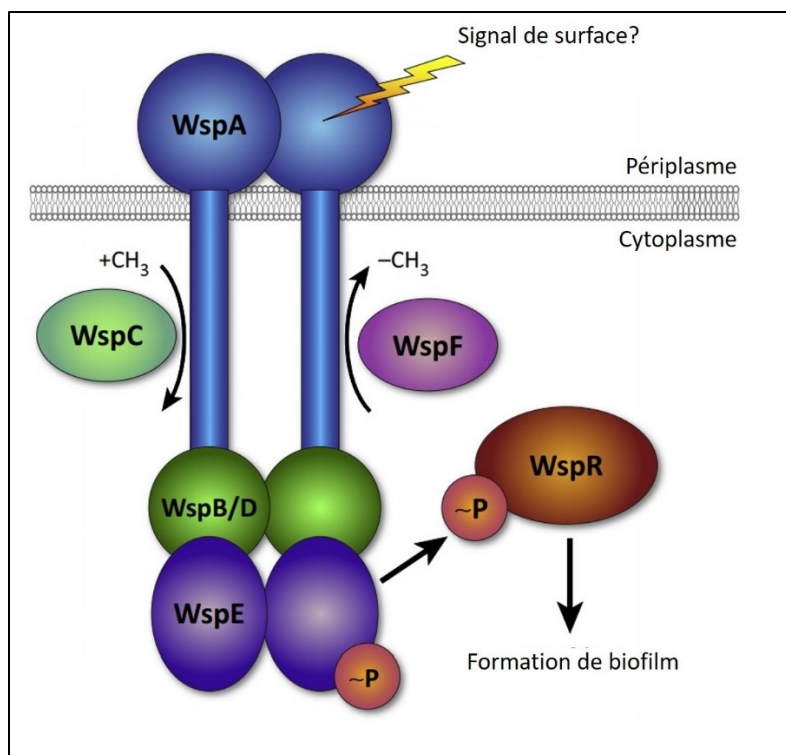


Figure 1.4.2 Structure du complexe Wsp.

Image adaptée de (Belas, 2014).

1.4.2 La répression catabolique CCR

P. aeruginosa est capable d'utiliser un grand nombre de composés carbonés différents pour combler ses besoins énergétiques. Les sources de carbone préférées de *P. aeruginosa* sont les sous-produits du cycle de l'acide citrique (TCA) comme le succinate (Rojo, 2010). Lorsque qu'il y a présence de ces sources de carbone préférées, la répression catabolique du carbone (*carbon catabolite repression*, CCR) est active, causant l'arrêt de la traduction des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres, comme le glucose (Sonnleitner *et al.*, 2009). Le contrôle de la CCR se fait de façon très similaire au contrôle de RsmA chez la voie Gac/Rsm. Sous l'action du système à deux composantes CbrAB, le pARN CrcZ est transcrit alors que des sources de carbone non-optimales sont présentes dans le milieu (Valentini *et al.*, 2014). CrcZ peut lier la chaperonne à ARN Hfq, qui agit pour inhiber la synthèse de protéines liées au métabolisme de sources de carbone alternatives (Sonnleitner & Blasi, 2014).

1.5 L'histidine phosphotransférase, HptB

Le relais entre les senseurs kinases hybrides et leurs régulateurs de réponse est effectué par les trois protéines Hpt connues dans le génome de *P. aeruginosa* : HptA, HptB et HptC (Rodrigue *et al.*, 2000). De celles-ci, seule HptB est bien caractérisée, les deux autres font très peu l'objet de travaux publiés. HptB transfère les groupements phosphates de ses senseurs kinases hybrides conjugués vers au moins un régulateur de réponse connu (Hsu *et al.*, 2008).

1.5.1 Senseurs kinases interagissant avec HptB

Jye-Lin Hsu et son équipe ont caractérisé l'interaction possible entre divers senseurs kinase hybrides et HptB. Parmi les 12 senseurs testés, quatre étaient capables de d'effectuer un phosphorelais avec HptB (Hsu *et al.*, 2008). Ces senseurs sont PA1611, ErcS' (PA1976), SagS (PA2824) et RetS (Figure 1.3.2), et sont capables d'une interaction directe confirmée par double hybride bactérien (Houot *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2008). RetS et PA1611 sont capables d'influencer l'activité de GacS (directement et indirectement, respectivement) (Francis *et al.*, 2018; Goodman *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2013). SagS peut interagir avec le senseur BfiS, le senseur du S2C BfiSR responsable de la transcription de *cafA* (Petrova & Sauer, 2010), et peut influencer le niveau des pARN *RsmY* et *RsmZ* de façon GacA-dépendante (Petrova & Sauer, 2011). SagS est généralement phosphorylé en conditions de culture planctonique (Petrova & Sauer, 2011). De plus, le transfert du phosphate de SagS vers HptB est inhibé par la protéine contenant un domaine PilZ, HapZ. Les domaines PilZ sont capables de détecter le di-GMPc. Dans le cas de HapZ, une quantité élevée de di-GMPc favorise l'inhibition du transfert de phosphate (Xu *et al.*, 2016). Le senseur ErcS' (PA1976) est principalement connu pour son rôle dans le contrôle de l'oxydation de l'éthanol, mais a été impliqué dans la détection de l'oxide nitrique (NO) (Hossain & Boon, 2017; Mern *et al.*, 2010). Dans la récente étude de Houssain et Boon en 2017, ErcS' (nommé NahK dans l'étude) subit l'activité inhibitrice de la protéine NosP, qui détecte le NO et bloque ainsi l'activité kinase de ErcS'. Le senseur ErcS' et son homologue ErcS ne sont pas transmembranaire, tous les deux étant retrouvés dans le cytoplasme (Mern *et al.*, 2010).

1.5.2 Déficience de *swarming* et contrôle surface-dépendant de *RsmZ*

Le gène *hptB* a été identifié comme étant important pour la motilité de type *swarming* (Figure 1.1.3). Un mutant $\Delta hptB$ montre un défaut très prononcé de cette motilité malgré sa capacité à produire des rhamnolipides et produire un flagelle fonctionnel (Jean-Pierre *et al.*, 2016; Tremblay, 2011). Tout semble indiquer que HptB peut contrôler un autre élément essentiel de la motilité de type *swarming* encore inconnu. Il a également été observé que le défaut de *swarming* est aboli lorsque la délétion des gènes *rsmY* et *rsmZ* est combiné à la délétion de *hptB* (Jean-Pierre *et al.*, 2016). Un triple mutant $\Delta hptB\Delta rsmY\Delta rsmZ$ montre la même capacité de déplacement qu'un double mutant $\Delta rsmY\Delta rsmZ$ (Figure 1.5.1).

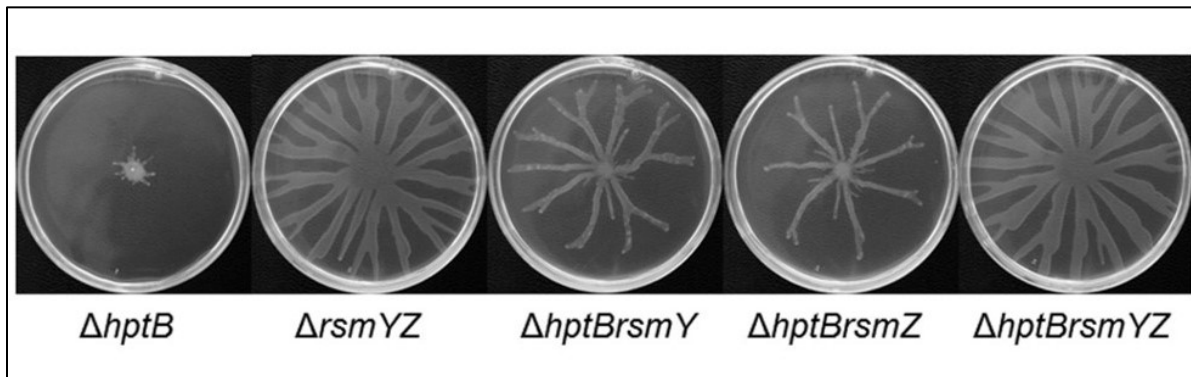


Figure 1.5.1 Swarming du mutant $\Delta hptB$ et complémentation du défaut par la délétion de *rsmY* et *rsmZ*.

La comparaison entre la souche sauvage et le mutant $\Delta hptB$ est montrée à la Figure 1.1.3. Image adaptée de (Jean-Pierre *et al.*, 2016).

La perte de HptB cause une surexpression des deux pARN qui serait la cause du défaut de *swarming* (Jean-Pierre *et al.*, 2016). Il a alors été proposé que HptB a une action négative indirecte sur l'action de GacA et que la perte de HptB signifierait une action plus prononcée de GacA. La délétion de *gacA* a donc été combinée à la délétion du gène *hptB*. Chez ce double mutant, l'expression de *RsmY* est réduite alors que l'expression de *RsmZ* est augmentée (Figure 1.5.2), supposant que HptB peut activer l'expression de *rsmZ* de façon GacA-indépendante via un mécanisme indirect toujours mal compris (Jean-Pierre *et al.*, 2016). De plus, cette surexpression de *rsmZ* est seulement observée lorsque le double mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$ (insertion du transposon Mar2xT7 dans *gacA*) est cultivé sur la surface d'un milieu gélosé (Figure 1.5.2). Il a donc été proposé que sous l'action d'un signal présent lorsque *P. aeruginosa* se développe sur une surface, HptB peut réprimer l'expression de *rsmZ*.

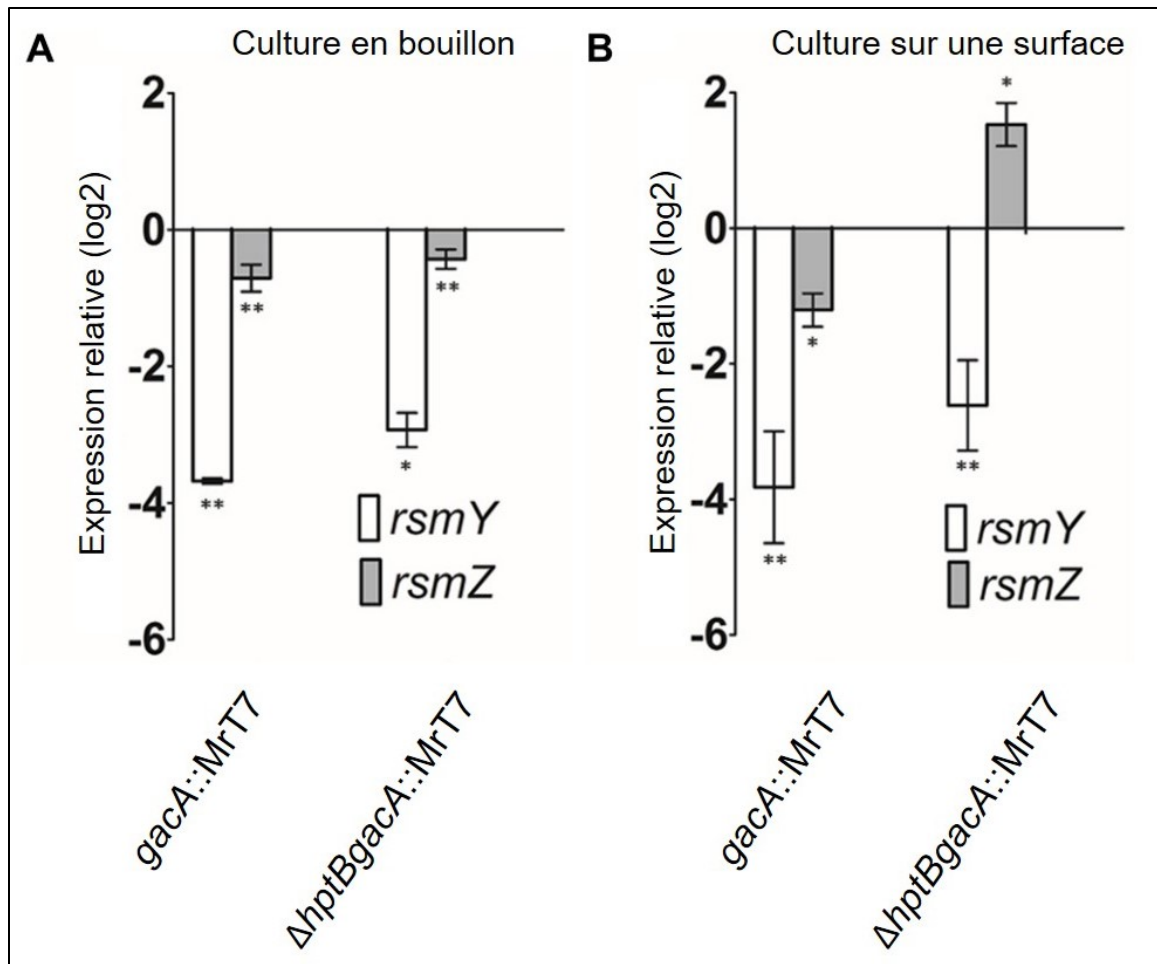


Figure 1.5.2 Différence d'expression des pARN *RsmY* et *RsmZ* selon les conditions de culture.

L'expression de *RsmZ* varie selon une croissance en bouillon (planctonique, en A) ou sur une surface (*swarming*, en B) chez le mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$. Adapté de (Jean-Pierre *et al.*, 2016).

1.6 Problématique

Alors qu'un mutant $\Delta hptB$ surexprime à la fois *RsmY* et *RsmZ* et qu'un mutant *gacA*- sous-exprime ces deux pARN, un double mutant $\Delta hptB gacA$ - présente une surexpression de son pARN *RsmZ* lorsqu'il se développe sur une surface.

1.6.1 Hypothèse

Il existe un ou plusieurs gènes capables d'induire l'expression de *RsmZ* de façon surface-dépendante en absence de HptB et de façon GacA-indépendante.

1.6.2 Objectif

L'objectif du projet est d'identifier grâce à un criblage les éléments de régulation génique capables d'influencer l'expression surface-dépendante de *rsmZ* chez *P. aeruginosa* PA14. Le criblage permettra également d'identifier d'autres voies impliquées dans la transcription de *RsmZ*. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet permettront de mettre en lumière la complexité de régulation de la voie Gac/Rsm.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Bactéries et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées dans le cadre de ce projet sont listées dans le Tableau 2.1. Les souches ont été cultivées de façon routinière dans du milieu TSB (*Tryptic Soy Broth*) avec ou sans agar (ALPHA Biosciences) à une concentration finale de 1,5% (TSA). Lorsque indiqué, les essais ont été effectués avec le milieu M9 modifié (M9DCAA) contenant $1,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$, $1,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $2,99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acide casaminés (Difco), 1 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 et 1 mM dextrose, non supplémenté d'agar (liquide), supplémenté de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bacto-agar (Difco) (visqueux), $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bacto-agar (Difco) (semi-solide) ou $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar (ALPHA Biosciences) (solide).

Tableau 2.1 Liste des souches utilisées dans le cadre de cette étude.

Nom	Génotype	Référence	Numéro de collection
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
UCBPP-PA14 (PA14)	Souche sauvage parente (WT)	Stock de laboratoire Eric Déziel (Rahme <i>et al.</i> , 1995)	ED14
WT $P_{rsmZ-lacZ}$	PA14 ::CTX- $P_{rsmZ-lacZ}$	(Jean-Pierre, 2017)	ED2012
$gacA-$	$gacA::\text{MrT7}$ (Id :34781)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)	ED1800
$gacA- P_{rsmZ-lacZ}$	$gacA::\text{MrT7} ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3213
$\Delta hptB$	$\Delta hptB$	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)	ED1214
$\Delta hptB P_{rsmZ-lacZ}$	$\Delta hptB ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	(Jean-Pierre, 2017)	ED2730
$\Delta hptB gacA-$	$\Delta hptB gacA::\text{MrT7}$ (Id :34781)	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)	ED2654
$\Delta hptB gacA- P_{rsmZ-lacZ}$	$\Delta hptB gacA::\text{MrT7} ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3214
Transposants CMA1-190	Charles Morin Criblage A #1 à #190	Cette étude, voir tableau Annexe I	N/A
$\Delta gacA$	$\Delta gacA$	Cette étude	ED3440
$\Delta gacA P_{rsmZ-lacZ}$	$\Delta gacA ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3442
$\Delta hptB \Delta gacA$	$\Delta hptB \Delta gacA$	Cette étude	ED3441
$\Delta hptB \Delta gacA P_{rsmZ-lacZ}$	$\Delta hptB \Delta gacA ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3443
$fgtA-$	$fgtA::\text{MrT7}$ (Id :56302)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)	ED3303
$fgtA- P_{rsmZ-lacZ}$	$fgtA::\text{MrT7} ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3853
prt-	PA14_08070::MrT7 (Id :56201)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)	ED3404
prt- $P_{rsmZ-lacZ}$	PA14_08070::MrT7 ::CTX- $P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3854
$truB-$	$truB::\text{MrT7}$ (Id :57118)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)	ED3406
$truB- P_{rsmZ-lacZ}$	$truB::\text{MrT7} ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3855
$rldD-$	$rldD::\text{MrT7}$ (Id :55505)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)	ED3407
$rldD- P_{rsmZ-lacZ}$	$rldD::\text{MrT7} ::\text{CTX-}P_{rsmZ-lacZ}$	Cette étude	ED3856
$prfC-$	$prfC::\text{MrT7}$ (Id :31568)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)	ED3433

<i>prfC</i> -P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	<i>prfC</i> ::MrT7 ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Cette étude	ED3857
PA14_58850-	PA14_58850::MrT7 (Id :22523)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)	ED3435
PA14_58850-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	PA14_58850 ::MrT7 ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Cette étude	ED3858
Δ <i>pqsE</i>	Δ <i>pqsE</i>	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)	ED36
Δ <i>pqsE</i> P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Δ <i>pqsE</i> ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Stock de laboratoire	ED2014
Δ <i>pqsE</i> Δ <i>hptB</i>	Δ <i>pqsE</i> Δ <i>hptB</i>	Cette étude	ED3851
Δ <i>pqsE</i> Δ <i>hptB</i> P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Δ <i>pqsE</i> Δ <i>hptB</i> ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Cette étude	ED3852
Δ <i>pqsE</i> Δ <i>gacA</i>	Δ <i>pqsE</i> Δ <i>gacA</i>	Cette étude	ED3622
Δ <i>pqsE</i> Δ <i>gacA</i> P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Δ <i>pqsE</i> Δ <i>gacA</i> ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Cette étude	ED3623
<i>myfR</i> -	<i>myfR</i> -	(Cao <i>et al.</i> , 2001)	ED35
<i>myfR</i> -P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	<i>myfR</i> ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Cette étude	ED3664
<i>pqsC</i> -	<i>pqsC</i> - (non polaire)	(Lesic & Rahme, 2008)	ED218
<i>pqsC</i> -P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	<i>pqsC</i> ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Cette étude	ED3665
<i>pqsD</i> -	<i>pqsD</i> - (non polaire)	(Dulcey <i>et al.</i> , 2013)	ED690
<i>pqsD</i> -P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	<i>pqsD</i> ::CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	Cette étude	ED3859
<i>Escherichia coli</i>			
χ 7213 pUT-mini-tn5-Km	χ 7213 pUT-mini-tn5-Km	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)	ED2724
SM10 pEX18Ap- Δ <i>gacA</i>	SM10 pEX18Ap- Δ <i>gacA</i>	(Jean-Pierre, 2017)	ED2966
SM10 pEX18Ap- Δ <i>hptB</i>	SM10 pEX18Ap- Δ <i>hptB</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)	ED2970
SM10 pMini-CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	SM10 pMini-CTX-P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	(Brencic <i>et al.</i> , 2009)	ED1994
DH5 α pUCP20- <i>pqsE</i>	DH5 α pUCP20- <i>pqsE</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2009)	ED1355

2.2 Conception des amorces utilisées

La liste complète des amorces, leur séquence et leur fonction est présentée dans le Tableau 2.2. Les amorces CM_Tn5_OEnd_R1 et CM_Tn5_OEnd_R2 ont été conçues à partir de la séquence du plasmide pUT-mini-Tn5-Km en se basant sur les caractéristiques des amorces décrites par (Jacobs *et al.*, 2003).

Tableau 2.2 Liste des amorces utilisées lors de cette étude

Nom	Séquence	Utilisation	Référence
CEKG2A	GGCCACGCGTCGACTAGTAC-NNNNNNNNNNAGAG	Amorce dégénérée - Amplification transposon ronde 1	(Jacobs <i>et al.</i> , 2003)
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTAC-NNNNNNNNNNACGCC	Amorce dégénérée - Amplification transposon ronde 1	(Jacobs <i>et al.</i> , 2003)
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTAC-NNNNNNNNNNGATAT	Amorce dégénérée - Amplification transposon ronde 1	(Jacobs <i>et al.</i> , 2003)

CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	Amorce dégénérée - Amplification transposon ronde 2	(Jacobs <i>et al.</i> , 2003)
CM_Tn5_OEnd_R1	TCACCGGATCCCCGGAATT	Amplification transposon Tn5 ronde 1	Cette étude
CM_Tn5_OEnd_R2	GCGGCCGCACTTGTGTATAA	Amplification transposon Tn5 ronde 2	Cette étude
pqsE2F	AGAGTCTCGAAGACGGACTGCTG	Confirmation de la délétion de <i>pqsE</i>	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
pqsE3R	TCGCTCAACGGTGCCAGCAA	Confirmation de la délétion de <i>pqsE</i>	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
FJP_PA14_gacA_for	TCGGCGATGGTCGCTATG	Confirmation de la délétion de <i>gacA</i>	(Jean-Pierre, 2017)
FJP_PA14_gacA_Rev	TAGCGAGGAAGGCGCTCGC	Confirmation de la délétion de <i>gacA</i>	(Jean-Pierre, 2017)
FJP_hptB_conf_for	GAATTGTCCGATCGTTGCCA	Confirmation de la délétion de <i>hptB</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
FJP_hptB_conf_Rev	GTTGCAGGTCACCGCGCC	Confirmation de la délétion de <i>hptB</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
sacB-T (forward)	TCACGGCTACCACATCGTC	Validation de la perte de <i>sacB</i>	Martin Lamarche, Labo Déziel
sacB-R	TGCAATCAGCGGTTTCATCAC	Validation de la perte de <i>sacB</i>	Martin Lamarche, Labo Déziel
rsmY_FWD	AGGAAGCGCCAAAGACAATA	Amplification qPCR de <i>RsmY</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
rsmY_REV	GGGTTTTGCAGACCTCTATCC	Amplification qPCR de <i>RsmY</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
rsmZq_FWD	GAACACGCAACCCCGAAG	Amplification qPCR de <i>RsmZ</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
rsmZq_REV	CCACTCTTCAGTCCCTCGTC	Amplification qPCR de <i>RsmZ</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
qnadB F	CTACCTGGACATCAGCCACA	Amplification qPCR de <i>NadB</i>	(Tremblay & Deziel, 2010)
qnadB R	GGTAATGTCGATGCCGAAGT	Amplification qPCR de <i>NadB</i>	(Tremblay & Deziel, 2010)

2.3 Construction des souches mutantes et complémentations

Les plasmides employés lors du projet sont répertoriés dans le Tableau 2.3. La délétion des gènes sans marqueurs de résistance est effectuée grâce au plasmide suicide de type pEX18, transféré d'une souche donneuse *E. coli* SM10 vers la souche de *P. aeruginosa* d'intérêt par conjugaison. La stratégie de délétion exploite l'insertion par recombinaison homologue d'une cassette de résistance et du gène de contre-sélection *sacB* dans le gène ciblé. À la suite de la conjugaison, les cellules sont étalées sur milieu contenant l'antibiotique de sélection de la cassette pour sélectionner les clones ayant effectués la première recombinaison. Cette cassette est excisable à

la suite de son insertion par un deuxième événement de recombinaison et l'absence du gène *sacB* peut être sélectionnée par l'ajout de sucrose (concentration finale de 100 g·L⁻¹) dans le milieu. L'enzyme SacB produira un métabolite toxique à partir du sucrose et seuls les mutants ayant excisés la cassette pourront croître. La délétion du gène et la perte de *sacB* sont confirmées par amplification par PCR utilisant les amorces décrites dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.3 Liste des plasmides utilisés durant le projet.

Nom	Utilité	Référence
pUT-mini-Tn5-Km	Transposition du mini-Tn5	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
pEX18Ap-Δ <i>gacA</i> (pFJP19)	Délétion du gène <i>gacA</i>	(Jean-Pierre, 2017)
pEX18Ap-Δ <i>hptB</i>	Délétion du gène <i>hptB</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2016)
pUCP20- <i>pqsE</i>	Complémentation <i>pqsE</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2009)
pFLP2	Excision de la cassette tetR du rapporteur P _{rsmZ} - <i>lacZ</i>	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)

2.4 Criblage par mutagénèse aléatoire avec le transposon mini-Tn5-Km

Pour identifier les gènes impliqués dans la surexpression de *RsmZ* sur une surface, observée chez le mutant PA14 $\Delta hptBgacA::MrT7$, un criblage par transposon a été effectué en utilisant le transposon Tn5-Km, notamment à cause d'une incompatibilité de marqueurs de résistance avec la souche et d'autres transposons. Le transposon mini-Tn5-Km possède une cassette de résistance à la kanamycine et est contenu dans le plasmide pUT. La Figure 2.4.1 résume les étapes du criblage.

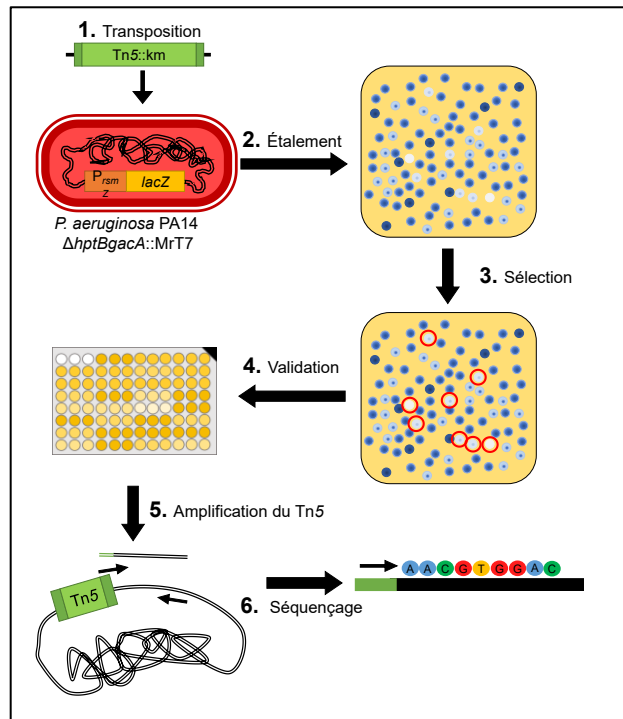


Figure 2.4.1 Schéma de la méthodologie du criblage Tn5::km

1. Transposition du transposon Tn5::km dans la souche $\Delta hptBgacA::MrT7$ P_{rsmZ} -*lacZ*. 2. Étalement des transposants sur milieu M9DCAA. 3. Sélection des transposants blancs. 4. Validation de la transcription de *rsmZ* par dosage β -gal. 5. Extraction de l'ADN génomique des candidats et amplification du Tn5 par PCR. 6. Identification du site d'insertion par séquençage Sanger.

2.4.1 Ajout du rapporteur P_{rsmZ} - $lacZ$ dans le mutant PA14 $\Delta hptBgacA::MrT7$

Pour évaluer l'expression du gène *rsmZ* et identifier les transposants ayant une potentielle inactivation de la surexpression de *rsmZ* quand la souche est cultivée sur une surface, l'utilisation du rapporteur transcriptionnel P_{rsmZ} - $lacZ$ a été envisagée. Ce rapporteur couple la région promotrice de *rsmZ* à la région codante de l'enzyme bêta-galactosidase (β -gal) $LacZ$, permettant ainsi de mesurer indirectement le niveau d'expression de *rsmZ* en mesurant la quantité de β -galactosidase produite par le rapporteur. Le rapporteur se trouve sur le plasmide pMiniCTX- P_{rsmZ} - $lacZ$ (tetR). Il s'agit d'un plasmide intégratif possédant un site nommé AttP capable d'intégrer une région génomique AttB par recombinaison homologe. Le résultat est une construction permanente dans le génome de la souche d'étude, sans devoir la maintenir par l'ajout d'antibiotiques, à l'instar des plasmides. Le plasmide pMiniCTX- P_{rsmZ} - $lacZ$ a été transféré dans le génome de *P. aeruginosa* par conjugaison de la souche donneuse *E. coli* SM10. *P. aeruginosa* et la souche donneuse sont cultivées sans agitation à 42°C et 37°C, respectivement, jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) à 600nm d'environ 2,0. Les deux cultures sont alors centrifugées, les culots sont combinés et resuspendus dans un volume total de 100-150 μ L avec du TSB. Ce volume est déposé au centre d'une gélose nutritive puis incubé à 37°C de 20h à 24h. Les cellules sont récoltées et étalées sur milieu gélosé nutritif avec ajout de tétracycline 125 μ g/mL pour sélectionner les *P. aeruginosa* ayant intégré la construction et ajout de triclosan 25 μ g/mL pour contre sélectionner la souche donneuse *E. coli*. Les clones obtenus à la suite de la sélection par l'antibiotique sont testés pour leur capacité à produire la β -galactosidase.

2.4.2 Excision de la cassette de résistance du rapporteur

La cassette de résistance *tetR* (résistance à la tétracycline) se situe entre deux sites cible de la recombinase Flp appelés *frt*, permettant ainsi l'excision de la cassette de l'insertion chromosomique par le système employant la recombinase Flp. Pour effectuer l'excision de la cassette, le plasmide pFLP2 exprimant la recombinase est transféré dans la souche d'intérêt par électroporation. La souche d'intérêt est cultivée durant la nuit jusqu'à l'obtention d'une culture dense. Cette culture est par la suite lavée trois fois par centrifugation et resuspension du culot

dans une solution de 300 mM de sucrose. Après ces étapes de lavage, les bactéries sont suspendues dans un volume final de 100 μ L de solution sucrose (300 mM). À ces cellules est ajouté 1 μ L du produit d'extraction du plasmide pFLP2 obtenu par la trousse Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen). Le mélange est placé dans une cuvette d'électroporation de 2mm et subi une tension de 2500V (1300V pour une cuvette de 1mm). Les cellules traitées sont rapidement resuspendues dans 1mL de milieu TSB, incubées au moins une heure à 37°C, puis étalées sur milieu TSA contenant 250 μ g/mL de l'antibiotique carbénicilline pour maintenir le plasmide. Les clones obtenus sont alors striés en parallèle sur milieu gélosé avec et sans ajout de tétracycline. Les souches qui ont bel et bien subies l'excision ont perdu la cassette de résistance *tetR* et ainsi la capacité de croître en présence de tétracycline.

2.4.3 Transposition du mini-Tn5-Km

Le transfert du plasmide pUT-mini-Tn5-Km a été effectué par conjugaison de la souche donneuse *E. coli* X7213 vers le mutant PA14 Δ *hptBgacA::MrT7 ::CTX-P_{rsmZ}-lacZ*. La souche de *E. coli* X7213 est auxotrophe et doit donc être cultivée en présence d'acide diamino pimélique (DAP, *Diaminopimelic acid*) dans le milieu à une concentration finale de 100 mg/L. La conjugaison a été effectuée par la méthode de la goutte. En bref, *P. aeruginosa* et la souche donneuse sont cultivées sans agitation à 42°C et 37°C, respectivement, jusqu'à DO₆₀₀ = 2,0. Les deux cultures sont alors centrifugées, les culots sont combinés et resuspendus dans un volume total de 100-150 μ L de TSB. Ce volume est déposé au centre d'une gélose TSA puis incubé à 37°C de 20 à 24h. Les cellules sont récoltées et resuspendues dans une solution de stockage à -80°C (TSB + 40% glycérol) en plusieurs aliquots de 100 μ L. Pour estimer la quantité de transposants obtenus, un aliquots est utilisés pour effectuer un décompte des colonies capable de croître sur milieu contenant l'antibiotique néomycine à une concentration de 200 μ g/mL, indiquant l'intégration du transposon mini-Tn5-Km.

2.4.4 Culture et sélection des transposants

La sélection des transposants se fait sur milieu M9DCAA supplémenté de 300mg/L de néomycine, 80 mg/L de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et solidifié avec 15 g/L d'agar bactériologique (ALPHA Biosciences). Le milieu est coulé dans des grandes plaques de culture de 20 cm x 20 cm (environ 200mL par plaque), et séché quelques minutes dans une enceinte de sécurité biologique. À partir de l'estimation de la quantité de transposants par aliquot, un volume de cet aliquot est sélectionné pour étaler sur chaque plaque de criblage. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 24 heures puis laissées à température ambiante pour 20-24 heures supplémentaire. Les mutants pour lesquels le transposon ne provoque pas d'effet sur la transcription de *rsmZ* apparaissent bleus à cause de la suractivation du rapporteur P_{rsmZ} -*lacZ* intégré dans leur chromosome. La bêta-galactosidase LacZ ainsi produite hydrolysera le X-Gal dans le milieu, libérant le groupement indole du galactose et formant un pigment bleuté. Les transposants apparaissant blancs ou bleus pâles ont été sélectionnés pour leur possible diminution d'expression de *rsmZ*. Ces transposants ont été striés de nouveau sur milieu nutritif contenant 200 μ g/mL de néomycine, puis stockés au congélateur -80°C.

2.4.5 Évaluation qualitative et dosage de la β -galactosidase

Les transposants d'intérêts obtenus ont été analysés pour confirmer leur niveau d'expression de la β -galactosidase. Ceux-ci ont été cultivés dans du TSB jusqu'à l'obtention d'une culture dense dilués à une densité optique à 600nm = 3,0. Trois gouttes de 5 μ L de cette suspension de cellule ont été déposées sur la surface d'un milieu M9DCAA solide contenant du X-gal. Les milieux inoculés ont été incubés à 34°C pendant 12 heures. À la suite de l'incubation, la couleur des colonies formées par les gouttes de suspension a été notée. Les colonies ont par la suite été suspendues dans du PBS. Cette suspension a été utilisée pour le dosage de la β -galactosidase par l'un des deux protocoles suivants :

[1] protocole basé sur l'essai original de Miller (Miller, 1972). Les cellules sont suspendues dans 1 mL de PBS. La lecture de la DO à 660nm est utilisée pour estimer la quantité de cellules dans la suspension, puis 100 μ L de cette suspension sont transférés dans 900 μ L de tampon

réactionnel (Tampon Z : 16,1 g/L Na₂HPO₄·7H₂O; 5,5 g/L NaH₂PO₄·H₂O; 0,75 g/L KCl; 0,246 g/L MgSO₄·H₂O et 2,7 mL/L de β-mercaptoéthanol) puis les cellules sont lysées par l'ajout de deux gouttes de chloroforme et une goutte de SDS 0.1%, vortexées 10 secondes et incubées à 30°C pendant 5 min. L'ajout de 200 µL de solution contenant le réactif ONPG (ortho-nitrophényl-β-D-galactopyrannoside) à une concentration de 4 g/L dans un tampon phosphate (0.1 M, pH 7). L'ajout de cette solution démarre la réaction, qui repose sur le principe que la molécule de couleur jaune ONP (ortho-nitrophénol), normalement couplée à un galactose (formant l'ONPG qui ne possède pas de couleur), est libérée dans la solution par l'activité β-galactosidase de l'enzyme LacZ. La réaction est arrêtée par l'ajout de 200 µL de Na₂CO₃ 1M et le temps de réaction est noté. L'intensité de la couleur jaune formée par la libération du ONP peut être mesurée par la lecture de la DO à 420nm de la solution. Avant la lecture de la DO, les tubes contenant la réaction sont centrifugés pour retirer les déchets cellulaires. En connaissant l'intensité de la couleur jaune (DO₄₂₀), la concentration de cellules (DO₆₀₀) et le temps de réaction, il est possible de calculer le nombre d'enzymes LacZ ayant participé à la réaction, par cellules, grâce à la formule de Miller :

$$\text{Unités de Miller} = \frac{1000 * DO1}{T * v * DO2}$$

Équation 2.4.1 Formule originale pour le calcul de l'activité β-gal.

Où

- DO1 représente la DO 420nm mesurée à la suite de la réaction,
- T représente le temps de réaction (en minutes),
- v représente le volume de cellules ajouté à la réaction (en mL),
- DO2 représente la concentration de cellule (DO₆₀₀).

L'Unité de Miller donne un indice de la quantité de β-galactosidase produite par un rapporteur (transcriptionnel ou traductionnel).

[2] protocole de dosage à haut débit proposé par Thibodeau et ses collaborateurs (Thibodeau *et al.*, 2004). Les cellules provenant de la colonie sacrifiée sont resuspendues dans 200 µL de PBS dans un puit de plaque 96 puits. Une lecture de la DO₆₀₀ est effectuée au NanoDrop (lecture individuelle de chaque puit) ou au Cytation 3 (lecture de la plaque entière). La lyse des cellules est effectuée en prélevant 80 µL de la suspension et en y ajoutant 20 µL de solution de lyse (5X) constitué de Popculture 5X (Millipore) supplémenté de 5 g/L lysozyme (Sigma), en mélangeant à

la pipette et incubant à 30°C pendant 20 minutes. La réaction est effectuée en cinétique dans une plaque 96-puits. Le mélange réactionnel est constitué de 135 µL du tampon de réaction (Buffer Z), 20 µL de lysat cellulaire et 30 µL du réactif ONPG (4 g/L). L'ajout du ONPG démarre la réaction et la plaque doit être insérée rapidement dans le lecteur de plaque (Cytation 3). L'appareil prend une lecture de la DO₄₂₀ de la plaque entière à toutes les 15 secondes pendant une heure. La pente de DO₄₂₀ en fonction du temps est utilisée pour calculer les Unités de Miller selon la formule :

$$\text{Unité de Miller} = \frac{1000 * P * FC1 * FC2}{DO2 * v * FC3}$$

Équation 2.4.2 Formule de Miller adaptée pour la mesure de l'activité β-gal en plaque 96-puits

où P représente la pente de la courbe de la DO₄₂₀ en fonction du temps (en minute),
 FC1 représente le facteur de correction pour une lecture de la DO₄₂₀ au lecteur de plaque,
 FC2 représente le facteur de correction de l'effet de l'ajout de Na₂CO₃ sur la DO₄₂₀,
 DO2 représente la concentration de cellule dans la suspension utilisée dans la réaction,
 v représente le volume de la suspension utilisé pour la réaction,
 FC3 représente le facteur de correction pour une lecture de DO₆₀₀ effectuée au lecteur de plaque.
 L'Unité de Miller donne un indice de la quantité de β-galactosidase produite par un rapporteur (transcriptionnel ou traductionnel).

FC1 corrige pour une lecture au lecteur de plaque (comparativement au Nanodrop), FC2 corrige pour l'effet de l'ajout de Na₂CO₃ sur la DO₄₂₀. L'ajout de Na₂CO₃ intensifie la couleur jaune du ONP, le protocole haut-débit n'utilise pas de Na₂CO₃ et ce facteur corrige pour cette étape manquante, FC3 corrige pour une lecture de DO₆₀₀ effectuée au lecteur de plaque (comparativement au Nanodrop). Les trois facteurs de correction (FC1, FC2 et FC3) sont requis seulement lorsque les résultats doivent être comparés à des essais effectués avec le protocole original et n'influence pas le résultat relatif obtenu au sein d'un même essai. La valeur des différents facteurs de correction est évaluée à FC1 = 1,98; FC2 = 2,13 et FC3 = 3,00 :

Le calcul du FC1 se fait par une mesure parallèle de solution d'ONP à plusieurs concentrations. Pour ce faire, un mélange réactionnel d'essai β-galactosidase est laissé réagir jusqu'à l'hydrolyse complète de l'ONPG. Ce mélange est dilué en série puis la DO₄₂₀ est mesurée à la fois pour chaque dilution grâce au NanoDrop et au Cytation 3. La mesure du NanoDrop est mise en

fonction de la mesure au Cytation 3, la pente résultante correspondant au facteur FC1 (Figure 2.4.2).

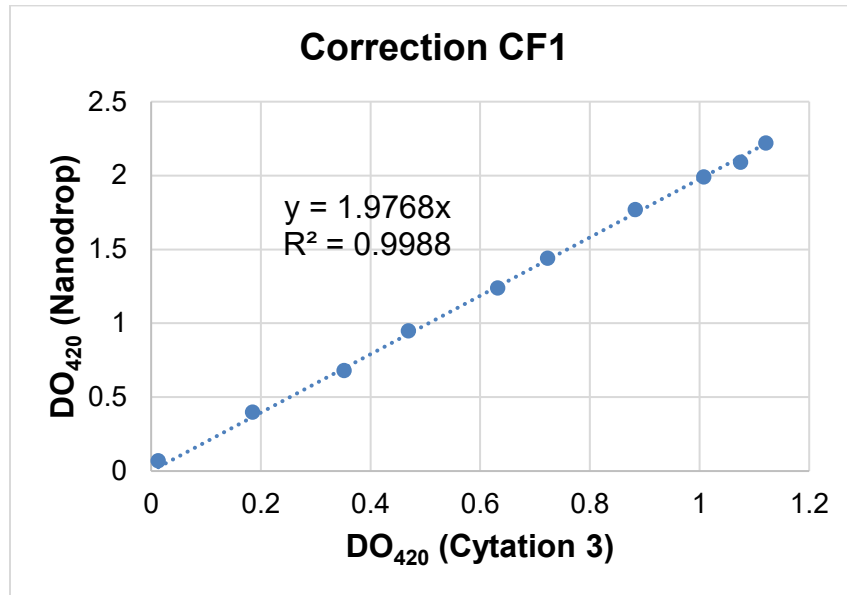


Figure 2.4.2 Calcul du facteur de correction 1

Le calcul du FC2 se fait par une mesure parallèle de solution d'ONP à plusieurs concentrations avec et sans ajout de Na₂CO₃, au Cytation 3. La mesure de DO₄₂₀ de la solution avec Na₂CO₃ est mise en fonction de la DO₄₂₀ de la solution sans ONPG, la pente résultante correspondant au facteur FC2 (2,13) (Figure 2.4.3).

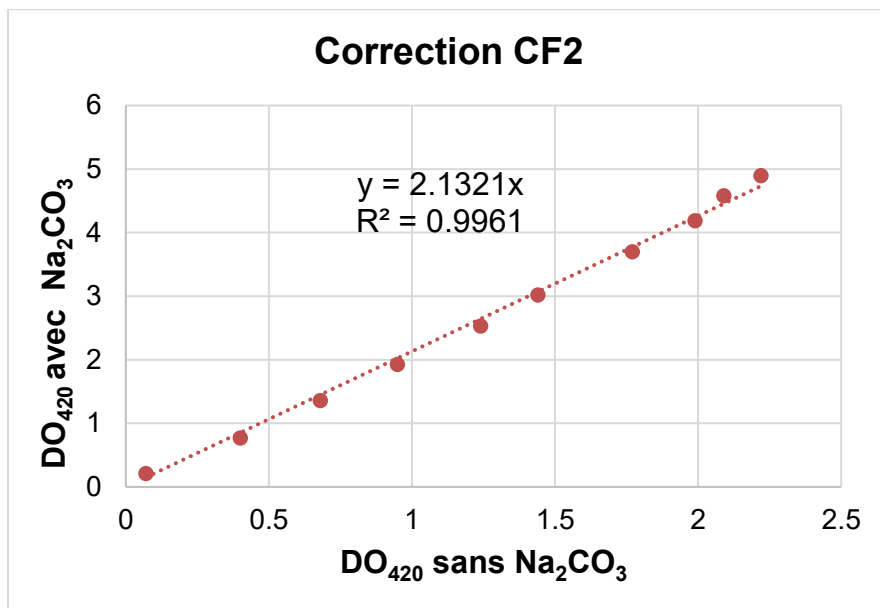


Figure 2.4.3 Calcul du facteur de correction 2

Le calcul du FC3 a été fait en mesurant la DO₆₀₀ de plusieurs dilutions de suspension bactérienne en parallèle avec le NanoDrop et le Cytation 3. Les mesures du NanoDrop ont été mise en fonction des mesures au Cytation 3, la pente résultante correspondant au FC3. Deux mesures ont été prises pour chaque suspension, la moyenne des pentes (2,99 et 3,01) a été arrondie à FC3 = 3,00 (Figure 2.4.4).

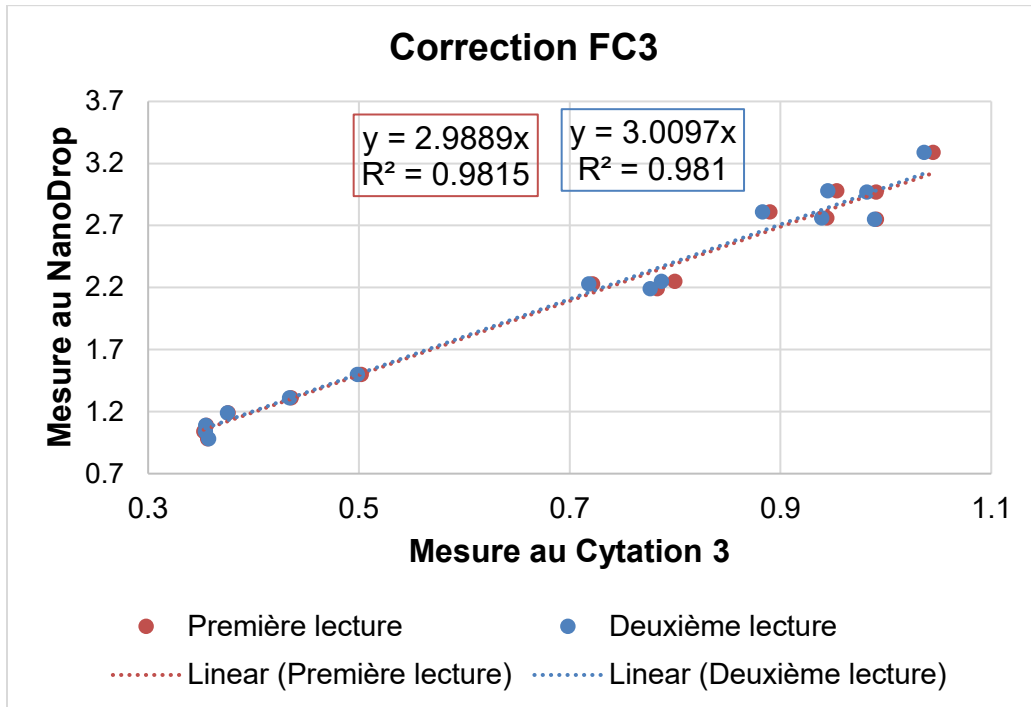


Figure 2.4.4 Calcul du facteur de correction 3

Les transposants jugés intéressants avaient une apparence nettement plus pâle lorsque cultivés sur milieu avec X-Gal et/ou une diminution significative du niveau de transcription de *rsmZ* évalué par le dosage β -galactosidase.

2.4.6 Extraction d'ADN et amplification du site d'insertion du transposon

L'ADN génomique des transposants intéressants a été extrait par une méthode d'extraction rapide d'ADN. Une culture dense de chacun des transposants a été centrifugée, lavée avec du PBS, puis resuspendue dans du PBS. La suspension a été chauffée à 100°C pendant 10 minutes

puis incubée sur glace pendant un autre 10 minutes. La suspension traitée a été centrifugée à vitesse maximale (17 000 x g) pour retirer les déchets cellulaires et le surnageant a été récolté dans un microtube propre. L'ADN ainsi extrait a été utilisée pour l'amplification de la région d'insertion du transposon par la méthode du PCR double ronde niché (nPCR).

La méthode d'amplification du transposon est basée sur celle de Jacobs (Jacobs *et al.*, 2003). Un nPCR permet une amplification très spécifique d'un produit en effectuant deux réactions PCR successives, la deuxième utilisant le produit PCR de la première ronde. Pour amplifier le site d'insertion du transposon, une amorce spécifique à la séquence en 3' du transposon et trois amorces partiellement aléatoires (dégénérées) sont employées lors de la première sonde pour amplifier un grand nombre de séquences, dont certaines représentant la région en aval du transposon. Les amorces dégénérées (Tableau 2.2) (ex : CEKG2A 5' GGCCACGCGTG-ACTAGTACNNNNNNNNNAGAG 3') possèdent à partir du 3' quatre ou cinq nucléotides fixe et 10 nucléotides aléatoires. Cette séquence sert de premier site aléatoire lors de la première ronde, les nucléotides fixes servant à réduire la fréquence de liaison de l'amorce dans le génome pour éviter une surabondance de fragments de tailles différentes. Les trois amorces aléatoires utilisées (CEKG2A, CEKG2B et CEKG2C, Tableau 2.2) ont une fréquence de liaison dans le génome combinée d'environ une liaison par 200 nucléotides. L'amorce contient également une séquence de 19 nucléotides connus qui permettra d'utiliser des amorces spécifiques à cette portion lors de la deuxième ronde. Cette dernière permet alors une amplification spécifique des fragments en aval du transposon. Il existe tout de même une possibilité que des fragments non spécifiques soient amplifiés par deux amorces aléatoires, mais cette possibilité est assez faible considérant le ratio 50/50 entre les amorces transposon-spécifiques et aléatoires. De plus, ces fragments ne seront pas séquencés puisqu'une des amorces spécifiques au transposon (CM_Tn5_OEnd_R2) est utilisée pour le séquençage. L'amplification a été effectuée avec l'enzyme EasyTaq (TransGen Biotech).

2.4.7 Identification du site d'insertion du transposon

Les produits du nPCR sont séquencés par la méthode de Sanger. Les chromatogrammes obtenus sont analysés pour évaluer la qualité des séquences, une série d'une vingtaine de nucléotides de

bonne qualité étant suffisant pour identifier de façon fiable le gène touché. Les séquences adéquates sont alignées sur le génome de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 par l'algorithme BLASTn grâce à la banque de donnée Pseudomonas.com (<http://pseudomonas.com/blast/setnblast>). La séquence obtenue représente la position en aval du transposon, l'orientation de cette séquence représentant l'orientation dans laquelle le transposon s'est inséré dans le génome. La liste complète des séquences obtenues pour chacun des transposants se trouve dans le Tableau 9.0.1.

2.5 Motilité de type *swarming*

Cette méthode est basée sur la procédure développée auparavant par Julien Tremblay (Tremblay & Deziel, 2008). Pour évaluer la capacité de mutants de *P. aeruginosa* à effectuer la motilité de type *swarming*, les mutants sont cultivés jusqu'à une DO 600nm d'environ 3,0 à 4,0, puis dilués à une DO = 3,0. Les cultures diluées sont inoculées au centre d'une gélose M9DCAA semi-solide séchée 75 minutes sous une enceinte de sécurité biologique, un inoculum par gélose, trois réplicats par mutant. Les géloses sont inoculées à 30°C ou 34°C pendant 16h à 24h, ou plus selon le cas. Finalement, chaque gélose est prise en photo par un appareil Canon.

L'essai donne une valeur qualitative de la capacité à effectuer la motilité de type *swarming* en comparant à une souche de référence adéquate. La souche de référence principale est la souche de type sauvage de *P. aeruginosa* PA14, mais d'autres souches peuvent servir de références. C'est le cas des mutants du criblage (PA14 $\Delta hptBgacA::MrT7::CTX-P_{rsmZ}-lacZ::mini-Tn5-Km$) comparés au mutant. PA14 $\Delta hptBgacA::MrT7::CTX-P_{rsmZ}-lacZ$ (souche de base du criblage).

2.6 Motilité de type *swimming*

Le *swimming* est la motilité effectuée en milieu liquide ou à faible viscosité par *P. aeruginosa*. Pour évaluer cette motilité, une culture dense de *P. aeruginosa* est diluée à une DO₆₀₀ = 3,0. Cette culture diluée est alors inoculée par l'insertion d'un cure-dent, préalablement imbibé de la culture de la souche à tester, à l'intérieur d'une gélose M9DCAA solidifiée avec seulement 0.25% de Bacto-agar (Difco), puis séchée 15 minutes sous une enceinte de sécurité biologique.

Une seule goutte est déposée par gélose par réplicats. La motilité de type *swimming* dépend de l'activité flagellaire de la souche testée et est un bon indicateur de l'effet d'une mutation sur la synthèse ou l'activité du flagelle chez *P. aeruginosa*.

2.7 Extraction d'ARN et RT-qPCR

Pour confirmer l'impact sur le nombre de transcrits de *RsmZ* chez divers mutants, une analyse par RT-qPCR a été effectuée. Pour ce faire, les acides nucléiques totaux, (ADN et ARN) ont été extraits à partir d'une culture liquide, ou en surface semi-solide (*swarming*) ou solide (colonies).

Pour les cultures liquides, une préculture dense (en croissance durant la nuit) de *P. aeruginosa* a été utilisée pour inoculer à une DO_{600} de 0.05 un volume de 5 mL de milieu M9DCAA, un réplicat biologique par tube, trois réplicats par mutant testé. Après 6 heures d'incubation à 30°C, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 1 mL de TransZol (Civic Biosciences, Beloeil, Qc), puis stocké au congélateur -80°C.

Pour les cultures en milieu solide, une préculture dense de *P. aeruginosa* a été diluée à une $DO_{600} = 3,0$, puis inoculée par l'ajout d'une goutte de 5 μ L de culture qui formera une colonie sur la surface d'un milieu solide M9DCAA, trois colonies par réplicat biologique (provenant de la même préculture), trois réplicats par mutant testé (trois précultures différentes). Les milieux ont été incubés 12 heures à 30°C, puis les colonies ont été resuspendues directement dans 1mL de solution TransZol. Les suspensions de cellules sont placées au congélateur -80°C jusqu'à la suite de l'extraction.

Pour une extraction à partir d'un milieu semi-solide (*swarming*), une culture dense de *P. aeruginosa* a été diluée à une DO_{600} de 3,0, puis inoculée par l'ajout d'une goutte de 5 μ L de culture au centre d'un milieu semi-solide M9DCAA, trois géloses par réplicats, trois réplicats par mutant testé. Les mutants non-*swarmer* peuvent être placés sur une même gélose). Après 12 heures d'incubation à 30°C, les pointes de dendrites et les centres de colonie sont extraits indépendamment l'un de l'autre et placés dans une solution de RNAlater (Ambion). Les pointes de dendrites sont récoltées en pipettant vigoureusement 10 μ L de RNAlater pour décoller et resuspendre la pointe dans la solution. Les centre de colonie *swarming* sont séparés avec un tube de type Falcon stérile de 15 mL puis déplacés vers un contenant (Pétri) stérile. Les bactéries y

sont resuspendues dans 1 mL de RNAlater. Les cellules en suspension dans la solution de RNAlater arrêtent de produire ou dégrader leur ARN. Pour les séparer de cette solution, les cellules sont lavées puis resuspendues dans 1 mL de TransZol. Les cellules dans le TransZol sont placées dans le congélateur -80°C jusqu'aux prochaines étapes d'extraction.

Pour la suite de l'extraction, les cellules dans le TransZol sont décongelées complètement à la température de la pièce. Au TransZol est ajouté 200 µL de chloroforme, le mélange est agité vigoureusement (avec les mains) pendant 30 secondes (jusqu'à une apparence laiteuse de la suspension) et incubé trois minutes à température pièce. Les échantillons sont alors centrifugés à 4°C, 10 000 x g pendant 15 minutes. À la suite de la centrifugation, 500 µL de la phase aqueuse (translucide et incolore, phase supérieure dans le tube) est récoltée en prenant bien soin de ne pas toucher aux autres phases. Si une très faible quantité de cellules a été récoltée, l'ajout de 5 µL de glycogène peut aider les rendements d'extraction en favorisant la précipitation de l'ARN. La précipitation des acides nucléiques est effectuée en ajoutant 500 µL d'isopropanol froid, le tout est bien mélangé par inversion (sans vortex). Conserver ce mélange au congélateur -20°C pendant toute une nuit aide à la précipitation des acides nucléiques. Le mélange est centrifugé à 4°C, 10 000 x g pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré puis remplacé par 1 mL d'éthanol 75% froid pour laver le culot d'acides nucléiques. Les échantillons sont vortexés 5 secondes puis centrifugés de nouveau à 4°C, 7500 x g pendant 5 minutes. L'éthanol est retiré et les culots sont séchés à l'intérieur d'une enceinte de sécurité biologique (10 minutes). Un volume de 50 µL d'eau ultrapure sans RNase est ajouté et les culots sont incubés 10 minutes à 55°C pour dissoudre les acides nucléiques. La qualité de l'ARN extrait est validée en migrant 2 µL sur gel 1%, 120 V pendant 15 minutes. Les bandes d'ARN ribosomiaux (ARNr) 23S et 16S doivent être visibles pour considérer l'extrait comme réussie. La concentration et la pureté des acides nucléiques est mesurée au spectrophotomètre Nanodrop en analysant 2 µL du produit d'extraction. La concentration d'acide nucléique doit être suffisante pour la poursuite des traitements (au moins 50-100 ng/µL). Les ratios de l'absorbance 260 nm/absorbance 280 nm (A_{260}/A_{280}) et absorbance 230 nm/absorbance 260 nm (A_{230}/A_{260}) sont mesurés ; le ratio A_{260}/A_{280} indique une contamination par des protéines si <1.8 et le ratio A_{230}/A_{260} indique une contamination par du phénol ou des sels si <1.8 . Un bon ratio A_{260}/A_{280} est crucial pour la poursuite des opérations. Les acides nucléiques sont conservés sur glace à court terme et au congélateur à moyen et long terme.

Avant d'effectuer la transcription inverse, il faut obligatoirement retirer toutes traces d'ADN génomique. Cette étape est réalisée par le traitement des acides nucléiques par une enzyme DNase fournie dans la trousse Turbo DNase (Invitrogen). Selon les instructions du fabricant, un volume de 20 µL d'acides nucléiques est traité par deux traitements de 2 µL de Turbo DNase, incubation d'une heure à 37°C. La réaction est inhibée en ajoutant 5 µL du réactif d'inactivation au mélange réactionnel et en incubant 5 minutes à la température de la pièce. Le réactif peut être retiré en centrifugeant la réaction et transférant le surnageant dans un nouveau tube. L'absence d'ADN génomique est évaluée par une amplification PCR du fragment du gène *nadB* (le même fragment utilisé pour l'analyse RT-qPCR). Il s'agit d'une réaction de PCR très spécifique de 40 cycles.

Une fois libre d'ADN génomique, l'ARN doit être converti en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse (RT, rétrotranscription). Cette étape utilise la trousse de RT iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). Les ARN doivent être dilués pour obtenir une quantité totale de 50ng dans la réaction de RT. La réaction est effectuée grâce à un thermocycleur et les transcriptases inverses sont inactivées par un traitement à 65°C pendant 20 minutes. Les ADNc obtenus sont conservés pour les analyses d'expression.

L'analyse d'expression se fait par la PCR quantitative utilisant l'ADNc obtenu des mutants. La qPCR est effectuée grâce à la trousse Ssoadvanced Universal SYBR GREEN Supermix (Bio-Rad). Une réaction pour chacun des gènes cibles doit être effectuée, plus un gène de référence, dans notre cas, le gène *nadB*. Le fluorophore SYBR Green permet de suivre en temps-réel l'amplification de l'ADNc et ainsi de connaître la quantité de transcrits relative au gène de référence. Cette expression relative est exprimée par la formule :

$$\text{Expression relative} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Équation 2.7.1 Formule d'expression relative par analyse RT-qPCR

Où $\Delta\Delta CT$ réfère à la différence de cycle de détection (*CT*, *cycle threshold*) entre le gène analysé et le gène de référence (ΔCT) et la différence de ses ΔCT entre les conditions analysées (souvent le résultat d'un mutant comparé à la souche sauvage).

2.8 Dosage β -gal en cinétique

Le même rapporteur utilisé dans le cadre du criblage a été utilisé pour suivre l'expression de *rsmZ* en cinétique. Cette cinétique a été faite à partir de mutants de *P. aeruginosa* cultivés sous forme de colonie en milieu M9DCAA solide (1,5% agar). Pour ce faire, des précultures (une préculture par réplicat biologique) ont été ajustées à une $DO_{600} = 0,15$ puis incubé environ six heures pour obtenir des cultures liquides synchronisées à la même phase de croissance. Ces cultures ont été ajustées à une $DO_{600} = 3,0$, puis une goutte de 5 μ L a été déposée à la surface du milieu gélosé. Une ou plusieurs gouttes peuvent être déposées pour un même réplicat selon la quantité de biomasse requise pour l'essai, les premiers points de mesure de la cinétique requièrent plusieurs gouttes pour compenser le manque de croissance. Chaque gélose porte les gouttes d'un réplicat par mutant testé, trois réplicats requièrent donc trois géloses. Les colonies sont sacrifiées lors du dosage β -gal, il faut alors prévoir que chaque point de mesure requiert une gélose par réplicat. Les colonies sacrifiées seront traitées comme lors d'un essai β -gal en plaque 96 puits. En bref, les cellules sont resuspendues dans 200 μ L de PBS dans un puit de plaque 96 puits. Une lecture de la DO_{600} est effectuée au NanoDrop et la lyse des cellules est effectuées grâce à la solution de lyse (Popculture 5X, 5 g/L lysozyme). La réaction est effectuée en combinant le mélange réactionnel constitué de 135 μ L du tampon de réaction (Buffer Z), 20 μ L de lysat cellulaire et 30 μ L du réactif ONPG (4 g/L). L'appareil Cytation 3 permet une lecture de la DO_{420nm} de la plaque en cinétique et la pente est utilisée pour calculer les Unités de Miller. Pour chaque point de mesure, le temps post-inoculation est noté. La courbe d'expression de *rsmZ* en fonction du temps par dosage β -gal est alors tracée grâce au logiciel Graphpad Prism 7.

3 RÉSULTATS

3.1 Criblage par transposition et gènes impliqués dans la surexpression du pARN *RsmZ*

3.1.1 Génération de la banque de transposants

Des résultats récents obtenus dans le laboratoire Déziel ont mis en lumière un contrôle *gacA*-indépendant de l'expression de *rsmZ* lorsque *P. aeruginosa* se développe sur une surface. Cette surexpression de *rsmZ* est visible chez le mutant PA14 $\Delta hptB gacA::MrT7$, mais pas chez le mutant PA14 *gacA::MrT7*, suggérant qu'il s'agisse d'une voie de régulation contrôlée par HptB (Figure 1.5.2). Des résultats préliminaires à ce projet montrent que cette surexpression de *rsmZ* est suffisante pour produire une coloration bleu foncé avec l'emploi d'un rapporteur $P_{rsmZ-lacZ}$ lorsque le mutant est cultivé avec du X-Gal dans le milieu. Ce rapporteur a donc été utilisé pour conduire un criblage par transposition pour identifier les gènes impliqués dans cette surexpression de *rsmZ*.

La mutagenèse aléatoire a permis de cribler environ 60 000 transposants. De ceux-ci, 190 mutants avec une potentielle réduction d'expression du gène *rsmZ* ont été isolés et congelés pour la confirmation de l'expression de *rsmZ* par le dosage β -gal. La liste de tous les transposants obtenus est compilée dans le tableau de l'Annexe I.

Ce tableau indique également des détails sur la coloration des colonies (niveau de dégradation du X-gal) lors de leur isolation sur les plaques de criblages et lors des essais β -gal sur milieu solide.

3.1.2 Confirmation de l'expression de *rsmZ* par dosage de la β -gal en croissance sur une surface

Pour valider l'impact qu'a l'insertion du transposon sur l'expression de *rsmZ* chez chacun des transposants, un dosage de la β -galactosidase produite par le rapporteur a été effectué à partir de colonies en croissance sur un milieu gélosé solide contenant du X-Gal. Des 190 transposants isolés, 53 montraient une réduction significative du niveau de transcription du pARN *RsmZ* en dosage β -gal et/ou une réduction visuelle (qualitative) du pigment bleu causée par l'hydrolyse du X-Gal (aspect visuel des colonies avant le dosage β -gal), comparativement à la souche de base

du criblage. Dans certains cas, la colonie formée par un transposant apparaissait plus pâle que la souche PA14 $\Delta hptBgacA::MrT7::CTX-P_{rsmZ}-lacZ$, et ce sans une réduction de l'activité β -galactosidase (ou vice versa). Dans ces cas, le mutant a été considéré intéressant et a été analysé par séquençage. Il existe également quelques cas ambigus où une faible activité β -gal qualitative ou quantitative a été observée, le site d'insertion du transposon a alors également été identifié. La liste complète des mutants, ainsi que le résumé des résultats du dosage et évaluations visuelles, est présentée à l'Annexe I.

Les données du dosage pour les principaux transposants (élimination des redondances et des gènes impliqués dans le métabolisme primaire) sont présentées dans la Figure 3.1.1, les données complètes pour les dosages sont présentées en Annexe II.

3.1.3 Identification des gènes impliqués dans l'expression de *rsmZ*

Le site d'insertion du transposon des candidats intéressants a été amplifié par nPCR puis séquencé. La séquence obtenue par le séquençage correspond à la région en aval (3') du transposon et permet de localiser l'insertion et d'identifier le gène affecté. Les diverses insertions obtenues ont été groupées puis listées dans le tableau 3.1.1. La liste complète des candidats séquencés et leur site d'insertion et gène affecté correspondant est présentée dans le tableau de l'Annexe III. Parmi ces gènes, nous retrouvons ceux impliqués dans le système de *quorum sensing* PQS. Ces gènes sont très bien caractérisés et récurrents dans le criblage et codent pour les synthèses de la molécule HHQ (PqsA-D), son récepteur (MvfR) et le régulateur PqsE. Il est possible que l'insertion dans les gènes *pqsA*, *pqsC* et *pqsD* provoquent un effet polaire sur *pqsE* à cause de la nature du transposon et de l'organisation de l'opéron. D'autres groupes fonctionnels, quatre gènes impliqués dans le métabolisme du carbone, deux gènes liés au métabolisme du soufre et quatre gènes responsables de la production de la pyocine de type R ont été retrouvés chez les transposants. La pyocine de type R est une bactériocine ayant une activité antimicrobienne face aux différentes souches de *P. aeruginosa* très importante pour le *fitness* et la compétition interbactérienne. Trois gènes impliqués dans le fonctionnement du ribosome (*truB*, *rluD* et *prfC*) ont été identifiés, suggérant un impact indirect du contrôle de l'activité du ribosome sur la transcription de *rsmZ* — via la modulation de la traduction d'un régulateur

potentiel. Deux gènes codant pour des glycosyl transférases, *fgtA* et *wapB*, ont été identifiés et pourraient être impliqués dans l'adaptation à une surface puisqu'elles glycosylent le flagelle et les lipopolysaccharides, respectivement. Un seul des gènes obtenus code pour un facteur capable de lier l'ADN et propose un mécanisme d'action direct sur l'expression de *rsmZ*, le gène *ihfA*. Ce gène code pour la sous-unité α du régulateur de transcription IHF (*Integration Host Factor*) et pourrait agir sur la transcription de *rsmZ* chez *P. aeruginosa*. Les transposants CMA68 et CMA108 ont subi une insertion de transposon dans leur gène PA14_57510 et PA14_58850, respectivement. Les deux gènes ont une fonction prédite codant pour une lipoprotéine sécrétée (PA14_57510) et une protéine contenant un domaine MOSC (PA14_58850), tous les deux de fonction inconnue. De façon particulière, le transposant CMA108 présente une activité β -gal complètement abolie, laissant suggérer que l'insertion du transposon mini-Tn5 dans le gène PA14_58850 (protéine hypothétique) aurait une grande importance dans l'expression de *rsmZ*, ou qu'il y aurait également une mutation cumulée dans le rapporteur qui cause cette abolition de l'expression d'une β -gal fonctionnelle, ce résultat devra donc être confirmé par RT-qPCR. Il y a également plusieurs autres insertions redondantes dans des gènes codants pour des protéines impliquées dans le métabolisme primaire, comme *aceE* et *zwf* et PA14_53970 (*acnD*), qui sont principalement liés au cycle de l'acide citrique (TCA).

Tableau 3.1 Gènes identifiés par le criblage considérés ayant un impact sur la transcription de *rsmZ* dans une souche Δ *hptBgacA*::MrT7.

Gène affecté	Locus tag (PA14)	Locus tag (PAO1)	Insertions	Fonction
<i>fgtA</i>	PA14 50300	PA1091	1	Glycosylation du flagelle
<i>wapB</i>	PA14 51220	PA1014	1	Glycosylation des LPS
<i>rluD</i>	PA14 60210	PA4544	2	Pseudouridine synthase de l'ARNr
<i>truB</i>	PA14 62730	PA4742	1	Pseudouridine synthase ARNt
<i>prfC</i>	PA14 13410	PA3903	1	Arrêt de traduction
Pyocine type R (<i>prt</i>)	PA14 08060	PA0621	4	Synthèse de la pyocine type R
	PA14 08070	PA0622		
	PA14 08120	PA0625		
	PA14 08150	PA0628		
Aconitate hydratase	PA14 53970	PA0794	4	TCA - Citrate → Isocitrate
<i>nadB</i>	PA14 54450	PA0761	2	Synthèse du NAD
<i>zwf</i>	PA14 23070	PA3183	2	Glucose déshydrogénase
<i>aceE</i>	PA14 66290	PA5015	2	Pyruvate déshydrogénase
Lipoprotéine sécrétée	PA14 57510	PA4446	1	Inconnue
Protéine hypothétique	PA14 58850	PA4536	1	Inconnue
<i>cysM</i>	PA14 52210	PA0932	1	Cystéine synthase
<i>cysG</i>	PA14 30340	PA1611	1	Sirohème synthase
<i>ihfA</i>	PA14 28720	PA2738	1	Régulateur transcriptionnel
<i>pqsA</i>	PA14 51430	PA0996	1	Synthèse des HAQ
<i>pqsC</i>	PA14 51410	PA0998	1	Synthèse des HAQ
<i>pqsD</i>	PA14 51390	PA0999	1	Synthèse des HAQ
<i>pqsE</i>	PA14 51380	PA1000	1	Régulateur du <i>quorum sensing</i>
<i>mvfR</i>	PA14 51340	PA1003	3	Régulateur de l'opéron <i>pqsABCDE</i>
Promoteur de <i>mvfR</i>	PA14 51340	PA1003	1	Régulateur de l'opéron <i>pqsABCDE</i>

Le nombre d'insertions représente le nombre d'insertion indépendantes pour chaque gène. Les gènes codant pour la pyocine de type R sont tous désignés *prt* à cause d'inconsistance quant à l'annotation des cadres de lecture de l'opéron.

3.1.4 Implication du génotype dans l'impact du transposon sur la transcription de *RsmZ*

Pour mieux caractériser l'impact des principales insertions de transposon chez les candidats obtenus grâce au criblage et pour cibler les candidats potentiellement impliqués dans un contrôle surface-dépendant de *rsmZ* sous l'action de HptB, l'activité β -gal de plusieurs transposants obtenus a été comparée à l'activité β -gal de simples mutants correspondants issus de la banque de transposon non-redondante de PA14. Pour ce faire, le rapporteur P_{rsmZ} -*lacZ* a été inséré dans le génome des simples mutants possédant une insertion de transposon dans le même gène que les mutants du criblage. Un dosage β -gal a été effectué pour évaluer l'impact de l'insertion du transposon selon le génotype $\Delta hptB gacA::MrT7$ (triple mutant issu du criblage, Figure 3.1.1) ou WT (simple mutant de la banque, Figure 3.1.2). Les résultats du dosage montrent que la plupart des gènes identifiés provoquent une réduction de la transcription de *rsmZ* seulement dans le génotype de base du criblage alors que *hptB* et *gacA* sont absents (Figure 3.1.1). C'est le cas entre-autres des gènes liés au PQS et de *fgtA*. D'autres délétions ont un impact également dans le génotype sauvage, tels *rluD* et *truB* qui sont tous les deux liés à la pseudouridination des ARNr et ARNt, respectivement, activités étant liées à la traduction. Ce résultat a permis de discriminer entre les potentiels acteurs HptB-dépendants et les gènes impliqués dans un contrôle plus général de *rsmZ*.

La plupart des gènes testés provoquent une réduction significative de leur niveau de transcription de *rsmZ* évaluée par le dosage de la β -gal, lorsque délété en parallèle avec *gacA* et *hptB* (Figure 3.1.1). Ce n'est pas le cas de *pri-* et CMA11 (*wapB-*, Annexe II), ces candidats avaient été analysés par séquençage à cause d'une légère perte du pigment bleu des colonies causée par l'hydrolyse du X-Gal qui ne se traduit pas par un effet lors du dosage.

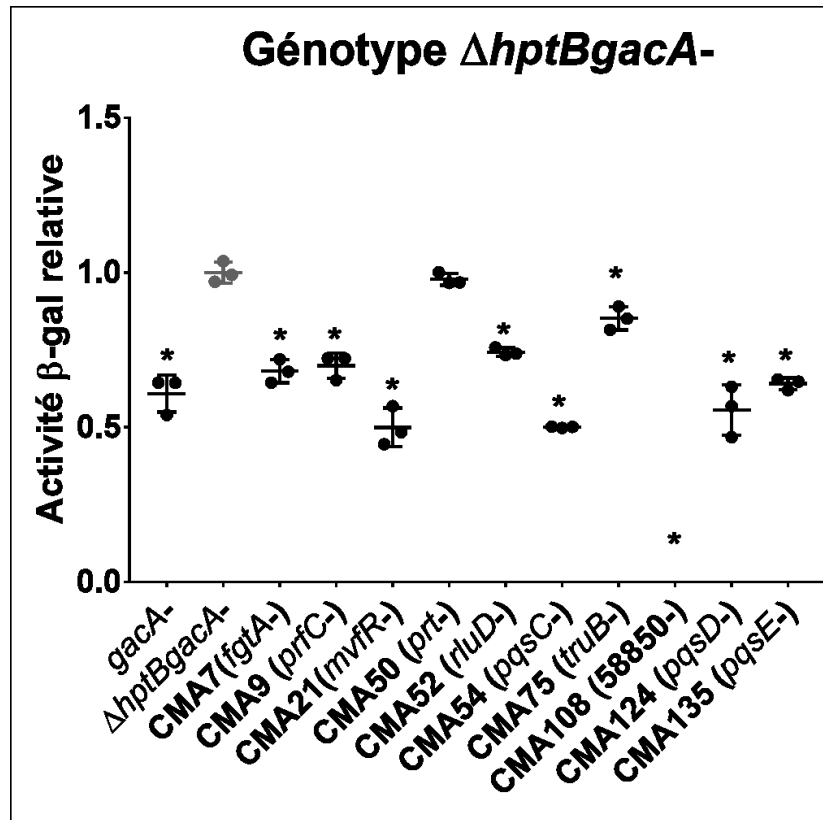


Figure 3.1.1 Dosage β-gal avec le rapporteur transcriptionnel P_{rsmZ} -*lacZ* chez les principaux transposants en culture sur gélose M9DCAA solide (1,5% agar).

Chacun des transposant (CMA) possède le génotype $\Delta hptBgacA::MrT7$. Les points représentent la valeur d'activité β-gal relative à la souche de base du criblage (en gris sur le graphique). La ligne centrale représente la valeur de la moyenne pour les trois répliquats, les lignes inférieures et supérieures représente l'écart type. CMA108 ne montre aucune activité LacZ. L'analyse statistique a été faite par One-way ANOVA. Les astérisques (*) indiquent une différence significative ($P < 0.05$) comparée à la souche de base du criblage.

Lorsque retrouvées dans un génotype WT, la majorité des simples délétions des gènes identifiés par le criblage perd leur effet sur l'expression de *rsmZ*, offrant un niveau de transcription similaire à la souche sauvage (Figure 3.1.2). Seule la perte du gène *truB*, et de *gacA*, provoque toujours un effet comparativement à la souche sauvage. Dans une moindre mesure, la perte du gène *rluD* provoque également une légère baisse non significative ($P = 0.1152$) de l'expression de *rsmZ*, mais ce n'est pas le cas de la perte de *prfC*. Les deux gènes *prfC* et *rluD* sont liés à *truB* par leur implication dans la traduction.

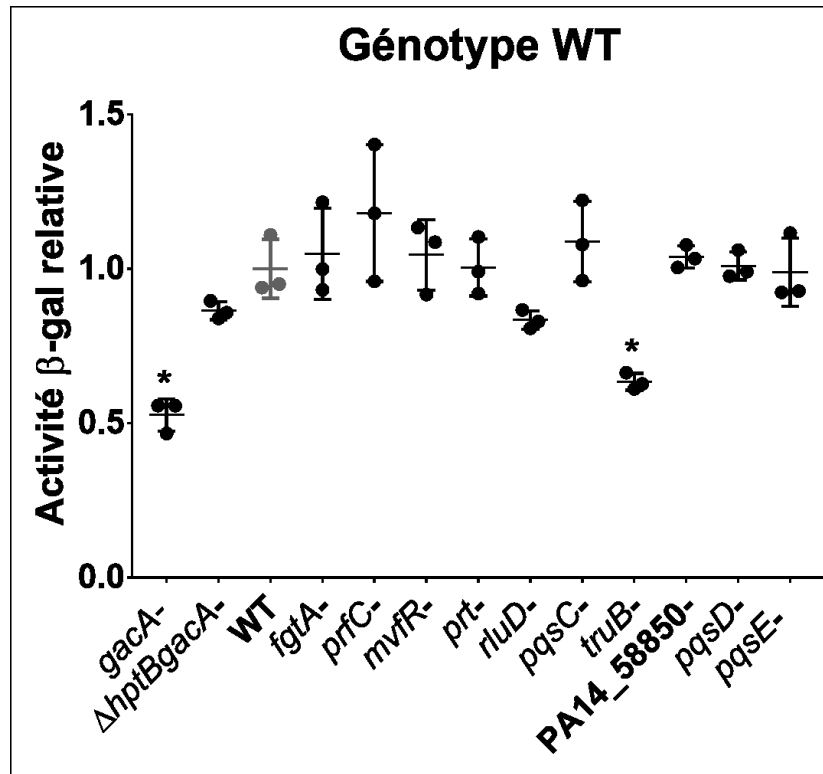


Figure 3.1.2 Dosage de l'enzyme β -galactosidase produite par le rapporteur transcriptionnel P_{rsmZ} - $lacZ$ chez les simples mutants correspondants aux principaux transposants en culture sur milieu gélosé solide (1,5% agar).

Chacun des mutants possède le génotype sauvage. Les points représentent la valeur d'activité β -gal relative à la souche sauvage WT (en gris sur le graphique). La ligne centrale représente la valeur de la moyenne pour les trois réplicats, les lignes inférieures et supérieures représente l'écart type. L'analyse statistique a été faite par Kruskal-Wallis et analyse multiple de Dunn. Les astérisques (*) indiquent une différence significative ($P < 0.05$) comparée à la souche de base du criblage.

3.1.5 Confirmation de l'impact des gènes dans le contrôle de *RsmZ* en conditions de culture planctonique

Pour identifier les gènes ayant une importance dans l'expression de *rsmZ* spécifiquement de façon surface-dépendante, ce qui était recherché par le criblage, un dosage de la β -galactosidase a été effectué sur les transposants séquencés, cultivés en bouillon (conditions planctoniques, Figure 3.1.3). Les résultats montrent que seule la perte du gène *fgtA* (CMA7) semble avoir uniquement un effet surface-dépendant parmi les mutants testés. Chez CMA7, la perte du gène *fgtA* a provoqué la perte de surexpression de *rsmZ* comparativement au mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$ en croissance sur une gélose (Figure 3.1.1), sans provoquer une baisse

d'expression en conditions planctoniques (Figure 3.1.3). Le gène *fgtA* code pour une glycosyl transférase impliquée dans la modification post-traductionnelle de la flagelline, la principale composante de la fibre flagellaire. Il est donc possible que cette glycosylation soit impliquée dans l'adaptation à la surface par *P. aeruginosa*.

Tous les autres mutants obtenus grâce au criblage ont une déficience de transcription de *rsmZ* en conditions planctoniques ainsi qu'en condition de culture sur une surface, indiquant que leur effet n'est pas surface-dépendant (Figure 3.1.3). Le transposant CMA50 semble être plus affecté en conditions liquide (Figure 3.1.3) que solide (Figure 3.1.1).

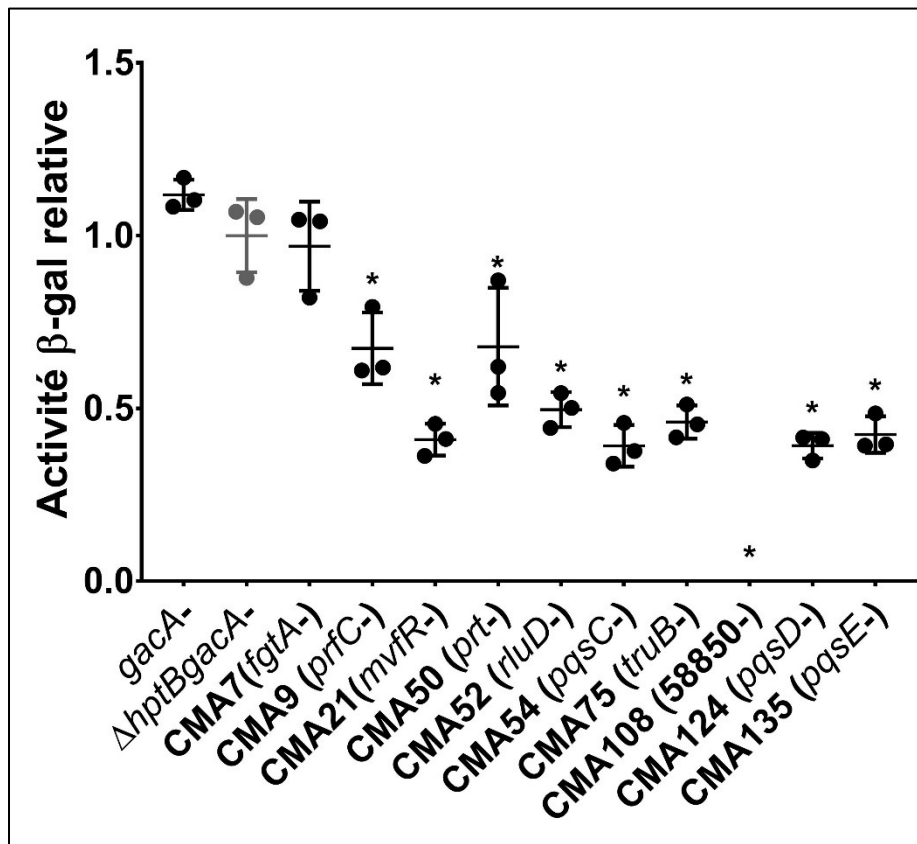


Figure 3.1.3 Dosage de l'enzyme β -galactosidase produite par le rapporteur transcriptionnel P_{rsmZ} -*lacZ* chez les principaux transposants en culture liquide.

Chacun des transposant (CMA) possède le génotype $\Delta hptBgacA::MrT7$. Les points représentent la valeur d'activité β -gal relative à la souche $\Delta hptBgacA::MrT7$ (en gris sur le graphique). La ligne centrale représente la valeur de la moyenne pour les trois répliquats, les lignes inférieures et supérieures représente l'écart type. L'analyse statistique a été faite par Kruskal-Wallis. Les astérisques (*) indiquent une différence significative ($P < 0.05$) comparée à la souche de base du criblage.

3.1.6 Confirmation de l'impact des gènes sur le contrôle de *RsmZ* et *RsmY* par RT-qPCR

Les résultats obtenus via le rapporteur transcriptionnel P_{rsmZ} -*lacZ* en conditions de culture sur une surface ont été confirmés par l'analyse de la quantité relative du pARN *RsmZ*. La baisse d'abondance du transcrit *RsmY* dans le mutant *gacA*::MrT7 confirme la validité de la méthode. De façon inattendue, seul le mutant CMA21 (*mvfR*-) a bel et bien une réduction du niveau de *RsmZ* dans les conditions testées comparativement à la souche $\Delta hptBgacA$::MrT7. Cependant, la souche de base du criblage ($\Delta hptBgacA$::MrT7 devrait surexprimer *RsmZ*, mais les résultats de RT-qPCR ne montrent pas cette surexpression (Figure 3.1.4, A). En effet, l'expression de *RsmZ* chez le mutant *gacA*::MrT7 et $\Delta hptBgacA$::MrT7 est identique alors qu'elle aurait dû être plus élevée chez ce dernier. De plus les deux mutants ont une expression moindre comparativement à la souche sauvage. Le transposant CMA108 n'avait pas d'activité β -gal mesurée par le dosage enzymatique (Figure 3.1.1 et Figure 3.1.3), mais montre un nombre de transcrit égal aux autres mutants du criblage, confirmant que son rapporteur a probablement subi une altération le rendant inefficace.

L'analyse RT-qPCR a également permis de vérifier un possible effet sur la transcription de *RsmY*, confirmant que les délétions identifiées comme importantes pour l'expression de *RsmZ* n'ont pas d'impact additionnel sur l'expression de *RsmY* dans les conditions testées (Figure 3.1.4, B). Le facteur recherché par le criblage ne devrait pas influencer la transcription de *rsmY*.

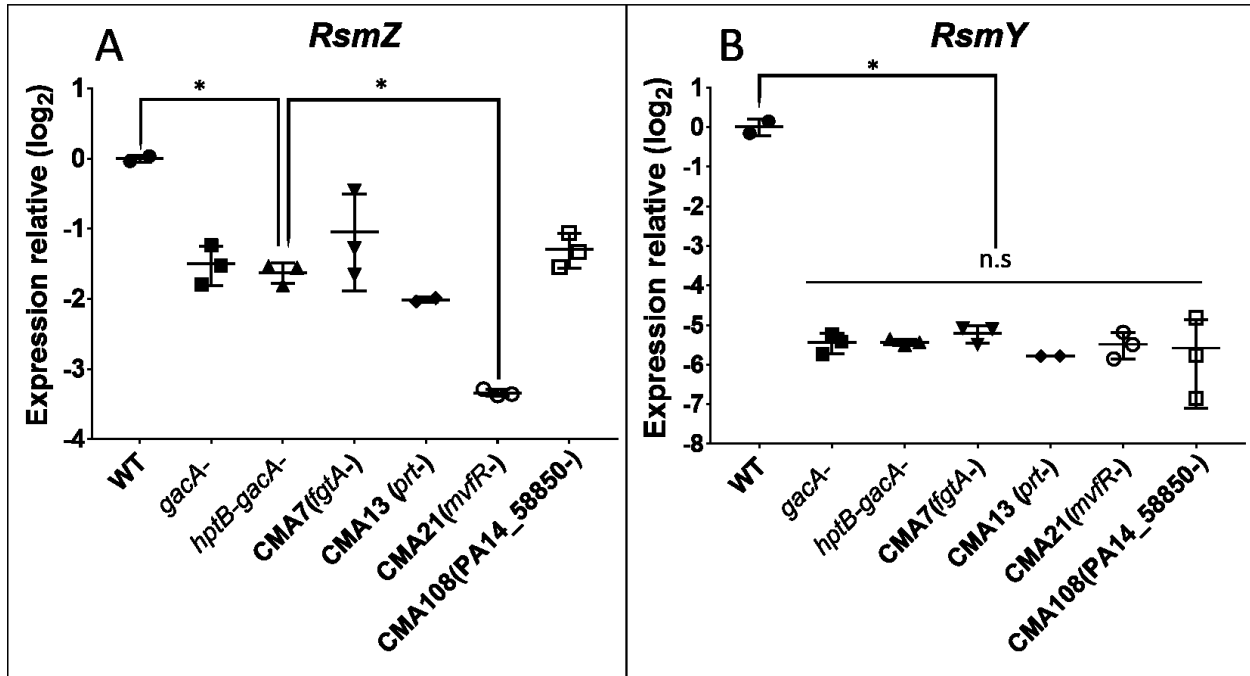


Figure 3.1.4 Expression relative de souches issues du criblage par RT-qPCR.

Pour *RsmZ* (A) et *RsmY* (B), chez les souches $\Delta hptBgacA$ - ($\Delta hptBgacA::MrT7$, base du criblage), CMA (transposants Tn5), *gacA*- (*gacA::MrT7*) et sauvage (WT). L'expression de *RsmZ* et *RsmY* est relative à celle de WT. Un astérisque indique une valeur $P < 0.05$, n.s signifie non-significatif.

3.2 Importance de la glycosylation du flagelle pour la motilité de type *swarming*

3.2.1 Les mutants *fgtA*- présentent un phénotype de *swarming* particulier

À cause de son implication dans la synthèse et la structure du flagelle, l'impact de la perte du gène *fgtA* sur la motilité de type *swarming* a été évalué dans le génotype sauvage et dans le mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$ utilisé pour le criblage. Les essais ont permis de montrer que la perte du gène *fgtA* chez la souche sauvage provoque une diminution de la motilité de type *swarming* (Figure 3.2.1). En contrepartie, lorsque l'inactivation de ce gène est couplée au génotype $\Delta hptBgacA::MrT7$, l'effet inverse est noté. Il semblerait que *fgtA* ait une importance au niveau de la capacité de *P. aeruginosa* de se mouvoir sur une surface. Pour savoir si cet effet agit de façon générale sur le flagelle, la capacité d'un mutant *fgtA*- d'effectuer la motilité *swimming* a été évaluée (Figure 3.2.2). Comparativement à la souche sauvage, le mutant *fgtA::MrT7* (issu de

la banque de transposon) ne présente pas de différence de diamètre de *swimming*. Il en est de même pour le mutant du criblage CMA7 qui présente un *swimming* similaire (Figure 3.2.2).

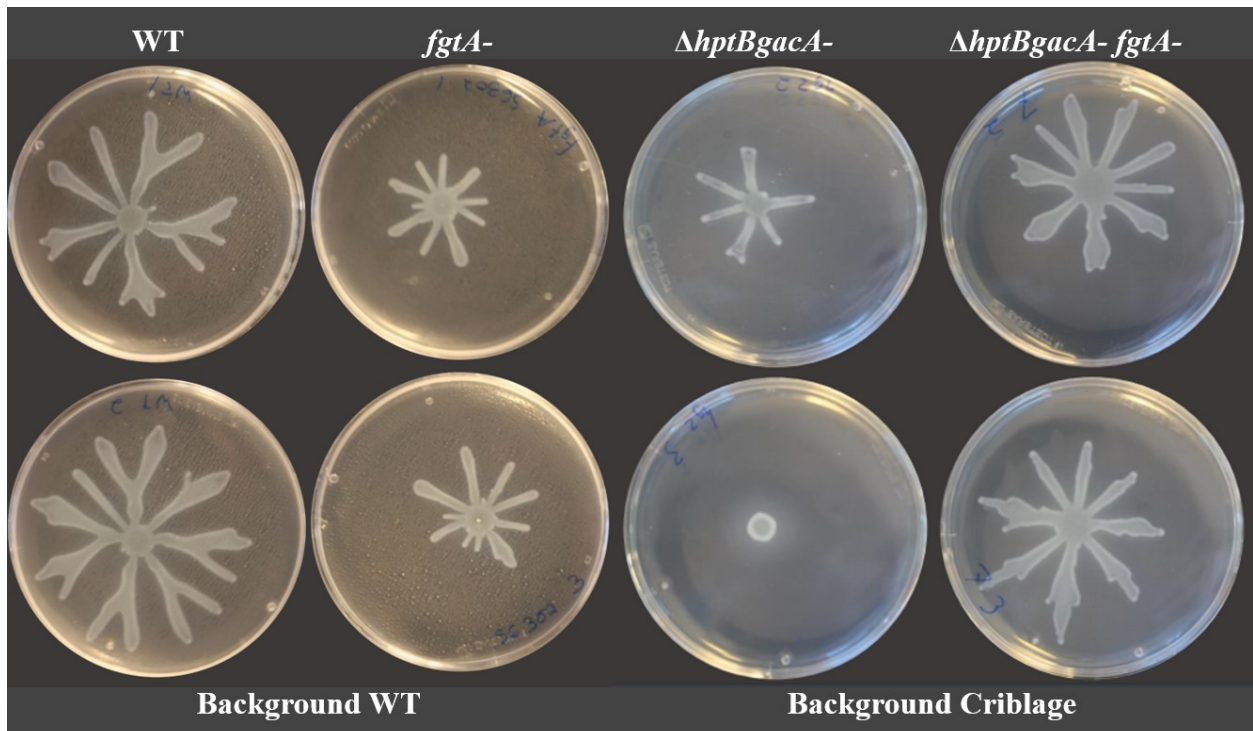


Figure 3.2.1 Motilité de type *swarming* des mutants *fgtA*- chez le génotype sauvage et $\Delta hptBgacA::MrT7$ ainsi que les souches de références.

Une goutte de 5 μ L de culture a été déposée au centre d'une gélose M9DCAA semi-solide et incubé 20 heures à 34°C. L'image présente deux répliques biologiques sur trois effectués pour un essai.

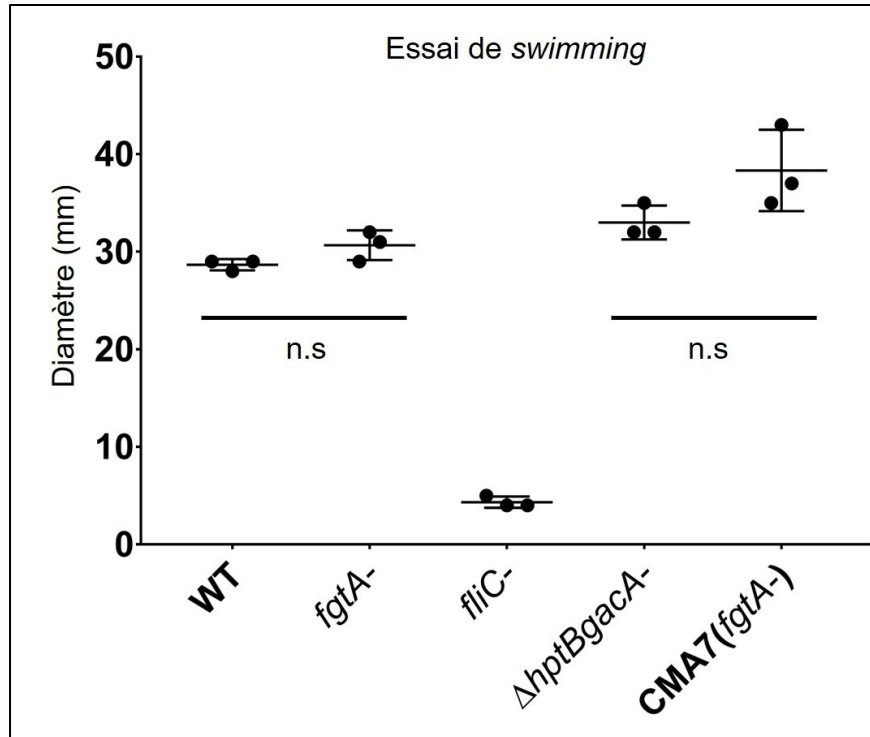


Figure 3.2.2 Comparatif de la motilité de type *swimming* des souches *fgtA*⁺ et *fgtA*⁻.

Le diamètre du front de motilité *swimming* est mesurée (en mm). Une gélose M9DCAA à faible viscosité (0.25% Bacto-agar) a été inoculée, puis incubée 20h à 34°C. L'analyse statistique a été évaluée par Test de Student, n.s signifie non significatif ($P > 0.05$).

3.3 Importance du système de *quorum sensing* PQS dans la régulation de *rsmZ*

3.3.1 L'influence de la molécule PQS sur l'expression de *RsmZ*

L'obtention de huit insertions indépendantes dans les gènes de l'opéron *pqs* ont mis en lumière une possibilité de régulation positive sur *RsmZ* par le système de *quorum sensing* PQS. Bien que cette régulation par le PQS ne corresponde pas à l'effet surface-spécifique recherché, cet aspect a tout de même été exploré. Pour déterminer si la molécule PQS était elle-même responsable de cette régulation, un dosage β -gal a été effectué chez diverses souches avec et sans ajout de PQS à une concentration physiologique de 10 ppm, dans des conditions de culture liquide (planctonique). L'addition de PQS semble avoir un effet négatif sur l'expression de *rsmZ*, surtout visible lorsque le PQS a été ajouté au génotype WT, l'ajout de la molécule signal au génotype

$\Delta hptBgacA::MrT7$ n'ayant pas un effet aussi important. De façon particulière, l'ajout de PQS semble avoir un effet malgré la perte du récepteur MvfR.

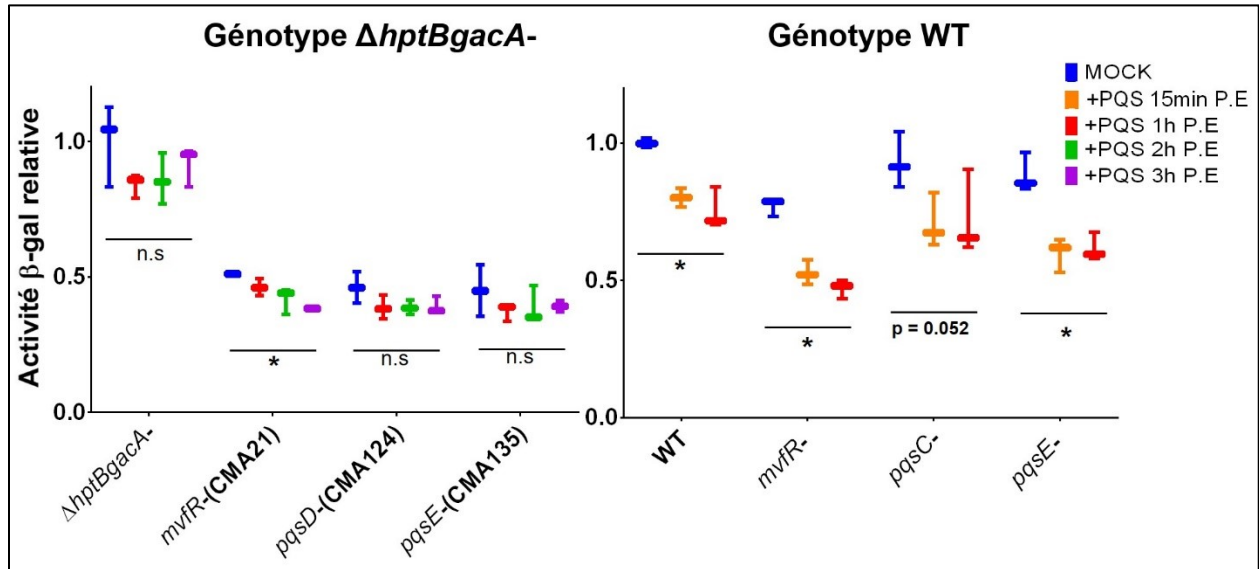


Figure 3.3.1 Impact sur la transcription de *rsmZ* d'un ajout de 10ppm PQS

rapportée par le rapporteur transcriptionnel $P_{rsmZ}-lacZ$ et présentée en tant qu'activité β -gal relative à la souche référence traitée au méthanol seulement (MOCK). Chaque couleur correspond à une condition d'ajout du PQS ou du véhicule (MOCK) selon la légende (haut à droite). Le méthanol est ajouté une heure avant l'échantillonnage. P.E désigne pré-échantillonnage. Les traits indiquent un groupe de valeurs significativement différentes ou non de la condition MOCK (bleue). Un astérisque (*) indique une valeur $P < 0.05$, n.s signifie non-significatif. Les analyses statistiques ont été effectuée par test multiple de Student.

3.3.2 L'expression en *cis* de *PqsE* complémente les mutants du criblage et favorise l'expression de *RsmZ*

Le grand nombre d'insertions dans l'opéron PQS et leur possible effet polaire sur *pqsE* a soulevé la question de l'importance de *PqsE* dans la régulation de *rsmZ*. Pour ce faire, le plasmide pUCP20 exprimant *pqsE* (et le plasmide vide correspondant) a été transformé vers des souches du criblage arborant une insertion de transposon dans l'un des gènes du système PQS. L'expression de *pqsE* en *cis* chez ces mutants (sauf le mutant *pqsC-*) a causé une augmentation significative du niveau d'activité β -gal, évaluée en croissance en culture liquide, comparativement à la condition où le plasmide vide était présent dans la bactérie (Figure 3.3.2). Ces données suggèrent que *PqsE* est le facteur qui régule l'expression de *rsmZ* chez les mutants

PQS, les autres insertions de transposon identifiés n'ayant qu'un effet indirect sur l'activité ou l'expression de PqsE via un effet polaire ou la perte de *myfR* qui réduit la transcription de *pqsE*.

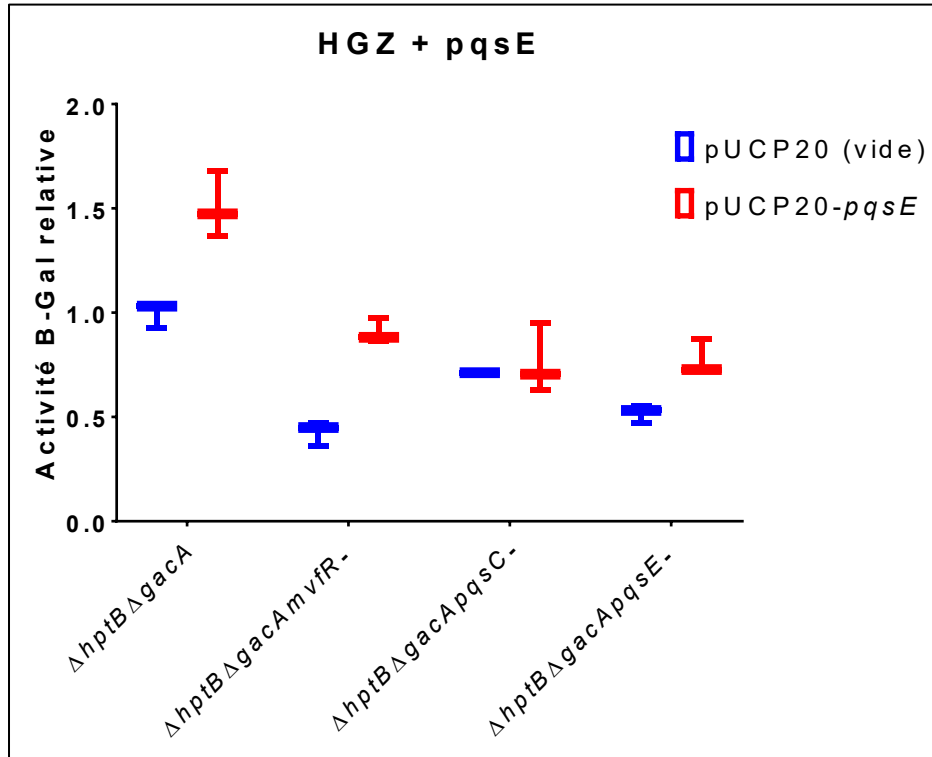


Figure 3.3.2 Impact sur la transcription de *rsmZ* de la surexpression de *pqsE*,

mesuré par le rapporteur transcriptionnel $P_{rsmZ-lacZ}$ et présentée en tant qu'activité β -gal relative à la souche référence contenant le plasmide pUCP20 (vide). Chaque couleur correspond à une condition selon la légende (haut à droite). Les traits centraux pour chaque valeur représentent la médiane, les trait supérieurs et inférieurs représentent les valeurs maximales et minimales obtenues. Les barres sous les valeurs indiquent un groupe de valeurs significativement différentes ou non de la condition MOCK (bleue). Un astérisque (*) indique une valeur $P < 0.05$, n.s signifie non-significatif. Les analyses statistiques ont été effectuée par multiple test de Student.

3.3.3 L'impact de la délétion de *pqsE* dépend de la délétion de *gacA*

L'effet de l'inactivation des gènes du PQS sur l'expression de *RsmZ* a été observé dans le génotype de base du criblage $\Delta hptB gacA::MrT7$ et n'est pas aussi fort dans le génotype WT (Figure 3.1.1 et Figure 3.1.2). Il est donc important de savoir lequel des gènes *hptB* et/ou *gacA* doivent être inactifs pour voir l'effet de la délétion du PQS. Pour ce faire, la délétion du gène *pqsE* a été combiné avec soit $\Delta gacA$, soit $\Delta hptB$, et les mutants obtenus ont été évalués par

dosage enzymatique de la β -gal pour connaître l'impact des délétions des gènes sur le niveau de transcription de *rsmZ*. Selon le dosage, la perte d'expression de *rsmZ* est visible lorsque la délétion de *pqsE* est couplée à *gacA*, mais pas à $\Delta hptB$. L'essai montre d'ailleurs que la surexpression de *rsmZ* causée par la délétion de *hptB* n'est pas influencée par la délétion de *gacA* ni de *pqsE*. De plus, la délétion de *gacA* seule semble avoir un effet marginal sur la transcription de *rsmZ*, malgré le fait que GacA soit reconnu comme l'activateur principal de cette transcription.

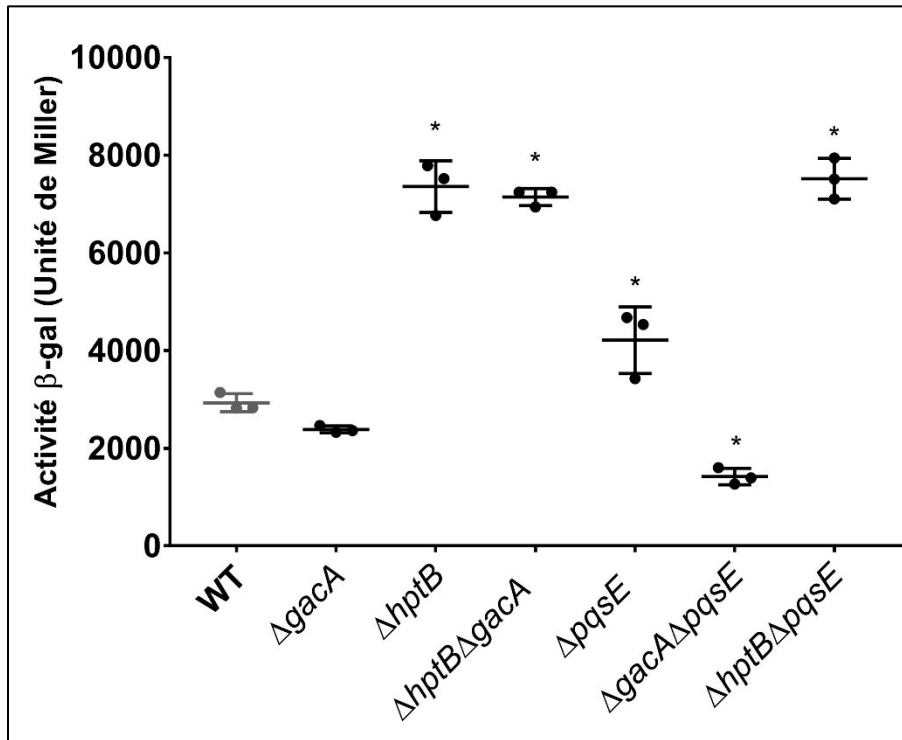


Figure 3.3.3 Activité β -gal représentant le niveau de transcription de *rsmZ* en condition de culture planctonique pour les simples doubles mutants $\Delta pqsE$, $\Delta gacA$ et $\Delta hptB$.

Les traits centraux pour chaque tripliqua indique la moyenne, les traits supérieurs et inférieurs indiquent les bornes de l'écart type. Un astérisque (*) indique si la transcription de *rsmZ* mesurée par le rapporteur est significativement différente de la souche sauvage (WT, en gris). L'analyse statistique a été faite par One-way ANOVA et test post-hoc de Tukey.

3.3.4 PqsE agit en parallèle avec GacA pour réguler *rsmZ*

Pour mieux connaître l'importance de *pqsE* dans la régulation de la transcription de *rsmZ* en présence ou absence de GacA, un dosage de la production de la β -gal par le rapporteur P_{rsmZ} -*lacZ*

a été effectué en cinétique chez les mutants $\Delta gacA$, $\Delta pqsE$ et $\Delta gacA\Delta pqsE$ à partir de colonies (culture sur milieu solidifié avec 1,5% agar). Le dosage de la β -gal à chaque heure pour chacun des mutants a permis de montrer que PqsE et GacA ont un rôle additif quant à l'expression de *rsmZ*. En comparant la courbe WT (bleue) et celle du mutant $\Delta pqsE$ (verte), il est possible de remarquer qu'un léger impact de *pqsE* sur la transcription de *rsmZ* est notable dès le début de la cinétique (3h) jusqu'à la fusion des courbes autour de 11 heures post-inoculation. En parallèle, l'impact de GacA se fait tout le long de la cinétique, et la réduction de transcription chez le mutant $\Delta gacA$ est beaucoup plus prononcée que chez le mutant $\Delta pqsE$. Les deux semblent avoir un effet additif sur la transcription de *rsmZ*, la réduction d'activité β -gal étant la plus prononcée pour le double mutant $\Delta gacA\Delta pqsE$. La croissance entre les différentes souches n'est pas significativement différente selon une analyse par comparaison multiple (Figure 3.3.5).

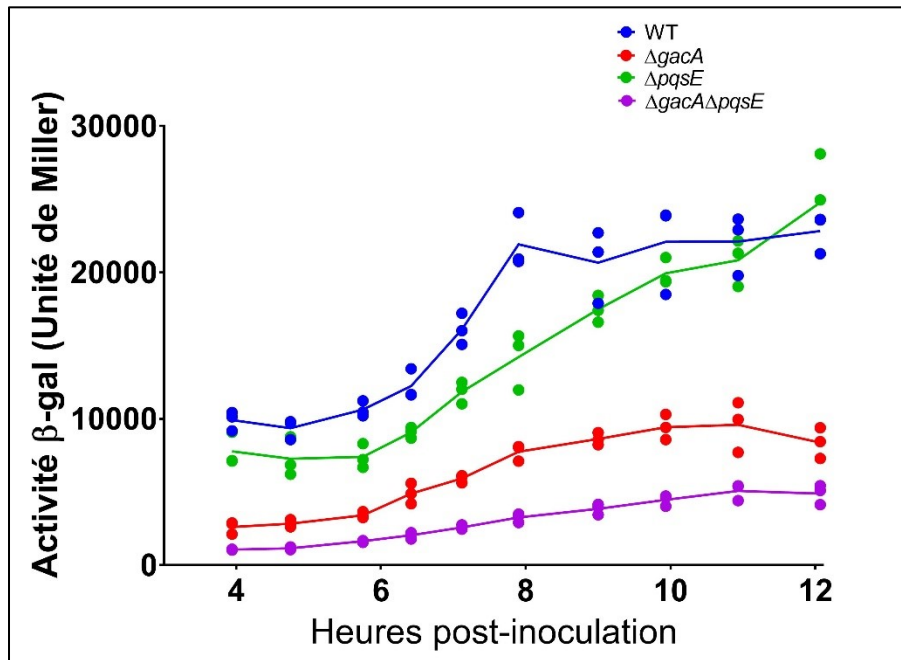


Figure 3.3.4 Cinétique de transcription de *rsmZ* pour des mutants $\Delta gacA$ et/ou $\Delta pqsE$.

L'expression a été mesurée grâce au rapporteur P_{rsmZ} -*lacZ* en condition de culture sur milieu M9 DCAA gélosé solide, à 30°C. Les points de couleur représentent les mesures à chaque temps, pour chaque mutant selon la légende. La courbe est tracée au niveau de la moyenne des points.

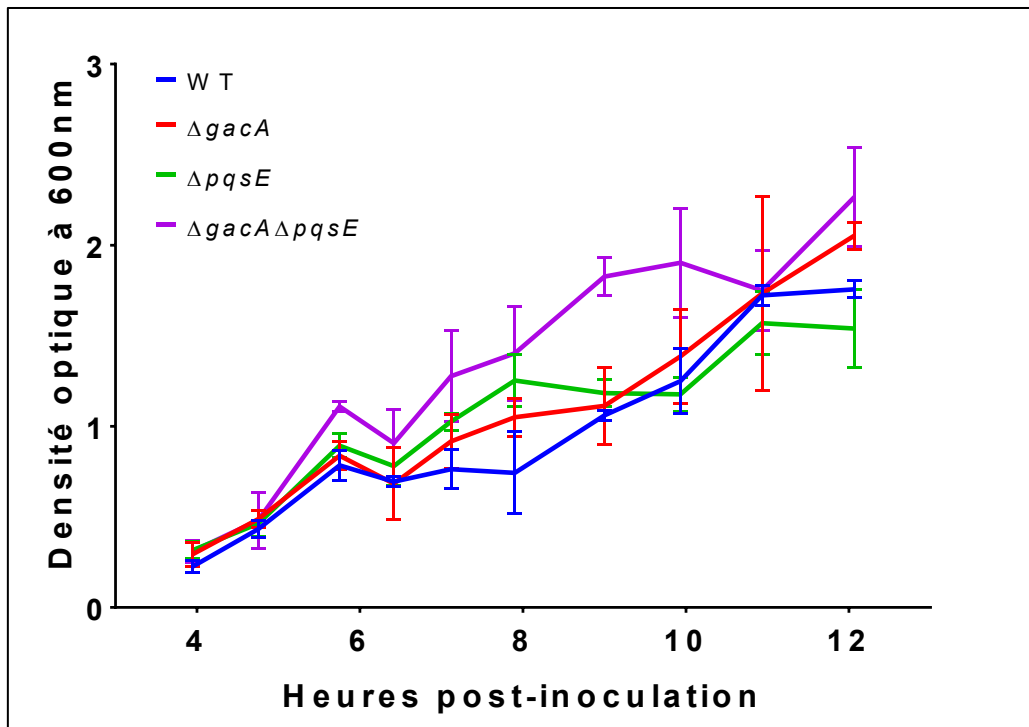


Figure 3.3.5 Cinétique de croissance des mutants $\Delta gacA$ et/ou $\Delta pqsE$ lors du dosage β -Gal.

La cinétique a été effectuée en condition de culture sur milieu M9DCAA gélosé solide, à 30°C. La densité optique a été mesurée à partir des suspensions de colonies. Les lignes de couleur représentent les mesures à chaque temps, pour chaque mutant selon la légende. La courbe est tracée au niveau de la moyenne des points.

4 DISCUSSION

4.1 Mise en place du criblage

Le criblage a permis d'identifier plus de 20 gènes ayant un potentiel effet positif sur la transcription de *rsmZ*. Au total, il s'agit de près de 60 000 transposants qui ont été criblés, permettant l'isolation de 190 mutants, dont 53 d'entre eux ont été analysés par le séquençage de leur région en aval du transposon pour identifier leur gène affecté.

Le criblage n'a pas été effectué dans les conditions optimales. La présence du transposon MrT7 (possédant une cassette de résistance à la gentamycine) dans la souche du criblage $\Delta hptBgacA::MrT7 P_{rsmZ}-lacZ$ a forcé l'utilisation du transposon mini-Tn5 avec un gène de résistance à la néomycine. Cet antibiotique n'est pas très efficace pour sélectionner adéquatement *P. aeruginosa*. L'utilisation de cet antibiotique a mené à l'apparition d'un grand nombre de colonies satellites qui ont rendus la tâche d'isoler les mutants intéressants beaucoup plus ardue. Un autre point qui aurait pu être amélioré est l'utilisation d'un gène de protéine fluorescente pour rapporter la transcription de *rsmZ* au lieu de la beta-galactosidase. Bien que le β -gal permet de réaliser des dosages précis de façon très simple, il est beaucoup plus difficile de bien identifier les clones voulus à cause de l'accumulation du produit d'hydrolyse du X-Gal dans le milieu; tous les transposants, sauf ceux ayant perdu l'activité du rapporteur, finiront par devenir bleu avec le temps. Une protéine fluorescente aurait donné une meilleure indication « en temps réel » du niveau de transcription de *rsmZ* et aurait permis une meilleure sélectivité des transposants. Cette difficulté d'identifier correctement les candidats du criblage potentiels peut expliquer pourquoi il existe une si grande disparité entre le nombre total d'isolats (190) et le nombre de candidats (53) avec une réduction quantitative (dosage) et/ou qualitative (observation visuelle sur milieu avec X-Gal). Malgré tout, la plupart des gènes obtenus sont soit redondants, soit en appartenance à un groupe fonctionnel similaire qui laisse sous-entendre un impact réel des gènes identifiés sur l'expression de *rsmZ*. Il pourrait également s'agir d'un biais induit par le rapporteur LacZ, dû à la nature indirecte de la mesure de l'activité du promoteur P_{rsmZ} qui dépend de la stabilité et la traduction du transcrit du gène *lacZ*. Ceci pourrait expliquer l'impact des protéines (TruB, RluD et PrfC) impliquées dans le contrôle de la traduction, leur importance pour la transcription de *rsmZ* n'ayant pas été évalué par RT-qPCR.

Un ancien étudiant du Labo Déziel (Fabrice Jean-Pierre) avait réalisé une analyse par RNAseq chez la souche $\Delta hptBgacA::MrT7$ en condition de croissance sur une surface pour tenter d'identifier un facteur de régulation qui aurait une expression différente comparativement à la souche sauvage et serait potentiellement impliqués dans la surexpression de *RsmZ* (Jean-Pierre, 2017). En comparant ses données de RNAseq avec les mutants obtenus grâce au criblage rapporté ici, on remarque que les gènes *truB* (PA14_62730), *pqsC* (PA14_51410), *pqsD* (PA14_51390) et *pqsE* (PA14_51380) sont sous-exprimés en conditions de culture sur une surface chez le double mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$ et ont aussi été identifiés via le criblage. Le gène PA14_08090, codant pour un segment de la pyocine de type R est également sous-exprimé dans ces conditions alors que d'autres gènes de cette famille (PA14_08060, PA14_08070, PA14_08120 et PA14_08150) ont été obtenus par le criblage. Le gène PA14_53970 codant pour une aconitate hydratase prédite (*AcnD*) a été à la fois identifié par le criblage et est aussi sous-exprimé en condition de culture liquide seulement chez le mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$ selon les données de RNAseq. Normalement, il aurait été attendu que les gènes impliqués dans la surexpression de *RsmZ* chez un mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$ soit surexprimés (dans le cas d'un activateur) ou sous-exprimés (dans le cas d'un répresseur). Ici, les gènes communs entre le RNAseq et le criblage sont sous-exprimés (comme dans le cas d'un répresseur) alors que l'inactivation de ces gènes par le transposon provoque une baisse de transcription de *RsmZ* (comme dans le cas d'un activateur). Cette tendance inverse peut s'expliquer par les conditions différentes entre le criblage et le RNAseq : le RNAseq a été fait en condition planctonique et en *swarming*, alors que le criblage a été fait en conditions non-motiles sur gélose. De plus, j'ai effectué ma sélection des transposants en les comparant à la souche de base du criblage ($\Delta hptBgacA::MrT7$) alors que le RNAseq compare les profils d'expression entre le mutant $\Delta hptBgacA::MrT7$ à ceux de la souche sauvage.

4.2 La glycosyl transférase FgtA

Le premier candidat avec une réduction de l'expression de *rsmZ* en condition de culture sur une surface est le transposant CMA7. Plus intéressant encore est le fait qu'il s'agisse du seul mutant obtenu dans le criblage avec un effet spécifiquement lorsque *P. aeruginosa* se développe sur une

surface (Figure 3.1.1), la perte de *fgtA* n'affectant pas l'expression de *rsmZ* en condition de culture planctonique (Figure 3.1.3). Ce mutant a donc rempli les critères attendus pour le gène ciblé par le criblage. Ce mutant a une insertion du transposon mini-Tn5 dans le gène *fgtA* codant pour une glycosyl transférase. Cette enzyme est responsable de la modification post-traductionnelle de la flagelline de type b, présente chez les souches PA14 et PAO1 de *P. aeruginosa*, entre autres (Spangenberg *et al.*, 1996). FgtA catalyse la O-glycosylation sur les résidus S191 et S195 de cette flagelline (Verma *et al.*, 2006). Le gène *fgtA* est le dernier gène d'une série de quatre formant un locus responsable de la glycosylation de la flagelline et est localisé directement en amont du gène codant pour la flagelline, *fliC* (Verma *et al.*, 2006). Cette glycosylation est connue principalement pour jouer un rôle dans l'interaction entre le système immunitaire d'un patient et *P. aeruginosa* lors d'une infection (Arora *et al.*, 2005; Merino & Tomas, 2014), de bref rapport dans la littérature n'accordant pas d'importance à cette glycosylation au niveau de la motilité (Schirm *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2006). Les résultats obtenus lors de mes essais de motilité montrent bien que le gène *fgtA* et/ou la glycosylation du flagelle a un impact sur la motilité de type *swarming* (Figure 3.2.1), la délétion du gène *fgtA* provoquant une réduction de la longueur des dendrites de la colonie. Il semble également y avoir un lien étroit entre *fgtA*, le génotype $\Delta hptBgacA::MrT7$ et le phénotype de motilité de type *swarming*, lié au fait qu'une délétion de *fgtA* augmente cette motilité dans le génotype $\Delta hptBgacA::MrT7$, l'effet inverse de celui observé dans le génotype sauvage. L'inactivation du gène *fgtA* a été effectuée par un transposon différent entre les deux génotypes : le transposon MrT7 pour le génotype WT (*fgtA::MrT7*) et le transposon mini-Tn5 pour le génotype $\Delta hptBgacA$ ($\Delta hptBgacA::MrT7$ *fgtA::Tn5*). Il est possible que la différence phénotypique soit liée à la différence entre les deux transposons. Néanmoins, l'impact des transposons n'est pas suffisant pour abolir complètement l'expression de *fliC* puisque ce dernier est essentiel pour la motilité *swarming* et *swimming* et un mutant *fgtA*- est capable de faire du *swimming* (Figure 3.2.2).

L'activité glycosyl transférase de FgtA ne permet pas d'expliquer comment cette protéine peut avoir une influence directe sur la transcription de *rsmZ*. Au moins deux mécanismes d'action indirects sont possibles : [1] la glycosylation de la flagelline a une importance dans la détection et le comportement de surface de *P. aeruginosa*, comme par exemple l'attachement initial précédant la formation de biofilm. Si tel est le cas, la délétion de *fgtA* devrait avoir un impact sur ces divers comportements et pourrait être évaluée par des essais phénotypiques en mesurant la

formation de biofilm. De tels essais permettraient également d'en apprendre davantage sur l'importance physiologique de la glycosylation du flagelle; [2] la protéine FgtA possède des fonctions de régulation parallèles à son activité glycosyltransférase. Si tel est le cas, FgtA aurait la capacité d'interagir directement avec d'autres acteurs capables d'influencer le niveau de *RsmZ* dans la cellule. Pour identifier ces possibles acteurs inconnus, on pourrait surexprimer la protéine FgtA couplée avec une étiquette de purification (FgtA-Tag). Grâce à cette étiquette, il serait alors possible de purifier FgtA par affinité et de coprécipiter les autres protéines auxquelles elle s'associe et les identifier par spectroscopie de masse en tandem (MS-MS) (Herzberg *et al.*, 2007). Ce type de méthode est très souvent utilisée pour identifier les interactions protéine-protéine et peut être adapté pour favoriser la purification de complexe membranaires et les interactions transitoires par une fixation chimique similaire à la méthode de ChIP (*Chromatin-Immunoprecipitation*) (Back *et al.*, 2003; Herzberg *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2011).

4.3 Le régulateur de transcription IHF

Le criblage n'a permis d'identifier qu'un seul gène avec une capacité de liaison à l'ADN prédite (sans compter *MvfR*). Le gène *ihfA* code pour la sous-unité α du régulateur de transcription IHF. Ce dernier est capable de lier et plier l'ADN de façon similaire aux histones des cellules eucaryotes et fait partie de la famille de protéine HU retrouvées chez diverses autres espèces bactériennes. La protéine codée par *ihfA* forme un hétérodimère (IHF) avec la sous-unité β codée par *ihfB* pour ensuite agir sur le génome pour faciliter la réplication de l'ADN, les événements de recombinaison de type lambda et l'expression des gènes (Calb *et al.*, 1996; Toussaint *et al.*, 1993). Chez *P. aeruginosa*, IHF est connu pour réguler la transcription de l'opéron *alg* menant à la production de l'alginate et au métabolisme du pyruvate. Mais chez d'autres espèces de *Pseudomonas*, tel *P. putida* et *P. protegens*, l'hétérodimère est connu pour réguler des fonctions de métabolisme primaire et secondaire, en partie liées au système Gac/Rsm via *RsmZ* (Calb *et al.*, 1996; Humair *et al.*, 2010; Silva-Rocha *et al.*, 2013). En effet, selon une étude par Humair et ses collaborateurs en 2010, IHF est capable de lier la région promotrice de *rsmZ*, avec un site de liaison prédit à proximité de celui de *MvaT*. Cette liaison a été démontrée par EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) chez *P. protegens* (Humair *et al.*, 2010). Un tel lien entre

le système Rsm et IHF a également été observé chez *Erwinia amylovora*, IHF étant capable de contrôler positivement l'expression de son pARN *RsmB*, l'homologue de *RsmY* et *RsmZ* de *P. aeruginosa* (Lee & Zhao, 2016). Cette liaison de IHF induirait un pli dans l'ADN qui faciliterait le recrutement des facteurs de transcription et du complexe de l'ARN polymérase. Le facteur IHF n'est pas le seul élément capable de contrôler l'expression de *RsmZ* par liaison et torsion de l'ADN, les protéines MvaT et MvaU ont également un rôle connu de répression de l'expression de *RsmZ* et plusieurs autres cibles dans le génome en liant et bloquant l'arrivée de ces facteurs de transcription (Brencic *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'évaluer l'interaction entre MvaT/U et IHF pour mieux comprendre leur dynamique dans l'expression de *RsmZ*.

L'insertion du transposon dans le gène *ihfA* a vraiment volé sous le radar durant le projet et n'a pas été amplement évaluée quant à son importance dans la régulation de *rsmZ*. Il serait pertinent de déterminer si son action est surface-dépendant et/ou fonctionnel seulement dans le génotype $\Delta hptBgacA::MrT7$. De telles informations permettraient de mieux cadrer le potentiel mécanisme d'action de IHF sur l'expression de *rsmZ*.

Malheureusement, il n'y a pas de mutants IHF- dans la banque de transposants de PA14. Il serait possible de transférer l'insertion mini-Tn5 dans un génotype sauvage par transformation du génome du mutant de la banque. Des analyses phénotypiques permettraient de mieux comprendre l'impact physiologique de IHF. Selon la littérature, un mutant IHF- devraient produire moins d'alginate (Delic-Attree *et al.*, 1996).

4.4 L'opéron de synthèse de pyocine (*pri*)

Les pyocines sont les bactériocines produites par *P. aeruginosa*, des molécules antimicrobiennes ayant une action inhibitrice contre les autres souches de cette espèce (Michel-Briand & Baysse, 2002). Il existe trois types de pyocines : type R (rigide), type F (flexible) et type S (soluble) ; les types R et F sont situés côte-à-côte sur l'opéron *pri*, leur séquences sont issues de la queue des bactériophages P2 et lambda, respectivement (Michel-Briand & Baysse, 2002; Nakayama *et al.*, 2000). Cet opéron a originalement été découvert à proximité de l'opéron tryptophane (*trp*), il se

situé entre les gènes *trpE* et *trpG* (Figure 4.4.1 A) (Kageyama, 1970a; Kageyama, 1970b; Michel-Briand & Baysse, 2002; Shinomiya *et al.*, 1983a; Shinomiya *et al.*, 1983b).

Le transposon Tn5 a été retrouvé à quatre reprises dans la région de l'opéron *prt* codant pour la pyocine de type R. Cette pyocine ressemble à une queue contractile de phage capable de lier la région *core* du lipopolysaccharide (LPS) de *P. aeruginosa*. Cette fixation contracte la gaine et libère une structure en aiguille, formant un pore dans la membrane et causant une dépolarisation qui tue la bactérie avec une très grande efficacité. Il existe cinq types de pyocine de type R — R1 à R5 — chacun liant une partie spécifique du LPS via leur fibre (Figure 4.4.1 B), PA14 est un producteur du type R2 (Kohler *et al.*, 2010; Kumazaki & Ishii, 1982; Ohsumi *et al.*, 1980). Les particules de pyocines sont libérées par la lyse des cellules productrices, elles se dispersent dans le milieu pour cibler les membres de la même espèce ce qui confère un avantage à la souche qui produit la meilleure pyocine (Heo *et al.*, 2007; Nakayama *et al.*, 2000).

La régulation de la production des pyocines se fait via les protéines PrtN et PrtR : PrtN agit comme activateur transcriptionnel de l'opéron *prt* et PrtR réprime la transcription de *prtN*. L'action du répresseur PrtR est régulée par la protéine RecA à la suite de l'activation de cette dernière par l'accumulation de dommages sur le chromosome de la bactérie (Matsui *et al.*, 1993). Il a été proposé que la pyocine de type R a une grande importance pour la survie aux ultraviolets et aux antibiotiques qui causent des dommages à l'ADN (Penterman *et al.*, 2014). La souche de base du criblage (Δ *hptBgacA::MrT7*) a le transposon Mar2xT7 inséré dans son gène *gacA* (*gacA::MrT7*). En aval du gène *gacA* se trouve le gène *uvrC* codant pour une endonucléase impliquée dans la réparation de l'ADN. Il est possible qu'un effet polaire du transposon affecte la transcription de *UvrC*, rend plus difficile la réparation de l'ADN et induit un stress chez *P. aeruginosa*.

Des mutations dans les gènes codant pour les glycosyltransférases des LPS permettent de résister à l'action de certaines pyocines de type R. Une mutation dans le gène *wapB* — identifié par le criblage — a déjà été associée à la résistance face à la pyocine de type R3 (Kocincova & Lam, 2013). La glycosyltransférase WapB catalyse l'ajout d'un D-glucose sur le *core* du LPS sans antigène O. La configuration antigène O (+) ou antigène O (-) est régulée par l'action de deux rhamnosyltransférases — WapR et MigA — qui restructurent le *core* pour permettre l'ajout ou non de l'antigène O, respectivement (Kocincova *et al.*, 2012; Poon *et al.*, 2008). Ces deux

enzymes ont une importance dans le comportement de surface de *P. aeruginosa*, un LPS avec beaucoup d'antigène O est lisse et facilite le déplacement, une cellule avec peu d'antigène O est rugueuse et s'accroche plus fortement aux surfaces (Lindhout *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2000). Cependant, il a été reporté qu'une mutation ponctuelle dans le gène *migA* de PA14 rend l'enzyme qu'il code inactive, suggérant par le fait même que WapB serait incapable d'exercer sa fonction (Hao *et al.*, 2015). Il se pourrait que WapB puisse avoir une autre fonction inconnue à ce jour, ou qu'une population de *P. aeruginosa* PA14 puisse récupérer l'allèle sauvage fonctionnelle. Il serait intéressant de savoir s'il existe un lien entre les insertions du transposon dans *wapB* et dans l'opéron *prt* et qu'elle pourrait être l'importance de WapB pour la résistance à la pyocine de type R2.

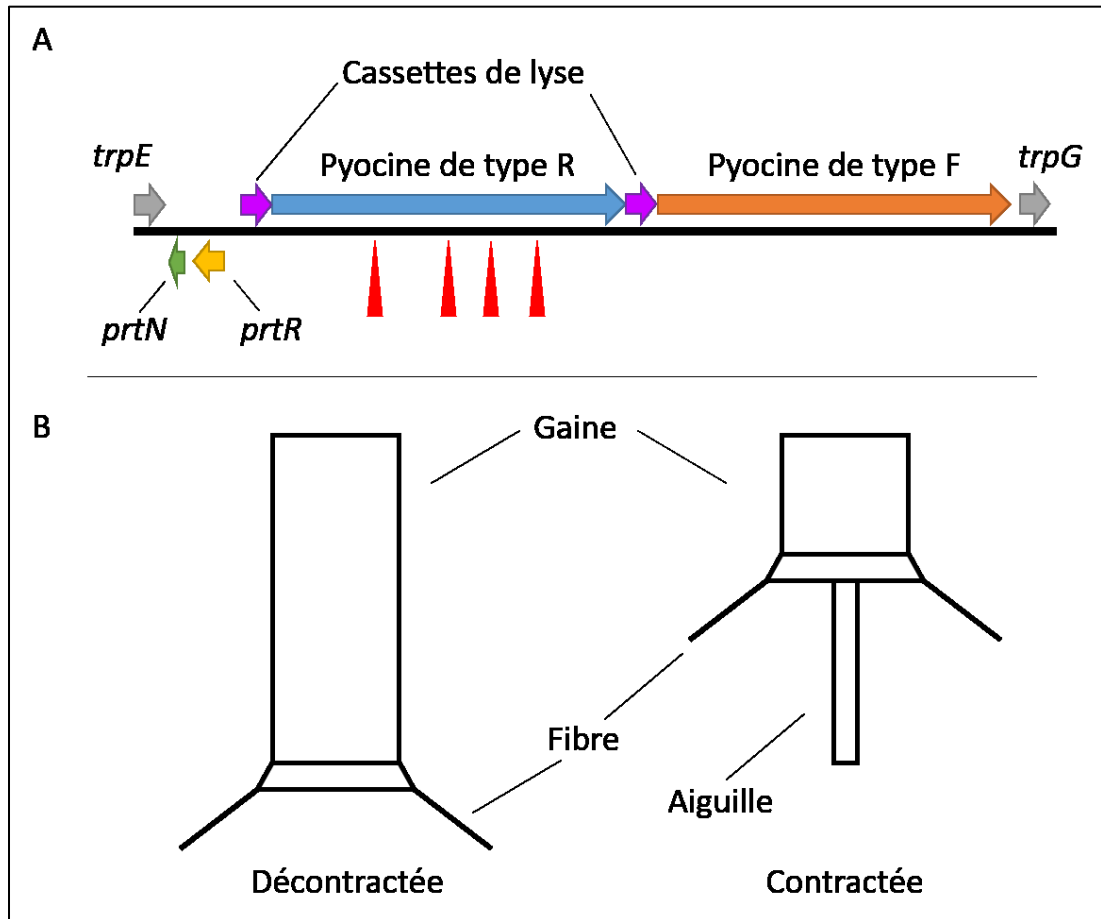


Figure 4.4.1 Organisation de l'opéron *prt* et de la structure de la pyocine de type R.

A. Schéma simplifié de l'opéron *prt* : les flèches représentent les cadres de lecture (tous les cadres de lecture des régions R et F sont indiqués par une seule flèche), leur orientation indique celle du cadre de lecture. Les triangles rouges indiquent la position approximative des quatre insertions du transposon Tn5. **B.** Structure de la pyocine de type R : la gaine recouvre l'aiguille jusqu'à sa contraction causée par le contact des fibres avec les lipopolysaccharides. Les schémas ne sont pas à l'échelle et sont basés sur ceux de (Michel-Briand & Baysse, 2002).

4.5 Le système de *quorum sensing* PQS

Le criblage a permis de révéler l'importance du système PQS dans la régulation de la transcription de *RsmZ*. En effet, un grand nombre d'insertions de transposon indépendantes ont été retrouvées dans les gènes de l'opéron *pqs* (*pqsA*, *pqsC*, *pqsD* et *pqsE*), dans le gène codant pour le régulateur de l'opéron MvfR (trois insertions) et dans sa région promotrice. Les analyses effectuées ont montré que l'impact de l'opéron *pqs* sur l'expression de *rsmZ* n'est pas surface-dépendant tel qu'espéré, mais est plus fort lorsque couplé à un génotype *gacA::MrT7*. De plus, malgré l'impact de la molécule PQS sur l'expression de *rsmZ*, cet effet n'a pas été jugé comme étant celui impliqué dans ce contrôle puisque l'ajout du PQS n'arrive pas à compléter un mutant *pqsC*- non polaire et provoque un effet également chez un mutant *mvfR*-. La protéine MvfR étant le récepteur principal de la molécule PQS, alors une source de PQS exogène ne devra avoir un impact physiologique si important. Des études récentes ont suggéré la capacité du HHQ et du PQS à lier d'autres protéines chez *P. aeruginosa*. Baker et son équipe ont démontré en 2017 que le PQS aurait la capacité de lier le récepteur RhlR, plus fortement lorsque MvfR est absent (Baker *et al.*, 2017). Cette liaison serait possible pour d'autres protéines telles MexG et PqsD, entre autres (Baker *et al.*, 2017; Hodgkinson *et al.*, 2016). Difficile de dire quelle serait la cause réelle de cet effet du PQS sur la transcription de *rsmZ*. Puisque cet effet est visible chez la souche sauvage de PA14, il serait aisé d'effectuer un dosage de la β -gal à la suite de l'ajout de PQS chez divers simples mutants dans les mêmes conditions pour tenter d'identifier le facteur impliqué dans la baisse d'expression de *rsmZ* à la suite de l'ajout de PQS.

Mes travaux ont également montré un impact de PqsE sur la transcription de *rsmZ*. Cet effet a d'abord été observé dans le génotype $\Delta hptB gacA::MrT7$ du criblage, mais ne requiert que la perte du gène *gacA* seulement, la délétion de *pqsE* chez un mutant $\Delta hptB$ n'ayant pas d'impact significatif. En plus, la délétion seule n'a pas d'impact fort sur la transcription de *rsmZ*, alors qu'une baisse d'expression est visible chez un double mutant $\Delta gacA \Delta pqsE$. Les données obtenues de l'analyse d'expression en cinétique montrent que PqsE et GacA aurait un effet additif sur le niveau de transcription de *RsmZ* au fil du temps, et ce en condition de culture sur milieu gélosé solide. La protéine PqsE reste encore très énigmatique quant à son mécanisme d'action. Il est connu qu'elle possède un rôle majeur dans la régulation des gènes cibles des systèmes de QS (Farrow *et al.*, 2008; Rampioni *et al.*, 2010). Récemment, une fonction de

production d'un ligand alternatif capable d'agir sur RhlR lui a été attribué par Mukherjee et ses collaborateurs (Mukherjee *et al.*, 2018). Il serait intéressant d'évaluer l'importance de RhlR dans la régulation de *rsmZ* et voir si PqsE et RhlR agissent de concert au niveau de la transcription de *rsmZ*. Notons néanmoins que le gène *rhlR* n'a pas été identifié par le criblage.

Une action du système PQS sur la voie Gac/Rsm semble logique à cause de la convergence des cibles régulées par PqsE et RsmA, comme la synthèse de pyocyanine (Burrowes *et al.*, 2006; Rampioni *et al.*, 2010). Une augmentation de l'expression de *rsmZ* par PqsE signifierait qu'en plus de favoriser l'expression de ses propres cibles, PqsE inhiberait indirectement l'action de RsmA, favorisant ainsi la traduction de ses cibles. Quelques liens ont été établis entre le système PQS et la voie Gac/Rsm par le passé (Guo *et al.*, 2014). Par exemple, l'ancienne étudiante du Labo Déziel Marianne Séguin a démontré que la délétion de *pqsE* avait un impact sur le niveau de transcription et de traduction de RsmA (Séguin, 2012). De plus, une brève mention de l'augmentation de l'expression de *rsmZ* par l'ajout de la molécule PQS de façon dose-dépendante a été faite par le passé dans un résumé (Goldberg *et al.*, 2008). Mes résultats montrent que le PQS ne semble pas avoir un impact aussi évident sur *RsmZ*. Il est cependant très difficile de comparer les deux résultats à cause du manque de détails quant aux conditions de culture, non détaillées dans ce court résumé.

4.6 Les gènes impliqués dans le métabolisme

Le criblage a permis d'identifier un autre groupe fonctionnel de gènes importants pour la transcription de *rsmZ*, celui impliqué dans le métabolisme primaire de *P. aeruginosa*. Dans ce groupe, des gènes liés au métabolisme énergétique et des sucres sont présents. La perte de l'un de ces gènes provoque une baisse d'expression de *rsmZ*. Vu leur implication dans le métabolisme primaire et un possible impact sur la croissance, il est difficile de dire si l'effet observé est dû à une cascade de régulation ou un impact indirect sur la dynamique de croissance. Un ralentissement de la croissance pourrait aisément perturber l'expression de *rsmZ* si le *quorum sensing* par le système PQS est important, le QS étant intimement lié à la croissance.

Le gène *zwf* code pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, protéine impliquée dans l'utilisation du glucose comme source de carbone (Ma *et al.*, 1998). Ce gène a fort probablement une importance pour le *fitness* de *P. aeruginosa* cultivé sur M9DCAA — le milieu utilisé pour la sélection des transposants — puisque ce milieu contient comme source principale de carbone du dextrose (D-glucose). Ce gène n'est pas essentiel pour la croissance dans un milieu M9DCAA, mais son inactivation provoque une légère baisse de croissance (qualitative) qui a tout de même été observée lors de la préparation des cultures liquides (résultats non-montrés). Il faudrait effectuer le dosage de la β -gal en cinétique pour bien cerner l'impact de la délétion de ce gène sur l'expression de *rsmZ*. Il serait aussi important de savoir si l'impact sur la transcription de *rsmZ* dépend de la présence ou non de glucose dans le milieu.

Le gène *aceE* code pour l'enzyme convertissant le pyruvate en acétyl-CoA juste avant son entrée dans le cycle de l'acide citrique (TCA, *tricarboxylic acid cycle*). Le gène PA14_53970 code pour une aconitate hydratase prédite (AcnD), homologue de AcnA, dont le rôle est de convertir le citrate en isocitrate lors des premières étapes du TCA. Les deux gènes ont ainsi un rôle primordial pour le maintien du cycle TCA, du métabolisme énergétique et de la balance redox du cytoplasme.

Finalement, le gène *nadB* code pour une protéine impliquée dans la synthèse de novo du Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD). Cette molécule est un cofacteur essentiel impliqué dans plusieurs fonctions métaboliques oxydoréductrices, comme le TCA. Chez *E. coli*, la délétion de ce gène est létale puisqu'il s'agit du seul moyen qu'a la bactérie pour obtenir le NAD. Chez *P. aeruginosa*, la délétion de *nadB* est connue pour être tolérée, suggérant qu'il existe une voie de synthèse alternative capable de compenser la perte du gène *nadB*. Il serait possible de tenter d'identifier cette voie de synthèse alternative de NAD par Tn-Seq. En supposant qu'il n'existe que deux voies de synthèse parallèle du NAD chez *P. aeruginosa*, une délétion de *nadB* devrait rendre les gènes de l'autre voie essentiels. La méthode du Tn-Seq permettrait d'identifier tous les sites d'insertions de transposon non létales.

L'impact de tous ces gènes peut se faire de deux façons : (1) la perte de l'un de ces gènes provoque une perte de *fitness* qui affecte la dynamique de croissance et par le fait même l'expression de *rsmZ* au point de lecture effectué lors de l'essai. Pour bien évaluer l'impact de ces délétions sur la transcription de *rsmZ*, il faudrait obligatoirement effectuer une courbe de

croissance des divers mutants ainsi que les dosages de la β -gal en cinétique; (2) la perte d'un de ces gènes provoque un déséquilibre du potentiel redox à l'intérieur de la cellule, ce qui active une voie de signalisation qui influence le niveau d'expression de *rsmZ*. Le métabolisme primaire de *Pseudomonas protegens* a déjà été identifié par un criblage comme ayant un impact sur l'expression de *RsmX*, *RsmY* et *RsmZ* (les pARN de cette espèce) de façon GacA-dépendante (Takeuchi *et al.*, 2009). Le criblage effectué dans le cadre de mon projet suggère qu'il y aurait une action GacA-indépendante du métabolisme primaire sur l'expression de *RsmZ* chez *P. aeruginosa*. L'ampleur de cet effet et le mécanisme d'action impliqué restent à déterminer, quoique la voie de la répression catabolique serait un mécanisme potentiel.

4.7 Les gènes liés au contrôle de la traduction

Trois autres gènes identifiés par le criblage (*truB*, *rluD* et *prfC*) sont impliqués dans la traduction. TruB et RluD sont deux pseudouridines synthases impliquées dans la modification d'uridines spécifiques de l'ARN de transfert et l'ARN ribosomal, respectivement (Gutgsell *et al.*, 2000; Gutierrez *et al.*, 2013). Le gène *prfC* code pour le facteur de relâchement 3 (RF3, *release factor 3*) impliqué dans le détachement du peptide traduit par le ribosome et dans la terminaison de la traduction (O'Connor & Gregory, 2011). La perte des trois gènes a provoqué une baisse de transcription de *rsmZ* dans le génotype $\Delta hptBgacA::MrT7$ en conditions de culture solide (Figure 3.1.1) et liquide (Figure 3.1.3). Parmi les trois, seul l'inactivation de *truB* a causé une baisse détectable de l'expression de *rsmZ* chez le génotype sauvage (Figure 3.1.2). L'impact noté ici pourrait être un effet de réduction globale de la traduction qui agit sur le rapporteur transcriptionnel en réduisant la traduction de la protéine LacZ.

Quelques rapports semblent montrer un lien entre ces trois gènes. Chez *E. coli*, l'inactivation de *rluD* cause un ralentissement de la croissance qui peut être compensé par des mutations dans les gènes *prfB* (RF2) et *prfC* (RF3) (O'Connor & Gregory, 2011). De plus, une analyse par cristallographie montre l'interaction des trois facteurs de relâchement avec l'hélice H69 de l'ARNr 23S, hélice subissant la pseudouridination par RluD (O'Connor & Gregory, 2011). Chez *P. aeruginosa*, *truB* et *rluD* ont été identifiés par Tn-seq comme importants pour le *fitness* en

conditions limitées en oxygène, mais pas une limitation en source de carbone (Basta *et al.*, 2017).

Un mécanisme impliquant la protéine SuhB permet d'établir un lien entre le contrôle de la traduction et l'expression des pARN *RsmY* et *RsmZ* via un contrôle de la transcription de *gacA* (Shi *et al.*, 2015). Dans les conditions du criblage, le gène *gacA* est inactivé par l'insertion du transposon Mar2xT7. Il existerait alors une possible voie alternative GacA-indépendante agissant directement sur *RsmZ*, et possiblement *RsmY*. Parmi tous les gènes régulés par SuhB, Li et collègues (Li *et al.*, 2017) ont identifié une diguanylate cyclase DGC, nommée GcbA, surexprimée chez un mutant Δ *suhB*. La DGC GcbA est connue pour être impliquée dans l'expression de *RsmZ* (Petrova *et al.*, 2014). Une implication des protéines TruB, RluD et RF3 dans la régulation de SuhB pourrait expliquer la modification GacA-indépendante de l'expression de *rsmZ* via GcbA. Ce mécanisme resterait à être confirmé. Une interaction directe entre les facteurs RF et SuhB pourrait être établie par double hybride bactérien.

5 CONCLUSION

Dans le but d'identifier des facteurs de régulation GacA-indépendant responsables de la surexpression du pARN *rsmZ* lorsque *P. aeruginosa* se développe sur une surface, un criblage par transposition exploitant le transposon Tn5-Km a été effectué dans la souche $\Delta hptBgacA::MrT7$ contenant le rapporteur $P_{rsmZ}-lacZ$. Des transposants ayant une transcription de *rsmZ* diminuée ont été sélectionnés et analysés par dosage de la β -galactosidase et séquençages. Le criblage a ainsi permis l'identification de plusieurs gènes, dont la plupart ont des fonctions similaires. Le lien entre tous ces gènes et l'expression de *rsmZ* ne semble pas direct. Cependant, le facteur de transcription IHF est un élément de régulation prometteur pour une potentiel action directe. De plus amples expérimentations sont nécessaires pour établir si IHF peut directement réguler la transcription de *RsmZ* chez *P. aeruginosa* et pour mieux comprendre l'impact des autres gènes identifiés. D'autres mécanismes d'action ont été proposés pour lier *RsmZ* aux autres groupes fonctionnels de gènes identifiés par le criblage. L'opéron PQS semble influencer l'expression de *RsmZ* via l'action de PqsE principalement. Les résultats ont révélé que plusieurs autres facteurs de régulation mal connus sont capables de moduler la transcription de *RsmZ* en absence de GacA, ce qui souligne l'importance de la voie Gac/Rsm et de son contrôle précis dans l'adaptation de *P. aeruginosa*.

6 RÉFÉRENCES

- Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE & Iglewski BH (1997) Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179(12):3928-3935.
- Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S & Ramphal R (2005) Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect. Immun.* 73(7):4395-4398.
- Back JW, de Jong L, Muijsers AO & de Koster CG (2003) Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *J. Mol. Biol.* 331(2):303-313.
- Baker YR, Hodgkinson JT, Florea BI, Alza E, Galloway W, Grimm L, Geddis SM, Overkleeft HS, Welch M & Spring DR (2017) Identification of new quorum sensing autoinducer binding partners in *Pseudomonas aeruginosa* using photoaffinity probes. *Chem. Sci.* 8(11):7403-7411.
- Ball G, Durand E, Lazdunski A & Filloux A (2002) A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 43(2):475-485.
- Basta DW, Bergkessel M & Newman DK (2017) Identification of Fitness Determinants during Energy-Limited Growth Arrest in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 8(6).
- Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC & Mattick JS (2002a) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184(13):3605-3613.
- Beatson SA, Whitchurch CB, Semmler AB & Mattick JS (2002b) Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184(13):3598-3604.
- Beaussart A, Baker AE, Kuchma SL, El-Kirat-Chatel S, O'Toole GA & Dufrene YF (2014) Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili. *ACS Nano* 8(10):10723-10733.
- Bedard E, Prevost M & Déziel E (2016) *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *Microbiologyopen* 5(6):937-956.
- Belas R (2014) Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 22(9):517-527.
- Bertani I, Sevo M, Kojic M & Venturi V (2003) Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor *rpoS*/RpoS in *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.* 180(4):264-271.
- Bhagirath AY, Pydi SP, Li Y, Lin C, Kong W, Chelikani P & Duan K (2017) Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That Controls Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* 3(2):162-175.
- Bhuwan M, Lee HJ, Peng HL & Chang HY (2012) Histidine-containing phosphotransfer protein-B (HptB) regulates swarming motility through partner-switching system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *J. Biol. Chem.* 287(3):1903-1914.

- Bordi C, Lamy MC, Ventre I, Termine E, Hachani A, Fillet S, Roche B, Bleves S, Mejean V, Lazdunski A & Filloux A (2010) Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 76(6):1427-1443.
- Boucher JC, Yu H, Mudd MH & Deretic V (1997) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect. Immun.* 65(9):3838-3846.
- Brantl S (2007) Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(2):102-109.
- Brencic A & Lory S (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.* 72(3):612-632.
- Brencic A, McFarland KA, McManus HR, Castang S, Mogno I, Dove SL & Lory S (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the *RsmY* and *RsmZ* regulatory small RNAs. *Mol. Microbiol.* 73(3):434-445.
- Brill-Karniely Y, Jin F, Wong GC, Frenkel D & Dobnikar J (2017) Emergence of complex behavior in pili-based motility in early stages of *P. aeruginosa* surface adaptation. *Sci. Rep.* 7:45467.
- Broder UN, Jaeger T & Jenal U (2016) LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Microbiol* 2:16184.
- Brouwer S, Pustelny C, Ritter C, Klinkert B, Narberhaus F & Haussler S (2014) The PqsR and RhlR transcriptional regulators determine the level of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by producing two different *pqsABCDE* mRNA isoforms. *J. Bacteriol.* 196(23):4163-4171.
- Burrowes E, Baysse C, Adams C & O'Gara F (2006) Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152(Pt 2):405-418.
- Cai Z, Liu Y, Chen Y, Yam JK, Chew SC, Chua SL, Wang K, Givskov M & Yang L (2015) RpoN Regulates Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* via Modulating the PqsR Quorum Sensing Regulator. *Int. J. Mol. Sci.* 16(12):28311-28319.
- Caiazza NC, Shanks RM & O'Toole GA (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187(21):7351-7361.
- Calb R, Davidovitch A, Koby S, Giladi H, Goldenberg D, Margalit H, Holtel A, Timmis K, Sanchez-Romero JM, de Lorenzo V & Oppenheim AB (1996) Structure and function of the *Pseudomonas putida* integration host factor. *J. Bacteriol.* 178(21):6319-6326.
- Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R & Rahme LG (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(25):14613-14618.
- Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, Fadel F, Filloux A, Sivaneson M, de Bentzmann S & Bordi C (2016) The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal

- Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* 12(5):e1006032.
- Chen L, Zou Y, She P & Wu Y (2015) Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Res.* 172:19-25.
- Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C & Greenberg EP (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(5):2752-2757.
- Cowles KN, Moser TS, Siryaporn A, Nyakudarika N, Dixon W, Turner JJ & Gitai Z (2013) The putative Poc complex controls two distinct *Pseudomonas aeruginosa* polar motility mechanisms. *Mol. Microbiol.* 90(5):923-938.
- Croda-Garcia G, Grosso-Becerra V, Gonzalez-Valdez A, Servin-Gonzalez L & Soberon-Chavez G (2011) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. *Microbiology* 157(Pt 9):2545-2555.
- Damron FH, Owings JP, Okkotsu Y, Varga JJ, Schurr JR, Goldberg JB, Schurr MJ & Yu HD (2012) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* regulon controlled by the sensor kinase KinB and sigma factor RpoN. *J. Bacteriol.* 194(6):1317-1330.
- de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U & Timmis KN (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172(11):6568-6572.
- Delic-Attree I, Toussaint B, Froger A, Willison JC & Vignais PM (1996) Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in *algD* gene expression. *Microbiology* 142 (Pt 10):2785-2793.
- Déziel E, Comeau Y & Villemur R (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* 183(4):1195-1204.
- Déziel E, Lepine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG & Rahme LG (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(5):1339-1344.
- Déziel E, Lepine F, Milot S & Villemur R (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149(Pt 8):2005-2013.
- Dulcey CE, Dekimpe V, Fauvelle DA, Milot S, Groleau MC, Doucet N, Rahme LG, Lepine F & Deziel E (2013) The end of an old hypothesis: the pseudomonas signaling molecules 4-hydroxy-2-alkylquinolines derive from fatty acids, not 3-ketofatty acids. *Chem. Biol.* 20(12):1481-1491.

- Ellison CK, Dalia TN, Vidal Ceballos A, Wang JC, Biais N, Brun YV & Dalia AB (2018) Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*. *Nat Microbiol* 3(7):773-780.
- Farrow JM, 3rd, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP & Pesci EC (2008) PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the Rhl quorum-sensing system. *J. Bacteriol.* 190(21):7043-7051.
- Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L & Tolker-Nielsen T (2014) Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ. Microbiol.* 16(7):1961-1981.
- Ferrara S, Falcone M, Macchi R, Bragonzi A, Girelli D, Cariani L, Cigana C & Bertoni G (2017) The PAPI-1 pathogenicity island-encoded small RNA PesA influences *Pseudomonas aeruginosa* virulence and modulates pyocin S3 production. *PLoS One* 12(6):e0180386.
- Filloux A (2011) Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front. Microbiol.* 2:155.
- Francis VI, Stevenson EC & Porter SL (2017) Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364(11).
- Francis VI, Waters EM, Finton-James SE, Gori A, Kadioglu A, Brown AR & Porter SL (2018) Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 9(1):2219.
- Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Dupont MJ, Charette SJ, Boyle B & Levesque RC (2019) The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* 11(1):109-120.
- Fulcher NB, Holliday PM, Klem E, Cann MJ & Wolfgang MC (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol. Microbiol.* 76(4):889-904.
- Galle M, Carpentier I & Beyaert R (2012) Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci* 13(8):831-842.
- Gellatly SL & Hancock RE (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67(3):159-173.
- Gold V & Kudryashev M (2016) Recent progress in structure and dynamics of dual-membrane-spanning bacterial nanomachines. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 39:1-7.
- Goldberg JB, Hancock RE, Parales RE, Loper J & Cornelis P (2008) *Pseudomonas* 2007. *J. Bacteriol.* 190(8):2649-2662.
- Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS & Lory S (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell* 7(5):745-754.
- Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A & Lory S (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev.* 23(2):249-259.

- Guo Q, Kong W, Jin S, Chen L, Xu Y & Duan K (2014) PqsR-dependent and PqsR-independent regulation of motility and biofilm formation by PQS in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Basic Microbiol.* 54(7):633-643.
- Gutgsell N, Englund N, Niu L, Kaya Y, Lane BG & Ofengand J (2000) Deletion of the *Escherichia coli* pseudouridine synthase gene *truB* blocks formation of pseudouridine 55 in tRNA *in vivo*, does not affect exponential growth, but confers a strong selective disadvantage in competition with wild-type cells. *RNA* 6(12):1870-1881.
- Gutierrez B, Douthwaite S & Gonzalez-Zorn B (2013) Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs. *RNA Biol.* 10(8):1324-1332.
- Guvener ZT & Harwood CS (2007) Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol. Microbiol.* 66(6):1459-1473.
- Ha DG & O'Toole GA (2015) c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* Review. *Microbiol Spectr* 3(2):MB-0003-2014.
- Hammond JH, Dolben EF, Smith TJ, Bhujju S & Hogan DA (2015) Links between Anr and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Bacteriol.* 197(17):2810-2820.
- Hao Y, Murphy K, Lo RY, Khursigara CM & Lam JS (2015) Single-Nucleotide Polymorphisms Found in the *migA* and *wbpX* Glycosyltransferase Genes Account for the Intrinsic Lipopolysaccharide Defects Exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 197(17):2780-2791.
- He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM & Rahme LG (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(8):2530-2535.
- Heeb S, Blumer C & Haas D (2002) Regulatory RNA as Mediator in GacA/RsmA-Dependent Global Control of Exoproduct Formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 184(4):1046-1056.
- Heeb S, Kuehne SA, Bycroft M, Crivii S, Allen MD, Haas D, Camara M & Williams P (2006) Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J. Mol. Biol.* 355(5):1026-1036.
- Heo YJ, Chung IY, Choi KB & Cho YH (2007) R-type pyocin is required for competitive growth advantage between *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(1):180-185.
- Herzberg C, Weidinger LA, Dorrbecker B, Hubner S, Stulke J & Commichau FM (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics* 7(22):4032-4035.
- Hickman JW, Tifrea DF & Harwood CS (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(40):14422-14427.

- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ & Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212(1):77-86.
- Hodgkinson JT, Gross J, Baker YR, Spring DR & Welch M (2016) A new *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) binding partner: MexG. *Chem. Sci.* 7(4):2553-2562.
- Hossain S & Boon EM (2017) Discovery of a Novel Nitric Oxide Binding Protein and Nitric-Oxide-Responsive Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* 3(6):454-461.
- Houot L, Fanni A, de Bentzmann S & Bordi C (2012) A bacterial two-hybrid genome fragment library for deciphering regulatory networks of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 158(Pt 8):1964-1971.
- Hsu JL, Chen HC, Peng HL & Chang HY (2008) Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Biol. Chem.* 283(15):9933-9944.
- Humair B, Wackwitz B & Haas D (2010) GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(5):1497-1506.
- Inclan YF, Persat A, Greninger A, Von Dollen J, Johnson J, Krogan N, Gitai Z & Engel JN (2016) A scaffold protein connects type IV pili with the Chp chemosensory system to mediate activation of virulence signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 101(4):590-605.
- Ishimoto KS & Lory S (1989) Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(6):1954-1957.
- Jackson KD, Starkey M, Kremer S, Parsek MR & Wozniak DJ (2004) Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186(14):4466-4475.
- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV & Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(24):14339-14344.
- Janssen KH, Diaz M, Gode CJ, Wolfgang MC & Yahr TL (2018a) *RsmV* a small non-coding regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* that sequesters RsmA and RsmF from target mRNAs. 10.1101/315341.
- Janssen KH, Diaz MR, Golden M, Graham JW, Sanders W, Wolfgang MC & Yahr TL (2018b) Functional Analyses of the *RsmY* and *RsmZ* Small Noncoding Regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 200(11).
- Jean-Pierre F (2017) Caractérisation de la régulation de la motilité de type swarming et des différences génétiques associées à la croissance bactérienne en surface ou en bouillon chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ph.D. (Université du Québec, Québec). 214 p

- Jean-Pierre F, Perreault J & Déziel E (2015) Complex autoregulation of the post-transcriptional regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 161(9):1889-1896.
- Jean-Pierre F, Tremblay J & Déziel E (2016) Broth versus Surface-Grown Cells: Differential Regulation of *RsmY/Z* Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB System. *Front. Microbiol.* 7:2168.
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH & Quax WJ (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76(1):46-65.
- Kageyama M (1970a) GENETIC MAPPING OF A BACTERIOCINOGENIC FACTOR IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
- I. MAPPING OF PYOCIN R2 FACTOR BY CONJUGATION. *The Journal of General and Applied Microbiology* 16(6):523-530.
- Kageyama M (1970b) GENETIC MAPPING OF A BACTERIOCINOGENIC FACTOR IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
- II. MAPPING OF PYOCIN R2 FACTOR BY TRANSDUCTION WITH PHAGE F116. *The Journal of General and Applied Microbiology* 16(6):531-535.
- Kazmierczak BI, Schniederberend M & Jain R (2015) Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 28:78-82.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(9):634-644.
- Kim SK & Lee JH (2016) Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* 54(2):71-85.
- Kocincova D & Lam JS (2013) A deletion in the *wapB* promoter in many serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* accounts for the lack of a terminal glucose residue in the core oligosaccharide and resistance to killing by R3-pyocin. *Mol. Microbiol.* 89(3):464-478.
- Kocincova D, Ostler SL, Anderson EM & Lam JS (2012) Rhamnosyltransferase genes *migA* and *wapR* are regulated in a differential manner to modulate the quantities of core oligosaccharide glycoforms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 194(16):4295-4300.
- 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. *J. Bacteriol.* 182(21):5990-5996.
- Kohler T, Donner V & van Delden C (2010) Lipopolysaccharide as shield and receptor for R-pyocin-mediated killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192(7):1921-1928.
- Kojic M & Venturi V (2001) Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J. Bacteriol.* 183(12):3712-3720.
- Kong W, Chen L, Zhao J, Shen T, Surette MG, Shen L & Duan K (2013) Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Mol. Microbiol.* 88(4):784-797.

- Kuchma SL, Delalez NJ, Filkins LM, Snaveley EA, Armitage JP & O'Toole GA (2015) Cyclic di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the MotAB stator. *J. Bacteriol.* 197(3):420-430.
- Kumazaki T & Ishii S (1982) Comparative study on fibers isolated from four R-type pyocins, phage-tail-like bacteriocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* 92(5):1559-1566.
- Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P & Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21(6):1137-1146.
- Lee CK, de Anda J, Baker AE, Bennett RR, Luo Y, Lee EY, Keefe JA, Helali JS, Ma J, Zhao K, Golestanian R, O'Toole GA & Wong GCL (2018) Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115(17):4471-4476.
- Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG & Ausubel FM (2006a) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7(10):R90.
- Lee J & Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6(1):26-41.
- Lee JH, Lequette Y & Greenberg EP (2006b) Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol. Microbiol.* 59(2):602-609.
- Lee JH & Zhao Y (2016) Integration Host Factor Is Required for RpoN-Dependent *hrpL* Gene Expression and Controls Motility by Positively Regulating *rsmB* sRNA in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 106(1):29-36.
- Lee K & Yoon SS (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(6):1053-1064.
- LeRoux M, Kirkpatrick RL, Montauti EI, Tran BQ, Peterson SB, Harding BN, Whitney JC, Russell AB, Traxler B, Goo YA, Goodlett DR, Wiggins PA & Mougous JD (2015) Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *Elife* 4.
- Lesic B & Rahme LG (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol. Biol.* 9:20.
- Li K, Xu C, Jin Y, Sun Z, Liu C, Shi J, Chen G, Chen R, Jin S & Wu W (2013) SuhB is a regulator of multiple virulence genes and essential for pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 4(6):e00419-00413.
- Li K, Yang G, Debru AB, Li P, Zong L, Li P, Xu T, Wu W, Jin S & Bao Q (2017) SuhB Regulates the Motile-Sessile Switch in *Pseudomonas aeruginosa* through the Gac/Rsm Pathway and c-di-GMP Signaling. *Front. Microbiol.* 8:1045.
- Li Y, Petrova OE, Su S, Lau GW, Panmanee W, Na R, Hassett DJ, Davies DG & Sauer K (2014) BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 10(6):e1004168.

- 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.
- Lin Chua S, Liu Y, Li Y, Jun Ting H, Kohli GS, Cai Z, Suwanchaikasem P, Kau Kit Goh K, Pin Ng S, Tolker-Nielsen T, Yang L & Givskov M (2017) Reduced Intracellular c-di-GMP Content Increases Expression of Quorum Sensing-Regulated Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol* 7:451.
- Lin CT, Huang YJ, Chu PH, Hsu JL, Huang CH & Peng HL (2006) Identification of an HptB-mediated multi-step phosphorelay in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res. Microbiol.* 157(2):169-175.
- Lindhout T, Lau PC, Brewer D & Lam JS (2009) Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology* 155(Pt 10):3449-3460.
- Lory S, Wolfgang M, Lee V & Smith R (2004) The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *Int. J. Med. Microbiol.* 293(7-8):479-482.
- Luo Y, Zhao K, Baker AE, Kuchma SL, Coggan KA, Wolfgang MC, Wong GC & O'Toole GA (2015) A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *MBio* 6(1).
- Ma JF, Hager PW, Howell ML, Phibbs PV & Hassett DJ (1998) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *J. Bacteriol.* 180(7):1741-1749.
- Maier B, Potter L, So M, Long CD, Seifert HS & Sheetz MP (2002) Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(25):16012-16017.
- Maier B & Wong GCL (2015) How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces. *Trends Microbiol.* 23(12):775-788.
- Malhotra S, Hayes D, Jr. & Wozniak DJ (2019) Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin. Microbiol. Rev.* 32(3).
- Marden JN, Diaz MR, Walton WG, Gode CJ, Betts L, Urbanowski ML, Redinbo MR, Yahr TL & Wolfgang MC (2013) An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(37):15055-15060.
- Matsui H, Sano Y, Ishihara H & Shinomiya T (1993) Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (*priN*) and negative (*priR*) regulatory genes. *J. Bacteriol.* 175(5):1257-1263.
- Mattick JS (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:289-314.
- Maura D, Hazan R, Kitao T, Ballok AE & Rahme LG (2016) Evidence for Direct Control of Virulence and Defense Gene Circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator, MvfR. *Sci. Rep.* 6:34083.

- Mena KD & Gerba CP (2009) Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201:71-115.
- Merino S & Tomas JM (2014) Gram-negative flagella glycosylation. *Int. J. Mol. Sci.* 15(2):2840-2857.
- Mern DS, Ha SW, Khodaverdi V, Gliese N & Gorisch H (2010) A complex regulatory network controls aerobic ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*: indication of four levels of sensor kinases and response regulators. *Microbiology* 156(Pt 5):1505-1516.
- Michel-Briand Y & Baysse C (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84(5-6):499-510.
- Mikkelsen H, Ball G, Giraud C & Filloux A (2009) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS One* 4(6):e6018.
- Mikkelsen H, McMullan R & Filloux A (2011a) The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* 6(12):e29113.
- Mikkelsen H, Sivaneson M & Filloux A (2011b) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 13(7):1666-1681.
- Miller CL, Romero M, Karna SL, Chen T, Heeb S & Leung KP (2016) *RsmW*, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiol.* 16(1):155.
- Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. xvi, 466 p. p
- Mohr CD, Martin DW, Konyecsni WM, Govan JR, Lory S & Deretic V (1990) Role of the far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172(11):6576-6580.
- Moradali MF, Ghods S & Rehm BH (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:39.
- Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ & Sauer K (2006) BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188(21):7335-7343.
- Morris ER, Hall G, Li C, Heeb S, Kulkarni RV, Lovelock L, Silistre H, Messina M, Camara M, Emsley J, Williams P & Searle MS (2013) Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure* 21(9):1659-1671.
- Mukherjee S, Moustafa DA, Stergioula V, Smith CD, Goldberg JB & Bassler BL (2018) The PqsE and RhIR proteins are an autoinducer synthase-receptor pair that control virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115(40):E9411-E9418.
- Mulcahy LR, Isabella VM & Lewis K (2014) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 68(1):1-12.

- Muller VS, Jungblut PR, Meyer TF & Hunke S (2011) Membrane-SPINE: an improved method to identify protein-protein interaction partners of membrane proteins in vivo. *Proteomics* 11(10):2124-2128.
- Murray TS & Kazmierczak BI (2008) *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J. Bacteriol.* 190(8):2700-2708.
- Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, Ohnishi M, Murata T, Mori H & Hayashi T (2000) The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.* 38(2):213-231.
- O'Connor JR, Kuwada NJ, Huangyutitham V, Wiggins PA & Harwood CS (2012) Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol. Microbiol.* 86(3):720-729.
- O'Connor M & Gregory ST (2011) Inactivation of the RluD pseudouridine synthase has minimal effects on growth and ribosome function in wild-type *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 193(1):154-162.
- O'Toole GA & Wong GC (2016) Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 30:139-146.
- Oglesby-Sherrouse AG & Vasil ML (2010) Characterization of a heme-regulated non-coding RNA encoded by the *prfF* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 5(4):e9930.
- Ohsumi M, Shinomiya T & Kageyama M (1980) Comparative study on R-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* 87(4):1119-1125.
- Oliveira NM, Foster KR & Durham WM (2016) Single-cell twitching chemotaxis in developing biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113(23):6532-6537.
- Paget MS (2015) Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* 5(3):1245-1265.
- Penaloza-Vazquez A, Fakhr MK, Bailey AM & Bender CL (2004) *AlgR* functions in *algC* expression and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Microbiology* 150(Pt 8):2727-2737.
- Penterman J, Singh PK & Walker GC (2014) Biological cost of pyocin production during the SOS response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 196(18):3351-3359.
- Persat A, Inclan YF, Engel JN, Stone HA & Gitai Z (2015) Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(24):7563-7568.
- Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Haas D & Williams P (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183(22):6676-6683.
- Petrova OE, Cherny KE & Sauer K (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclase GcbA, a homolog of *P. fluorescens* GcbA, promotes initial attachment to surfaces, but not biofilm formation, via regulation of motility. *J. Bacteriol.* 196(15):2827-2841.

- Petrova OE, Cherny KE & Sauer K (2015) The diguanylate cyclase GcbA facilitates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion by activating BdlA. *J. Bacteriol.* 197(1):174-187.
- Petrova OE & Sauer K (2010) The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA *rsmZ* through CafA. *J. Bacteriol.* 192(20):5275-5288.
- Petrova OE & Sauer K (2011) SagS contributes to the motile-sessile switch and acts in concert with BfiSR to enable *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 193(23):6614-6628.
- Petrova OE & Sauer K (2012) Dispersion by *Pseudomonas aeruginosa* requires an unusual posttranslational modification of BdlA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(41):16690-16695.
- Poon KK, Westman EL, Vinogradov E, Jin S & Lam JS (2008) Functional characterization of MigA and WapR: putative rhamnosyltransferases involved in outer core oligosaccharide biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190(6):1857-1865.
- Potvin E, Sanschagrin F & Levesque RC (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(1):38-55.
- 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.
- Rampioni G, Bertani I, Zennaro E, Polticelli F, Venturi V & Leoni L (2006) The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J. Bacteriol.* 188(2):815-819.
- Rampioni G, Pustelny C, Fletcher MP, Wright VJ, Bruce M, Rumbaugh KP, Heeb S, Camara M & Williams P (2010) Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environ. Microbiol.* 12(6):1659-1673.
- Ramsey DM & Wozniak DJ (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 56(2):309-322.
- 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.
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Mejean V & Foglino M (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* 8(11):498-504.
- Rojo F (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas* : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 34(5):658-684.
- Romling U, Gomelsky M & Galperin MY (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57(3):629-639.

- Sana TG, Berni B & Bleves S (2016) The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol* 6:61.
- Schirm M, Arora SK, Verma A, Vinogradov E, Thibault P, Ramphal R & Logan SM (2004) Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 186(9):2523-2531.
- Schubert M, Lapouge K, Duss O, Oberstrass FC, Jelesarov I, Haas D & Allain FH (2007) Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(9):807-813.
- Schulmeyer KH, Diaz MR, Bair TB, Sanders W, Gode CJ, Laederach A, Wolfgang MC & Yahr TL (2016) Primary and Secondary Sequence Structure Requirements for Recognition and Discrimination of Target RNAs by *Pseudomonas aeruginosa* RsmA and RsmF. *J. Bacteriol.* 198(18):2458-2469.
- Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS & Greenberg EP (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* 51(4):973-985.
- Schuster M, Lostroh CP, Ogi T & Greenberg EP (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185(7):2066-2079.
- Séguin M (2012) *La régulation de RsmA chez Pseudomonas aeruginosa*. Maîtrise (Université du Québec, Québec). 175 p
- Shi J, Jin Y, Bian T, Li K, Sun Z, Cheng Z, Jin S & Wu W (2015) SuhB is a novel ribosome associated protein that regulates expression of MexXY by modulating ribosome stalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 98(2):370-383.
- Shinomiya T, Shiga S & Kageyama M (1983a) Genetic determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. I. Localization of the pyocin R2 gene cluster between the trpCD and trpE genes. *Mol. Gen. Genet.* 189(3):375-381.
- Shinomiya T, Shiga S, Kikuchi A & Kageyama M (1983b) Genetic determinant of pyocin R2 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. II. Physical characterization of pyocin R2 genes using R-prime plasmids constructed from R68.45. *Mol. Gen. Genet.* 189(3):382-389.
- Silva-Rocha R, Chavarria M, Kleijn RJ, Sauer U & de Lorenzo V (2013) The IHF regulon of exponentially growing *Pseudomonas putida* cells. *Environ. Microbiol.* 15(1):49-63.
- Soberon-Chavez G, Lepine F & Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(6):718-725.
- Sonnleitner E, Abdou L & Haas D (2009) Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(51):21866-21871.
- Sonnleitner E & Blasi U (2014) Regulation of Hfq by the RNA *CrcZ* in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genet.* 10(6):e1004440.
- Sonnleitner E & Haas D (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91(1):63-79.

- Sonnleitner E, Wulf A, Campagne S, Pei XY, Wolfinger MT, Forlani G, Prindl K, Abdou L, Resch A, Allain FH, Luisi BF, Urlaub H & Blasi U (2018) Interplay between the catabolite repression control protein Crc, Hfq and RNA in Hfq-dependent translational regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 46(3):1470-1485.
- Sorger-Domenigg T, Sonnleitner E, Kaberdin VR & Blasi U (2007) Distinct and overlapping binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq and RsmA proteins on the non-coding RNA *RsmY*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352(3):769-773.
- Spangenberg C, Heuer T, Burger C & Tummeler B (1996) Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 396(2-3):213-217.
- Storz G, Vogel J & Wassarman KM (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol. Cell* 43(6):880-891.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S & Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-964.
- Takeuchi K, Kiefer P, Reimmann C, Keel C, Dubuis C, Rolli J, Vorholt JA & Haas D (2009) Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* 284(50):34976-34985.
- Thibodeau SA, Fang R & Joung JK (2004) High-throughput beta-galactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems. *BioTechniques* 36(3):410-415.
- Touhami A, Jericho MH, Boyd JM & Beveridge TJ (2006) Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili by using atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* 188(2):370-377.
- Toussaint B, Delic-Attree I & Vignais PM (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196(1):416-421.
- Toutain CM, Zegans ME & O'Toole GA (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187(2):771-777.
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y & Nomura N (2016) Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80(1):7-12.
- Tremblay J (2011) *Caractérisation de la motilité de type Swarming chez Pseudomonas aeruginosa*. Doctorat en biologie (Université du Québec, Québec). xvi, 258 p. p. Accès au document <http://espace.inrs.ca/id/eprint/302>
- Tremblay J & Deziel E (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J. Basic Microbiol.* 48(6):509-515.
- Tremblay J & Deziel E (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 11:587.

- Tremblay J, Richardson AP, Lepine F & Deziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9(10):2622-2630.
- Tsang J & Hoover TR (2014) Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. *Scientifica (Cairo)* 2014:681754.
- Turkina MV & Vikstrom E (2019) Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Innate Immun.* 11(3):263-279.
- Turnbull L & Whitchurch CB (2014) Motility assay: twitching motility. *Methods Mol. Biol.* 1149:73-86.
- Valentini M, Garcia-Maurino SM, Perez-Martinez I, Santero E, Canosa I & Lapouge K (2014) Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology* 160(Pt 10):2243-2252.
- Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA & Filloux A (2018) Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Opin. Microbiol.* 41:15-20.
- Valot B, Guyeux C, Rolland JY, Mazouzi K, Bertrand X & Hocquet D (2015) What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. *PLoS One* 10(5):e0126468.
- van Schaik EJ, Giltner CL, Audette GF, Keizer DW, Bautista DL, Slupsky CM, Sykes BD & Irvin RT (2005) DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J. Bacteriol.* 187(4):1455-1464.
- Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S & Filloux A (2005) The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* 151(Pt 3):985-997.
- Vater SM, Weisse S, Maleschlijski S, Lotz C, Koschitzki F, Schwartz T, Obst U & Rosenhahn A (2014) Swimming behavior of *Pseudomonas aeruginosa* studied by holographic 3D tracking. *PLoS One* 9(1):e87765.
- Verma A, Schirm M, Arora SK, Thibault P, Logan SM & Ramphal R (2006) Glycosylation of b-Type flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: structural and genetic basis. *J. Bacteriol.* 188(12):4395-4403.
- Viducic D, Murakami K, Amoh T, Ono T & Miyake Y (2016) RpoN Modulates Carbapenem Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* through Pseudomonas Quinolone Signal and PqsE. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(10):5752-5764.
- Viducic D, Murakami K, Amoh T, Ono T & Miyake Y (2017) RpoN Promotes *Pseudomonas aeruginosa* Survival in the Presence of Tobramycin. *Front. Microbiol.* 8:839.
- Viducic D, Ono T, Murakami K, Katakami M, Susilowati H & Miyake Y (2007) *rpoN* gene of *Pseudomonas aeruginosa* alters its susceptibility to quinolones and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(4):1455-1462.

- Wang C, Ye F, Kumar V, Gao YG & Zhang LH (2014a) BswR controls bacterial motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through modulation of the small RNA *rsmZ*. *Nucleic Acids Res.* 42(7):4563-4576.
- Wang S, Yu S, Zhang Z, Wei Q, Yan L, Ai G, Liu H & Ma LZ (2014b) Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(21):6724-6732.
- West SE, Sample AK & Runyen-Janecky LJ (1994) The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J. Bacteriol.* 176(24):7532-7542.
- Wood TK (2014) Biofilm dispersal: deciding when it is better to travel. *Mol. Microbiol.* 94(4):747-750.
- Xu L, Venkataramani P, Ding Y, Liu Y, Deng Y, Yong GL, Xin L, Ye R, Zhang L, Yang L & Liang ZX (2016) A Cyclic di-GMP-binding Adaptor Protein Interacts with Histidine Kinase to Regulate Two-component Signaling. *J. Biol. Chem.* 291(31):16112-16123.
- Yang HJ, Matewish M, Loubens I, Storey DG, Lam JS & Jin SG (2000) *migA*, a quorum-responsive gene of *Pseudomonas aeruginosa*, is highly expressed in the cystic fibrosis lung environment and modifies low-molecular-mass lipopolysaccharide. *Microbiol-Uk* 146:2509-2519.
- Yang N, Ding S, Chen F, Zhang X, Xia Y, Di H, Cao Q, Deng X, Wu M, Wong CC, Tian XX, Yang CG, Zhao J & Lan L (2015) The Crc protein participates in down-regulation of the Lon gene to promote rhamnolipid production and Rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 96(3):526-547.
- Yeung AT, Parayno A & Hancock RE (2012) Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 3(3).
- Yu S, Jensen V, Seeliger J, Feldmann I, Weber S, Schleicher E, Haussler S & Blankenfeldt W (2009) Structure elucidation and preliminary assessment of hydrolase activity of PqsE, the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) response protein. *Biochemistry* 48(43):10298-10307.

7 ANNEXE I

Tableau 7.1 Transposants obtenus grâce au criblage

Nom	Couleur colonie	RsmZ	Gène affecté	Nom	Couleur colonie	RsmZ	Gène affecté
CMA1	N/A	=		CMA96	comme hptBgacA	=	
CMA2	N/A	=		CMA97	comme hptBgacA	=	
CMA3	N/A	=		CMA98	comme hptBgacA	=	
CMA4	N/A	+		CMA99	comme hptBgacA	-	R pyocine
CMA5	N/A	+		CMA100	comme hptBgacA	=	
CMA6		N/A		CMA101	comme hptBgacA	=	
CMA7	plus pâle, comme gacA	--	<i>fgtA</i> /PA14_50300	CMA102	comme hptBgacA	=	
CMA8	comme hptBgacA			CMA103	comme hptBgacA	=	
CMA9	comme hptBgacA	--	<i>prfC</i>	CMA104	comme hptBgacA	=	
CMA10	comme hptBgacA	=		CMA105	comme hptBgacA	=	
CMA11	plus pâle	-	<i>wapB</i> /PA14_51220	CMA106	Très blanche	---	rapporteur
CMA12	comme hptBgacA			CMA107	comme hptBgacA	=	
CMA13	comme hptBgacA	--	PA14_08150	CMA108	Très blanche	---	PA14_58850
CMA14	comme hptBgacA	=		CMA109	comme hptBgacA	=	
CMA15	comme hptBgacA	=		CMA110	Bleu pâle, faible croissance	-	<i>aceE</i>
CMA16	Très blanche	---	Beta-gal	CMA111	comme hptBgacA	=	
CMA17	comme hptBgacA	=		CMA112	Plus pâle (léger)	=	
CMA18	comme hptBgacA	=		CMA113	Bleu foncé	--	<i>myfR</i>
CMA19	comme hptBgacA			CMA114	Plus pâle (léger)	=	
CMA20	comme hptBgacA			CMA115	bleu foncé	--	<i>myfR</i>
CMA21	plus foncée, couleur plus uniforme	--	<i>myfR</i>	CMA116	comme hptBgacA	=	
CMA22	légèrement plus pâle	-	<i>nadB</i> /PA14_54450	CMA117	Tout blanc	---	rapporteur
CMA23	comme hptBgacA	=		CMA118	comme hptBgacA	=	
CMA24	comme hptBgacA	-		CMA119	comme hptBgacA	+	
CMA25	comme hptBgacA	-		CMA120	un peu plus pâle	-	Aconitate hydratase
CMA26	comme hptBgacA	-		CMA121	Blanc	-	<i>aceE</i>
CMA27	comme hptBgacA	-		CMA122	comme hptBgacA	---	
CMA28	aucun bleu	---	Beta-gal	CMA123	comme hptBgacA	=	
CMA29	légèrement plus pâle	-	<i>cysG</i> /PA14_30340	CMA124	comme hptBgacA	--	<i>pqsD</i>
CMA30	comme hptBgacA	-		CMA125	faible DO	=	
CMA31	pâle comme gacA	--	<i>cysG</i> /PA14_30340	CMA126	comme hptBgacA	--	<i>cysM</i>

CMA32	comme hptBgacA	=		CMA127	comme hptBgacA	-	Aconitate hydratase
CMA33	aucun bleu	---	Beta-gal	CMA128	comme hptBgacA	=	
CMA34	comme hptBgacA	=		CMA129	comme hptBgacA	-	Aconitate hydratase
CMA35	centre légèrement plus pâle	+	MexY/PA14_384 10	CMA130	comme hptBgacA	-	Aconitate hydratase
CMA36	comme hptBgacA	=	wabB/PA14_5122 0	CMA131	comme hptBgacA	-	N/A
CMA37	comme hptBgacA	+		CMA132	comme hptBgacA	=	
CMA38	comme hptBgacA	=		CMA133	comme hptBgacA	=	
CMA39	comme hptBgacA	=		CMA134	comme hptBgacA	=	
CMA40	comme hptBgacA	=		CMA135	très uniforme, bleu	--	<i>pqsE</i>
CMA41	aucun bleu	---	Beta-gal	CMA136	comme hptBgacA	=	
CMA42	comme hptBgacA	=		CMA137	plus pâle	---	<i>ihfA</i>
CMA43	comme hptBgacA	=		CMA138	comme hptBgacA	=	
CMA44	comme hptBgacA	-	R Pyocine	CMA139	comme hptBgacA	=	
CMA45	comme hptBgacA	=		CMA140	comme hptBgacA	=	
CMA46	comme hptBgacA	--	R pyocine	CMA141	comme hptBgacA	=	
CMA47	comme hptBgacA	=		CMA142	comme hptBgacA	=	
CMA48	comme hptBgacA	=		CMA143	Blanc	---	Rapporteur
CMA49	comme hptBgacA	=		CMA144	comme hptBgacA	=	
CMA50	plus pâle, comme gacA	=	R pyocine	CMA145	comme hptBgacA	=	
CMA51	comme hptBgacA	=		CMA146	comme hptBgacA	=	
CMA52	plus pâle	-	<i>rluD</i> pseudouridine synthase	CMA147	comme hptBgacA	=	
CMA53	comme hptBgacA	=		CMA148	comme hptBgacA	=	
CMA54	plus foncée, couleur plus uniforme	--	<i>pqsC</i>	CMA149	Blanc	---	Rapporteur
CMA55	comme hptBgacA	=		CMA150	comme hptBgacA	=	
CMA56	un peu plus pâle	-	<i>rluD</i> pseudouridine synthase	CMA151	comme hptBgacA	=	
CMA57	comme hptBgacA	=		CMA152	comme hptBgacA	=	
CMA58	comme hptBgacA	=		CMA153	comme hptBgacA	=	
CMA59	comme hptBgacA	=		CMA154	comme hptBgacA	=	
CMA60	comme hptBgacA	=		CMA155	Blanc	---	Rapporteur
CMA61	comme hptBgacA	=		CMA156	comme hptBgacA	=	
CMA62	plus pâle, comme gacA	--		CMA157	comme hptBgacA	=	
CMA63	comme hptBgacA	=		CMA158	comme hptBgacA	=	
CMA64	comme hptBgacA	=	<i>wapB</i>	CMA159	comme hptBgacA	=	
CMA65	comme hptBgacA	=		CMA160	comme hptBgacA	=	

CMA66	Très blanche	---		CMA161	comme hptBgacA	=	
CMA67	comme hptBgacA	--		CMA162	comme hptBgacA	=	
CMA68	comme hptBgacA	=	PA14 57510 secreted lipoprotein	CMA163	comme hptBgacA	=	
CMA69	comme hptBgacA	=		CMA164	comme hptBgacA	=	
CMA70	un peu plus pâle	-		CMA165	comme hptBgacA	=	
CMA71	comme hptBgacA	-		CMA166	comme hptBgacA	=	
CMA72	comme hptBgacA	=		CMA167	comme hptBgacA	=	
CMA73	comme hptBgacA	-	<i>wapB</i>	CMA168	comme hptBgacA	=	
CMA74	comme hptBgacA	=		CMA169	comme hptBgacA	=	
CMA75	plus pâle	=	<i>truB</i>	CMA170	comme hptBgacA	=	
CMA76	comme hptBgacA	=		CMA171	faible DO		
CMA77	comme hptBgacA	=		CMA172	comme hptBgacA	--	<i>pqsE</i>
CMA78	un peu plus pâle	-	<i>truB</i>	CMA173	comme hptBgacA	=	
CMA79	Très blanche	---	Beta-gal	CMA174	comme hptBgacA	=	
CMA80	comme hptBgacA	=		CMA175	Blanc	---	Rapporteur
CMA81	très pâle, faible croissance	--	<i>zwf</i>	CMA176	Blanc	---	Rapporteur
CMA82	comme hptBgacA	--		CMA177	comme hptBgacA	=	
CMA83	plus pâle	-	<i>truB</i>	CMA178	comme hptBgacA	=	
CMA84	plus pâle, comme gacA	-	<i>rluD</i>	CMA179	comme hptBgacA	=	
CMA85	comme hptBgacA	=		CMA180	comme hptBgacA	=	
CMA86	plus pâle, comme gacA	-	<i>rluD</i>	CMA181	comme hptBgacA	=	
CMA87	comme hptBgacA	=		CMA182	comme hptBgacA	=	
CMA88	comme hptBgacA	=		CMA183	plus pâle	--	Aconitate hydratase
CMA89	comme hptBgacA	=		CMA184	comme hptBgacA	=	
CMA90	comme hptBgacA	=		CMA185	plus pâle	--	<i>pqsA</i>
CMA91	plus pâle, comme gacA	-	<i>rluD</i>	CMA186	comme hptBgacA	=	
CMA92	comme hptBgacA	=		CMA187	plus pâle	--	promoteur <i>myfR</i>
CMA93	comme hptBgacA	=		CMA188	comme hptBgacA	=	
CMA94	comme hptBgacA	=		CMA189	plus pâle	---	<i>zwf</i>
CMA95	comme hptBgacA	=		CMA190	plus pâle	--	<i>nadB</i>

Les transposants en bleu ont été séquencés. CMA6 (rouge) est le résultat d'une contamination de CMA5. La colonne *RsmZ* représente une valeur semi-quantitative de l'activité de la β -gal : (=) similaire à $\Delta hptBgacA$ -, (-) entre $\Delta hptBgacA$ - et $gacA$ -, (--), similaire à $gacA$ - et (---) niveau quasi-nul).

8 ANNEXE II

Confirmation de l'expression de tous les mutants du criblage avant le séquençage. En bleu, la souche de base du criblage $\Delta hptBgacA::MrT7$

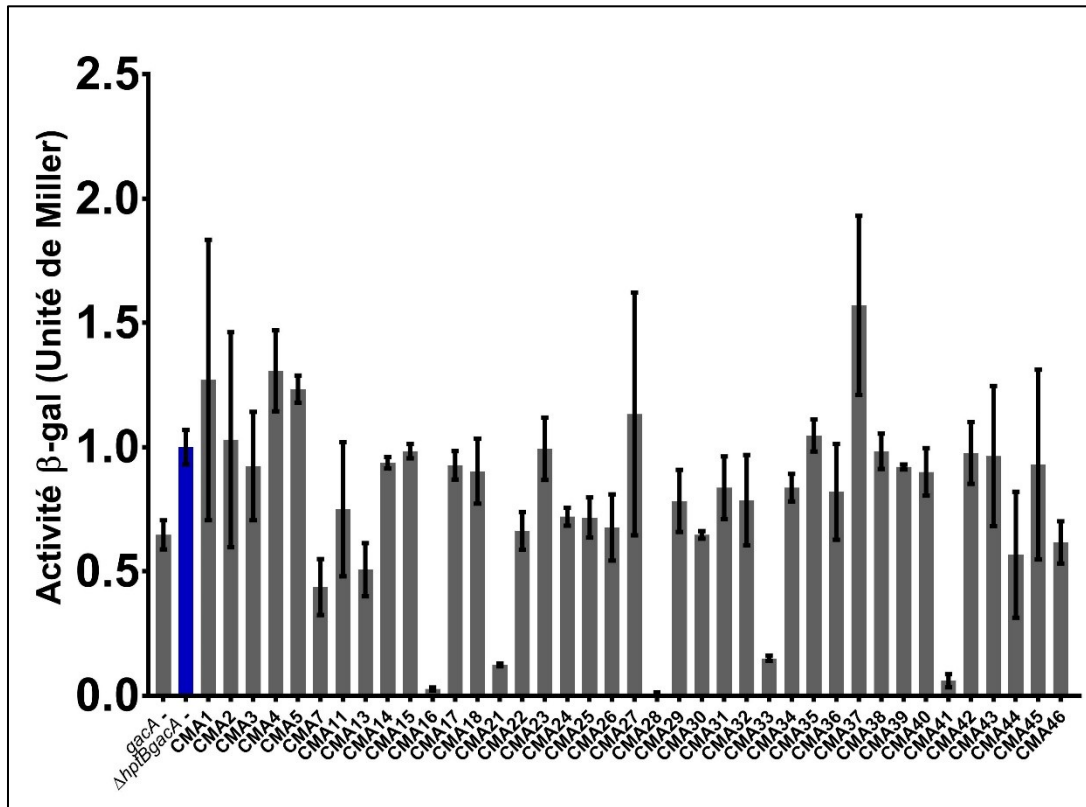


Figure 8.0.1 Dosage β -gal obtenue à partir du protocole original de Miller.

L'activité β -gal est montrée de façon relative pour combiner les différents essais et mieux les comparer.

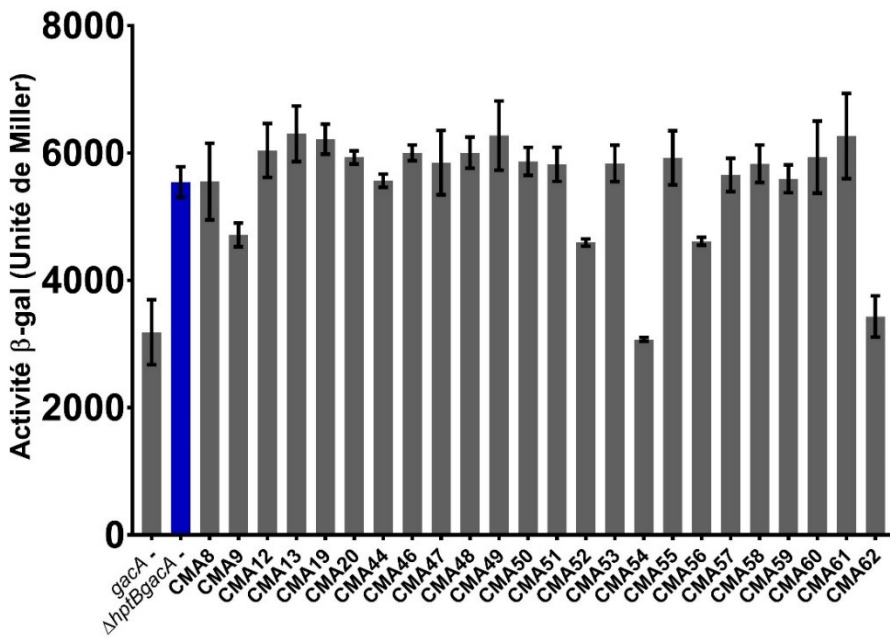


Figure 8.0.2 Dosage des transposants CMA8 à CMA62

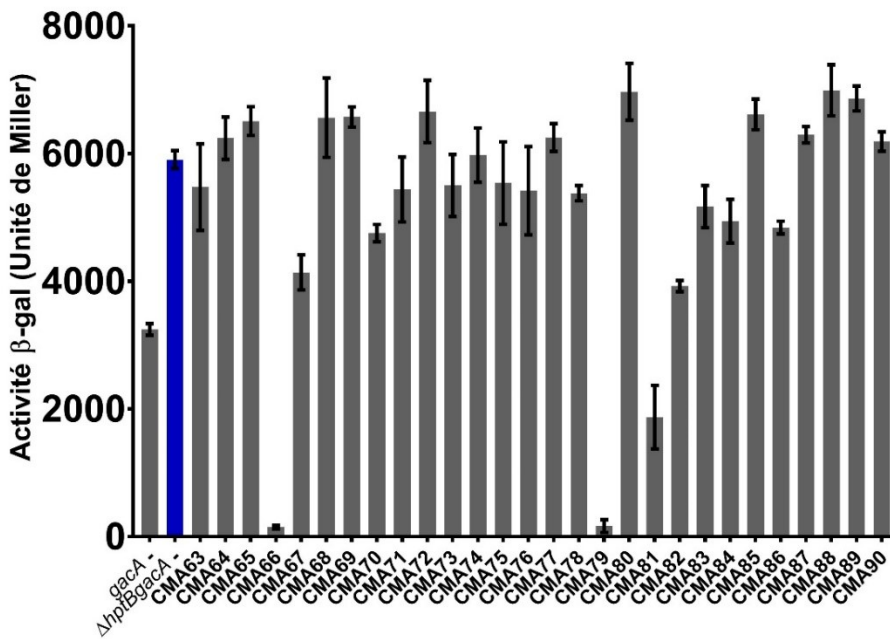


Figure 8.0.3 Dosage des transposants CMA63 à CMA90

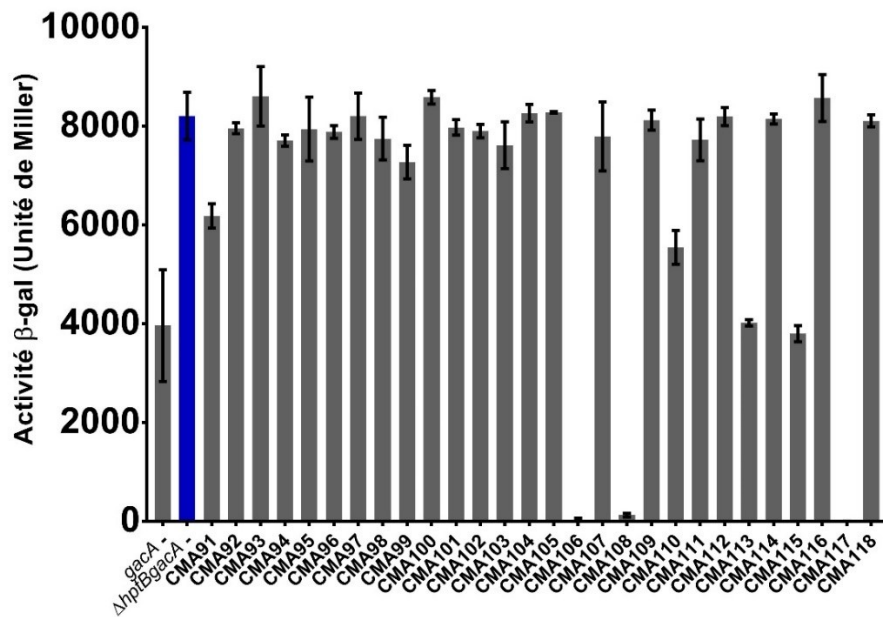


Figure 8.0.4 Dosage des transposants CMA91 à CMA118

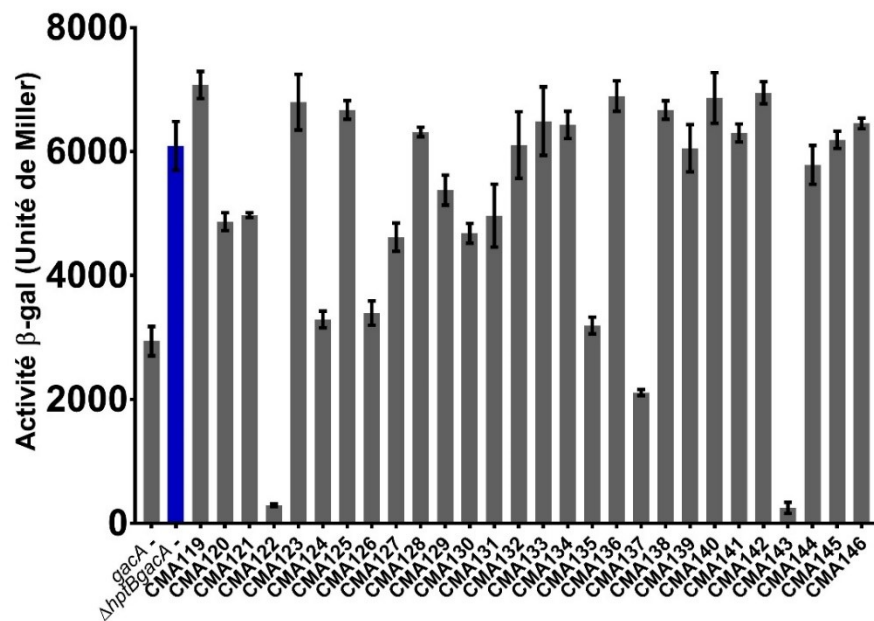


Figure 8.0.5 Dosage des transposants CMA119 à CMA146

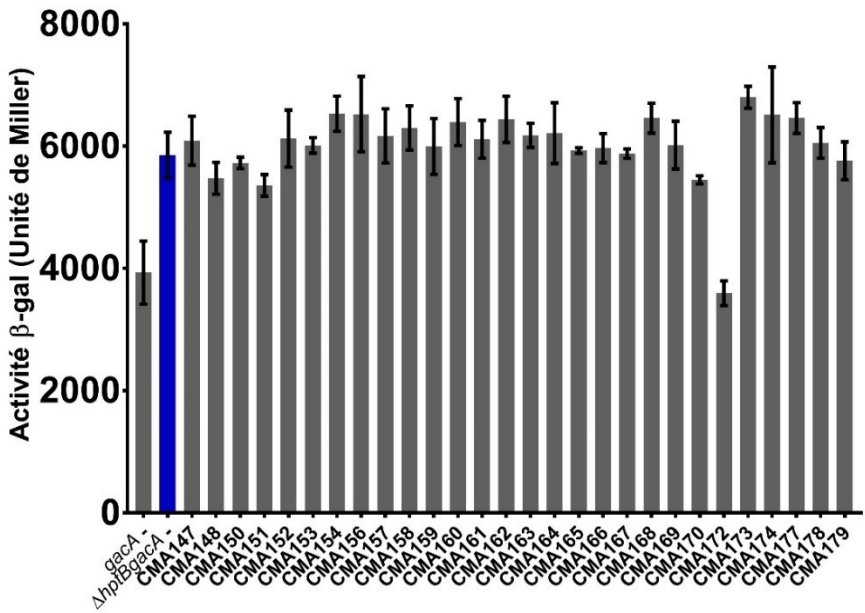


Figure 8.0.6 Dosage des transposants CMA147 à CMA179

9 ANNEXE III

Tableau 9.1 Liste complète de toutes les insertions de transposon identifiées.

Transposant	Gène affecté	Locus tag (PA14)	Site d'insertion (pb)	orientation
CMA 7	<i>fgtA</i>	PA14_50300	4469583	←
CMA 9	<i>prfC</i>	PA14_13410	1153339	→
CMA 11	<i>wapB</i> (1)	PA14_51220	4552121	→
CMA 13	R pyocine (1)	PA14_08150	700584	→
CMA 16	Rapporteur	N/A	N/A	N/A
CMA 21	<i>MvfR</i> (1)	PA14_51340	4563008	→
CMA 22	<i>nadB</i> (1)	PA14_54450	4827389	←
CMA 28	Rapporteur	N/A	N/A	N/A
CMA 29	<i>cysG</i> (1)	PA14_30340	2628561	←
CMA 31	<i>cysG</i> (1)	PA14_30340	2628559	←
CMA 33	Rapporteur	N/A	N/A	N/A
CMA 35	<i>MexY/AmrB</i>	PA14_38410	3423089	←
CMA 36	<i>wapB</i> (1)	PA14_51220	4552101	→
CMA 41	Rapporteur (4)	N/A	N/A	N/A
CMA 44	R pyocine (2)	PA14_08060	693695	←
CMA 46	R pyocine (3)	PA14_08120	698411	→
CMA 50	R pyocine (4)	PA14_08070	695116	←
CMA 52	<i>rluD</i> (1)	PA14_60210	5363945	→
CMA 54	<i>pqsC</i>	PA14_51410	4568708	→
CMA 56	<i>rluD</i> (1)	PA14_60210	5363945	→
CMA 64	<i>wapB</i> (1)	PA14_51220	4552121	→
CMA 68	secreted lipoprotein	PA14_57510	5124407	→
CMA 73	<i>wapB</i> (1)	PA14_51220	4552121	→
CMA 75	<i>truB</i> (1)	PA14_62730	5598540	→
CMA 78	<i>truB</i> (1)	PA14_62730	5598540	→
CMA 79	Rapporteur	N/A	N/A	N/A
CMA 81	<i>zwf</i> (1)	PA14_23070	2000300	→
CMA 83	<i>truB</i> (1)	PA14_62730	5598556	→
CMA 84	<i>rluD</i> (1)	PA14_60210	5363945	→
CMA 86	<i>rluD</i> (1)	PA14_60210	5363945	→
CMA 91	<i>rluD</i> (2)	PA14_60210	5364183	←
CMA 99	R pyocine (2)	PA14_08060	693695	←
CMA 106	Rapporteur	N/A	N/A	N/A

CMA 108	Protéine hypothétique	PA14_58850	5241899	→
CMA 110	<i>aceE</i> (1)	PA14_66290	5907764	←
CMA 113	<i>myfR</i> (1)	PA14_51340	4563319	→
CMA 115	<i>myfR</i> (2)	PA14_51340	4563455	→
CMA 117	Rapporteur	N/A	N/A	N/A
CMA 120	Aconitate hydratase (1)	PA14_53970	4785893	→
CMA 121	<i>aceE</i> (2)	PA14_66290	5909582	←
CMA 124	<i>pqsD</i>	PA14_51390	4567535	←
CMA 126	<i>cysM</i>	PA14_52210	4630701	←
CMA 127	Aconitate hydratase (2)	PA14_53970	4785992	→
CMA 129	Aconitate hydratase (3)	PA14_53970	4786920	←
CMA 130	Aconitate hydratase (2)	PA14_53970	4785992	→
CMA 135	<i>pqsE</i> (1)	PA14_51380	4566261	←
CMA 137	<i>ihfA</i>	PA14_28720	2474995	→
CMA 172	<i>pqsE</i> (1)	PA14_51380	4566261	←
CMA 183	Aconitate hydratase (4)	PA14_53970	4786415	→
CMA 185	<i>pqsA</i>	PA14_51430	4570050	→
CMA 187	Promoteur de <i>myfR</i>	PA14_51340	4562400	←
CMA 189	<i>zwf</i> (2)	PA14_23070	2001000	→
CMA 190	<i>nadB</i> (2)	PA14_54450	4828509	→

En rouge : les insertions dans le rapporteur transcriptionnel. Les gènes avec le même (chiffre) sont des clones de la même insertion. La position d'insertion est approximative.

