

**UNE NOUVELLE PERSPECTIVE SUR LES FACTEURS FAVORISANT
LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING CHEZ LA BACTÉRIE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Par
Sophie Robitaille

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Frédéric Veyrier
INRS- Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Jean-Philippe Côté
Département de biologie
Université Sherbrooke

Examineur externe

Éric Massé
Département de biochimie et de
génomique fonctionnelle
Université Sherbrooke

Directeur de recherche

Éric Déziel
INRS- Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

AVANT-PROPOS

Cette thèse porte sur la régulation de la motilité bactérienne de groupe et l'adaptation de la régulation aux conditions environnementales chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

La section Résultats est composée d'un article accepté, d'un article à soumettre et de deux chapitres sur la régulation bactérienne en motilité de groupe de type *swarming*. Les deux articles portent sur une évolution dirigée en condition de motilité de groupe avec un mutant déficient dans ce type de motilité et visent à mieux connaître les facteurs importants pour l'expression de la motilité de type *swarming*. Les deux autres chapitres portent sur la compréhension d'un système de sécrétion et de son rôle potentiel sur la motilité de type *swarming*.

RÉSUMÉ

Afin de survivre, les bactéries doivent s'adapter à leur environnement rapidement. Pour ce faire, elles ont développé divers mécanismes qui leur permettent de détecter des stimuli et d'y répondre efficacement. Afin de s'adapter les bactéries utilisent les systèmes à deux composants. Le fonctionnement de ces systèmes repose sur la détection d'un signal environnemental par un senseur transmembranaire. Ce senseur relaye par la suite ce signal vers une protéine effectrice qui peut agir, par exemple, comme facteur de transcription favorisant le déclenchement d'évènements intracellulaires nécessaire pour une réponse adaptée au signal environnemental. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* exprime le système à deux composants GacS/A, composé d'un senseur membranaire et son régulateur de réponse associé respectivement. Ce système permet la régulation du régulateur post-transcriptionnel RsmA qui régule le passage du mode de vie sessile (biofilms) au mode de vie motile, associé à la motilité de type *swarming*. Ce type de motilité est défini par un déplacement de groupe coordonné sur une surface semi-solide. Jusqu'à présent deux facteurs essentiels ont été répertoriés pour ce type de motilité, soit la production d'un flagelle fonctionnel, permettant à la bactérie de produire la force motrice nécessaire au déplacement, et la production d'un biosurfactant, permettant à la bactérie de réduire la tension de surface. Ainsi la bactérie peut coloniser de nouveaux environnements. Dans le laboratoire Déziel, une mutation a été découverte dans un gène qui régule le système Gac/Rsm. Ce mutant, dans le gène *hptB*, possède un important défaut dans sa motilité de type *swarming*. Il a la particularité de produire des biosurfactants et de posséder un flagelle fonctionnel. Toutefois, la raison pour laquelle ce mutant est incapable de se déplacer en motilité de type *swarming* reste encore inconnue. Ainsi, le but de ce projet est de comprendre le rôle de ce régulateur dans la motilité de type *swarming* et d'identifier quel facteur manquant explique son défaut de motilité en surface semi-solide.

Pour mieux comprendre la raison de ce défaut de motilité, une évolution dirigée a été réalisée en condition *swarming* afin de forcer le mutant *hptB* à se déplacer. Par la suite, le génome de clones isolés des populations résultantes a été analysé afin de trouver les mutations compensatoires qui permettraient de récupérer la motilité de type *swarming* de ce mutant. Étonnamment, les populations se composent majoritairement de mutants dans les systèmes de communication bactérienne qui permettent de coordonner l'action de la population. Or, leur émergence donne un avantage à la population. De plus, les clones isolés comportent aussi des mutations dans le

système Gac/Rsm et permettent de compenser la mutation dans le gène *hptB*. Ces mutations ont confirmé le rôle central de RsmA dans la régulation en condition *swarming*.

Finalement, les systèmes de sécrétion de type VI, régulés par le système Gac/Rsm, ont été étudiés comme potentiel facteur inconnu essentiel à la motilité de type *swarming*. Ces systèmes permettent la sécrétion d'effecteurs d'une cellule à l'autre par un contact physique en contexte de compétition bactérienne. Or, l'hypothèse initiale était que ces systèmes permettent l'échange de protéines de régulation en condition *swarming*. Les résultats n'ont pas démontré le lien existant entre ces systèmes et la motilité de type *swarming*.

Finalement, le rôle de RsmA a été confirmé comme régulateur global du mode de vie bactérien en surface et que le facteur inconnu à la motilité de type *swarming* recherché doit passer par la voie Gac/Rsm.

Mots-clés: Communication bactérienne ; LasR ; RsmA ; HptB ; Motilité de type *swarming* ; Système de sécrétion de type VI ; Système à deux composants

ABSTRACT

To be able to survive, bacteria need to adapt rapidly to their environment. They have developed diverse mechanisms to detect stimuli and trigger a fast response. One strategy used by bacteria to adapt is through the utilization of two-component systems. These systems allow for the detection of an external environment through a transmembrane sensor. Those sensors then relay the signal to an associated protein with an effector function that can act as a transcription regulator, triggering intracellular events necessary for the adaptation to the presence of the signal. *Pseudomonas aeruginosa* has multiple two-component systems but one of the most studied one is the GacS/GacA one. This system regulates the post-transcriptional regulator RsmA, which is implicated in the transition between motile (swarming) and sessile (biofilm formation) lifestyles. Swarming motility is defined by a social and coordinated bacterial movement on a semi-solid surface. Until now, two essential elements for such motility include the presence of a functional flagellum, giving the force needed for propulsion, and the production of a biosurfactant to reduce surface tension to decrease surface tension between the cells and the substratum. This type of motility facilitates the colonization of a new environment. In the Déziel laboratory, a mutant, with an important swarming defect, has been found with a mutation in a gene impacting the regulation of the Gac/Rsm system. This mutant, $\Delta hptB$, possesses a functional flagellum and produces biosurfactants; the elements known to be required for surface motility. However, the mechanism by which this mutant is unable to move through swarming motility has yet to be identified. The purpose of this project is to understand the role of this regulator in swarming and find the unknown factor explaining its lack of motility.

Directed evolution in swarming conditions was done using the $\Delta hptB$ mutant. The purpose was to see if the emergence of mutations in the genome of the $\Delta hptB$ would rescue its capacity to swarm. The genome of clones passaged on many iterations were isolated from the resulting population analyzed to find compensatory mutations that led to the restoration of the swarming phenotype. Surprisingly, the resulting population was mostly composed of mutants in quorum sensing, an interbacterial communication system. Their emergence gave rise to a fitter population. Another set of mutations was identified in the Gac/Rsm system and restored the swarming capacity of the $\Delta hptB$ mutant. These results confirm the role of RsmA as a global regulator of swarming motility.

To conclude, the type VI secretion system was studied as a potential element necessary for swarming motility. Type VI secretion systems are regulated by the Gac/Rsm pathway and lead to the secretion of effector proteins from one cell to the other by physical contact in the context of

bacterial competition. The hypothesis was that the type VI secretion system secretes proteins from one cell to the others in swarming conditions thus allowing such surface motility. However, the results did not permit us to conclude there is a link between the type VI secretion system and swarming motility.

Here the role of RsmA is confirmed as the global regulator for the motile bacteria lifestyle and an unknown essential factor for swarming motility is regulated through the Gac/Rsm system.

Keywords: Bacteria communication; LasR; RsmA; HptB; swarming motility; type VI secretion system and two-component system

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Pr Éric Déziel, qui m'a accueilli dans son laboratoire en 2013. Merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir guidé à travers mon parcours au cycle supérieur. Tu as su me pousser durant mon cursus dans mes réflexions et m'aider à développer mon esprit critique. Merci d'avoir cru en mon projet lorsque je n'y croyais plus moi-même.

J'aimerais aussi remercier les différentes personnes que j'ai côtoyées durant mon parcours dans le laboratoire: Ahmad, Soumaya, Koyomi, Snizhana, Servane, Ghizlane, Anissa, Fadi, Arvin, Charles, Thays, Alison, Samar, Hélène, Marianne, Sylvain, Xavier, Pauline, May, Justine, Concetta et tous les autres. Merci à tous de vos conversations, de vos réflexions et de votre aide pendant ces années, vous avez tous, à votre façon, contribué positivement à mon parcours.

Je voudrais remercier particulièrement Marie-Christine pour nos discussions matinales au laboratoire ou pour toutes les fois où tu as écouté mes hypothèses les plus folles. Je veux aussi remercier Sarah pour son support et ses encouragements durant notre parcours commun et toutes nos conversations à la hotte.

Au sein de l'INRS, j'aimerais aussi remercier le Pr Philippe Constant et le Pr Claude Guertin pour leur aide en statistique et les discussions au courant de mon doctorat. De plus, je tiens à remercier les Pr Jonathan Perrault et le Pr Nicolas Doucet qui m'ont beaucoup aidé pour la mise en place d'expériences et l'analyse de résultats. Finalement, j'aimerais remercier Pr Frédéric Veyrier pour l'aide dans le domaine de la bio-informatique. Vous avez tous été d'un grand appui pour la réalisation de mon projet.

Je tiens aussi à souligner l'appui de mes amis et collègues des différents laboratoires du GRME qui ont été présents au courant des dernières années.

Je veux remercier mes amies: Émilie, Marie-Ève, Magali et Joannie. Depuis déjà longtemps, vous êtes là pour moi.

Je veux remercier mon amoureux, Fabrice, qui m'a soutenu et enduré à travers toutes les étapes de mon doctorat, dans les bons et aussi les moins bons jours. Merci pour tout, tu as toujours eu les bons mots pour me remonter le moral.

Je tiens à remercier ma famille qui m'a appuyé depuis toujours. Mes parents, Diane et Gilles, merci de croire en moi et de m'avoir encouragé dans mes choix. Vous m'avez toujours amené à

me dépasser, sans vous je ne serais pas où je suis aujourd'hui. Merci à mes frères, Alexandre et Julien, de m'avoir encouragé durant ces années.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos	iii
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT	vii
REMERCIEMENTS	ix
TABLE DES MATIÈRES	xi
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxiii
1 INTRODUCTION	1
1.1 Modèle bactérien: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 Communication inter-bactérienne	2
1.2.1 Systèmes de Quorum Sensing	2
1.2.2 Phénomène des tricheurs (cheaters).....	5
1.3 Modes de vie des bactéries	6
1.3.1 Motilité.....	6
1.3.2 Biofilms.....	13
1.4 Régulation des modes de vie.....	14
1.4.1 Di-guanosine monophosphate cyclique	14
1.4.2 Systèmes à deux composants	16
1.4.3 Le système à deux composants GacS/GacA.....	18
1.4.4 Régulateur HptB.....	20
1.5 Compétitions bactériennes.....	22
1.5.1 Contact-dependent growth inhibition.....	22
1.5.2 Systèmes de sécrétion de type VI.....	23
2 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTÈSE.....	37
2.1 Problématique.....	37
2.1 Hypothèse	38
2.2 Objectif général	38
2.2.1 Objectif 1.....	38
2.2.2 Objectif 2.....	38
3 ARTICLE 1: Swarming Motility Growth Favors the Emergence of a Subpopulation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Quorum Sensing Mutants	39
3.1 Résumé en français	40
3.2 Summary.....	40
3.3 Introduction	41

3.4	Experimental procedures	42
3.4.1	<i>Bacterial strains and culture conditions</i>	42
3.4.2	<i>Experimental evolution</i>	43
3.4.3	<i>Sequencing of the genomic DNA</i>	44
3.4.4	<i>Sequencing of the lasR gene</i>	44
3.4.5	<i>Quantification of 3-oxo-C₁₂-homoserine lactone</i>	44
3.4.6	<i>Production of pyocyanin</i>	45
3.4.7	<i>Growth on casein agar</i>	45
3.4.8	<i>Growth curves</i>	45
3.4.9	<i>Growth on 1.5% agar modified M9DCAA medium</i>	45
3.4.10	<i>Fitness in swarming</i>	46
3.4.11	<i>Emergence of lasR mutants in a swarming colony</i>	46
3.4.12	<i>Swarming phenotype of evolved clones from ΔhptB evolution through the different transfers</i> 46	
3.5	Results:	47
3.5.1	<i>Restoration of the swarming motility of an ΔhptB mutant through directed evolution</i>	47
3.5.2	<i>The evolved population is a mix of two phenotypes</i>	47
3.5.3	<i>Clones C1 and C3 have acquired lasR mutations</i>	50
3.5.4	<i>Emergence of lasR^r variants in wild-type PA14 under swarming conditions</i>	52
3.5.5	<i>A lasR^r mutant is more competitive under swarming conditions</i>	54
3.5.6	<i>LasR-defective mutants do not have a metabolic advantage under swarming conditions</i> 55	
3.5.7	<i>The evolved population has better fitness in swarming</i>	56
3.6	Discussion.....	57
3.7	Acknowledgements	61
4	DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE #1	63
4.1	Contexte.....	63
4.2	Méthodologie.....	63
4.2.1	<i>Souches bactériennes</i>	63
4.2.2	<i>Aire de recouvrement</i>	63
4.2.3	<i>Croissance de PA14 et du mutant lasR::<i>Gm</i> en conditions aérobies ou microaérobies..</i> 63	
4.2.4	<i>Croissance de PA14 et lasR::<i>Gm</i> selon les composants du milieu M9DCAA</i>	64
4.2.5	<i>Expériences sur les «biens publics»</i>	64
4.2.6	<i>Cinétique en solide</i>	65
4.3	Résultats	65
4.4	Discussion.....	73

5	ARTICLE 2 :An experimentally evolved variant of RsmA confirms its central role in the control of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> social motility	77
5.1	Résumé en français	78
5.2	Summary:.....	79
5.3	Author Summary :	79
5.4	Introduction:	80
5.5	Materials and methods :	82
5.5.1	<i>Bacterial Strains and culture conditions</i>	82
5.5.2	<i>Sequencing of the whole genome DNA</i>	82
5.5.3	<i>Construction of markerless rsmA and gacA mutants</i>	83
5.5.4	<i>Construction of strains with gene expression reporters</i>	83
5.5.5	<i>B-galactosidase assays</i>	83
5.5.6	<i>Complementation experiments</i>	84
5.5.7	<i>Purification of RsmA</i>	84
5.5.8	<i>Electrophoretic mobility shift assays of rsmY and RsmA/RsmA R31S (C2)</i>	85
5.5.9	<i>Molecular modeling of the WT and R31S RsmA-RsmY complexes</i>	86
5.5.10	<i>Stability and energy contributions of the R31S mutation in RsmA</i>	87
5.6	Results:	87
5.6.1	<i>Evolution on the ΔhptB mutant restores swarming phenotype by selecting mutations in the Gac/Rsm regulatory pathway</i>	87
5.6.2	<i>The R31S mutation alters RsmA affinity for RsmY</i>	93
5.7	Discussion.....	96
5.8	Acknowledgments	99
6	DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE #2	101
6.1	Contexte	101
6.2	Matériels et méthodes	102
6.2.1	<i>Traduction de RsmA</i>	102
6.2.2	<i>Évolution dirigée de ΔrsmA et ΔrsmYZ</i>	102
6.2.3	<i>Expérience de l'activité de RsmA en présence du promoteur de hcnA</i>	103
6.3	Résultats	105
6.4	Discussion.....	111
7	RÔLE DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE VI DANS LA RÉGULATION DU SWARMING..	115
7.1	Introduction	115
7.2	Matériels et méthodes	116
7.2.1	<i>Souches bactériennes et conditions de croissance</i>	116
7.2.2	<i>Création de la souche PA14 ΔhptB HSI-II et III</i>	118

7.2.3	<i>Intégration de mutations dans les gènes mutants rhlA et hptB dans le double mutant HSI-II et III</i>	119
7.2.4	<i>Expérience d'évitement</i>	119
7.2.5	<i>Quantification de la production de rhamnolipides</i>	120
7.2.6	<i>Co-culture en motilité de type swarming</i>	120
7.2.7	<i>Création des mutants Δ HSI-II <i>icmF1</i> et Δ HSI-III <i>icmF1</i></i>	121
7.2.8	<i>Évolution dirigée du mutant HSI-II et III</i>	121
7.3	Résultats	122
7.3.1	<i>Caractérisation de la motilité de type swarming des mutants du SST6</i>	122
7.3.2	<i>Comprendre l'évitement de hptB</i>	128
7.3.3	<i>Complémentation du défaut de swarming des mutants HSI</i>	129
7.3.4	<i>Évolution dirigée du mutant des îlots HSI-II et III</i>	130
7.3.5	<i>Déterminer le phénotype en motilité de type swarming des doubles mutants HSI</i>	131
7.4	Discussion	132
8	RÉGULATION DES SST6 SELON LES DIFFÉRENTES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	137
8.1	Introduction	137
8.2	Matériel et méthode	137
8.2.1	<i>Souches bactériennes utilisées et conditions de croissance</i>	137
8.2.2	<i>Récolte des cellules et extraction ADN</i>	138
8.2.3	<i>PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)</i>	139
8.3	Résultats	141
8.3.1	<i>Expression des SST6 en motilité de type swarming</i>	141
8.3.2	<i>Expression des SST6 en colonie</i>	142
8.3.3	<i>Expression des SST6 en biofilm</i>	143
8.4	Discussion	144
9	CONCLUSION	147
9.1	Inter-régulation entre le système Rsm/Gac et le QS	149
9.2	Régulation par le c-di-GMP: pont entre le QS et le système Gac/Rsm vers le mode de vie motile	151
9.3	Cibles de la motilité de type swarming: les systèmes de sécrétion de type VI	154
9.4	Perspectives: Cibles potentielles à la motilité de type swarming	155
10	BIBLIOGRAPHIE	159
11	ANNEXE A- Données supplémentaires à l'Article 1 (Chapitre 3)	181
11.1	Tableaux supplémentaires	181
11.2	Figures supplémentaires	186
11.3	Données complémentaires à l'article	190

12 ANNEXE B- Données supplémentaires (Chapitre 5)	195
12.1 Tableaux supplémentaires	195
12.2 Figures supplémentaires.....	201
13 ANNEXE C- Données supplémentaire chapitre 4	209
14 ANNEXE D- Données supplémentaires conclusion	210

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Système de QS chez <i>P. aeruginosa</i>	4
Figure 1.2: Types de motilité chez <i>P. aeruginosa</i>	11
Figure 1.3: Facteurs nécessaires ou associés à la motilité chez <i>P. aeruginosa</i>	12
Figure 1.4: Cycle de vie d'un biofilm.....	14
Figure 1.5. Systèmes à deux composants.....	17
Figure 1.6 Régulation du système à deux composants GacS/GacA.....	19
Figure 1.7 Capacité de la motilité de type <i>swarming</i> du mutant $\Delta hptB$	21
Figure 1.8: Organisation génique des îlots géniques HSI chez <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	24
Figure 1.9: Structure type d'un SST6.....	25
Figure 1.10: Régulation des SST6.....	32
Figure 1.11 Motilité de type <i>swarming</i> des mutant HSI.....	34
Figure 1.12: Éloignement de PA14 par $\Delta hptBrhIA^-$	35
Figure 3.1. Recovery of the swarming motility phenotype of the $\Delta hptB$ mutant of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PA14 following experimental evolution.....	49
Figure 3.2. Phenotype of the two swarming evolved $\Delta hptB$ mutants with a gain-of-function and a secondary mutation in <i>lasR</i>	51
Figure 3.3. Experimental evolution in swarming conditions of <i>P. aeruginosa</i> PA14 wild-type strain.....	53
Figure 3.4. A <i>lasR</i> -null mutant is advantaged in swarming population.....	55
Figure 3.5. Growth of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 and its <i>lasR</i> -null mutant.....	56
Figure 3.6. Fitness of the evolved population when mixed with the original PA14:: <i>gfpmut3</i> in a 1:1 initial ratio.....	57
Figure 4.1 : Surface de l'aire de recouvrement du mutant $\Delta hptB$	65
Figure 4.2: Croissance de <i>lasR</i> ::Gm et PA14 en condition microaérophile.....	67
Figure 4.3: Cinétique de croissance dans le milieu M9DCAA modifié.....	69
Figure 4.4 :Production de rhamnolipides en milieu M9DCAA.....	71
Figure 4.5: Déterminer le potentiel tricheurs de mutants <i>lasR</i>	73

Figure 4.6 : Cinétique dans le milieu M9DCAA 1,5% agar	73
Figure 5.1: Swarming phenotype of the C2 and C4 clones is similar to wild-type <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14.	88
Figure 5.2: Analysis of rsmY and rsmZ expression in the C4 clone mutant	89
Figure 5.3: Complementation of mutant rsmA with pUCP20 as a control, pSR15 (pUCP20-rsmA) and pSR16 (pUCP20-rsmAR31S) for the rsmY-lacZ expression at 6h in TSB at 37°C.....	91
Figure 5.4 Expression of RmsA-regulated targets in the C2 clone mutant.....	92
Figure 5.5: Prediction of RsmAR31S interaction with sRNA RsmY.....	94
Figure 5.6: <i>In vitro</i> interaction of RsmA and RsmA ^{R31S} with RsmY.....	95
Figure 6.1 : Schémas représentant l'effet de l'absence de LasR sur la régulation de RsmA.....	101
Figure 6.2:Traduction de RsmA dans le clone C2	105
Figure 6.3: Évolution dirigée en conditions swarming des mutants $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$	107
Figure 6.4: Modèle simplifié du système de modulation de la transcription de <i>hcnA</i>	109
Figure 6.5: Régulation de RsmA par un transcript régulé par LasR	110
Figure 7.1: Défaut de motilité de type swarming des doubles mutants HSI	123
Figure 7.2: Croissance des mutants HSI dans le milieu	124
Figure 7.3: Motilité de type <i>swimming</i>	125
Figure 7.4: Production de rhamnolipides des mutants HSI.....	126
Figure 7.5 : Co-inoculation en motilité de type <i>swarming</i>	128
Figure 7.6: Évitements en <i>swarming</i> de la souche $\Delta hpt rhIA::aadA$	129
Figure 7.7:Co-inoculation des doubles mutants HSI avec PA14	130
Figure 7.8: Évolution dirigée du mutant HSI-II et III	131
Figure 7.9: Test de motilité de type <i>swarming</i> des mutants HSI-II <i>icmF1</i> et HSI-III <i>icmF1</i>	132
Figure 8.1: Niveaux de transcription de différents gènes associés aux SST6 en motilité de type <i>swarming</i>	142
Figure 8.2: Niveaux de transcription de différents gènes associés aux SST6 en condition colonie	143
Figure 8.3: Niveaux de transcription de différents gènes associés aux SST6 en condition de biofilms ..	144
Figure 9.1: Modèle d'intégration	153
Figure 11.1: Model of the swarming experimental evolution.....	186

Figure 11.2: Liquid evolution of $\Delta hptB$ mutant	187
Figure 11.3: Representation of the <i>lasR</i> mutations localisation.....	187
Figure 11.4: Impact of <i>ddpA3</i> deletion on swarming.....	187
Figure 11.5: Phenotype tests of PA14 swarming evolution potential <i>lasR</i> clones	188
Figure 11.6: The emergence of potential <i>lasR</i> - in a swarming colony at 24h and 48h on swarming center and tendrils.	189
Figure 11.7: Cells count of the initial culture for fitness experience.....	190
Figure 11.8 : Évolution dirigée de PA14 dans le milieu M9DCAA 1.5% agar	191
.....	192
Figure 11.9 : Évolution en motilité de type <i>swarming</i> des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATM0068 et 57SP	192
Figure 12.1: Growth of C4 clone and related strains	201
Figure 12.2: Swarming of $\Delta hptB$ mutant when complemented with a plasmid-borne <i>rsmA</i>	202
Figure 12.3: Growth of the complementation strains.	203
Figure 12.4: Growth of the C2 clones and related strains.....	205
Figure 12.5: Binding of RsmA and RsmA ^{R31S} to negative control.	205
Figure 12.6: Quantification of the binding between RsmY and RsmA ^{R31S}	207
Figure 12.7: Comparison of CsrA sequences from <i>P. aeruginosa</i> strains and other species.....	207
Figure 13.1: Motilité de type <i>swarming</i> des mutants dans les gènes de protéases régulées par LasR ..	209
Figure 14.1: Production de 3-oxo-C ₁₂ -HSL et C ₄ -HSL du mutant $\Delta rsmA$	210

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Liste des effecteurs connus ou prédits chez <i>P. aeruginosa</i>	26
Tableau 1.2: Résumé des gènes des SST6 différemment exprimés chez le mutant $\Delta hptB$ en condition de <i>swarming</i> (Adapté de Tremblay (2011)).....	33
Tableau 6.1: Souches et plasmides utilisés	103
Tableau 6.2: Pourcentages de l'émergence des mutants <i>lasR</i>	108
Tableau 7.1: Souches et plasmides utilisés	117
Tableau 8.1: Amorces de qRT-PCR utilisées	140
Tableau 11.1: Strains used in this study	181
Tableau 11.2: Primers used in this study	183
Tableau 11.3: Proportion of each swarming phenotypes in lineages 3 and 4	184
Tableau 11.4: Mutations found in the <i>lasR</i> gene of the evolved clone C1 and C3	184
Tableau 11.5: Mutations found in the <i>lasR</i> gene of the PA14 evolved clones.....	184
Tableau 11.6 : Pourcentage de clones ne formant pas de halo sur gélose lait lors de l'évolution en milieu solide.....	191
Tableau 11.7: Pourcentage de clones ne formant pas de halo sur gélose lait lors de l'évolution de différente souche de <i>P. aeruginosa</i>	193
Tableau 12.1: Strains used in this study	195
Tableau 12.2: Primers used in this study	198

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Adénosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messagers
pARN	Petits ARN
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DO	Densité optique
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HAA	Acide 2 (3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoïque
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
HHQ-D4	5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
Hpt	<i>Histidine-containing phosphotransfer</i>
HSI	<i>Hcp1 secretion island</i>
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
3-oxo-C₁₂-HSL	N-3-oxo-dodecanoyl-homosérine lactone

C₄-HSL	N-butanoyl-homosérine lactone
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
ns	Non-significatif
OD	<i>Optical density</i>
ONPG	o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
PT4	Pili de type IV
QS	<i>Quorum sensing</i>
SST6	Système de sécrétion de type VI
TBE	Tris Borate EDTA
TPP	<i>Threonine phosphorylation pathway</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
UFC	Unité de formation de colonie
UTR	<i>Untranslated region</i>
VgrG	<i>Valine–glycine repeat G</i>
WT	<i>Wild-type</i>
σ	Facteur sigma

1 INTRODUCTION

1.1 Modèle bactérien: *Pseudomonas aeruginosa*

Cette thèse étudie la régulation et les modes de vie bactériens chez la bactérie modèle *Pseudomonas aeruginosa*. Initialement décrite par le Français Carle Gessard en 1882, cette bactérie est classée dans l'embranchement des Gamma-protéobactéries (Diggle & Whiteley, 2020). Cette bactérie à Gram négatif se retrouve dans une grande diversité de niches écologiques telles que les sols et les environnements aqueux. Elle peut aussi causer des infections chez des hôtes tels que les plantes, les animaux et les humains (Ramos, 2011). Ces différentes possibilités d'environnements et d'hôtes résultent de sa grande capacité d'adaptation (Klockgether & Tümmler, 2017). Par exemple, elle croît en présence d'oxygène, toutefois dans des conditions spécifiques elle peut s'adapter à la condition anaérobique (Diggle & Whiteley, 2020). L'intérêt qui lui est porté est particulièrement dû au fait qu'elle est un pathogène opportuniste de l'être humain et peut causer des infections aiguës (rapides progression chez l'hôte) et/ou des infections chroniques (infections persistantes) selon les conditions (Furukawa *et al.*, 2006; Klockgether & Tümmler, 2017; Ramos, 2011). Chez les individus atteints de la fibrose kystique, une maladie génétique provoquant une accumulation de sécrétions riches en nutriment dans les voies respiratoires, *P. aeruginosa* peut causer des infections chroniques qui sont responsables d'un grand taux de morbidité et de mortalité (Klockgether & Tümmler, 2017). L'Organisation mondiale de la Santé considère comme une priorité la recherche de nouveaux antimicrobiens contre cette bactérie (WHO, 2017).

La bactérie *P. aeruginosa* possède un grand génome (environ 5-7 million pb). Celui-ci code pour plusieurs facteurs de virulence qui permettent à la bactérie d'échapper à son élimination par le système immunitaire affaibli d'un l'hôte lors de l'infection, d'induire la pathogénicité de la bactérie et de favoriser la colonisation de la bactérie. Par exemple, *P. aeruginosa* produit de la pyocyanine qui peut endommager les cellules de l'hôte et induire la mort cellulaire (Moradali *et al.*, 2017). Elle produit aussi du cyanure d'hydrogène, un inhibiteur du cytochrome C qui est impliqué dans la respiration cellulaire (Moradali *et al.*, 2017). Elle peut aussi produire des phospholipases, qui peuvent perturber l'intégrité des membranes cellulaires de l'hôte (Moradali *et al.*, 2017). Lors d'une l'infection aiguë, les bactéries sont motiles et plus virulentes que lors d'une l'infection chronique où les bactéries vont former un biofilm (discuté plus en détail à la **Section 1.3.2**) (Moradali *et al.*, 2017; Overhage *et al.*, 2008).

Pour ce projet, la souche de *P. aeruginosa* utilisée est UCBPP-PA14. Cette souche isolée chez l'humain est connue pour sa capacité à causer des infections chez les plantes et les modèles animaux (Rahme *et al.*, 1995). Le génome de UCBPP-PA14 a été séquencé (NC_008463.1) et une banque de mutants est disponible facilitant l'étude de cette souche (Lee *et al.*, 2006; Liberati *et al.*, 2006). De plus, cette thèse porte sur régulation par le système Gac/Rsm (**Section 1.4**). Même si certaines études chez cette souche étudie le système Gac/Rsm (Jean-Pierre *et al.*, 2017; Marden *et al.*, 2013; Mikkelsen *et al.*, 2011; Rahme *et al.*, 1995) la plupart des études portent sur d'autres souches de *P. aeruginosa* (Bordi *et al.*, 2010; Brencic & Lory, 2009; Brencic *et al.*, 2009; Burrowes *et al.*, 2006b; Heeb & Haas, 2001; Heurlier *et al.*, 2004b; Hsu *et al.*, 2008). La souche PA14 a la particularité d'avoir une mutation dans un régulateur du système Gac/Rsm contribuant en partie à la pathogénicité de cette souche ce qui rend son utilisation intéressante (Mikkelsen *et al.*, 2011). Finalement, cette souche est un modèle bactérien pour l'étude de la communication bactérienne.

1.2 Communication inter-bactérienne

Depuis longtemps, les bactéries sont étudiées comme des entités unicellulaires. Toutefois, les bactéries peuvent communiquer entre elles afin de coordonner leurs actions et former des communautés multicellulaires. En groupe les bactéries résistent aux assauts environnementaux et économisent le coût énergétique de la production de certains composés ; ceux-ci sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et sont alors partagés par les membres du groupe (Lyons & Kolter, 2015). Ainsi, les bactéries peuvent combiner leurs efforts afin de maximiser l'impact de leurs actions et former des structures multicellulaires. Toutefois, afin d'éviter les conflits sociaux, les bactéries ont développé des systèmes de discrimination pour éliminer les compétiteurs ou les bactéries qui pourraient profiter du système sans y contribuer (West *et al.*, 2006). Afin de pouvoir combiner leurs efforts collectifs, les bactéries possèdent des systèmes de communication.

1.2.1 Systèmes de *Quorum Sensing*

Pour communiquer entre elles et coordonner leurs actions, les bactéries utilisent un système de communication intercellulaire, nommé le *quorum sensing* (QS). Pour ce faire, les bactéries diffusent des molécules de signalisation dans le milieu extracellulaire. Lorsque la densité cellulaire augmente, la concentration de ces molécules augmente aussi. À une certaine densité, les molécules atteignent une concentration critique, le « quorum ». Les signaux agissent alors

comme ligands et s'associent à des régulateurs transcriptionnels spécifiques des systèmes de QS. Ces régulateurs peuvent ainsi contrôler divers gènes cibles, incluant ceux qui synthétisent les molécules de signalisation elles-mêmes par l'interaction avec leurs promoteurs (Fuqua *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 2012).

La bactérie *P. aeruginosa* possède trois systèmes de QS qui sont interreliés selon une hiérarchie (Juhas *et al.*, 2005) (**Fig. 1.1**). Tout d'abord, le système Las est composé du régulateur transcriptionnel LasR, et de l'acyl homosérine lactones (AHL) synthase LasI. LasI produit le *N*-3-oxo-dodecanoyl-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) (Juhas *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 1997). La liaison entre LasR et le 3-oxo-C₁₂-HSL permet la régulation de plusieurs gènes dont *lasI*, dans une boucle de rétrorégulation (Seed *et al.*, 1995). LasR régule aussi les transcriptions des gènes *rhII* et *rhIR*. Ce dernier, RhIR, code pour le régulateur transcriptionnel du deuxième système de QS Rhl. Ce système est aussi composé d'une synthase, RhII, qui produit la molécule de signal de ce système, soit le *N*-butanoyl-homosérine lactone (C₄-HSL) (Latifi *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1995). RhIR permet entre autres la transcription de l'opéron *rhIAB* associé à la production des rhamnolipides, élément nécessaire à la motilité de type *swarming* (**Fig.1.3C**). Ceux-ci seront décrits plus en détail à la **Section 1.3.1.5.2** (Ochsner *et al.*, 1994; Ochsner & Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1995).

Les systèmes Las et Rhl contrôlent un troisième système de QS, soit le système PQS (**Fig. 1.1**). Ce système fonctionne grâce au signal principal *Pseudomonas quinolone signal* (PQS ; 3,4-dihydroxy-2-heptyl-quinoline). Pour se faire, LasR lié au 3-oxo-C₁₂-HSL active la transcription du régulateur MvfR (aussi connu sous le nom de PqsR) (McGrath *et al.*, 2004; Pesci *et al.*, 1999; Wade *et al.*, 2005). MvfR active la transcription des opérons *pqsABCDE* et *phnAB*. Les enzymes PqsABCD permettent la synthèse d'une famille de molécules nommées 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) (Déziel *et al.*, 2004), dont le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) (**Fig. 1.1**). Le HHQ et le PQS agissent comme ligand activant la fonction de MvfR (Xiao *et al.*, 2006). L'enzyme PqsH (activée par LasR et codée ailleurs sur le génome) convertit le HHQ en PQS (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002; Schertzer *et al.*, 2010). La pompe à efflux MexEF-OprN exporte le HHQ à l'extérieur des cellules (Lamarche & Déziel, 2011). Le HHQ, qui provient de l'extérieur de la cellule, peut alors rentrer dans une autre cellule et être converti en PQS (Déziel *et al.*, 2004). Ceci illustre le phénomène de la communication bactérienne et l'interaction cellule-cellule (Déziel *et al.*, 2004)(**Fig.1.1**). Plusieurs études transcriptomiques ont décrit les gènes régulés par les trois systèmes de QS chez *P. aeruginosa*. Ils représentent environ 6 % des gènes codés dans le génome (Déziel *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2003; Schuster & Peter Greenberg,

2006; Wagner *et al.*, 2003). Le QS contrôle la production de plusieurs facteurs extracellulaires, tels que les rhamnolipides, le cyanure d'hydrogène (HCN) et des protéases, comme LasA et LasB qui dégrade entre autres la caséine et l'élastine. LasB peut aussi dégrader le collagène et la fibrine. L'élastine, le collagène et la fibrine se retrouve dans différents composés cellulaires de l'hôte et LasA et LasB pourraient ainsi contribuer à l'invasion des cellules épithéliales de *P. aeruginosa* (Van Delden & Iglewski, 1998).

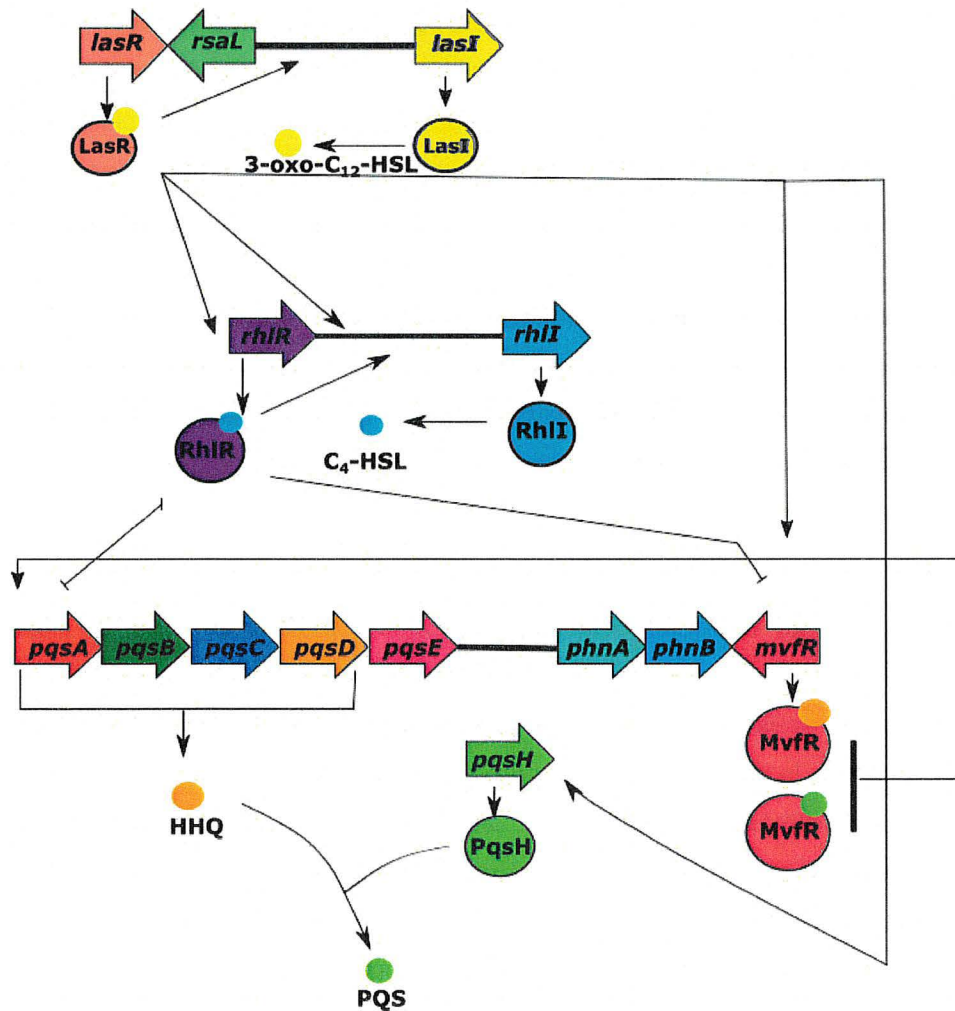


Figure 1.1: Système de QS chez *P. aeruginosa*

Les système de QS Las et Rhl permettent la régulation de plusieurs gènes. L'opéron *pqsABCDE* permet la production du HHQ qui est convertie en PQS par la protéine PqsH. Le PQS s'associe avec MvfR pour la régulation de divers gènes (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002; García-Reyes *et al.*, 2020; Jimenez *et al.*, 2010; Juhas *et al.*, 2005; McGrath *et al.*, 2004; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1999; Seed *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 2006).

1.2.2 Phénomène des tricheurs (*cheaters*)

Certains facteurs (enzymes, métabolites) exportés s'accumulent dans l'environnement d'une population bactérienne ce qui contribue au bien-être de cette population. Ces facteurs sont considérés des « biens publics » (*public goods*). La production de plusieurs de ces biens publics, identifiés chez *P. aeruginosa*, est régulée par le QS. Cependant, dans de telles circonstances, des « tricheurs » peuvent apparaître. Ce sont des mutants avec une déficience dans leur système de QS. Ceux-ci peuvent jouir des biens publics présents dans l'environnement sans eux-mêmes y contribuer. Ils peuvent ainsi prendre avantage sur la population, ce qui peut causer un déclin de la communauté notamment appelée *tragedy of the commons* (tragédie des biens communs), et ainsi éliminer la coopération entre cellules bactériennes (Diggle *et al.*, 2007; Heilmann *et al.*, 2015; West *et al.*, 2006).

Chez *P. aeruginosa*, des mutants dans le gène *lasR* apparaissent dans les poumons de patients de fibrose kystique (Smith *et al.*, 2006) où ils prennent le dessus de la population. Ces mutants se retrouvent aussi en laboratoire dans des conditions où le QS est nécessaire pour la croissance. Dans ces conditions, les mutants *lasR* agissent comme des tricheurs (Dandekar *et al.*, 2012; Diggle *et al.*, 2007; Sandoz *et al.*, 2007). Par exemple, le QS régule des protéases nécessaires pour la dégradation de la caséine pour qu'elle soit assimilable par les bactéries. La bactérie sécrète ces enzymes et elles agissent dans le milieu extracellulaire. Dans une évolution dirigée dans un milieu contenant la caséine comme seule source de carbone, après plusieurs transferts dans ce milieu, des mutants *lasR* émergent puisqu'ils bénéficient du produit de dégradation de la caséine sans y contribuer (Sandoz *et al.*, 2007). Ainsi, l'apparition de tricheurs peut être néfaste pour une population.

Toutefois, les bactéries possèdent des mécanismes pour limiter les tricheurs. Le QS, en plus de contrôler des biens publics, contrôle aussi des biens privés, qui sont dans certaines circonstances nécessaires et permettent de limiter les tricheurs (Abisado *et al.*, 2018). Par exemple, chez *P. aeruginosa* le QS contrôle le métabolisme de l'adénosine par une nucléoside hydrolase intracellulaire qui est nécessaire lorsque la seule source de carbone du milieu est l'adénosine. Les tricheurs ne peuvent ainsi pas survivre sur un tel milieu, puisqu'ils ne produisent pas l'enzyme nécessaire à l'assimilation de l'adénosine. Ceci expliquerait, du moins en partie, que les mutants de QS n'apparaissent pas dans n'importe quelles conditions et que dans l'environnement, ils ne prennent pas le dessus sur les autres bactéries pour causer une *tragedy of the commons* (Dandekar *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2019; Schuster *et al.*, 2017).

1.3 Modes de vie des bactéries

Les bactéries ont une grande capacité à s'adapter à leur environnement. Ainsi, elles possèdent plus d'un mode de vie, adapté selon les conditions du milieu dans lequel elles se retrouvent. Les modes de vie les mieux étudiés sont le mode de vie planctonique (motile) et le mode de vie sessile (biofilm) (Harshey, 2003; Verstraeten *et al.*, 2008).

1.3.1 Motilité

Certaines bactéries sont motiles (Harshey, 2003). Celles-ci ont besoin de se déplacer pour se disséminer dans l'espace afin de trouver des environnements mieux adaptés en fonction de la disponibilité des ressources ou leurs préférences d'habitat. Pour ce faire, elles ont développé différents moyens de déplacement (Harshey, 2003) (**Fig. 1.2**).

1.3.1.1 Motilité de type *swimming*

La motilité de type *swimming* permet le déplacement dans le milieu liquide ou peu visqueux (environ 0.25% d'agar) (**Fig. 1.2A**) par l'entremise d'un ou plusieurs flagelle(s). Cet appendice cellulaire permet de propulser la bactérie dans l'environnement (Verstraeten *et al.*, 2008). Ses composantes seront détaillées à la **section 1.3.1.5.1**. La motilité de type *swimming* se réalise en mode unicellulaire (Harshey, 2003). Elle peut être observée dans une gélose à faible pourcentage d'agar (0,25% d'agar); ainsi, un mutant qui ne produit plus de flagelle fonctionnel ne peut se déplacer dans ces conditions (Rashid & Kornberg, 2000)(**Fig. 1.2A**).

1.3.1.2 Motilité de type *twitching*

La motilité de type *twitching* s'effectue sur une surface solide. Ce phénomène est souvent observé en bordure des colonies (Mattick, 2002). Pour ce faire, la bactérie a besoin de fimbriae (pili) de type IV (PT4) (**Fig. 1.2B**). C'est grâce à l'extension et la rétraction des pili que la bactérie se déplace (Harshey, 2003; Kearns, 2010). Ces structures sont ancrées dans la membrane externe et le peptidoglycane par un complexe de protéines. Deux ATPases, PilF/B et PilT, donnent l'énergie nécessaire à la polymérisation et à la dépolymérisation des pilines (PilA). La longueur de la structure est dynamique et peut être de plusieurs micromètres. Ainsi, l'élongation et la rétraction, causées par la polymérisation et la dépolymérisation et couplées à l'attachement à la surface, résultent en un mouvement de *twitching* (Maier & Wong, 2015; Mattick, 2002) (**Fig. 1.3A**).

1.3.1.3 Motilité de type *surfing*

Ce type de motilité sur surface nécessite un flagelle fonctionnel et la présence de mucine (composante du mucus retrouvé dans les voies respiratoires) qui facilite le mouvement. Ce type de déplacement est plus rapide que la motilité de type *swimming* dans des conditions similaires (Yeung *et al.*, 2012). Ce phénomène a été initialement découvert chez *P. aeruginosa* dans un milieu semblable aux conditions retrouvées dans les poumons de patients atteints de la fibrose kystique dû à la présence de grande quantité de mucine. Depuis le phénomène a été observé chez d'autres espèces telles qu'*Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* et *Vibrio harveyi* (Sun *et al.*, 2018; Yeung *et al.*, 2012).

1.3.1.4 Motilité de type *sliding*

Ce type de motilité résulte de l'expansion d'une colonie bactérienne jumelée à la réduction de la tension entre la colonie et la surface qui permet l'élargissement plus rapide de la colonie par rapport à la simple croissance bactérienne. Ceci permet une meilleure colonisation de la surface. Afin de permettre ce type de motilité, la bactérie produit des agents mouillants pour réduire la tension entre les bactéries et la surface (Harshey, 2003). Or, les bactéries en motilité de type *sliding* n'utilisent pas un appareil de locomotion connu pour se déplacer comme les autres types de motilité décrits plus haut (Murray & Kazmierczak, 2008). Ce type de motilité est observé chez *P. aeruginosa* dans un mutant qui ne possède ni de flagelle fonctionnel, ni de PT4 fonctionnels (Murray & Kazmierczak, 2008).

1.3.1.5 Motilité de type *swarming*

La motilité de type *swarming* se solde en un mouvement coordonné d'un groupe de bactéries sur une surface semi-solide. En laboratoire, les bactéries se déplacent de façon organisée pour former des colonies dendritiques et coloniser de nouveaux territoires (**Fig.1.2C**) (Kearns, 2010; Tremblay *et al.*, 2007). Chez *E. coli*, la vitesse de motilité de type *swarming* s'apparente à la vitesse de motilité de type *swimming* (Darnton *et al.*, 2010). Les colonies en motilité de type *swarming*, chez *P. aeruginosa*, sont composées de deux sous-populations qui ont un profil transcriptomique différent: les bactéries au centre de la colonie de *swarming* et les bactéries au bout des dendrites (Tremblay & Déziel, 2010). Globalement, les cellules qui se retrouvent dans les centres de *swarming* sont soumises aux stress environnementaux et expriment des gènes associés au stress oxydatif et au cuivre, alors que les cellules qui se retrouvent au bout des dendrites sont métaboliquement actives et expriment des gènes associés à la production d'énergie et de protéines ribosomales (Tremblay & Déziel, 2010).

La motilité de type *swarming* est associée à la virulence de la bactérie. En effet, chez *P. mirabilis*, ces bactéries possédant les caractéristiques de cellules en *swarming* ont été observées dans les reins de souris infectées (Allison *et al.*, 1994). Chez *P. aeruginosa*, cette bactérie surexprime certains gènes associés aux facteurs de virulence de la bactérie en motilité de type *swarming* lorsque comparée à la condition bouillon et elle est aussi plus résistante aux antibiotiques en condition *swarming* (Lai *et al.*, 2009; Overhage *et al.*, 2008). Ainsi l'hypothèse est que la motilité de type *swarming* semble jouer un rôle dans la pathogénicité de la bactérie et permet une meilleure dissémination de l'infection. Ceci est supporté par une étude qui a répertorié des mutants avec un défaut dans l'établissement d'une infection ; plusieurs de ces mutants possèdent aussi un défaut de motilité de type *swarming* (Potvin *et al.*, 2003).

De plus, les caractéristiques de la motilité de type *swarming* peuvent être différentes selon les espèces bactériennes. Chez certaines souches bactériennes en motilité de type *swarming*, tel que *P. mirabilis*, les cellules bactériennes sont plus longues dû à une suppression de la division cellulaire (Allison *et al.*, 1994; Kearns, 2010). En laboratoire, certains facteurs environnementaux influencent la motilité de type *swarming*. *P. aeruginosa* peut faire des dendrites lors de la motilité de type *swarming* formant un arrangement particulier sur gélose (**Fig. 1.2C**). Or, dû aux différentes conditions environnementales et aux différences entre les espèces, les bactéries peuvent prendre des arrangements différents sur les géloses de *swarming* (Kearns, 2010; Köhler *et al.*, 2000). Par exemple, *Bacillus subtilis* peut former des dendrites ou non selon le milieu. De plus, la concentration d'agar affecte la motilité de type *swarming*. Les espèces bactériennes sont classées en deux catégories : soit les *swarmer* robustes (qui se déplacent à des concentrations d'agar de 1,5 % et plus) et les *swarmer* tempérés (qui se déplacent à des concentrations d'agar de 0,5 à 0,8 %) (Partridge & Harshey, 2013). Finalement, les bactéries qui se déplacent en motilité de type *swarming* doivent posséder un ou des flagelles fonctionnels et produire un agent mouillant (Kearns, 2010). Alors qu'ils sont essentiels pour la motilité de type *twitching*, le rôle des fimbriae de type IV est controversé dans la motilité de type *swarming* (ceci sera discuté plus en détail à la **Section.1.3.5.3**).

1.3.1.5.1 Le flagelle

Comme première fonction obligatoire au déplacement en motilité de type *swarming*, la bactérie doit produire un ou des flagelle(s) fonctionnel(s). La rotation cet appareil permet de propulser le mouvement sur la surface. Pour générer cette force, le flagelle de *P. aeruginosa* comprend deux stators alternatifs dans sa membrane interne: MotAB et MotCD. Ceux-ci forment des canaux qui permettent le passage de protons et donnent la force nécessaire pour faire tourner la *C-ring*

(structure cytoplasmique du flagelle qui tourne par l'interaction électrostatique entre MotAB et un composant du *C-ring* (FliG)). Ultimement, la rotation du *C-ring* induit la rotation de la partie externe du flagelle. Par la suite, la L-ring et la P-ring permettent l'ancrage du flagelle dans la membrane externe de la cellule. La P-ring, interagit avec MotB et se retrouvent dans le peptidoglycan, alors que la L-ring se retrouvent dans la membrane externe (Baker & O'Toole, 2017). La protéine FliC (monomère du flagelle) forme la partie extérieur du flagelle et sa rotation est induit par les stators ce qui permet ainsi le mouvement du flagelle (Baker & O'Toole, 2017; Kearns, 2010) (**Fig. 1.3B**).

Plusieurs espèces bactériennes produisent plus de flagelles lors de la motilité de type *swarming* par rapport à la motilité de type *swimming*. Ceci leur permet de combattre plus facilement la force de tension créée par la surface elle-même. Toutefois, *P. aeruginosa* ne possède qu'un seul flagelle polaire (Kearns, 2010; Partridge & Harshey, 2013). Le stator MotCD est nécessaire afin de combattre la force de tension à 0,5 % agar (condition standard de *swarming*), alors que les deux stators (MotAB et MotCD) sont nécessaires pour des conditions plus élevées en agar. Finalement, en absence de la protéine FliC, la bactérie ne peut pas se déplacer en motilité de type *swarming* (**Fig 1.2C**), car elle n'a pas de flagelle (Kearns, 2010; Partridge & Harshey, 2013; Rashid & Kornberg, 2000; Toutain *et al.*, 2005). Les bactéries qui ont un flagelle non fonctionnelle ont une virulence déficiente en contexte d'infection (Dasgupta *et al.*, 2004; Potvin *et al.*, 2003).

1.3.1.5.2 Les biosurfactants

Le deuxième élément nécessaire à la motilité de type *swarming* est la production d'agents tensioactifs. Ce sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles sont composées d'une portion hydrophobe et d'une portion hydrophile. Elles permettent ainsi d'interagir avec l'eau et la surface et jouent le rôle d'agent mouillant (Partridge & Harshey, 2013). Une des limitations pour les bactéries, lors de la motilité de type *swarming*, est de combattre la tension entre la surface et les bactéries. La production de molécules amphiphiles réduit la tension de surface et permet aux bactéries de glisser sur la surface de la gélose (Partridge & Harshey, 2013). La bactérie *P. aeruginosa* produit comme surfactant des rhamnolipides (Jarvis & Johnson, 1949; Ochsner *et al.*, 1994) qui sont composés de trois familles de molécules distinctes (**Fig. 1.3C**). Ce mélange complexe de molécules est composé des acides 3 — (3-hydroxyalkanoyloxy) alcanoïque (HAA) et des molécules de HAA liées à un (mono-rhamnolipide) ou deux (di-rhamnolipide) molécules de rhamnoses. La protéine RhIA produit les HAA et un mutant dans ce gène cause une perte complète de motilité de type *swarming* (**Fig. 1.2C**), par l'absence d'un agent mouillant à la surface. Par la suite, RhIB rajoute une molécule de rhamnose et RhIC rajoute la deuxième

molécule de rhamnose sur le composé. Les gènes *rhlAB* forment un opéron, alors que le gène *rhlC* se trouve ailleurs dans le génome (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Le mélange de ces trois molécules permet le phénotype distinct de la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*. Les HAA repoussent les dendrites ce qui entraîne la formation de dendrites qui ne se rencontrent jamais. Les di-rhamnolipides ont le rôle d'attirer les dendrites. Les mono-rhamnolipides, pour leur part, favorisent le déplacement des cellules spécifiquement (Tremblay *et al.*, 2007).

1.3.1.5.3 Les pili de type IV

Finalement, les pili de type IV (PT4) ont un rôle controversé dans la motilité de type *swarming*. Fait intrigant, certains groupes de recherche observent que les mutants dans cet appareil ont un défaut de motilité de type *swarming* chez la souche PAO1 en utilisant différents milieux de *swarming* (Köhler *et al.*, 2000; Overhage *et al.*, 2007). Toutefois, d'autres groupes rapportent qu'il n'y a aucun défaut dans la motilité de type *swarming* chez les mutants du PT4 dans la souche PAO1 et chez la souche PA14 (Anyan *et al.*, 2014; Mattick, 2002; Shrout *et al.*, 2006; Toutain *et al.*, 2005). Köler *et al.* rapportent un défaut de la motilité de type *swarming* des mutants dans les gènes du PT4 en utilisant différentes sources de carbone chez PAO1, alors que Toutain *et al.* rapportent aucun défaut de motilité de type *swarming* dans différents mutants des PT4 dans le même milieu et avec la même température d'incubation chez PA14 (Köhler *et al.*, 2000; Toutain *et al.*, 2005). Ainsi, ces contradictions démontrent qu'un mutant dans les gènes du PT4 peut posséder un défaut de motilité de type *swarming* dans certaines conditions de culture et/ou différentes souches de *P. aeruginosa*. La souche utilisée dans cette thèse, dans les conditions de *swarming* décrites, ne présente pas de défaut de motilité de type *swarming* chez un mutant du PT4 (*pilA*) (Fig.1.2C).

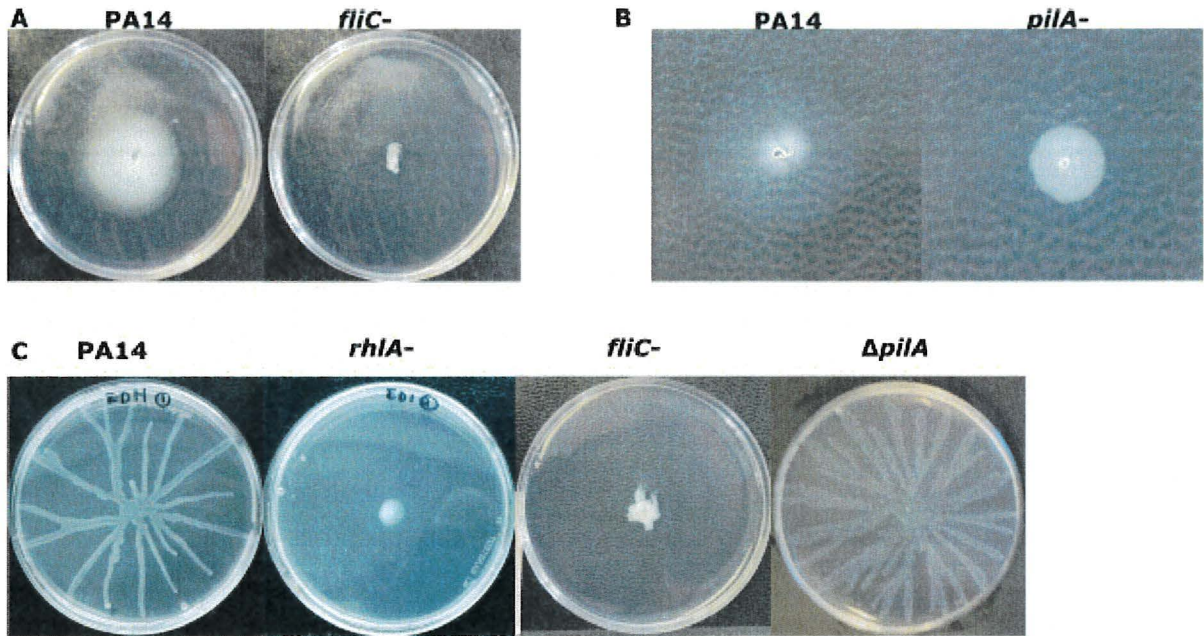


Figure 1.2: Types de motilité chez *P. aeruginosa*

La bactérie *P. aeruginosa*, souche PA14, se déplace selon plusieurs types de motilité. (A) La motilité de type *swimming*, où un mutant *fliC*⁻ ne peut pas se déplacer car il ne produit plus la flagelline essentielle à un flagelle fonctionnel. (B) Motilité de type *twitching* où un mutant *pilA*⁻ ne peut pas se déplacer dans ces conditions dû à l'absence d'un PT4 fonctionnel. (C) La motilité de type *swarming* où les mutants *rhlA*⁻ et *fliC*⁻ ne peuvent pas se déplacer dû à l'absence de l'un des éléments essentiels à ce type de motilité. Toutefois, un mutant dans le PT4 (*pilA*⁻) peut toujours se déplacer en motilité de type *swarming*. Les photos proviennent du Laboratoire Déziel.

1.3.2 Biofilms

Les biofilms sont des communautés bactériennes structurées et recouvertes d'une matrice qui protègent les bactéries et dont la matrice est composée d'exopolysaccharides (Psl et Pel), d'ADN extracellulaires, d'alginate, de lipides et de protéines (Chang, 2018; Costerton *et al.*, 1999). Les biofilms représentent un style de vie non motile et sont associés à une surface ou une interface. Ils contiennent des canaux qui permettent aux nutriments de circuler dans le biofilm et aux déchets de sortir de ce dernier (Costerton, 1995; Costerton *et al.*, 1999).

Le développement d'un biofilm est un phénomène bactérien complexe (**Fig.1.4**) (Lebeaux *et al.*, 2014; O'Toole *et al.*, 2000). Tout d'abord, l'initiation de la formation d'un biofilm est le résultat d'une réponse à des conditions environnementales spécifiques propices à la vie sur surface sous forme sessile. Ces conditions peuvent être la disponibilité des nutriments, le pH, la température, etc (O'Toole *et al.*, 2000). À cette étape, les cellules bactériennes planctoniques (motiles) adhèrent alors à une surface. Le flagelle et les PT4 contribuent à cette étape. L'hypothèse est que les PT4 servent à l'interaction cellule-cellule à cette étape (Anyan *et al.*, 2014). De plus, l'attachement à une surface impacte la régulation génique du microorganisme et favorise la production d'une matrice permettant la transition vers le mode de vie sessile. Au début, l'attachement des cellules est réversible, mais à l'étape suivante elle devient irréversible (Anyan *et al.*, 2014; Chang, 2018; O'Toole *et al.*, 2000; Shrout *et al.*, 2006). À la suite de l'étape d'attachement, les bactéries forment une microcolonie et perdent leurs flagelles. Le biofilm commence alors l'étape de la maturation en formant la matrice nécessaire à la protection des bactéries qui se retrouvent à l'intérieur. À cette étape, le *quorum sensing* (**Section 1.2.1**) permet aux bactéries de réguler finement la production d'éléments essentiels à la maturation des biofilms; tel que la production de rhamnolipides servant pour la formation des canaux et le relâchement ADN extracellulaire nécessaire à la matrice (Davey *et al.*, 2003; O'Toole *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2002; Solano *et al.*, 2014). Finalement, en réacquérant leur flagelle, des cellules bactériennes quittent le biofilm dû à divers signaux tel que le manque de nutriments. Pour se faire, des enzymes sécrétées, telle que l'alginate lyase par exemple, permettent de dissoudre la matrice pour laisser sortir les cellules bactériennes du biofilm. De plus, la liquéfaction du centre du biofilm (dû à la mort cellulaire par exemple) et le détachement du biofilm permettent aussi aux bactéries mobiles de s'échapper du biofilm (Allsopp *et al.*, 2017; Davey *et al.*, 2003; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Lebeaux *et al.*, 2014; Livak & Schmittgen, 2001; O'Toole *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2002).

Finalement, la motilité de type *swarming* se régule inversement avec la formation des biofilms (Brencic & Lory, 2009; Caiazza *et al.*, 2007). En fait, certaines études démontrent que la motilité de type *swarming* pourrait être un précurseur à la formation des biofilms (Shrout *et al.*, 2006).

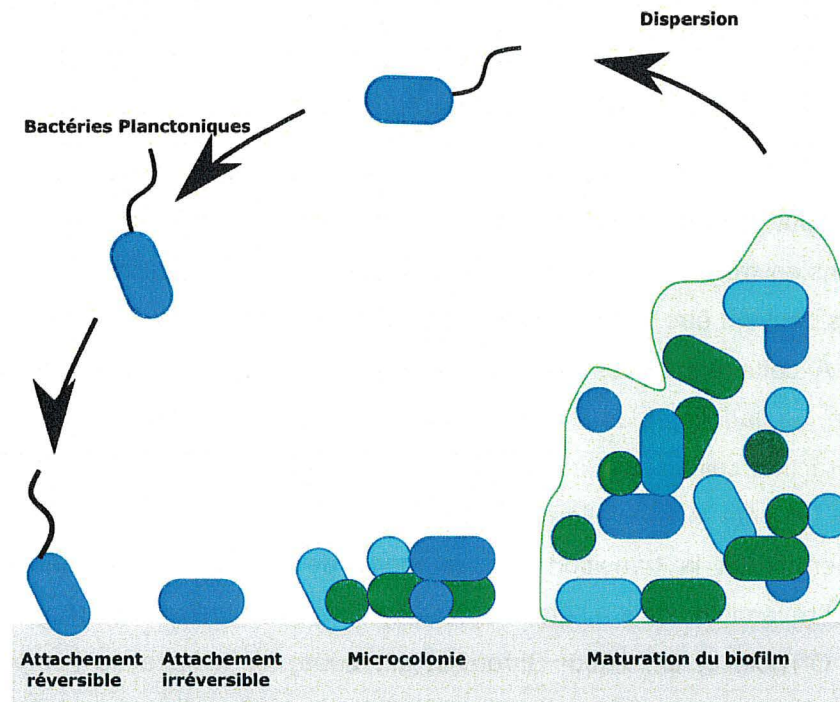


Figure 1.4: Cycle de vie d'un biofilm

Schémas des différentes étapes de la formation d'un biofilm et les étapes qui permettent le détachement des cellules bactériennes au biofilm (Anyan *et al.*, 2014; Lebeaux *et al.*, 2014; O'Toole *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2002).

1.4 Régulation des modes de vie

La bactérie *P. aeruginosa* possède plus d'un mode de vie et peut s'adapter à différents environnements. Ainsi, le mode de vie planctonique ou motile est associé aux infections aiguës. Sa régulation est inverse au mode de vie sessile où les bactéries se retrouvent sous forme de biofilms (Furukawa *et al.*, 2006). Ainsi, la bactérie possède plusieurs systèmes de régulation pour permettre la transition entre ces deux modes de vie très différents.

1.4.1 Di-guanosine monophosphate cyclique

Le signal intracellulaire diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) régule diverses fonctions bactériennes. La synthèse du c-di-GMP résulte de la fusion de deux molécules de GTP par des domaines diguanylates cyclases alors que des domaines phosphodiésterases peuvent

dégrader le c-di-GMP (Valentini & Filloux, 2016). Ces deux types de domaines enzymatiques, qu'on retrouve en grand nombre chez *P. aeruginosa*, modulent ainsi le niveau de c-di-GMP dans une cellule. Certaines protéines possèdent même les deux domaines. Le c-di-GMP, lorsque formé, se retrouve dans le cytoplasme et agit sur différentes composantes cellulaires (Römling *et al.*, 2013; Valentini & Filloux, 2016). Cette molécule s'associe avec divers effecteurs dans la cellule qui influencent plusieurs fonctionnalités de la cellule, dont les facteurs de virulence (système de sécrétion de type III, exotoxines) et la production d'exopolysaccharides nécessaire à la formation des biofilms (Valentini & Filloux, 2019).

Le c-di-GMP permet de réguler la transition entre le mode de vie sessile et motile. La concentration élevée de c-di-GMP dans une bactérie favorise la formation des biofilms, alors qu'une faible concentration semble favoriser la motilité des cellules bactériennes (Hengge, 2009; Roy *et al.*, 2012; Valentini & Filloux, 2016). La baisse de c-di-GMP, lors de la maturation des biofilms, entraîne la dispersion du biofilm lors du manque de nutriments (Basu Roy & Sauer, 2014; Valentini & Filloux, 2016). Des bactéries avec un faible taux de c-di-GMP et des bactéries avec un haut taux de c-di-GMP dans leur cytoplasme peuvent se retrouver dans un même biofilm. Celles avec un faible taux de c-di-GMP se déplacent sur la surface à laquelle le biofilm s'attache (Armbruster *et al.*, 2019). Les cellules avec un taux plus élevé de c-di-GMP sont celles qui bâtissent le biofilm en produisant la matrice du biofilm. Plusieurs diguanylylate cyclases et phosphodiesterases affectent le niveau de c-di-GMP et permettent de réguler des gènes liés à la production des exopolysaccharides et la formation des biofilms (Armbruster *et al.*, 2019; Chang, 2018). Ainsi, le c-di-GMP participe à toutes les étapes de formation des biofilms, dès l'étape de l'attachement (Armbruster *et al.*, 2019; Valentini & Filloux, 2016).

De plus, le c-di-GMP participe à la transmission d'un signal qui part de la détection de la surface et qui est transmis à plusieurs régulateurs clés dans la cellule (Chang, 2018; Kuchma *et al.*, 2015; Kuchma *et al.*, 2007). Cette détection de la surface est importante pour permettre l'adhésion des cellules bactériennes à la surface. Ces signaux peuvent contribuer à la transition entre les modes de vie sessile et planctonique. Par exemple, le système Wsp détecte la surface à l'aide d'un récepteur membranaire, WspA, qui permet la phosphorylation indirecte de WspR. WspR possède un domaine diguanylate cyclase ce qui permet la synthèse du c-di-GMP (Chang, 2018). De plus, la protéine SadC et la protéine BifA, une diguanylate cyclase et une phosphodiesterase respectivement, répondent aux stimuli de la surface lors de l'attachement des cellules et réprime l'expression du flagelle (Kuchma *et al.*, 2015; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007). Sur surface, le PT4 permet aussi cette détection par l'entremise du régulateur PiiY1 (Chang, 2018).

Cette protéine permet l'activation de SadC et donc de la production de c-di-GMP nécessaire à la formation de biofilms (Chang, 2018).

Donc, la signalisation par le c-di-GMP permet la détection de surface et la régulation entre les différents modes de vie de la bactérie.

1.4.2 Systèmes à deux composants

Les bactéries utilisent les systèmes à deux composants pour répondre aux différents stimuli qu'elles rencontrent. Ils permettent aux bactéries de changer rapidement leur expression génique pour mieux s'adapter (Ann M. Stock *et al.*, 2000).

Ils sont composés d'une histidine kinase qui reçoit un signal à son domaine senseur en N-terminal (**Fig.1.5**). Cela entraîne l'autophosphorylation sur un résidu histidine en C-terminal. Le domaine catalytique, composé d'une ATPase, permet l'ajout de la phosphorylation sur l'histidine (Capra & Laub, 2012). Cette protéine transmembranaire permet donc le transfert du stimulus au cytoplasme (Ann M. Stock *et al.*, 2000). L'histidine kinase transmet ensuite le signal à un régulateur de réponse sur un résidu aspartate ce qui active la protéine. Le régulateur de réponse possède deux domaines, un domaine régulateur (ou receveur) en N-terminal et un domaine effecteur en C-terminal (Ann M. Stock *et al.*, 2000). Certains régulateurs de réponse n'ont pas de domaine effecteur séparé (Capra & Laub, 2012). La plupart des régulateurs de réponse possèdent un domaine effecteur qui se lie à l'ADN puisqu'il joue le rôle de facteur de transcription qui réprime ou active des gènes cibles (Ann M. Stock *et al.*, 2000). Le régulateur de réponse possède souvent un domaine phosphatase pour arrêter l'activation. Ce domaine peut aussi se retrouver sur une protéine auxiliaire ou être intégré à la protéine histidine kinase (West & Stock, 2001).

Les systèmes à deux composants sont classés en trois catégories. Dans les systèmes classiques, l'histidine kinase comprend un domaine qui reçoit les stimuli et un domaine de transmission (**Fig.1.5A**). Pour les systèmes non-orthodoxes, l'histidine kinase possède aussi un domaine receveur à l'extrémité de la protéine. Celui-ci reçoit le signal sur un résidu aspartate avant de le transmettre au régulateur de réponse. Le signal passe souvent par l'intermédiaire d'un module *histidine-containing phosphotransfer* (Hpt) (**Fig.1.5 B**). Finalement, les systèmes hybrides fonctionnent grâce à une protéine Hpt indépendante (**Fig.1.5 C**) (Rodrigue *et al.*, 2000).

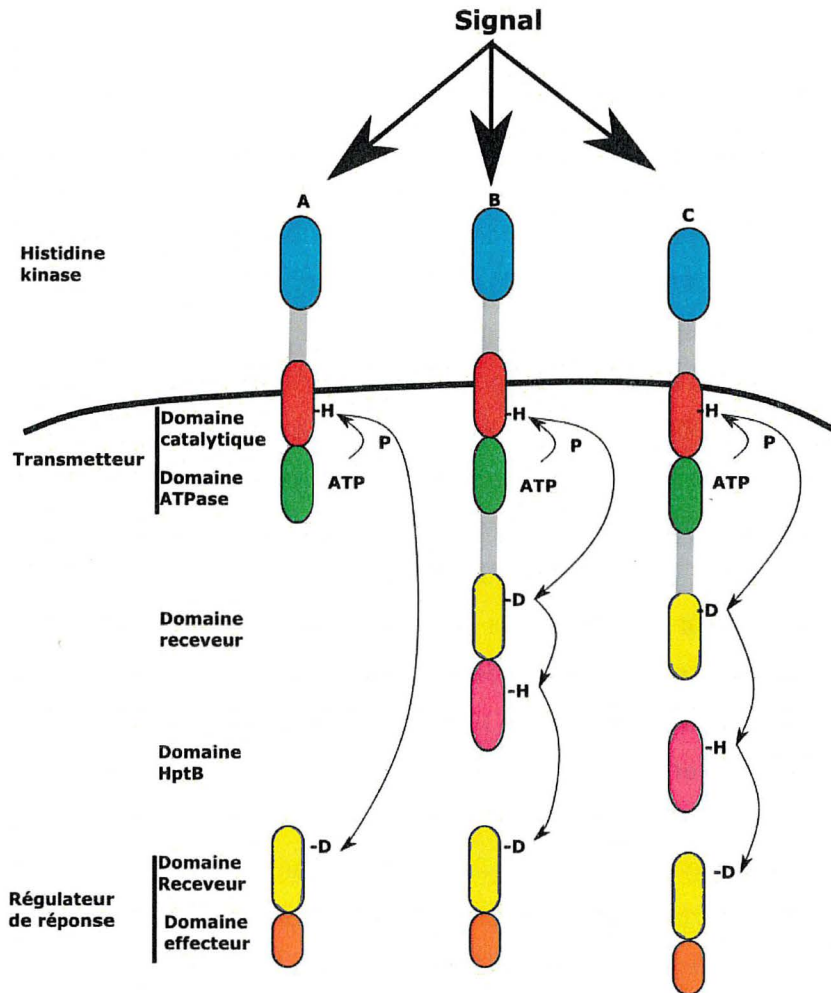


Figure 1.5. Systèmes à deux composants.

Un signal est transmis à une histidine kinase. Un phosphate est ajouté sur le domaine catalytique de l'histidine kinase. L'histidine kinase transmet ensuite le résidu phosphate vers le régulateur de réponse. (A) Système à deux composants classique où le signal phosphate est transmis du domaine catalytique directement sur le domaine receveur du régulateur de réponse. (B) Dans le système à deux-composant non-orthodoxe la transmission du groupe phosphate passe par l'intermédiaire d'un domaine receveur sur l'histidine kinase et parfois par un domaine HptB à même cette protéine. (C) Pour le système hybride, le domaine HptB est une protéine indépendante. Adapté de Capra *et al.* (Capra & Laub, 2012) et de Rodrigue *et al.* (Rodrigue *et al.*, 2000).

La bactérie *P. aeruginosa* encode dans son génome plus d'une soixantaine de ces systèmes. Elle possède 63 histidines kinases et 64 régulateurs de réponse (Rodrigue *et al.*, 2000) dont 42 systèmes à deux composants classiques, cinq systèmes à deux composants non-orthodoxes et trois protéines Hpt (A-B-C) qui composent les systèmes hybrides.

1.4.3 Le système à deux composants GacS/GacA

Le système à deux composants de GacS/GacA contient le senseur GacS, qui détecte des signaux environnementaux, (Rodrigue *et al.*, 2000) et le régulateur de réponse GacA (Laville *et al.*, 1992; Reimmann *et al.*, 1997). Ce système permet la régulation post-transcriptionnelle de plusieurs gènes dont la production de métabolites secondaires chez *P. aeruginosa* (Laville *et al.*, 1992; Rahme *et al.*, 1995). GacA régule la transcription de deux gènes encodant des pARN, *rsmZ* (Brencic *et al.*, 2009; Heeb *et al.*, 2002) et de *rsmY* (Brencic *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2006). Ces deux petits ARN (pARN) inhibent l'action du régulateur post-transcriptionnel RsmA en se liant à celui-ci (Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2003). D'autres pARN, RsmW et RsmV, ont dernièrement été identifiés. Ils ont aussi la capacité de titrer la protéine RsmA (Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016). RsmF (RsmN), un orthologue de RsmA, a aussi récemment été identifié. Il agit d'une manière similaire à RsmA (Marden *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2018). Toutefois, le bassin de gènes régulés par RsmA est plus large que pour RsmF. De plus, RsmF possède une moins grande affinité pour certaines cibles de RsmA dont les pARN RsmY et RsmZ (Janssen *et al.*, 2018b). RsmA réprime la production de plusieurs métabolites secondaires, tels que le HCN (Brencic & Lory, 2009; Irie *et al.*, 2010), en empêchant la traduction de leurs ARN messagers (ARNm). De plus, RsmA permet d'activer indirectement la motilité et le mode de vie planctonique (associés aux infections aiguës) (Lin *et al.*, 2006). En se liant à leur ARNm, RsmA peut aussi inhiber directement les gènes liés à la formation des biofilms, tels que *pel* et *psl*, et au mode de vie sessile (associés aux infections chroniques) (Brencic & Lory, 2009; Irie *et al.*, 2010) **(Fig. 1.6)**. En effet, en utilisant un modèle murin, Mulcahy et collègues (Mulcahy *et al.*, 2008) ont démontré chez *P. aeruginosa* que RsmA est nécessaire pour la dissémination bactérienne dans un contexte d'infection aiguë. De plus, ce même groupe rapporte que l'inactivation du gène *rsmA* résulte en la persistance de *P. aeruginosa* chez la souris (Mulcahy *et al.*, 2008). RsmA, un homodimère, empêche la traduction des différents gènes en se liant aux séquences GGA qui se retrouvent en 5' — *Untranslated Transcribed Region* (UTR) de ces ARNm cibles (Brencic & Lory, 2009; Liu *et al.*, 1997). RsmA agit aussi en boucle de rétroaction en augmentant positivement l'expression de *rsmY* et *rsmZ* par un mécanisme inconnu (Heurlier *et al.*, 2004a; Valverde *et al.*, 2003) et en s'autorégulant négativement (Jean-Pierre *et al.*, 2015).

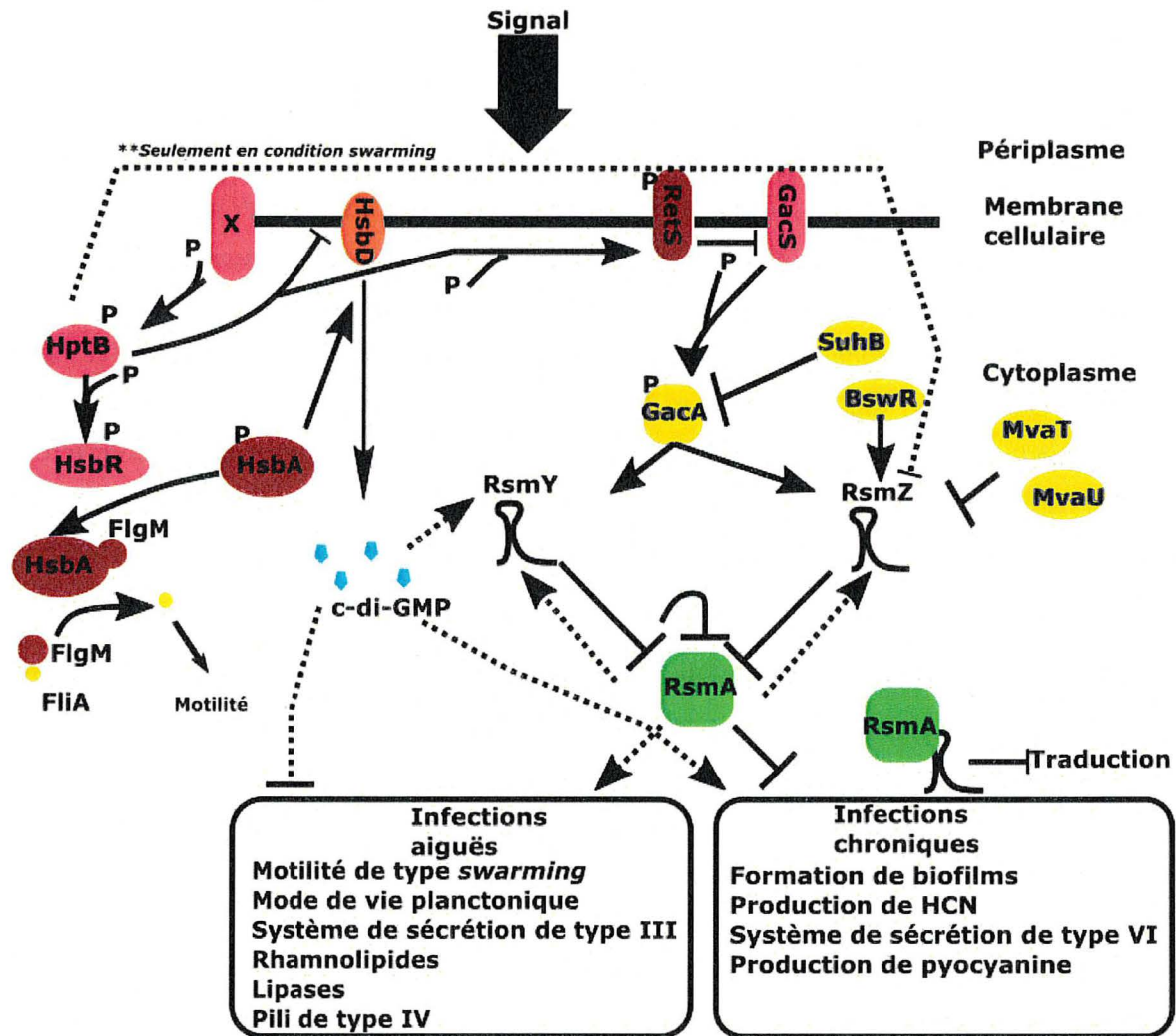


Figure 1.6 Régulation du système à deux composants GacS/GacA

Régulation génique du système à deux composants GacS/GacA et tous les intermédiaires connus. GacS permet la phosphorylation de GacA qui contrôle la transcription de *rsmY* et *rsmZ*. Ceux-ci régulent RsmA, un régulateur post-transcriptionnel, en s'y liant. RsmA permet l'activation ou l'inhibition des gènes liés au mode de vie sessile et planctonique. Les facteurs extérieurs au système Gac/Rsm peuvent influencer cette cascade, tels que HptB. **En condition *swarming* seulement, HptB peut influencer RsmZ sans passer par le régulateur GacA (Ann M. Stock *et al.*, 2000; Basu Roy & Sauer, 2014; Bordi *et al.*, 2010; Brencic & Lory, 2009; Brencic *et al.*, 2009; Castang *et al.*, 2008; Goodman *et al.*, 2004a; Goodman *et al.*, 2009a; Heeb *et al.*, 2002; Heurlier *et al.*, 2005; Heurlier *et al.*, 2004b; Hsu *et al.*, 2008; Jean-Pierre *et al.*, 2015; Jean-Pierre *et al.*, 2017; Kay *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Moscoco *et al.*, 2011; Pessi *et al.*, 2001; Reimann *et al.*, 1997; Rodrigue *et al.*, 2000; Valentini & Filloux, 2016; Valentini & Filloux, 2019; Valentini *et al.*, 2016; Valverde *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014). La couleur rose représente le système à deux composants comprenant HptB impliqué dans le relais de la phosphorylation. La couleur verte représente les régulateurs post-transcriptionnels, la couleur jaune représente les facteurs de transcription et la couleur rouge vin représente des facteurs qui se lient à leur protéines cibles. La couleur orange représente des facteurs impliqués dans la production du c-diGMP. Les molécules sont en bleu. Les flèches pointillées représentent les relations indirectes et/ou encore méconnues et les flèches pleines représentent les interactions connues et directes.

D'autres facteurs à l'extérieur de cette cascade peuvent influencer la régulation du système Gac/Rsm (Figure 1.6). Tout d'abord, la protéine RetS, un régulateur transmembranaire, est

antagoniste à la protéine GacS et empêche son action (Goodman *et al.*, 2009a). RetS agit sur GacS en empêchant l'autophosphorylation de GacS, en retirant le phosphate nécessaire à l'activation de GacS ou encore en empêchant le transfert du phosphate critique au passage du signal (Francis *et al.*, 2018). Par la suite, pour la régulation de GacA, SuhB contrôle la transcription de cette protéine (Li *et al.*, 2013). Pour ce qui est des pARN RsmY et RsmZ, d'autres facteurs que la protéine GacA peut les réguler. Par exemple, MvaT et MvaU sont des régulateurs de transcription qui se lient au promoteur de *rsmZ* et bloquent sa transcription (Castang *et al.*, 2008). Toutefois, BswR concurrence MvaT ce qui augmente la transcription de *rsmZ* (Wang *et al.*, 2014). De plus, la régulation de *rsmZ* diffère lorsque la bactérie se retrouve en mode planctonique (bouillon) ou en mode motile sur surface (motilité de type *swarming*) (Jean-Pierre *et al.*, 2017) (**Figure 1.6 ****). Le gène *rsmZ* est régulé, en condition surface, par un important régulateur de ce système, HptB, qui sera décrit plus loin (une des trois protéines Hpt connues chez *P. aeruginosa*) (voir **Section 1.4.4**).

Finalement, les signaux détectés par le système Gac/Rsm ne sont pas très bien connus. Toutefois, RetS détecte des composants de *P. aeruginosa* qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire lors de la lyse cellulaire. Ainsi, RetS permet la détection du danger pour les cellules avoisinantes et favorise les systèmes de compétition bactérienne, tels que la production de HCN ou la production des systèmes de sécrétion de type VI (SST6) (décrit à la **Section 1.5.2**) (LeRoux *et al.*, 2015a; LeRoux *et al.*, 2015b). Aussi, Humair et collègues ont observé que RetS semble être impliqué dans la détection de température chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens* (Humair *et al.*, 2009).

1.4.4 Régulateur HptB

HptB est l'une des trois protéines Hpt encodées dans le génome de *P. aeruginosa*, et elle fait partie du systèmes à deux composants hybrides. Plusieurs histidines kinases peuvent phosphoryler la protéine HptB (les différentes kinase sont représentées par le facteur X sur la **Fig. 1.6**) (Hsu *et al.*, 2008). Entre autre, les histidines kinases PA1611 (Hsu *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006), PA2884 et PA1978 (annotation sur le génome de PAO1) transmettent un phosphate à HptB, mais pas à HptA et HptC (les deux autres protéines Hpt retrouvées chez cette bactérie) (Hsu *et al.*, 2008). HptB peut, par la suite, interagir avec RetS et HsbR (PA3346) (Hsu *et al.*, 2008). Lorsque HptB donne un phosphate sur le domaine receveur du régulateur de réponse HsbR, l'activité phosphatase du domaine catalytique de ce dernier augmente (mais son activité kinase diminue). Ainsi, il peut déphosphoryler la protéine HsbA (PA3347), un anti-anti-facteur

sigma qui se lie à un anti-sigma facteur (FlgM). Il y a alors la libération d'un facteur sigma (FliA)(Bordi *et al.*, 2010). FliA régule des gènes ciblent tel que *fliC* liée à la synthèse du flagelle et permet donc la motilité (Frisk *et al.*, 2002). De plus, la forme phosphorylée de HsbA permet la régulation de HsbD (PA3343). HsbD est une diguanylate cyclase qui favorise la production de c-di-GMP, ce qui permet une meilleure expression de *rsmY*, et ultimement favorise le mode de vie sessile et la traduction des gènes qui lui sont liés (Valentini *et al.*, 2016).

Un mutant dans le gène *hptB* a un important défaut de motilité de type *swarming*. Toutefois, ce même mutant possède tous les éléments nécessaires à la motilité de type *swarming*. En effet, il exprime un flagelle fonctionnel et produit des rhamnolipides (Jean-Pierre *et al.*, 2017; Tremblay, 2011) (**Fig. 1.7**). Ainsi, une étude plus approfondie de la protéine HptB permettrait de mieux comprendre la régulation de la motilité de type *swarming*.

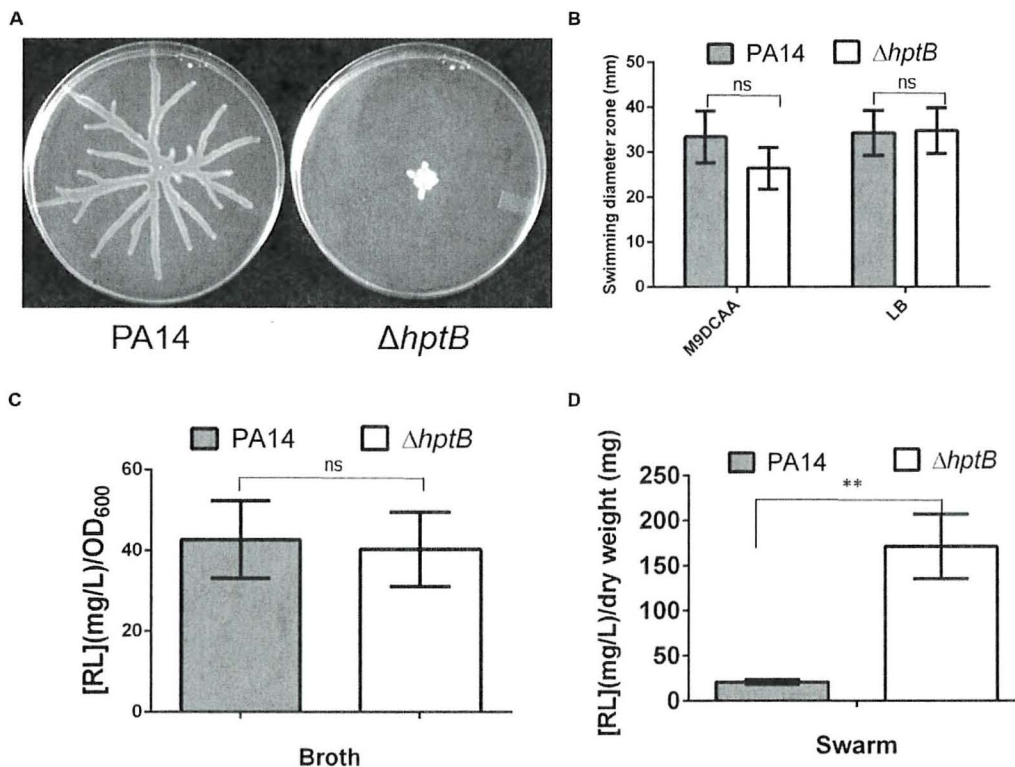


Figure 1.7 Capacité de la motilité de type *swarming* du mutant $\Delta hptB$

(A) Motilité de type *swarming* de *P. aeruginosa* PA14 et du mutant $\Delta hptB$ avec les tests pour les différents éléments nécessaires à la motilité de type *swarming* soit (B) la fonctionnalité du flagelle et la production de rhamnolipides en (C) culture liquide et (D) en surface. Figure tirée de Jean-Pierre *et al.* (Jean-Pierre *et al.*, 2017).

1.5 Compétitions bactériennes

Afin de coloniser un nouveau territoire déjà colonisé par d'autres espèces, les bactéries doivent utiliser des mécanismes qui permettent la compétition bactérienne (Klein *et al.*, 2020). Pour ce faire, les bactéries possèdent plusieurs mécanismes qui servent de système d'attaque: soit la sécrétion de molécules antimicrobiennes dans le milieu extracellulaire ou la production de systèmes nécessitant un contact physique (Klein *et al.*, 2020). De plus, les bactéries reconnaissent les signes associés à la présence de compétiteurs tels que les dommages cellulaires, la présence de molécules exogènes ou les limites nutritionnelles et peuvent ainsi réguler leurs mécanismes de défense et d'attaque face à la compétition en fonction de ces signes (Cornforth & Foster, 2013; LeRoux *et al.*, 2015b). Ici, des systèmes d'attaque qui nécessitent un contact physique tel que les *contact-dependent growth inhibition* (CDI) et les systèmes de sécrétion de type VI (SST6) sont présentés.

1.5.1 *Contact-dependent growth inhibition*

Le CDI permet la compétition bactérienne en empêchant la croissance d'une autre bactérie par un contact direct cellule-cellule. Ces systèmes, initialement découverts chez *E. coli* (Aoki *et al.*, 2005), sont composés de la protéine CdiB, un tonneau bêta transmembranaire, qui permet le transport de la toxine CdiA du périplasme vers une autre bactérie. CdiA contient un domaine récepteur de liaison qui se lie à un récepteur spécifique sur la cellule voisine. Cela permet d'injecter son domaine C-terminal qui contient l'activité toxique de la protéine et inhibe la croissance de la cellule attaquée. Les récepteurs visés peuvent être divers et dépendent de la cible. Les récepteurs chez *P. aeruginosa* sont encore méconnus (Allen & Hauser, 2019; Willett *et al.*, 2015). La bactérie hôte produit aussi une protéine d'immunité, CdiI, qui la protège de sa propre toxine CdiA en s'y liant (Allen & Hauser, 2019; Mercy *et al.*, 2016; Willett *et al.*, 2015). Afin d'inhiber la croissance de la cellule voisine, la toxine CdiA peut former un pore membranaire ou peut avoir une activité DNase ou RNase (Willett *et al.*, 2015). Ces systèmes se retrouvent dans plusieurs souches de *P. aeruginosa*. Le génome de PAO1 encode, dans son génome, deux de ces systèmes et leur fonction a été confirmée alors que PA14 code deux gènes *cdiA* prédits. Chez PAO1, la protéine RsmA participe à la régulation de ces systèmes et ils sont associés à la formation de biofilms (Mercy *et al.*, 2016).

1.5.2 Systèmes de sécrétion de type VI

Les SST6 permettent d'injecter des effecteurs d'une cellule à une cellule voisine (procaryotes ou eucaryotes) et nécessitent un contact physique entre les deux cellules (Hood *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2014; Lesic *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 2013). Les SST6 ont été initialement publiés chez *P. aeruginosa* et chez *Vibrio cholerae* (Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006). Des analyses phylogéniques confirment la présence d'au moins un SST6 dans plus de 25 % des protéobactéries, groupe bactérien dont fait partie *P. aeruginosa* (Bingle *et al.*, 2008).

Le génome de *P. aeruginosa* code pour trois *Hcp1 secretion island* (HSI) (HSI-I, HSI-II, HSI-III) qui produisent chacun un SST6 soit H1-SST6, H2-SST6 et H3-SST6, respectivement (**Fig. 1.8**) (Mougous *et al.*, 2006). H1-SST6 est connu pour injecter des toxines (**Section 1.5.2.2**) dans des bactéries voisines (Hood *et al.*, 2010). De plus, lorsqu'une bactérie produit une toxine, elle produit la protéine immunitaire correspondante pour prévenir son intoxication (Hood *et al.*, 2010). Les systèmes H2-SST6 et H3-SST6 jouent un rôle dans la pathogénicité des cellules eucaryotes et la compétition avec les cellules procaryotes par la production, entre autres, de toxines dites polyvalentes (Jiang *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2014; Lesic *et al.*, 2009; Sana *et al.*, 2012) (**Tableau 1.1**).

On rapporte régulièrement de nouveaux rôles attribués aux SST6. Par exemple, ils peuvent contribuer au maintien de la population bactérienne dans un microbiote (ex. intestin humain) (Sana *et al.*, 2016b; Zhao *et al.*, 2018). Chez *Burkholderia thailandensis*, les SST6 permettent de restreindre l'apparition des tricheurs dans une population (**Section 1.2.2**). En effet, les protéines immunitaires contre les effecteurs du SST6 sont sous le contrôle du QS et un tricheur ne peut pas les produire ; donc les autres bactéries peuvent l'éliminer de la population (Majerczyk *et al.*, 2016). De plus, les SST6 semblent nécessaires pour la production de biofilms chez certaines bactéries puisque des mutants dans les SST6 ont des défauts de formation de biofilms (Gallique *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2011). Plus récemment, des SST6 ont même été impliqués dans l'absorption de certains métaux et l'acquisition d'ADN extracellulaire (Borgeaud *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017; Ringel *et al.* ; Si *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015).

Les SST6 jouent un rôle dans la reconnaissance du soi chez *P. mirabilis* en motilité de type *swarming*. Chez cette bactérie, lorsque deux colonies de souches différentes, en motilité de type *swarming*, se rencontrent, elles ne se reconnaissent pas et ne peuvent pas se mélanger formant une ligne appelée phénomène de Dienes (Gibbs & Greenberg, 2011) causé par le SST6. Ces systèmes sécrètent un effecteur (IdsD) qui se lie à IdsE (se retrouve dans la membrane interne) dans une cellule voisine. Si IdsD reconnaît IdsE et s'y lie, il y aura rencontre des colonies en

motilité de type *swarming*. Or, si les deux souches n'ont pas des protéines *IdsD* et *IdsE* compatibles (deux souches différentes par exemple), la protéine *IdsD* injectée dans la cellule voisine ne sera pas reconnue par *IdsE*. Ceci n'entraîne pas la mort cellulaire, mais limite l'expansion des colonies en motilité de type *swarming* ce qui forme la ligne de Dienes (Gibbs *et al.*, 2008; Gibbs *et al.*, 2011; Saak & Gibbs, 2016; Wenren *et al.*, 2013).

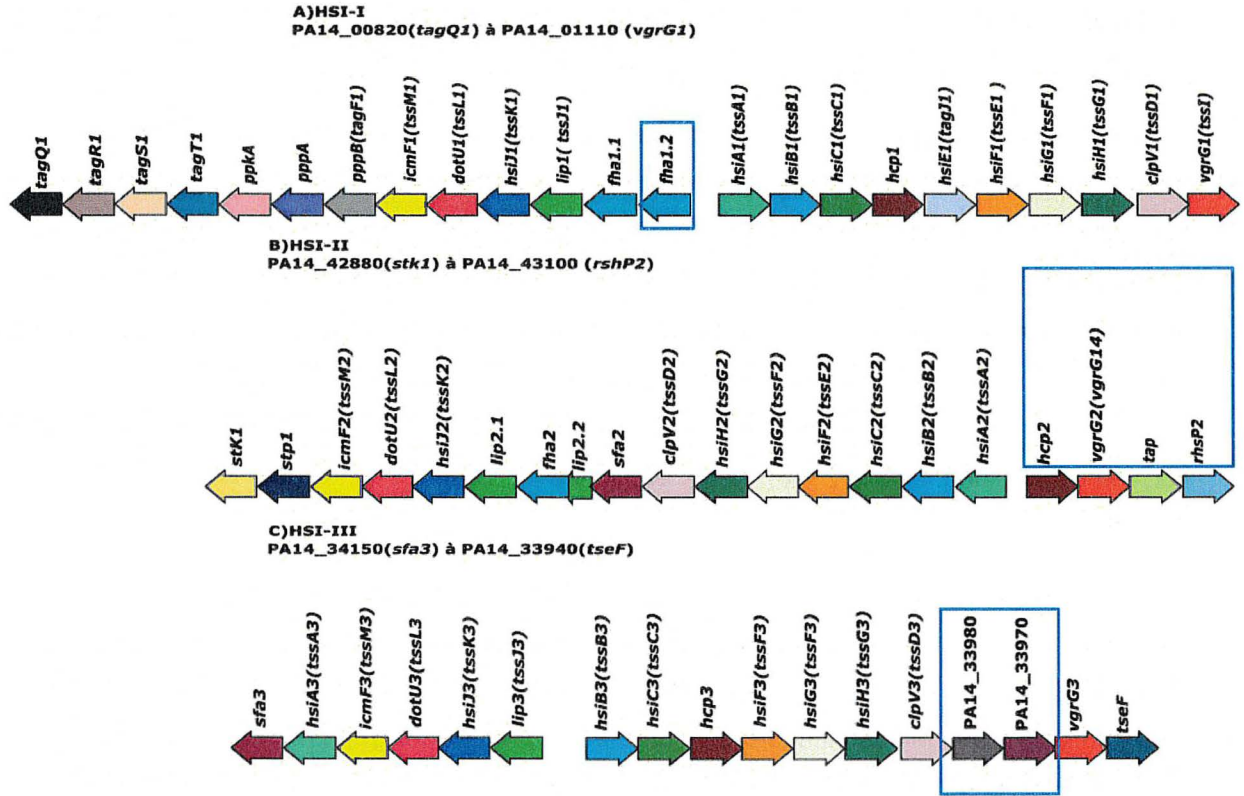


Figure 1.8: Organisation génique des îlots géniques HSI chez *P. aeruginosa* PA14

Organisation génique des îlots géniques (A) HSI-I, (B) HSI-II et (C) HSI-III qui codent pour trois SST6 chez PA14. Les îlots comprennent majoritairement des protéines nécessaires pour l'assemblage des systèmes. Les numéros PA14 réfèrent à l'annotation sur le génome de PA14-UCBPP (<http://pseudomonas.com/>) (Winsor *et al.*, 2005). Les gènes de même couleur entre les trois îlots sont homologues. Les encadrés en bleus correspondent aux gènes de PA14 qui ne se retrouvent pas sur le génome de PA01. Les parenthèses comprennent les différentes appellations pour les gènes (Filloux *et al.*, 2008; Gallique *et al.*, 2017; Hsu *et al.*, 2009; Lesic *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2017; Lossi *et al.*, 2013; Mougous *et al.*, 2006).

1.5.2.1 Structure type d'un SST6

Les SST6 forment des seringues apparentées à la queue d'un bactériophage T4 (Pukatzki *et al.*, 2007). Ils ont la forme d'un tuyau hexamérique formé de protéines Hcp (Mougous *et al.*, 2006) et relié à une membrane (Fig. 1.9) (Basler *et al.*, 2012). Ces structures dynamiques s'assemblent et se recyclent rapidement (20-30 $\mu\text{m s}^{-1}$ est la vitesse d'assemblage chez *Vibrio cholerae*) (Basler *et al.*, 2012). Une membrane recouvre le tube Hcp et se compose des protéines HsiB1/HsiC1

(aussi nommé TssB/C), dans le système SST6-H1 chez *P. aeruginosa* (ou VipA/VipB, chez *V. cholerae*). Elle se contracte et donne l'énergie au système pour que le tuyau formé de Hcp sorte et atteigne une cellule voisine. Par la suite, l'ATPase ClpV donne l'énergie nécessaire pour le recyclage du système (Basler *et al.*, 2012; Lossi *et al.*, 2013). Au bout de ce tube se trouvent trois protéines VgrG qui forment un complexe avec une protéine PAAR qui permettent de perforer la cellule voisine (Wang *et al.*, 2019).

Les protéines qui permettent l'ancrage du système forment un complexe entre les membranes (TssJML) et un complexe dans le cytoplasme qui est lié à la membrane interne (TssEFGK) (**Fig. 1.9**). TssJ (Lip) se retrouve dans le périplasme avec un domaine qui est inséré dans la membrane externe et permet l'ancrage dans cette membrane en interagissant avec TssM (IcmF) qui possède un domaine transmembranaire et relie la membrane interne et externe. TssL permet l'ancrage de TssM à la membrane interne. TssM et TssL interagissent avec TssK ce qui permet l'interaction avec le complexe dans le cytoplasme (Wang *et al.*, 2019).

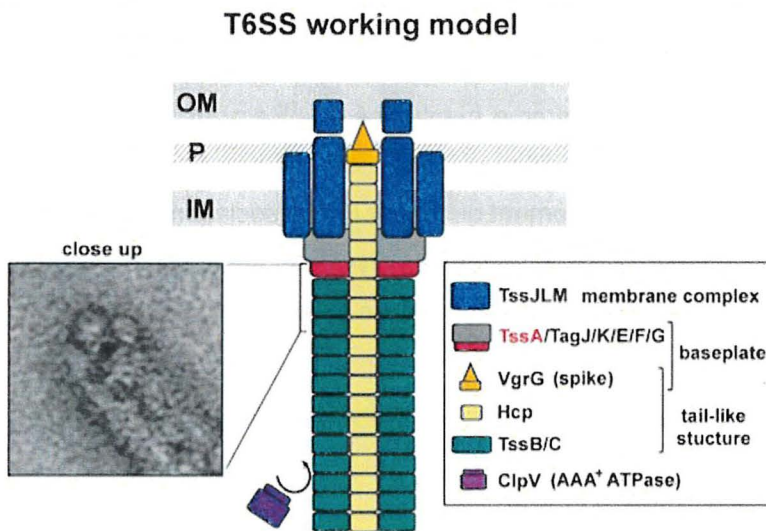


Figure 1.9: Structure type d'un SST6

Structure du SST6 qui comprend le tube Hcp recouvert de la membrane (TssB/C ou HsiB/C). Le complexe TssA-TagJ(HsiE1)-TssKEFG interagit avec TssJ et TssM qui composent le complexe membranaire TssJLM. Figure tirée de Planamente *et al.* (Planamente *et al.*, 2016)

1.5.2.2 Effecteurs

Les effecteurs sont des protéines sécrétées par les SST6 d'une cellule à l'autre et qui possèdent une activité précise sur la cellule voisine (souvent la fonction de toxine). Ils ne sont généralement pas codés dans les îlots HSI, mais ailleurs dans le génome. Ils sont en opéron avec leur protéine

immunitaire correspondante qui protège la cellule hôte. Dans certains cas, des protéines accessoires telles que les protéines Hcp, VgrG et PAAR se retrouvent dans le même opéron (Lien & Lai, 2017; Shneider *et al.*, 2013). Les effecteurs sont sécrétés par l'un des trois SST6 (voir **Tableau 1.1**) et plusieurs catégories d'effecteurs sont connues selon leurs cibles: la paroi cellulaire, la membrane cellulaire et l'acide nucléique. De nouvelles cibles ont été découvertes chez *Pseudomonas aeruginosa*. Par exemple, l'effecteur VgrG2b sécrété par H2-T6SS interfère dans la division de la cellule chez *P. aeruginosa* (Wood *et al.*, 2019) et Tse8 peut bloquer la synthèse des protéines (Nolan *et al.*, 2019).

Chacun des trois SST6 chez *P. aeruginosa* peut sécréter des effecteurs qui attaquent les procaryotes. Le fait de pouvoir attaquer les autres bactéries permet une meilleure colonisation (Sana *et al.*, 2016a). Toutefois, les effecteurs des systèmes SST6-H2-T6SS et H3 peuvent viser aussi les cellules eucaryotes (Russell *et al.*, 2014). Ces effecteurs contribuent à l'internalisation des bactéries dans les cellules eucaryotes en visant des systèmes précis de la cellule, dont les microtubules (Sana *et al.*, 2016a).

Certains effecteurs ont des rôles autres que de tuer ou inhiber la croissance des cellules eucaryotes ou procaryotes chez *P. aeruginosa*. Comme mentionné à la **Section 1.5.2**, certains effecteurs peuvent permettre le recrutement des métaux (Ringel *et al.* ; Wang *et al.*, 2015). Par exemple, un effecteur du H3-T6SS permet le recrutement du fer par une association avec le PQS, une molécule de QS (Lin *et al.*, 2017). Ainsi, le SST6 sont plus polyvalent que la seule sécrétion d'effecteurs toxiques et peuvent sécréter des protéines avec un plus large spectre d'action agissant dans le milieu extracellulaire.

Tableau 1.1: Liste des effecteurs connus ou prédits chez *P. aeruginosa*

SST6-H1					
Effecteurs	Gènes	Fonction	Cible	Proie	Références
	(Locus PAO1/ PA14)		cellulaire		
Tse 1	PA1844/ PA14_40660	Amidase	Enveloppe cellulaire	Procaryote	(Hood <i>et al.</i> , 2010) (Russell <i>et al.</i> , 2011)
Tse 2	PA2703/	Enzyme NAD	Autre	Procaryote	(Hood <i>et al.</i> , 2010)

	PA14_29200	Dépendante prédite			(Robb <i>et al.</i> , 2016)
Tse 3	PA3484/ PA14_19020	Muramidase	Enveloppe cellulaire	Procaryote	(Russell <i>et al.</i> , 2011) (Hood <i>et al.</i> , 2010)
Tse 4	PA2775/ PA14_28210	NA (activité Antimicrobienne testée)	NA	Procaryote	(Whitney <i>et al.</i> , 2014)
Tse 5	PA2684/ PA14_29400	NA (seulement prédit)	NA	Procaryote	(Whitney <i>et al.</i> , 2014)
Tse 6	PA0093/ PA14_01140	NAD(P)+ Glycohydrolase	Autre	Procaryote	(Whitney <i>et al.</i> , 2015)
Tse 7	PA0099/NA	DNase	Chromosome	Procaryote	(Pissaridou <i>et al.</i> , 2018)
Tse8	PA4163/ PA14_10040	NA (interaction avec le complexe de transcription)	Synthèse des protéines	Procaryote	(Nolan <i>et al.</i> , 2019)

SST6-H2

Effecteurs	Gènes (Locus PAO1/ PA14)	Fonction	Cible	Référence
Tle1	PA3290/ PA14_21490	Phospholipase A ₂ prédite	Membrane cellulaire	NA (Russell <i>et al.</i> , 2013)
Tle2	NA	Phospholipase A ₁ prédite	Membrane cellulaire	NA (Russell <i>et al.</i> , 2013)

<i>Tle3</i>	PA0260/	Phospholipase	Membrane	Eucaryote/	(Berni <i>et al.</i> , 2019)
	PA14_03200		cellulaire	Procaryote	
<i>Tle4 (TlpE)</i>	PA1510/	Phospholipase /	Membrane	Eucaryote/	(Jiang <i>et al.</i> , 2016)
	PA14_01200	Réticulum endoplasmique	cellulaire	Procaryote	(Russell <i>et al.</i> , 2013)
<i>Tle5a(PldA)</i>	PA3487/	Phospholipase D/	Membrane	Eucaryote/	(Russell <i>et al.</i> , 2013)
	PA14_18970	Cascade de signalisation Akt1 (cellules eucaryotes)	cellulaire	Procaryote	(Jiang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Azu</i>	PA4922/	Métabolisme du cuivre	Extracellulaire	NA	(Han <i>et al.</i> , 2019)
	PA14_65000				
<i>TseT</i>	PA3907/	NA (Domaine	NA	Procaryote	(Burkinshaw <i>et al.</i> , 2018)
	PA14_13360	catalytique Tox-REase)			
<i>VgrG2b</i>	PA0261/	Metalloprotéase	Division	Procaryote	(Wood <i>et al.</i> , 2019)
	PA14_03220		cellulaire/ Enveloppe cellulaire		

SST6-H3

Effecteurs	Gènes (Locus PAO1/ PA14)	Fonction	Cible	Référence	
<i>Tle5b(PldB)</i>	PA5089/	Phospholipase D/	Membrane	Procaryote/	(Jiang <i>et al.</i> , 2014)
	PA14_67220	Cascade de signalisation Akt1	cellulaire	Eucaryote	(Russell <i>et al.</i> , 2013)

(Cellule eucaryotes)					
<i>TseF</i>	PA2374/ PA14_33940	Métabolisme du fer	Extracellulaire	NA	(Lin <i>et al.</i> , 2017)

NA: Information non disponible

Effecteurs testés généralement chez PAO1, mais l'annotation PA14 du gène homologue est donnée.

Adapté de Sana et al. (Sana et al., 2016a)

1.5.2.3 Régulation

L'activation des SST6 n'est pas encore bien connue. Une attaque par le SST6 d'une bactérie voisine active le SST6 de *P. aeruginosa* (Basler *et al.*, 2013). De plus, en laboratoire en condition liquide, un mutant *retS* est nécessaire pour étudier le système. Autrement, le système n'est pas activé dans une monoculture, sans compétiteur, dans ces conditions (Mougous *et al.*, 2006) dû à l'effet inhibiteur de RsmA en liquide (**Fig. 1.6**). Toutefois en condition de culture solide, H1-T6SS est activé en monoculture (Mougous *et al.*, 2007; Silverman *et al.*, 2011). Ainsi, mieux comprendre leur activation est primordial pour mieux comprendre leur rôle.

Comme mentionné plus haut, RsmA peut inhiber l'activité de SST6-H1 en se liant directement aux ARNm *pha1* et *hsiA1* (Bordi *et al.*, 2010; Brencic *et al.*, 2009; Mougous *et al.*, 2006). Le système Gac/Rsm inhibe aussi SST6-H2 et H3 par l'inhibition de la traduction de *hsiA2* et *hsiB3* par RsmA. RsmA peut alors se lier aux ARNm des opérons des trois îlots HSI (Allsopp *et al.*, 2017) (**Fig. 1.10A**). Le facteur global de régulation ArmZ inhibe aussi le système SST6-H2, et active SST6-H1 et H3 (Allsopp *et al.*, 2017).

D'autres systèmes modulent l'expression des gènes liés aux trois SST6. Tout d'abord, le QS régule l'expression des trois SST6 différemment. Le SST6-H1 est inhibé par LasR et MvfR, alors que les deux autres systèmes sont activés par ces mêmes régulateurs (Lesic *et al.*, 2009; Sana *et al.*, 2012; Sana *et al.*, 2013). Le régulateur Fur, qui est activé en présence de faibles concentrations de fer dans l'environnement, peut se lier aux promoteurs des opérons HSI-II et inhiber leur expression (Sana *et al.*, 2012). Le facteur sigma RpoN (σ^{54}) favorise aussi l'activation des gènes pour les opérons des îlots HSI-II et III (Bernard *et al.*, 2011). Toutefois, Sana *et al.* ont obtenu des résultats différents où un mutant dans le gène *rpoN* surexprime des gènes de HSI-II ce qui démontre une inhibition par RpoN. L'îlot HSI-III possède deux opérons en sens inverse (**Fig. 1.8**). Dans leurs résultats (Sana *et al.*, 2013), ils ont démontré que RpoN active l'opéron de

gauche commençant par le gène *lip3*, mais inhibe l'opéron de droite commençant par le gène *hsiB3*. RpoN ne semble pas affecter la régulation de HSI-I. Finalement, le c-di-GMP permet la régulation du SST6. Un niveau élevé de c-di-GMP favorise la production de Hcp1, et donc l'activation de SST6-H1, mais ne semble pas affecter directement les deux autres systèmes (Moscoso *et al.*, 2011) (**Fig. 1.10A**).

Pour le SST6-H1, un système de phosphorylation permet l'activation et le recyclage du système pour l'assemblage à un nouveau site de la cellule (Cianfanelli *et al.*, 2016). Celui-ci s'active, entre autres, lors de l'attaque subit par le SST6 d'une bactérie compétitrice (Basler *et al.*, 2013). Le *threonine phosphorylation pathway* (TPP) permet cette activation. Tout d'abord, TagR, un régulateur de l'activation du SST6, fait partie d'un système qui reçoit le signal environnemental nécessaire, soit la perturbation de l'enveloppe cellulaire par exemple. En association avec un complexe composé de TagS, TagQ, et TagT, TagR active le système et transmet un phosphate à PpkA. Ainsi activé PpkA peut ajouter un groupement phosphate sur Fha1. Lorsque activé, Fha1 permet l'activation du SST6 et permet l'attaque vers une cellule voisine. Lors de l'inactivation du SST6-H1, la phosphatase PppA, qui joue le rôle d'antagoniste, retire le groupe phosphate à Fha1 qui s'associe alors à ClpV pour le recyclage du système. Le système est alors démantelé et les éléments peuvent être recyclés pour assembler un nouveau système (Cianfanelli *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2009) (**Fig. 1.10B**). Un tel système n'a jamais été rapporté pour les deux autres SST6 chez *P. aeruginosa*.

Figure 1.10: Régulation des SST6

(A) Le schéma représente les avancées dans la littérature sur la régulation des SST6. Différents régulateurs permettent l'expression ou la régulation post-transcriptionnelle des îlots HSI. Les flèches pleines représentent les interactions directes et connues et les flèches pointillées représentent les interactions indirectes ou mécanismes encore inconnus (Allsopp *et al.*, 2017; Bernard *et al.*, 2011; Brenic *et al.*, 2009; Lesic *et al.*, 2009; Moscoso *et al.*, 2011; Sana *et al.*, 2012). (B) Système de régulation de l'activation de SST6-H1- par le TPP et (C) le processus d'attaque et de recyclage du SST6. Figure tirée de Basler *et al.* (Basler *et al.*, 2013).

1.5.2.4 Motilité de type *swarming* et les SST6

Le mutant $\Delta hptB$ exprime un flagelle fonctionnel et produit des rhamnolipides, mais possède tout de même un important défaut de motilité de type *swarming* tel que mentionné à la **Section 1.4.4**. Le but de ce projet est de comprendre pourquoi ce mutant a un important défaut de motilité de type *swarming* alors qu'il possède tous les éléments connus nécessaires à ce type de motilité. Le profil transcriptomique du mutant $\Delta hptB$, lors de conditions de motilité de type *swarming* et lors de conditions de non *swarming*, a été comparé précédemment à celui de la souche sauvage dans les mêmes conditions. Lors de cette étude effectuée en 2010, le doctorant Julien Tremblay a découvert que le mutant $\Delta hptB$ surexprime les gènes liés aux SST6, lorsque comparé à la souche sauvage dans les mêmes conditions (**Tableau 1.2**) (Tremblay, 2011). Cependant, des mutants dans chacun des trois îlots HSI n'ont pas de défaut dans leur motilité de type *swarming* (**Fig. 1.11**). Néanmoins, lorsque deux des trois îlots sont supprimés, les mutants ont un important défaut de *swarming*. Les simples mutants HSI utilisés sont le résultat de la délétion d'un îlot HSI (mutant simple HSI-I, HSI-II et HSI-III). Les doubles mutants HSI sont le résultat de la délétion de deux îlots HSI (les doubles mutants HSI-I et II, HSI-I et III et HSI-II et III) (Lesic & Rahme, 2008; Lesic *et al.*, 2009) (**Fig. 1.11**).

Par la suite, comme il a été mentionné à la **Section 1.3.1.5.2**, la sécrétion des HAA entraîne le repoussement des cellules en motilité de type *swarming*. Lorsque PA14 ne produit plus de HAA (mutant $rhIA^-$), cette colonie ne peut pas éloigner une colonie de la souche sauvage en motilité de type *swarming* (Tremblay, 2011; Tremblay *et al.*, 2007) (**Fig. 1.12**). Les dendrites de PA14 peuvent alors se mélanger à la colonie de $rhIA^-$. Or, l'introduction d'une mutation dans le gène $hptB$ dans ce mutant (PA14 $rhIA^- \Delta hptB$) entraîne cet effet d'éloignement (Tremblay, 2011) (**Fig. 1.12**). Cet éloignement n'est pas dû à la production de HAA puisque le gène nécessaire à leur synthèse ($rhIA$) est absent. Sachant que le mutant $\Delta hptB$ sur-exprime les gènes liés au SST6, l'hypothèse est que ces systèmes pourraient être responsables de cet évitement puisqu'un phénomène similaire est observé chez *P. mirabilis* (**Section 1.5.2**). Ainsi, chez *P. aeruginosa*, les SST6 pourraient aussi contribuer à la reconnaissance du soi en motilité de type *swarming* et chez

$\Delta hptB$ une trop grande production de ces systèmes pourrait expliquer le phénomène observé à la **Figure 1.12**. (Ceci sera exploré au **Chapitre 7**).

Fait intéressant, les SST6 ont un rôle connu en motilité de type *swarming* chez une autre bactérie autres que *P. aeruginosa* et *P. mirabilis*. Chez *Vibrio alginolyticus* certains mutants dans les gènes des SST6 ont un important défaut de motilité de type *swarming* (Liu *et al.*, 2012). Ainsi, ces résultats préliminaires et certaines études suggèrent que les SST6 jouent un rôle dans la motilité de type *swarming*.

Tableau 1.2: Résumé des gènes des SST6 différemment exprimés chez le mutant $\Delta hptB$ en condition de *swarming* (Adapté de Tremblay (2011))

GÈNES	CHANGEMENT D'EXPRESSION (LOG ₂)	GÈNES	CHANGEMENT D'EXPRESSION (LOG ₂)	GÈNES	CHANGEMENT D'EXPRESSION (LOG ₂)
Condition $\Delta hptB$ versus le non <i>swarming</i>		Condition $\Delta hptB$ versus extrémités de dendrites		Condition $\Delta hptB$ versus le centre de <i>swarming</i>	
Gènes du HSI-II		Gènes du HSI-I		Gènes du HSI-I	
<i>hsiB2</i>	1,5	<i>pppB</i>	1,5	<i>hsiB1</i>	1,5
<i>hsiC2</i>	1,5	<i>hcp1</i>	2,0	<i>hsiC1</i>	1,4
<i>hsiF2</i>	1,5	<i>hsiE1</i>	1,6		
<i>lip2.2</i>	1,4	<i>hisF1</i>	1,4		
<i>fha2</i>	1,7	Gènes du HIS-III			
<i>lip2.1</i>	1,6	<i>hsiC3</i>	1,3		
<i>his J2</i>	1,7	<i>hsiF3</i>	1,6		
<i>dotU2</i>	1,8	<i>hcp3</i>	1,4		
<i>icmF2</i>	1,5				

<i>hsiG2</i>	1,6				
<i>hsiH2</i>	1,9				
<i>vrgG</i>	1,7				

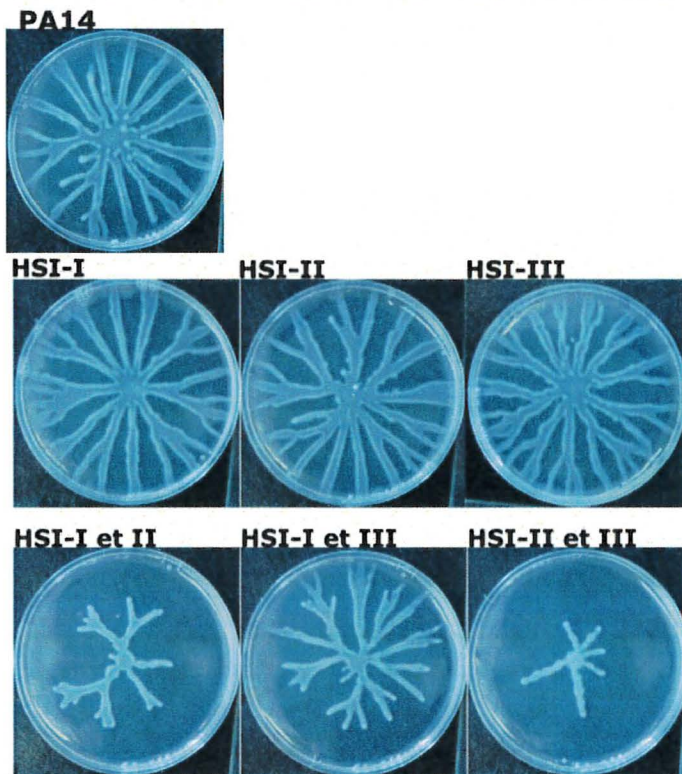


Figure 1.11 Motilité de type *swarming* des mutant HSI

Motilité de *swarming* de PA14 et des doubles mutants HSI. Laboratoire Déziel

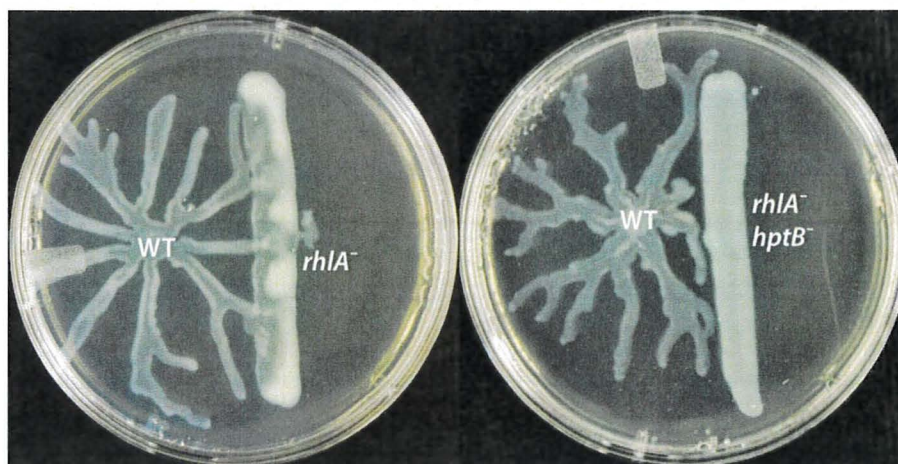


Figure 1.12: Éloignement de PA14 par $\Delta hptBrhIA^-$

Motilité de type *swarming* de la souche PA14(WT) lorsqu'elle rencontre un mutants $rhIA^-$ et un mutant $\Delta hptBrhIA^-$. La souche sauvage a été inoculée sur un hémisphère de la gélose (un volume de 5 μ l a été déposé) alors que les souches $rhIA^-$ et $\Delta hptBrhIA^-$ ont été étalées à l'autre hémisphère de la gélose à l'aide d'un écouvillon. La production de HAA entraîne un éloignement de PA14. Or, les dendrites de PA14 peuvent rencontrer un mutant $rhIA^-$ qui ne produit plus de HAA. L'addition de la mutation $\Delta hptB$, créant un mutant $\Delta hptBrhIA^-$, ramène cet effet d'éloignement mais ce n'est pas dû à la production de HAA. Figure réalisée par Julien Tremblay du Laboratoire Déziel.

2 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTÈSE

2.1 Problématique

Les bactéries sont capables de s'adapter aux différents environnements. Certaines conditions environnementales favorisent la vie sessile sous forme de biofilms alors que d'autres conditions favorisent le mode de vie planctonique (motilité). Afin de permettre aux bactéries de s'adapter aux conditions changeantes, elles ont développé différents systèmes de régulation tels que les systèmes à deux composants qui permettent cette adaptation rapide.

Selon les différents signaux environnementaux, les bactéries peuvent être en mode motile où elles vont se déplacer dans leur environnement. Ceci leur permettra de coloniser de nouveaux environnements potentiellement plus adaptés à leur mode de vie. Elles peuvent utiliser plusieurs modes de déplacement, selon le fait qu'elles soient en surface (solide ou semi-solide) ou en milieu liquide utilisant différents appareils cellulaires (tel que le pilus de type IV ou le flagelle). Une de ces motilités est la motilité de groupe de type *swarming* permettant aux bactéries de se déplacer sur une surface semi-solide tout en coordonnant leur mouvement.

La motilité de type *swarming* requiert la production d'un flagelle fonctionnel et de rhamnolipides. Des mutants n'ayant pas ces deux éléments ne peuvent pas se déplacer par ce type de mouvement. Le mutant $\Delta hptB$ possède ces deux éléments. Malgré tout, ce mutant ne peut pas se déplacer en motilité de type *swarming*. Manifestement, d'autres facteurs requis pour la motilité de type *swarming*, encore inconnu à ce jour, sont nécessaires.

Ainsi, étudier ce mutant permettra de mieux comprendre les éléments inconnus nécessaires à la motilité de type *swarming*. Étant donné que ce mutant est dans un gène touchant la régulation entre le mode de vie sessile et motile, celui-ci régule indirectement la motilité de type *swarming* et donc contrôle potentiellement le critère recherché (facteur inconnu). Sachant que le mutant $\Delta hptB$ surexprime les SST6, ces systèmes pourraient être potentiellement des facteurs qui contrôlent la motilité de type *swarming*.

2.1 Hypothèse

En plus d'un flagelle fonctionnel et de la production d'un agent tensioactif, il existe d'autres facteurs permettant la motilité sociale de type *swarming* chez *P. aeruginosa*. Le défaut de motilité de type *swarming* du mutant $\Delta hptB$ dépend justement de facteurs inconnus nécessaires au *swarming*. Ces fonctions inconnues seraient liées au SST6, qui permettraient la reconnaissance de soi entre cellules bactériennes lors du *swarming*.

2.2 Objectif général

Le but de ce projet est de déterminer quelles sont les facteurs inconnus nécessaires à la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*.

2.2.1 Objectif 1

Caractériser le défaut de motilité de type *swarming* du mutant $\Delta hptB$ (Chapitres 3 à 6)

2.2.2 Objectif 2

Déterminer le rôle des SST6 dans la motilité de type *swarming* (Chapitres 7-8)

3 ARTICLE 1: SWARMING MOTILITY GROWTH FAVORS THE EMERGENCE OF A SUBPOPULATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA QUORUM SENSING MUTANTS

Sophie Robitaille, Marie-Christine Groleau and Eric Déziel*

INRS-Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval (Québec), Canada.

Journal: Environmental Microbiology

Soumission: 23 Janvier 2020

Acceptation: 22 avril 2020

DOI: 10.1111/1462-2920.15042

Contributions de auteurs:

J'ai réalisé la mise en place et les expériences, ainsi que l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit. Marie-Christine Groleau a réalisé deux expériences et participé à la rédaction de l'article. Le Pr Éric Déziel a contribué à la mise en place des expériences, l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

Les données supplémentaires sont en annexe A (**Section 11**)

3.1 Résumé en français

La bactérie *P. aeruginosa* se déplace en utilisant divers types de locomotion afin de coloniser plusieurs environnements. L'un d'eux est la motilité de type *swarming* qui se compose d'un mouvement coordonné sur une surface semi-solide. La bactérie doit alors produire un flagelle fonctionnel et produire des rhamnolipides qui permettent ainsi un déplacement multicellulaire coordonné d'une population. Le mutant $\Delta hptB$, codant pour une protéine participante au système de régulation Gac/Rsm, produit des rhamnolipides et un flagelle fonctionnel, mais possède un important défaut dans sa motilité de type *swarming*. Une évolution dirigée en condition *swarming* fut réalisée sur ce mutant pour sélectionner des clones évolués avec des mutations compensatoires. Le but était de découvrir des gènes qui sont responsables du défaut dans la motilité de type *swarming*. Étonnamment, une sous-population a émergé de cette évolution avec une mutation dans le régulateur LasR. Ce gène code pour un facteur de transcription qui participe au système de QS. De plus, dans une évolution dirigée de la souche sauvage dans les mêmes conditions, des mutants dans le gène *lasR* émergent et composent la majorité de la population. La population résultante, majoritairement composée de mutants *lasR*⁻, est avantagée en condition *swarming* par rapport à une population non évoluée. Nos résultats démontrent qu'un phénotype social, tel que la motilité de type *swarming*, favorise l'émergence de mutant avec un système de QS déficient et que cela contribue au profit de toute la population.

3.2 Summary

Pseudomonas aeruginosa exploits several types of motility behaviors to colonize diverse environments. One of these is swarming motility, a coordinated group movement on a semi-solid surface. This bacterium needs to express a functional flagellum and produce rhamnolipids to display this type of social motility. A $\Delta hptB$ mutant, a gene part of the Gac/Rsm signaling pathway, produces rhamnolipids and expresses a functional flagellum but has an important swarming defect. Experimental directed evolution was performed on this mutant under swarming conditions to obtain compensatory mutations and thus identify genes responsible for its deficient swarming phenotype. Unexpectedly, a gain-of-function subpopulation emerged from this evolution with mutations in *lasR*, which codes for a key quorum sensing transcriptional regulator. Furthermore, we found that *lasR*⁻ mutants even emerge at high frequencies in the wild-type strain when using the same experimental evolution strategy. The resulting evolved population, largely composed of LasR-defective mutants, is fitter than the original strain in swarming motility. We also established that *lasR*⁻ mutants have a growth advantage under swarming conditions when compared to wild-

type. Our results demonstrate that a social phenotype, i.e. swarming motility, favors the emergence of mutants deficient in a quorum sensing regulatory pathway to the benefit of the whole population.

3.3 Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a versatile Gram-negative bacterium exploiting different types of motilities to colonize its environment. One of them is a social coordinated movement of the population observed on a soft surface called swarming motility (Kearns, 2010). Swarming requires a functional flagellum and the release of surface-active molecules (surfactant). The rotation of the flagella provides power to propel the cells while the surfactant acts as a wetting agent reducing the surface tension, permitting rapid cellular movement on a surface (Kearns, 2010). Rhamnolipids are surfactants produced by *P. aeruginosa* (Jarvis & Johnson, 1949; Ochsner *et al.*, 1994). It is composed of a mixture of three types of molecules: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) free, or linked to one (mono-rhamnolipids) or two (di-rhamnolipids) rhamnose moieties (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Rhamnolipids are the end-product of enzymes RhIA, RhIB and RhIC encoded by the *rhlAB* operon and *rhlC* gene (Caiazza *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003; Ochsner *et al.*, 1994). All are required for the formation of migrating tendrils typical of the swarming of *P. aeruginosa* (Tremblay *et al.*, 2007). Rhamnolipid production is under the control of quorum sensing in *P. aeruginosa*. This bacterium has two hierarchical quorum sensing systems assessing cell density through the release of acyl-homoserine lactone signals. The *las* system is considered the initiator of the quorum sensing regulatory network and consists of the transcriptional regulator LasR and of the LasI synthase producing the cognate signaling molecule *N*-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) (Juhas *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 1994; Seed *et al.*, 1995). The *rhl* system is activated by LasR and is composed of the regulator RhIR and the *N*-butanoyl-homoserine lactone synthase (C₄-HSL) synthase RhII (de Kievit *et al.*, 2002; Ochsner & Reiser, 1995; Winson *et al.*, 1995). RhIR directs the transcription of the *rhlAB* operon and thus production of rhamnolipids (Ochsner *et al.*, 1994; Ochsner & Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997).

Swarming motility is also regulated by the post-transcriptional regulator RsmA through the two-component system GacS/GacA (Heurlier *et al.*, 2004b). Two-component systems permit the relay of external signals through a phosphorylation cascade allowing the activation or repression of genes necessary for the adaptation of bacteria in response to their environment (Hoch & Varughese, 2001b). This specific system regulates the transition between the motile and sessile

modes of growth in *P. aeruginosa* (Goodman *et al.*, 2004a; Goodman *et al.*, 2009a; Jean-Pierre *et al.*, 2017). HptB, a histidine-containing phosphotransfer domain protein (Hsu *et al.*, 2008), regulates GacA and indirectly the transcription of *rsmZ*, depending on the environmental conditions (broth vs surface growth) (Jean-Pierre *et al.*, 2017). The small RNA RsmZ inhibits the activity of RsmA at the post-translational level (Heurlier *et al.*, 2004b).

A $\Delta hptB$ mutant has a severe defect in swarming but still possesses a functional flagellum and produces rhamnolipids (Hsu *et al.*, 2008; Jean-Pierre *et al.*, 2017). We thus wanted to identify the missing element(s) disturbing the swarming motility of this mutant. We performed a directed evolution on $\Delta hptB$ to select for gain-of-function mutants displaying a restored swarming phenotype, similar to the wild-type. We observed the rapid emergence of *lasR*⁻ mutants through the evolution. Surprisingly, the same phenomenon also occurred when wild-type *P. aeruginosa* was experimentally adapted by the same procedure. The emergence of *lasR*⁻ mutants and takeover of *P. aeruginosa* populations are well known to occur over time in the lungs of individuals with cystic fibrosis chronically infected with this opportunistic pathogen (Smith *et al.*, 2006), or under specific culture conditions where this quorum sensing system controls the production of shareable metabolites necessary for growth (Sandoz *et al.*, 2007). In these cases, LasR-deficient mutants are considered «cheaters»; bacteria that cannot produce the quorum sensing signal or cannot respond to it but can benefit from the production of «public goods» by the other members of the population (Diggle *et al.*, 2007).

We hypothesized that *lasR*⁻ mutants are favoured in a swarming population, explaining their emergence. We established that, at least under our conditions, *lasR*⁻ mutants have a fitness benefit over the wild-type. This advantage does not seem to be the result of faster growth or takeover of the wild-type's public goods production. Nevertheless, we were able to determine that the evolved population, mostly composed of LasR-deficient mutants, can take over the swarming population and that the population as a whole benefited from their presence.

3.4 Experimental procedures

3.4.1 Bacterial strains and culture conditions

Strains (**Table S1**) were derived from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Lee *et al.*, 2006). The $\Delta hptB$ mutant has been previously made using pJT39 (Jean-Pierre *et al.*, 2017). The mutated $\Delta hptB$ fragment was transferred into pEX18Ap (pFJP17). The $\Delta hptB$ mutation was then

transferred to PA14 *lasR*::Gm (Déziel *et al.*, 2004) to create the $\Delta hptB$ *lasR*::Gm double mutant as described previously using a pEX18Ap- $\Delta hptB$ (pFJP17) (Jean-Pierre *et al.*, 2017).

The bacteria were routinely grown in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco) at 37°C in a TC-7 roller drum (New Brunswick) at 110 rpm. For swarming motility, 0.5% Bacto-agar (Difco) M9DCAA plates (92 mm x 16 mm (Sarstedt) unless otherwise specified) were prepared as previously described (Tremblay & Déziel, 2008). The plates were incubated at 34°C for 20h in plastic bag, unless otherwise specified. The OD₆₀₀ were measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Pictures were taken using a Lumix DMC-ZS60 camera (Panasonic). The contrast of the picture was not changed except for **Figure 3.1D** where the contrast was increased and **Figure 3.2D** has its saturation increased to have a better interpretation of the blue pigment using GIMP 2.10. All graphic and statistics were done using Prism6 (Graph Pad).

3.4.2 Experimental evolution

Strains PA14 or its isogenic $\Delta hptB$ mutant were inoculated at the center of four swarming plates from four independent cultures at OD₆₀₀ = 3. The plates were incubated 48h at 34°C in plastic bags. After incubation of the initial swarming plates, tendrils were harvested using a cotton-tipped applicator (Fisher) and resuspended in 1 ml sterile PBS by vortexing. The suspension was adjusted to an OD₆₀₀ = 1.00. Five μ l of this suspension was used to inoculate a new swarming plate. Suspension samples were kept at -80°C in 15% glycerol. Transfers were repeated until the wild-type swarming pattern of PA14 was recovered or a change in swarming was observed. When necessary, clones were isolated on Miller's LB agar (Alpha Biosciences) and incubated at 37°C. Each experiment was performed at least three times. For PA14, 48h experimental evolutions, larger plates (150 mm x 20 mm (Sarstedt)) were used. At each transfer, bacterial cells from the tip of tendrils and the swarming center were suspended and kept at -80°C as previously described. The estimation of the proportion of *lasR* mutants was done as described previously with modifications (Sandoz *et al.*, 2007). Suspended cells were diluted and plated on LB agar to obtain isolated clones. One hundred clones from tendrils and center for each lineage were picked and inoculated on a 1.5 % Tryptic Soy agar (TSA, AlphaBiosciences) containing 1.5 % skim milk, and incubated overnight at 30°C. Colonies that failed to degrade casein (formation of a clearing halo around the colony) were counted as *LasR*-defective clones. The calculated percentages of potential *lasR* mutants are the result of three experiments.

For experimental evolution in a liquid condition, four overnight cultures of PA14 and $\Delta hptB$ from TSB were inoculated in liquid M9DCAA medium at OD₆₀₀=0.05 and incubated at 34 °C in a TC-7

roller drum (New Brunswick). The cells were transferred every 48h in a fresh medium at an $OD_{600}=0.05$. The experience was done twice.

3.4.3 Sequencing of the genomic DNA

The four replicates of the fourth passage of the 48h $\Delta hptB$ experimental evolution from the second essay were prepared for sequencing. Clones from the tendrils of the evolved population were isolated on LB agar. The swarming of the individual clones was tested. One clone was picked from each replicate and sent for sequencing.

Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Genomic DNA of the wild-type PA14 and PA14 $\Delta hptB$ were also extracted. The samples were sent to Génome Québec Innovation Center (McGill University, Montreal, Canada) for sample preparation and sequencing using a half lane of MiSeq PE250 (Illumina). The C1 and C3 clones have 2,276,330 and 2,912,050 reads each covering a 6M bp genome. The sequences were trimmed using Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) and quality analyzed by FastQC (Andrews ; Ewels *et al.*, 2016). The assembly was done by SeqMan NGen (DNASTar, Lasergene) using *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (NCBI:txid208963) genome as the reference. The results were then analyzed using SeqMan Pro and Array Star (DNASTar, Lasergene). Mutations were confirmed by PCR amplification (**Section 11.1-Annexe A-Tableau 11.2**) of the genes of interest and the purified PCR fragments were sent to Institut de Recherches Cliniques de Montréal (Montréal, Canada) for Sanger sequencing.

3.4.4 Sequencing of the *lasR* gene

To confirm the presence of the mutations, the *lasR* gene was amplified by PCR using primers lasR-F and lasR-R (Table S2). The PCR product was ligated into pEASY-T1 (TransGen Biotech) and was sent to Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM, Montréal, Canada) for Sanger Sequencing.

3.4.5 Quantification of 3-oxo-C₁₂-homoserine lactone

Three sub-cultures of the bacteria were inoculated from three independent pre-cultures in 6 ml modified M9 medium with dextrose and casamino acids (M9DCAA) (Tremblay & Déziel, 2008) at $OD_{600} = 0.05$. The cultures were incubated at 34°C in a TC-7 roller. Quantification of 3-oxo-C₁₂-HSL was performed as previously described (Lépine *et al.*, 2018). At 3.5h, 7h, 9h, and 12h, 480 µl of culture were sampled. The OD_{600} was measured and 120 µl of methanol containing 12 ppm

of 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-D4) was added to each sample. Injections were performed on a high-performance liquid chromatograph (Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) using a Kinetex C8 column (Phenomenex) equipped with a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters) in positive electrospray mode (Déziel *et al.*, 2005). The measurements were performed twice with similar results.

3.4.6 Production of pyocyanin

The bacteria were grown in King's A medium to determine their pyocyanin production (King *et al.*, 1954). Briefly, clones from frozen stock were inoculated in King's A liquid medium and incubated overnight with shaking in a TC-7 roller drum (New Brunswick) at 37°C.

3.4.7 Growth on casein agar

Growth on casein was performed as previously described, with some modifications (Chen *et al.*, 2019; Dandekar *et al.*, 2012). Strains were inoculated in LB medium from frozen stocks and incubated overnight in a TC-7 roller drum at 37°C. The bacteria were then spotted on casein agar and incubated overnight at 37°C.

3.4.8 Growth curves

PA14 and *lasR*::Gm mutant were cultured in modified M9DCAA medium. Overnight cultures were diluted at $OD_{600} = 0.05$ in fresh media and 200 μ l was transferred to in three wells of an Honeycomb 2 multiwell plate per condition (Oy Growth Curves Ab Ltd). The plate was incubated in a Bioscreen C apparatus (Oy Growth Curves Ab Ltd) at 34°C with 10 seconds shaking before measurements every hour for 24h. The experiment was done three times with similar results.

3.4.9 Growth on 1.5% agar modified M9DCAA medium

PA14 and *lasR*::Gm mutant were grown to $OD_{600} = 0.5$ (exponential phase in a TC-7 roller drum at 37°C. An aliquot was sampled and used for colony-forming unit (CFU) counts using the drop plate method. The serial dilutions were plated on LB agar and incubated 24h at 30°C. Seven spots of 5 μ l were inoculated on a 1.5% agar M9DCAA medium for each replicate and plates were incubated at 34°C. At 0h, 12h, 18h, 24h, 36h, 42h, 48h and 72h a colony was removed from the plate using a cotton-tipped applicator and bacteria suspended in a tube containing PBS and glass beads. Cells were resuspended by vortexing. An aliquot of 200 μ l was used for CFU counts. Four independent replicates were done, and the experience was performed twice.

3.4.10 Fitness in swarming

PA14::*gfpmut3* was obtained through the electroporation of pUC18-mini-Tn7*gfpmut3*-Gm in PA14, as described previously (Choi & Schweizer, 2006). The selection was done on LB agar plates containing 50 µg/ml gentamicin. PA14::*gfpmut3* and *lasR*::Gm mutant were grown to an OD₆₀₀ = 3 (early stationary phase) in a TC-7 roller drum at 37°C. The OD₆₀₀ was adjusted to 3.0 using PBS and CFU count was done (**Fig. 11.7A**). PA14::*gfpmut3* was mixed to *lasR*::Gm mutant at a 1:1 ratio. The mix was inoculated at the center of a swarming plate as described above. The plates were incubated 20h at 34°C in plastic bags. Tendril and swarming center cells were sampled and suspended in 2 ml PBS with glass beads. An aliquot was taken for CFU counts. The plates were imaged with a Typhoon (GE Healthcare Life Science) with JH3 filter to detect GFP-producing colonies. Total counts and fluorescent colonies counts were done. Four independent replicates were performed, and the experiment was done twice.

To evaluate the fitness of the evolved population compared to the original strain, four cultures of PA14::*gfpmut3* and mixed tendril population from the four lineages of PA14 evolution at the ninth passage were grown to an OD₆₀₀ = 3.0 at 37°C. CFU was measured as previously described on each culture (**Fig. 11.7B**). Each culture of PA14::*gfpmut3* was then mixed with each culture from each lineage at a 1:1 ratio. The mix was inoculated on swarming plates, which were incubated 20h at 34°C in plastic bags. The CFUs counts were performed as described above using a Typhoon to distinguish PA14::*gfpmut3* colonies and *lasR*::Gm mutant colonies.

3.4.11 Emergence of *lasR* mutants in a swarming colony

PA14 swarming plates were prepared as previously described. Six plates were inoculated from three independent PA14 cultures. At 24h and 48h the bacterial cells from the swarming center and the swarming tendrils from three plates (one for each replicate) were recovered and plated. Exactly 100 colonies were tested for their proteolytic activity on skim milk agar as described above. The experiment was performed three times.

3.4.12 Swarming phenotype of evolved clones from $\Delta hptB$ evolution through the different transfers

The swarming phenotype of $\Delta hptB$ was performed by choosing 20 clones of each transfer of third and fourth lineage isolating on LB agar as previously described. Clones were inoculated in TSB and incubated overnight at 37 °C as previously described. A volume 1mL of culture was washed

with PBS and dilute to $OD_{600nm}=1.00$. A volume of $5\mu l$ was inoculated on a swarming plate and swarming was performed as previously described.

3.5 Results:

3.5.1 Restoration of the swarming motility of an $\Delta hptB$ mutant through directed evolution

We wanted to determine if it is possible to restore the swarming phenotype of a $\Delta hptB$ mutant of *P. aeruginosa* using experimental evolution. This mutant has a functional flagellum and produces rhamnolipids, the two known required functions to achieve swarming motility, but nevertheless shows a deficient swarming phenotype, with only very short tendrils after 20h of incubation (**Fig. 3.1A**) (Jean-Pierre *et al.*, 2017). We hypothesized that the presence of some residual swarming in this mutant is the result of a strong adaptive pressure towards a beneficial swarming phenotype and that some compensatory mutations were restoring swarming towards wild-type pattern. These mutations would thus help identify additional key functions important for swarming motility and explain the swarming defect in the mutant. To achieve this, bacteria sampled from the tip of tendrils were used to inoculate fresh swarming plates. After only three transfers on fresh swarm plates, evolved populations derived for the $\Delta hptB$ mutant were able to cover the plates as efficiently as the wild-type (**Figs. 3.1B and 11.1**). The same phenomenon was repeatedly observed in three independent experiments. For each transfer, a fresh culture of PA14 was also inoculated as a control. When parallel transfers were performed in liquid cultures using the same medium without agar, we observed no restoration of swarming in the $\Delta hptB$ mutant after four passages (**Fig. 11.2**). The adaptation was therefore specific to growth on a surface.

3.5.2 The evolved population is a mix of two phenotypes

We isolated individual clones from the fourth transfer for every four lineages in one of the three experiments. The $\Delta hptB$ clones isolated were individually tested for their swarming abilities. Interestingly, two distinct swarming phenotypes were observed among the swarming clones (**Fig. 3.1C**). It is the mix of these two phenotypes that causes the swarming pattern obtained through evolution, as observed at T4 in **Figure 3.1**. We looked at the evolution of phenotypes from two of the four lineages (lineages 3 and 4) and calculated the percentages of each possible phenotype (wild-type swarming phenotype, $\Delta hptB$ -like phenotype, and phenazine blue-producing phenotype) for 20 clones at each of four transfers. We noticed that the proportion of clones displaying the

ΔhptB phenotype was falling below 5% (0/20) after the fourth transfer (**Tableau 11.3**), suggesting rapid adaptation and replacement of the population through acquisition of secondary mutations.

The first type of swarming clones (exemplified by C1 and C3 in **Fig. 3.1C**) is characterized by the overproduction of a blue pigment (likely pyocyanin) and has an intermediate swarming phenotype while the second type of gain-of-function clones (such as C2 and C4) is characterized by a fully recovered swarming pattern, allowing rapid covering of the whole plate (**Fig. 3.1C**) .

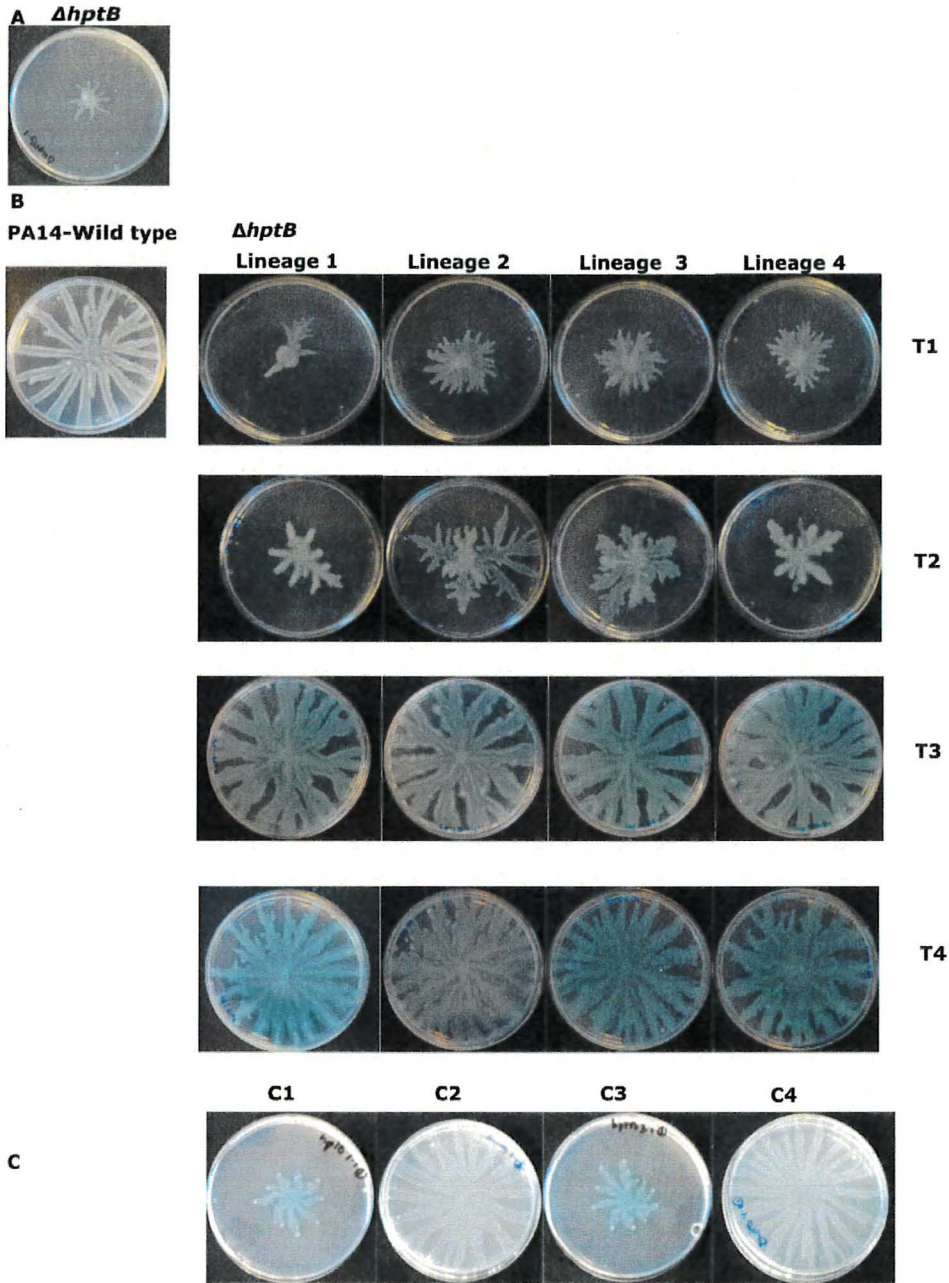


Figure 3.1. Recovery of the swarming motility phenotype of the $\Delta hptB$ mutant of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 following experimental evolution

(A) Swarming of the $\Delta hptB$ mutant after 20h of incubation. (B) Experimental evolution of four parallel lineages in swarming conditions. Bacteria were passaged every 48h. One clone from each lineage was selected for whole-genome sequencing. (C) Swarming phenotype of the sequenced clones are aligned with the lineage they have been isolated from.

3.5.3 Clones C1 and C3 have acquired *lasR* mutations

To identify potential mutations, the genomic DNA of the four clones shown in **Figure 3.1C** was extracted and their sequences acquired. Not surprisingly, considering the two different observed gain-of-function patterns, we found mutations in genes involved in two distinct regulatory pathways. Focusing here on C1 and C3 (clones C2 and C4 will be the subject of a separate report; Robitaille and Déziel, unpublished), we found point mutations in the *lasR* gene in both clones. The mutations were, for C3, a G-to-A nucleotide change causing a stop codon at position 81 of the protein sequence and a T-to-A change in C1 clone causing an asparagine to isoleucine change at position 209 on the protein (N209I) (**Fig. 11.3** and **Table 11.4**). C1 also has a 43 bp deletion in another gene, *dppA3* (PA14_58390), which encodes a substrate-binding protein related to an ABC transporter. Note that a mutant for *ddpA3* in the wild-type background showed no effect on the swarming phenotype (**Fig. 11.4**). Clone C1 ($\Delta hptB$ with mutations in both *lasR* and *dppA3*) displays the same swarming phenotype as the C3 clone with a mutation in *lasR* only (besides the initial $\Delta hptB$ deletion), as well as the $\Delta hptB$ *lasR*::Gm double mutant (**Fig. 3.2A**).

To confirm that *lasR* mutations in C1 and C3 lead to a defective or absent LasR regulator, we verified some LasR-dependant phenotypes such as the production of 3-oxo-C₁₂-HSL, the ability to produce exoproteases and the production of pyocyanin in King's A medium. We observed a minimal zone of clearing on skim milk agar plates and no growth on casein agar (**Fig. 3.2C-E**) compared to PA14, confirming a defective LasR function. Accordingly, the clones also overproduced pyocyanin in King's A medium like the *lasR*::Gm and $\Delta hptB$ *lasR*::Gm mutants (**Fig. 3.2D**). Furthermore, both clones have a major defect in the production of 3-oxo-C₁₂-HSL, compatible with a defective LasR, but with some residual activity that reaches wild-type production at OD₆₀₀=2.5 (**Fig. 3.2B**). This residual activity can also be noticed on the skim milk plates.

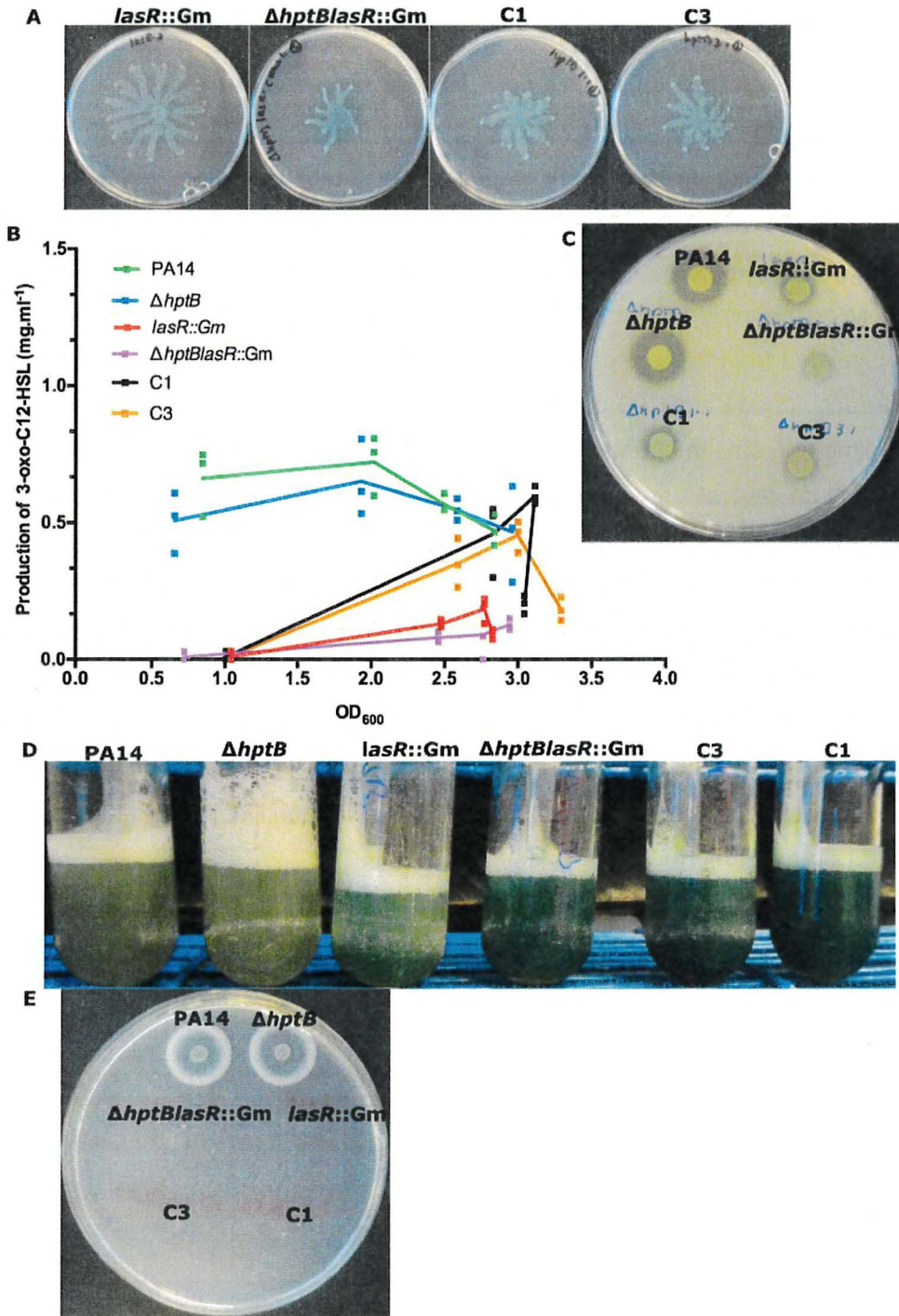


Figure 3.2. Phenotype of the two swarming evolved $\Delta hptB$ mutants with a gain-of-function and a secondary mutation in *lasR*

(A) Swarming of evolved clones C1 and C3 vs *lasR*-null and double $\Delta hptBlasR::Gm$ mutants. For each strain, (B) the 3-oxo-C₁₂-HSL production was quantified from liquid cultures between 0 and 12h and (C) the casein degradation activity (proteolysis) was tested on TSA skim milk plates. Also, the strains were tested for their (D) pyocyanin production in King's A and (E) capacity of growth on casein agar.

3.5.4 Emergence of *lasR*⁻ variants in wild-type PA14 under swarming conditions

We hypothesized that the swarming defect of $\Delta hptB$ actually favored the uncovering of *lasR*⁻ mutants in the swarming population. We thus performed a similar experimental evolution on the wild-type PA14 strain. To mimic the conditions used for the $\Delta hptB$ evolution, which has an important defect in swarming, we used larger Petri dishes to prevent that bacterial cells reach the edge of the plate before sampling, and thus avoiding back-and-forth cell movements along the tendrils. Unexpectedly, an overproduction of pyocyanin was evident from the fourth passage (**Fig. 3.3A**). Clones were isolated from the center of swarming colonies and the tips of the tendrils at every transfer from each lineage and 100 colonies were inoculated on skim milk agar for each transfer to determine the percentage of potential *lasR*⁻ mutants (which do not degrade casein). At transfer 4, the percentage of *lasR*⁻ mutants drastically increased correlating with the strong pyocyanin production (**Fig. 3.3B-C**), a feature of LasR-deficient mutants. The percentage of *lasR*⁻ mutant was calculated from three independent experiments. Importantly, the proportion of LasR-deficient clones stabilized from transfer 6 onward at about half the whole population. Several randomly selected clones having a *lasR*⁻ phenotype were further tested for the production of 3-oxo-C₁₂-HSL, production of exoproteases (degradation of casein and growth on casein) and pyocyanin production in King's A medium. As expected, all the clones displayed phenotypes indicative of a LasR activity defect, and this was confirmed by the identification of mutations in the *lasR* gene (**Fig. 11.5 and Tableau 11.5**).

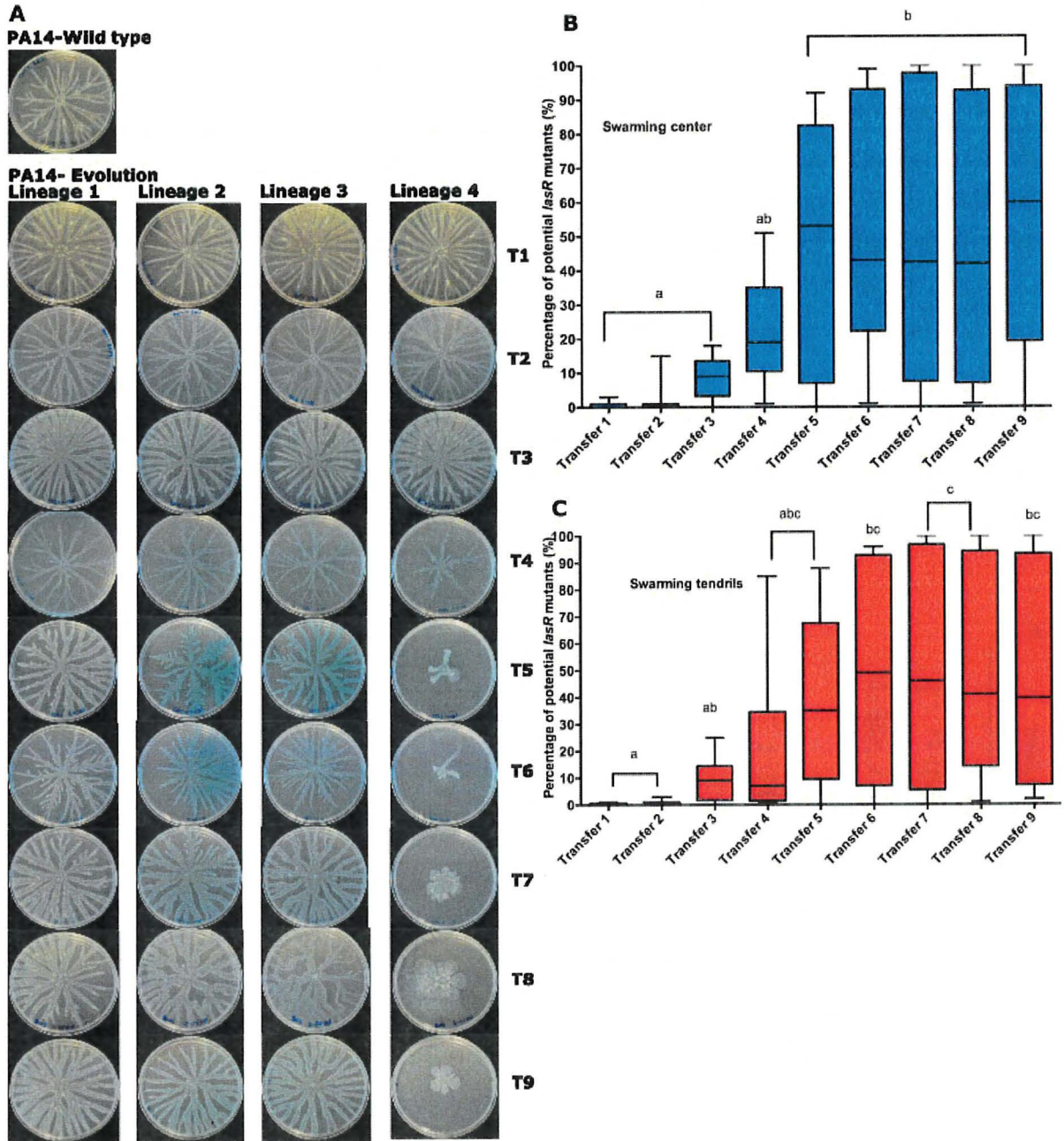


Figure 3.3. Experimental evolution in swarming conditions of *P. aeruginosa* PA14 wild-type strain

(A) Plates on four parallel lineages were passaged every 48h. The proportion of LasR-deficient clones was assessed on TSA skim milk plates from the (B) swarming centers and the (C) swarming tendrils in each lineage from nine consecutive passages. The swarming center and tendrils are not significantly different using two-way ANOVA. The statistics used to compare every passage for swarming center and tendrils separately is one-way ANOVA with $P < 0.05$. Bars sharing the same letter are not significantly different from each other.

3.5.5 A *lasR* mutant is more competitive under swarming conditions

To understand why the swarming population seemed to derive an adaptive benefit of having a large proportion of LasR-defective mutants, we first verified whether LasR-deficient clones just survive longer under swarming conditions. However, there was no accumulation of *lasR* mutants in a swarming colony incubated without transfer for 48h (**Fig. 11.6**). We then investigated whether a *lasR* mutant would be more competitive under swarming conditions by inoculating a swarming plate with a 1:1 ratio of PA14::*gfpmut3* and isogenic *lasR*::Gm mutant. After 20h of incubation, the centers of swarming colonies and tips of tendrils were independently recovered, and the ratios wild-type:mutant were determined. We indeed observed that the proportion of *lasR*::Gm mutant was increased in the mixed population (**Fig. 3.4**), even more prominently at the tip of tendrils (**Fig. 3.4A**), even though such mutants produce a smaller swarming colony when grown independently (**Fig. 3.2A**).

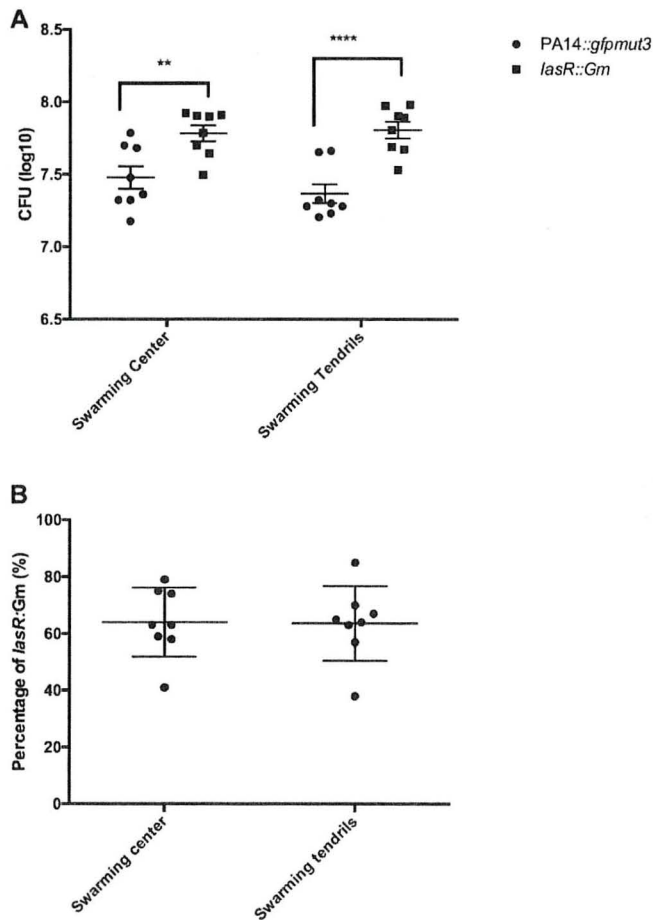


Figure 3.4. A *lasR*-null mutant is advantaged in swarming population

Colony forming unit of the PA14::*gfpmut3* and *lasR*::Gm mutant were enumerated from the edge of tendrils and colony centers of a swarming colony inoculated in a 1:1 initial ratio. (A) The fluorescent colonies and total colonies were counted. Statistical comparison performed with a two-way ANOVA **<0.01, ****<0.0001. (B) The percentage of *lasR*::Gm mutants over the total number of bacteria was determined from mixed population swarming colonies.

3.5.6 *LasR*-defective mutants do not have a metabolic advantage under swarming conditions

To explore why the mutant has a competitive benefit, we asked whether this could simply be explained by better growth, for instance, because of some metabolic advantage. Since *lasR*⁻ mutants were previously shown to have a metabolic advantage in other conditions (D'Argenio *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2016), we hypothesized that *LasR*-defective mutants could be energetically favored when growing under swarming conditions. First, we compared the growth of PA14 and its isogenic *lasR*::Gm mutant in liquid M9DCAA media at 34°C. Mutant *lasR*::Gm displays a growth pattern slightly different from the wild-type, but nothing that would account for its competitive advantage in swarming growth (**Fig. 3.5A**). However, considering that *P. aeruginosa* does not behave the same in liquid conditions vs swarming conditions, a growth difference in liquid does not necessarily translate in solid condition (Overhage *et al.*, 2008). Since *lasR*::Gm produces lower concentrations of rhamnolipids (Dekimpe & Déziel, 2009), its swarming phenotype is deficient which decreases the total biomass of a swarming colony (Köhler *et al.*, 2000). Since swarming colonies contain more bacterial cells than non-swarming colonies, it is not possible to compare colony-forming units (CFU) of swarming strains that do not behave similarly (Xavier *et al.*, 2011). To overcome this limitation, we performed a growth curve on solid media comparing colonies on M9DCAA solidified with 1.5% agar, by comparing total CFUs of strain PA14 and its *lasR*::Gm mutant. No growth advantage of *lasR*::Gm under these conditions was obtained (**Fig. 3.5B**). We conclude that *LasR*-defective mutants did not emerge in swarming colonies because of a growth advantage.

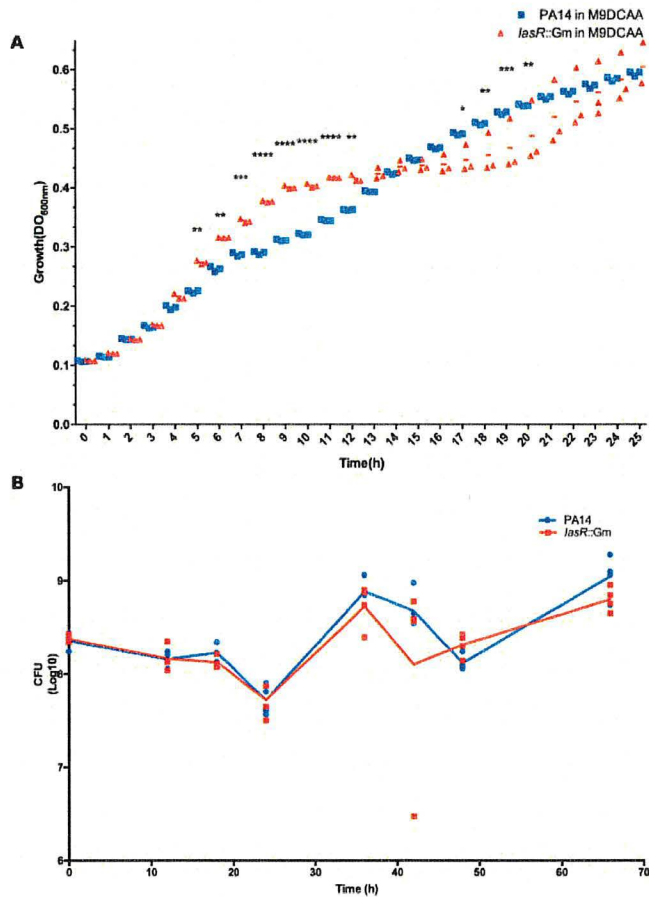


Figure 3.5. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and its *lasR*-null mutant

(A) PA14 and isogenic *lasR*::Gm mutant were grown in M9DCAA medium with a Bioscreen and growth was assessed by OD₆₀₀ measurements and (B) by CFU counting on 1.5% agar M9DCAA plates. The comparison was analysed with a two-way ANOVA; * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 , **** <0.0001 .

3.5.7 The evolved population has better fitness in swarming

Since LasR-defective clones are prevalent in evolved swarming colonies, we looked at the benefit for the whole population to contain these mutants. We hypothesized that the emergence of such mutants is not just through a specific selfish advantage of the mutant but rather as a contribution to the fitness benefit of the whole population. To test this hypothesis, a swarming-evolved population was mixed 1:1 with a GFP-labelled original PA14 strain and inoculated on a swarming agar plate. After 20h, we counted the CFUs at the tips of the tendrils and the center of the swarming colony. We calculated the number of fluorescent (original PA14) and non-fluorescent colonies (evolved population) and determined the fitness of each group under swarming conditions (**Fig. 3.6A**). The proportion of bacteria from the evolved population compared to the total number of cells was between 74% and 98% in both swarming centers and tendrils, while it

was accounting for only 50% in the inoculum, revealing a better fitness under swarming conditions (Fig. 3.6B).

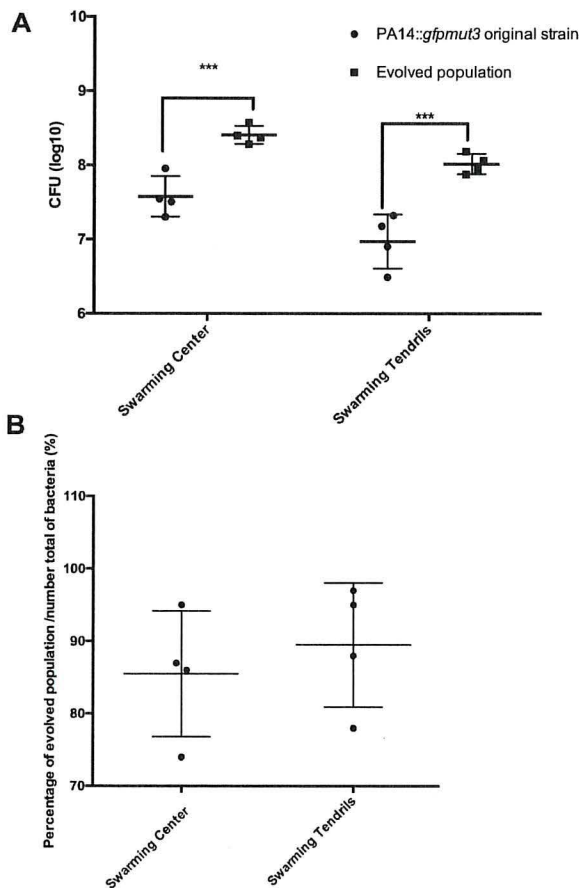


Figure 3.6. Fitness of the evolved population when mixed with the original PA14::gfpmut3 in a 1:1 initial ratio.

(A) The colonies forming unit count of both populations were done from the edge of the tendrils and swarming center. Comparison based on a two-way ANOVA ****<0.0001. (B) The percentage of evolved population over the total number of bacteria cells was determined.

3.6 Discussion

We report the rapid emergence and adaptive benefits of quorum sensing mutants of *P. aeruginosa* under swarming conditions, a form of cooperative behaviour. Importantly, such mutants do not emerge in the wild-type or $\Delta hptB$ backgrounds in the same culture medium (M9DCAA) under conditions that are non-permissible to swarming, i.e. on solid media using a higher percentage of agar (data not shown) or in liquid conditions (no agar). Indeed, both the wild-type PA14 and its isogenic $\Delta hptB$ retained their original swarming phenotype after many passages in liquid cultures. Pyocyanin is a well-known blue pigment produced by *P. aeruginosa* and its

production is quorum sensing-controlled. LasR regulates RsaL, a repressor of the *phz* genes responsible for pyocyanin production, and a *lasR*- mutant thus overproduces pyocyanin under certain conditions (Diggle *et al.*, 2003; Rampioni *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2011). Swarming colonies with a high proportion of LasR-deficient mutants indeed resulted in visible overproduction of pyocyanin.

It should be mentioned here that we also confirmed the emergence of LasR-deficient clones under swarming conditions with other *P. aeruginosa* strains besides PA14: strain ATM0068-19 (Wolter *et al.*, 2013) and strain 57SP (DÉziel *et al.*, 1996). After only three transfers under the same conditions, both strains had a significant proportion of LasR-deficient clones (data not shown) in their swarming colonies, supporting the hypothesis that acquisition of such mutants is generally beneficial to a swarming population. The mixed evolved population took over the swarming colony in both tendrils and swarming centers. To carry a large proportion of LasR-defective mutants appears to provide a survival advantage to the evolved population. The emergence of *lasR*⁻ mutants, obtained through an evolution experiment in biofilm, was recently suggested to provide higher antibiotic resistance to a bacterial population (Azimi *et al.*, 2019). We observed a better fitness of the *lasR*⁻ mutant-enriched evolved population on a 20h swarming colony vs a wild-type population (**Fig. 3.6**).

While we confirmed the fitness benefit under swarming conditions of carrying LasR-deficient mutants as mixed population, which aspect of swarming triggers the selection for the emergence of these mutants remains unclear. Zhao *et al.* (Zhao *et al.*, 2016) showed that dilution of a rich culture medium increases the frequency of emergence of *lasR*⁻ mutants and that these mutants require less energy to grow. Nutrients availability could have explained our results. Although we observed a slightly faster growth of the *lasR*- mutant in liquid culture, it did not have a metabolic advantage on solid media (**Fig. 3.5**). Together, our data do not support a metabolic advantage of the LasR-deficient mutants under swarming conditions.

Another possible explanation for the emergence of LasR-deficient mutants is cheating. Quorum sensing is beneficial to a population since it controls the production of extracellular factors (public goods) beneficial to the whole population under certain conditions (Diggle *et al.*, 2007). Quorum sensing cheaters, mutants that benefit from public goods production without contributing to their production, are strongly positively selected in conditions where these factors are necessary for growth (Sandoz *et al.*, 2007). Under swarming conditions, rhamnolipids are a necessary public good and their production is controlled by quorum sensing, especially by RhIR (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Under our conditions, *lasR*⁻ mutants still produce rhamnolipids and are capable of

performing swarming motility, thus cheating would be surprising (Dekimpe & Déziel, 2009). Actually, cheaters for rhamnolipid production have never been observed and the proposed mechanism preventing the selection for rhamnolipid-negative mutants is metabolic prudence: these costly metabolites are only produced when the carbon source is in excess (Xavier *et al.*, 2011). Also, in biofilm evolution, the emergence of *lasR*⁻ mutants does not seem to lead to a cheater phenotype since their presence give an fitness advantage to the population against antibiotics (Azimi *et al.*, 2019; Vandeplassche *et al.*, 2019). We conclude that under swarming conditions, emerging LasR-defective clones are not cheaters.

The emergence of *lasR*⁻ mutants has been previously observed among cystic fibrosis (CF) lung infection isolates (D'Argenio *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2009). The presence of such mutants is associated with a poor prognosis (Hoffman *et al.*, 2009; LaFayette *et al.*, 2015). Better growth on certain amino acids and increased resistance to β -lactam antibiotics are among previously identified benefits of loss of LasR function among CF isolates (D'Argenio *et al.*, 2007). The presence of *lasR*⁻ mutants impacts the morphology of biofilms; a mixed culture of *lasR*⁻ mutants and wild-type results in thinner and less dense biofilms and increased susceptibility to antibiotics (Popat *et al.*, 2012). However, in a laboratory evolution context, the emergence of *lasR*⁻ mutants in biofilms led to resistance to β -lactam antibiotics, confirming the results observed in CF patients (Azimi *et al.*, 2019; Vandeplassche *et al.*, 2019). Indeed, *lasR*⁻ mutants are not always cheaters detrimental to the population (Harrison *et al.*, 2014). This agree with our observations under swarming conditions that evolved *lasR*⁻ mutants can provide fitness advantage to a population. In both biofilms and swarming colonies, bacteria grow in a structured, social context, unlike in planktonic cultures, possibly explaining the difference with reported conditions, typically lab reconstructed, defining *lasR*⁻ mutants as cheaters.

Another possible mechanism for the selection of LasR-deficient clones under swarming conditions is that such mutants are more resistant to cell lysis (Heurlier *et al.*, 2005; Sandoz *et al.*, 2007). However, there was no clear selection for more LasR-defective clones inside a swarming colony after 24h (**Fig. 11.6**); rather it seems that it was sequential transfers of swarming cells on new swarming plates that favored the selection for LasR-deficient mutants.

Indeed, a selfish advantage of LasR-deficient clones seems unlikely since, under swarming conditions, the selection seemed to be constrained indeed, even if some lineages had a proportion of LasR-deficient clones higher than 90%, most of the lineages seemed to reach a plateau averaging around 50% after about six passages (**Fig. 3.3 B-C**). Apparently, the LasR-defective mutants never took over the whole population in any lineages, not at the center nor at

the tendrils tips of swarming colonies. We nevertheless observed high variability in the proportions of LasR-deficient clones between lineages, which could be at least partially explained by the co-emergence of other mutations (e.g. C2 and C4 clones). This indicates an equilibrium is reached in the mixed population, maybe because a total takeover by *lasR*⁻ mutants could lead to the collapse of the population, as it has been seen previously (Dandekar *et al.*, 2012). Several mechanisms have been proposed to explain how *P. aeruginosa* controls a population collapse by the excessive emergence of *lasR*⁻ mutants; further studies will be required to elucidate what is happening under swarming conditions and which forces stabilizes the swarming population.

Another interesting observation is that the production of 3-oxo-C₁₂-HSL by the LasR-deficient clones derived from swarming adaptation in both backgrounds (wild-type strain and $\Delta hptB$ mutant) we tested is reduced, as expected, but still higher than by the *lasR*::Gm and $\Delta hptB$ *lasR*::Gm mutants. For the C1 clone, the mutation is in a site that codes for a conserved amino acid found in the DNA-binding domain of LasR that could be part of a hydrogen bonding between the protein and the DNA (Chowdhury & Bagchi, 2016). The LasR protein could still be active but with less activity than the wild-type explaining levels higher than produced by the *lasR* deletion mutants. For the C3 clones, the mutation results in a stop codon, but still some production of 3-oxo-C₁₂-HSL is observed when compared to the wild-type strain. Similar results have been observed with *lasR*⁻ mutants isolated from cystic fibrosis lungs: a stop codon in *lasR*, did not seem to eliminate LasI activity (Feltner *et al.*, 2016) The fact that the *rhl* system can activate LasR-dependant targets in a *lasR* null background (Dekimpe & Déziel, 2009) could contribute to explain why an apparent absence of a functional LasR does not result in even lower 3-oxo-C₁₂-HSL production. In our analyses of the whole genome sequences, we did not observe additional mutations in C3. However, we cannot rule out that another mutation is present in the genome but was not detected. On the other hand, we found a deletion in the *ddpA3* gene in clone C1, which might contribute the changes in 3-oxo-C₁₂ production. The *ddpA3* gene binds to tri/di-peptides for their specific uptake and is then used as a nitrogen source (Pletzer *et al.*, 2014). The expression of *ddpA3* is under the negative control of PsdR (Asfahl *et al.*, 2015) and a *psdR*⁻ mutant is a non-social mutant that can emerge in quorum sensing-dependent environments as immunity against *lasR* cheaters: its presence reduces the fitness of the such cheaters. However, a mutation in *lasR*⁻ does not impact *dppA3* expression (Asfahl *et al.*, 2015). Both the non-null mutations in *lasR*⁻ and mutation in *dppA3* could possibly contribute to the stabilized proportion of LasR-deficient clones in the swarming-adapted populations. In the case of the clones from PA14 evolution, only the *lasR* gene was sequenced but we suspect presence of additional mutations that could explain the difference of 3-oxo-C₁₂ HSL production. Other regulator, associated with QS, could be mutated explaining

such results, For example, second mutation in *mexT*, or *psdR* trigger action of *rhl* system as previously observed (Chen *et al.*, 2019; Kostylev *et al.*, 2019; Oshri *et al.*, 2018). RhlR as mentioned previously can activated LasR-dependant target.

A previous experimental evolution with PA14 performed under swarming conditions did not reveal any emergence of *lasR*⁻ mutants. However, the experimental conditions were different (Boyle *et al.*, 2017; van Ditmarsch *et al.*, 2013): here, only bacteria from the tendrils were transferred on fresh plates and at higher densities. Also, the medium used here contained dextrose and ammonium chloride, which are both absent in the medium used in the Xavier Lab (Xavier *et al.*, 2011). It will be interesting to investigate which factors explain the difference observed. Note that clones C2 and C4 do not either match the mutation or phenotype detected in the van Ditmarsch *et al.* study (van Ditmarsch *et al.*, 2013).

Here, we performed a directed evolution on the swarming-defective $\Delta hptB$ mutant as a useful background to find compensatory mutations, and therefore better understand the elements controlling swarming in *P. aeruginosa*. Unexpectedly, our results led us to the discovery of the emergence of *lasR*⁻ mutants providing a benefit to the swarming population. The same evolution of the wild-type under swarming conditions also led to the emergence of *lasR*⁻ mutants. This phenomenon has never been described before and became our primary focus. However, *lasR*⁻ mutants emergence does not fully compensate the $\Delta hptB$ swarming default, and this aspect will be further investigated with clones C2 and C4 (Robitaille and Déziel, unpublished).

To conclude, we observed a strong selective pressure for the emergence of LasR-deficient mutants of *P. aeruginosa* under swarming motility conditions. The same phenomenon was observed with three different strains. Our results support a model where emergence of such mutants in a population contributes to the global fitness of the community, rather than imparting a selfish benefit to the mutant clones. This study further highlights swarming motility as a compelling microbial cooperative behaviour.

3.7 Acknowledgements

We thank Frédéric Veyrier for his help with the whole genome sequencing analyses. We also thank Sylvain Milot for his technical help with the LC/MS analyses and Fabrice Jean-Pierre for the PA14::*gfpmut3* and pEX18Ap- $\Delta hptB$ constructs, and helpful discussions. SR received Ph.D. scholarships from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) and from the Fondation Armand-Frappier de l'INRS. This work was supported by grant MOP-142466 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and grant RGPIN-2015-03931 from the

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). ED holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology.

4 DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE #1

4.1 Contexte

Suite à l'article 1 (**Chapitre 3**), il n'a pas été possible de déterminer la raison de l'émergence de mutants *lasR*. Le but du chapitre 4 est de déterminer quel est l'avantage pour les mutants *lasR* d'émerger en motilité de type *swarming*. Plusieurs avenues sont explorées, soit la possibilité pour les mutants *lasR* dans nos conditions (1) d'avoir un avantage métabolique comparé à la souche sauvage ou (2) d'être un tricheur en exploitant les biens publics. Plus particulièrement, l'intérêt ici est d'établir la raison de l'apparition des mutants *lasR* dans nos conditions, alors que van Ditmarsch *et al.* et Boyle *et al.*, utilisant une approche similaire, n'ont pas observé l'apparition de ces mutants lors de leur évolution dirigée en motilité de type *swarming* (van Ditmarsch *et al.*, 2013) (Boyle *et al.*, 2013).

4.2 Méthodologie

4.2.1 Souches bactériennes

Les souches de *P. aeruginosa* PA14 et *lasR::Gm* ont été utilisées pour ces expériences et sont décrites précédemment. Les mutants *rhIR::Tc* et *lasR::GmrhIR::Tc*, utilisés dans cette section, ont déjà été décrits (Dekimpe & Déziel, 2009; Déziel *et al.*, 2005). Le mutant *rhIA::MrT7* (ID23291) provient d'une banque de mutants par transposition (Liberati *et al.*, 2006). Les mesures de DO₆₀₀ ont été prises avec le NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

4.2.2 Aire de recouvrement

Les essais de *swarming* ont été réalisés comme décrit précédemment (**Section 3.4.2**). Les photos ont été analysées avec le programme ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Les résultats proviennent de trois expériences différentes.

4.2.3 Croissance de PA14 et du mutant *lasR::Gm* en conditions aérobies ou microaérobies

Pour les expériences en condition microaérobie et aérobie, quatre cultures de PA14 et de *lasR::Gm* ont été inoculées dans du TSB à partir d'un stock congelé et incubées 16h à 37°C dans un tambour rotatif à 110 rpm (New Brunswick). Les réplicats ont été dilués à DO₆₀₀=0,05 dans deux tubes contenant du milieu M9DCAA (Tremblay & Déziel, 2008). Pour chacun des réplicats,

un tube a été incubé dans une jarre anaérobie et l'autre tube en condition aérobie, les deux de façon statique. Pour l'obtention d'une atmosphère microaérobie dans les jarres, l'oxygène a été préalablement consommé en allumant une bougie. Les tubes ont été incubés à 34°C. À tous les 12h entre 24 et 120h et à 147 h, un volume de 200 µl d'échantillon a été prélevé dans chacun des tubes. Des dilutions en série ont été effectuées et étalées sur géloses LB. Après 16h d'incubation à 37°C, les unités formatrices de colonies (UFC) ont été calculées. Les statistiques ont été réalisées avec Prism6 (GraphPad). L'expérience a été effectuée une fois.

4.2.4 Croissance de PA14 et *lasR::Gm* selon les composants du milieu M9DCAA

Pour les croissances bactériennes dans le milieu M9DCAA sans NH₄Cl et dextrose ou sans acides casaminés (*casamino acids* (CAA)), les cinétiques ont été réalisées en même temps que la cinétique présentée à la **Figure 3.5A**. Les conditions expérimentales sont décrites à la **section 3.4.8** avec l'omission de certains composés dans le milieu (soit sans le NH₄Cl et dextrose ou sans les CAA).

4.2.5 Expériences sur les «biens publics»

Pour ce qui est de la quantification de la production de rhamnolipides, trois cultures de PA14 et *lasR::Gm* ont été inoculées dans du TSB à partir d'un stock congelé et incubées 16h à 37°C dans un tambour rotatif à 110 rpm. Les réplicats ont été dilués à DO₆₀₀=0,05 dans un tube contenant du milieu M9DCAA (Tremblay & Déziel, 2008). Les tubes ont été incubés à 34°C. Un volume de 480 µl a été prélevé à 3, 5, 7, 9, 12, 24 et 30h et la DO₆₀₀ a été mesurée. Un volume de 120 µl contenant 12 ppm de 5, 6, 7, 8-tétradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-D4) a été ajouté aux aliquots. Les échantillons ont été analysés en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) combinée à la colonne Kinetex C8 (Phenomenex) équipée d'un spectromètre de masse (MS) (Quattro Premier XE, Waters) en mode négatif, tel que décrit précédemment (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). La quantification est la somme des mono-rhamnolipides et di-rhamnolipides Rham-C₁₀-C₁₀.

Pour les tests de complémentation, les souches PA14, *lasR::Gm*, *lasR::Gm rhlR::Tc* et *rhlA::MrT7* ont été inoculées dans du TSB et incubées à 37°C pendant 16h sur un tambour rotatif. Les essais de *swarming* ont été réalisés comme décrits au à la **section 3.4.1**. Après 1h de séchage, un volume de 5 µl de mono-rhamnolipides (Rham-C₁₀-C₁₀) à 1200 ppm dans du méthanol ou de méthanol seul comme témoin a été déposé au centre de la gélose. Après 15 minutes de séchage supplémentaires, les géloses ont été inoculées avec les cultures exactement à l'endroit où la

goutte de méthanol ou de rhamnolipides a été déposée, et incubées pendant 12h dans des sacs de plastique hermétiques à 34°C.

Pour l'évolution dirigée avec l'ajout de rhamnolipides, elle a été réalisée comme expliquée à la **Section 3.4.2**. À 1h de séchage des géloses de *swarming*, un volume de 5 µl de mono-rhamnolipides (Rham-C₁₀-C₁₀) à 1200 ppm dans le méthanol a été déposé sur les géloses. Les souches ont été inoculées 15 minutes plus tard. Pour l'évolution dirigée avec l'ajout de FeCl₃, elle a été réalisée comme expliquée à la **Section 3.4.2** avec l'ajout de 50 µM de FeCl₃ filtré dans le milieu de *swarming*.

4.2.6 Cinétique en solide

À la **Figure 3.5B** une cinétique en solide a été effectuée avec un suivi des UFC tel que décrit à la **Section 3.4.9**. La DO₆₀₀ des suspensions obtenues lors de la récolte des cellules a été mesuré avant d'effectuer les dilutions en série pour les UFC.

4.3 Résultats

Tout d'abord, le recouvrement de la motilité de type *swarming* du mutant $\Delta hptB$ a été comparé au recouvrement de la motilité de type *swarming* des clones C1 et C3 et $\Delta hptB \text{ lasR} :: Gm$ pour déterminer si les clones C1 et C3 se déplacent plus que le mutant $\Delta hptB$ (**Figure 4.1**). Les clones C1 et C3 montrent une légère augmentation de leur surface de recouvrement par rapport au mutant $\Delta hptB$.

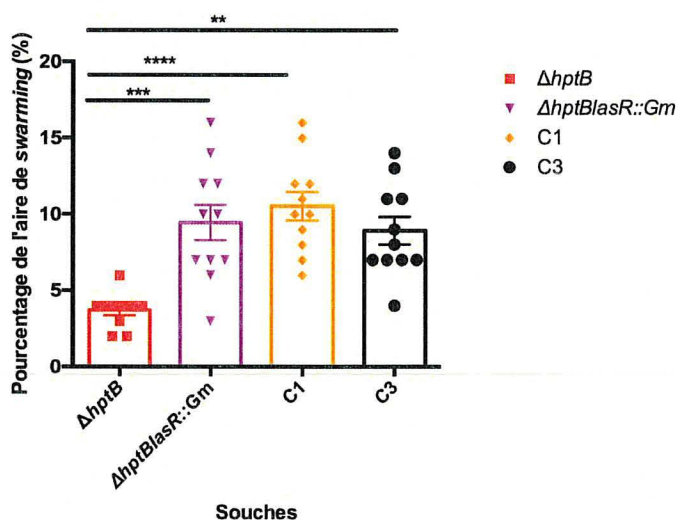


Figure 4.1 : Surface de l'aire de recouvrement du mutant $\Delta hptB$

Le pourcentage des aires de motilité de type *swarming* du mutants $\Delta hptB$ a été comparé aux clones C1 et C3 en utilisant le test statistique One-way ANOVA. P value * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$, **** $\leq 0,0001$). Les statistiques ont été réalisées avec Prism 6 (Graph Pad).

Afin de mieux comprendre l'émergence des mutants avec une protéine LasR défectueuse en motilité de type *swarming*, plusieurs hypothèses ont été explorées. En effet, les mutants *lasR*⁻ sont connus pour être plus résistants en phase stationnaire que la souche sauvage. Ils ont un meilleur avantage de survie dans certaines conditions expliquant qu'ils apparaissent dans certaines conditions (Basta *et al.*, 2017; D'Argenio *et al.*, 2007; Heurlier *et al.*, 2005). Pour tester cette hypothèse, certains aspects métaboliques ont été explorés. Tout d'abord, l'impact de l'oxygène en motilité de type *swarming* a été vérifié. Dans une étude transcriptomique sur PA14 en motilité de type *swarming* comparé au à la condition non-*swarming*, les cellules au bout des dendrites surexpriment des gènes liés à la grande consommation d'oxygène (Tremblay & Déziel, 2010). L'hypothèse est qu'il y a un manque d'oxygène dans les dendrites. Afin de vérifier que l'avantage des mutants *lasR*⁻ soit lié à la consommation d'oxygène, la croissance de la souche PA14 et du mutant *lasR*⁻ ont été comparée en condition microaérophile. Nos résultats démontrent qu'un mutant *lasR*⁻ ne croît pas mieux dans des conditions en présence de moins d'oxygène comparé à la souche sauvage (**Fig.4.2**).

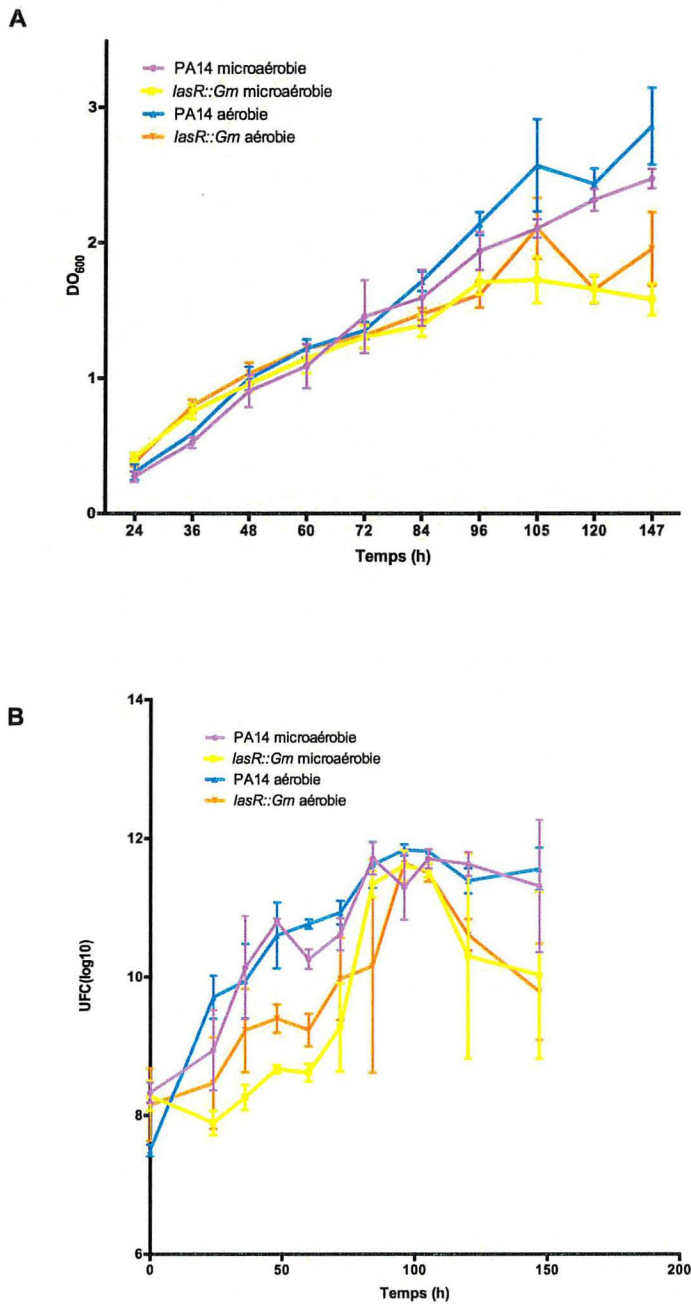


Figure 4.2: Croissance de *lasR::Gm* et PA14 en condition microaéroophile

Croissance de PA14 et *lasR* en milieu M9DCAA en condition aérobie et microaérobie. Le suivi de croissance s'est fait (A) en mesurant la DO₆₀₀ et (B) en calculant les UFC. Le test statistique One-way ANOVA ne montre pas de différence entre les différentes conditions autant dans les mesures de DO₆₀₀ que les UFC ($P < 0,05$).

Des évolutions dirigées en condition *swarming* réalisées précédemment par l'équipe de Xavier avec la même souche de *P. aeruginosa* n'ont pas sélectionnées des mutants *lasR* (Boyle *et al.*, 2017; van Ditmarsch *et al.*, 2013). Cependant, les conditions de cultures et le milieu de *swarming*

sont différentes. Leur milieu est aussi une base de M9, mais il n'y a ni de dextrose ni de NH_4Cl . De plus, le CAA utilisé est filtré et non autoclavé comme dans notre protocole. De plus, ils ont utilisé la colonie complète pour inoculer une nouveau pétri de *swarming* durant l'évolution, alors que dans le chapitre 3 et 4 de cette thèse seul les cellules aux bouts des dentrites ont été repiquées. En liquide, le mutant *lasR*⁻ a un certain avantage dans les conditions utilisées (**Fig. 3.5A**). Cet avantage du mutant *lasR*⁻ a été testé en retirant certains composés du milieu afin de comprendre quel élément est préférentiellement utilisé par un mutant *lasR*⁻. En retirant le CAA du milieu (M9D), le mutant *lasR*::Gm perd une partie de son avantage de croissance versus le milieu M9DCAA (**Fig. 4.3A**). Toutefois, en retirant le NH_4Cl et le dextrose (M9CAA), le mutant *lasR*::Gm conserve un avantage de croissance comme observé dans le milieu M9DCAA. Ainsi, il est possible de supposé que la présence de NH_4Cl et du dextrose ne favorisent pas la croissance des mutants *lasR*⁻, alors que le CAA semblent y contribuer en condition liquide (**Fig. 4.3B**).

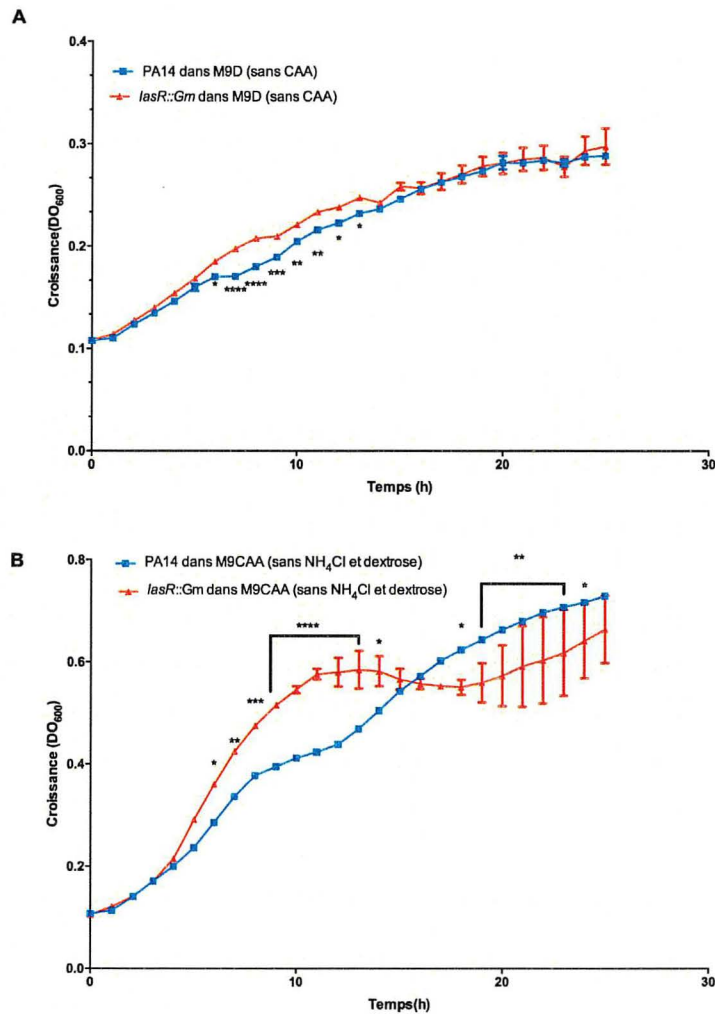


Figure 4.3: Cinétique de croissance dans le milieu M9DCAA modifié

Cinétique de croissance des souches PA14 et *lasR::Gm* dans le milieu M9DCAA à 34°C (A) sans CAA dans le milieu ou (B) sans NH₄Cl et dextrose dans le milieu. Des analyses statistiques de type two-way ANOVA ont permis de comparer la croissance de PA14 et *lasR::Gm*. (P value *≤0,05, **≤0,01, ***≤0,001, ****≤0,000 1). Les statistiques ont été réalisées avec Prism 6 (Graph Pad).

Une autre hypothèse est que les mutants *lasR*⁻ émergent généralement dans des conditions où ils profitent d'un bien public et agissent en tant que tricheurs (**Section 1.3.2**). Tout d'abord, la baisse de production de rhamnolipides, un bien public partagé dans une communauté (Xavier *et al.*, 2011), a été observé pour les clones C1 et C3 (**Fig. 4.4**). Le mutant *lasR*⁻ est connu pour produire moins de rhamnolipides que la souche sauvage (Dekimpe & Déziel, 2009), ce qui concorde avec les clones *lasR*⁻ isolés de l'évolution et confirme que les rhamnolipides semblent être exploités dans nos conditions. Afin de confirmer que le seul élément nécessaire à la motilité

de type *swarming* contrôlé par le QS est la production de rhamnolipides, le mutant *lasR::Gm rhIR::Tc* et d'autres mutants du QS ont été complétés par l'ajout de mono-rhamnolipides Rham-C₁₀-C₁₀ purs (**Fig.4.5 A**). L'utilisation de mono-rhamnolipides n'a pas permis la formation de dendrites, mais le double mutant *lasR::Gm rhIR::Tc* a pu se déplacer.

Afin de confirmer que les rhamnolipides ne sont pas un bien public qui permet la sélection de tricheurs (Xavier *et al.*, 2011), une évolution sur la souche sauvage PA14 a été réalisée en présence d'un excès de rhamnolipides. Donc, à chaque passage, des rhamnolipides purs ont été ajoutés. Au passage 4, les colonies en motilité de type *swarming* avaient une teinte bleutée (**Fig. 4.5B**). À ce même passage, des colonies ont été isolées pour chaque lignée et leur capacité à dégrader la caséine était testée afin de calculer le nombre de *lasR*⁻ potentiels (ne pouvant pas dégrader la caséine). Lors de l'évolution dirigée avec l'ajout de rhamnolipides, au quatrième passage, le pourcentage de colonies potentiellement *lasR*⁻ était de 30 %, 40 %, 68 % et 16 % pour les lignées 1 à 4 respectivement (**Fig. 4.5D**). De plus, les colonies en motilité de type *swarming* ont une teinte bleue caractéristique des mutants *lasR*⁻. Il est possible de conclure que des mutants *lasR*⁻ ont émergé de l'évolution. Si les mutants *lasR*⁻ avaient exploité la production des rhamnolipides de la souche sauvage, en présence d'excès de rhamnolipides ceux-ci n'auraient plus d'avantage dans la population et n'émergeraient pas. Ceci a été démontré par Sandoz *et al.* où l'ajout du bien exploité par les tricheurs dans une culture empêche leur émergence (Sandoz *et al.*, 2007). Ainsi, les rhamnolipides ne semblent pas être un bien public qui peut être exploité par les tricheurs.

Par la suite, la pyoverdine a été testée afin de déterminer s'il s'agit un bien public favorisant l'émergence de mutants *lasR*⁻ en motilité de type *swarming*. La pyoverdine est un sidérophore soit une molécule nécessaire pour capturer le fer en milieu pauvre pour ce composé (Cornelis & Dingemans, 2013). Un mutant *pvdQ*⁻ (produisant moins de pyoverdine que la souche sauvage) est connu pour avoir un défaut de motilité de type *swarming* (Jimenez *et al.*, 2010; Ochsner *et al.*, 2002; Overhage *et al.*, 2007). Le défaut de motilité de type *swarming* du mutant *pvdQ*⁻ peut être complété par l'ajout de fer (Jimenez *et al.*, 2010). Ainsi, afin de vérifier si la pyoverdine serait un bien public qui favoriserait l'apparition de mutants *lasR*⁻, une évolution dirigée sur la souche PA14 a été réalisée avec l'ajout de 50 µM de FeCl₃ (**Fig.4.5C**). Toutefois un pigment bleu est apparu après plusieurs passages signifiant une probable émergence de mutants *lasR*⁻ spontanés. Au passage 4, des colonies ont été testées pour leur capacité à dégrader la caséine. Les populations contenaient 22 %, 4 %, 2 % et 18 % de mutants *lasR*⁻ (qui ne peuvent pas dégrader la caséine) pour les lignées 1 à 4 respectivement (**Fig. 4 .5E**). Comme mentionné ci-

dessous, si la pyoverdine avait été un bien public exploité par les mutants *lasR*, l'ajout de FeCl_3 aurait dû empêcher l'émergence des mutants *lasR*. Ainsi, l'émergence de mutants *lasR* dans l'évolution dirigée avec l'ajout de FeCl_3 confirme que la production de sidérophores ne semble pas être un bien public qui peut être exploité par les mutants *lasR*.

Finalement, à la **Figure 3.5B**, une cinétique sur surface solide a été réalisée. Durant cette cinétique le décompte UFC a été fait. En parallèle, les mesures de DO_{600} ont été prises afin de confirmer les résultats du UFC (**Fig 4.6**). De plus, la cinétique aurait pu être effectuée avec des souches fluorescente afin de mesurer l'augmentation de l'intensité de fluorescence de chacune des souches dans le temps.

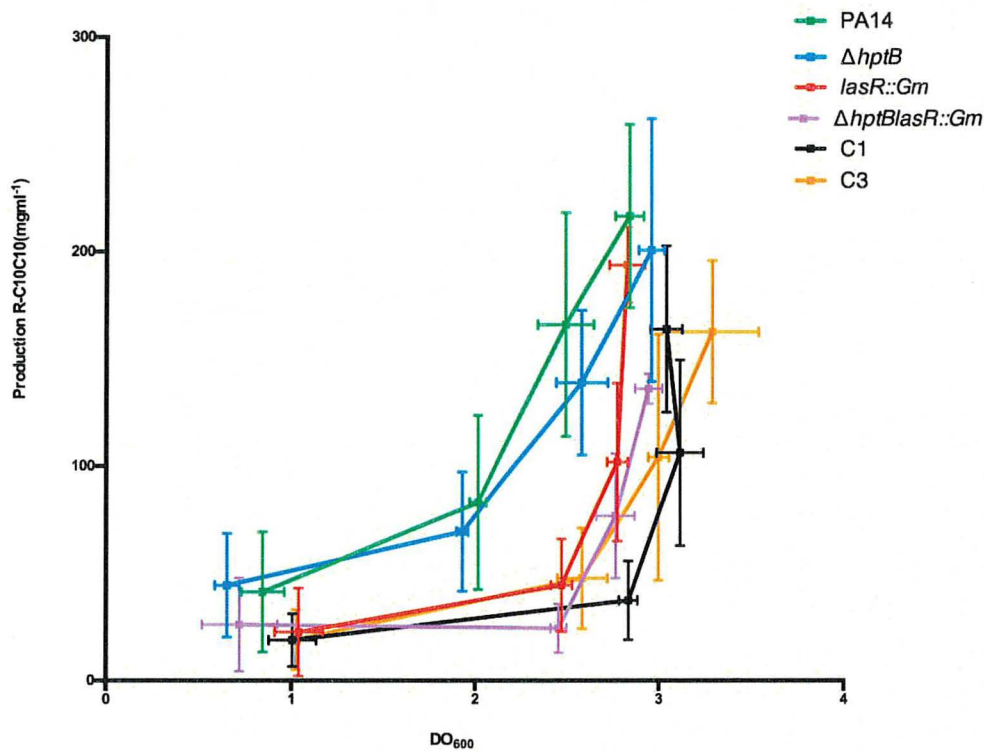


Figure 4.4 : Production de rhamnolipides en milieu M9DCAA

La production de rhamnolipides a été mesurée pour chacune des souches cultivées à 34°C dans du milieu M9DCAA et incubées dans un tambour rotatif.

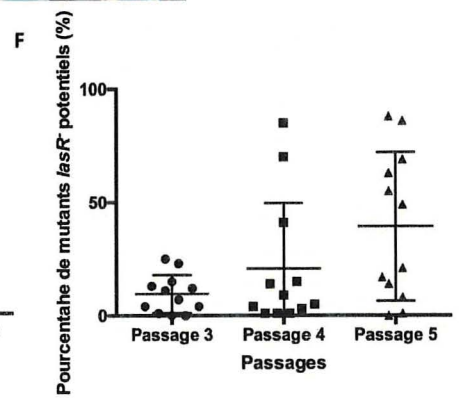
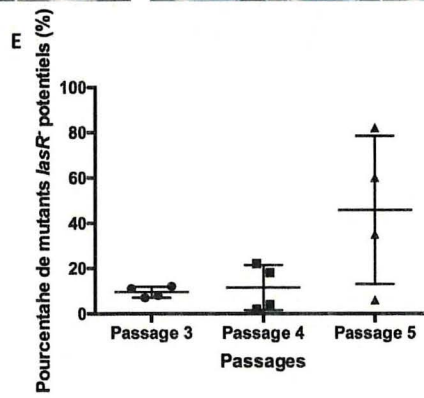
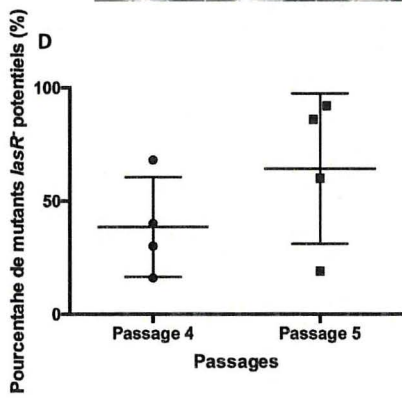
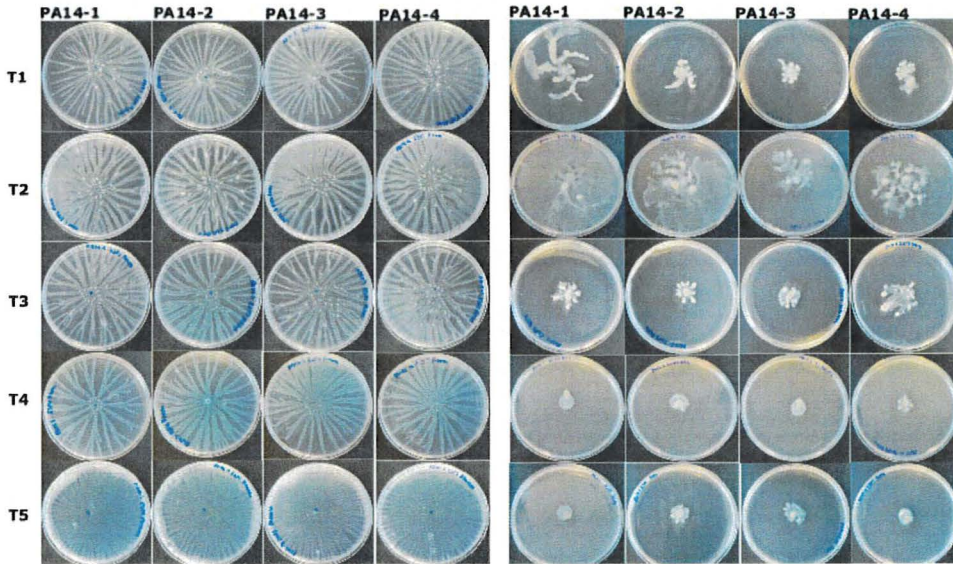
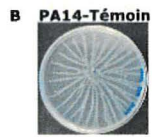
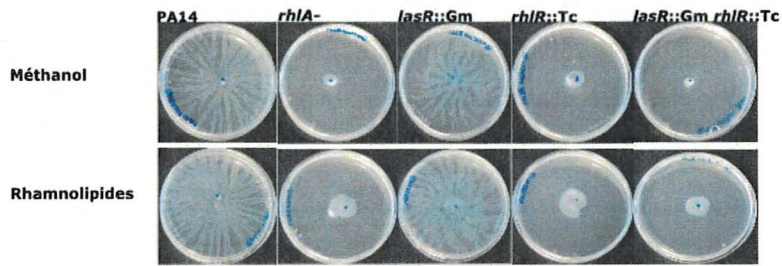


Figure 4.5: Déterminer le potentiel tricheurs de mutants *lasR*

Déterminer si les mutants *lasR* qui sont sélectionnés en motilité de type *swarming* sont des tricheurs. (A) Motilité des mutants de QS en présence de mono-rhamnolipides. (B) Évolution dirigée de PA14 en présence d'un excès de mono-rhamnolipides et (C) en présence de FeCl_3 . Les pourcentages de *lasR* potentiels sont représentés en (D) pour l'évolution en condition *swarming* en présence de rhamnolipides et en (E) pour l'évolution en condition *swarming* en présence de fer. En (F) se trouve l'émergence de PA14. Les résultats proviennent de la Fig 3.4B pour les passage 3, 4 et 5 à titre comparatif.

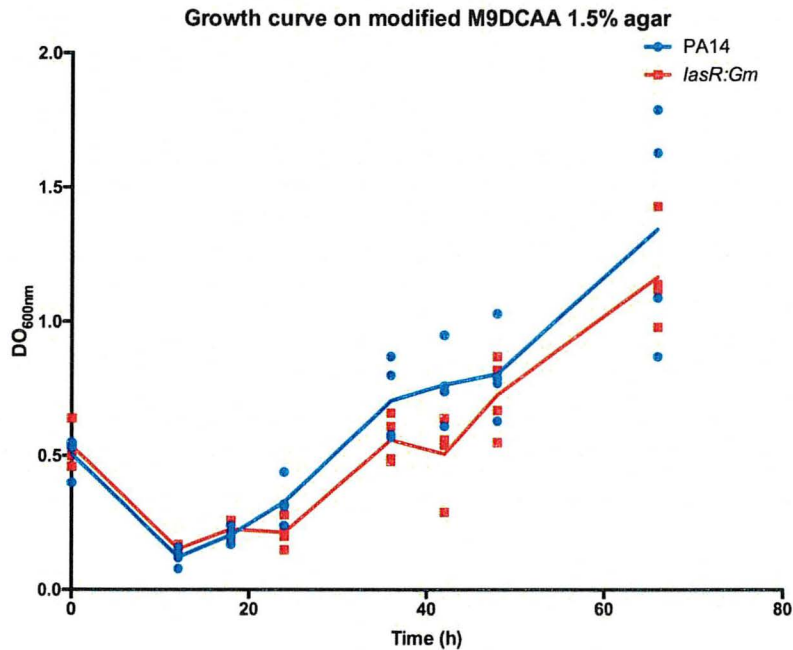


Figure 4.6 : Cinétique dans le milieu M9DCAA 1,5% agar

Suivis de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ lors de la croissance sur surface solide du mutant *lasR* et PA14 sur le milieu M9DCAA 1,5% agar.

4.4 Discussion

Le but de ces expériences complémentaires est de vérifier l'hypothèse que les mutants spontanés défectueux dans la fonction de la protéine LasR (observés lors de l'évolution dirigée de PA14 en motilité de type *swarming* (**Chapitre 3**)) ont un avantage lorsque comparé à la souche sauvage et ainsi expliquer leur émergence. Cet avantage peut être dû soit à un (1) avantage métabolique ou (2) au fait que des cellules profitent d'un bien public (tricheur). Or, par nos expériences, aucun élément n'a pu être déterminé pour expliquer la sélection de mutants *lasR* en motilité de type *swarming*.

Tout d'abord, afin de déterminer si les mutants *lasR* ont un avantage métabolique, la piste de l'oxygène a été explorée. Des travaux passés du laboratoire Déziel ont indiqué qu'il y pourrait y

avoir un manque d'oxygène aux bouts de dendrites étant donné le profil transcriptomique de cette sous-population, lorsque comparé au profil transcriptomique de la colonie en condition non-*swarming* (Tremblay & Déziel, 2010). Dans la même étude, les gènes liés au métabolisme et la synthèse de l'ATP étaient surexprimés au bout de dendrites en plus de ceux liés à l'utilisation de l'oxygène. Chez *P. mirabilis*, les cellules adoptant une motilité de type *swarming* consomment moins d'oxygène pour la même consommation d'ATP que les cellules en non-*swarming* (Armitage, 1981). Ceci confirme la grande activité métabolique se retrouvant en condition *swarming* (Armitage, 1981). Il a été démontré, par un suivi de la consommation de l'oxygène qu'un mutant *lasR*⁻ consomme moins d'oxygène que la souche sauvage dans certaines conditions nutritionnelles, ce qui pourrait augmenter sa résistance au stress oxydatif (Hoffman *et al.*, 2010). Le mutant *lasR*⁻ pourrait ainsi être avantageux puisque les bouts de dendrites semblent limités en oxygène, dû à une grande utilisation, et que ces mutants semblent nécessiter moins d'oxygène pour croître. Toutefois, le fait de réduire la consommation d'oxygène en condition liquide n'a pas favorisé la croissance de *lasR*::Gm, dans nos conditions, lorsque comparé à la croissance de la souche sauvage PA14 dans les mêmes conditions. Il aurait été intéressant de tester ces conditions d'oxygène en croissance sur une surface ou de regarder quelle population (entre *lasR*⁻ et PA14) émerge lorsqu'elles sont mélangées dans un ratio 1:1 en condition microaérobie. De plus, les conditions microaérobies n'étaient peut-être pas optimales, dû à une ouverture fréquente de la jarre. L'utilisation d'une chambre anaérobie pour le prélèvement des échantillons et un système plus étanche à l'oxygène auraient pu être appropriés ici.

Comme il a été mentionné au **Chapitre 3** à la **Figure 3.5**, le mutant *lasR*::Gm a un léger avantage de croissance en liquide qui n'a pas été reproduit pas en condition solide. Toutefois, des expériences pour trouver l'élément nutritif qui permet cet avantage ont été réalisées. Sachant que le milieu précédemment utilisé dans les évolutions dirigées en motilité de type *swarming* chez PA14 est similaire à celui utilisé pour ce projet avec la différence de ne pas contenir de dextrose ou de NH₄Cl, ces éléments ont été testés. Le mutant *lasR*::Gm ne perd pas son avantage de croissance sans ces nutriments. De plus, *lasR*::Gm perd une partie de son avantage en éliminant le CAA, mais pas complètement (**Fig. 4.3**). Ces résultats confirment que la présence du NH₄Cl et du dextrose ne donne d'avantage métabolique aux mutants *lasR*⁻ lorsqu'ils sont présents dans le milieu.

Par la suite, afin de déterminer si les mutants *lasR*⁻ agissent comme tricheurs, le rôle des différents biens publics connus pour favoriser la motilité de type *swarming* a été étudié. Le bien public le mieux connu nécessaire à la motilité de type *swarming* est la production de

rhamnolipides (Xavier *et al.*, 2011). Un mutant *lasR*⁻ produit moins de *swarming* que la souche sauvage dû à une production de rhamnolipides inférieur à la souche sauvage (Dekimpe & Déziel, 2009; Soberón-Chávez *et al.*, 2005), et pourrait ainsi bénéficier de la production de rhamnolipides de la souche sauvage. Cependant, Xavier *et al.* (Xavier *et al.*, 2011) ont démontré que ce bien public n'est pas «trichable» car la bactérie a développé un mécanisme de protection nommé «prudence métabolique». Cependant, ce modèle a été établi dans des conditions différentes de celles étudiées ici. Cette avenue a donc été explorée. L'approche expérimentale a été d'ajouter le bien public en excès, donc les tricheurs perdent leur avantage. En effet, Sandoz *et al.* (Sandoz *et al.*, 2007) ont démontré que l'excès de bien public (dans leur cas le produit de dégradation de la caséine) prévient l'émergence de mutants *lasR*⁻ durant l'évolution. Or, l'émergence de mutants *lasR*⁻ en présence d'un excès de rhamnolipides exogènes à tout de même été constaté (**Fig. 4.5B**). Ainsi, nos résultats vont de pair avec le concept de prudence métabolique.

Un autre bien public connu chez *P. aeruginosa* sont les protéases extracellulaires, qui dégradent, par exemple, la caséine (Sandoz *et al.*, 2007). Dans la littérature des mutants dans le gène *lasB* (codant une des protéases produites par *P. aeruginosa*) ont un défaut de motilité de type *swarming*; dans notre laboratoire, les mutants dans les gènes de protéases testés n'ont pas de défaut en condition *swarming* (Overhage *et al.*, 2008) (**Section 13- Fig. 13.1**). Donc, si ces enzymes ne sont pas nécessaires pour la motilité de type *swarming*, elles ne peuvent être un bien public permettant aux mutants spontanés *lasR* d'émerger en motilité de type *swarming*.

Un autre bien public connu est la sécrétion du sidérophore pyoverdine. Un mutant *lasR*⁻ produit moins de pyoverdine que la souche sauvage, donc la production de sidérophores pourrait être la source de l'apparition des tricheurs (Stintzi *et al.*, 1998). De plus, il est notable qu'un gène de régulation de la pyoverdine, *pvdQ*, lorsque muté affecte négativement la motilité de type *swarming* (Overhage *et al.*, 2008). Ce gène, en plus d'être impliqué dans l'acquisition de fer, peut aussi dégrader le 3-oxo-C₁₂-HSL ce qui pourrait expliquer que la motilité de type *swarming* soit affectée (Overhage *et al.*, 2008). Toutefois le défaut de motilité de type *swarming* peut être complémenté par un ajout extérieur de fer (Jimenez *et al.*, 2010). L'ajout de fer dans un milieu de *swarming* peut aussi avoir un effet inhibiteur sur ce type de motilité dû à son effet négatif sur la production de rhamnolipides (Déziel *et al.*, 2003). Ici, une concentration de fer qui permet la motilité de type *swarming* chez PA14 et complémente le mutant *pvdQ*⁻ a été trouvée (**Fig. 4.5C**). L'ajout de fer ne prévient pas l'apparition de *lasR*⁻ et donc la pyoverdine ne peut-être un bien public impliqué dans l'émergence de mutant *lasR*⁻.

Finalelement, la raison de l'émergence des mutants *lasR* dans les conditions d'évolution n'a pas été identifiée. Ainsi, cela soutient l'hypothèse que l'apparition de tels mutants est le résultat d'une meilleure adaptation de la population en motilité de type *swarming*.

5 ARTICLE 2 :AN EXPERIMENTALLY EVOLVED VARIANT OF RSM A CONFIRMS ITS CENTRAL ROLE IN THE CONTROL OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SOCIAL MOTILITY

Sophie Robitaille, Yossef López de los Santos, Fabrice Jean-Pierre[#], Marie-Christine Groleau, Nicolas Doucet, Jonathan Perreault, and Eric Déziel

INRS-Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval (Québec), Canada.

[#]Current address: Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire, USA

Journal: PloS Pathogens

Soumission: Soumis le 9 Juillet 2020

Contributions de auteurs:

J'ai réalisé la mise en place et la réalisation des expériences, ainsi que l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit. Marie-Christine Groleau a réalisé l'expérience de complémentation de RsmA. Yossef López de los Santos a créé le modèle d'interaction entre RsmA/RsmA^{R31S} et RsmY. Fabrice Jean-Pierre a réalisé l'expérience de complémentation de HptB par RsmA en motilité de type *swarming*, Le Pr Nicolas Doucet et Jonathan Perrault ont participé dans la mise en place des expériences de EMSA et l'analyse des résultats. Le Pr Éric Déziel a contribué à la mise en place des expériences, l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

Les données supplémentaires sont en annexe B (**Section 12**).

5.1 Résumé en français

Les bactéries sont capables de s'adapter et de coloniser divers environnements en modifiant leur régulation. Les systèmes à deux composants permettent aux bactéries de répondre rapidement aux stimuli environnementaux. Ces systèmes sont composés d'un senseur membranaire qui détecte les signaux de l'environnement et d'un régulateur de réponse qui modulent l'expression de gènes spécifiques et qui permettent à la cellule de répondre aux stimuli environnementales. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste ubiquitaire et a beaucoup été étudiée pour sa capacité à s'adapter à divers environnements. Un de ces systèmes à deux composants, le système Gac/Rsm, est composé du senseur GacS et du régulateur de réponse GacA. Ce système régule négativement RsmA, un régulateur post-transcriptionnel central dans la régulation de la transition entre de mode d'infection chronique et aiguë chez cette bactérie, et qui régule différents facteurs de virulence. Chez *P. aeruginosa*, la motilité de type *swarming*, un déplacement de groupe, est régulée positivement par RsmA. Par un mécanisme encore non caractérisé, RsmA est aussi négativement régulé par la protéine HptB, et l'inactivation du gène *hptB* résulte dans un important défaut de motilité de type *swarming*. Puisque le mutant $\Delta hptB$ possède toutes les caractéristiques connues pour se déplacer en motilité de type *swarming* une évolution dirigée a été réalisée pour identifier les éléments qui ont causé le défaut de motilité de type *swarming*. Après quelques passages, le mutant $\Delta hptB$ a récupéré son phénotype de motilité de type *swarming* par l'émergence de mutations dans les gènes *rsmA* et *gacA*. Puisque GacA inhibe indirectement RsmA, cette mutation est cohérente dans le gène *gacA* puisque l'inactivation dans le gène *gacA* compense pour le défaut de motilité de type *swarming* chez $\Delta hptB$. Toutefois, la mutation dans RsmA est contre-intuitive puisque RsmA active la motilité de type *swarming*: en effet, à l'aide de rapporteur transcriptionnel, il a été démontré que le changement R31S de nucléotide dans RsmA n'abolit pas son activité. Par contre, par la technique *electrophoretic mobility shift*, il a été démontré que ce mutant exprime une version de RsmA qui est moins titrée par son pARN régulateur RsmY. Ces résultats confirment le rôle central de RsmA comme régulateur de la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* et l'identification d'un résidu important dans la fonction de RsmA.

5.2 Summary:

Bacteria can colonize a variety of different environments by modulating their gene regulation using two-component systems. The versatile opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* has been studied for its capacity to adapt to a broad range of environmental conditions. The Gac/Rsm pathway is composed of the sensor kinase GacS, that detects environmental cues, and the response regulator GacA, that modulates the expression of a specific genes. This system, through the sRNA repressors RsmY and RsmZ, negatively controls the activity of the protein RsmA, which is centrally involved in the transition from chronic to acute infections by post-transcriptionally regulating several virulence functions. RsmA positively regulates swarming motility, a social surface behaviour. Through a poorly defined mechanism, RsmA is also indirectly regulated by HptB, and a $\Delta hptB$ mutant exhibits a severe swarming defect. Since a $\Delta hptB$ mutant retains all the known functions required for that type of motility, we used an experimental evolution approach to identify elements responsible for its swarming defect. After a few passages under swarming conditions, the defect of the $\Delta hptB$ mutant was rescued by the emergence of spontaneous single nucleotide substitutions in the *gacA* and *rsmA* genes. Since GacA indirectly represses RsmA activity, it was coherent that an inactivating mutation in *gacA* would compensate the $\Delta hptB$ swarming defect. However, the effect of the mutation in *rsmA* was unexpected since RsmA promotes swarming; indeed, using expression reporters, we found that the mutation that does not abolish its activity. Instead, using electrophoretic mobility shift assays and molecular simulations, we show that this variant of RsmA is actually less amenable to titration by its cognate repressor RsmY, supporting the other phenotypes observed for this mutant. These results confirm the central role of RsmA as a regulator of swarming motility in *P. aeruginosa* and identify residues crucial for RsmA function in social motility.

5.3 Author Summary :

Bacteria need to readily adapt to their environment. Two-component systems (TCS) allow such adaption by triggering bacterial regulation changes through the detection of environmental cues. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* possesses more than 60 TCS in its genome. The Gac/Rsm is a TCS extensively studied for its implication in virulence regulation. This system regulates the transition between chronic and acute bacterial infection behaviours . To acquire a better understanding of this regulation, we performed a directed experimental evolution on a swarming-deficient mutant in a poorly understood regulatory component of the Gac/Rsm pathway. We observed single nucleotide substitutions that allowed restoration of a

swarming phenotype similar to the wild-type behaviour. More specifically, mutations were found in the *gacA* and *rsmA* genes. Interestingly, the observed mutation in *rsmA* does not result in loss of function of the protein but rather alters its susceptibility to repression by its cognate interfering sRNA. Since modification in the RNA sequence of RsmA results in the rescue of swarming motility, we confirm the central role of this posttranscriptional repressor in this social lifestyle.

5.4 Introduction:

Bacteria can adapt to diverse environments using various mechanisms. They use two-component systems (TCS) to rapidly modulate the expression of specific subsets of genes (Ann M. Stock *et al.*, 2000). TCS convert external stimuli into an internal response that promotes adaptation to environmental cues. Some bacteria exploit these systems for virulence regulation (Beier & Gross, 2006). Typically, TCS consists of a histidine sensor kinase that responds to an external signal to trigger the autophosphorylation of an intracellular histidine residue. Then, the phosphoryl group of the sensor kinase is transferred to an aspartate residue located in the receiver domain of a cognate response regulator, which then modulates the expression of a specific set of target genes (Hoch & Varughese, 2001a). In some cases, phosphorylation of the receiver domain can occur through a His-containing phosphotransfer (Hpt) protein that acts as an intermediate between the membrane sensor and the response regulator (Zhang & Shi, 2005).

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for several nosocomial infections and also a major cause of morbidity and mortality among individuals with cystic fibrosis (Spicuzza *et al.*, 2009; Van Delden & Iglewski, 1998). The genome of prototypical *P. aeruginosa* strain PAO1 contains 63 histidine kinases, 64 response regulators, and three Hpt proteins (Rodrigue *et al.*, 2000). The Gac/Rsm pathway regulates, among others, virulence-associated genes, and biofilm formation (Brencic & Lory, 2009). This pathway regulates the transition between chronic (associated with the sessile lifestyle) and acute (associated with the motile lifestyle) infections (Brencic *et al.*, 2009; Goodman *et al.*, 2004b). The Gac TCS is composed of the histidine sensor kinase GacS (Hrabak & Willis, 1992) and its cognate response regulator GacA. When GacS is phosphorylated, it transfers its phosphoryl group to GacA (Laville *et al.*, 1992), promoting the transcription of the small RNAs (sRNA) RsmY and RsmZ (Brencic *et al.*, 2009). The expression levels of these sRNAs are influenced by bacterial culture conditions, either in broth or on a surface, highlighting the importance of this pathway in the regulation between these two modes of growth (Jean-Pierre *et al.*, 2017). HptB modulates the expression of RsmZ

through an unknown surface-specific membrane sensor other than GacS, resulting in the phosphorylation of GacA and/or an uncharacterized regulatory factor (Jean-Pierre *et al.*, 2017). The sRNAs RsmY and RsmZ are repressors of the protein RsmA and act by reversibly titrating its activity (Burrowes *et al.*, 2005; Heeb *et al.*, 2002; Valverde *et al.*, 2003). RsmA is a post-transcriptional regulator that binds to a specific trinucleotide GGA motif usually present in the 5'UTR of target mRNAs, thus preventing their translation (Brencic & Lory, 2009; Liu *et al.*, 1997). RsmA inhibits genes associated with biofilm development and favors genes linked to acute infections (Brencic *et al.*, 2009). Also, RsmA is necessary for colonization in a murine infection model (Mulcahy *et al.*, 2008).

Swarming motility is a social surface motility behaviour utilized by several bacteria to promote the colonization of environments by coordinating the movement of a bacterial population on a semi-solid surface (Kearns, 2010). Swarming cells require a functional rotating flagellum which gives them the necessary propelling power. They also need to produce surface-active agents reducing the surface tension between the substrate and the cell, thus facilitating the movement on the surface (Kearns, 2010). Loss of RsmA or HptB functions leads to defects in swarming motility (Heurlier *et al.*, 2004a; Hsu *et al.*, 2008; Jean-Pierre *et al.*, 2017), highlighting the importance of this regulatory cascade in swarming regulation.

To date, no specific gene directly regulated by RsmA has been identified to explain the control of swarming motility. We have previously determined that the defect in swarming motility of a $\Delta hptB$ mutant is not due to either a lack of functional flagella or a deficit in surfactant production (Jean-Pierre *et al.*, 2017). Therefore, additional and still unknown elements are necessary for the swarming motility of *P. aeruginosa*. Since swarming motility is believed to be a beneficial phenotype, defective mutants should derive a selective benefit to regain social motility behaviour. Indeed, Boyle *et al.* (Boyle *et al.*, 2017) rescued the swarming motility of a *cbrA* mutant through directed experimental evolution. To test our hypothesis, we recently performed a similar experiment using directed swarming evolution on a $\Delta hptB$ mutant of strain PA14 to identify unknown elements necessary for swarming motility (Robitaille *et al.*, 2020). After four transfers corresponding to cell passages from the tips of swarming tendrils on new swarming plates, the swarming motility of $\Delta hptB$ was restored (Robitaille *et al.*, 2020). Among evolved gain-of-function clones, two distinct phenotypes emerged: (i) pyocyanin-overproducers with a partially restored swarming phenotype resulting from mutations in *lasR* (described in (Robitaille *et al.*, 2020)); and

(ii) clones expressing a completely restored swarming behaviour comparable to the parental strain PA14. The latter clones (named C2 and C4) are described and characterized here (Fig. 1 B-C); we found single nucleotide substitutions in the *rsmA* and *gacA* genes, further strengthening the importance of the Gac/Rsm pathway in the regulation of surface social behaviour in *P. aeruginosa*. In particular, this experimental evolution experiment revealed residues crucial for RsmA interaction with RNA.

5.5 Materials and methods :

5.5.1 Bacterial Strains and culture conditions

Pseudomonas aeruginosa strain PA14 was used in this study (Rahme *et al.*, 1995). Details on the strains are found in **Table 12.1**. Conditions used for the directed evolution under swarming conditions was previously described (Robitaille *et al.*, 2020). The bacteria were grown in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco) at 37°C in a TC-7 roller drum (New Brunswick) at 110 rpm unless otherwise specified. Swarming assays have been performed as previously described (Tremblay & Déziel, 2008). Swarming plates containing 0.5% agar were prepared and 5 µl of a bacterial suspension at OD₆₀₀=3.00 were inoculated. The plates were incubated at 34°C in bags for 20h or as indicated. For the swarming complementation experiment, the swarming plates were supplemented with 125 µg/mL of tetracycline. Pictures were taken using a Lumix DMC-ZS60 camera (Panasonic). OD₆₀₀ measurements were taken using a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

5.5.2 Sequencing of the whole genome DNA

The whole genome sequencing of C2 and C4 was obtained as previously described (Robitaille *et al.*, 2020). The C2 and C4 clones generated 2,862,314 and 3,254,964 reads respectively covering a 6M bp genome. Mutations were confirmed by PCR amplification (**Table 12.2**). Purified PCR fragments were sent to Institut de Recherches Cliniques de Montréal (Montréal, Canada) for Sanger Sequencing. RsmA/CsrA variants from other *P. aeruginosa* strains and other bacterial species were obtained by BLAST (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and sequences aligned was performed through Clustal Omega 1.2.3 on Geneious Prime 2020.0 (Biomatters).

5.5.3 Construction of markerless *rsmA* and *gacA* mutants

The *rsmA* gene (PA14_52570) was deleted at more than 95% using a two-step allelic exchange method (Hmelo *et al.*, 2015). All primers are described in **Table 12.2**. The upstream region was amplified using RsmA-L-F-EcoRI and RsmA-L-R-homRsmA primers. The downstream fragment was amplified using primers RsmA-F-F and RsmA-R-R-HindIII. And the overlapping PCR was amplified using RsmA-L-F-EcoRI and RsmA-R-R-HindIII. The obtained fragment was ligated into pEX18-Ap. The obtained vector (pSR09) was transformed in conjugative *E. coli* SM10 and selected on Lysogeny Broth (LB) Miller's agar (Alpha Biosciences) containing 100 µg/ml of carbenicillin. The allelic exchange was performed in PA14 and $\Delta hptB$ by conjugation. Clones were selected on carbenicillin 300 µg/ml and triclosan 25 µg/ml. The double recombination was performed on no salt LB agar with the addition of 10% sucrose.

The same method was used for the deletion of the *gacA* (PA14_30650) gene. Primers are listed in **Table 12.2**. The upstream region has been amplified using primers FJP_UP_gacA_pEX_For and FJP_UP_gacA_pEX_Rev. The downstream fragment has been amplified using FJP_DN_gacA_pEX_For and FJP_DN_gacA_pEX_Rev primers. The overlapping PCR was amplified with FJP_UP_gacA_pEX_For and FJP_DN_gacA_pEX_Rev. The obtained fragment was inserted in pEX18-Ap. The plasmid obtained (pFJP19) was transformed in SM10 and selected on LB agar with 50 µg/ml carbenicillin. Allelic exchange in PA14 and $\Delta hptB$ was performed as described (Hmelo *et al.*, 2015).

5.5.4 Construction of strains with gene expression reporters

Two-partnered conjugation with SM10 containing pCTX-*rsmY* or pCTX-*rsmZ* was performed with *P. aeruginosa* strains. Clones were selected on 125 µg/ml tetracycline and 25 µg/ml triclosan.

Plasmid pME3826 was transformed by electroporation as described previously (Choi *et al.*, 2006). Clones were selected on LB agar containing 125 µg/ml of tetracycline.

5.5.5 B-galactosidase assays

For the expression of *rsmY-lacZ*, *rsmZ-lacZ*, and *hcnA'-lacZ*, strains were inoculated in TSB from frozen stock and incubated as previously described with tetracycline when needed. Overnight cultures were diluted in fresh TSB or M9DCAA modified medium (Tremblay & Déziel, 2008) as specified at OD₆₀₀=0.5. The cultures were incubated at 34°C or 37°C in a TC-7 roller drum (New

Brunswick) at 110 RPM. β -galactosidase activity was measured as previously described (Miller & Lee, 1984). Measurements at 420 nm were performed using a Cytation 3 Multiplate Reader (Biotek). Experiments were performed using three biological replicates and were repeated at least twice. Prism 6 (GraphPad) was used for statistics.

5.5.6 Complementation experiments

The *rsmA* gene was amplified from gDNA of PA14 WT and the evolved C2 clone using primers For_Comp_rsmA_EcoRI_FJP and Rev_Comp_rsmA_HindIII (Table 12.2). The amplified fragment was inserted into pUCP20 using HindIII and EcoRI restriction sites. The obtained clones were isolated on LB agar with 100 μ g/ml carbenicillin. The obtained plasmid was electroporated into PA14 Δ *rsmA rsmY-lacZ* and clones were selected with 250 μ g/ml carbenicillin. PA14 *rsmY-lacZ* with pUCP20 was used as a control.

Complementation of Δ *hptB* and *rsmA::MrT7* with wild-type *rsmA* was achieved by amplifying the sequence of *rsmA* from genomic DNA of PA14 using the For_Comp_rsmA_EcoRI_FJP and Rev_Comp_rsmA_HindIII primers. The obtained fragment was inserted in the pUCP26 vector by digestion using EcoRI and HindIII Fast Digest restriction enzymes (Thermo Fisher Scientific). The plasmid obtained (pFJP18) was transformed in DH5 α and selected on LB agar with tetracycline 15 μ g/ml. The construct was verified by digestion with EcoRI and HindIII restriction enzymes (Thermo Fisher Scientific) and PCR. The pFJP18 plasmid was then electroporated into PA14 Δ *hptB* and *rsmA::MrT7* along with empty pUCP26 vector and clones were selected with tetracycline 125 μ g/ml. Four independent clones were tested for their swarming phenotypes.

5.5.7 Purification of RsmA

For purification of RsmA-WT-6xHis and RsmA^{R31S}-6xHis, plasmids pET29a(+)-RsmAH6 or pET29a(+)-RsmA^{R31S} were used respectively to produce the protein. Plasmid pET29a-RsmA^{R31S}-H6 was created by inserting a synthesized mutated version of RsmA^{R31S} without start and stop codon into NdeI and XhoI restriction sites (BioBasic) of pET29a(+). Plasmids were transformed in BL21 (DE3).

Purification was performed as previously described with slight modifications (Jean-Pierre *et al.*, 2015). The BL21(DE3) strain containing either pET29a(+)-RsmA-H6 or pET29a(+)-RsmA^{R31S}-H6 was grown overnight in TSB containing kanamycin 50 μ g/ml. Overnight cultures were diluted 1:1000 and grown to exponential phase in LB containing kanamycin 50 μ g/ml at 37°C with shaking

at 250 rpm. Cells were induced by adding IPTG at a final concentration of 1 mM and grown for an additional 4h. The culture pellet was suspended in a buffer containing 0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl pH7.5 and 2% imidazole. To purify the protein, a HisTrap HP 5 ml column (GE Healthcare) was used. Purification was performed using a solution of 0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl pH 7.5. To elute the His-Tagged protein, a solution of 0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl pH 7.5 and 0.5 M imidazole was applied using a 2-50% gradient in 100 minutes, completing with up to 100% imidazole solution in 15 minutes using an ÄKTA FPLC system (GE Healthcare). Fractions containing the protein were pooled and concentrated using an Amicon with a 3 KDa cut-off (Millipore). The protein was conserved in 10 mM Tris-HCl pH7.63 and 33% glycerol. A Bradford assay (Bio-Rad) was performed to determine protein concentration. Confirmation was performed using a Western-Blot with anti-His antibodies (Mouse antibodies to 6His-peptide) (Meridian Life Science) and Coomassie blue coloration to confirm protein purity.

5.5.8 Electrophoretic mobility shift assays of *rsmY* and RsmA/RsmA R31S (C2)

The *rsmY* small RNA with a T7 RNA polymerase promoter sequence has been produced as previously described (Jean-Pierre *et al.*, 2015). The fragment was amplified using 5'-*rsmY* and 3'-*rsmY* primers and a nested PCR was then performed using 3'-*rsmY* nested primer as the reverse primer. Purification was done using FavorPrep (Civic Bioscience).

For *in vitro* radioactive transcription, the 20µl *rsmY* template was added to transcription reaction containing 0.5ul of RNase inhibitor Ribolock at 40U/µl (Thermo Fisher), 1µl pyrophosphatase (Roche), 1 unit of T7 RNA polymerase and transcription buffer 5X (Hepes pH7.5 400mM, MgCl₂ 120nM, DTT 200nM and Spermidine 10mM). For nucleotide, 5mM of ATP, GTP and CTP were added. For UTP, 0.02 mM of non-radiolabelled and 5 µCi [α^{32} P]-UTP was added to the mix. The reaction was 3 hours at 37°C. The final volume was 100µl. A DNase I RNase free 2000 U/ml (NEB) treatment was done using 1µl for 15 minutes at 37°C. The resulting RNA was gel purified on an 8% 8M Urea denaturing PAGE and resuspended in 250ul of RNase-free water.

For the EMSA assay, various concentrations (0, 0.0005 µM, 0.005µM, 0.05µM, 0.25µM and 0.5µM) of each protein was mixed to 2 µl of radio-labelled RNA in a reaction described in Jean-Pierre *et al.* (Jean-Pierre *et al.*, 2015) containing of 20mg of non-specific t-RNA competitor, 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 50mM KCl, 5mM DTT. Negative control was done in the same condition containing no protein but containing glycerol and Tris-HCl 10mM pH7.5. The reaction was incubated 30 minutes at 37°C. The mixture was added mixed to 6X loading buffer containing (40% sucrose, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue) and loaded on an 8%

(29:1) native polyacrylamide native gel using Tris-Borate EDTA (TBE) as the running buffer. The gel was scanned using a Typhoon PhosphorImager FLA9000(GE Healthcare) and ImageQuant software for analysis of the image. The contrast of the image was increased. The intensity of radioactivity could then be measured.

5.5.9 Molecular modeling of the WT and R31S RsmA-RsmY complexes

To investigate atomic-scale contributions of the R31S mutation in RsmA, structural alignments were first performed between apo and holo forms of RsmA, RsmE, and RsmN homologs using PDB entries 1VPZ, 4KJI, 2MF0, and 2JPP in UCSF Chimera 1.14 (Pettersen *et al.*, 2004). Since regulators bind their respective RNA ligands through a conserved hairpin RNA motif, the RsmY ligand was modeled from the experimental structure of the RsmZ analog bound to RsmN (PDB 4KJI). RNA sequence alignment was performed using the Needleman-Wunsch algorithm in package BioLabDonkey 1.9-17. We first identified RsmY/Z hairpin motif sequence identity, followed by mutational transposition of RsmY nucleotides in the RsmZ structural template. Once the molecular sRNA hairpin motif was created, the RsmA^{R31S} mutant was built in a similar fashion by replacing Arg31 with Ser31. A physiological pH value of 7.4 was applied to assign protonation states of charged amino acids, with pKa values predicted according to parameters reported by (Krieger *et al.*, 2006). Rotameric positions and RsmA-RsmY refinement for WT and R31S complexes was optimized by performing molecular dynamics simulations (500 ps, 298K) under explicit solvent conditions with a water density of 0.997 g/ml and pressure density stabilized by the Manometer1D tool. This protocol enables a rescaling factor to be applied over the entire MD cell (cuboid shape) to maintain constant pressure during simulations. The unit cell was extended 10 Å with solute on each side of the system, and ion concentration was set as a mass fraction of 0.9% NaCl to emulate physiological conditions. The simulation time step ran at 2x1.25 fs in periodic boundary conditions using particle-mesh Ewald (PME) and 8.0 Å cutoff for non-bonded real space forces. The CorrectDrift algorithm was applied to prevent solute molecules from diffusing around and crossing periodic boundaries. A final energy minimization step was performed after refinement of the RNA-protein complexes. Building of the RsmY RNA hairpin motif, structural refinement, molecular dynamics simulations (MD), and energy minimization steps for all molecular systems were performed using YASARA-Structure 19.12.14 (Krieger & Vriend, 2015). The YASARA2 force field was applied for refinement, solvation, and MD simulations of RsmA-RsmY complexes (Krieger *et al.*, 2009). RNA-protein interface analysis of all complexes was also performed using the MolDock scoring function provided by the Molegro Virtual Docker suite, version 6.0 (Thomsen & Christensen, 2006).

5.5.10 Stability and energy contributions of the R31S mutation in RsmA

The structural and energetic effects caused by the R31S mutation were assessed by evaluating unfavorable torsion angles and investigating the local structural environment of the mutated position using CUPSAT (Parthiban *et al.*, 2006). We also used DUET to perform mutational analysis based on energy function calculations (Pires *et al.*, 2014). Analysis and prediction of protein stability changes upon mutation was also performed by Normal Mode Analysis using DynaMut (Rodrigues *et al.*, 2018). Finally, Mupro was used to calculate neural networks that compute the effects of mutation from sequence and structure predictions (Cheng *et al.*, 2006).

5.6 Results:

5.6.1 Evolution on the $\Delta hptB$ mutant restores swarming phenotype by selecting mutations in the Gac/Rsm regulatory pathway

We previously reported a directed swarming evolution experiment on the $\Delta hptB$ mutant of *P. aeruginosa* PA14 to identify elements capable of restoring a swarming phenotype similar to wild-type (Robitaille *et al.*, 2020). Two different groups of clones had partially or completely restored swarming abilities. Thus, the evolved $\Delta hptB$ clones acquired compensatory mutations. We previously reported that mutations in *lasR* characterized the partially recovered mutants (Robitaille *et al.*, 2020). Here, we focus on mutations involved in the complete recovery of swarming motility of the $\Delta hptB$ mutant. Whole-genome sequencing was performed on clones C2 and C4, which completely regained their swarming phenotype (**Fig. 5.1**) (Robitaille *et al.*, 2020). Clone C4 has a single non-synonymous point mutation in the *gacA* gene (PA14_30650), resulting in a substitution at residue 90 (c.268C>T; proline to serine (p.P90S)) when compared to the parental $\Delta hptB$ protein sequence. Clone C2 carries a mutation (c.91C>A) in the *rsmA* gene (PA14_52570), resulting in an arginine to serine substitution at position 31 of the protein sequence (p.R31S) when compared to the parental $\Delta hptB$ genome sequence. No additional mutations were identified in these two clones.

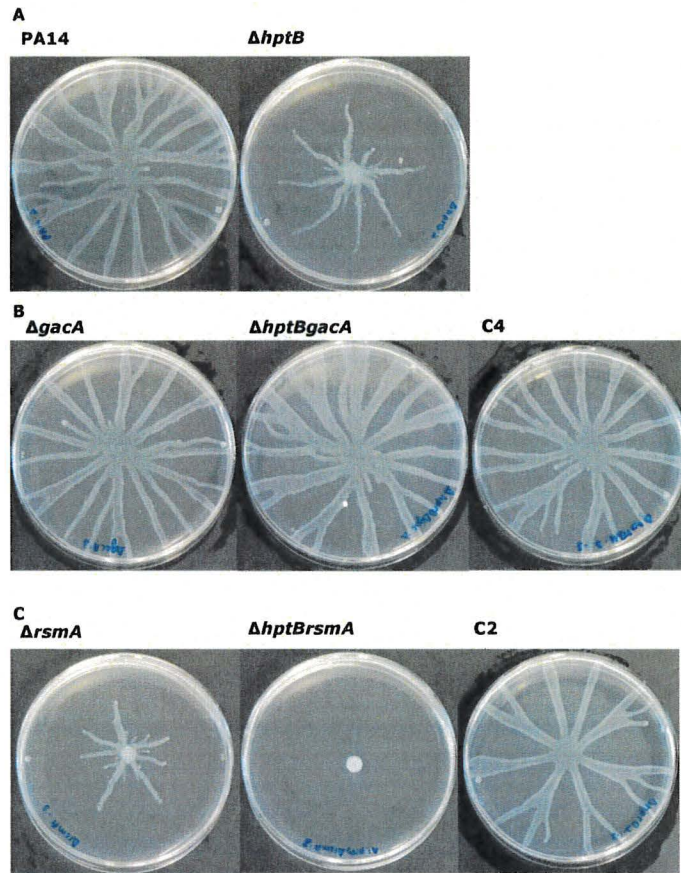


Figure 5.1: Swarming phenotype of the C2 and C4 clones is similar to wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

Swarming motility of (A) PA14 and $\Delta hptB$ (B) $\Delta gacA$, $\Delta hptBgacA$, and clone C4, (C) $\Delta rsmA$, $\Delta hptBrsmA$, clone C2 after 20h of incubation at 34°C.

Given the emergence of non-synonymous mutations in the *gacA* and *rsmA* genes (clones C4 and C2, respectively) after repeated passages of the $\Delta hptB$ isogenic strain to select for a recovered swarming phenotype, we verified whether the acquired mutations were responsible for the rescue. We first looked at the activity of GacA in the C4 clone. As shown in **figure 5.1B**, inactivation of *gacA* in a $\Delta hptB$ strain restores the swarming phenotype. Accordingly, swarming of clone C4 is similar to that of $\Delta gacA$ and $\Delta hptBgacA$ mutants. Furthermore, we verified whether the activity of GacA is affected in clone C4 by looking at the transcription of its direct targets, *rsmY* and *rsmZ* (**Fig. 5.2** and **Fig. 12.1**). In agreement with a loss of GacA function, the transcription of both sRNAs is significantly lower in the evolved clone when compared to its parental $\Delta hptB$ background. Clone C4 shows no significant difference in expression of *rsmY* and *rsmZ* with the $\Delta gacA$ and $\Delta hptBgacA$ mutants. Thus, these results demonstrate that clone C4 acquired an

inactivating mutation in the GacA regulator, allowing for the rescue of the swarming defect in the $\Delta hptB$ parental strain.

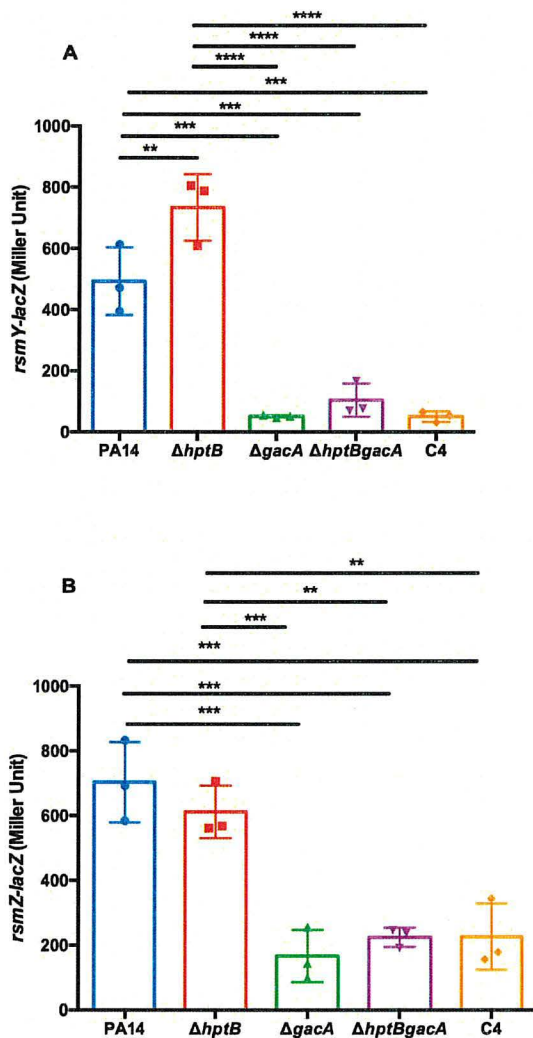


Figure 5.2: Analysis of *rsmY* and *rsmZ* expression in the C4 clone mutant

(A) β -galactosidase activity of a *rsmY-lacZ* reporter (B) and *rsmZ-lacZ* reporter in bacteria grown in TSB at 37°C after 5h of incubation. One-way ANOVA was performed comparing each strain to each other ($*\leq 0.05$, $**\leq 0.01$, $***\leq 0.001$, $****\leq 0.0001$). See Fig. 12.1 for the growth of each strain.

We then looked at the effect of the *rsmA* mutation in the C2 clone. Loss of *hptB* or *rsmA* usually results in an important defect in swarming motility (Fig. 5.1A-C) (Heurlier *et al.*, 2004b; Hsu *et al.*, 2008; Jean-Pierre *et al.*, 2017), while a combination of both *rsmA* and *hptB* mutations results in a complete loss of coordinated social movement (Fig. 5.1C). However, swarming was rescued in clone C2 (Fig. 5.1C). This was surprising given that the over-expression of RsmA in the $\Delta hptB$ background also results in a rescue of the swarming phenotype (Fig. 12.2). Thus, we considered

two possible explanations for these results: [1] the single nucleotide substitution in *rsmA* does not influence the function of RsmA, and another undetected mutation is responsible for the swarming recovery, or [2] the arginine-to-serine substitution in RsmA in the evolved clone C2 somehow increases the activity of this regulator. To verify the first possibility, which we thought very unlikely considering the high coverage of our genome sequencing, we looked at the complementation of a $\Delta rsmA$ markerless mutant with a plasmid carrying the RsmA^{R31S} substitution from clone C2 by measuring the transcription of *rsmY*. The transcription of *rsmY* and *rsmZ* are downregulated in a $\Delta rsmA$ mutant background (Heurlier *et al.*, 2004b; Valverde *et al.*, 2003). We observed that a plasmid-borne *rsmA*^{R31S} can restore expression of *rsmY* in $\Delta rsmA$, although incompletely (**Fig. 5.3 and Fig. 12.3**). Thus, RsmA^{R31S} is functional, but with a somewhat altered activity, indicating that the mutation in clone C2 does not result in abrogation of the activity of the protein. We then looked at the translation of *hcnA* mRNA transcripts, known to be directly repressed by RsmA (Lapouge *et al.*, 2007; Pessi *et al.*, 2001). Interestingly, we observed that the translation of *hcnA* is lower in the C2 clone compared to the $\Delta hptBrsmA$ mutant, but similar to the wild-type strain (**Fig. 5.4A and Fig.12.4A**). Thus, to further understand the impact of the observed non-synonymous mutation in the *rsmA* gene of clone C2, we looked at the transcription of *rsmY* and *rsmZ* (**Fig. 5.4 B-C and Fig.12.4B-C**). We observed that the C2 clone exhibits a higher expression of both sRNAs when compared to the $\Delta rsmA$ and $\Delta hptBrsmA$ mutants, while it is lower than in the $\Delta hptB$ mutant. These results confirm that RsmA is still functional in clone C2. In fact, the RsmA regulatory activity of the evolved clone is similar to that of the wild-type PA14 strain (**Fig. 5.4 A-C**). Taken together, these data indicate that RsmA^{R31S} is active in the C2 clone, but its function is altered when compared to wild-type RsmA. Importantly, RsmA^{R31S} is able to rescue the swarming defect imposed by the loss of HptB.

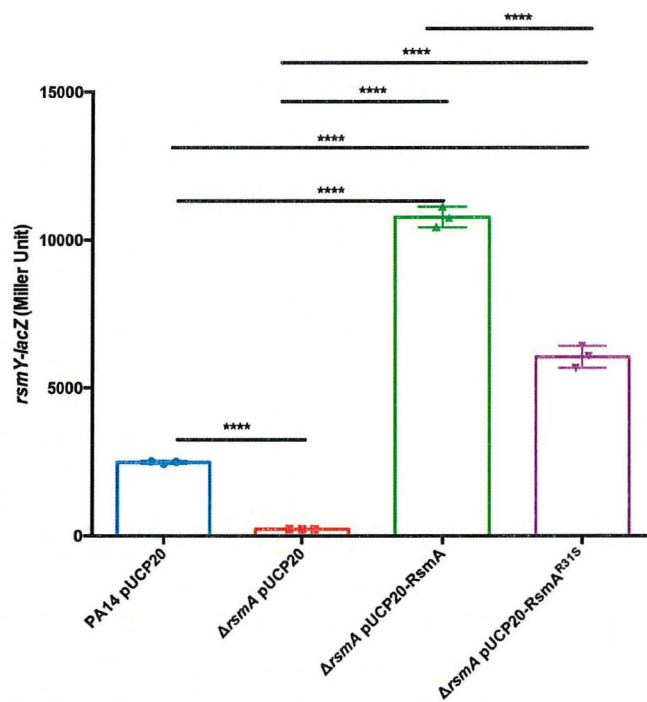


Figure 5.3: Complementation of mutant *rsmA* with pUCP20 as a control, pSR15 (pUCP20-*rsmA*) and pSR16 (pUCP20-*rsmAR31S*) for the *rsmY-lacZ* expression at 6h in TSB at 37°C.

One-way ANOVA was performed to compare each strain to each other. (* ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 , **** ≤ 0.0001). See **Fig. 12.3** for the growth of each strain.

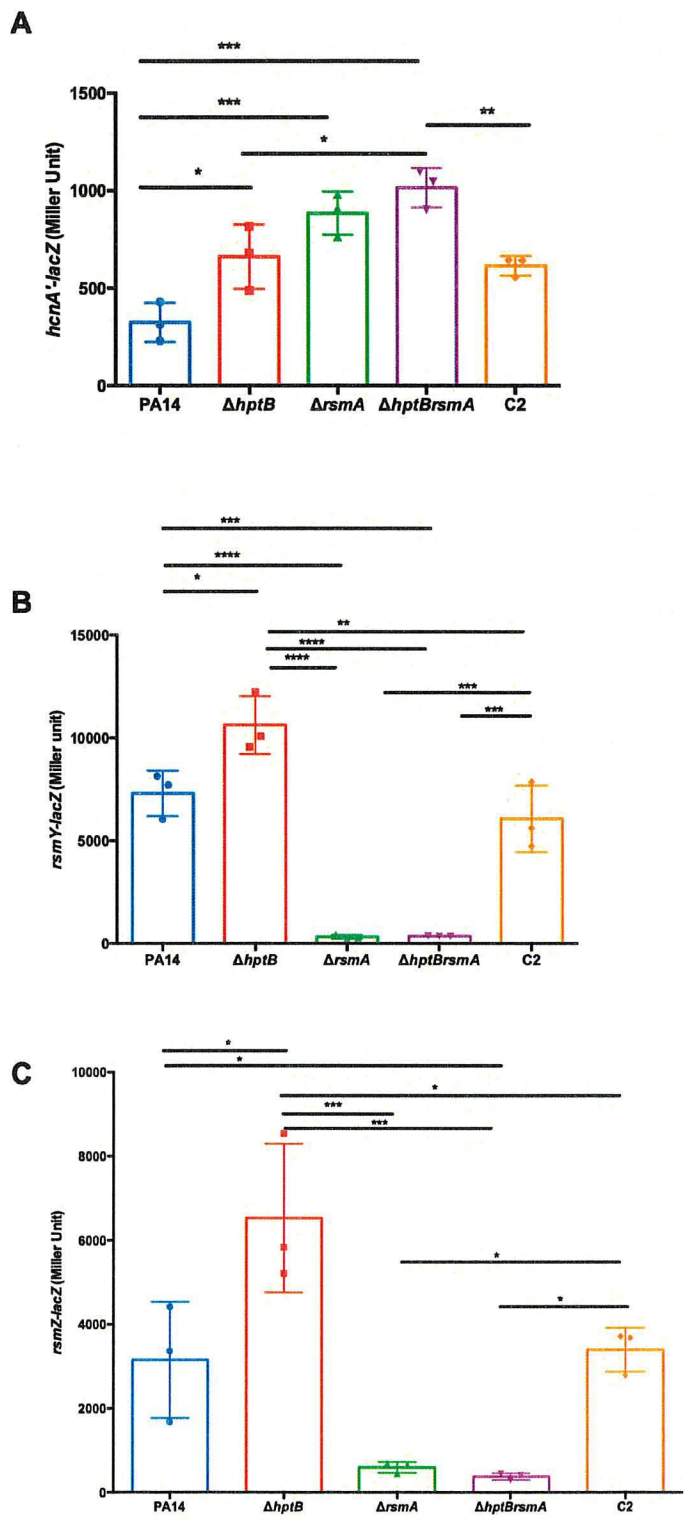


Figure 5.4 Expression of RmsA-regulated targets in the C2 clone mutant.

(A) β -galactosidase activity of *hcnA-lacZ*, (B) *rsmY-lacZ* (C) and *rsmZ-lacZ* at 34°C in M9DCAA at 8h for *hcnA-lacZ* and 6h for *rsmY-lacZ* and *rsmZ-lacZ*. One-way ANOVA was performed to compare each strain to each other. (* \leq 0.05, ** \leq 0.01, *** \leq 0.001, **** \leq 0.0001). See **Fig 12.4** for the growth of each strain.

5.6.2 The R31S mutation alters RsmA affinity for RsmY

One hypothesis to explain our observations is reduced binding affinity, and thus repression, of RsmA^{R31S} activity by RsmY/Z. We first tested this hypothesis by building a molecular model of the RsmA-RsmY complex. This allowed us to evaluate the atomic-scale impact of the R31S mutation on the structure and binding energy of complex formation between WT RsmA and RsmA^{R31S}. Our structural model suggests that the wild-type R31 residue is most likely involved in the stabilization of the U₈₈A₈₉ nucleotide pair located downstream of the conserved GGA motif in RsmY. Replacing the long, charged, and flexible terminal guanidinium arginine moiety for the small and polar hydroxyl group of a serine side chain results in the loss of two key hydrogen bonding interactions between RsmA and RsmY (**Fig. 5.5**). In addition, increased local flexibility combined with perturbations in steric contacts and short-/long-range electrostatic interactions result in a total estimated energy penalty contribution of ~18 kcal/mol in variant RsmA^{R31S} relative to wild-type RsmA. This energy penalty most likely results in important binding variability within the protein-ligand ensemble, especially considering that binding free energy (ΔG) values of 2-3 kcal/mol are sufficient to impart significant alterations in protein-RNA interactions (Barik *et al.*, 2016; Krüger *et al.*, 2018).

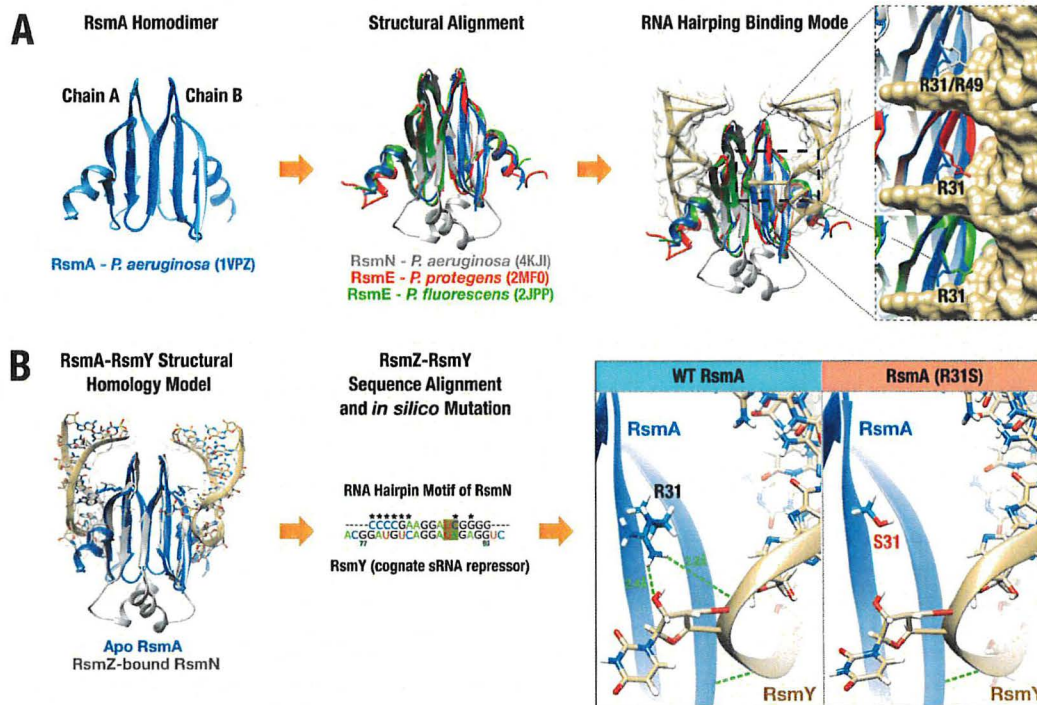


Figure 5.5: Prediction of RsmAR31S interaction with sRNA RsmY.

Structural effects induced by the R31S mutation in post-transcriptional regulator RsmA upon binding to its sRNA repressor RsmY. (A) Structural comparison between RsmA from *P. aeruginosa* (blue, left and middle panel) and three homologous regulators (middle panel): RsmN from *P. aeruginosa* (gray, PDB 4KJI), RsmE from *P. protegens* (red, PDB 2MF0), and RsmE from *P. fluorescens* (green, PDB 2JPP). Overlay illustrates structural conservation of post-transcriptional regulators throughout the *Pseudomonas* genus. Regulator protein homologs also bind RNA targets in a similar fashion, involving the conservation of a structural RNA hairpin motif (gold surface), which triggers repositioning of the conserved R31 side chain (R49 in RsmN) upon RNA binding (right panel). This further emphasizes the role played by the wild-type R31 in stabilization of the $U_{88}A_{89}$ nucleotide pair located downstream of the conserved GGA motif in RsmY. (B) Structural model of the RsmA-RsmY complex built using the highly homologous RsmN-RsmZ pair as cognate template (gray, PDB 4KJI). *In silico* point mutations (middle panel, nucleotides marked with a star) were introduced to convert the RsmZ hairpin sequence motif into the corresponding putative RsmY hairpin analog bound to RsmA. The right panel shows how the R31S mutation destabilizes the RsmA-RsmY binding complex by abrogating two putative hydrogen bonding interactions (green dashed lines) between the terminal wild-type R31 guanidinium moiety and the $U_{88}A_{89}$ nucleotide pair downstream of the conserved GGA motif in cognate RsmY repressor.

We then used electrophoretic mobility shift assays (EMSA) to experimentally challenge this model and investigate interactions between wild-type and RsmA^{R31S} upon RsmY binding (Fig. 5.6). Our EMSA results show that RsmA binds to RsmY and forms three different protein-RNA complexes, which are reflected by the known binding of several RsmA monomers to multiple binding sites on a RsmY sRNA molecule (Janssen *et al.*, 2018b; Marden *et al.*, 2013). The RsmY sRNA has seven GGA sites where RsmA can bind. The second, fifth and seventh binding sites are the most determinant for RsmA-RsmY complex formation (Janssen *et al.*, 2018b). At tested RsmA concentrations where protein:RNA interactions are detected, both wild-type and RsmA^{R31S} at the concentration of 0.05 μ M formed complex 1 (Fig. 5.6B). However, at higher concentrations,

RsmA^{R31S} can only form complex 2. In contrast, the wild-type protein was able to shift RsmY, forming complex 3, which was not observed for RsmA^{R31S} at the same concentration (Fig. 5.6A and Fig. 12.5).

To confirm our observations, the radioactive intensity of each lane was measured for each section found in figure 5.6 (A-B-C) to quantify the three complexes. The intensity of each section was then divided by the total intensity of the lane (sum of intensities of sections A, B, C for each concentration) to determine the ratio of RNA for each section (Fig. 12.6). In section A, complex 3 was found and could be quantified (Fig. 12.6A) while the first and second complexes were quantified in section B (Fig. 12.6B). Unbound RNAs were quantified in section C (Fig. 12.6C). These data demonstrate that RsmA^{R31S} does not bind as well as wild-type RsmA to RsmY, which validates our *in silico* model and explains the results we observed for our *in vivo* assays.

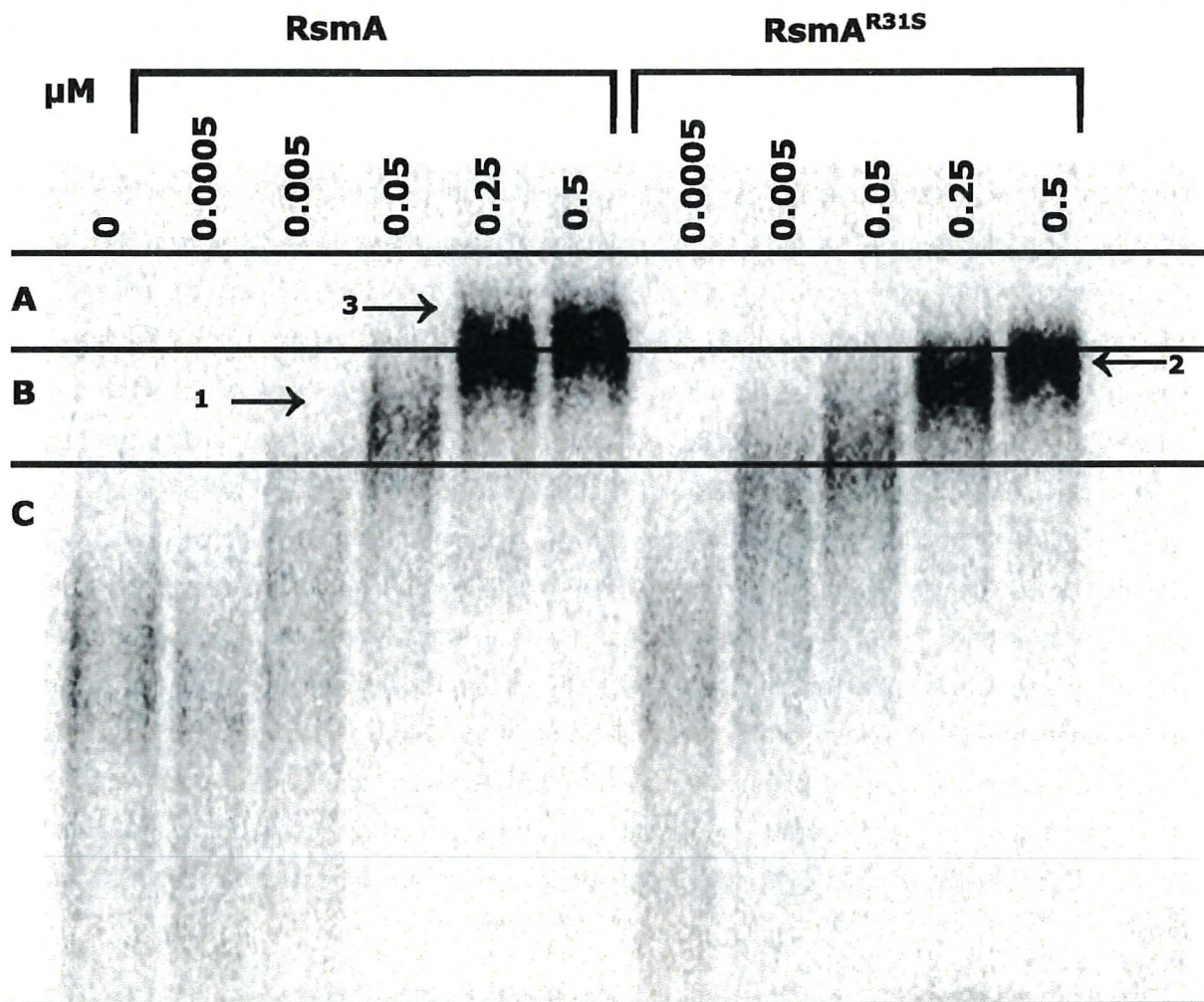


Figure 5.6: *In vitro* interaction of RsmA and RsmA^{R31S} with RsmY.

EMSA of *rsmY* small RNA by wild-type RsmA (WT) and mutated RsmA^{R31S} with 0 to 0.5 μ M of each protein. Sections A, B, C represent the delimitation of the boxes used to measure radioactivity for Fig 12.6. Complexes are identified by numbers 1-2-3 and arrows on the EMSA.

5.7 Discussion

Here we used swarming motility as a model social phenotype to better understand the implication of HptB and the Gac/Rsm pathway in surface behavior of *P. aeruginosa*. The post-transcriptional regulator RsmA favors swarming motility and the acute mode of infection while repressing functions involved in the development of chronic infections, such as biofilms. Even though swarming is regulated inversely than biofilm formation, evidence suggests that swarming could play a role in early steps of biofilm development (Caiazza *et al.*, 2005; Shrout *et al.*, 2006). Furthermore, swarming cells are more resistant to antibiotics (Lai *et al.*, 2009). Our previous report on the swarming-deficient *hptB* mutant demonstrated that flagellar motility and production of a wetting agent are not the only elements essential for swarming motility; using directed evolution of $\Delta hptB$ under swarming conditions, we found that *lasR*-defective mutants partially regained the ability to swarm (Robitaille *et al.*, 2020). Here, we investigated a second group of mutants in the Gac/Rsm pathway that also arise in a $\Delta hptB$ background during experimental swarming evolution and that are fully rescued in their surface motility. One of these mutants (clone C4) had a modification in the *gacA* gene resulting in a protein with a deficient activity. Indeed, the transcription of both *rsmY* and *rsmZ* in clone C4 are at the same level as in a $\Delta hptB gacA$. This finding was not surprising, as we had previously found that loss of *rsmY* and *rsmZ*, which are the primary targets of GacA, completely rescues the swarming defect in a $\Delta hptB$ background (Jean-Pierre *et al.*, 2015). Spontaneous mutations in the *gacA* and *gacS* genes have been previously well-documented in different *Pseudomonas* strains and various growth conditions (Duffy & Défago, 2000; Song *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2018), including in the context of swarming evolution experiments (Song *et al.*, 2016). The mutation found in *gacA* is located at a well-conserved position (Heeb & Haas, 2001; Reimann *et al.*, 1997) in the receiver domain next to the aspartic acid essential for GacS phosphorelay (Heeb & Haas, 2001). Since the mutation led to a loss-of-function, it could prevent the phosphotransfer by the GacS sensor. Loss of GacA essentially abolishes *rsmY* and *rsmZ* expression, resulting in an increased availability of RsmA and thus increased repression of its multiple mRNA targets leading to an indirect promotion of swarming motility.

The experimental evolution with the $\Delta hptB$ mutant also selected for a mutation in the *rsmA* gene which led to a restored swarming phenotype. This was completely unexpected since loss of RsmA

activity decreases swarming motility (**Fig. 5.1C**) (Heurlier *et al.*, 2004b). A spontaneous mutation in that gene has never been reported. The best explanation for this surprising mutation was that RsmA has an altered protein activity caused by this single nucleotide substitution. In contrast with the $\Delta hptBrsmA$ and $\Delta rsmA$ mutants, the evolved C2 clone is capable of a wild-type-like swarming, which further supports the observation that the mutation obtained in the evolved clones does not result in a non-functional protein. Those results also concur with *rsmY* and *rsmZ* expression assays: transcription of both sRNAs is lower in $\Delta rsmA$ and $\Delta hptBrsmA$ compared to PA14, but clone C2 is similar to PA14. The same observations were also made when looking at the translation of *hcnA*. These results support a model where the emergence of the single nucleotide substitution mutation in *rsmA* results in a modification rather than a loss of protein function.

To better understand how the emergence of a RsmA^{R31S} substitution in the evolved $\Delta hptB$ strain could rescue its swarming motility phenotype without affecting the expression of *rsmY* and *rsmZ*, we hypothesized that the affinity between RsmA^{R31S} and target RNAs could be impacted. In *Escherichia coli* K12, a R31 substitution of CsrA (RsmA homolog) to alanine subtly affects the *in vivo* regulation of CsrA on target genes or phenotypes (Mercante *et al.*, 2006). However, this effect is not as important as observed with other neighboring residues. R31 is not strictly conserved between bacterial species, although positively charged residues are primarily found at this position (arginine, lysine, histidine) (Heeb *et al.*, 2006; Mercante *et al.*, 2006) (**Fig. 12.7**). Residue R44 is involved in RNA interaction and R31 most likely plays an important accessory role impacting binding affinity and/or ligand discrimination since it appears to stabilize the U₈₈A₈₉ nucleotide pair located downstream of the conserved GGA motif in RsmY (**Fig. 5.5**). This positively charged residue is solvent-exposed and its interaction with RNA is mediated by two hydrogen bonds involving its terminal guanidinium moiety (Heeb *et al.*, 2006; Mercante *et al.*, 2006). In contrast, the mutation in C2 introduces a serine instead of an arginine, leading to a small and polar residue unable to maintain these interactions, therefore affecting RNA binding affinity and/or discrimination.

We confirmed that RsmY affinity for RsmA with the R31S substitution is modified due to different RsmY mobility shift when interacting with either RsmA or RsmA^{R31S} in EMSA experiments (**Fig. 5.6**). The most probable interpretation is that the loss of interaction between the R31 residue and RNA reduces affinity for some binding sites, notably with GGAUA, such as in RsmY, as opposed to other sites. The complexes between sRNA and RsmA are the result of the multiple RsmA

molecule binding to the different GGA motifs of RsmY (Janssen *et al.*, 2018b). Even though both RsmA and RsmA^{R31S} are capable of interacting with RsmY and forming Complex 1, only the wild-type protein can form Complex 3 which most likely represents a higher capacity to bind RsmY molecules compared to RsmA^{R31S}. Indeed, this was confirmed when we looked at the radioactivity signal of the protein-RNA complexes; clearly, RsmA^{R31S} does not bind as well as WT RsmA to RsmY (**Fig. 12.6A**). Affinity between RsmA^{R31S} and RsmY shows that the inhibition by RsmY is not as efficient, which supports the fact that the C2 clone exhibits similar activity as the wild-type protein (**Fig. 5.4B**), but different than $\Delta rsmA$ and $\Delta hptBrsmA$. Also, complementation experiments (**Fig. 5.3**) confirmed EMSA results since RsmA^{R31S} complement $\Delta rsmA$, but not to the same extent than RsmA wild-type. The difference of interaction between RsmA and RsmA^{R31S} could be confirmed using other target of RsmA as RsmZ to confirm if this target is affected the same way.

Our results indicate that RsmA inhibits, directly or indirectly, an unknown repressor impacting swarming motility. However, this repressing factor is still unknown, and it is thus not yet possible to test its activity with RsmA and RsmA^{R31S} *in vitro*. RsmY has many RsmA binding sites and displays secondary structures with multiple stem-loops with RsmA binding sites (Janssen *et al.*, 2018b). Depending on the different mRNAs that are controlled by RsmA, the number of available binding sites and/or secondary structures could probably affect the binding capacity between the protein and target RNAs. The RsmA:mRNA interaction of these RsmA-controlled mRNAs implicated in swarming motility could be less impacted by the mutation R31S than RsmY, due to their sequence and structure, and then explain the rescue of swarming in the $\Delta hptB$ background. Also, additional elements such as chaperone Hfq, which can bind some mRNA transcripts that associate with RsmA, could contribute to RNA binding and were missing in our *in vitro* experiments (Gebhardt *et al.*, 2020). However, our data strongly support the fact that a modified RsmA binds RsmY less efficiently, impacting its inhibitory effect, which further explains the swarming rescue of the C2 clone.

We wanted to understand why the swarming population of an evolved $\Delta hptB$ mutant selected for a spontaneous mutation in RsmA. HptB can inhibit *rsmZ* expression under swarming conditions independently of GacA (Jean-Pierre *et al.*, 2017) and also inhibits *rsmY* and *rsmZ* by indirectly influencing GacA. We can then hypothesize that a $\Delta hptB$ favours the inhibition of RsmA by

increasing expression of *rsmZ* and *rsmY* which could explain its lack of swarming. The RsmA mutation in the C2 evolved clone most likely results in lower affinity for RsmY and RsmZ, compensating for the $\Delta hptB$ mutation. The mutated RsmA version has lower *rsmZ* and *rsmY* expression than $\Delta hptB$ mutants. This could explain the selection of a spontaneous mutant in our directed evolution experiment and thus the benefit of having a mutation that modifies RsmA activity. Additionally, although arginine is primarily found at position 31, we found two naturally occurring RsmA variants at this position in *P. aeruginosa* strains using BLAST (NCBI) (R31G and R31C). We aligned these sequences (and other sequences of RsmA homologs in different strains) to PA14 RsmA sequence in a multiple sequence alignment to observe the variation found at position 31 (**Fig. 12.7**). This can indicate that naturally occurring RsmA can tolerate R31 replacements, although R31 is largely favored for optimal activity. Understanding this mutation could help identify the unknown element(s) necessary for swarming motility.

Previous experimental evolution on wild-type PA14 strain under swarming conditions did not reveal a mutation in *rsmA* (Boyle *et al.*, 2013; van Ditmarsch *et al.*, 2013). Also, passaging $\Delta hptB$ in liquid cultures did not result in a rescue of swarming motility (Robitaille *et al.*, 2020). It is likely that the use of swarming conditions and a *hptB* mutant background have selected for the mutation in *rsmA*. Our results show the central role of RsmA in swarming regulation. Decreasing RsmA repression by its cognate sRNAs was the only evolved way to relieve sRNA-mediated repression of swarming in $\Delta hptB$ mutant. We could achieve it through selective pressure forcing the $\Delta hptB$ mutant to swarm; something that would have not been obtained if we had adopted a classical transposon mutagenesis screening approach where only loss-of-function mutants can result. We confirmed the role of RsmA as a master switch between bacterial acute (motile lifestyle) and chronic infection (sessile lifestyle) and identified a residue that is critical for its activity. Knowing this, we could now modulate its function by permitting a better adaptation to its environment. Even though RsmA regulates secondary metabolites, it could act as a target to inhibit biofilm formation.

5.8 Acknowledgments

We thank Fabrice Jean-Pierre and Charles Morin for construction for the $\Delta gacA$ and $\Delta hptB gacA$ mutants and for helpful discussions. We also gratefully acknowledge the technical support provided by Myriam Létourneau and Émilie Boutet for the RsmA purification and EMSA assays, respectively.

6 DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE #2

6.1 Contexte

Afin de mieux comprendre l'impact de la mutation dans le gène *rsmA* du clone C2, des expériences supplémentaires ont été réalisées. Tout d'abord, le niveau de traduction de la protéine RsmA dans le clone C2 a été déterminé en utilisant un rapporteur traductionnel.

Dans un deuxième temps, le lien possible entre RsmA et l'émergence de mutants *lasR*, lors d'une d'évolution dirigée, a été étudiée. RsmA et LasR ont des cibles communes (production de HCN, T6SS, exopolysaccharide). RsmA se lie à leur ARN messager inhibant leur traduction alors que LasR se lie à leur promoteur pour permettre la traduction (Brencic & Lory, 2009; Gilbert *et al.*, 2009; Irie *et al.*, 2010; Pessi & Haas, 2000; Pessi & Haas, 2001; Sana *et al.*, 2012). Le but de ces expériences était de déterminer si l'absence de LasR ne permet pas à RsmA d'être plus disponible intracellulairement (car moins d'ARNm cibles présents) et donc de réguler les ARNm qui sont en lien avec la motilité de type *swarming* (Fig. 6.1).

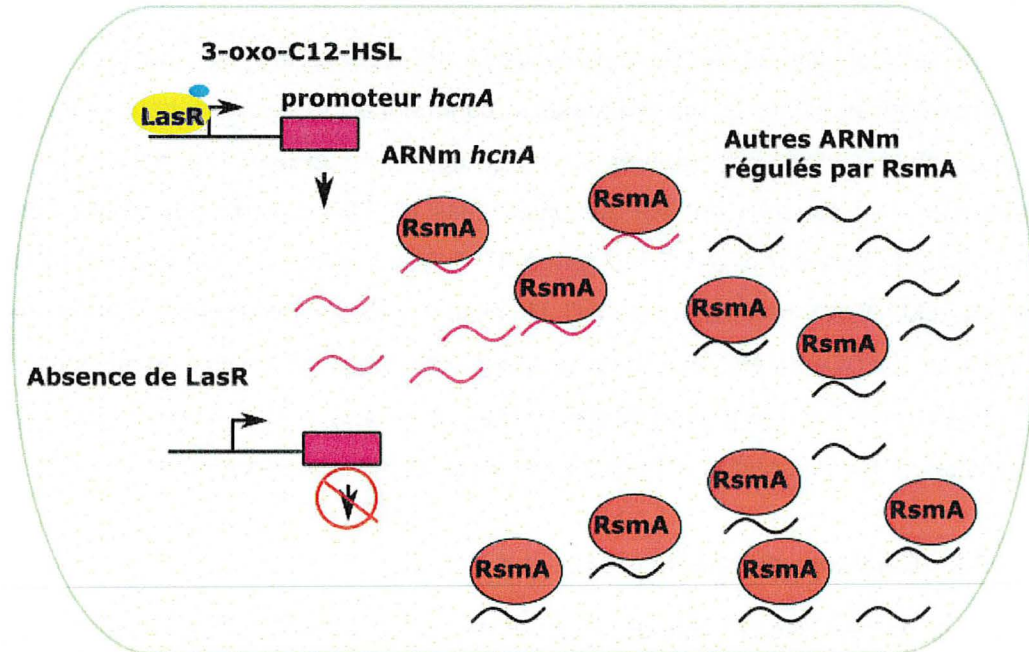


Figure 6.1 : Schémas représentant l'effet de l'absence de LasR sur la régulation de RsmA

L'absence de LasR entraîne l'absence (ou la diminution) des ARNm qui sont transcrit par la régulation de LasR qui se lie au promoteur. Certains de ces ARNm, comme *hcnA*, sont aussi régulés par RsmA. Donc, l'hypothèse est qu'une diminution de ces ARNm rend RsmA plus « disponible » pour les autres ARNm régulés par celui-ci.

Ceci pourrait expliquer l'émergence de ces mutants, en partie, dans l'évolution du mutant $\Delta htpB$. Pour ce faire, des évolutions dirigées en condition *swarming* ont été réalisées sur les mutants dans les gènes *rsmA* et *rsmYZ* afin de déterminer si des mutations dans ces gènes empêcheraient l'apparition de mutants *lasR*⁻. En effet, dans un mutant *rsmYZ*, RsmA n'est plus inhibé et donc est plus disponible pour la régulation d'ARNm. Ainsi la pression pour l'émergence de mutants *lasR*⁻ peut être moins grande si l'hypothèse est vraie. L'absence de mutants *lasR*⁻ spontanés dans l'une ou l'autre des évolutions confirmerait le lien entre le QS et le système Gac/Rsm.

Par la suite, des tests préliminaires pour déterminer si la présence des mutations dans le gène *lasR* favorisait l'activité de RsmA ont été réalisés. Plusieurs ARNm connus pour être contrôlés directement par LasR sont inhibés par RsmA au niveau de la traduction et leur niveau présence et impact sur RsmA a été étudié.

6.2 Matériels et méthodes

La bactéries et plasmides ayant été utilisés pour ces expériences sont décrits au **Tableau 6.1**.

6.2.1 Traduction de RsmA

Pour le suivi de traduction de RsmA, le plasmide pFJP9 a été ajouté aux souches PA14, $\Delta rsmA$, $\Delta htpBrsmA$, $\Delta htpB$ et clone C2 par conjugaison comme il a été décrit précédemment (**Section 3.4.10**). Les clones ont été sélectionnés sur du LB agar avec 25 µg/ml de triclosan et 125 µg/ml de tétracycline. Les souches ont été inoculées dans du TSB à partir des stocks congelés et incubées dans un tambour rotatif à 110 rpm à 37°C. Les cultures ont été diluées à DO₆₀₀=0,05 dans le milieu M9DCAA et incubées à 34°C. Un aliquot a été prélevé toutes les heures entre 3 et 8h d'incubation. La DO₆₀₀ a été mesurée et un volume de 100 µl a été utilisé pour mesurer l'activité β-galactosidase comme décrit précédemment (**Section 5.4.5**). Trois cultures indépendantes ont été testées pour chaque souche et l'expérience a été effectuée une seule fois.

6.2.2 Évolution dirigée de $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$

Les conditions de l'évolution dirigée des mutants $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$ sont les mêmes que pour les évolutions effectuées chez PA14 et $\Delta htpB$ décrites au **Chapitre 3 (Section 3.4.2)**. Quatre lignées indépendantes ont été réalisées et l'expérience a été réalisée deux fois pour chaque mutant. Le suivi de l'apparition des mutants *lasR*⁻ a été réalisé au deuxième essai aux passages 7 et 10.

Pour chaque lignée, à ces deux passages, des clones des populations au bout des dendrites ont été isolés sur du LB agar. Par la suite, douze clones par lignée ont été repiqués dans un volume de 200 µl de milieu KingA et ont été incubés 16 h sur une plaque agitatrice toute la nuit à 600 rpm. Le milieu KingA favorise la production de pyocyanine chez *P. aeruginosa* (King *et al.*, 1954), permettant de détecter une surproduction chez des souches avec un LasR défectueux (Dekimpe & Déziel, 2009).

6.2.3 Expérience de l'activité de RsmA en présence du promoteur de *hcnA*

Le plasmide pSR14 (pJN105-prom *hcnA*) a été construit en amplifiant la région promotrice de *hcnA*, de -88 jusqu'à après les 9 premiers codons, à partir du plasmide pME3826 avec les amorces *hcnAPromEcoRI* -F (5'-GCTCGAATTCGATACCCACCTGTCATGG-3') et *hcnA9codonSacl*-R (5'-GGATGAGCTCATCGTGTGGACGTTCAAGAAG-3') (Pessi & Haas, 2000). Le fragment a été digéré par *EcoRI* et *Sacl* et inséré dans pJN105. Les clones ont été sélectionnés sur du LB agar avec la gentamycine 50 µg/ml. Les plasmides pJN105 et pSR14 sont intégrés dans PA14 $\Delta rsmA::rsmA'-lacZ$ et PA14::*rsmA'-lacZ* par électroporation (Choi *et al.*, 2006). Les clones ont été sélectionnés sur du LB agar avec 100 µg/ml de gentamycine.

Pour mesurer l'activité de RsmA en présence ou absence de grandes quantités de d'ARNm de *hcnA*, les souches PA14::*rsmA'-lacZ* et $\Delta rsmA::rsmA'-lacZ$ contenant les plasmides pSR14 (surexpression de *hcnA*) ou pJN105 (témoin négatif) ont été inoculées dans du TSB avec de la gentamycine 100 µg/ml. Les cultures ont été incubées 16h à 37°C et ensuite diluées à DO₆₀₀=0,05 dans du TSB avec ou sans 0,2% d'arabinose (pour l'induction du promoteur pBAD). Un aliquot a été prélevé toutes les heures entre 3 et 8h. La DO₆₀₀ a été mesurée et un volume de 100 µl a été utilisé pour mesurer l'activité β -galactosidase, tel que décrit précédemment (**Section 5.4.5**). Chaque condition comportait trois réplicats biologiques.

Tableau 6.1: Souches et plasmides utilisés

Souches bactériennes			
Souches	Numéro ED	Génotype	Référence
PA14	14	souche sauvage UCBPP-PA14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)

PA14 $\Delta rsmA$	3452	déletion propre du gène <i>rsmA</i>	Chapitre 5
PA14 $\Delta rsmYZ$	1988	déletion propre des gènes <i>rsmY</i> et <i>rsmZ</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2017)
PA14 $\Delta hptB$	1214	déletion propre du gène <i>hptB</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2017)
PA14 $\Delta hptB\Delta rsmA$	3868	déletion propre des gènes <i>rsmA</i> et <i>hptB</i>	Chapitre 5
C2	3452	Clone de l'évolution de $\Delta hptB$ isolé de la lignée 2	Chapitre 3-5
Plasmide			
Plasmide	Numéro ED	Génotype	Source
pFJP9	ED3895	<i>rsmA</i> mini-CTX <i>lacZ</i> rapporteur TetR	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2015)
pJN105	ED962	<i>araC</i> - <i>P_{BAD}</i> dans le plasmide pBBR1MCS-5, GmR	(Newman & Fuqua, 1999)
pSR14	ED3941	pJN105 avec le promoteur de <i>hcnA</i> entre -88 et les 9 premiers codons du gène sous la régulation de l'arabinose	Cette étude
pME3826	ED88	Insertion d'un fragment 0,78-kb du promoteur de <i>hcnA</i> et ces 9 premiers codons en fusion traductionnel avec <i>lacZ</i> dans le plasmide pME6010, TetR	(Pessi & Haas, 2000)

6.3 Résultats

Tout d'abord, la traduction de la protéine RsmA dans le clone d'évolution C2 a été déterminée afin de vérifier si la mutation affectait sa production dans des conditions qui imitent la condition en motilité de type *swarming* en liquide. En effet, les souches $\Delta rsmA$ et $\Delta hptB\Delta rsmA$ surproduisaient la protéine à 3h et à 4h (Fig. 6.2). La protéine RsmA s'autorégule négativement ce qui explique l'augmentation de la production de la protéine dans ces souches (Jean-Pierre *et al.*, 2015). Pour ce qui est du clone C2, cette souche traduit moins le gène *rsmA* que PA14, ce qui suggère que RsmA est plus actif dans le clone C2 que dans la souche sauvage.

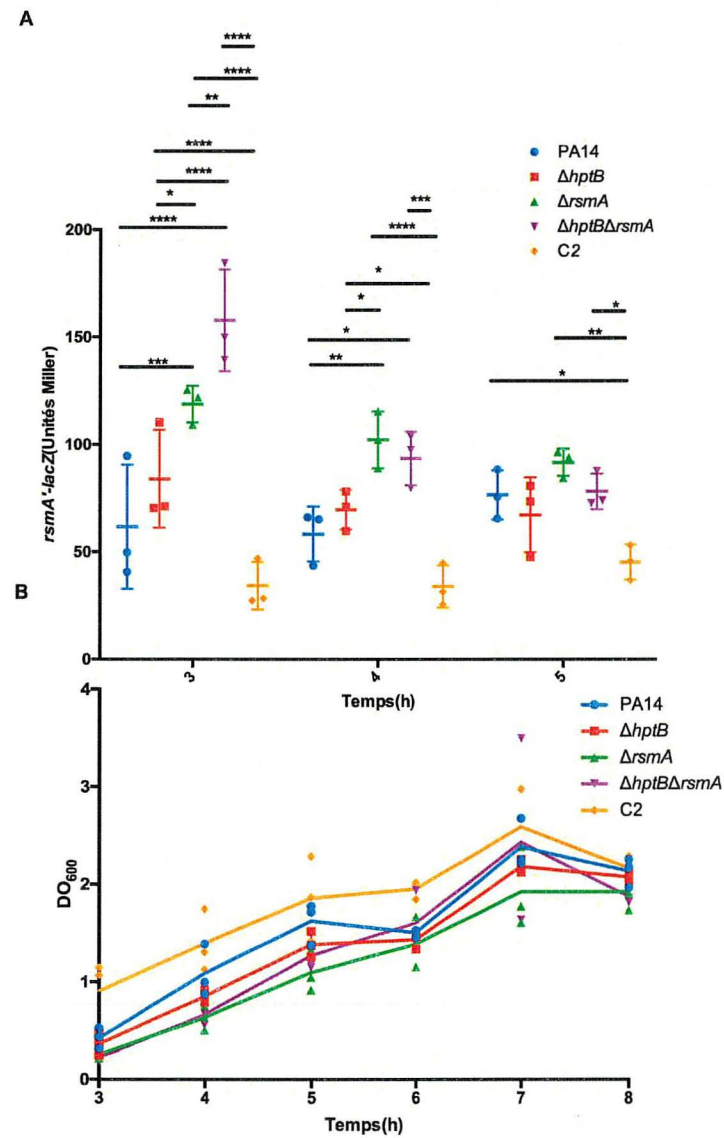


Figure 6.2: Traduction de RsmA dans le clone C2

Mesure de la (A) traduction du rapporteur *rsmA*⁻-*lacZ* dans le clone C2 entre 3 et 5h dans le milieu M9DCAA à 34°C et (B) la croissance des souches. Le test statistique Two-way ANOVA a été réalisé avec Prism6 (Graph Pad) en comparant les mesures chacune des autres souches entre elles (*≤0,05, **≤0,01, ***≤0,001, ****≤0,0001).

Par la suite, le rôle de RsmA dans l'apparition des mutants spontanés *lasR*⁻ qui ont été décrits au **Chapitre 3** a été testé. L'hypothèse est que la mutation dans le gène *lasR* empêche la transcription de certains gènes dont la traduction est inhibée par l'interaction avec RsmA. Ainsi, les sites actifs de la protéine RsmA sont moins « occupés » et RsmA peut réguler les ARNm en lien avec la motilité de type *swarming*. Notons que les mutants $\Delta hptB$ *lasR*::Gm et les évoluants C1 et C3 se déplacent plus en motilité de type *swarming* que la souche $\Delta hptB$ (**Fig. 4.1**).

Tout d'abord, des évolutions dirigées chez les souches $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$ ont été réalisées. Si des mutants *lasR*⁻ n'émergent pas de cette évolution, ce sera une indication que le système Gac/Rsm pourrait participer dans le contrôle de l'émergence des mutants *lasR*⁻. Pour l'évolution du mutant $\Delta rsmYZ$, les colonies ont pris une légère teinte bleuetée verte dès le passage 2 pour la lignée 2 (**Fig. 6.3**). Toutefois, visuellement, l'apparition des mutants *lasR*⁻ n'était pas aussi flagrante que pour les évolutions de PA14 et $\Delta hptB$ (**Fig. 3.1-3.3-6.3**). De plus, afin de faire un suivi de l'apparition des mutants *lasR*⁻, aux passages 7 et 10, douze clones par lignée ont été testés dans le milieu King's A. Les évolutions de $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$ causent l'émergence des mutants *lasR*⁻, mais le processus semble ralenti par rapport à la souche sauvage (**Figure 3.3**). Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour le confirmer.

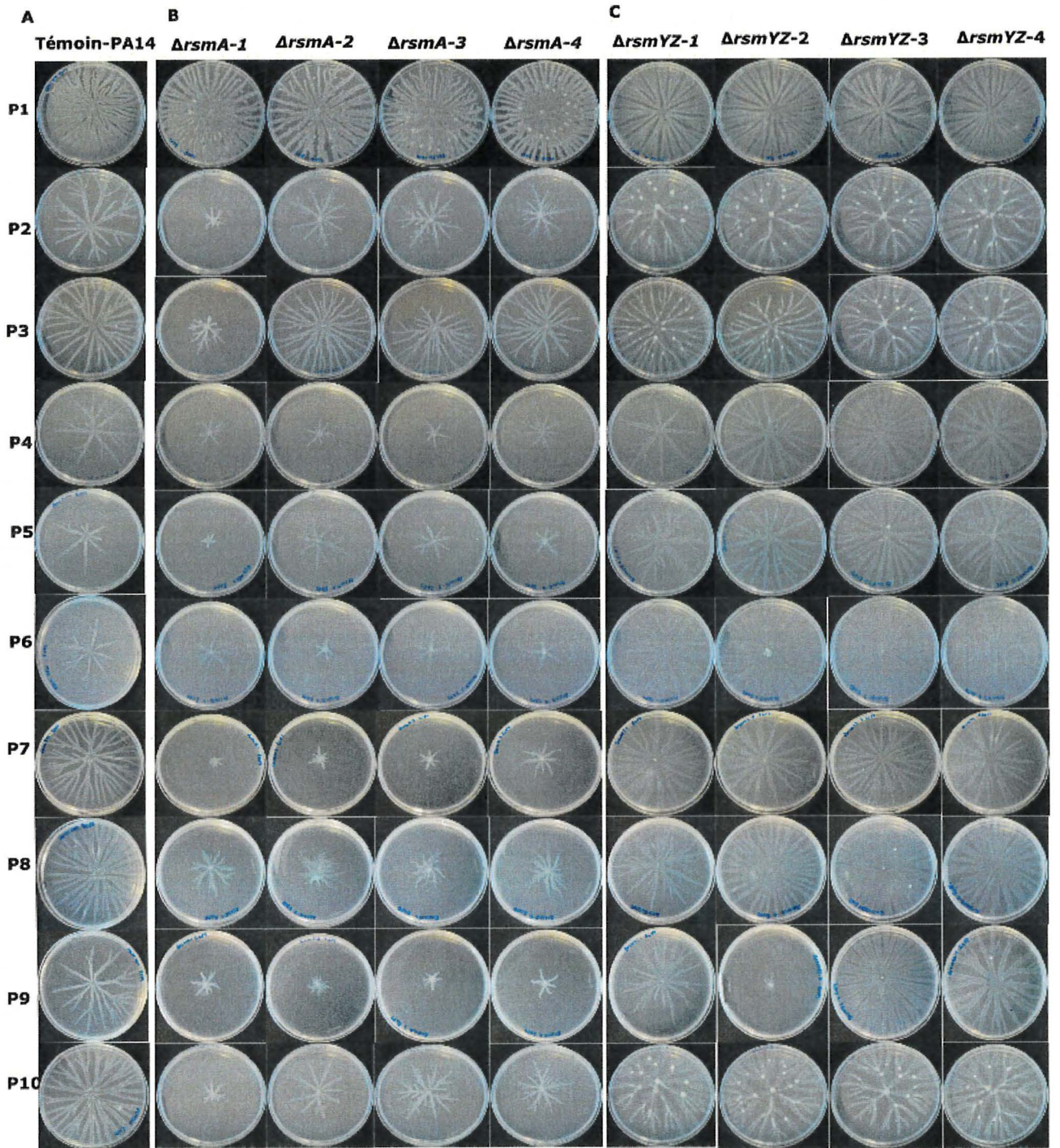


Figure 6.3: Évolution dirigée en conditions swarming des mutants $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$

(A) Représentation du témoin PA14 en motilité de type *swarming* et évolution dirigée des mutants (B) $\Delta rsmA$ et (C) $\Delta rsmYZ$ en condition *swarming*. Les conditions de l'évolution sont décrites à la **Section 3.4.2**. Chaque évolution comporte quatre lignées indépendantes.

Tableau 6.2: Pourcentages de l'émergence des mutants *lasR*

Évolution dirigée de $\Delta rsmA$		Évolution dirigée de $\Delta rsmYZ$
	Passage 7	Passage 7
Lignée	Pourcentage de clones avec un LasR défectueux potentiels	Pourcentage de clones avec un LasR défectueux potentiels
1	0%	83%
2	50%	75%
3	0%	25%
4	8,3%	25%
	Passage 10	Passage 10
Lignée	Pourcentage de clones avec un LasR défectueux potentiels	Pourcentage de clones avec un LasR défectueux potentiels
1	41,7%	0%
2	0%	58,3%
3	41,7%	66,7 %
4	50%	25%

Finalement, une autre approche a été utilisée pour déterminer si la protéine RsmA influence l'apparition des mutants *lasR* dans l'évolution en motilité de type *swarming* de PA14. Puisque que plusieurs gènes chez *Pseudomonas aeruginosa* sont régulés par LasR (au niveau de la transcription) et RsmA (au niveau de la traduction), un système sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'arabinose a été créé. L'ajout de l'arabinose permet ainsi de moduler la transcription du promoteur de *hcnA*. La transcription du gène *hcnA* est activée par LasR et sa traduction est inhibée par RsmA (Pessi & Haas, 2000; Pessi *et al.*, 2001). Ainsi, en augmentant la transcription de *hcnA* (par l'ajout d'arabinose au système), il est possible de déterminer si la transcription de *hcnA* dans une même cellule affecte la traduction d'une autre cible de RsmA. Cette autre cible est RsmA puisque ce régulateur auto-régule son propre ARNm et peut inhiber sa traduction

(Jean-Pierre *et al.*, 2015), mais n'est pas régulé par LasR. Donc, si les deux systèmes s'influencent, l'augmentation artificielle de transcrits *hcnA* dans la cellule, augmentera la traduction de RsmA (RsmA ayant plus de ARNm sur lesquels se lier)(Fig. 6.4).

Le rapporteur *rsmA'-lacZ* a été inséré dans les souches PA14 et $\Delta rsmA$ qui contiennent pJN105 ou pJN105 avec le promoteur de *hcnA* (pSR14). Ces plasmides contiennent un promoteur pBAD avec les gènes de régulation *araC* qui permettent une expression des gènes sous l'influence de l'arabinose (Newman & Fuqua, 1999). La partie du promoteur *hcnA* amplifiée contient les éléments de régulation pour la liaison avec RsmA, mais le site de liaison de *lasR* est absent. L'ajout d'arabinose entraîne l'expression du promoteur *hcnA* sur lequel RsmA peut se lier. Si les transcrits produits réussissent à occuper RsmA, la protéine produite dans la souche bactérienne ne pourra pas s'auto-inhiber et il devrait donc y avoir l'augmentation de la traduction du rapporteur *rsmA'-lacZ* chez PA14. Or, aucune différence significative n'a été observée lorsque le plasmide pSR14 est présent chez PA14 en présence et absence d'arabinose (Fig. 6.5).

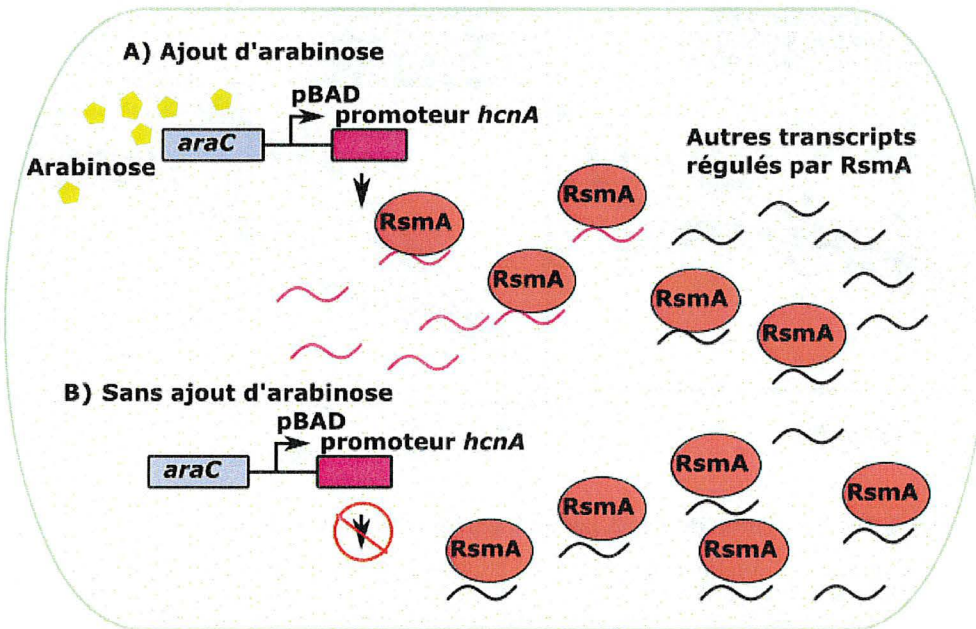


Figure 6.4: Modèle simplifié du système de modulation de la transcription de *hcnA*

Représentation du modèle simplifié du système où la transcription du promoteur de *hcnA* est sous l'influence de l'arabinose (plasmide pSR14) dans une cellule bactérienne (en vert). (A) En présence d'arabinose (représenté par des pentagones jaunes), il y a production de transcrits *hcnA* (en rose) qui se lie à RsmA. Moins de RsmA est alors disponible pour réguler les autres cibles (en noir-donc le l'ARNm de RsmA lui-même). (B) En absence d'arabinose, le transcrits de *hcnA* n'est pas produit, RsmA est alors plus disponible pour inhiber la traduction des autres transcrits.

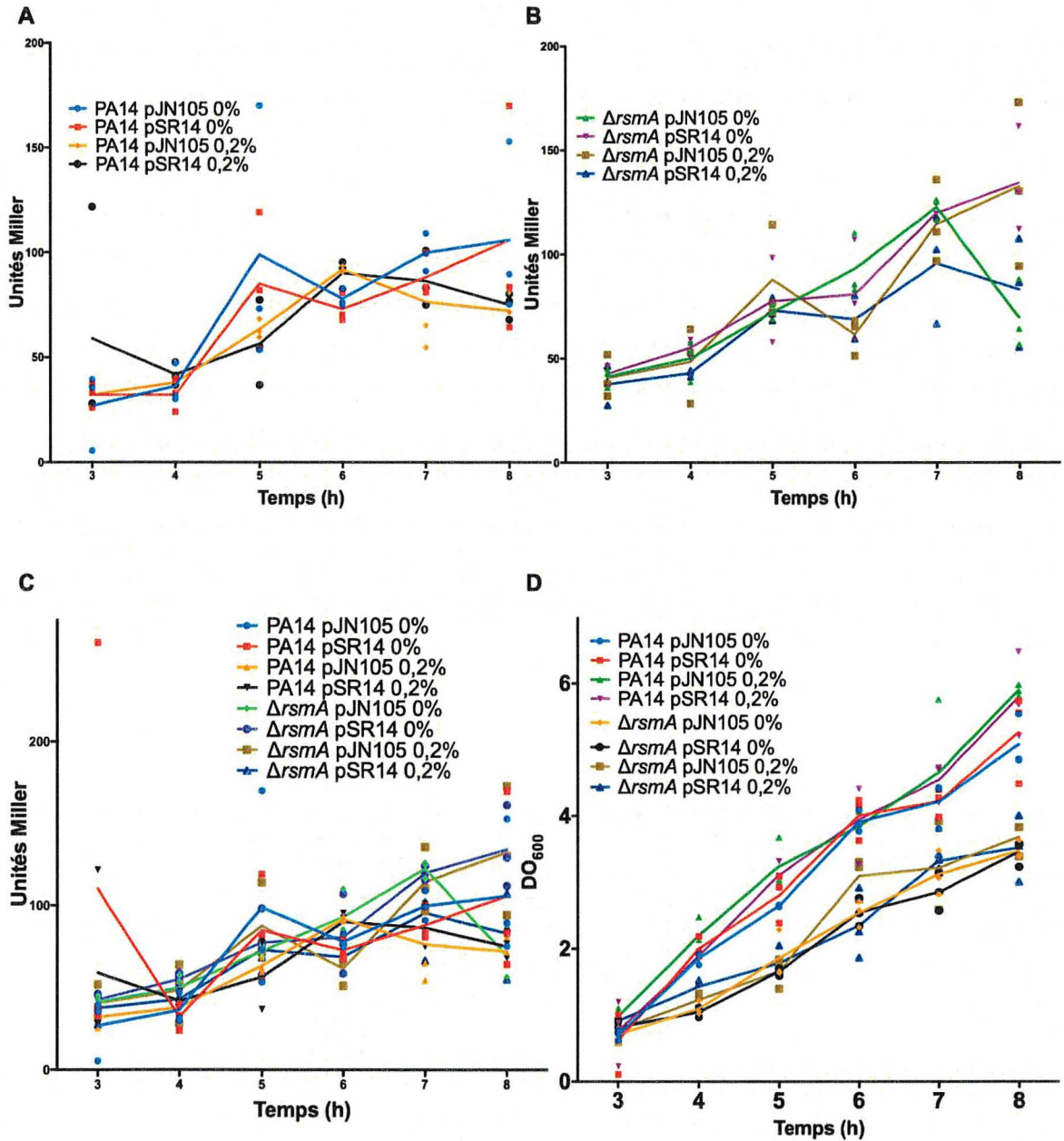


Figure 6.5: Régulation de RsmA par un transcript régulé par LasR

Représentation de la régulation de *rsmA-lacZ* par l'expression du promoteur de *hcnA* des souches PA14 (pJN105), PA14 (pSR14), $\Delta rsmA$ (pJN105) et $\Delta rsmA$ (pSR14) en TSB à 37°C en absence ou présence de 0,2% d'arabinose. Ainsi, les résultats pour (A) la souche PA14 et (B) la souche $\Delta rsmA$ sont présentés. Les résultats (C) pour les deux souches ont été réunis dans le même graphique. (D) La croissance des souches avec (0,2%) et sans arabinose est représenté.

6.4 Discussion

Le but de ce chapitre est de mieux comprendre le rôle de RsmA dans l'émergence des mutants *lasR*⁻ dans l'évolution de PA14 en condition *swarming*. Tout d'abord, la traduction de l'ARNm de *rsmA* a été évaluée. Dans le clone C2, l'activité de la fusion traductionnelle *rsmA*¹-*lacZ* est légèrement inférieure par rapport à la souche sauvage. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et mérite d'être répétée. Tout de même, la différence de traduction ne semble pas affecter les phénotypes associés de RsmA (**Fig. 5.4 et Fig. 5.6**) obtenus puisqu'on observe une différence d'affinité entre RsmA^{R31S} et RsmY au **Chapitre 5** et que les autres phénotypes correspondent à la souche sauvage.

Par la suite, des évolutions dirigées sur les mutants $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$ ont permis d'étudier l'influence de l'absence de RsmA ($\Delta rsmA$) ou une plus grande abondance de RsmA libre ($\Delta rsmYZ$) sur l'émergence des mutants *lasR*⁻. Nos résultats ont démontré qu'au passage 7 de l'évolution de $\Delta rsmA$, le pourcentage est légèrement moins (moyenne des quatre lignées de 14.6%) élevé que la moyenne de l'évolution PA14 qui était d'environ 40 % (**Fig. 3.3 B-C**). Cela signifie, que dans les mêmes conditions d'évolution que l'évolution de PA14 (**Fig. 3.3**), le mutant $\Delta rsmA$ favorise moins l'émergence des mutants *lasR*⁻. Or, une plus grande activité de RsmA ($\Delta rsmYZ$) permet l'émergence des mutants *lasR*⁻. Ainsi, ces résultats indiquent que le phénomène d'émergence de *lasR*⁻ pourrait être influencé par le système Gac/Rsm dans une population. Toutefois, il faudrait confirmer ces résultats en répétant les évolutions et ajoutant un suivis des mutants *lasR*⁻ à chaque passage comme réalisé à la **Fig. 3.3**.

De plus, l'évolution dirigée de la souche $\Delta rsmA$ ne semble pas permettre de récupérer la motilité de type *swarming* après dix passages comme pour le mutant $\Delta hptB$. Ces résultats semblent démontrer que RsmA est essentiel à la motilité de type *swarming* et que des mutations compensatoires ne semblent pas émerger. Ceci confirme le rôle central de RsmA dans la motilité de type *swarming* et supporte les résultats de l'article 2.

Par la suite, l'hypothèse est que RsmA soit plus disponible, lorsqu'il y a moins de transcrits à réguler. En effet, l'absence de LasR pourrait permettre à RsmA d'être plus disponible pour réguler les ARNm propres au *swarming*, car moins d'ARNm cibles seraient produits (ARNm cibles dont la transcription est préalablement favorisée par LasR). Dans notre modèle, l'ajout d'arabinose permet d'augmenter le nombre de transcrits *hcnA*. Donc, RsmA est plus occupé qu'en l'absence d'arabinose, ce qui devrait se refléter sur la hausse de la traduction de RsmA. Or, aucune différence entre les diverses conditions n'a été détectée: l'ajout d'arabinose n'a pas permis une

augmentation de l'activité du rapporteur *rsmA-lacZ*. De plus, il n'y a pas de différence entre le plasmide pJN105 et pSR14 dans la souche PA14. Pour les témoins, il n'y a pas d'augmentation d'expression du promoteur entre la condition avec et sans arabinose lorsque le plasmide pJN105 est vide puisqu'il n'y a pas de production de transcrits *hcnA*. Ceci était un résultat attendu. Par la suite, l'utilisation du mutant $\Delta rsmA$ est un témoin négatif puisque l'absence ou la présence d'arabinose n'a pas interférer, ce qui était attendu. Or, plusieurs éléments doivent être vérifiés pour s'assurer que notre modèle est fonctionnel et permet de bien vérifier notre hypothèse. Tout d'abord, il faut s'assurer de la bonne transcription de *hcnA* à partir du plasmide pJN105. Par la suite, des tests de concentrations d'arabinose ont été effectués et 0,2 % semblait être prometteur. Or, il serait possible de tester des concentrations plus hautes ou utiliser un milieu minimal pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'interférence.

Ces résultats ne permettent pas de conclure que RsmA influence l'émergence de mutants avec un LasR défectueux. D'autres expériences seront nécessaires. Or ces deux systèmes sont connus pour s'autoréguler et réguler un système commun: le c-di-GMP (Moscoso *et al.*, 2014; Pessi & Haas, 2001; Pessi *et al.*, 2001; Reimmann *et al.*, 1997; Valentini *et al.*, 2016). Il serait intéressant de pousser la réflexion en déterminant si les évoluants C1-C2-C3-C4 voient leur production de c-di-GMP changer par rapport à PA14 pour mieux comprendre le phénomène observé. Il faudrait aussi regarder dans la lignée 2 de l'évolution $\Delta hptB$ si des mutants dans *rsmA* ont aussi des mutations dans le gène *lasR*. Plusieurs clones ont été isolés des quatre lignées et leur motilité de type *swarming* a été testée. Or, les clones récupéraient entièrement leur motilité de type *swarming* ou possédaient un phénotype bleu-vert. Ainsi, visuellement, il ne semble pas y avoir de clones ayant acquis une mutation dans les deux systèmes. En effet, les quatre clones qui ont été entièrement séquencés avaient soit une mutation dans le système Gac/Rsm ou dans le gène *lasR* ce qui correspondait à leur phénotype de motilité de type *swarming*. Or, il serait tout de même intéressant de tester cette hypothèse en isolant des clones des quatre lignées et en séquençant les gènes *lasR*, *gacA*, *rsmA* dans une même souche. Si des mutations se retrouvaient dans les deux systèmes dans une même cellule, l'idée de la régulation commune des deux systèmes serait une avenue à étudier davantage.

Finalement, il serait intéressant de regarder d'un point de vue de la population comment un mutant *lasR*⁻ pourrait influencer un mutant *rsmA*⁻ dans une même population. Le gène *rsmA* produit moins de molécules de 3-oxo-C₁₂-HSL (le ligand de LasR) (**Fig. 14.1**) (Pessi *et al.*, 2001; Reimmann *et al.*, 1997). Ainsi, la présence de mutants favorisant RsmA, entraîne une baisse du niveau du ligand de LasR dans le milieu extracellulaire. Cela pourrait contribuer à l'apparition des

mutants dans le gène *lasR* puisque la diminution de ligand entraîne une baisse de l'activation de LasR par son ligand dans ces conditions. Les évolutions des mutants $\Delta rsmA$ et $\Delta rsmYZ$ indiquent que favoriser RsmA ou inhiber RsmA influence la proportion de l'émergence des *lasR* (**Fig. 6.3** et **Tableau 6.2**)

7 RÔLE DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE VI DANS LA RÉGULATION DU SWARMING

7.1 Introduction

Les bactéries ont besoin de se déplacer dans les différents environnements qu'elles colonisent. Ainsi, elles peuvent se mouvoir selon plusieurs modes de locomotion, dont la motilité de type *swarming* qui permet un mouvement coordonné sur une surface semi-solide (Kearns, 2010). Pour effectuer cette motilité sociale de surface, la bactérie doit posséder un flagelle fonctionnel et produire un surfactant (Kearns, 2010). La production de rhamnolipides nécessite une régulation par le *quorum sensing* (QS) afin de générer une action coordonnée (Ochsner *et al.*, 1994; Ochsner & Reiser, 1995; Pearson *et al.*, 1997).

Comme il a été démontré au **Chapitre 3**, une évolution en condition *swarming* a été réalisée sur un mutant avec un défaut de motilité de type *swarming*. Ce mutant possède toujours les éléments nécessaires connus à ce type de motilité et donc un autre facteur inconnu semble expliquer son défaut de motilité de type *swarming*. La mutation se trouve dans le gène *hptB* qui fait partie de la cascade de régulation Gac/Rsm. Le régulateur RsmA, qui joue le rôle de régulateur global du mode de vie sessile *versus* motile dans le système Gac/Rsm, permet la régulation des SST6. Ces systèmes sont associés au mode de vie sessile (Brencic & Lory, 2009). Chez *P. aeruginosa*, trois îlots géniques codent pour trois SST6 différents (Déziel *et al.*, 2005; Lesic *et al.*, 2009; Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006). Chez *P. mirabilis*, ils jouent un rôle en motilité de type *swarming*. Ils permettent la reconnaissance du soi par la sécrétion d'effecteur d'une bactérie à l'autre (Alteri *et al.*, 2013; Gibbs *et al.*, 2008; Gibbs *et al.*, 2011; Saak & Gibbs, 2016; Wenren *et al.*, 2013) (voir la **Section 1.5.2** pour plus de détails).

Dans le laboratoire Déziel, des résultats préliminaires sur le mutant $\Delta hptB$ démontrent que ce mutant surexprime des gènes liés aux trois îlots géniques de SST6 (**Tableau 1.2**). Toutefois, lorsqu'un seul des trois îlots est inactivé, les mutants n'ont pas de défaut dans leur motilité de type *swarming*. Lorsque deux des trois îlots sont mutés dans le génome, ces mutants ont un important défaut de motilité de type *swarming* (**Fig. 1.11**) (Tremblay, 2011). Ces résultats laissent démontrent que les SST6 sont nécessaires à la motilité de type *swarming*. De plus, comme il a été mentionné à la **Section 1.5.2.4** le mutant $\Delta hptB$ produit une substance qui repousse la souche sauvage en motilité de type *swarming* (**Fig. 1.12**). Ce phénomène peut être lié au phénomène de

reconnaissance de soi chez *P. mirabilis*. Puisque le mutant $\Delta hptB$ sur-exprime des gènes liés au SST6, ceci pourrait entraîner une plus grande production de ces systèmes, donc d'effecteurs. Si le SST6 joue un rôle dans la reconnaissance du soi en motilité de type *swarming* comme chez *P. mirabilis*, la souche sauvage pourrait ne pas reconnaître le mutant $\Delta hptB$ et l'éviter. Le but est de déterminer si les SST6 sont le facteur inconnu nécessaire à la motilité de type *swarming*. Grâce aux résultats préliminaires obtenus par un ancien étudiant du laboratoire Déziel et les connaissances actuelle des SST6, l'hypothèse de cette section est que les SST6 permettent la sécrétion d'effecteurs d'une cellule à l'autre et joue un rôle de reconnaissance de soi chez *P. aeruginosa* en motilité de type *swarming* qui serait essentiel à la motilité de type *swarming*.

7.2 Matériels et méthodes

7.2.1 Souches bactériennes et conditions de croissance

La souche de *P. aeruginosa* et ces dérivés qui sont utilisés dans cet article proviennent de la souche PA14 (**Tableau 7.1**) (Rahme *et al.*, 1995). Les souches ont été cultivées dans le TSB à 37°C toute la nuit dans un tambour rotatif TC-7 à 110 rpm, lorsque non mentionnés, à partir de l'échantillon congelé avant toutes expériences. Les mesures d'absorbance ont été mesurées à l'aide du Nanodrop ND-1000.

Pour les courbes de croissance, les bactéries ont été inoculées à $DO_{600}=0,05$ dans le milieu M9DCAA (Tremblay & Déziel, 2008) et cultivées dans un tambour rotatif à 34°C à 110 rpm. Trois cultures par souche ont été inoculées pour un triplicata. Un aliquot a été prélevé à toutes les heures entre 2 et 12h de croissance.

Pour les essais de motilité de type *swarming*, ils ont été réalisés comme déjà décrits (Tremblay & Déziel, 2008) (**Section 3.4.1**). Brièvement, des cultures ont été inoculées à $DO_{600}=0,05$ dans du TSB et incubées sur un tambour rotatif à 37°C jusqu'à $DO_{600}=3,00$, puis elles ont été inoculées sur une gélose en condition *swarming*. Les géloses étaient incubées 20h dans des sacs en plastique à 34°C. Afin de mesurer les aires de recouvrement de la colonie en motilité de type *swarming*, à l'aide du programme Photoshop CS3 Extended (Adobe), l'aire totale de la surface de la gélose et l'aire de la colonie en *swarming* a été mesurés à partir des photos prises avec une caméra numérique (Canon EOS 10D).

Pour les essais de motilité de type *swimming*, les cultures ont été incubées jusqu'à DO_{600} de 3,00 dans le TSB en agitation (110 rpm) dans un tambour rotatif à 37°C. Une suspension de 3 μ l a été utilisée pour inoculer une gélose. Les géloses sont composées de 20 ml de milieu M9DCAA à

0,25 % d'agar Bacto (Difco) et séchées 15 minutes dans une enceinte biologique. Les géloses ont été incubées dans des sacs pendant 24 h à 30°C.

Tableau 7.1: Souches et plasmides utilisés

Souches bactériennes			
Souches	Numéro ED	Génotype	Référence
PA14	14	UCBPP-PA14 souche sauvage	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 HSI-I	1217	Îlot HSI-I a été délété (positions exactes inconnues)	Laboratoire de Laurence Rahme
PA14 HSI-II	1218	Îlot HSI-II a été retiré entre les gènes PA14_42880 (<i>stk1</i>) à PA14_43100	(Lesic & Rahme, 2008)
PA14 HSI-III	1219	Îlot HSI-III a été retiré entre les gènes PA14_33970 et PA14_34130 (<i>icmF3</i>)	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 HSI-I et II	1220	Îlot HSI-I et II ont été délétés	Laboratoire de Rahme
PA14 HSI-I et III	1221	Îlot HSI-I et III ont été délétés	Laboratoire de Rahme
PA14 HSI-II et III	1222	Îlot HSI-II et III ont été délétés	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 <i>fliC</i> -	13	PA14_50290::MAR2xT7, GmR (ID::36424)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>rhIA</i> -	1	PA14_19100::MAR2xT7, GmR (ID::23291)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14:: <i>gfpmut3</i>	2725	PA14 contenant la protéine GFPmut3 dans son chromosome dans le site <i>attTn7</i>	Chapitre 3
PA14 Δ <i>hptB</i>	1214	Délétion propre du gène <i>hptB</i>	(Jean-Pierre <i>et al.</i> , 2017)

PA14 <i>rhIA</i> :: <i>aadA</i>	2975	Inactivation de <i>rhIA</i> par insertion de la cassette <i>aadA</i> ; StpR	Cette étude
PA14 Δ <i>hptBrhIA</i> :: <i>aadA</i>	2976	Délétion propre du gène <i>hptB</i> et inactivation de <i>rhIA</i> par insertion de la cassette <i>aadA</i> ; StpR	Cette étude
PA14 HSI-II et III Δ <i>hptBrhIA</i> :: <i>aadA</i>	3298	Îlot HSI- II et III ont été retirés. Délétion propre du gène <i>hptB</i> et inactivation de <i>rhIA</i> par insertion de la cassette <i>aadA</i> ; StpR GmRTetRStpR	Cette étude
Plasmides			
Plasmide	Numéro ED	Génotype	Source
pUT-Tn5	ED767	Contient transposon mini-Tn5-Stp/Sm	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
pEX18-Ap	ED689	Amp ^R ; <i>oriT</i> + <i>sacB</i> +, vecteur suicide	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pFJP17	ED2970	pEx18Ap avec le une allèle de <i>hptB</i> dans lequel il manque le domaine histidine phosphotransfert	Chapitre 3
pSR07	ED2852	pEX18Ap- <i>rhIA</i> :: <i>aadA</i> Insertion de la cassette de résistance à la streptomycine dans un fragment de <i>rhIA</i> .	Cette étude
pSR08	ED3299	pEX18Ap- <i>icmF1</i> avec une délétion propre de plus de 95% du gène	Cette étude

7.2.2 Création de la souche PA14 Δ *hptB* HSI-II et III

Pour l'intégration de la mutation Δ *hptB* dans le double mutant HSI-II et HSI-III de PA14, le plasmide pFJP17 dans la souche *E. coli* SM10 a été utilisé. L'intégration a été réalisée par la conjugaison à deux partenaires comme décrit précédemment (Jean-Pierre *et al.*, 2017). Les mérodiplodes de la première recombinaison ont été sélectionnés sur géloses Lysogeny Broth

(LB), recette de Miller (Alpha Bioscience) contenant de la carbénicilline 300 µg/ml. Les doubles recombinants a été sélectionnés sur du LB Agar sans sel avec 10 % sucrose.

7.2.3 Intégration de mutations dans les gènes mutants *rhIA* et *hptB* dans le double mutant HSI-II et III

Pour inactiver le gène *rhIA* (PA14_19100), un fragment de 1115 paires de bases a été amplifié avec l'AmpliTaq (ThermoFisher) et les amorces F-*rhIA-KpnI* (5' -aagagggtacc AAATCCTCCTGGCGCTGAT-3') et R-*rhIA-EcoRI* (5' -aggagaattcACAGGGTTCGATGGCGAGA-3'). Ce fragment possède un site de restriction *XhoI*. La cassette de résistance à la streptomycine (*aadA*) a été amplifiée à l'aide des amorces F-*aadA-XhoI-FRT* (5'-aggagctcgag TGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAGTTC CGCTTGAGTTAAGCCGCG-3') et R-*aadA-XhoI-FRT* (5'-aggactcgagGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCAGGGCG TTAAACATCATGAGG-3') sur le plasmide pUT-Tn5 Stp/Sm. Le plasmide pSR07 a été créé en insérant initialement le fragment *rhIA* dans pGEM-T easy (Promega). Par la suite, le fragment *aadA* a été inséré dans le fragment *rhIA*, à l'aide de l'enzyme de restriction *XhoI* (Thermo Science). Un site de l'enzyme de restriction *XhoI* se retrouve au milieu du fragment *rhIA*. Le fragment *rhIA::aadA* a alors été transféré dans le plasmide pEX18Ap en utilisant les enzymes de restriction *KpnI* et *EcoRI* (Thermo Science) et créant le plasmide pSR07.

La construction pSR07 a été transférée dans les souches PA14, PA14 Δ *hptB* et PA14 Δ *hptB* HSI-II et III par conjugaison avec SM10 (pSR07). Les clones de la première recombinaison ont été sélectionnés sur du LB agar contenant de la carbénicilline 300 µg/ml et du triclosan 25 µg/ml. Les clones de la deuxième recombinaison ont sélectionné sur du LB Agar sans sel avec 10 % sucrose.

7.2.4 Expérience d'évitement

Les essais de motilité de type *swarming* ont été réalisés de la façon décrite précédemment avec quelques modifications. À 60 minutes de séchage des géloses en condition *swarming*, les souches, testées pour leur capacité à repousser la souche sauvage, ont été étalées à l'aide d'un écouvillon sur ces géloses. La souche sauvage a été inoculée, avec un volume de 5 µl de culture, à 3 cm de la souche préalablement étalée. Les géloses ont été incubées dans des sacs à 34°C pour 20h.

7.2.5 Quantification de la production de rhamnolipides

Les souches ont été inoculées à une $DO_{600}=0,05$ dans un milieu M9DCAA liquide et incubées à 34°C dans un tambour rotatif. Un prélèvement a été pris pour chaque souche à 13h, 15h, 20h, 24h et 36h. La DO_{600} des souches a été mesurée. Un volume de $300\ \mu\text{l}$ d'échantillon a été prélevé et transféré dans un vial pour la quantification des rhamnolipides. Un volume de $300\ \mu\text{l}$ d'acétonitrile contenant $10\ \mu\text{l}$ de standard interne ((5,6,7,8-tétradeutéro-4-hydroxy-2-heptylquinoline - HHQ-D₄) -concentration finale d'environ 3 ppm) a été ajouté. Le mélange a été vortexé et centrifugé à haute vitesse. Un volume de $300\ \mu\text{l}$ a été récupéré pour l'injection au LC/MS.

En milieu solide, huit géloses *swarming* ont été préparées pour chaque souche comme décrit précédemment pour un total de quatre réplicats par souche. Après incubation dans des sacs, quatre géloses par souche ont été utilisées pour déterminer la biomasse sèche. Pour se faire, à l'aide d'une spatule, la biomasse a été grattée. La biomasse a été alors resuspendue avec 1 ml de tampon phosphate salin (PBS) et récoltée dans un récipient d'aluminium préalablement pesé. Cette dernière étape a été répétée avec un autre ml de PBS. Les contenants d'aluminium ont été déposés toute la nuit à 65°C et la biomasse sèche a été pesée. Pour quantifier la production de rhamnolipides, les quatre autres géloses ont été déposées à 65°C toute la nuit pour être séchées. L'agar sec a été resuspendu dans 2 ml d'eau Mili Q puis transvidé dans un tube de centrifugation de 15 ml. Par la suite, 2 ml d'acétonitrile a été ajouté et les tubes ont été vortexés 1 minute. La centrifugation était de 20 minutes à vitesse maximale 9500 rpm (Allegra X-14, Beckman Coulter). Un volume de $500\ \mu\text{l}$ a été transféré (seulement la phase aqueuse) dans un vial et un volume de $5\ \mu\text{l}$ de HHQ-D₄ de standard interne a été ajouté.

Les injections ont été faites en utilisant un HPLC (Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) combiné à la colonne Kinetex C8 (Phenomenex) et équipé d'un spectromètre de masse (Quattro Premier XE, Waters) en mode négatif tel que rapporté précédemment (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). Les mono-rhamnolipides et di-rhamnolipides Rham-C₁₀-C₁₀ et Rham-C₁₀-C₁₂ ont été quantifiés et la somme a servi à la quantification totale.

7.2.6 Co-culture en motilité de type *swarming*

Ces essais de *swarming* ont été réalisés avec quelques différences.

Pour les essais de complémentarité (co-inoculation avec une distance), les souches ont été inoculées à 1 cm de distance sur la gélose et ont été par la suite incubées 48h à 34°C .

Pour les co-inoculations, les souches PA14::*gfpmut3*, mutant *rhlA*⁻ et les six mutants (simples et doubles) HSI ont été incubés jusqu'à DO₆₀₀ environ 3,00 dans un tambour rotatif comme décrit plus haut. La souche PA14::*gfpmut3* a été mélangée à chacune des autres souches dans un ratio 1:1 selon la DO₆₀₀ et le mélange a été inoculé sur une gélose en condition *swarming*. Après 20h d'incubation à 34°C dans des sacs, le bout des dendrites et le centre de la colonie *swarming* ont été récoltés chacun dans des tubes différents avec 2 ml de PBS. Un échantillon a été utilisé pour calculer des unités de formations de colonies (UFC). Les géloses étaient incubées à 30°C pendant 16h. Le nombre total de colonies sur chacune des géloses a été calculé. Les géloses ont été ensuite analysées au Typhoon (GE Health Care Life Science) en utilisant le filtre JH3 pour détecter la fluorescence de la GFP et ainsi le nombre de colonies GFP a été calculé.

7.2.7 Création des mutants Δ HSI-II *icmF1* et Δ HSI-III *icmF1*

Pour la mutation *icmF1*, une version du gène avec une délétion de 3243 bp pour un gène de 3309 bp a été créée. Pour ce faire, un fragment avant le gène a été amplifié avec les amorces *icmF1-mutupSmalv2-F* (5'- aatgccccgggGTCACCGCCATAGCGA -3') et *icmF1-mutupv2-R* (5'- cccggctctgaaggggttCATGACCTTCGCCGCGT -3') et un fragment après le gène a été amplifié avec les amorces *icmF1mutdw-F* (5'- AACCCCTTCAAGAGCCGGG-3') et *icmF1mut-dw-HindIII-R* (5'- acgaaagcttTTCGCTGCGCAGCAGGTTG-3'). Par la suite, les deux fragments ont été fusionnés par PCR grâce à une section d'homologie (section en minuscule dans la séquence d'amorce) sur amorces *icmF1-mutupv2-R* et *icmF1mutdwF*⁻. Le fragment résultant a été cloné dans pEX18-Ap à l'aide des enzymes de restriction *SmaI* (Fermenta) et *HindIII* (Thermo Science) (les sites de restrictions sont soulignés dans la séquence des amorces) créant le plasmide pSR08. La mutation a été insérée dans les souches par conjugaison avec SM10 (pSR08) comme décrits précédemment. Les clones ont été sélectionnés sur LB agar contenant de la carbénicilline 300 µg/ml et du triclosan 25µg/ml. Les clones de la deuxième recombinaison ont été sélectionnés sur LB agar sans sel et sucrose 10%.

7.2.8 Évolution dirigée du mutant HSI-II et III

Une évolution dirigée a été effectuée sur le mutant HSI-II et III dans les mêmes conditions que l'évolution Δ *hptB*, avec quelques différences. Le temps d'incubation entre chaque passage de 24h a été utilisé (**Section 3.4.2**). De plus, lorsqu'il y avait absence de dendrites, le contour de la

colonie a été récupéré pour le prochain passage. L'expérience a été reproduite trois fois et chaque essai comportait quatre lignées.

7.3 Résultats

7.3.1 Caractérisation de la motilité de type *swarming* des mutants du SST6

Des résultats préliminaires démontrent que les SST6 peuvent avoir un effet sur la motilité de type *swarming*. Comme rapporté initialement (**Section 1.5.2.4**), des mutants dans un seul des îlots HSI peuvent se déplacer en condition *swarming* alors que l'élimination de deux îlots HSI cause un important défaut de motilité de type *swarming* (Tremblay, 2011) (**Fig. 7.1A**). Ce défaut de motilité de type *swarming* fut quantifié afin de confirmer le phénotype (**Fig. 7.1B**). Le mutant *fliC*⁻ ne possède pas de flagelle fonctionnel et ne peut donc pas se déplacer en condition *swarming* (Rashid & Kornberg, 2000).

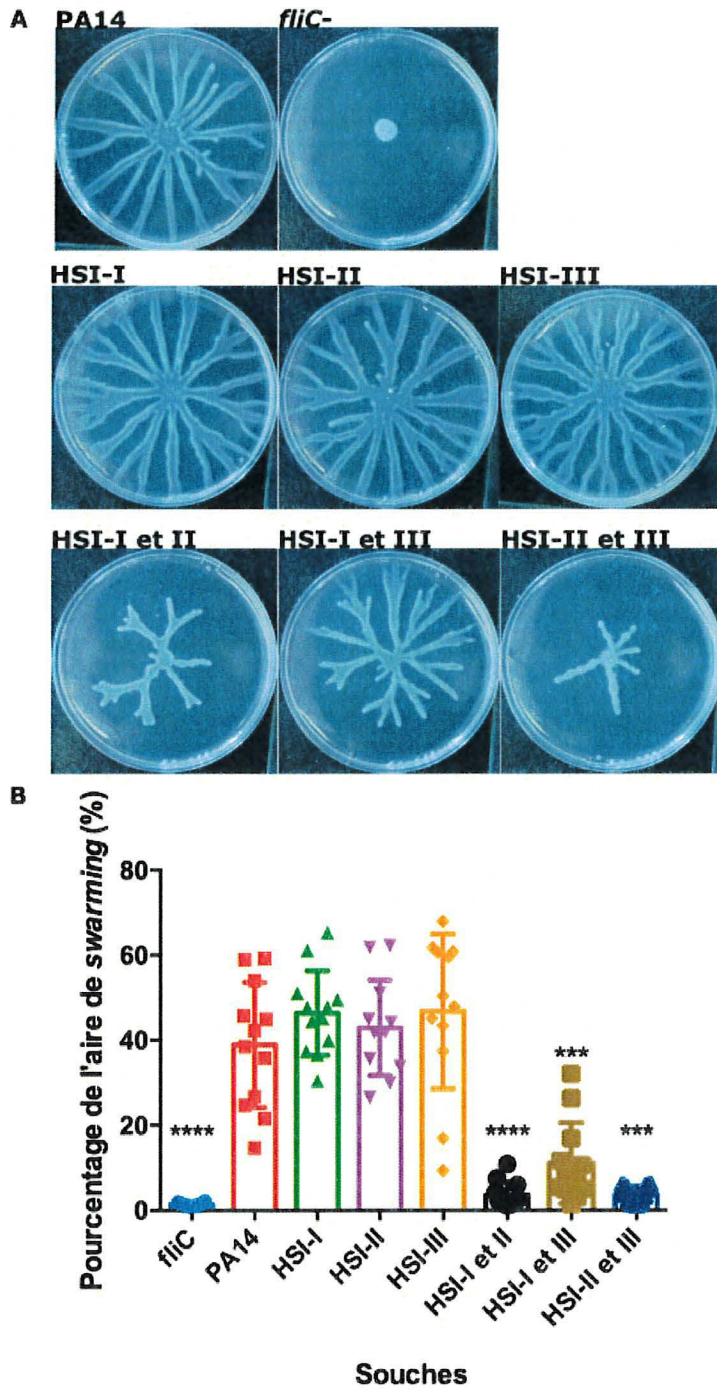


Figure 7.1: Défaut de motilité de type swarming des doubles mutants HSI

(A) Motilité des simple et double mutants HSI. (B). Le pourcentage de recouvrement des géloses en motilité de type *swarming* est calculé pour ces différents mutants. Prism 6 (Graph Pad) a permis le calcul des statistiques. Une analyse One-way ANOVA a permis de comparer les différentes souches au pourcentage de la souche sauvage ($*\leq 0,05$, $**\leq 0,01$, $***\leq 0,001$, $****\leq 0,0001$).

Afin de mieux comprendre le défaut de motilité de type *swarming* des doubles mutants HSI, différents phénotypes ont été étudiés. Tout d'abord, afin de déterminer si le défaut n'est pas dû à un défaut de croissance, des courbes de croissance ont été réalisées dans le milieu M9DCAA composé entre autres d'acides casaminés et de dextrose (Tremblay & Déziel, 2008) (**Fig. 7.2**). Les différentes souches n'ont pas de défaut de croissance par rapport à la souche sauvage.

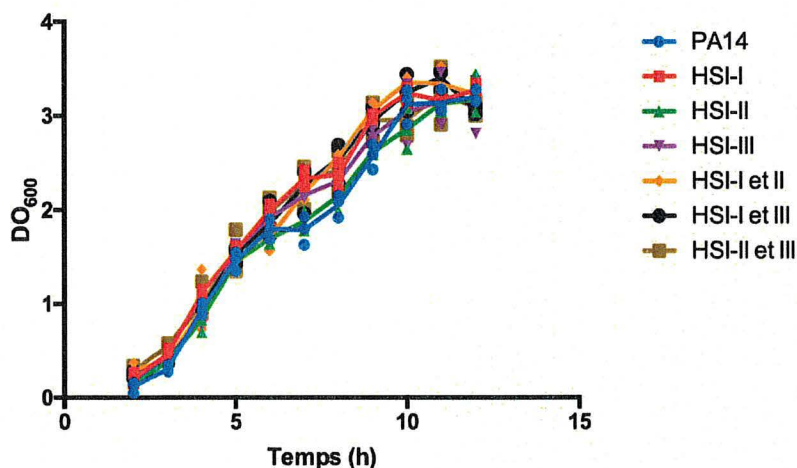


Figure 7.2: Croissance des mutants HSI dans le milieu

La croissance des différentes souches a été mesurée au cours de la croissance dans du milieu M9DCAA à 34°C dans un tambour rotatif.

Par la suite, les deux éléments connus pour être essentiels à la motilité de type *swarming*, soit la production de surfactants et l'expression d'un flagelle fonctionnel, ont été investigués. Les tests de motilité de type *swimming* permettent de déterminer si le flagelle est fonctionnel. Ce test a été réalisé sur les mutants HSI pour déterminer la fonctionnalité de leur flagelle. Le diamètre des zones de motilité de type *swimming* a été mesuré et les aires de motilité de type *swimming* ont été calculées (**Fig. 7.3**). Seul le double mutant HSI-II et III a démontré une diminution significative de sa motilité *swimming*. C'est une très petite différence qui ne peut, vraisemblablement, pas expliquer un défaut de motilité.

Ensuite, la production de rhamnolipides des doubles mutants HSI a été déterminée (**Fig. 7.4**). Pour ce faire, la production a été comparée entre la souche sauvage et les différents mutants en cultures liquides, dans le milieu M9DCAA, ainsi qu'en géloses *swarming*. Le mutant *rhlA*⁻ a été utilisé comme témoin négatif puisque RhlA produit un précurseur des rhamnolipides et donc un mutant dans ce gène ne produit aucun rhamnolipides (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). En culture

liquide, la production de rhamnolipides est similaire entre les différentes souches (Fig. 7.4A). Cependant, en mode de vie en surface, les trois doubles mutants ont un défaut significatif de production (Fig. 7.4B). Par ces résultats, la production de rhamnolipides pourrait donc expliquer le défaut de motilité de type *swarming* des doubles mutants SST6.

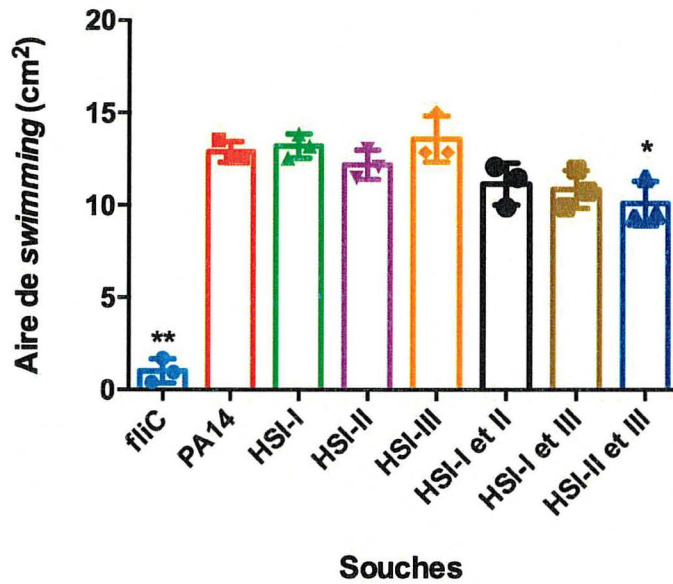


Figure 7.3: Motilité de type *swimming*

Mesure les aires des zones de swimming des différentes souches. Les statistiques ont été réalisées par Prism 6 (GraphPad). Un one-way ANOVA a été appliqué pour comparer les différentes souches à PA14 (* $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$, **** $\leq 0,0001$).

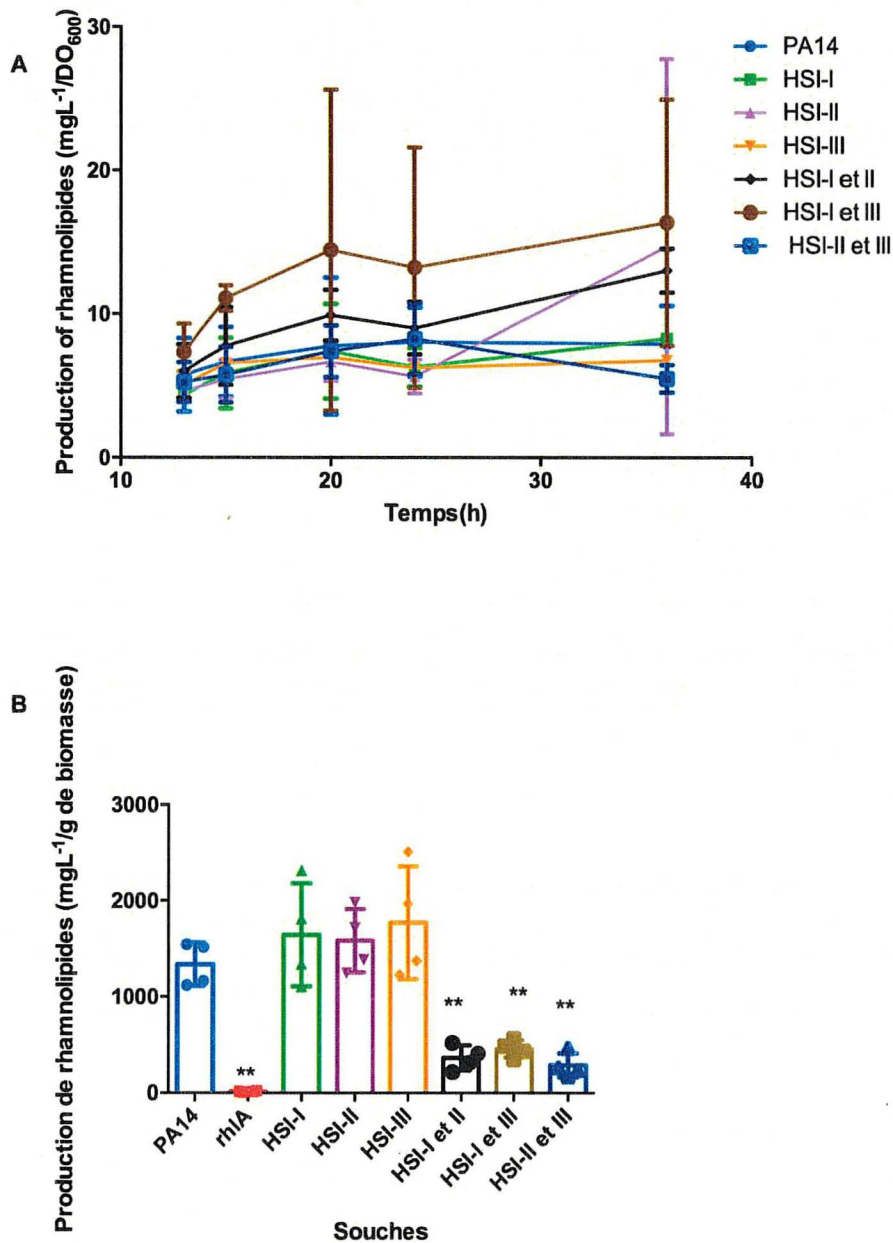


Figure 7.4: Production de rhamnolipides des mutants HSI

Mesure de la production de rhamnolipides en (A) liquide ou (B) en condition swarming sur une surface semi-solide. Les statistiques ont été réalisées à l'aide de Prism 6 (Graph Pad). Un one-way ANOVA a été réalisé pour comparer la production de rhamnolipides des différents mutants en condition solide par rapport à la souche sauvage (* $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$, **** $\leq 0,0001$).

Afin de confirmer que le défaut de production des rhamnolipides explique le défaut de motilité de type *swarming* des doubles mutants HSI, ceux-ci ont été co-inoculés à côté de la souche *flhC*. Ce mutant ne se déplace pas en motilité de type *swarming*, mais produit une quantité normale de

rhamnolipides. Cette production est suffisante pour permettre à un mutant *rhIA*⁻ de migrer en swarming (**Fig. 7.5A**). Étonnement, la co-inoculation des doubles mutants HSI avec *fliC*⁻ n'a pas entraîné une complémentation de la motilité de type *swarming* (**Fig. 7.5B**). Toutefois, les doubles mutants HSI ont été capables de compléter la motilité de type *swarming* du mutant *rhIA*⁻ (**Fig. 7.5B**). Seul le manque de rhamnolipides explique le défaut de motilité de type *swarming* de ce mutant car ce défaut est complété par une source exogène de rhamnolipides (Tremblay *et al.*, 2007). Pour conclure, les doubles mutants HSI produisent suffisamment de rhamnolipides pour entraîner la motilité de type *swarming* d'une souche n'en produisant pas, donc il apparaît que la production réduite des doubles mutants ne serait pas l'explication pour leur défaut de motilité de type *swarming*.

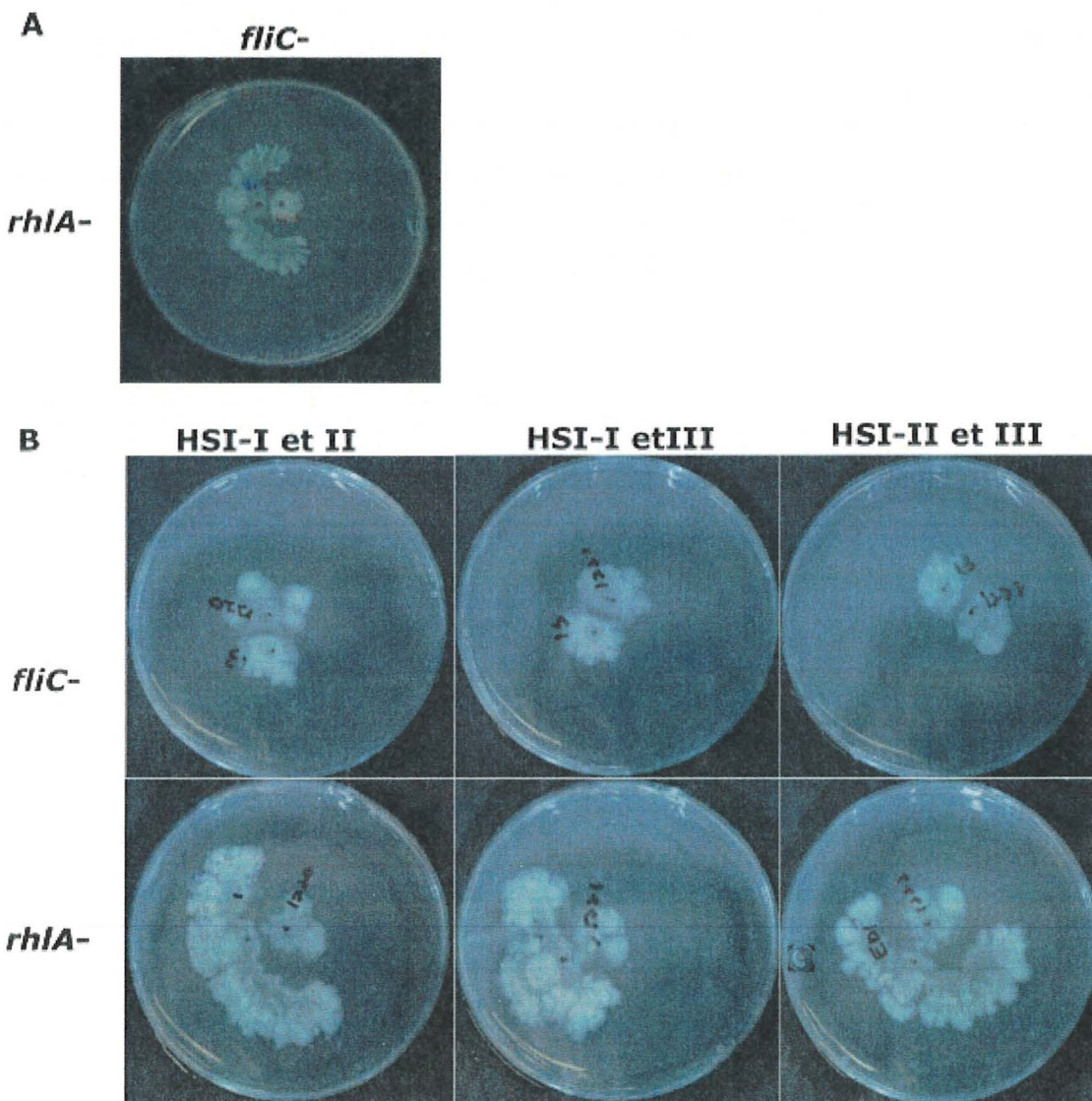


Figure 7.5 : Co-inoculation en motilité de type *swarming*

Co-culture des doubles mutants HSI avec les mutants *fliC*⁻ ou *rhIA*⁻. Les cultures ont été inoculées à 1 cm de distance. A) La production de rhamnolipides de *fliC*⁻ permet à *rhIA*⁻ de se déplacer. (B) Les doubles mutants HSI ne peuvent se déplacer à l'aide des rhamnolipides que *fliC*⁻ produit, mais permettent à *rhIA*⁻ de se déplacer.

Ainsi un autre élément nécessaire, mais encore inconnu, expliquerait leur défaut de motilité de groupe et supporte l'idée que les SST6 ait un rôle à y jouer.

7.3.2 Comprendre l'évitement de *hptB*

Afin de comprendre le rôle des SST6 en motilité de type *swarming* et la raison de leur défaut, le lien avec HptB doit être éclairci. Les rhamnolipides sont un mélange de trois familles de congénères. L'une d'elles, produit par le gène *rhIA*, consiste en plusieurs congénères d'acides 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alcanoïques (HAA) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010) qui causent le repoussement des dendrites dans une colonie en motilité de type *swarming* (Tremblay *et al.*, 2007). Étonnement, et contrairement au mutant *rhIA*⁻ le mutant $\Delta hptB rhIA$ ⁻ est évité par la souche sauvage en motilité de type *swarming* (Tremblay, 2011) (**Fig. 7.6 et 1.12**). Donc, ce repoussement n'est pas le résultat de la production d'HAA. Puisque la mutation dans le gène *hptB* cause une surexpression des gènes SST6 en condition de *swarming*, la sécrétion d'effecteurs par le SST6 pourrait expliquer le repoussement de la souche sauvage. Ceci contribuerait à expliquer le rôle des SST6 en motilité de type *swarming*.

Pour tester cette hypothèse, les mutations dans le gène *hptB* et *rhIA* ont été ajoutées dans le double mutant HSI-II et III afin d'effectuer des tests d'évitement (**Fig. 7.6**). Toutefois, l'abolition de deux des trois SST6 n'a pas empêché l'évitement de la souche $\Delta hptB rhIA$ ⁻::*aadA*. Cette hypothèse n'est donc pas vérifiée.



Figure 7.6: Évitement en *swarming* de la souche $\Delta hpt rhIA::aadA$

Test d'évitement entre PA14 et les différentes souches soit $rhIA::aadA$, $\Delta hptB rhIA::aadA$ et $\Delta hptB rhIA::aadA$ HSI-II et III en condition de *swarming*.

7.3.3 Complémentation du défaut de *swarming* des mutants HSI

Puisque les SST6 nécessitent un contact physique ou une forte proximité, des expériences de complémentation ont été réalisées afin de déterminer si la proximité entre les cellules des différents mutants entrainerait la récupération de la motilité de type *swarming*. En mélangeant PA14 (qui possède trois systèmes SST6 fonctionnels), l'hypothèse est que PA14, par la sécrétion d'un facteur nécessaire à la motilité de type *swarming* par exemple par le SST6, permettrait aux doubles mutants HSI de se déplacer. Un mélange de la souche PA14::*gfpmut3* avec chacun des doubles mutants HSI a été inoculé sur des géloses de motilité de type *swarming*, et suite à l'incubation, le ratio des deux souches au bout des dendrites a été déterminé (**Fig. 7.7**). Or, les doubles mutants HSI ne se retrouvent pas au bout de dendrites, seul PA14 s'y retrouvent en grande majorité. Pour le témoin positif, lorsque PA14::*gfpmut3* est mélangé avec le mutant $rhIA^-$, les deux souches se retrouvent au bout des dendrites (**Fig. 7.7**). Donc les doubles mutants HSI ne sont pas capables de se déplacer en motilité de type *swarming*, même lorsqu'en contact avec la souche sauvage.

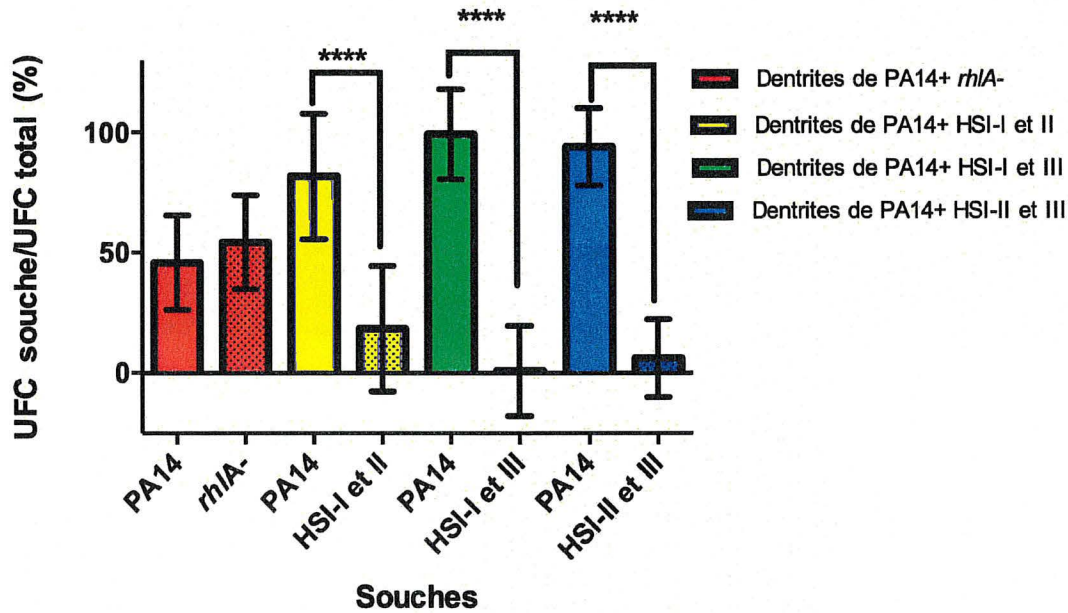


Figure 7.7: Co-inoculation des doubles mutants HSI avec PA14

Les doubles mutants HSI étaient inoculés avec PA14::*gfpmut3*. Le ratio de colonies GFP (PA14) *versus* le nombre total de bactéries est comparé au ratio de colonies non GFP (double mutants HSI et *rhlA*⁻) sur le nombre total de colonies. Les statistiques ont été réalisées avec de Prism 6 (Graph Pad) et des Student *t*-test ont été effectué entre le ratio de PA14 et le ratio de l'autre souche dans chaque condition (****<0,0001).

7.3.4 Évolution dirigée du mutant des îlots HSI-II et III

À la **Section 7.3.3**, il n'a pas été possible de récupérer la motilité de type *swarming* des doubles mutants HSI. En s'inspirant des Chapitres 3 à 6 de cette thèse, une évolution dirigée a été tentée sur le mutant HSI-II et III afin de vérifier s'il était possible de récupérer sa capacité de se déplacer en motilité de type *swarming*. S'il est possible de restaurer son défaut de motilité, il sera alors possible de déterminer, par le séquençage du génome, les mutations compensatoires dans des gènes cibles.

Au **chapitre 5**, cette méthode a permis de confirmer le rôle du système Gac/Rsm dans la motilité de type *swarming*. Le mutant HSI-II et III a été choisi pour cette expérience puisqu'il est le double mutant avec le plus grand défaut de motilité de type *swarming*. Or, lors de l'évolution, le mutant HSI-II et III a perdu sa motilité de type *swarming*, alors que le contraire était attendu (**Fig. 7.8**).

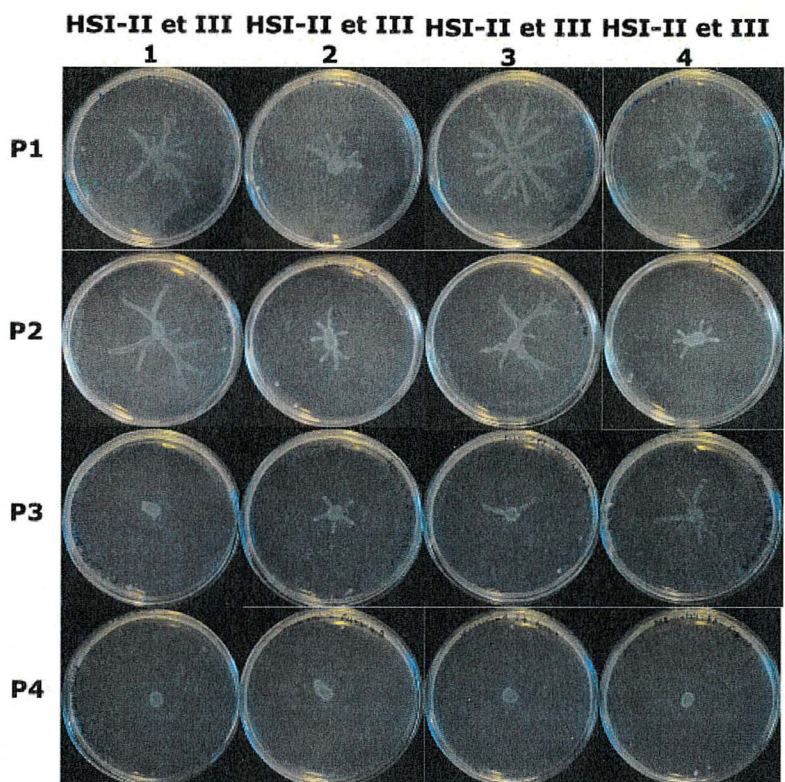


Figure 7.8: Évolution dirigée du mutant HSI-II et III

Évolution dirigée du mutant HSI-II et III en condition de *swarming*. Les cellules aux bouts des dendrites ont été récupérées pour inoculer le prochain passage. Quatre lignées indépendantes ont été réalisées.

7.3.5 Déterminer le phénotype en motilité de type *swarming* des doubles mutants HSI

Les résultats obtenus précédemment sont ambigus quant à l'implication des SST6 en motilité de type *swarming*. De plus, les doubles mutants HSI sont le résultat de la délétion de plusieurs gènes contenus dans les îlots HSI (**Tableau 7.1**) (Lesic & Rahme, 2008; Lesic *et al.*, 2009). Le but est de déterminer si le défaut de motilité de type *swarming* ne serait pas le résultat de la délétion de grandes régions géniques qui affecterait d'autres gènes. Pour ce faire, un allèle muté du gène *icmF1* du système HSI-I a été réalisé et inséré dans les mutants HSI-II et le mutant HSI-III pour mimer les mutants HSI-I et II et HSI-I et III. Une mutation dans *icmF1* (ou *tssM1*) est connue pour abolir le rôle de sécrétion du SST6-1 (LeRoux *et al.*, 2012; Mougous *et al.*, 2006). Cette protéine transmembranaire permet le bon assemblage du système pour qu'il soit fonctionnel (Mougous *et al.*, 2006). Des tests de motilité de type *swarming* ont été réalisés sur ces mutants pour vérifier la perte de la motilité de type *swarming* chez les mutants HSI-II et HSI-III lors de

l'ajout de la mutation dans *icmF1* (**Fig. 7.8**). Ces résultats ont démontré que l'ajout de la mutation *icmF1* dans les mutants HSI-II et HSI-III n'ont pas permis de causer un défaut de motilité de type *swarming*. Donc ces nouveaux doubles mutants ne permettent pas de reproduire le défaut des doubles mutants préalablement obtenus.

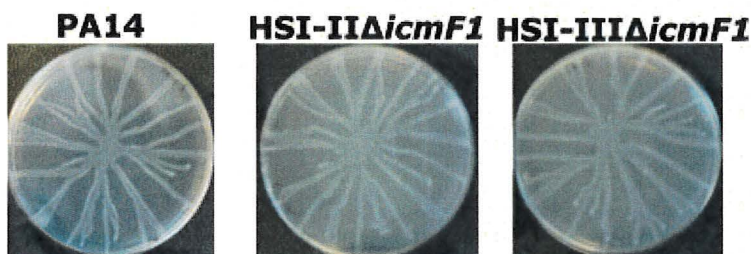


Figure 7.9: Test de motilité de type *swarming* des mutants HSI-II *icmF1* et HSI-III *icmF1*

Test de motilité de type *swarming* de PA14 et des mutants HSI-II Δ *icmF1* et HSI-III Δ *icmF1*.

7.4 Discussion

Le but de cet objectif est de déterminer si les SST6 ont un rôle à jouer en motilité de type *swarming*. Tous les doubles mutants HSI que possède *P. aeruginosa* ont un grand défaut de motilité de type *swarming*. Les différents gènes liés à ces systèmes sont surexprimés dans un mutant *hptB*, qui possède un défaut de motilité *swarming* dû à un élément manquant inconnu. L'hypothèse initiale est que les SST6 ont un rôle à jouer dans la motilité de type *swarming*. Chez *P. mirabilis*, le rôle des SST6 dans la reconnaissance du soi est bien répertorié en motilité de type *swarming* (**Section 1.5.2**) (Alteri *et al.*, 2013; Gibbs *et al.*, 2008; Gibbs *et al.*, 2011). Ainsi, il serait possible que l'échange d'effecteurs par ce système module la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*.

Tout d'abord, le pourcentage de recouvrement en motilité de type *swarming* a confirmé le défaut de motilité. Un problème de croissance n'explique pas ce défaut, puisqu'en liquide dans des conditions qui imitent la motilité de type *swarming*, ces mutants n'ont pas de défaut de croissance. Toutefois, ces résultats pourraient être confirmés par une courbe de croissance en condition solide. La présence d'un flagelle fonctionnel et la production de rhamnolipides de manière suffisante ne sont pas à eux seuls en mesure d'expliquer le défaut dans la motilité de type *swarming* des mutants HSI. Cela laisse sous-entendre qu'un autre facteur inconnu est responsable dans leur incapacité à se déplacer en surface. De plus, les trois doubles mutants ont, pour chaque phénotype testé, une tendance similaire donc ces systèmes seraient

complémentaires dans leur action pour la motilité de type *swarming*. Avec ces résultats, la cause du défaut de motilité de type *swarming* chez les doubles mutants HSI ne peut être déterminée.

L'évolution dirigée du mutant HSI-II et III n' a pas permis de récupérer la motilité de type *swarming*, comme pour le mutant $\Delta hptB$ puisque RsmA régule les HSI. Toutefois, il n'est tout de même pas possible de déterminer si la cause du défaut est la même pour les mutants HSI et le mutant $\Delta hptB$. Au **Chapitre 5**, le défaut de motilité de type *swarming* du mutant $\Delta hptB$ a été complété par des mutations spontanées dans les gènes *gacA* et *rsmA*. Il serait intéressant de déterminer si ces mêmes mutations, introduites dans les doubles mutants HSI, récupèrent le défaut de motilité de type *swarming* de ces mutants. Ceci pourrait être une indication que le défaut de motilité du mutant $\Delta hptB$ et des doubles mutants HSI proviennent de la même source (même élément manquant à la motilité de type *swarming*).

Par la suite, afin de déterminer cet élément inconnu, le mutant $\Delta hptB$ a été exploré. Celui-ci surexprime des gènes liés aux SST6 (Tremblay, 2011). PA14 évite le mutant $\Delta hptB$ *rhIA*'::*aadA*. L'idée que des effecteurs sécrétés d'une bactérie à l'autre entraînent le phénomène d'évitement pourrait expliquer ce phénotype. Comme exposé à la **Section 1.5.2**, les SST6 nécessitent un contact physique. Par contre, les colonies, même si elles ne semblent pas se toucher, sont très proches. Les systèmes pourraient être perméables et sécréter des effecteurs dans le milieu extracellulaire surtout dans un contexte de surexpression des systèmes. Le surnageant de culture est souvent étudié pour la sécrétion d'effecteurs dans des contextes de surexpression (Mougous *et al.*, 2006). Toutefois, nos résultats démontrent que les systèmes HSI-II et III ne causent pas l'évitement. Ces mêmes tests n'ont pas été faits sur le premier système HSI-I. Notons que les résultats précédents sur les doubles mutants HSI réagissent de façon similaire et le SST6-1 a peu de chance d'y être impliqué. Il pourrait toutefois être intéressant de créer le mutant nécessaire et de le tester. Des mutants dans différents gènes des effecteurs ou des protéines immunitaires ont été testés pour leur capacité à se déplacer en motilité *swarming*, toutefois ils avaient tous un phénotype semblable à PA14 (résultats non montrés). Sachant que les SST6 en motilité de type *swarming* ont un rôle dans la reconnaissance de soi chez *P. mirabilis* (Alteri *et al.*, 2013; Gibbs & Greenberg, 2011; Gibbs *et al.*, 2008; Saak & Gibbs, 2016; Wenren *et al.*, 2013), la surexpression des SST6 pourrait causer le repoussement de PA14. En effet, le mutant $\Delta hptB$ pourrait sécréter tellement de ces effecteurs que PA14 ne reconnaîtrait pas $\Delta hptB$ comme soi en ne fournissant pas assez de protéines immunitaires. Ainsi la surexpression des gènes SST6 pourrait en fait causer le défaut de motilité de type *swarming*. Or, cela ne semble pas être le cas ici. La motilité

de type *swarming* de $\Delta hptB$ avec les mutations HSI sans la mutation *rhIA* pourrait être testée en motilité de type *swarming* pour voir si la capacité de se déplacer a été retrouvée.

Par la suite, deux des trois SST6 sont nécessaires pour la motilité de type *swarming*. Étant donné la nature de ces systèmes, les SST6 nécessitent un contact physique afin d'échanger des effecteurs. Or, le contact des systèmes pourrait être un signal perçu par les systèmes qui régulent la motilité de type *swarming*. Afin de confirmer que les SST6 ont un rôle à jouer, les doubles mutants HSI ont été mis en contact physique avec la souche sauvage qui possède ces trois SST6 fonctionnels. Toutefois, cette proximité n'a pas permis de compléter les doubles mutants HSI (**Fig. 7.7**). De plus, ces résultats confirment que l'élément qui manque à la motilité de type *swarming* n'est pas un bien public, mais un bien privé. Des expériences similaires ont déjà été réalisées par une autre étudiant dans le laboratoire Déziel avec le mutant $\Delta hptB$ durant mon projet de doctorat. Le mutant $\Delta hptB$ n'était pas complété par la souche sauvage et donc cela confirme aussi pour ce mutant le fait que ce soit un bien privé (Jean-Pierre, 2017). Ainsi, ni la sécrétion d'effecteurs d'une cellule à l'autre ni le contact des SST6 ne semblent responsables du défaut de motilité.

Une autre tentative pour déterminer le défaut de motilité de type *swarming* des mutants HSI a été l'évolution dirigée du mutant HSI-II et III. Il a été surprenant de constater la perte complète de motilité de type *swarming* de ce mutant lors de l'évolution. De plus, contrairement à l'évolution de PA14 et $\Delta hptB$ (**Fig. 3.1 et 3.3**), visuellement, les colonies en *swarming* n'ont pas pris une teinte bleue. Il ne semblerait ne pas avoir d'émergence de mutants *lasR*. Il serait intéressant de confirmer l'absence de mutants *lasR* et de répéter avec les autres doubles mutants HSI.

Les doubles mutants HSI affectent plusieurs gènes dans le génome de la bactérie puisqu'ils sont le résultat de la délétion de grands îlots. Ainsi, d'autres éléments, non liés aux SST6, peuvent être affectés par ces délétions et peuvent expliquer le défaut de motilité de type *swarming*. Lorsque la mutation dans HSI-I est remplacée par *icmF1* dans les mutants HSI-II et HSI-III, ces souches peuvent se déplacer en motilité de type *swarming* (**Fig.7.9**). Ces résultats supportent le fait que les doubles mutants HSI ont un défaut de motilité de type *swarming* dû à un autre élément que les SST6. De plus, un autre étudiant du laboratoire a fait les tests de *swarming* sur HSI-II $\Delta icmF1$ et HSI-III $\Delta icmF1$ mais a vu une perte de *swarming* pour HSI-III $\Delta icmF1$. Ainsi, il n'a pas pu confirmer les résultats présentés ici pour HSI-III $\Delta icmF1$. Ainsi, il est important de vérifier les mutants utilisés et de tester les phénotypes propres au HSI pour confirmer l'abolition des systèmes (par exemple tester la sécrétion de protéines propres au SST6). De plus, inactiver *icmF1* n'est peut-être pas suffisant. Il serait possible de rajouter des mutations dans d'autres

gènes de structure du HSI-I dans les souches HSI-II Δ *icmF1* et HSI-III Δ *icmF1* pour s'assurer d'une inhibition du système.

Finalement, l'hypothèse initiale était que la sécrétion d'effecteurs propres aux SST6 explique le défaut de motilité de type *swarming*. Les résultats présentés dans ce chapitre semblent écarter cette hypothèse. Ainsi, d'autres pistes doivent être envisagées pour trouver l'élément qui cause un défaut de motilité de type *swarming* chez les mutants HSI et Δ *hptB*. Le système Gac/Rsm contrôle d'autres éléments qui pourraient expliquer le défaut tel que les PT4 (Brencic & Lory, 2009). Les différentes expériences ont permis de conclure que l'élément recherché soit un bien privé ce qui correspond au PT4.

8 RÉGULATION DES SST6 SELON LES DIFFÉRENTES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

8.1 Introduction

Au **Chapitre 7**, le but était de déterminer si les SST6 jouent un rôle dans la motilité de type *swarming*. Les résultats obtenus à ce jour ne permettent pas d'attribuer ce rôle aux SST6. Or, les conditions d'activation des SST6 sont encore méconnues. L'activation du système H1-T6SS semble passer par l'attaque d'une cellule voisine (Basler *et al.*, 2013). Son activation dans une monoculture est observée seulement en condition solide (Mougous *et al.*, 2007; Silverman *et al.*, 2011). L'hypothèse initiale est que la proximité entre cellules pourrait expliquer qu'en condition solide le H1-T6SS soit plus activé (plus de cellules, plus d'attaques)(Silverman *et al.*, 2011) et donc exprimé, lors de la motilité de type *swarming*, soit un type de motilité de groupe sur surface. Notons que chez *P. aeruginosa*, les SST6 sont normalement étudiés en condition liquide dans un mutant du gène *retS* (Mougous *et al.*, 2006). En effet, RsmA régule négativement ces systèmes et donc un tel mutant dans ce gène permet indirectement d'activer les SST6 (Brencic & Lory, 2009; Brenic *et al.*, 2009). Dans un mutant *retS*, ce régulateur ne peut plus inactiver GacS ce qui favorise indirectement l'expression de *rsmY* et *rsmZ* résultant ainsi en l'inhibition de RsmA. Sans une telle mutation, l'activité de ses systèmes n'est pas observée en liquide (Allsopp *et al.*, 2017; Silverman *et al.*, 2011). Il y a une description des différents systèmes de régulation à la **Section 1.4.3**.

Comprendre dans quelles conditions les SST6 sont exprimés permettrait de mieux comprendre comment ces systèmes fonctionnent. Même si les résultats obtenus précédemment n'associent pas le SST6 à la motilité de type *swarming*, une tentative pour déterminer quelles conditions favorisent leur expression a été réalisée. L'hypothèse est que les conditions environnementales associées à la surface (motilité de type *swarming*, en condition colonie et en biofilm) favorisent leur expression par rapport à la condition liquide.

8.2 Matériel et méthode

8.2.1 Souches bactériennes utilisées et conditions de croissance

Pour les expériences qui suivent, la souche PA14 a été utilisée (Rahme *et al.*, 1995). Pour les conditions de cultures, la souche PA14 a été cultivée en liquide, en motilité de type *swarming*, en

colonie (solide) ou en biofilm. Chaque fois, trois cultures de PA14 ont été inoculées dans le TSB à partir d'un tube congelé et incubé à 37 °C sur un tambour rotatif à 110 rpm (New Brunswick). Les mesures de DO_{600} ont été prises à l'aide d'un NanoDrop ND-1000. Par la suite, les trois cultures ont été inoculées dans les conditions spécifiques qui suivent.

Pour la condition liquide, les cultures dans le TSB ont été diluées à $DO_{600}=0,05$ dans 4,5 ml de milieu M9DCAA modifié contenant du dextrose et des casamino acides (M9DCAA) (Tremblay & Déziel, 2008). Les cultures ont été incubées à 34°C dans un tambour rotatif jusqu'à $DO_{600}=1,2$ (phase exponentielle) (Voir **Fig. 7.2**).

Pour la condition en motilité de type *swarming*, les essais ont été pratiqués tels que décrits précédemment. Brièvement, les cultures bactériennes ont été diluées à $DO_{600}=0,05$ dans du TSB frais et cultivées à 37°C dans un tambour rotatif jusqu'à $DO_{600}=3,00$. Trois géloses ont été inoculées pour chacun des réplicats. Les géloses ont été préparées à partir du milieu M9DCAA avec 0,5 % Bacto d'Agar (BD Biosciences) et les géloses ont été séchées 75 minutes sous une hotte biologique avant l'inoculation. Les géloses ont été placées dans des sacs et ont été incubées pendant 20h dans une chambre à 34 °C.

Pour la condition en colonie, les cultures ont été diluées à $DO_{600}=0,05$ dans du TSB frais et incubées jusqu'à $DO_{600}=3,00$ dans un tambour rotatif à 37°C à 110 rpm. Un volume de 5 µl a été inoculé sur une gélose de M9DCAA avec 1,5 % Bacto Agar (BD Biosciences), préalablement séchée 1h sous une hotte biologique. Les géloses ont été ensuite incubées 20h dans des sacs à 34°C. Pour chaque réplicat, six gouttes ont été déposées sur le dessus d'une même gélose.

Pour la condition biofilm, les cultures ont été cultivées comme décrits précédemment (Chapalain *et al.*, 2013). Les cultures dans le TSB ont été diluées à $DO_{600}=0,05$ dans du TSB frais et incubées jusqu'à $DO_{600}=3,00$ à 37°C sur tambour rotatif. Les géloses de milieu M9DCAA avec 1,5 % Bacto Agar (BD Biosciences) ont été préparées avec un filtre de polycarbonate de 0,22 µm déposé sur le dessus (quatre filtres par réplicat). Un volume de 100 µl de culture a été déposé sur le filtre. Les biofilms ont été alors incubés pendant 24h ou 48h dans des sacs à 34°C.

8.2.2 Récolte des cellules et extraction ADN

Pour les cellules en condition liquide, les cellules ont été récoltées comme décrits précédemment (Jean-Pierre *et al.*, 2017). Les cultures bactériennes ont été centrifugées pendant 9 minutes à 8 000 x g à 25°C. Le culot a été resuspendu dans 1 ml de Purezol (BioRad) et l'extraction de l'ARN a été réalisée selon le protocole du manufacturier BioRad.

Pour les cellules en conditions *swarming*, la récolte des cellules a été réalisée dans une chambre à 34 °C comme décrit précédemment (Tremblay & Déziel, 2010). Les centres de *swarming* ont été découpés à l'aide d'un Falcon de 15 ml (Sarstedt) et transférés dans un vase de Pétri stérile. Les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de RNA later (Qiagen) et récoltées. Pour les extrémités de dendrites, chaque bout a été resuspendu dans 10 µl de RNA later (Quiagen) et ils ont été récoltés ensemble dans un même microtube. Les cellules récoltées (centres de *swarming* et les extrémités de dendrites) ont été centrifugées 9 minutes à 8000 xg à 25°C. Le culot a été resuspendu dans 800 µl de Purezol (BioRad) et l'extraction de l'ARN a été réalisée selon le protocole du manufacturier BioRad.

Pour la condition colonie, 1 ml de RNA later (QIAGEN) ont été déposé sur chaque pétri. La biomasse (soit 6 colonies par réplikat) a été grattée et les cellules ont été resuspendues. La suspension a été récoltée par une pipette et déposée dans un microtube. Les cellules ont été centrifugées 9 minutes à 8000 xg à température pièce. Le culot a été ensuite resuspendu dans 1 ml de Purezol (BioRad) et l'extraction de l'ARN a été réalisée selon le protocole du manufacturier BioRad.

Pour la condition biofilm, les filtres ont été déposés dans un tube de polypropylène de 50 ml (Sarstedt) contenant 1,5 ml de RNA later (Qiagen) et des billes de verre (4.5-mm, environ 10 au total). Tous les filtres d'un même réplikat ont été combinés dans un même tube. Les tubes ont été mélangés par inversion et vortexés 10 minutes à vitesse maximum. La suspension bactérienne a été récoltée à l'aide d'une pipette et transférée dans un microtube. Les cellules bactériennes ont été centrifugées 9 minutes à 8000 xg à température pièce. Le culot a ensuite été resuspendu dans 1 ml de Purezol (BioRad) et l'extraction de l'ARN a été réalisée selon le protocole du manufacturier BioRad.

8.2.3 PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

Les ARN étaient dilués à 50 ng/µl et retranscrits en ADN suivant les indications du manufacturier de la iScript (BioRad). Le kit Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) a été utilisé pour la quantification en utilisant le thermocycleur RotorGene 6000 (Corbett) thermocycler comme appareil et les amorces utilisées se trouvent au **Tableau 8.1**. Le gène *nadB* a été utilisé comme gène de référence et utilisé pour la normalisation du cycle limite (CT) dans chaque échantillon. Ce gène a précédemment été utilisé comme référence dans les mêmes conditions et son expression est constante dans les condition de *swarming* et liquide (Jean-Pierre, 2017; Jean-Pierre *et al.*, 2017; Tremblay, 2011; Tremblay & Déziel, 2010). Dans le cas des quantifications de

l'ARNm des bactéries cultivées en biofilm, le gène *omlA* a été utilisé comme gène de référence, puisqu'il a précédemment été utilisé dans des conditions similaires et a été démontré pour avoir une expression stable (Kuchma *et al.*, 2005). La méthode utilisée pour calculer la variation d'expression est la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) et les résultats sont donnés selon la variation d'expression relative entre deux conditions (\log_2). Ici, la condition de base est le milieu liquide. Les variations de $<-1,5 \log_2$ ou $>1,5 \log_2$ sont considérées significatives.

Tableau 8.1: Amorces de qRT-PCR utilisées

Gène	Amorces	Séquences (5'-3')	Références
nadB	nadBq_fwd1	CTACCTGGACATCAGCCACA	(Tremblay & Déziel, 2010)
	nadBq_rev	GGTAATGTTCGATGCCGAAGT	
omlA	omlA-F	ATGCTGACCTGTCTCGCTTT	Cette étude
	omlA-R	CCTTGCTGGATGTTCGATTTT	
fha1.2	F-00980	CACCAGCTACCACAAGCTGA	Cette étude
	R-00980	GCAGGACCCAGTCGTTGT	
hsiA1	F-00990	CTGGATGTACCCGTTTTGCT	Cette étude
	F-00990	GCGTTCGAGTTCGAGGAA	
hcp1	PA0085q_fwd	ACCCTGAAGGAAGTCCTGGT	(Tremblay, 2011)
	PA0085q_rev	AGTTCAGGGTCACGTTCTCG	
hsiC2	PA1668q_fwd	GTGGAAAACAGCCAGGTCAT	(Tremblay, 2011)
	PA1668q_rev	CCGAAGGTCTCGTTATGGAA	
hsiA2	F-43050 (OAL511)	GGTTGACCTGGGCCCTCTAC	(Jones <i>et al.</i> , 2014)
	R-43050 (OAL512)	GATGGATCTCGACCCAATGC	
hcp2	F-43070(OAL540)	CCAAGGTCGAGATCCAGTGGTA	(Jones <i>et al.</i> , 2014)
	R-43070(OAL541)	GTAGTCCTTGATGTCGACGATGAT	

vgrG14	SR_F-43080	TGCAGGTGCTCTCCTTCAG	Cette étude
	SR_R-43080	GTTTGTGCAGCAGGCTTTTC	
dotU3	F-34110	GGTAGGCATAGGGCAACG	Cette étude
	R-34110	AGGCCTCCAGCCATTCCT	
lip3	F-34080	GAAGCACGGATGTTTCACC	Cette étude
	R-34080	CGCGAAGAAATACGAGCAG	
hsiB3	F-34070	CAGCTCCTTCTTCTCGATGG	Cette étude
	R-34070	CAGCTCCTTCTTCTCGATGG	
clpV3	F-33990	CTCGAGCGAGGTGGAAAG	Cette étude
	R-33990	GGTAGGCATAGGGCAACG	

8.3 Résultats

8.3.1 Expression des SST6 en motilité de type *swarming*

Les SST6 permettent l'échange d'effecteurs d'une cellule à l'autre. Comme expliqué précédemment (**Section 8.1**), ces systèmes ne semblent pas être naturellement exprimés en liquide, mais plus tôt en condition de culture solide. Donc, en utilisant la motilité de type *swarming*, il a été possible d'observer l'expression de différents gènes se trouvant dans les trois îlots des SST6. Leur transcription a été comparée à l'expression de ces mêmes gènes en condition liquide. En condition de motilité de type *swarming*, il est attendu que ces systèmes soient plus exprimés. Toutefois, leur transcription est de la même intensité ou est moins exprimée en condition *swarming* comparée à la condition liquide (**Figure 8.1**). Le gène *hsiA1* est une exception et est légèrement surexprimé, autant dans les centres que dans les dendrites en condition *swarming*, lorsque comparés à la condition liquide. Pour ce qui est des gènes associés au HSI-II, seul *hsiC2* est sous-exprimé en condition *swarming* (centres et dendrites) par rapport à la condition liquide. Les autres gènes de ce système n'ont pas démontré de différence de transcription significative

entre les deux conditions. Pour les gènes associés au HSI-III, *dotU3* et *clpV3* sont sous-exprimés dans les deux conditions alors que *lip3* et *hsiB3* n'ont pas démontré de différence de transcription.

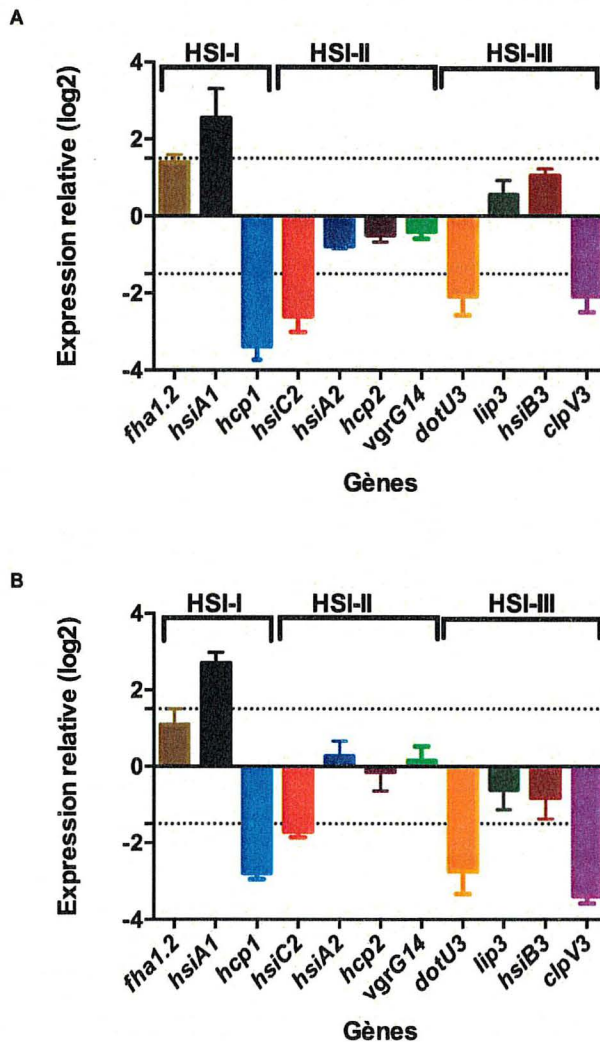


Figure 8.1: Niveaux de transcription de différents gènes associés aux SST6 en motilité de type *swarming*

Résultats comparatifs de la transcription de gènes provenant de HSI-I (*fha1.2*, *hsiA1*, *hcp1*), de HSI-II (*hsiC2*, *hsiA2*, *hcp2*, *vgrG14*) et de HSI-III (*dotU3*, *lip3*, *hsiB3*, *clpV3*) dans une colonie de *swarming*. L'expression de ces gènes est représentée en (A) dans les centres de *swarming* ou (B) les bouts de dendrites comparés à l'expression dans la condition liquide. Les lignes pointillées représentent le seuil arbitraire.

8.3.2 Expression des SST6 en colonie

Dans le cas d'une colonie sur le dessus d'une gélose, les gènes sont sous-exprimés par rapport à la condition liquide (**Fig. 8.2**). Seul *hsiC2* est très sous-exprimé selon une expression relative de près de -4. Les gènes *hcp1*, *dotU2* et *clpV3* ont présenté un niveau d'expression de près de -1,5, log2, mais ils dépassent légèrement la limite et sont donc considérés comme sous-exprimés.

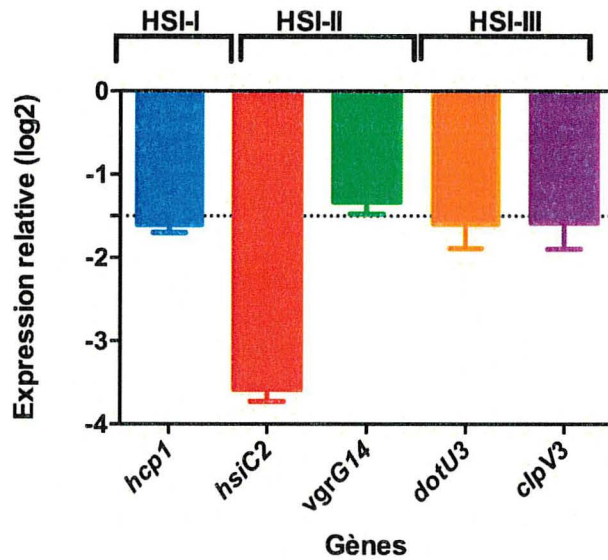


Figure 8.2: Niveaux de transcription de différents gènes associés aux SST6 en condition colonie

Résultats comparatifs de l'expression de gènes provenant de HSI-I (*fhA1.2*, *hsiA1*, *hcp1*), de HSI-II (*hsiC2*, *hsiA2*, *hcp2*, *vgrG14*) et de HSI-III (*dotU3*, *lip3*, *hsiB3*, *clpV3*) dans une colonie (géluse 1,5 % agar) comparée à l'expression de la condition liquide. Les lignes pointillées représentent le seuil arbitraire.

8.3.3 Expression des SST6 en biofilm

Finalement, l'expression relative des différents gènes a été mesurée en condition biofilm (24 et 48h) et comparée à la condition liquide. Les gènes associés aux SST6 sont sous-exprimés dans les biofilms avec une tendance plus forte à 48h (sauf pour *vgrG14*). Les gènes les plus affectés ont été *hsiC2* et *hsiA2* (Fig. 8.3).

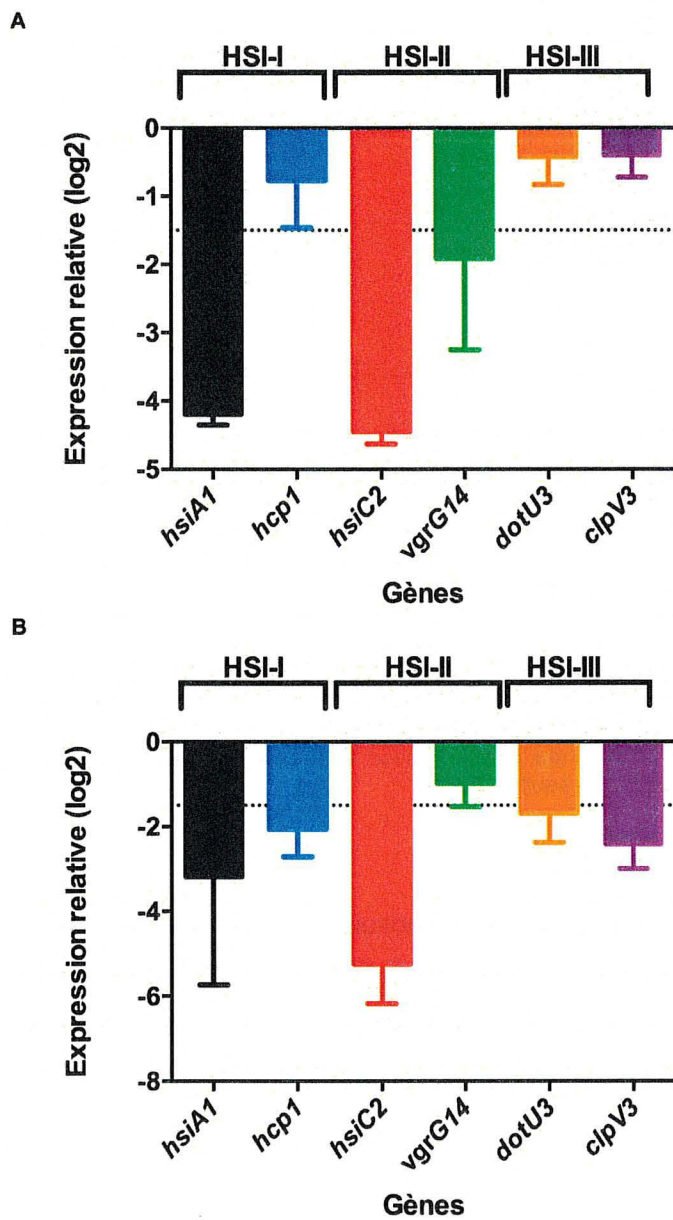


Figure 8.3: Niveaux de transcription de différents gènes associés aux SST6 en condition de biofilms

Résultats comparatifs de l'expression de gènes provenant de HSI-I (*fhA1.2*, *hsIA1*, *hcp1*), de HSI-II (*hsiC2*, *hsiA2*, *hcp2*, *vgrG14*) et de HSI-III (*dotU3*, *lip3*, *hsiB3*, *clpV3*) dans un biofilm (A) 24h ou (B) 48h comparé à la condition liquide. Les lignes pointillées représentent le seuil arbitraire.

8.4 Discussion

Étant donné que les SST6 sont étudiés en condition liquide en utilisant des mutants dans la régulation de ces systèmes, l'hypothèse est que d'autres conditions environnementales peuvent

favoriser l'expression de ces systèmes. De plus, l'étude transcriptomique d'un mutant de *rsmA* a indiqué que ce régulateur réprime l'expression des SST6 (Brencic & Lory, 2009). Le but ici est de déterminer quelles conditions de croissance favorisent l'expression de gènes cibles pour ces trois systèmes chez *P. aeruginosa*. Pour ce faire, l'expression de différents gènes en motilité de type *swarming*, en colonie et en biofilm a été étudiée. Leur expression est comparée à celle de la condition liquide (considérée comme la condition de base) pour connaître les conditions qui permettent une meilleure expression de ces systèmes.

Étonnamment, nos résultats démontrent, qu'en général, les gènes testés ont la même expression ou sont sous-exprimés comparés à la condition liquide. Pourtant, dans la littérature, tout porte à croire que la condition solide semble favoriser l'expression des SST6 (Silverman *et al.*, 2013; Silverman *et al.*, 2011). De plus, la régulation des SST6 est associée à la régulation en biofilm (Chen *et al.*, 2020; Southey-Pillig *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Chen *et al.*, (Chen *et al.*, 2020) ont démontré que l'expression des gènes *hcp1*, *hcp2*, *hcp3* est plus élevée dans les biofilms qu'en culture planctonique. Ceci est contraire aux résultats présentés dans ce chapitre pour le gène *hcp1*. Or, ils ont utilisé la souche PAO1 et les conditions de croissance sont différentes (Chen *et al.*, 2020). En condition *swarming*, dans le laboratoire Déziel, durant la réalisation de ce projet, une étude transcriptomique a été réalisée sur plusieurs mutants et chez PA14 en condition *swarming* comparée à la condition liquide. Les résultats supportent les données en motilité de type *swarming* où plusieurs gènes liés aux trois systèmes de sécrétion de type VI étaient fortement sous-exprimés (Jean-Pierre, 2017). Cette sous-expression est présente autant dans les bouts de dendrites que dans les centres de motilité de type *swarming* chez la souche sauvage.

Notons que Allsopp *et al.* (Allsopp *et al.*, 2017) ont pu observer la sécrétion de Hcp1-2-3 à 25 °C alors qu'à 37 °C, dans les mêmes conditions, ces protéines n'étaient pas sécrétées. Des tests préliminaires sur les doubles mutants HSI à différentes températures en motilité de type *swarming* n'ont pas permis de conclure sur l'effet la température sur la motilité de type *swarming*. Il aurait été intéressant de regarder l'expression des différents gènes testés selon les différentes températures.

Notons que les SST6 ont une forte régulation post-transcriptionnelle (Basler *et al.*, 2013; Casabona *et al.*, 2013; Mougous *et al.*, 2007). Tout porte à croire ici qu'analyser la transcription des gènes ne soit pas la meilleure approche pour vérifier l'hypothèse et que l'analyse de la production des protéines est plus adéquate. Tout d'abord, les trois SST6 sont régulés négativement par RsmA au niveau post-transcriptionnel (Allsopp *et al.*, 2017; Brennic & Lory, 2009) et ceci se confirme par la sécrétion des différents Hcp (Allsopp *et al.*, 2017). De plus, des

ARNm spécifiques aux H1-SST6 se lient directement à RsmA (Brencic & Lory, 2009). Pour ce qui est de H2-T6SS et H3-T6SS, afin de mieux comprendre les conditions environnementales qui permettent l'activité protéomique des SST6, des rapporteurs traductionnels ou de l'activité d'une protéine dans les conditions proposées ci-dessus pourraient être étudiés. Par exemple, l'utilisation de *c/pV-GFP* (protéine nécessaire à l'assemblage) a déjà été effectuée pour rapporter l'assemblage des SST6 (Basler *et al.*, 2013). De plus, dans la littérature, l'abondance des protéines du SST6 dans les différentes souches et différentes conditions a déjà été rapporté en utilisant la technique de *stable isotope dilution*(SID)-*selected reaction monitoring*(SRM)-*mass spectrometry*(MS) (Lin *et al.*, 2019; Zhao & Brasier, 2013). SID-SRM-MS est un technique des MS permettant la quantification de protéines. Un petite signature (unique à la protéine d'intérêt) est généré avec l'ajout d'isotopes stables. Celui-ci est ajouté au mélange et permet de quantifier la protéine d'intérêt en utilisant le MS de façon plus précise (Zhao & Brasier, 2013). Ainsi, en déterminant certaine protéines cibles du SST6, il sera possible de les quantifier de façon précise selon les conditions environnementales.

9 CONCLUSION

L'objectif initial de ce projet est de mieux comprendre les facteurs régulant la motilité sociale de type *swarming* chez *P. aeruginosa*. Pour ce faire, le mutant $\Delta hptB$ a été étudié et a été central pour ces travaux car il possède tous les éléments requis connus pour ce type de motilité, soit un flagelle fonctionnel et la production d'un agent mouillant, mais est incapable de se déplacer en motilité de type *swarming*. Ainsi l'hypothèse a été émise qu'il existe un ou plusieurs autres facteurs, nécessaires à la motilité de type *swarming* encore inconnus et qui explique le défaut de motilité de type *swarming* du mutant $\Delta hptB$.

Pour mieux comprendre l'incapacité du mutant $\Delta hptB$ à adopter une motilité de type *swarming*, une évolution dirigée de ce mutant a été réalisée. Le but était de sélectionner des mutants ayant récupéré un phénotype de motilité de type *swarming* similaire à la souche sauvage. Précédemment, Boyle *et al.* ont utilisé une approche similaire avec un mutant impliqué dans le métabolisme du carbone, qui a un défaut de motilité de type *swarming*, mais possède aussi les éléments nécessaires connus à ce type de motilité (Boyle *et al.*, 2017). Dans notre évolution expérimentale, les cellules aux extrémités des dendrites ont été récupérées, resuspendues et transférées sur une nouvelle gélose de motilité de type *swarming* sur plusieurs passages. À la suite de seulement trois passages le mutant $\Delta hptB$ a récupéré un phénotype de type *swarming* semblable à la souche sauvage. Étonnement, les colonies évoluées ont aussi prises une teinte bleutée caractéristique de la production excessive de pyocyanine. Des clones, provenant des populations résultantes après quatre passages, ont été isolés. De ces clones deux phénotypes distincts, soit le phénotype bleu démontrant un *swarming* partiel ou la récupération totale du phénotype de *swarming*, ont été isolés. Des analyses génomiques ont associé ces deux phénotypes à des catégories distinctes de mutations.

Dans un premier temps, l'évolution dirigée en motilité de type *swarming* a permis de récupérer un phénotype de surface similaire à la souche sauvage dans ces conditions chez le mutant $\Delta hptB$ par des mutations compensatoires dans les gènes *gacA* et *rsmA*. Ceci démontre que le facteur inconnu à la motilité de type *swarming* est contrôlé par la protéine RsmA et confirme son rôle de régulateur global de la motilité de type *swarming*. L'évolution expérimentale a permis d'identifier une mutation dans ce gène ce qui a permis à la protéine de limiter son interaction avec un petit ARN qui a pour fonction d'inhiber la protéine RsmA. De plus, un autre clone possède une mutation dans le gène *gacA*, dont le seul rôle connu est de contrôler l'expression des pARN qui modulent

l'activité de la protéine RsmA. Le fait que le mutant $\Delta hptB$ après trois passages puisse se déplacer mais que le mutant $\Delta rsmA$ ne semble pas récupérer la motilité de type *swarming* après dix passages (**Fig. 6.3**) semble confirmer la nécessité de ce régulateur en motilité de type *swarming*. Ceci renforce la convergence des résultats vers la protéine RsmA et son importance dans la régulation des modes de vie de la bactérie. RsmA inhibe la traduction de gènes (Brencic *et al.*, 2009) et pour promouvoir la motilité de type *swarming*, l'hypothèse est que la protéine RsmA agit sur un ou plusieurs régulateur(s) qui inhibent l'élément inconnu essentiel au *swarming* (**Fig. 9**). En effet, RsmA étant un inhibiteur, il pourrait inhiber un régulateur qui empêche la production du facteur recherché. Toutefois, une autre hypothèse est que la protéine RsmA agit directement sur un élément qui empêche la motilité de type *swarming*.

Ce qui a été constaté en étudiant les populations obtenues par évolution expérimentale de $\Delta hptB$, c'est qu'elles sont surtout composées de mutants spontanés dans le gène *lasR*. Ces mutants ont aussi émergé lors de l'évolution dirigée de PA14 en motilité de type *swarming* et ne semblent pas être un phénomène spécifique à l'évolution du mutant $\Delta hptB$. Les mutations dans les gènes *rsmA* et *gacA*, au contraire sont probablement spécifiques au mutant $\Delta hptB$ étant donné que l'émergence des mutations dans ces gènes n'a pas été observée dans d'autres conditions. Le phénomène de l'émergence de mutants *lasR*⁻ n'est pas nouveau puisque les mutants *lasR*⁻ ont déjà été rapportés pour apparaître dans certaines conditions de culture en laboratoire et aussi chez l'être humain (Azimi *et al.*, 2019; Sandoz *et al.*, 2007; Schick & Kassen, 2020). Or, le **Chapitre 3** rapporte pour la première fois l'émergence de mutants *lasR*⁻ en motilité de type *swarming*. Dans nos conditions, le potentiel impact de facteurs environnementaux qui entraîne l'émergence de mutants *lasR*⁻ en condition *swarming* a été exploré. Toutefois, un facteur favorisant l'apparition de tels mutants *lasR*⁻ n'a pas pu être découvert. Une grande proportion des observations sur ce sujet dans la littérature est basée sur des conditions en liquide. Or, le plus grand défi a été d'adapter cette littérature à la condition de surface. En effet, certains résultats étaient prometteurs lorsque l'aspect métabolique de *P.aeruginosa* cultivée en milieu en liquide a été étudié (**Chapitre 4**). Toutefois, l'avantage observé en condition liquide n'a pas été retrouvé en condition solide. Il a tout de même été possible de conclure que le mutant *lasR*⁻ contribue positivement au «fitness» d'une population en *swarming*, versus une population constituée uniquement de la souche sauvage. Cet avantage d'une population mixte évoluée reste inexplicable et nécessitera de nouvelles études. Il serait intéressant de répéter les expériences réalisées aux **Chapitres 3 et 4** (croissance en oxygène, cinétique de croissance en solide (**Fig. 3.5, Fig. 4.2, Fig. 4.3**)) avec les populations évoluées (composées majoritairement d'une variété de clones