

INRS-Institut Armand-Frappier

***Drosophila melanogaster* comme hôte-modèle alternatif  
pour l'étude de la virulence de microorganismes pathogènes**

Par  
Josée Castonguay-Vanier

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Rolf Morosoli, PhD. INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Steve Charette, PhD. Université Laval
Directeur de recherche	Éric Déziel, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier

## RÉSUMÉ

L'idée d'utiliser des organismes plus simples que les mammifères afin de modéliser les bases moléculaires de la pathogenèse de certains microorganismes est de plus en plus courante. *Drosophila melanogaster* sert ainsi depuis une dizaine d'années d'hôte alternatif pour l'étude de la virulence de certains microorganismes, mais également pour l'étude de la relation hôte-pathogène.

Le présent projet visait ainsi à établir la drosophile comme hôte-modèle dans nos laboratoires. Les protocoles d'infection par ingestion ont donc d'abord été optimisés. Une fois cet objectif réalisé, la validité du modèle a pu être confirmée par des tests de mortalité par ingestion de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 et de mutants déjà connus pour être moins virulents chez d'autres hôtes tels que *lasR/rhlR* (quorum sensing) ou *pscD* (système de sécrétion de type III).

Ce mode d'infection par ingestion de microorganismes pathogènes ne s'est toutefois pas avéré concluant avec *Actinobacillus pleuropneumoniae*, une bactérie pathogène spécialiste du porc, ni avec les espèces faisant partie du complexe *Burkholderia cepacia* (Bcc). Aucune mortalité ne sera en effet survenue dans les populations de drosophiles infectées par les espèces de ces deux genres bactériens. La méthode d'infection par piqûre fut donc utilisée pour le Bcc, où elle a permis de différencier les souches selon leur pouvoir pathogène ; ce qui n'avait encore jamais été rapporté dans la littérature. Les souches *B. multivorans* LMG16660 et *B. dolosa* LMG21819 n'ont provoqué aucune mortalité, alors qu'avec les souches *B. cepacia* LMG1222, *B. pyrrocinia* LMG21824 et *B. ubonensis* LMG 20358 aucune drosophile n'a survécu plus de 72 heures aux infections. La croissance de plusieurs souches du Bcc (*B. cenocepacia* LMG18830, *B. cenocepacia* K56-2 et *B. cepacia* LMG18821) a également été suivie chez les drosophiles infectées. Il a ainsi été observé que le nombre d'UFC (Unités Formatrices de Colonies) isolées des mouches augmentait de façon continue lors des infections. Alors que les souches LMG18830 et K56-2 ont mis plus de 3 jours à atteindre  $10^6$  UFC *in vivo*, *B. cepacia* LMG18821 a mis moins de 15 heures. Cette souche s'est aussi avérée plus virulente que les deux autres, tuant la totalité des drosophiles en moins de 120 heures.

En plus de proposer un modèle efficace (par ingestion pour *P. aeruginosa* et par piqûre pour les espèces du Bcc), le présent projet visait aussi à étudier l'effet de certains facteurs sur les

courbes de mortalité des mouches à fruit lors d'infections par ingestion de *P. aeruginosa*. En effet, les conditions expérimentales dans lesquelles se déroulent les infections (par exemple : la présence d'un microbiote chez la drosophile, le sexe de l'animal, le cycle de lumière lors de l'infection ou un jeûne avant l'ingestion de *P. aeruginosa*) varient d'une équipe de recherche à l'autre. L'étude de l'effet de ces facteurs sur les courbes de mortalité des drosophiles a donc débuté, afin d'éventuellement pouvoir proposer un modèle d'infection par ingestion standardisé. Les présents travaux ne permettent pas pour le moment d'affirmer que la mortalité des femelles lors de l'infection diffère de celle des mâles.

L'étude de la flore intestinale de la population de drosophiles du laboratoire a également été entreprise (par culture sur une variété de milieux en conditions aérobies et anaérobies, par amplification de régions du gène codant pour l'ARNr 16S et par électrophorèse sur gel à gradient dénaturant ou DGGE). Trois espèces appartenant au genre *Lactobacillus* ont ainsi été identifiées : *L. plantarum*, *L. pentosus* et *L. brevis*. Un traitement aux antibiotiques afin d'éliminer ce microbiote a été proposé.

---

Étudiante

---

Directeur de recherche

## REMERCIEMENTS

Ce projet de maîtrise, je ne l'aurais jamais entrepris s'il n'eut été de ce coup de téléphone du Dr Éric Déziel au printemps 2006. Je le remercie donc d'avoir pris une chance en acceptant une néophyte du laboratoire dans son équipe de recherche, et je le remercie encore plus pour son talent à vulgariser des concepts qui m'étaient souvent inconnus. En faisant partie de son équipe, j'ai pu apprécier sa motivation à ne pas suivre les chemins déjà tracés et à faire preuve d'une grande ouverture d'esprit face à la différence.

J'aimerais également remercier tous les membres du Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement pour leur patience infinie et les innombrables conseils (particulièrement Ludovic Vial, Julie Auclair et Julie Disnard).

Un merci tout particulier à Bertrand Bouchard (Laboratoire du Dr Michel Fournier) qui a été une source inépuisable de bons mots, d'heureux conseils et d'inspiration.

Une dernière pensée pour ma famille et mes ami(e)s hors de l'Institut qui ont souvent dû passer en deuxième.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>1. REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>6</b>
1.1 Les relations hôtes-pathogènes.....	7
1.2 Modèles d'infection alternatifs.....	7
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> comme modèle d'infection.....	8
1.3.1 Avantages et inconvénients de l'utilisation de la drosophile .....	9
1.3.2 Concordance avec le modèle murin .....	9
1.3.3 Le système immunitaire de la drosophile .....	10
1.3.4 Microbiote et immunité .....	11
1.3.5 Cycle de vie .....	12
1.3.6 Rythme circadien.....	14
1.4 Modes d'infection .....	15
1.5 Agents pathogènes.....	15
1.5.1 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	16
1.5.2 Espèces faisant partie du Complexe <i>Burkholderia cepacia</i> .....	16
1.5.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
1.5.4 Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .....	17
<b>2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</b> .....	<b>20</b>
2.1 Hypothèses .....	21
2.2 Objectifs .....	22
<b>3. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>23</b>
3.1 Maintien d'une population de drosophiles .....	24
3.1.1 Stocks de <i>D. melanogaster</i> .....	24
3.1.2 Conditions d'élevage.....	24
3.1.3 Milieu nutritif pour drosophiles .....	24
3.1.4 Transfert sur nouveau milieu .....	25
3.1.5 Anesthésie des drosophiles adultes .....	26
3.2 Axénisation des drosophiles.....	26
3.3 Infection par ingestion.....	27
3.4 Infection par piqûre .....	28
3.5 Isolement de bactéries vivantes à partir de drosophiles adultes.....	30
3.6 Culture de microorganismes de la microflore des drosophiles .....	30
3.7 Extraction d'ADN de souches pures et de la microflore des drosophiles .....	31
3.8 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	32
3.9 Réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	33

3.10	Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE).....	36
3.11	Extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide.....	37
3.12	Séquençage et analyse des séquences .....	38
<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>36</b>
4.1	Infections par ingestion .....	40
4.1.1	<i>Établissement et maintien de la population de drosophiles</i> .....	40
4.1.2	<i>Optimisation du protocole d'infection par ingestion</i> .....	41
4.1.3	<i>Infections avec pathogènes autres que P. aeruginosa</i> .....	48
4.1.3.1	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	48
4.1.3.2	<i>Complexe Burkholderia cepacia</i> .....	48
4.2	<i>Drosophila melanogaster</i> comme modèle d'infection pour le complexe <i>Burkholderia cepacia</i> .....	49
4.2.1	<i>Attestation de la contribution des auteurs</i> .....	50
4.2.2	<i>Confirmation des auteurs</i> .....	51
4.2.3	<i>Résumé en français</i> .....	52
4.2.4	<i>L'article</i> .....	53
4.2.4.1	<i>Abstract</i> .....	54
4.2.4.3	<i>Materials and methods</i> .....	56
4.2.4.4	<i>Results</i> .....	59
4.2.4.5	<i>Discussion</i> .....	62
4.2.4.6	<i>Acknowledgments</i> .....	67
4.2.5	<i>Figure additionnelle</i> .....	76
4.3	Identification des facteurs pouvant influencer l'infection.....	77
4.3.1	<i>Le cycle de lumière</i> .....	78
4.3.2	<i>Le durée du jeûne</i> .....	78
4.3.3	<i>Le sexe et l'âge de l'animal</i> .....	78
4.3.4	<i>Le microbiote</i> .....	80
4.3.4.1	<i>Le microbiote bactérien cultivable</i> .....	80
4.3.4.2	<i>Le microbiote bactérien non-cultivable</i> .....	82
4.3.4.3	<i>Les mycètes</i> .....	85
4.3.4.4	<i>Les autres eucaryotes</i> .....	86
4.3.4.5	<i>Axénisation des drosophiles</i> .....	87
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONS et PERSPECTIVES.....</b>	<b>93</b>
5.1	Infections par ingestion .....	94
5.2	Infections par piqûre.....	94
5.3	Modèle par ingestion ou par piqûre ?.....	95
5.4	Perspectives .....	95
<b>6.</b>	<b>LISTE DES RÉFÉRENCES.....</b>	<b>97</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Différence entre les mâles et les femelles.....	13
<b>Figure 2.</b> Cycle de vie de <i>D. melanogaster</i> .....	13
<b>Figure 3.</b> Infection par piqûre.....	28
<b>Figure 4.</b> Réaction immunitaire indiquée par des taches de mélanine chez un mâle (A) et chez une femelle (B).....	40
<b>Figure 5.</b> Protocole d'infection par ingestion essai # 1. ....	41
<b>Figure 6.</b> Infection par ingestion avec ou sans ajout de saccharose. ....	42
<b>Figure 7.</b> Infection par ingestion de mutant <i>chiC</i> - de <i>P.aeruginosa</i> PA14. ....	43
<b>Figure 8.</b> Méthode d'infection par ingestion basée sur celle de Chugani <i>et al</i> (2001).....	44
<b>Figure 9.</b> Infection par ingestion du mutant <i>chiC</i> - . ....	45
<b>Figure 10.</b> Infection par ingestion des mutants <i>pscD</i> - et <i>lasR/rhlR</i> .....	46
<b>Figure 11:</b> Survival curves for <i>D. melanogaster</i> flies challenged with <i>B. cenocepacia</i> K56-2.70	
<b>Figure 12:</b> Survival curves for <i>D. melanogaster</i> when infected with <i>B. cenocepacia</i> strains	71
<b>Figure 13.</b> Survival curves for <i>D. melanogaster</i> when infected with strains from the Bcc. ...	72
<b>Figure 14:</b> Relative bacterial load of flies infected with different Bcc species over time. ....	73
<b>Figure 15:</b> Survival curves for <i>D. melanogaster</i> when infectect with Bcc mutant strains.....	74
<b>Figure 16:</b> Competitive indices. ....	75
<b>Figure 17.</b> Courbes de croissance des mutants utilisés pour l'article, obtenues avec un Microbiology Bioscreen C Reader (Oy Growth Curves Ab Ltd). ....	76
<b>Figure 18.</b> Effet du sexe des drosophiles sur l'infection par ingestion de <i>P. aeruginosa</i> PA14.79	
<b>Figure 19.</b> Effet du sexe des drosophiles sur l'infection par ingestion du mutant <i>chiC</i> - ..... 79	
<b>Figure 20.</b> Diversité bactérienne du microbiote .....	81
<b>Figure 21.</b> Diversité microbienne non cultivable. ....	83
<b>Figure 22.</b> Vérification de produits PCR avec amorces FUN3 et FUN4. ....	85
<b>Figure 23.</b> Diversité des eucaryotes. ....	86

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Temps nécessaire pour le passage de l'embryon au stade adulte.....	14
<b>Tableau 2.</b> Gènes aux fonctions connues nécessaires à la virulence complète de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	19
<b>Tableau 3.</b> Amorces utilisées pour réaliser les PCR .....	35
<b>Tableau 4.</b> <i>Burkholderia cepacia</i> complex strains.....	68
<b>Tableau 5.</b> Primers used in this study.....	69
<b>Tableau 6.</b> Premier traitement aux antibiotiques pour axénisation des mouches. ....	89
<b>Tableau 7.</b> Deuxième traitement aux antibiotiques pour axénisation des mouches.....	91



## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
DGGE	Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
g	Gramme
L	Litre
μL	Microlitre
μm	Micron ou micromètre
M	Concentration molaire (mole)
mg	Milligramme
mM	Millimole
ml	Millilitre
mm	Millimètre
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pb	Paire de bases
p/v	Poids par volume
RPM	Rotation par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
V	Volt
v/v	Volume par volume

## **1. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

### **1.1 Les relations hôtes-pathogènes**

Les interactions hôtes-pathogènes sont des relations antagonistes où le succès des deux organismes dépend de leur habilité à supplanter l'autre (Tzou *et al*, 2002) ; la survie et la multiplication de l'agent infectieux en dépendra. Une bactérie pathogène devra d'abord coloniser l'hôte, c'est-à-dire adhérer à la surface ou aux cellules épithéliales puis y persister. Elle devra ensuite entraîner des dommages aux tissus ou aux organes et finalement provoquer la maladie, la manifestation clinique du dommage causé par cette interaction hôte-pathogène (Casadevall & Pirofski, 2000). Pour chacune de ces étapes, différents gènes seront donc exprimés chez le pathogène : des gènes de régulation, des gènes permettant l'adaptation ou la survie du micro-organisme aux attaques du système immunitaire de l'hôte, et des gènes reliés à l'expression des facteurs de virulence. Ces bactéries pathogènes n'ont cependant pas toutes le même spectre d'hôtes. En effet, certaines sont spécifiques à un organisme alors que d'autres ont la capacité de créer une infection chez une grande variété d'animaux. Ainsi, afin d'étudier les mécanismes impliqués dans leur virulence, l'utilisation d'hôtes-modèles appropriés est essentielle.

### **1.2 Modèles d'infection alternatifs**

Afin de pouvoir étudier les pathogènes infectant les humains et de mieux comprendre leurs mécanismes de virulence, l'utilisation de mammifères de laboratoire est depuis longtemps habituelle. Les rats et les souris, de la famille des muridés, sont entre autres très souvent utilisés. Depuis quelques années, des travaux de recherche démontrent de plus en plus que les mammifères, les plantes et les invertébrés utiliseraient certains mécanismes de défense communs contre les envahisseurs (entre autres : Medzhitov, 2001 ; Kavanagh et Reeves, 2004). Ces mécanismes, liés au système immunitaire inné, pourraient en fait être présents chez tous les métazoaires (Hoffmann et Reichhart, 2002). L'idée d'utiliser des organismes plus simples que les mammifères afin de modéliser les bases moléculaires de la pathogenèse de certains microorganismes peut ainsi être vue comme une possibilité. Des raisons financières et pratiques, mais aussi des considérations d'ordre éthique peuvent également faire pencher la balance en faveur de l'utilisation de modèles alternatifs aux souris ou rats.

Jusqu'en 1995, aucun modèle autre que le modèle murin n'était connu pour l'étude de la virulence de souches *Pseudomonas aeruginosa* pathogènes pour les humains (voir section 1.5.3).

C'est l'équipe de Rahme qui démontra alors que plusieurs souches de cette bactérie étaient en fait capable d'infecter des souris, mais aussi la plante *Arabidopsis thaliana* (Rahme *et al*, 1995 ; Rahme *et al*, 1997). C'est en 1999 que le nématode *Caenorhabditis elegans* fut utilisé pour la première fois et qu'il fut aussi établi comme hôte-modèle alternatif, également lors d'une étude sur la virulence de *P. aeruginosa* (Tan *et al*, 1999 ; Mahajan-Miklos *et al*, 1999). Le système immunitaire inné de *C. elegans* diffère toutefois beaucoup de celui des mammifères et demeure encore peu connu. L'année suivante, une étude, encore sur *P.aeruginosa*, soulignant une corrélation positive entre le modèle murin et les insectes (larves de *Galleria mellonella*) fut publiée (Jander *et al*, 2000). La taille de *G. mellonella* et le fait qu'il puisse survive à des températures proches de celle du corps humain en faisait alors un modèle attrayant. Les insectes font également preuve, face aux pathogènes, d'une réponse cellulaire complexe beaucoup plus proche de celle des mammifères que les nématodes et les plantes. S'il est possible d'étudier la virulence des pathogènes avec le modèle *Galleria*, il est cependant impossible de s'attaquer aux relations hôtes-pathogènes puisque le génome de cet insecte n'est pas encore connu. Des souches mutantes de ce modèle ne sont donc pas encore disponibles. L'amibe *Dictyostelium discoideum* fut aussi utilisée en 2000, à ce moment comme hôte pour les espèces de *Legionella* (Hägele, 2000), mais c'est en 2002 qu'elle fut utilisée pour la première fois dans une étude sur la virulence de *P. aeruginosa* (Cosson *et al*, 2002; Pukatzki *et al*, 2002; Skriwan *et al*, 2002). L'utilisation de ce modèle a permis l'étude de la phagocytose, ou à l'inverse, de la survie de ces pathogènes dans les phagolysosomes (Kurz et Ewbank, 2007). Son cycle de vie rapide et la facilité avec laquelle il est possible de la cultiver en laboratoire en font un modèle intéressant. La séquence de son génome est également disponible depuis 2005 (Eichenger *et al*, 2005). Étant un protozoaire, *D. discoideum* se trouve cependant évolutivement loin des mammifères.

### **1.3 *Drosophila melanogaster* comme modèle d'infection**

*D. melanogaster*, également appelée mouche à fruit ou drosophile, est un insecte de l'ordre des diptères. Elle est utilisée depuis une dizaine d'années comme modèle animal dans l'étude de la virulence de plusieurs microorganismes : *Erwinia carotovora* (Nicolas *et al*, 1998), *Plasmodium gallinaceum* (Schneider et Shahabuddin, 2000), *P. aeruginosa* (Boman *et al*, 1972 ; Chugani *et al*, 2001 ; D'Argenio *et al*, 2001), *Crithidia* spp. (Boulanger *et al*, 2001), *Mycobacterium marinum* (Dionne *et al*, 2003), *Listeria monocytogenes* (Mansfield *et al*, 2003),

*Cryptococcus neoformans* (Apidianakis *et al*, 2004), *Salmonella typhimurium* (Brandt *et al*, 2004), *Vibrio cholerae* (Blow *et al*, 2005), *Klebsiella pneumoniae* (Benghezal *et al*, 2006), *Streptococcus pneumoniae* (Pham *et al*, 2007) et *Serratia marcescens* (Flyg *et al*, 1980; Nehme *et al*, 2007).

Ces travaux de recherche ont entre autres permis de découvrir de nouveaux facteurs de virulence chez les agents pathogènes étudiés, mais aussi d'élucider les voies signalétiques utilisées chez l'hôte pour prévenir ou combattre une infection microbienne. C'est notamment en utilisant *D. melanogaster* qu'il aura été possible de démontrer pour la première fois chez un organisme les mécanismes d'action de la toxine cholérique de *Vibrio cholerae* (Blow *et al*, 2005).

### **1.3.1 Avantages et inconvénients de l'utilisation de la drosophile**

L'utilisation de *D. melanogaster* comme modèle d'infection permet la manipulation génétique de l'hôte. Son génome est également connu. La publication de sa séquence (Adam *et al*, 2000) a permis de démontrer que 60% de gènes humains reliés à des maladies avaient un homologue chez *D. melanogaster* (Schneider, 2000). C'est également un organisme simple et économique à élever et à utiliser puisque, par exemple, une femelle peut pondre jusqu'à 100 œufs par jour et en moyenne jusqu'à 3000 œufs durant sa vie (Ashburner *et al*, 2005).

Cependant, alors que plusieurs pathogènes n'expriment leurs facteurs de virulence qu'au-dessus d'une certaine température la drosophile, à l'instar de *C. elegans*, ne peut survivre que quelques heures à 37°C. Il est également probable qu'elle ne pourra servir d'hôte-modèle pour l'étude de tous les pathogènes des mammifères, puisqu'elle ne possède, entre autres, pas des organes aussi complexes.

### **1.3.2 Concordance avec le modèle murin**

Il a été démontré dans de nombreuses études (par exemple, Alibaud *et al*, 2008 ; Lau *et al*, 2003 ; Vodovar *et al*, 2004) que plusieurs gènes connus pour être essentiels à la virulence de *P. aeruginosa* chez les mammifères l'étaient aussi chez la drosophile. Certains de ces gènes joueraient un rôle dans la régulation du système de sécrétion de type III ; par exemple *pchH* ou *pchI*. Le gène *trpD* serait quant à lui impliqué dans la synthèse de l'acide aminé tryptophane (Alibaud *et al*, 2008).

Ces études valident donc le choix de la mouche à fruit comme modèle alternatif au modèle murin, particulièrement pour l'étude de la virulence de *P. aeruginosa*.

### ***1.3.3 Le système immunitaire de la drosophile***

Les vertébrés peuvent compter sur un système immunitaire sophistiqué afin de combattre les agents pathogènes. Dans ce cas, l'immunité est innée mais aussi acquise. Les insectes, dont *D. melanogaster*, sont dépourvus de cette deuxième composante apparue beaucoup plus tard au cours de l'Évolution avec l'arrivée des poissons cartilagineux (Hoffmann et Reichhart, 2002). La première ligne de défense de la drosophile contre les envahisseurs est assurée par son épiderme. En effet, les cellules épithéliales de cet animal, tout comme celles des mammifères, ont la capacité de produire des peptides antimicrobiens (PAM) et des dérivés réactifs de l'oxygène (Tzou *et al*, 2000). En plus d'assurer une défense immunitaire, la trachée et les intestins des drosophiles servent de barrières physiques à l'envahisseur : elles sont recouvertes d'une membrane de chitine et sont des sites de sécrétion constitutive de lysozymes (Kavanagh et Reeves, 2004). Un bris de la cuticule de l'insecte entraînera également une réaction de mélanisation immédiate (De Gregorio *et al*, 2002). Une 'tache' noire, due à la synthèse et à la déposition de mélanine à cet endroit, sera donc visible sur le pourtour de la blessure. Cette réaction est connue pour jouer un rôle dans l'immunité des arthropodes, mais les mécanismes demeurent encore à être élucidés (De Gregorio *et al*, 2002). Si l'agent infectieux parvient finalement jusqu'à l'hémolymphe<sup>1</sup>, il pourra alors être intercepté par des plasmocytes capables de phagocytose.

La détection du non-soi afin d'engager une réponse immunitaire chez la drosophile est possible par la présence de protéines de reconnaissance sécrétées dans son système circulatoire ou liés à la membrane de ses cellules. Une fois en contact avec le microorganisme étranger, ces récepteurs détecteront certains patrons moléculaires spécifiques de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif : certaines formes de peptidoglycanes et certains composants des lipopolysaccharides (les  $\beta$ -1,3-glucanes) par exemple (Ashburner *et al*, 2005). Ceci déclenchera alors une réponse immunitaire, incluant la synthèse de PAM par l'organe fonctionnellement équivalent au foie des mammifères : le corps gras. Une trentaine de PAM sont ainsi produits par la drosophile (Lemaitre et Hoffmann, 2007). Deux voies de signalisation intracellulaires sont

---

<sup>1</sup> L'hémolymphe est le liquide baignant les cellules et circulant dans le corps. Il est l'équivalent du sang chez les arthropodes.

impliquées dans l'activation des gènes responsables de l'activation de ces peptides, selon l'organisme envahisseur détecté : les voies Toll et IMD (*immune deficiency*) (Hoffmann et Reichhart, 2002). Alors que la voie Toll est majoritairement activée par les mycètes et bactéries à Gram positif, la voie IMD l'est davantage par les bactéries à Gram négatif. La séparation entre l'activation de ces deux voies n'est cependant pas absolue (Lau *et al*, 2005). Des études réalisées avec des doubles mutants *Imd/Toll* sur des puces à ADN ont permis d'établir que ces deux voies régulent près de 80% des gènes induits lors de blessures septiques (Lemaitre et Hoffmann, 2007). Il est intéressant de noter qu'on ne comprend toujours pas pourquoi la flore intestinale de la drosophile n'active pas de façon permanente ces voies de l'immunité.

Fait intéressant : la découverte de la voie Toll chez la drosophile stimula les recherches sur l'immunité innée chez les mammifères et permis la caractérisation de récepteurs similaires aux Toll de *D. melanogaster* chez les humains : les Toll-like receptors (TLR) en 1997 (Medzhitov, 2001).

#### **1.3.4 Microbiote et immunité**

Le terme *microbiote* tend à être privilégié par les spécialistes au détriment des expressions *microflore* ou *flore intestinale*. *Microbiote* fait ainsi référence à l'ensemble des microorganismes présents dans un milieu donné et est composé de la microflore ET/OU de la microfaune représentative de ce milieu. Ici, le terme sera utilisé en référence aux microorganismes présents dans le système gastro-intestinal des drosophiles.

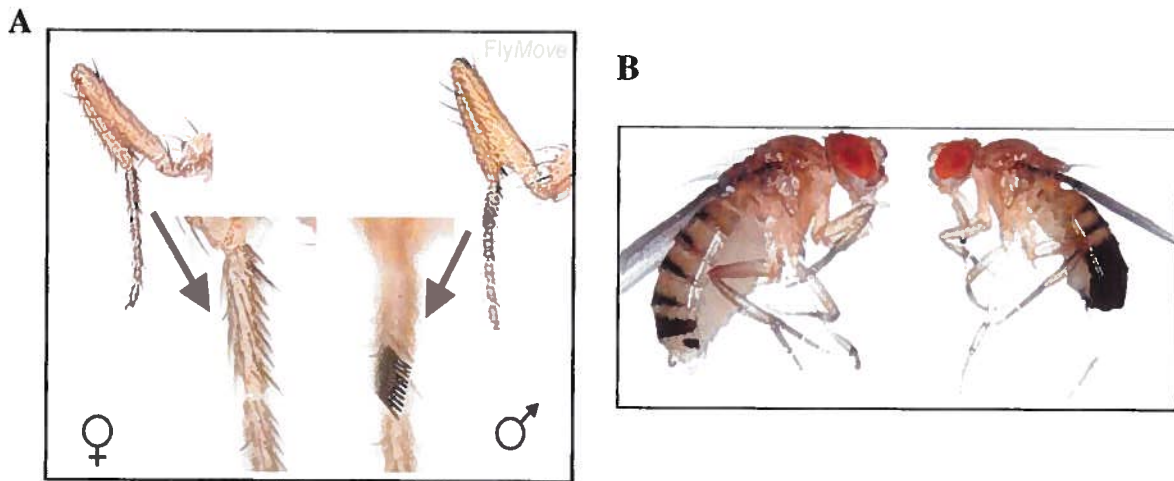
Il est connu que le microbiote joue un rôle bénéfique chez les vertébrés. Chez les mammifères, les bactéries intestinales permettent l'extraction et la digestion de certains nutriments et jouent également un rôle dans l'immunité (Berg, 1996). En effet, la présence d'une flore ou d'une faune indigène rendrait plus difficile la colonisation des intestins par les microorganismes pathogènes exogènes (Berg, 1996). Le système gastro-intestinal de la drosophile se compose des sections suivantes : une cavité buccale, un pharynx, un œsophage, un jabot, un gésier, un ventricule, un intestin grêle, un gros intestin, ainsi qu'un rectum débouchant sur l'anus. Le pH de chacune de ces sections varie. En effet, son jabot (*crop*: sert à stocker la nourriture avant sa digestion) est acide, son ventricule (équivalent de l'estomac, ou *midgut*) est hautement alcalin, et la section comprenant le duodénum jusqu'au dernier tiers du colon transverse (section appelée *hindgut*) varie de neutre à acide (Cox et Gilmore, 2007). La diversité de la flore indigène d'un animal sera

reliée à la diversité de niches écologiques que son système digestif représente (variété de structures, de pH, d'enzymes digestives présentes, etc.). Le système gastro-intestinal des drosophiles pourrait donc être habité par plusieurs espèces de microorganismes. Peu d'études ont cependant été réalisées sur la microflore des insectes. Celles des termites et des coquerelles sont plus connues, et au début de ce projet, seule une étude avait été publiée sur celle des drosophiles de laboratoire. Quatre genres bactériens y avaient été découverts (par analyses 16S et par étalement sur différentes géloses) : *Lactobacillus*, *Gluconobacter*, *Enterobacter* et *Anaerococcus* (Brummel *et al*, 2004). Ces travaux démontraient également que la présence intestinale de bactéries durant la première semaine de vie des drosophiles adultes permettait une augmentation de 30 à 35 % de leur longévité.

### ***1.3.5 Cycle de vie***

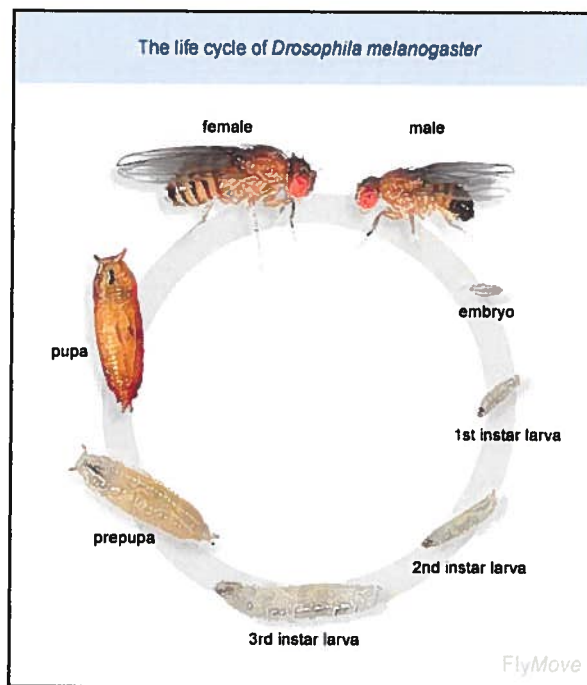
Les femelles (Fig. 1) connaissent un développement plus rapide que celui des mâles (Greenspan, 1997). Puisque la drosophile est un animal à sang froid, son cycle de vie (voir figure 2) est toutefois affecté par la température ambiante. Le tableau 1 présente la durée du passage de l'embryon à l'état adulte en fonction de la température. Ainsi, c'est à 25°C que son cycle de vie est parmi les plus courts et c'est également à cette température que les mouches seraient en meilleure santé (Greenspan, 1997). Le développement de l'embryon au stade adulte prend à ce moment de 9 à 10 jours, 2 jours de plus lorsque du méthyle parabène (aussi appelé Nipagen® ou Tegosept®) est ajouté au milieu nutritif (voir Matériel et méthodes). *D. melanogaster* peut vivre à des températures variant de 18°C à 29°C, avec des cycles respectifs de 19 et 7 jours (Goldstein et Fyrberg, 1994). Cependant garder les stocks à ces températures extrêmes donnera des rendements moins élevés au niveau de la reproduction de l'insecte.





**Figure 1.** Différence entre les mâles et les femelles.

**A :** les mâles ont des poils foncés (les peignes sexuels) sur les métatarses (FlyMove, consulté 09/06) alors que les femelles n'en n'ont pas. **B :** Les mâles (à droite) sont de plus petite taille que les femelles et ont le bout de l'abdomen plus foncé (Sanders, 2002).



**Figure 2.** Cycle de vie de *D. melanogaster*

FlyMove, consulté 09/06. Un embryon passera par 3 stades larvaires avant de devenir une puce sessile qui éclora en drosophile adulte.

**Tableau 1.** Temps nécessaire pour le passage de l'embryon au stade adulte

Température (°C)	Passage de l'embryon à l'adulte (jours)
12	+ de 50 jours
18	19
22	11
25	9-10
29	7
37	Survie de quelques heures

(Tiré de Goldstein et Fyrberg, 1994)

### ***1.3.6 Rythme circadien***

Le rythme circadien est régulé chez les insectes comme chez les mammifères par le système nerveux. Il est activé par des signes environnementaux tels que la lumière, et on trouve des photorécepteurs dans tous les organes sensoriels de la mouche à fruit (Hardin, 2005). Une des toutes premières études sur le rythme circadien fut d'ailleurs réalisée sur la drosophile et démontra que des mouches exposées à des journées de durées autres que 24 h avaient une espérance de vie réduite (Pittendrigh et Minis, 1972). Altérer ce rythme pourrait ainsi avoir des effets sur la survie des mouches, et au final, des mouches infectées. Une étude plus récente réalisée avec des micropuces à ADN a démontré qu'une multitude de gènes étaient effectivement régulés par le rythme circadien chez la mouche à fruit et que des gènes liés à l'immunité étaient majoritaires parmi ceux-ci : gènes impliqués dans la production de PAM ou de molécules de détection du non-soi, gènes impliqués dans la voie IMD, etc. (McDonald et Rosbash, 2001). Les auteurs de cette étude avancent même que ce serait tout le système immunitaire de la drosophile qui serait sous l'emprise directe ou indirecte du rythme circadien (McDonald et Rosbash, 2001).

#### **1.4 Modes d'infection**

La méthode d'infection de *D. melanogaster* par ingestion fut utilisée pour la première fois par Chugani *et al* (2001) et consiste à laisser les drosophiles adultes ou en stade larvaire se nourrir de bactéries puis à noter leur mortalité au fil des jours. Cette méthode a l'avantage d'être simple et permet l'utilisation d'un grand nombre d'insectes.

Certains pathogènes ne sont cependant pas capables de franchir la première ligne de défense des mouches à fruit et ne parviennent donc pas à créer une infection chez celles-ci lorsqu'ils sont ingérés. Tel est le cas des espèces faisant partie du complexe *Burkholderia cepacia* (voir la section 4.2). Ainsi, il est nécessaire de les injecter directement dans l'hémolymphe de l'insecte. Cette méthode d'infection permet de discriminer les souches pathogènes des non-infectieuses : les injections de *Escherichia coli*, par exemple, ne causent pas de mortalité chez la drosophile comparativement à *P. aeruginosa* (Vodovar *et al*, 2004). Cette méthode par piqûre est cependant plus laborieuse et demande davantage de précision que la méthode d'infection par ingestion de bactéries. Elle outrepassé également les étapes initiales d'une infection naturelle. Elle permet néanmoins de mieux contrôler le nombre de bactéries qui participeront au départ à créer une infection chez les drosophiles. Les mouches à fruit ne sont en effet exposées à l'agent pathogène qu'au moment de la piqûre, alors que la méthode d'infection par ingestion permet le contact entre l'animal et le microorganisme de façon continue. La méthode d'infection par piqûre permet donc de diminuer la variabilité au sein des résultats.

Il a récemment été démontré que la majorité des souches de *P. aeruginosa* produisaient les mêmes résultats et que les taux de mortalité étaient les mêmes chez la drosophile dans les deux modèles d'infection (Lutter *et al*, 2008). Ainsi, dans ce cas, le choix d'utiliser l'un ou l'autre des modèles n'aurait pas d'effet sur la finalité de l'infection. Une infection produite par ingestion sera par contre plus lente à se développer puisque le microorganisme devra entre autres d'abord traverser la barrière épithéliale de l'hôte.

#### **1.5 Agents pathogènes**

Bien que les travaux de ce projet portent principalement sur la virulence de *P. aeruginosa* souche PA14 chez *D. melanogaster*, d'autres pathogènes auront aussi servi à tester le modèle.

### **1.5.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae***

Cette bactérie à Gram négatif fut isolée et caractérisée pour la première fois en 1957 de lésions de pleuropneumonie porcine, d'où lui vient son nom. Ce microorganisme infecte ainsi spécifiquement l'appareil respiratoire du porc et représente un des problèmes majeurs des élevages porcins des pays industrialisés (Frey, 1995). Le pouvoir pathogène de cet organisme serait essentiellement dû à la production de deux toxines, les toxines ApxI et ApxII<sup>2</sup> puisque les mutants correspondant perdent toute capacité à produire une infection (Boekema *et al*, 2004). Aucun modèle alternatif n'est présentement disponible pour l'étude de la virulence de *A. pleuropneumoniae*, seuls les porcs et les souris sont utilisés. L'attrait pour un modèle à la fois économique et fonctionnel est donc grand.

### **1.5.2 Espèces faisant partie du Complexe *Burkholderia cepacia***

Le Complexe *Burkholderia cepacia* est composé d'au moins 15 espèces, toutes ayant été isolées chez des patients atteints de fibrose kystique (Mahenthalingam *et al*, 2000 ; Vanlaere *et al*, 2008). Bien qu'elles fussent autrefois classées parmi les *Pseudomonas*, les *Burkholderia* sont toutefois responsables d'un déclin plus rapide de l'état de santé des patients atteints de fibrose kystique que *P. aeruginosa* (McClellan et Callaghan, 2009). Ces patients nécessitent en effet plus de traitements antibiotiques et subissent un déclin plus rapide des fonctions pulmonaires (Courtney *et al*, 2004). Le genre *Burkholderia* comprend également des espèces bactériennes affectant l'homme parmi les plus résistantes aux antibiotiques (Aaron *et al*, 2000).

Pour avoir une description détaillée de ces microorganismes, voir l'article placé à la section 4.2.

### **1.5.3 *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif. C'est un pathogène opportuniste qui ne créera donc une infection que chez les hôtes immuno-déprimés ou chez ceux ayant une condition génétique particulière ; par exemple : les gens atteints de fibrose kystique (Lyczak *et al*, 2000). Ce microorganisme représente également un problème pour les grands brûlés et peut être

---

<sup>2</sup> Pour *A. pleuropneumoniae*, famille des toxines RTX ou repeats in the structural toxin.

responsable d'infections nosocomiales majeures (Gales *et al*, 2001). *P. aeruginosa* est en fait résistant à de nombreuses classes d'antibiotiques ce qui complexifie son éradication (Hancock, 1998 ; Mesaros *et al*, 2007). Avec 6,3 millions de paires de bases, le génome de *P. aeruginosa* souche PAO1 est l'un des plus grands parmi les bactéries à avoir été séquencé à ce jour. La proportion de gènes de régulation de son génome est également l'une des plus grandes connue jusqu'à maintenant, ce qui pourrait expliquer le caractère ubiquitaire de la bactérie. *P. aeruginosa* peut en effet être trouvé dans des environnements très diversifiés (Stover *et al*, 2000).

#### **1.5.4 Facteurs de virulence de *P. aeruginosa***

*Mycobacterium marinum* induit la perte de toutes les réserves de glycogène de la drosophile qui meure ainsi lorsque ses réserves en énergie tombent à zéro (Shirasu-Hiza et Schneider, 2007). *Pseudomonas entomophila* provoque des dommages physiques aux parois intestinales des mouches à fruit ce qui les fait cesser de s'alimenter et entraîne subséquentement leur mort (Shirasu-Hiza et Schneider, 2007). Ces deux stratégies ne semblent toutefois pas faire partie de celles employées par *P. aeruginosa*. Dans une étude publiée par Lau *et al*. (2003), il a été démontré que la souche PA14 de cette bactérie avait la capacité de se servir des tissus de la drosophile comme source d'éléments nutritifs. La corrélation entre la mortalité des drosophiles et la prolifération de cette bactérie dans la mouche a également été confirmée lors d'infections par piqûre. Le système de sécrétion de type III, injectant des facteurs de virulence directement dans les cellules de l'hôte, contribue aussi à sa pathogénicité. Ce système de sécrétion est en effet impliqué dans la sécrétion de toxines (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) empêchant notamment les cellules de l'hémolymphe de l'insecte de faire de la phagocytose (Yahr *et al*, 1998 ; Fauvarque *et al*, 2002 ; Avet-Rochex *et al*, 2005).

Plusieurs mutants moins pathogènes de *P. aeruginosa* ont été identifiés (voir Tableau 2). Toutefois, très peu de ces mutations entraînent la perte complète de virulence envers *D. melanogaster* (Lemaitre et Hoffmann, 2007 ; Vodovar *et al*, 2004 ; D'Argenio *et al*, 2001 ; Chugani *et al*, 2001). Jusqu'à maintenant en effet, seul un mutant du gène *pchH* ne parviendrait à créer aucune mortalité après 8 jours d'infection par ingestion (Alibaud *et al*, 2008). Certains de ces gènes sont contrôlés par le quorum sensing. Le quorum sensing correspond à la capacité des bactéries à communiquer entre elles à l'aide de molécules-signal et permet la coordination de certaines actions alors qu'une densité cellulaire particulière (le quorum) a été atteinte (Fuqua *et al*,

1994). Ce système contrôle une multitude de facteurs de virulence chez plusieurs bactéries, autant à Gram négatif qu'à Gram positif (Waters et Bassler, 2005). Il a également été démontré que l'expression de lactonases transgéniques chez la drosophile protégeait celle-ci contre les infections par piqûre de *P. aeruginosa* en interrompant les voies du quorum sensing du microorganisme (Stoltz *et al*, 2008).

Il a finalement été démontré que les drosophiles ayant des mutations dans les systèmes Toll et IMD étaient plus susceptibles aux infections par *P. aeruginosa* que les souches sauvages de *D. melanogaster* (Lemaitre et Hoffmann, 2007). Le microorganisme est somme toute sensible à la réponse humorale de cet hôte mais il finit éventuellement par le déjouer. Il a en effet été démontré que *P. aeruginosa* PA14 supprimait l'expression des PAM (Apidianakis *et al*, 2005).

**Tableau 2.** Gènes aux fonctions connues nécessaires à la virulence complète de *Pseudomonas aeruginosa* chez *Drosophila melanogaster*

Nom du gène <sup>a</sup>	Fonction	Référence
<i>cca</i> <sup>d</sup>	Transférane nucléotidyle ARNt	(Potvin <i>et al</i> , 2003)
<i>chpA</i> <sup>d</sup>	Système de transduction de signaux chimiotactiques (contrôle la motilité par <i>twitching</i> )	(D'Argenio <i>et al</i> , 2001)
<i>dbxA</i> <sup>e</sup>	Isomérase disulfure périplasmique	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>exxA</i> <sup>c</sup>	Activateur transcriptionnel	(Fauvarque <i>et al</i> , 2002)
<i>exxD</i> <sup>c</sup>	Régulateur négatif du système de sécrétion de type III	(Fauvarque <i>et al</i> , 2002)
<i>fabF1</i> <sup>e</sup>	Synthase II de protéines de transport Beta-cetoacyl-acyl	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>fimV</i> <sup>d</sup>	Remodelage du peptidoglycane	(D'Argenio <i>et al</i> , 2001)
<i>flhB</i> <sup>e</sup>	Protéine de biosynthèse flagellaire	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>gacA</i> <sup>c</sup>	Régulateur global de la virulence	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>hudR</i> <sup>e</sup>	Facteur de transcription, famille MarR/SlyA	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>katA</i> <sup>c</sup>	Catalase A	(Shin <i>et al</i> , 2008)
<i>mtrR</i> <sup>e</sup>	Régulateur transcriptionnel de transporteur multi-drogues	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>mvfR</i> <sup>e</sup>	Régulateur du quorum sensing	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>opdO</i> <sup>e</sup>	Porine de la membrane externe	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>oxyR</i> <sup>d</sup>	Régulateur de la réponse au stress oxydatif	(Lau <i>et al</i> , 2005)
PA14_03530 <sup>b</sup>	Facteur de transcription de type LysR	(Kim <i>et al</i> , 2008)
PA14_35740 <sup>b</sup>	Transposase	(Kim <i>et al</i> , 2008)
PA14_38610 <sup>b</sup>	Transporteur d'acides gras à courtes chaînes	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>pchH</i> <sup>f</sup>	Induction des protéines du système de sécrétion de type III	(Alibaud <i>et al</i> , 2008)
<i>pchI</i> <sup>f</sup>	Induction des protéines du système de sécrétion de type III	(Alibaud <i>et al</i> , 2008)
<i>pgk</i> <sup>d</sup>	Phosphoglycérate kinase	(Potvin <i>et al</i> , 2003)
<i>pgm</i> <sup>d</sup>	Phosphoglycérate mutase	(Potvin <i>et al</i> , 2003)
<i>phzB</i> <sup>e</sup>	Biosynthèse de phénazines	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>pilF</i> <sup>e</sup>	Protéine d'assemblage du pilus de type IV	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>pilH,I,J,K,L</i> <sup>d</sup>	Biosynthèse du pilus de type IV	(D'Argenio <i>et al</i> , 2001 ; Potvin <i>et al</i> , 2003)
<i>pilV</i> <sup>d</sup>	Biosynthèse du pilus de type IV	(D'Argenio <i>et al</i> , 2001 ; Fauvarque <i>et al</i> , 2002)
<i>plcS</i> <sup>e</sup>	Phospholipase C	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>pqsB</i> <sup>e</sup>	Synthèse des HAQ (quinolone hydroxyalkyle)	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>prpR</i> <sup>e</sup>	Facteur de transcription de type RocR	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>pstP</i> <sup>e</sup>	Régulateur transcriptionnel des opérons dépendants de RpoN	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>pvdI</i> <sup>e</sup>	Synthétase, peptide non-ribosomal	(Kim <i>et al</i> , 2008)
<i>pyrF</i> <sup>d</sup>	Décarboxylase orotidine	(Potvin <i>et al</i> , 2003)
<i>qscR</i> <sup>d</sup>	Répresseur des gènes dépendants du quorum sensing	(Chugani <i>et al</i> , 2001)
<i>relA</i> <sup>d</sup>	Synthèse des ppGpp et pppGpp	(Erickson <i>et al</i> , 2004)
<i>toxA</i> <sup>e</sup>	Exotoxine A	(Lau <i>et al</i> , 2003)
<i>trpD</i> <sup>f</sup>	Synthèse du tryptophane	(Alibaud <i>et al</i> , 2008)
<i>wspF</i> <sup>e</sup>	Méthylestérase	(Kim <i>et al</i> , 2008)

a : Numéros d'accès GenBank disponibles sur <http://www.pseudomonas.com>.

b : # du gène de PA14

c : Souche CHA.

d : Souche PAO1

e : Souche PA14

f : Souche 22D10

## **2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**



## 2.1 Hypothèses

Le présent projet de maîtrise visait à tester deux hypothèses :

1. Certains facteurs (le cycle de lumière, la durée de la période de jeûne avant l'infection, le sexe des drosophiles et leur microbiote) peuvent influencer les résultats de l'infection de *D. melanogaster* par ingestion de *P. aeruginosa*.

Les conditions expérimentales dans lesquelles les infections se déroulent varient d'une équipe de recherche à l'autre. Ces variables ont-elles une influence sur les résultats obtenus ? Ainsi, afin de proposer un modèle véritablement optimisé et standardisé, l'étude de l'effet de ces conditions expérimentales sur les courbes de mortalité des drosophiles semble nécessaire.

Par exemple, puisque séparer les mâles des femelles et qu'obtenir des adultes du même âge est laborieux, répondre à cette question permettrait d'éliminer des manipulations superflues. Les équipes de recherche travaillant avec les mouches à fruit comme hôtes-modèles n'appliquent également pas de standards quant à ces questions et les résultats obtenus d'une étude à l'autre le sont avec des mouches de sexes et d'âges différents. Des infections par piqûres réalisées avec la levure *Cryptococcus neoformans* ont d'ailleurs permis de déceler des différences (toutefois mineures) entre les résultats obtenus avec des mâles et ceux obtenus avec des femelles (Apidianakis *et al*, 2004).

Puisque la drosophile possède un microbiote (Brummel *et al*, 2004) et qu'il est connu que la microflore joue un rôle bénéfique chez les mammifères (Berg, 1996), peut-être celle de *D. melanogaster* joue-t-elle aussi un rôle dans son immunité, particulièrement lorsqu'un pathogène est ingéré ? Parvenir à créer une population de drosophiles exemptes de ce microbiote (drosophiles axéniques) permettrait éventuellement ainsi de tester cette hypothèse mais également de s'assurer que les résultats des infections par ingestion ne sont pas faussés par ce facteur.

2. *D. melanogaster* est un modèle valide pour l'étude de la virulence des espèces appartenant au complexe *Burkholderia cepacia*.

Aucune étude n'a à ce jour été publiée sur la drosophile comme hôte-modèle pour les espèces du complexe *Burkholderia cepacia*. Puisque le genre *Burkholderia* était autrefois classé parmi les

*Pseudomonas*, il semble probable que la drosophile, déjà validée pour l'étude de la pathogénicité de *P. aeruginosa*, soit également un modèle efficace pour les espèces du Bcc.

## **2.2 Objectifs**

Afin de vérifier ces hypothèses, il fallait d'abord établir et maintenir une population saine de drosophiles. Aucun laboratoire de l'INRS-Institut Armand-Frappier ne possédait de populations de mouches à fruit et par le fait même d'expérience avec cet animal. Il fallait donc partir de zéro et déterminer les conditions d'élevage ainsi que les besoins des drosophiles avant de pouvoir réaliser des infections avec ce modèle. Quel est l'environnement optimal pour leur croissance (humidité relative, lumière, température, etc.) ? Comment reconnaître les mâles des femelles ? Comment les anesthésier ? Quels sont leurs besoins nutritionnels ? Comment les protéger des parasites potentiels (mites ou pathogènes du genre *Wolbachia*) ? Il fallait ensuite optimiser les protocoles d'infections par ingestion et s'assurer que les résultats obtenus soient reproductibles.

### 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### **3.1 Maintien d'une population de drosophiles**

#### **3.1.1 Stocks de *D. melanogaster***

Les populations initiales de *D. melanogaster* souches sauvages Oregon R (OR) et Canton S (CS) utilisées pour les présents travaux ont été obtenues des laboratoires du Dre L.G. Rahme (Massachusetts General Hospital, Boston, MA) en 2006. De nouveaux stocks des souches OR ont également été obtenus des laboratoires du Dr P. Lasko (département de biologie, McGill University, Montréal, Qc) au printemps 2007. Dans tous les cas, les stocks originaux provenaient du Bloomington Stock Center (Indiana, É.-U., <http://flystocks.bio.indiana.edu/>) et ont été maintenus en quarantaine afin d'éviter toute contamination par les mites. Seules les populations de drosophiles souche OR ont été utilisées pour les tests de mortalité.

#### **3.1.2 Conditions d'élevage**

Les drosophiles doivent idéalement être maintenues dans des conditions standardisées afin d'assurer la reproductibilité des expériences. Les stocks de drosophiles ont donc été gardés dans un incubateur à température, humidité et lumière contrôlées (*Intellus environmental controller #I-30VLC8, Percival Scientific Inc., Perry, IA, É.-U.*). L'humidité relative de l'incubateur a été maintenue à 65% tout au long de ce projet et le cycle de lumière a été réglé afin d'alterner lumière et obscurité aux 12 heures. De façon générale, la température a été réglée à 21°C. Une température de 25°C a toutefois été utilisée lorsque l'augmentation des populations de drosophiles était nécessaire. Quelques bouteilles ont cependant été gardées à température-pièce par mesure de sécurité en cas de problème d'incubateur.

#### **3.1.3 Milieu nutritif pour drosophiles**

Les stocks de drosophiles doivent être maintenus par transferts réguliers des insectes sur du nouveau milieu nutritif. Si les laboratoires travaillant avec *D. melanogaster* utilisent majoritairement les mêmes ingrédients dans la préparation de ce milieu, peu en utilisent les mêmes proportions. Pour éviter tous biais possibles lors de ce projet, le même protocole de préparation a été utilisé à chaque fois. Il s'agit d'un protocole obtenu de l'équipe du Dre Laurence

Rahme par l'entremise du Dr Yiorgos Apidianakis (Massachusetts General Hospital, Boston, E-U) et adapté pour les besoins de notre laboratoire.

Les levures présentes dans l'environnement constituent une source essentielle de nutriments pour les drosophiles sauvages. Ces levures, ainsi que l'extrait de levure pour les drosophiles de laboratoire, permettraient en effet de combler les besoins essentiels de *D. melanogaster* en vitamines et en acides aminés (Oakeshott *et al.*, 1989). Le saccharose sert quant à lui de source de carbone à l'animal (Dahmann, 2008).

Ainsi, 10 g d'agar de type II pour drosophiles (*Genesee Scientific, Research Triangle Park, North Carolina, É.-U.*), 44 g de semoule de maïs jaune (*Genesee Scientific*), 30 g de levure sèche inactive (*Genesee Scientific*) et 12 g de D-saccharose (*Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada*) ont chaque fois été dissous dans 1 litre d'eau osmose inverse puis amenés à ébullition dans un flacon *Erlenmeyer* de 4 L. Le milieu a ensuite été stérilisé par autoclavage (à 121°C durant 30 minutes) puis laissé à refroidir par agitation constante dans une enceinte biologique (*StrerilGARD Hood, The Baker Company Inc, Sanford, Maine, É.-U.*) jusqu'à ce qu'il atteigne une température d'environ 50°C. À ce moment, 5 ml d'une solution de 20% de Tegosept® (*Genesee Scientific*) dissout dans l'éthanol 95% et 4,67 g de propionate de sodium (*Genesee Scientific*) ont été ajoutés au milieu en tant que fongicides<sup>3</sup>. Une fois tous les ingrédients mélangés, 25 ml de milieu liquide étaient versés dans des bouteilles de polypropylène de 6 oz à fond carré (*Genesee Scientific*) préalablement stérilisées à l'autoclave. Le milieu nutritif était ensuite laissé à solidifier sous la hotte biologique durant 3 heures, puis les bouteilles étaient fermées avec des bouchons d'acétate de cellulose (*Genesee Scientific*). Les bouteilles de milieu non utilisées à ce moment étaient conservées à 4°C pour un maximum de dix jours.

### **3.1.4 Transfert sur nouveau milieu**

Puisque les drosophiles ne survivent pas à la congélation (pas de cryo-conservation possible de l'adulte), il est impératif de maintenir les stocks vivants. Afin d'éviter toute contamination des drosophiles par les mites ou les moisissures, les mouches adultes doivent être transférées sur du

---

<sup>3</sup> Il est cependant fait mention par Ashburner (2005) que la concentration d'acide propionique dans le milieu nutritif des drosophiles devrait en fait être dépendante du pH de ce milieu. À pH de 5, la concentration optimale de cet acide devrait être de 2,1 ml/litre. À pH de 6, elle devrait être de 13,2 ml/litre.

milieu nutritif frais à intervalle de 10 jours maximum lorsqu'il est conservé à 25°C. Un milieu plus vieux produira aussi des drosophiles en moins bonne santé (Greenspan, 1997).

Afin d'éviter tous problèmes liés à une possible surpopulation, un maximum d'une cinquantaine de mouches femelles a été placé ou gardé par bouteille de 6 oz, sans égard au nombre de mâles présents.

### ***3.1.5 Anesthésie des drosophiles adultes***

Il est parfois nécessaire d'anesthésier les drosophiles afin de pouvoir les manipuler plus facilement ; par exemple lorsqu'il faut séparer les mâles des femelles, les infecter par piqûre (voir section 3.4) ou regrouper les mouches. Alors que l'éther a longtemps été utilisé pour réaliser ces manipulations, la majorité des laboratoires utilisent maintenant le CO<sub>2</sub> puisqu'une exposition de plus de 1 min. à l'éther est mortelle pour les mouches (Dahmann, 2008). L'utilisation du CO<sub>2</sub> cause également moins d'inconfort à l'expérimentateur.

Ce gaz a donc été utilisé comme anesthésiant avec un vaporisateur à cartouches de 16 g (*Portable CO<sub>2</sub> blowgun, Genesee Scientific*) ou avec un tapis diffuseur (*CO<sub>2</sub> anesthetizing apparatus flowbed, Genesee Scientific*). Dans le dernier cas, le dioxyde de carbone d'une bonbonne de 50 L (*Praxair Canada Inc., Mississauga, ON, Canada*) avec détendeur était acheminé dans un flacon *Erlenmeyer* de 4 L rempli d'eau avant son arrivée au tapis afin d'éviter la déshydratation des drosophiles. Une fois endormies, les mouches sont manipulées avec un pinceau à poils fins.

### ***3.2 Axénisation des drosophiles***

Les expériences ayant conduit à cette version du protocole sont présentées de façon détaillée à la section 4.3.4.5.

Les milieux nutritifs pour axénisation ont été préparés tel que décrit dans la section 3.1.3 en y ajoutant toutefois 5 µg/ml de pipéracilline, 25 µg/ml de tétracycline, 25 µg/ml de chlorampénicol, 100 µg/ml de rifampicine, 50 µg/ml de triméthoprime, 15 µg/ml d'érythromycine et 2 µg/ml de clindamycine lorsque les milieux étaient tièdes suite à l'autoclavage. Les drosophiles ont été transférées sur du milieu frais à tous les quatre jours puisque certains antibiotiques ont une stabilité limitée.

Les populations de drosophiles à traiter ont été gardées sur ce milieu additionné d'antibiotiques pendant trois générations.

### 3.3 Infection par ingestion

Les infections de *D. melanogaster* par ingestion de bactéries ont été réalisées selon un protocole modifié originalement publié par Chugani *et al* en 2001. Les expériences ayant conduit à cette version finale du protocole sont présentées de façon détaillée dans la section 4.2.

La souche PA14 de *P. aeruginosa* provient du laboratoire du Dr Rahme (Rahme *et al*, 1995), le mutant *chiC*- (chitinase C) provient de la banque non-redondante de mutants de PA14 (Liberati *et al*, 2006), le mutant *lasR*-/*rhIR*- (régulateurs de deux systèmes de quorum sensing chez *P. aeruginosa*) est une construction de notre laboratoire (Dekimpe et Déziel, 2009), le mutant *pscD*- (système de sécrétion de type III) provient de Miyata *et al* (2003). La souche de *A. pleuropneumoniae* a été fournie par le Dr Mario Jacques (Université de Montréal). Pour la provenance des souches du complexe *Burkholderia cepacia*, incluant *B. ambifaria*, voir l'article placé en section 4.2.

Chaque souche bactérienne à tester a été cultivée, à partir de stock congelé, à 37°C dans un incubateur avec tambour rotatif. Les différentes souches de *P. aeruginosa* ainsi que les bactéries du genre *Burkholderia* ont toutes été cultivées dans 5 ml de bouillon trypticase de soja (TSB pour Tryptic Soy Broth, *Becton Dickinson & Company, Sparks, MD, É.-U.*) alors que les souches d'*A. pleuropneumoniae* ont été cultivées dans 5 ml de bouillon infusion cœur-cervele (BHI pour Brain Heart Infusion, *Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Angleterre*) supplémenté de 5 µg/ml de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD, *Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada*). Les cultures ont été incubées jusqu'à ce qu'elles atteignent leur phase exponentielle de croissance, mesurée par spectrophotomètre (*NanoDrop ND-1000, NanoDrop Product, Wilmington, DE, É.-U.*) en terme de densité optique (DO) à 600 nm : 0,6 pour *A. pleuropneumoniae*, 3,0 pour les souches de *P. aeruginosa* et 4,0 pour les souches de *Burkholderia*. Une DO de 3,0 correspond à environ  $5,0 \times 10^9$  UFC (Unités Formatrices de colonies) de *P. aeruginosa* par ml, alors qu'une DO de 4,0 correspond approximativement à  $1,3 \times 10^9$  UFC/ml de *Burkholderia ambifaria*.

Une fois que les DO voulues ont été atteintes, les cellules ont été lavées : 2,8 ml de chacune des cultures a été centrifugé (avec une microcentrifugeuse *Hermle Z233 M-2*) à une vitesse de 7 500 x g durant 2 min. Les surnageants ont ensuite été décantés puis les culots ont été resuspendus

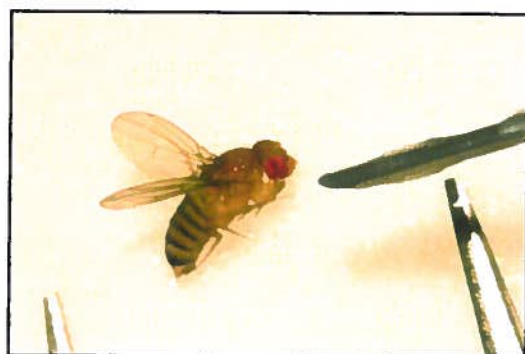
dans 1 ml d'une solution stérile de PBS/saccharose 5% (Tampon phosphate salin ou PBS : NaCl 0,137 M ; KCL 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M, pH 7,6). Une deuxième centrifugation de 2 min. à 7 500 x g a été effectuée, les surnageants ont encore une fois été décantés, puis les culots ont été suspendus dans 70 µL de PBS/saccharose 5% stérile.

Parallèlement à ces étapes, des fioles de polystyrène (2,5 cm de diamètre, *Genesee Scientific*) contenant 5 ml d'agar (*Fisher Scientific*) 1,5% / saccharose 5% stérile ont été préparées sous la hotte biologique. Un disque de papier filtre Whatman® (papier de cellulose pour chromatographie, grade 3MM Chr, *Whatman International Ltd, Maidstone, Angleterre*) de 2,3 cm de diamètre a ensuite été déposé sur la surface de chacune des géloses.

Les 70 µL de suspension bactérienne ont ensuite été déposés sur ces papiers filtres, alors que 70 µL de suspension bactérienne stérilisée par autoclavage ont été déposés pour les fioles servant de témoins. Ces fioles ont ensuite été laissées à sécher quelques minutes afin d'éviter les excédents de liquide sur le filtre (puisque les drosophiles s'y collent et meurent). Puis, des drosophiles adultes ont été transférées par groupe de 10 dans chacun des tubes où elles ont été laissées pour toute la durée de l'expérience. Les tubes ont été refermés (avec des bouchons d'acétate de cellulose, *Genesee Scientific*) et ils ont été placés dans l'incubateur à environnement contrôlé.

Les drosophiles mortes (sans mouvement lorsque le tube était agité) ont été dénombrées une fois par jour dans chacun des tubes.

### 3.4 Infection par piqûre



**Figure 3.** Infection par piqûre  
Drosophile femelle sur tapis diffuseur de CO<sub>2</sub>, grossissement au stéréoscope de 10X.



Les infections de *D. melanogaster* par piqûre avec bactéries, technique aussi connue comme *pricking* ou *nicking* (Fig. 3), ont été réalisées selon le protocole originalement publié par Baldini *et al.* (2002), adapté par le Dr Yiorgos Apidianakis et modifié pour les besoins de notre laboratoire.

Pour ce protocole, chaque souche bactérienne de *Burkholderia* à tester a été cultivée, à partir de stock congelé, à 37°C dans un incubateur avec tambour rotatif dans 5 ml de TSB (*Becton Dickinson & Company*) jusqu'à une  $DO_{600}$  de 2, correspondant à  $6,6 \times 10^8$  UFC/mL. Les cultures bactériennes ont ensuite été récupérées par centrifugation 5 min à  $7\,500 \times g$ , puis les surnageants ont été décantés. Les culots ont été resuspendus dans 1 ml de solution de  $MgSO_4$  10 mM et d'ampicilline 100µg/ml (*MP Biomedicals*, Solon, OH, É.-U.) puis centrifugés à nouveau. Le surnageant de chacun des tubes a ensuite été décanté et les culots ont été suspendus une dernière fois dans 1 ml de  $MgSO_4$  10 mM et d'ampicilline 100µg/ml. Pour ce type d'infection, seules les femelles adultes ont été utilisées puisque les mâles, plus petits, seraient plus susceptibles aux blessures causées par l'aiguille (D'Argenio *et al.*, 2001). Une fois endormies, les mouches ont été placées sur un tapis diffuseur de  $CO_2$  afin de maintenir l'anesthésie (*Genesee Scientific*). Les infections ont été réalisées sur le tapis avec un stéréoscope (le Stemi V4, *Carl Zeiss Canada Ltd*, Toronto, ON, Canada) à grossissement de 10X. Chaque mouche a été piquée au niveau du thorax dans la partie dorsale avec une aiguille de calibre 26s (*Microliter® #701*, *Hamilton Co.*, Rena, Nevada, É.-U.) préalablement trempée dans la suspension bactérienne à tester. L'aiguille a été lavée avant chaque nouvelle souche à tester avec de l'éthanol 70% puis avec une solution de 10 mM de  $MgSO_4$  et d'ampicilline 100µg/ml. L'ajout d'ampicilline à la solution de  $MgSO_4$  visait à éliminer le risque d'infection par les bactéries potentiellement présentes à la surface des drosophiles. Les souches de *Burkholderia* utilisées ne sont pas sensibles à cette concentration d'ampicilline.

Les mouches faisant partie du groupe témoin ont quant à elles été piquées avec une aiguille trempée dans une solution de  $MgSO_4$  10 mM et d'ampicilline 100µg/ml.

Une fois ces étapes terminées, les mouches ont été placées par groupe de 10 dans des fioles de polystyrène contenant 5 ml d'agar 1,5% / saccharose 5% et remises à l'incubateur pour toute la durée de l'infection. Tous les tubes ont été observés une fois par jour afin de dénombrer les drosophiles mortes. Pour les infections induisant la mortalité totale des drosophiles en moins de 50 heures, les observations ont été faites à intervalles plus rapprochés.

### ***3.5 Isolement de bactéries vivantes à partir de drosophiles adultes***

Pour pouvoir récupérer des microorganismes vivant à l'intérieur des drosophiles, il faut d'abord effectuer une stérilisation externe des mouches adultes. Ainsi, sous la hotte biologique et à l'aide de matériel stérile, chacune des mouches endormie a été mise dans un tube de 1,5 ml contenant 1 ml d'éthanol 70%, puis lavée durant 1 min en mélangeant par inversion. Elles ont ensuite été transférées dans de nouveaux tubes de 1,5 ml contenant 1 ml d'eau (osmose inversée, filtrée et stérilisée) puis rincées en mélangeant une fois de plus par inversion durant 1 minute. Chaque mouche a finalement été transférée dans un autre tube de 1,5 ml contenant cette fois-ci 200 µL de PBS stérile.

À cette étape, les mouches ont en fait été placées individuellement dans les tubes lorsqu'un suivi de population bactérienne devait être effectué, pendant une infection par exemple. Par contre, dans le cas où le but de l'expérience était de récolter le plus de cellules possible de la microflore des drosophiles afin d'en extraire l'ADN (section 3.7), les mouches ont plutôt été groupées par 10.

Pour homogénéiser le contenu de chacun de ces tubes, un pilon (*Daigger Lab Equipment & Supplies, Vernon Hills, Illinois, É.-U.*) a été utilisé avec un homogénéisateur à moteur sans fil (*Kontes pellet pestles® Micro Grinder, Daigger Lab Equipment & Supplies*). Pour cette étape, les tubes de 1,5 ml de la même compagnie ont été utilisés puisque leur forme s'agence à celle des pilons et permet un meilleur broyage.

La suspension résultante, diluée ou non, a ensuite été transférée sur gélose appropriée à l'aide d'une pipette, puis étalée avec 5 billes de verre stériles de 0,4 à 0,5 mm de diamètre (*Fisher Scientific*). Ces géloses ont ensuite été incubées à 37 °C ou laissées à température pièce selon l'expérience en cours.

### ***3.6 Culture de microorganismes de la microflore des drosophiles***

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés afin de tenter une identification primaire des organismes isolés des drosophiles. Ces milieux ont été choisis puisqu'ils supportent la croissance et permettent l'isolement d'espèces bactériennes variées, mais surtout de la flore des mammifères. Les géloses ou bouillons suivants ont donc été préparés selon les directives du fabricant (*Becton Dickinson & Company*) : Bouillon M.R.S (De Man, Rogosa, Sharpe) pour l'isolement des

*Lactobacillus*; géloses à la bile, à l'esculine et à l'azoture de sodium (BEA ou gélose Enterococcosel) pour l'isolement des entérocoques; géloses Sabouraud maltosées pour l'isolement de levures et de moisissures; géloses Baird-Parker avec ajout d'émulsion de jaune d'œuf et de telluride pour l'isolement de *Staphylococcus aureus*; géloses MacConkey pour supporter la croissance de différentes bactéries d'origine intestinale ou des bactéries à Gram négatif; milieu semi-solide *Clostridium* renforcé pour la culture d'organismes anaérobies et anaérobies facultatifs; géloses R2A et TGEA (pour *Tryptone Glucose Extract Agar*) afin de récupérer les microorganismes à croissance lente; et enfin géloses trypticase de soja (TSA pour Tryptic Soy Agar) comme milieu riche non-sélectif.

Toutes les géloses ainsi que les milieux liquidesensemencés ont été incubés à 25°C, température à laquelle étaient maintenus les stocks de mouches à ce moment. Les milieux liquides ont été incubés sous agitation.

Puisque 99% des espèces bactériennes faisant partie de la flore des humains sont anaérobies strictes (Berg, 1996), l'isolement et la culture de microorganismes à partir de drosophiles ont été réalisées en conditions tant aérobies qu'anaérobies. Pour les cultures sans oxygène, les manipulations effectuées à la section 3.5 ont été réalisées sous jet d'azote dans la hotte biologique puis les géloses ou milieux liquides ont été incubés en chambre anaérobie (ou *glovebox* de type Bactron II *Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR, É.-U.*) contenant 80% de N<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> et 10% de CO<sub>2</sub>.

### **3.7 Extraction d'ADN de souches pures et de la microflore des drosophiles**

L'extraction de l'ADN chromosomique des souches bactériennes pures a été faite en utilisant la même méthode que pour extraire l'ADN de la microflore des drosophiles.

Pour avoir l'ADN provenant de souches bactériennes cultivées et isolées, la biomasse a été récoltée d'une gélose puis mise dans un tube de 1,5 ml contenant 250 mg de billes de verres de 0,4 à 0,5 mm de diamètre (*Fisher Scientific*) lavées puis stérilisées par autoclavage. Pour l'ADN provenant de la flore intestinale des drosophiles, un broyage des mouches a préalablement été effectué (section 3.5). La solution restante a ensuite été transférée dans un tube de 1,5 ml contenant aussi 250 mg de billes de verres neuves stérilisées par autoclavage.

Dans les deux cas, 250 µL de TEN (Tris-HCl 50m M, EDTA 100 mM et NaCl 150 mM pH 8,0) et 10 µL de SDS 20% (p/v) ont été rajoutés. Le SDS sert ici à solubiliser la membrane des

cellules présentes dans la solution et le TEN sert de tampon afin de préserver l'ADN. Un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1) (*Fisher Scientific / Fisher Scientific / A&C Produits Chimiques Américains, Montréal, QC, Canada*) a ensuite été rajouté afin d'éliminer les protéines de la solution. Le contenu des tubes a été broyé dans un appareil agitateur *FastPrep FP120 (Thermo Savant, Holbrook, NY, É.-U.)* réglé à la vitesse 4, trois fois durant 20 secondes. Les échantillons ont été placés sur la glace entre chacune des agitations au *FastPrep*. Ensuite, après une centrifugation de 15 min. à 16 500 x g, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes de 1,5 ml. Un volume de chloroforme/alcool isoamylique (49 : 1) y a été ajouté, puis les tubes ont été mélangés par inversion avant d'être centrifugés durant 1 min. à 16 500 x g. Encore une fois, les surnageants ont été récoltés et transférés dans de nouveaux tubes. Ceux-ci contenaient préalablement 2 volumes d'éthanol 95% ainsi que ¼ de volume d'acétate d'ammonium 10 M (*A&C Produits Chimiques Américains*). Suite à une agitation par inversion, tous les tubes ont été placés à -20°C pour la nuit afin de permettre à l'ADN de précipiter. Après une centrifugation de 15 min à 16 500 x g, les surnageants ont été décantés et les culots ont été lavés avec de l'éthanol 70% afin d'éliminer les sels des échantillons. L'éthanol a été décanté et les culots ont été laissés à sécher sous la hotte biologique avant d'être suspendus dans 50 µL d'eau filtrée par osmose inverse et stérilisée par filtration. L'ADN ainsi extrait a été conservé à 4°C.

La concentration en ng/µl d'ADN de chacun des échantillons a été mesurée par spectrophotométrie en considérant l'absorbance à 260 nm. La qualité de l'extraction d'ADN (par rapport à la quantité de protéines dans l'extraction) a été vérifiée grâce à la mesure du ratio d'absorbance à 260/280 nm. Ce ratio doit être de 1,8.

### **3.8 Électrophorèse sur gel d'agarose**

Les extractions d'ADN ainsi que les produits PCR (section 3.9) ont été vérifiés sur gel d'agarose de 2% pour les fragments plus courts que 500 paires de bases (pb) et sur gel de 1% pour les fragments plus longs. Pour faire le gel, de l'agarose *UltraPure (Invitrogen, Grand Island, NY, É.-U.)* a été dissoute dans du tampon TAE 1X (40 mM de Tris-HCL à pH 8,0 ; 40 mM d'acide acétique (*Fisher Scientific*) et 1 mM de EDTA à pH 8,0) puis a été coulée dans un support à gel avec un peigne afin d'y créer des puits. Après sa polymérisation, le peigne a été enlevé et le support placé dans une cuve à électrophorèse (*BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, É.-U*) contenant du tampon TAE 1X.

Un marqueur de poids moléculaire, le  $\lambda$ styI (obtenu à partir de la digestion de l'ADN du phage  $\lambda$  par l'enzyme de restriction *StyI* (Amersham Biosciences) a été utilisé à raison de 5  $\mu$ L/puit afin de permettre une estimation de la longueur des fragments des échantillons. Un volume de 5  $\mu$ L d'extraction d'ADN ou de produit PCR mélangés à 2  $\mu$ L de tampon de chargement a été déposé dans chacun des autres puits. Le tampon de chargement, utilisé à concentration finale de 30 % v/v de glycérol (Fisher Scientific), 0,25 % p/v de xylène cyanol (Sigma-Aldrich) et de 0,25 % p/v de bleu de bromophénol (Sigma-Aldrich), sert de marqueur visuel afin de savoir à quel moment arrêter la migration des échantillons. Il sert cependant aussi à augmenter la densité de l'échantillon afin de s'assurer que le matériel génétique présent demeure dans le puit et puisse ainsi migrer.

Après migration des échantillons sous un courant d'environ 90V, chacun des gels a été coloré par agitation dans un bain de bromure d'éthidium de 10  $\mu$ g/ml, rincé ensuite dans un bain d'eau durant 10 min, puis visualisé sous rayons ultraviolets grâce à l'appareil *AlphaImager<sup>TM</sup> 3400* (Alpha Innotec Corporation, San Leandro, CA, É.-U.).

### **3.9 Réaction de polymérase en chaîne (PCR)**

Pour chacune des PCR, les réactifs ont été déposés dans un tube stérile de 0,5 ml. Le volume final de la solution à préparer était de 50  $\mu$ L. Ainsi, 2,5 U de Taq polymérase (Illustra<sup>TM</sup>, GE Healthcare, Baie-d'Urfé, Qc, Canada) a été utilisé par réaction. Le tampon 10X de l'enzyme (contenant 500mM de KCL, 15mM de MgCl<sub>2</sub> ainsi que 100 mM de Tris-HCl, pH de 9,0) devra être dilué 1/10 dans la réaction PCR. Y ont ensuite été rajoutés: 1  $\mu$ L d'albumine sérique bovine (BSA) à 20  $\mu$ g/ $\mu$ L (à concentration finale de 0,4 $\mu$ g/ $\mu$ L), 200  $\mu$ M (1  $\mu$ L de solution à 10 mM) de déoxynucléosides triphosphates (dNTP) (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada), 5  $\mu$ L de tampon de PCR 10X (Sigma) pour une concentration finale de 1X et 1 $\mu$ L de chacune des amorces (voir Tableau 3) servant à l'élongation des deux côtés des brins d'ADN à 10 pmol/ $\mu$ L pour une concentration finale de 200  $\mu$ M chacune. Le volume des réactifs a ensuite été complété à 48  $\mu$ L avec de l'eau filtrée par osmose inverse et stérilisée par filtration, puis finalement 2  $\mu$ L de la solution contenant l'ADN à amplifier, dilué à environ 1  $\mu$ g/ml, a été ajouté. Durant ces étapes, tous les réactifs ont été gardés sur glace et les manipulations effectuées sous une hotte biologique.

Les PCR ont été faites dans l'appareil *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700* (Applied BioSystems, Foster City, CA, É.-U.) ou dans le *RoboCycler Gradient 96* (Stratagene, La Jolla, CA, É.-U.). Le programme suivant a été utilisé pour la paire d'amorces FUN4-GC/FUN3 ainsi que pour les amorces avec pinces GC pour les DGGE (section 3.10) 341-GC/534R et Euk1209F-

GC/Euk1643F-GC : 5 minutes à 94°C, 5 minutes à 55°C ; 30 cycles de : 45 secondes à 72°C, 45 secondes à 94°C et 45 secondes à 55°C ; une période d'élongation de 10 minutes à 72°C. Le même programme a été repris pour les PCR avec amorces 8F/1541R. L'étape d'élongation s'est cependant réalisée en *touchdown* (soit 3 cycles à 65°C ; 3 à 63°C ; 3 à 61°C ; 3 à 59°C ; 3 à 55°C et 20 cycles à 53°C) afin d'éviter les amplifications non-spécifiques, ce qui avait déjà posé problème durant ce projet.

Les produits issus des PCR ont par la suite été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (section 3.8).

**Tableau 3.** Amorces utilisées pour réaliser les PCR

Amorces	Région ciblée	Position	Séquence (5' → 3')	Fragment (pb)	Référence
341F-GC	Eubactéries, région V3 du gène codant pour l'ARNr 16S	341-357	GCCGCCCGCCGGCCGGCCGGG CGGGCGGGGGCACCAGGGGGG CCTACGGGAGGCAGCAG	~200	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
534R 8F (PA)	Eubactéries, gène codant pour l'ARNr 16S	518-534 8-27	ATTACCGCGGCTGCTGG AGAGTTTGATC(c/a)TGGCTCAG	~1 500	(Edwards <i>et al.</i> , 1989)
1541R (PH)	Tous les groupes taxonomiques majeurs des mycètes; amplification de la région V7 et d'une partie de V8 du gène codant pour l'ARNr 18S	1522-1541 1536-1555	AAGGAGGTGATCCA(g/a)CCGCA CGCCCCCGCCGGCCGGCCGGG CGGGGGCACGGGGGATTGCAATGC (v/c)CTATCCCCA	~340	(Borremann et Hartin, 2000)
nu-SSU-1196 (FUN3)	Picoeucaryotes, partie du gène codant pour l'ARNr 18S	1177-1196 1423-1438 <sup>†</sup>	GGAAACTCACCAGGTCACAGA CGGGCGCCCGCCCGCCCGCCCGC CGCCCCCGCCGACAGGTCTGTGATGCC	~210	(Diez <i>et al.</i> , 2001)
Euk1209F-GC Euk1643R (Uni1392R)		1641-1627 <sup>†</sup>	ACGGGGCGGTGT(a/g)C		(Brown et Wolfe, 2006)

<sup>†</sup> Relatif à la position chez *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.10 Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)

Cette méthode a été utilisée dans le but d'observer la diversité microbienne de la flore intestinale des drosophiles. Certains microorganismes composant cette microflore peuvent être cultivés (section 3.6). Ainsi leur ADN peut être extrait, amplifié et séquencé. Il est alors possible de chercher dans des bases de données à quelle espèce appartient le microorganisme isolé. Cependant, il est généralement admis qu'un maximum de 15% des microorganismes de l'environnement sont effectivement cultivables (Amann *et al*, 1995).

Le DGGE permet la migration dans un gel à gradient dénaturant d'un amplicon d'ADN selon son contenu en paires de bases G/C. Les ponts hydrogènes entre les bases azotées de l'ADN sont détruits selon une concentration particulière de dénaturant. Ainsi, plus un échantillon contient de paires de bases G/C, plus il faudra un gradient élevé de ce dénaturant dans le gel pour ouvrir les hélices d'ADN, ce qui ralentit la migration de ces échantillons. À la fin de l'électrophorèse, on obtiendra donc un patron de bandes, ce qui permet de visualiser la diversité en espèces de chacun des échantillons, qu'elles soient cultivables ou non. Les bandes obtenues peuvent ensuite être excisées du gel (section 3.11) et l'ADN peut en être extrait afin d'être par la suite séquencé.

Les gels de DGGE peuvent avoir un gradient en dénaturant allant de 0 à 100%. Plus le gradient de dénaturant est petit pour un même gel (par exemple de 40 à 60%), meilleure sera la séparation des bandes dans ce gel (résolution). Il est dans ce cas plus facile d'exciser certaines des bandes ou de mieux les visualiser. Lorsque les échantillons contenaient de l'ADN provenant d'un consortium inconnu d'espèces, le plus grand gradient (normalement de 0 à 80%) en dénaturant a cependant été utilisé.

Les gels ont été faits à partir de deux solutions d'acrylamide:bis de 8% (v/v): l'une sans dénaturant et l'autre avec 100% de dénaturants, soit du formamide (*Fisher Scientific*) et de l'urée (*Bio-Rad Laboratories*). Pour ce faire, une solution stock de polyacrylamide (faite d'acrylamide et de bis N,N'-methylene-bis-acrylamide en ratio de 37,5:1) (*Bio-Rad Laboratories*) de 40 % a d'abord été faite.

Pour préparer la solution sans dénaturant, 8 % de cette solution de polyacrylamide initiale a été utilisé dans un tampon TAE 1X (*Fisher Scientific*). Pour la préparation de l'autre solution, celle à haute concentration en dénaturants (100%), 8% de la solution de polyacrylamide initiale a également été utilisé. Y ont été ajoutés les dénaturants, soit : 40% (v/v) de formamide (*Fisher Scientific*) déionisé, 7 M d'urée (*Bio-Rad Laboratories*) et du tampon TAE 1X. Toutes ces



solutions ont été passées sur filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  (*Fisher Scientific*) et ont été dégazées dans une jarre anaérobie durant 15 min. Ce sont ces deux solutions stocks de 0 et de 100% de dénaturants qui ont ensuite servi à réaliser les différents gradients de gels tels que mentionnés plus haut (de 40-60% ou de 0-80% par exemple).

Avant de couler les gels à l'aide d'une chambre à gradient (modèle 385, *Bio-Rad Laboratories*), 5  $\mu\text{L}$  de persulfate d'ammonium (*Bio-Rad Laboratories*) 10% (v/v) et 0,5  $\mu\text{L}$  de tétraméthyléthylènediamine (TEMED, *Bio-Rad Laboratories*) ont été rajoutés aux solutions de polyacrylamide pour chaque ml de solution de gel. Ces deux réactifs aident en fait à la polymérisation du gel. Après les deux heures nécessaires à la polymérisation, les gels ont été placés dans la cuve à électrophorèse remplie avec du tampon TAE 1X préchauffé à 60°C. Chacun des puits a ensuite été rempli avec 15  $\mu\text{L}$  de produits PCR s'il s'agissait de cultures pures ou avec le double lorsqu'il s'agissait d'amplicons de consortium bactérien (microflore des drosophiles par exemple). À chaque fois, un volume de tampon de chargement (glycérol avec 0,25% de xylène cyanol et 0,25% de bleu de bromophénol comme colorants) égal à celui de l'ADN a aussi été chargé dans les puits.

Après migration des échantillons dans un courant de 100V durant 16 heures, chacun des gels a été coloré par agitation dans un bain de bromure d'éthidium de 10  $\mu\text{g/ml}$ , rincé dans un bain d'eau durant 10 minutes, puis visualisé sous rayons ultraviolets grâce à l'appareil *Alphamager<sup>TM</sup> 3400*.

### **3.11 Extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide**

Des bandes de DGGE suscitant l'intérêt ont été extraites du gel de polyacrylamide. Elles ont été excisées avec un scalpel sous rayonnement UV produit par l'appareil *Electronic UV Transilluminator (UltraLum Incorporated, Claremont, CA, É.-U.)*. Chacune de ces bandes a ensuite été placée dans un tube de 1,5 ml auquel a été ajouté un volume de 500  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution pour gel de polyacrylamide (soit 0,5 M d' $\text{AcNH}_4$  ; 10mM de  $\text{AcMg}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ; 1 mM de EDTA pH 8,0 ainsi que du SDS à concentration de 0,1%). Ces tubes ont été laissés 3 heures à 37°C dans un incubateur avec tambour rotatif. Après avoir réalisé une centrifugation de 1 min à 16 500 x g, le surnageant de chacun des tubes a été prélevé et conservé, puis remplacé par 250  $\mu\text{L}$  de tampon frais. Chaque échantillon a ainsi été lavé par inversion puis centrifugé de nouveau. Les surnageants ont été récoltés et combinés aux précédents.

Pour faire précipiter l'ADN contenu dans le surnageant de chacun des tubes, 2 volumes d'éthanol 100% y ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été placés à -20°C durant 2 heures. Après 10 min de centrifugation à 16 500 x g et après avoir décanté le surnageant de chacun des tubes, les culots ont été suspendus dans 200 µL d'eau milli-Q stérile, 1/10 de volume d'acétate d'ammonium 3M et 2 volumes d'éthanol 100%. L'ADN a ensuite été laissé à -20°C durant 2 heures afin de permettre sa précipitation. Une dernière centrifugation de 10 min à 16 500 x g a été réalisée, le surnageant a encore une fois été jeté et les culots ont été laissés à sécher sous la hotte biologique. Finalement, l'ADN a été suspendu dans 15 µL d'eau.

Afin de pouvoir être séquencé, l'ADN ainsi extrait a été quantifié par spectrophotométrie et amplifié par PCR (section 3.9). Un gel d'agarose (section 3.8) a ensuite été réalisé afin de s'assurer que l'ADN extrait du gel de polyacrylamide a bien été amplifié.

### ***3.12 Séquençage et analyse des séquences***

Une fois l'ADN d'intérêt extrait (sections 3.7 et 3.11) puis amplifié (section 3.9), il a été possible d'envoyer ces échantillons au Centre d'innovation Génome Québec (Montréal, QC, Canada) afin qu'ils soient séquencés.

Les séquences générées par Génome Québec ont d'abord été corrigées avec le logiciel *Chromas* version 2.01 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Elles ont ensuite été comparées à celles des banques de données à l'aide du logiciel *BLASTn* du *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mais aussi avec le programme *FASTA* de l'*European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>).

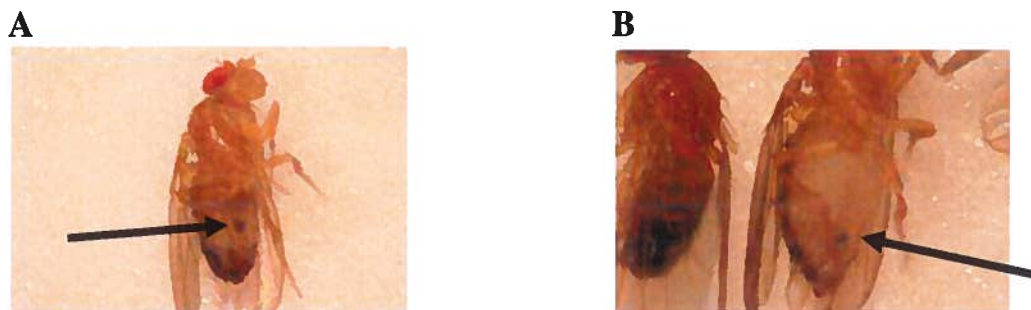
## 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

## 4.1 Infections par ingestion

### 4.1.1 Établissement et maintien de la population de drosophiles

Dès l'été 2006, un stock sain de drosophiles a été établi dans l'incubateur à environnement contrôlé, gardé à 25°C et à une humidité relative de 65%. La colonie était alors en bonne santé : le ratio mâles/femelles était de 50/50, il y avait éclosion des œufs et transformation des larves en mouches adultes.

Cependant, durant le printemps et l'été 2007, la population de drosophiles du laboratoire s'est pratiquement effondrée. Une infection par le genre bactérien *Wolbachia* a été suspectée puisque les adultes présentaient des signes courants de maladies : une baisse de la reproduction (Clark *et al*, 2005) et la présence de taches de mélanine (Fig. 4) sur l'abdomen des drosophiles (De Gregorio *et al*, 2002). Les *Wolbachia* font partie des  $\alpha$ -protéobactéries et sont connues comme pathogènes des arthropodes. Il a été estimé que 30% des stocks de mouches à fruit du *Bloomington Stock Center* seraient en fait infectés par ces bactéries endosymbiontes (Clark *et al*, 2005).



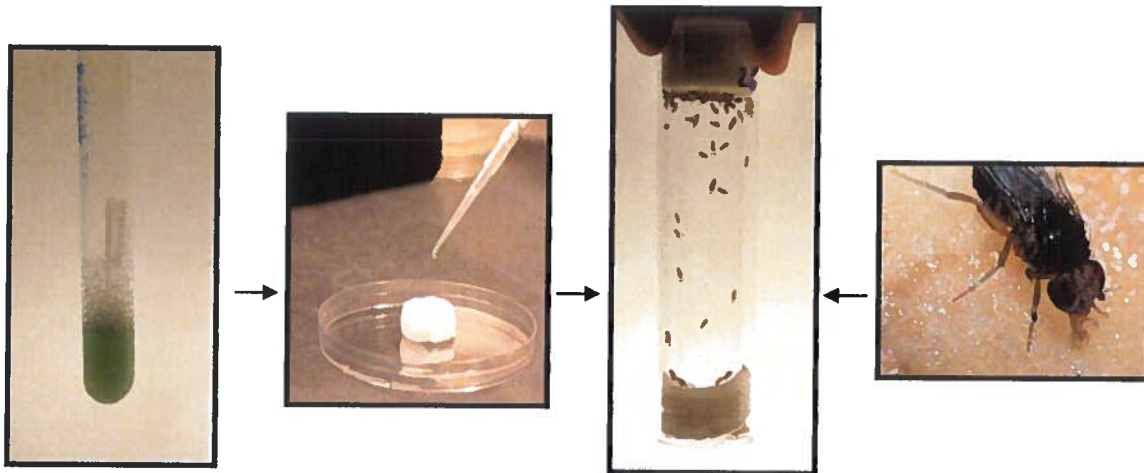
**Figure 4.** Réaction immunitaire indiquée par des taches de mélanine chez un mâle (A) et chez une femelle (B).

Les drosophiles ont donc été transférées sur milieu nutritif contenant de la tétracycline (250  $\mu\text{g/ml}$ ) pour trois générations (Frydman *et al*, 2006). Les stocks ne se renouvelant pas après ce traitement, il fallut donc trouver la cause du problème afin de pouvoir poursuivre les travaux du présent projet. C'est ainsi qu'après plusieurs semaines de recherche, un dérèglement fut découvert dans le programme régissant la lumière de l'incubateur où étaient gardées les

drosophiles. Le cycle fut donc reprogrammé afin de recréer une journée normale de 12 heures de lumière et 12 heures de nuit. Le problème fut ainsi résolu et le projet pu reprendre son cours.

#### 4.1.2 Optimisation du protocole d'infection par ingestion

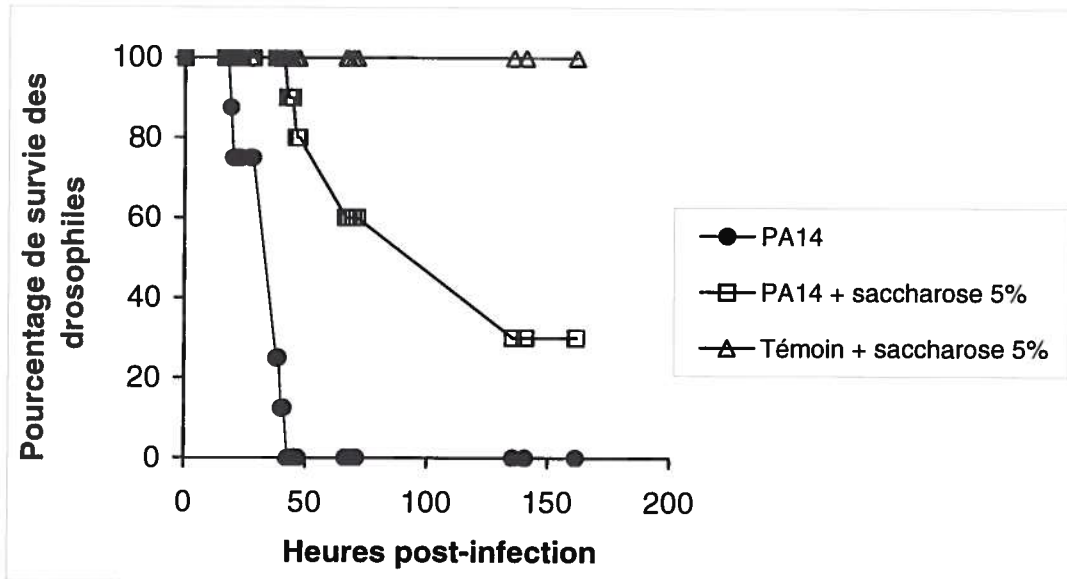
Le protocole de départ a été obtenu de l'équipe du Dr Laurence Rahme par l'entremise du Dr Yiorgos Apedianakis. Il consistait à placer une boule de coton non stérile au fond d'une fiole de polystyrène de 2,5 mm de diam. et d'y ajouter 2 ml de culture bactérienne de *P. aeruginosa* PA14. Selon ce protocole, les cellules étaient préalablement cultivées dans 5 ml de TSB à partir d'un stock congelé et gardées à 37°C dans un incubateur avec tambour rotatif jusqu'à ce qu'elles atteignent une  $DO_{600}$  de 3,0. À ce moment, 2 ml de culture étaient prélevés et les cellules devaient être lavées deux fois dans du PBS/saccharose 20% stérile avant d'être déposées sur le coton. Les drosophiles étaient ensuite laissées dans ces fioles pour la durée de l'infection. La figure 5 illustre cette méthode.



**Figure 5.** Protocole d'infection par ingestion essai # 1. Lorsqu'une culture de *P. aeruginosa* atteint une  $DO_{600}$  de 3, deux millilitres sont prélevés, les cellules sont lavées puis déposées sur un coton. Ce coton est ensuite mis dans une fiole avec les drosophiles à infecter.

Selon ce protocole, le saccharose était rajouté afin que les drosophiles ne manquent pas de nutriments et meurent bel et bien de l'infection. J'ai d'abord voulu déterminer si le saccharose

était bel et bien nécessaire aux drosophiles. La figure 6 illustre les courbes de mortalité de drosophiles en contact avec *P. aeruginosa* souche PA14. Un taux de 100% de mortalité est atteint en moins de 50 heures lorsque les drosophiles ne sont en contact qu'avec *P. aeruginosa*. Pour ce test, du saccharose 5% (plutôt que 20%) a été utilisé puisque la survie des bactéries dans une telle concentration de succharose a été mise en doute (Chirife et al, 1982). L'ajout de saccharose 5% sur le coton, en plus des bactéries, permet comme la figure 6 l'illustre, de retarder la mortalité du groupe infecté. Il est également possible que cela permette aux bactéries du coton de survivre plus longtemps. Cette hypothèse n'a toutefois pas été vérifiée. Ce test confirme toutefois que les drosophiles sont davantage susceptibles de mourir de faim si du saccharose n'est pas ajouté à la solution bactérienne mise dans la fiole<sup>5</sup>. Les drosophiles faisant partie du groupe témoin (coton imbibé de saccharose 5% et sans bactéries) ont également survécues pendant toute la durée du test.



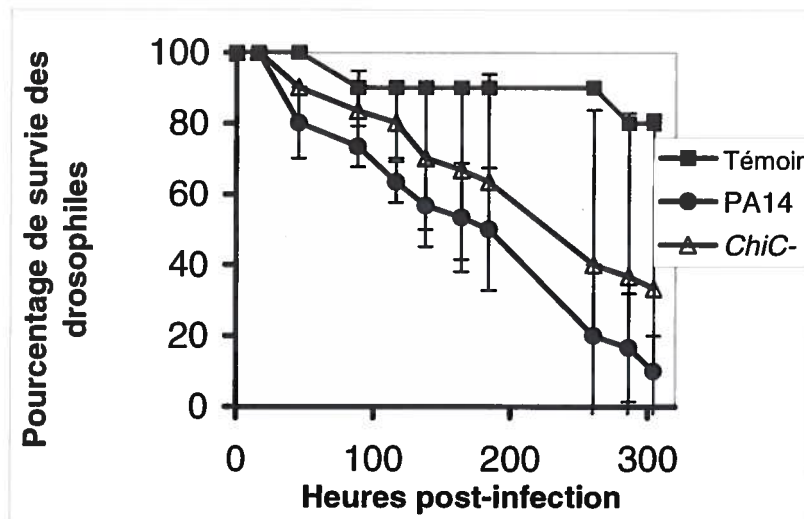
**Figure 6.** Infection par ingestion avec ou sans ajout de saccharose.

Les cellules de *P.aeruginosa* souche PA14 ingérées par les drosophiles étaient lavées et suspendues dans une solution de saccharose 5% puis déposées sur le coton (courbe PA14 + saccharose 5%), ou simplement lavées et suspendues dans une solution de PBS (courbe PA14). Les drosophiles adultes étaient préalablement affamées 3 heures et maintenus à 21 °C.

<sup>5</sup> Lors d'infections visant à distinguer les souches selon leur virulence, les tests sont faits en triplicatas. Ici, j'ai choisi de ne pas le faire, Ce test a été fait plusieurs fois dans des conditions différentes (sexe et âge des drosophiles) et à chaque fois démontré que les drosophiles, infectées ou non, ne survivaient pas plus de 48 heures sans saccharose.

Les essais subséquents ont ainsi été réalisés en lavant puis en suspendant les cellules bactériennes dans une solution de saccharose 5% lorsque la culture était à DO de 3.0. Deux millilitres de cette solution étaient alors déposés sur chacun des cotons. Dix drosophiles étaient ensuite déposées dans les fioles pour toute la durée de l'infection.

Cette méthode, si elle parvenait bien à créer une infection chez les drosophiles, ne produisait par contre pas de résultats reproductibles. Il est possible d'observer les courbes de mortalité produites avec ce nouveau protocole à la figure 7<sup>6</sup>. Les écart-types de chacune de ces courbes sont en effet très grands. L'expérience visait ici à vérifier si un mutant de *P. aeruginosa*, déficient dans la production d'une chitinase serait moins virulent que la souche sauvage PA14. Puisque le système gastro-intestinal de la drosophile est recouvert de chitine (Kavanagh et Reeves, 2004), j'avais alors émis l'hypothèse que *P. aeruginosa* devait d'abord dégrader ce polysaccharide avant de pouvoir infecter l'insecte. Il est connu que *P. aeruginosa* produit au moins une chitinase (Folders *et al*, 2001). Ainsi, un mutant *chiC*- pourrait donc se révéler moins virulent. Il a cependant été impossible de tirer des conclusions avec cet essai puisque les écart-types des courbes de mortalité étaient trop grands. L'hypothèse a toutefois été vérifiée ultérieurement et les résultats peuvent être observés à la figure 9.

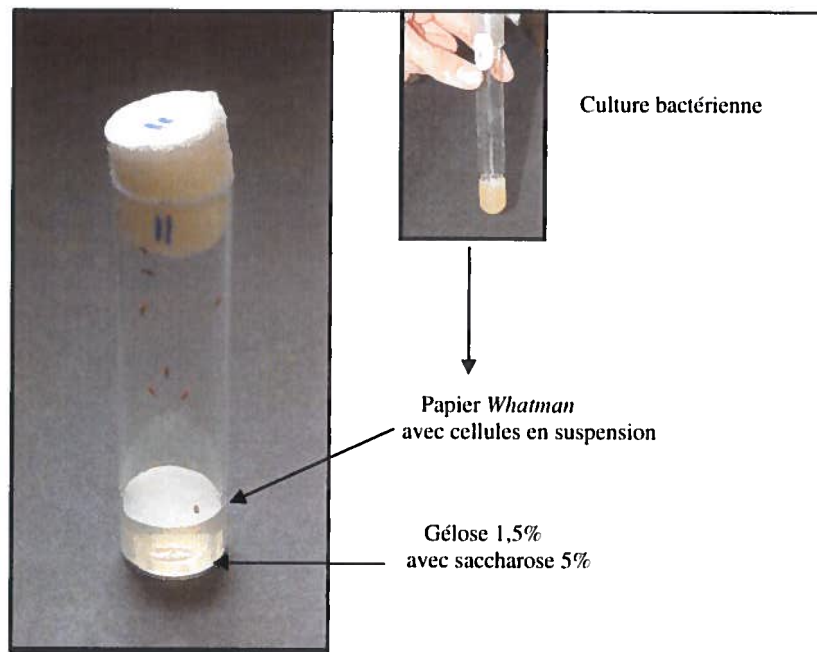


**Figure 7.** Infection par ingestion de mutant *chiC*- de *P.aeruginosa* PA14. Infection réalisée avec dépôt des cellules en suspension dans du saccharose 5% sur des cotons non stériles. ●= *P. aeruginosa* souche sauvage PA14, Δ= mutant *chiC*- (chitinase C).

<sup>6</sup> Pour cette infection, et dans la plupart des autres infections par ingestion, le décompte de la mortalité a été arrêté à 300 heures car les géloses et les papiers filtres au fond des tubes deviennent secs.



Un deuxième protocole, toujours avec ajout de saccharose 5%, fut utilisé pour tenter d'améliorer la reproductibilité de l'essai. Basée sur la méthode publiée par Chugani *et al.* (2001), cette façon de faire consistait à déposer la solution bactérienne pathogène sur un papier filtre plutôt que sur un coton (voir Fig. 8). De cette façon, les cellules sont retenues à la surface du papier et les drosophiles sont ainsi exposées aux mêmes quantités de bactéries d'un tube à l'autre. Les cotons sont en effet plus poreux et plus épais. Il est donc probable que les cellules n'y aient pas été réparties uniformément ou n'aient pas été uniformément accessibles aux mouches. Afin d'éviter que le papier filtre ne s'assèche, une gélose de 5 ml d'agar 1,5% / saccharose 5% est préalablement coulée au fond de chacun des tubes.

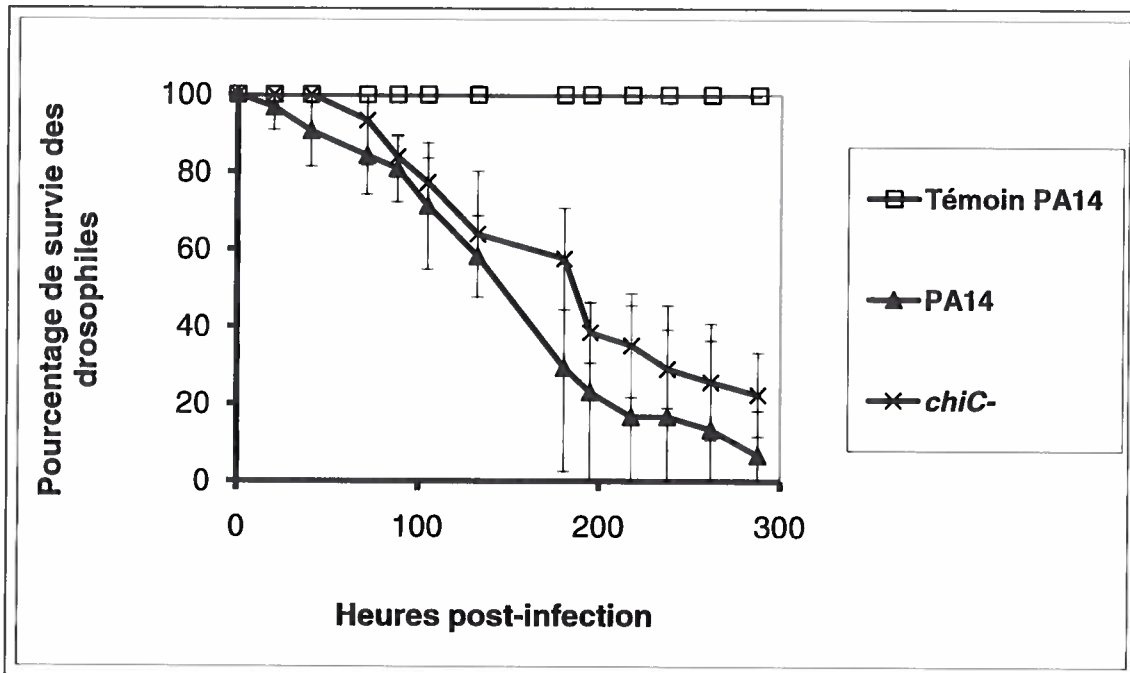


**Figure 8.** Méthode d'infection par ingestion basée sur celle de Chugani *et al* (2001). Selon cette méthode, les bactéries sont déposées sur un papier filtre stérile posé sur une gélose couvrant le fond d'une fiole.

Les essais ont donc été repris avec ce nouveau protocole. La figure 9 illustre les nouveaux résultats obtenus d'une infection avec le mutant *chiC*- de *P. aeruginosa* et avec la souche sauvage PA14. Les écart-types y sont beaucoup plus petits que ceux observés à la figure 7. En effet, ceux présentés en figure 7 ne permettaient pas d'observer une différence entre les groupes infectés et le

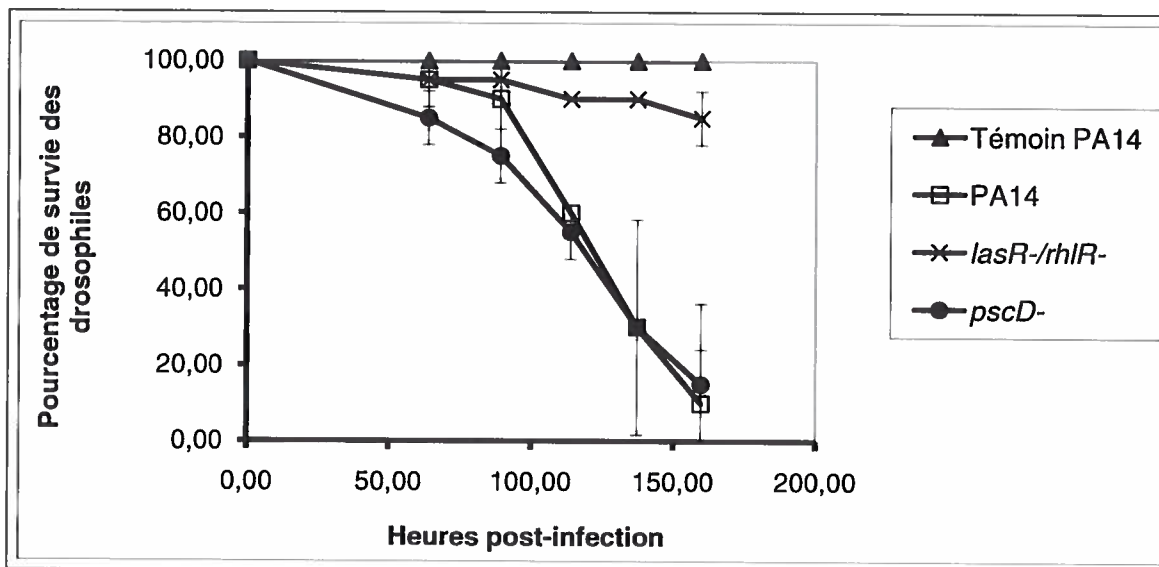


groupe témoin (sauf en un point). Les résultats obtenus avec cette nouvelle méthode ne permettent pas d'observer une différence entre la virulence du mutant *chiC*- et celle de la souche sauvage PA14. *P. aeruginosa* utiliserait donc ainsi d'autres moyens que la production de chitinase pour infecter son hôte.



**Figure 9.** Infection par ingestion du mutant *chiC*- .  
Essai selon le protocole adapté de Chugani *et al* (2001). Mâles âgés de 10 à 12 jours, préalablement affamés 7 heures et maintenus à 25 °C.

Un bon modèle alternatif devra servir à différencier les souches virulentes des non pathogènes. Il fallait donc maintenant confirmer que le modèle d'infection de la *drosophile* par ingestion était valide. D'autres infections ont donc été réalisées avec cette nouvelle méthode.



**Figure 10.** Infection par ingestion des mutants *pscD*- et *lasR/rhIR*.

Mâles âgés de 4 à 7 jours, affamés 7 heures et maintenus à 25 °C infectés avec *P. aeruginosa* souche PA14, le double mutant *lasR-/rhIR*- (régulateurs de deux systèmes de quorum sensing) et le mutant *pscD*- (système de sécrétion de type III).

Le gène *pscD* chez *P. aeruginosa* fait partie du système de sécrétion de type III (voir section 1.5.4 pour plus de détails). Il contribue à la sécrétion de certaines protéines dépendantes de ce système, notamment ExoT et ExoU (Miyata *et al*, 2003). La souche possédant une mutation dans ce gène n'a pas été testée dans la drosophile et pourrait être moins virulente dans ce modèle. Les résultats obtenus à la figure 10 permettent de conclure que ce gène n'est pas nécessaire à la virulence de *P. aeruginosa* dans le modèle d'infection des drosophiles par ingestion. En effet, aucune différence ne peut être observée entre les courbes de mortalité de la souche sauvage et du mutant. Le mutant *pscD* s'était avéré aussi virulent chez le nématode *C. elegans* (Mahajan-Miklos *et al*, 1999 ; Miyata *et al*, 2003 ; Tan *et al*, 1999) et la plante *A. thaliana* (Miyata *et al*, 2003 ; Rahme *et al*, 1997) que la souche sauvage de *P. aeruginosa*. C'est avec le modèle *G. mellonella* par injection qu'il s'est la seule fois avéré moins virulent (Miyata *et al*, 2003). Cette variation pourrait être expliquée par les méthodes d'infection utilisées chez les deux hôtes. En effet, alors que le graphe présenté en figure 10 a été obtenu par ingestion de bactéries par les mouches à fruits (et *C. elegans*), les courbes de mortalité chez *G. mellonella* ont été obtenues par injection du mutant dans la larve de l'insecte. Il se pourrait aussi simplement que le gène *pscD*

soit impliqué dans la virulence de PA14 lors d'infection avec *G. mellonella* et non avec *D. melanogaster*, *D. discoideum* ou *A. thaliana*.

Une double mutation des gènes *lasR* et *rhlR* (les régulateurs de deux systèmes de quorum sensing chez cette bactérie) rend par contre le microorganisme beaucoup moins pathogène pour les drosophiles. Ce double mutant (de la souche de *P. aeruginosa* PA01) n'a été testé que dans un autre modèle alternatif : chez *D. discoideum* (Cosson *et al*, 2002). Dans cette étude, 200 amibes avaient été étalées sur géloses avec  $6 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (comme source nutritive) et  $10^7$  UFC de *P. aeruginosa*. Le mutant *lasR/rhlR* s'est avéré beaucoup moins virulent pour l'amibe que la souche sauvage ce qui a également été le cas pour la drosophile dans la présente étude<sup>7</sup>. Ces résultats obtenus avec le mutant *lasR/rhlR* indique que le quorum sensing joue un rôle dans la virulence de *P. aeruginosa* lorsqu'ingéré par la drosophile. Une étude de Lutter *et al* (2008) supporte également ce résultat. Il y est démontré que la souche sauvage PA103 de *P. aeruginosa* s'avère pratiquement avirulente lorsqu'ingérée par *D. melanogaster*, tout comme le double mutant *lasR/rhlR*. Or, cette souche ne possède pas de système de quorum sensing fonctionnel. Il a pourtant été démontré que PA103 était virulente chez la drosophile avec le modèle par piqûre. Ainsi, le quorum sensing serait essentiel afin de créer une infection mortelle lors d'une infection par ingestion, mais pas avec le modèle par piqûre. Des résultats contradictoires quant au rôle du QS lors des infections par piqûre ont cependant été publiés (Stoltz *et al*, 2008). La question reste à être élucidée.

Les essais illustrés par la figure 10 permettent donc de valider le modèle par ingestion. Il est en effet possible de distinguer les souches selon leur pathogénicité chez *D. melanogaster*. Les résultats obtenus avec le double mutant *lasR/rhlR* concordent avec ceux déjà paru chez l'amibe. Ceux obtenus avec le mutant *pscD* aussi.

---

<sup>7</sup> Il faut toutefois noter que le double mutant utilisé pour cette infection provient à l'origine de la souche sauvage PA01 de *P. aeruginosa* et non de la souche PA14. Il aurait donc fallu ajouter un groupe de drosophiles infectées par la souche PA01, en plus de la souche PA14, afin de comparer avec exactitude l'effet du double mutant *lasR/rhlR* sur la mortalité des mouches à fruits.

### **4.1.3 Infections avec pathogènes autres que *P. aeruginosa***

#### **4.1.3.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae***

Des infections avec *A. pleuropneumoniae* ont été tentées une fois le protocole d'infection par ingestion optimisé. L'expérience a été répétée à des températures de 21°C puis de 25°C. Les mouches à fruit ont également été affamées 5 et 7 heures avant d'être en contact avec l'agent pathogène. D'autres essais ont aussi été tentés en triplant la quantité de bactéries utilisée. Dans tous les cas, aucune mortalité n'est survenue. Le modèle d'infection par ingestion ne semble donc pas adapté à l'étude de la virulence d'*A. pleuropneumoniae*. Comparativement à *P. aeruginosa* ou aux espèces bactériennes faisant partie du complexe *Burkholderia cepacia*, ce microorganisme n'est pas un pathogène généraliste. Il est ainsi possible de douter que les mécanismes impliqués dans sa virulence soient efficaces contre les insectes, ceux-ci ne possédant d'ailleurs pas le même système respiratoire que les mammifères.

#### **4.1.3.2 Complexe *Burkholderia cepacia***

Des infections avec les espèces appartenant au complexe *Burkholderia cepacia* ont aussi été réalisées avec le modèle drosophile par ingestion et par piqûre. Les résultats de ces essais font partie d'un article scientifique rédigé en anglais dont le manuscrit a été soumis à *Infection and Immunity* pour une publication. Il peut être consulté à la section 4.2.

## **4.2 *Drosophila melanogaster* comme modèle d'infection pour le complexe *Burkholderia cepacia***

#### ***4.2.1 Attestation de la contribution des auteurs***

**Josée Castonguay-Vanier** : - Manipulations :

*(D. melanogaster stock and maintenance, Fly feeding assays, Fly pricking assays, Bacterial growth in vivo, Competition assays);*

- Rédaction de l'article;
- Travail sur les figures.

**Dr Ludovic Vial** : - Préparation des cultures bactériennes et construction des mutants;

- Étalements sur géloses et décomptes bactériens  
*(Bacterial growth in vivo, Competition assays);*

- Rédaction des paragraphes *Bacterial strains and culture conditions* et *Construction of mutants*, tables 1 et 2;

- Travail sur les figures;
- Révision de l'article.

**Dr Éric Déziel**: - Supervision des travaux;

- Révision de l'article.

#### ***4.2.2 Confirmation des auteurs***

Courriel reçu 18/08/2009 :

C'est bon pour moi en ce qui concerne la contribution des auteurs.

Ludovic VIAL  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Laboratoire de Éric Déziel  
531 Boul. des Prairies,  
Laval, Qc, H7V 1B7  
Poste / Ext. 4392  
Courriel / email: [Ludovic.Vial@iaf.inrs.ca](mailto:Ludovic.Vial@iaf.inrs.ca)

#### 4.2.3 Résumé en français

Les espèces bactériennes faisant partie du complexe des *Burkholderia cepacia* (Bcc) ont la capacité d'infecter une grande variété d'hôtes. En particulier, elles sont associées à un déclin rapide de l'état de santé des patients atteints de fibrose kystique. L'objet de cette étude visait à déterminer si *D. melanogaster* peut être utilisée comme hôte alternatif pour les espèces du Bcc. Ce modèle d'infection a été validé par plusieurs études portant sur la virulence d'une multitude de microorganismes. En effet, la drosophile est de plus en plus utilisée dans les études des relations hôtes-pathogènes pour une grande diversité d'agents infectieux. La virulence de souches appartenant à neufs génomovars différents a été étudiée: *B. cepacia* (gen. I), *B. multivorans* (gen. II), *B. cenocepacia* (gen. III), *B. stabilis* (gen. IV), *B. vietnamiensis* (gen.V), *B. dolosa* (gen.VI), *B. ambifaria* (gen. VII), *B. pyrrocinia* (gen. IX) et *B. ubonensis* (gen. X). La technique d'infection par piqûre s'est avérée létale pour les populations de drosophiles infectées alors que la méthode par ingestion n'a provoqué aucune mortalité. *B. cepacia* (LMG1222), *B. pyrrocinia* (LMG21824) et *B. ubonensis* (LMG 20358) ont été les souches les plus pathogènes, induisant des taux de mortalité de 100% en moins de 72 heures, alors que *B. multivorans* (LMG16660) et *B. dolosa* (LMG21819) se sont révélées avirulentes. La détermination d'index de compétitivité a permis d'accroître la sensibilité ainsi que le pouvoir de discrimination des tests de mortalité. Des infections avec la souche *B. cenocepacia* K56-2 et des mutants connus pour être moins virulents chez les muridés ont eux aussi confirmé la validité du modèle drosophile. *D. melanogaster* représente donc un hôte alternatif pertinent pour les tests de virulence du Bcc.



#### *4.2.4 L'article*

### ***Drosophila melanogaster as a model host for the Burkholderia cepacia complex***

Josée Castonguay-Vanier, Ludovic Vial and Eric Déziel\*

INRS-Institut Armand Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

\*Contact information: Eric Déziel

[eric.deziel@iaf.inrs.ca](mailto:eric.deziel@iaf.inrs.ca)

Phone: 450-687-5010 Fax : 450-686-5501

#### **4.2.4.1 Abstract**

Bacterial species from the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) are associated with fast health decline among individuals with cystic fibrosis and are known for their virulence towards a broad range of hosts. The fruit fly is increasingly used as an alternative model and its validity in enhancing our understanding of host-pathogen relationships has been demonstrated with a variety of microorganisms. The aim of this study was to establish *Drosophila melanogaster* as a surrogate host for species from the Bcc. Nine different genomovars were investigated: *B. cepacia* (gen. I), *B. multivorans* (gen. II), *B. cenocepacia* (gen. III), *B. stabilis* (gen. IV), *B. vietnamiensis* (gen.V), *B. dolosa* (gen.VI), *B. ambifaria* (gen. VII), *B. pyrrocinia* (gen. IX) and *B. ubonensis* (gen. X). While the feeding method proved unsuccessful at killing the flies, the pricking technique did generate mortality within the populations. *B. cepacia* (LMG1222), *B. pyrrocinia* (LMG21824) and *B. ubonensis* (LMG 20358) were the most virulent species, with mortality rate of 100% within 72 hours, while *B. multivorans* (LMG16660) and *B. dolosa* (LMG21819) were avirulent. Validity of the *Drosophila* infection model was confirmed with *B. cenocepacia* strain K56-2 and mutants known to be less virulent in murine hosts. Competition assays were also performed. They provided enhanced sensitivity and discriminating power to the mortality tests. Overall results of this study do tally with those obtained with mammalian models. *Drosophila* could therefore be considered a suitable model for virulence tests.

#### 4.2.4.2 Introduction

Members of the *Burkholderia* bacterial genus are well known for the versatility of their ecological niches. They were first isolated from the phytosphere where they were found to be pathogenic to plants (Burkholder, 1950). It is now known however that they can also be beneficial to them and fix atmospheric nitrogen (Vial *et al*, 2007). *Burkholderia* species are among the most antibiotic-resistant bacteria associated with human infections (Aaron *et al*, 2000). Some species can in fact survive in antimicrobial agents (Weber *et al*, 2007) and inside macrophages (Lamothe *et al*, 2007; Martin & Mohr, 2000) or free-living amoebae (Marolda *et al*, 1999). Within the genus, the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) has channelled a great part of the interest for all these reasons. Furthermore, species from the Bcc are responsible for chronic granulomatous disease (Coenye *et al*, 2001) and are posing a considerable threat to immunocompromised individuals such as cystic fibrosis (CF) patients. The seriousness of a Bcc infection can be depicted by the fact that CF patients infected with Bcc strains suffer a faster health decline than when infected with *Pseudomonas aeruginosa* (McClellan & Callaghan, 2009). The Bcc is composed of at least 15 closely related genomic species, all of which have been recovered from CF patients (Mahenthalingam *et al*, 2000; Vanlaere *et al*, 2008). They are however not equally prevalent: *B. multivorans* and *B. cenocepacia* being the most encountered; the latter also being associated with the highest mortality rate within the CF community (Mahenthalingam *et al*, 2000).

Much remains to be done in order to better understand the mechanisms behind the broad virulence of the Bcc, and development of animal models therefore seems inevitable. The traditional murine model has proven useful in the quest for understanding the virulence mechanisms of the Bcc (Chu *et al*, 2002; Sajjan *et al*, 2001; Sousa *et al*, 2007; Tomich *et al*, 2003), but the search is on for more cost-effective alternatives and for somewhat less controversial widescreen models with faster generation time.

The greater wax moth *Galleria mellonella* has recently been proposed as a host for the testing of different strains of the Bcc (Seed & Denis, 2008) partly because it had previously shown good correlation between *P. aeruginosa* PA14 infection outcomes in mammals and in lower organisms (Jander *et al*, 2000). Its ease of handling also provided great incentives to its use as surrogate model. However, hosts with which reverse but also forward genetic is possible would represent additional advantages. The alfalfa seedlings model was the first proposed

alternative to mice and it revealed different patterns of infection between the Bcc strains (Bernier *et al*, 2003). However, such as for *Galleria*, alfalfa is not easily manipulated genetically. *Caenorhabditis elegans* has hence been suggested (Cardona *et al*, 2005), but sometimes produced mixed results regarding infection outcomes (Cardona *et al*, 2005; Markey *et al*, 2006; Seed & Denis, 2008).

The genome sequence of the fruit fly has been unravelled several years ago (Adams *et al*, 2000) and mutants are readily available. Although *Drosophila* does not possess an acquired immune system, its innate counterpart has been shown to be very similar to the mammalian one (Fallon *et al*, 2001; Medzhitov *et al*, 1997). The fruit fly is capable of cellular as well as humoral responses when faced with invaders: the phagocytosis is done by its plasmatocytes and its fat body produces an array of antimicrobial peptides. The signalling cascades involved in the production of these molecules represent the milestone of the similarity between the innate immune system of vertebrates and of the rest of the animal kingdom (Hoffmann *et al*, 2002). For these reasons, the fruit fly offers great potential to give insights on host-pathogen interactions. In fact, *Drosophila melanogaster* has already proven to be a great tool in the study of plant or fungal pathogens such as *Erwinia carotovora* (Nicolas *et al*, 1998) and *Cryptococcus neoformans* (Apidianakis *et al*, 2004), but also of opportunistic ones such as *P. aeruginosa* (D'Argenio *et al*, 2001).

We report here the use of the fruit fly as an effective model of infection for discriminating species and strains within the Bcc. We also show that use of competitive indices (CI) provides supplemental discriminating power for the characterization of strain virulence.

#### **4.2.4.3 Materials and methods**

##### **Bacterial strains and culture conditions**

Bcc strains used in this study are listed in Table 4. *Escherichia coli* SM10  $\lambda$ pir (*thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km<sup>r</sup>  $\lambda$ pir*) served as donor for conjugation experiments (Simon *et al*, 1983). Unless stated otherwise, Bcc strains were routinely grown in tryptic soy broth (TSB) (Difco) at 37°C with shaking or on TSB agar plates. When required, antibiotics were added at the following final concentrations: 75  $\mu$ g/ml for trimethoprim and 200  $\mu$ g/ml for tetracycline.

Growth rates were verified and with a Microbiology Bioscreen C Reader (Labsystems, Finland) in 100-well sterile microplates using 200  $\mu$ l of TSB. The optical density of the cultures was measured with the wideband 420-580 nm filter.

### **Construction of the mutants**

A 394-bp internal fragment of *cepl* and a 553-bp fragment of *bcscN* were amplified from *B. cenocepacia* K56-2 using the following primers: *cepl*IF with a *KpnI* site (Table 5) and *cepl*R with a *XbaI* site for the *cepl* gene, and primers *bcsc*NF and *bcsc*NR for the *bcscN* gene with the same restriction sites. The PCR products were digested with *KpnI* and *XbaI* and ligated to the *XbaI* and *KpnI* sites of the suicide vector pKNOCK-Tet (Alexeyev, 1999). The constructs were then electroporated into *E. coli* SM10 cells. The plasmids were then mobilized from SM10 into *B. cenocepacia* K56-2 cells by mating. Single-crossover insertion mutants were selected on TSB agar containing 200  $\mu$ g/ml of tetracycline. The plasmid insertion in the target gene was confirmed by PCR. The same procedure was used for the construction of the *B. cenocepacia zmpA zmpB* mutant: a 547-bp internal fragment of *zmpB* was amplified from *B. cenocepacia* K56-2 using primers *zmp*BF with a *KpnI* site and *zmp*BF with a *XbaI* site. It was then cloned in the *XbaI* and *KpnI* sites of pKNOCK-Tet. *B. cenocepacia* K56-2 *zmpA* was used as the recipient strain. Single-crossover insertion mutants were selected on TSB agar containing 75  $\mu$ g/ml trimethoprim and 200  $\mu$ g/ml tetracycline.

### ***D. melanogaster* stock and maintenance**

Wild-type Oregon R (OR) flies were used throughout this study. They were maintained on standard cornmeal sucrose medium and kept in a controlled environment of 25°C and 65% humidity with a 12-hours light cycle. All experiments were conducted under these conditions unless stated otherwise.

### **Fly feeding assays**

OR wild type flies of approximately seven days old were first infected with a feeding assay modified from Chugani *et al* (2001). Plastic vials containing 5 ml of 1.5% agar and 5% sucrose were prepared. Whatman filter disks (2.3-cm diameter) were placed inside these vials so to completely cover the agar surface. Bacterial cultures were grown to an OD<sub>600</sub> of 4. Cells were

then collected by centrifuging 1 ml of each culture at 7,500 x g, washed once with 1ml of sterile PBS/5% sucrose solution and resuspended in 70 µl of sterile PBS/5% sucrose.

Bacterial suspensions were added to the surface of the filter paper in the plastic vials and let to dry for 15 min. Flies were anaesthetised with CO<sub>2</sub> and transferred to the vials per batches of 10. They were left to feed on the bacteria, and following death was recorded every day. All experiments were done in triplicates and vials inoculated with 70µl of sterile PBS/5% sucrose were used as controls. For these infection assays, bacterial load was recorded to verify that the flies had ingested bacteria.

### **Fly pricking assays**

Adult female flies of 6 to 10 days old were used for this experiment and infected according to a protocol modified from Baldini *et al.* (2002) and Tzou *et al.* (2002). The flies were anaesthetised with CO<sub>2</sub> and pricked in the dorsal thorax with a 26S-gauge Hamilton syringe previously dipped in the appropriate bacterial cell suspension, prepared as follow: 3 ml of bacterial culture was brought to an OD<sub>600</sub> of 2. Cells were then washed with 1 ml of sterile 10 mM MgSO<sub>4</sub> supplemented with 100µg /ml of ampicillin and resuspended in 1 ml of the same buffer. The addition of ampicillin to the buffer was done to prevent a possible infection with bacteria present on the surface of the fly.

For every bacterial strain to be tested, 10 flies were pricked and subsequently placed in a plastic vial containing 5 ml of 1.5% agar and 5% sucrose. All experiments were done in triplicates and flies pricked with sterile MgSO<sub>4</sub> buffer served as negative controls. The syringe was washed between every replicate with 70%-grade ethanol and rinsed with the MgSO<sub>4</sub> buffer with ampicillin in concentration of 100µg/ml.

### **Bacterial growth *in vivo***

To monitor bacterial loads of the flies during the course of an infection, the number of CFU per fly on specific days following infection were recorded as follow: flies were individually placed in microfuge tubes containing 70%-grade ethanol and surface-sterilized by mixing by inversion for 1 min. They were then rinsed for 1 min. in sterile water and individually grinded in 200 µl of sterile PBS with a micropestle. The suspensions obtained were serially diluted in NaCl 0.8% and plated on TSB agar containing gentamycin 25µg/ml and polymyxin B 25µg/ml. For the

time point regarded as zero, flies were allowed to rest for 1 h after having been infected and were subsequently anaesthetised and homogenized such as described above. Five living flies were used per time point.

### **Competitive index analyses**

For these experiments, a 1:1 ratio mix of two bacterial strains was prepared in 10 mM of MgSO<sub>4</sub> with 0.5 mg/ml of ampicillin. The CFUs for the two strains used in the input were counted by plating the serial dilutions of the inoculums using the appropriate antibiotics so to distinguish the strains between them. Flies were then injected with the bacterial mixture. Ninety-six hours following infection, 8 flies were sacrificed according to the method described for the measurement of *in vivo* bacterial growth. Strain discrimination was then performed, using the appropriate antibiotics. Competitive index (CI) is defined as the CFU output ratio of the mutant strain when compared to the wild-type strain, divided by the CFU input ratio (inoculum) of the mutant over the wild-type.

#### **4.2.4.4 Results**

##### ***Burkholderia cepacia* complex does not kill *D. melanogaster* when fed to the fly**

Validating the fruit fly as an effective model in the study of the virulence of the Bcc species seemed promising because *Drosophila* was already being used successfully with other pathogenic bacteria. Pricking and feeding infections performed with *P. aeruginosa* are lethal to the flies and did allow the discovery of genes important to the virulence of the species (Chugani *et al*, 2001; D'Argenio *et al*, 2001; Lutter *et al*, 2008). Hence, several species from the Bcc were tested for their capacity to kill fruit flies following ingestion. Interestingly, *B. multivorans* LMG16660, *B. vietnamiensis* LMG 18835, *B. ambifaria* HSJ1, *B. pyrrocinia* LMG21824, *B. cenocepacia* LMG18830, *B. dolosa* LMG21819 and *B. stabilis* LMG18870 were all incapable of producing mortality during the trials (data not shown). Variables that could potentially have an influence on infection outcomes were then modified: flies were deprived of food and water for varying lengths of time (7 to 9 hrs) so to starve them. The incubation temperature was raised from 21°C to 25°C and the bacterial concentration on which flies were left to feed was doubled. Still, no difference regarding fly mortality was obtained: the flies were not killed by Bcc bacteria using this method.

### **Fly pricking is effective at generating a mortal infection**

Given that feeding the flies with Bcc strains did not produce any mortality, assays with another method of infection were conducted. The pricking (sometimes called *nicking* –Lutter *et al*, 2008) of *Drosophila* with a needle dipped in a bacterial suspension has proven effective with several microorganisms other than *P. Aeruginosa* (Schneider et Shahabuddin, 2000 ; Boulanger *et al*, 2001 ; Dionne *et al*, 2003 ; Mansfield *et al*, 2003 ; Apidianakis *et al*, 2004).

Figure 11 shows survival curves for *D. melanogaster* when challenged with *B. cenocepacia* K56-2 on three different assays, each performed in triplicate. Results demonstrate that the method can reveal fly killing by a Bcc strain with effectiveness. It also shows that it is highly reproducible and accurate.

Pricking experiments uncovered differences in terms of virulence between the Bcc species and strains, allowing discrimination between strains of one particular species but also between all the Bcc species. For instance, flies were infected with five different strains of *B. cenocepacia*. Figure 12 shows that variability in infectious capacity can be seen between strains of the same Bcc specie.

A number of other Bcc species were then tested (Fig. 13). *B. cepacia* LMG1222, *B. cepacia* LMG18821, *B. ubonensis* LMG20358 and *B. pyrrocinia* LMG21824 were found to be the most virulent among the tested strains. They killed 100 % of the flies within 3 days whereas *B. multivorans* LMG16660 and *B. dolosa* LMG21819 sit at the other end of the pathogenicity spectrum and seem poorly virulent. Interestingly, the other tested *B. dolosa* strain, LMG21443, was found to be slightly more virulent than LMG21819 but still took more than 12 days to kill only 40% of the flies. All the remaining Bcc strains produce *Drosophila* mortality curves between these two lethality endpoints.

### ***Drosophila* mortality correlates with bacterial growth and persistence *in vivo***

In order to verify if bacteria were present throughout the infections in pricked flies, bacterial survival *in vivo* was measured for three Bcc strains: *B. cenocepacia* LMG18830, *B. cenocepacia* K56-2 and *B. cepacia* LMG18821. Figure 14 demonstrates that every strain tested was capable of colonizing the fly and able to replicate inside the host, although with different rates. Experiments conducted with *B. cepacia* LMG18821 highlight a clear correlation between the replication rate of the bacteria and the mortality rate of the flies. The strain killed flies much



faster than *B. cenocepacia* LMG18830 or K56-2 did: all infected flies died in less than 120 hours whereas approximately 40% of the animals for K56-2 and 70% of them for LMG18830 were still alive at that time during infection. Analyses of *in vivo* persistence results reveal that although CFU for the three strains measured one hour post infection were all equivalent, it only took one day for *B. cepacia* LMG18821 CFU to reach  $10^6$  CFU. Approximately six days were needed for LMG18830 to reach the same CFU number in the flies. Strains that displayed slower *in vivo* growth rates also killed flies more slowly.

These experiments also show that mean starting inoculums can be measured and are relatively similar from one experiment to the other. One hour post infection,  $4.55 \times 10^4 \pm 2.73 \times 10^4$  CFU per fly were recovered for *B. cenocepacia* LMG18830 while it was  $4.63 \times 10^4 \pm 3.15 \times 10^4$  CFU per fly for *B. cenocepacia* K56-2 and  $1.73 \times 10^4 \pm 8.26 \times 10^3$  CFU per fly for *B. cepacia* LMG18821.

*In vivo* persistency and growth were also confirmed for *B. multivorans* LMG16660 (data not shown); although the strain did not kill *Drosophila* within the time frame of the experiment, CFUs were still recovered on day 8 following septic injury.

### **Fly mortality when infected with Bcc mutants**

Since pricking assays revealed conclusive, mutants of *B. cenocepacia* strain K56-2 previously reported to have reduced virulence towards mammals and no growth defect<sup>8</sup> were tested in the fly. While the *zmpA* mutant clearly proved to be less pathogenic to the fly than the wild-type strain, no significant difference could be observed with *zmpB* (Fig. 15A). Infections performed with the *zmpA-zmpB* double mutant produced a survival curve very similar to the one obtained with the *zmpA* mutant: both being significantly less virulent than the parental strain. According to the pricking experiments, quorum sensing *cepR* or *cepI* mutants did not yield different *Drosophila* survival curves and were therefore as virulent as the wild type strain (Fig. 15B). Trials conducted with the *bscN* mutant did show a partial difference in fly mortality pattern when compared to the parental strain (Fig. 15C). This experiment, done in triplicate, was repeated on two occasions and each time produced similar results: a subtle pathogenicity lag for the *bscN* mutant about mid-time post-infection. As it was the case with *zmpB*, *cepR* or *cepI*

---

<sup>8</sup> La courbe de croissance de ces mutants peut être trouvée à la section 4.2.5.

mutants, RSF12 and RSF13 (Fig. 15D) did not show significant differences with the results obtained with the parental strain and were all equally virulent to K56-2.

### **Competitive index assays**

In order to provide enhanced sensitivity and discriminating power to the fly mortality tests, competitions assays were performed. Most of the time, virulence will be evaluated in terms of lethality: an all-or-none outcome. However, damage to the host and illness are not absolute outcomes (Casadevall & Pirofski, 2001). The competitive index assays therefore provided extra information : the capacity of a mutant strain to compete against the wild type strain *in vivo*. They were shown to be highly replicable from one experiment to the other. Figure 16A shows three independent tests performed with *zmpA* mutants that all produced very similar mean indices. For most assays, the variability between individual indices was in fact less than 1 log.

In every case, mean CIs were all below 1 which indicates that tested mutant strains were less competitive *in vivo* when compared to their parental strains. The double mutant *zmpAB* was shown to be less competitive than the single mutant *zmpA* which in turn had a lower CI than the *zmpB* mutant. In contrast with the mortality assays (Fig. 15) the CI exposed the weakness of the *bscN* mutant, which actually proved even less competitive than the double mutant *zmpAB*.

The strain SAL1 is defective in the expression of *hldA* and *hldD* genes. These codes for enzymes involved in the synthesis of complete lipopolysaccharide core oligosaccharides. Such mutations make the cells more sensitive to various antimicrobial peptides (Loutet *et al*, 2006). This strain produced the lowest CI, with an extremely low mean result of 0.005.

#### **4.2.4.5 Discussion**

##### ***Drosophila* infection outcomes with various Bcc species are concordant with results achieved in other infection models**

In this work, we have investigated the potential of *D. melanogaster* as an infection model for several pathogenic Bcc strains. Our results reveal that this host allows the discrimination between the different strains tested. However, when performing infections, an organism will have to fulfill several other criteria in order to be a suitable alternative model. Among others, results will need to be comparable with what has been previously published. Overall, all the Bcc strains

tested in the fly pricking assays yielded similar results to those obtained with alternative or murine hosts.

*B. stabilis* LMG18870, *B. ambifaria* Cep0996 and *B. vietnamiensis* LMG18835 could be classified intermediate in their virulence towards the fly. These results are consistent with previous work on mammals, on alfalfa and *G. mellonella* (Bernier *et al*, 2003; Seed & Denis, 2008 ); the only exception being *B. ambifaria* Cep0996, scoring 3 on 3 in pathogenicity tests conducted with *C. elegans* (Cardona *et al*, 2005). *B. cenocepacia* LMG 18830, also of moderate virulence in the *Drosophila*, mouse and wax moth models, produced however very different infection outcomes in alfalfa (pathogenic) and *C. elegans*, (non lethal).

*B. dolosa* strain LMG21819, which was avirulent in flies, was also avirulent in *C. elegans* (Cardona *et al*, 2005) while strain LMG621443, more pathogenic to flies, had a LD<sub>50</sub> of 40,000 in *Galleria mellonella* (Seed & Denis, 2008) and a pathogenicity score of 2 on 3 with *C. elegans* (Cardona *et al*, 2005). *B. cenocepacia* strains J2315 and K56-2 were found to be comparable in their virulence towards *Drosophila*, killing gradually all the flies within 300 hours. Their pathogenicity was also very similar in the rat model (Bernier *et al*, 2003).

*B. multivorans* LMG16660 was unable to kill the flies with both pricking and feeding methods of infection. These results are comparable to work done with alternative host-models. For instance, no or very little mortality was observed with *C. elegans* (Cardona *et al*, 2005) or with alfalfa (Bernier *et al*, 2003) even when several strains of the specie were tested. Experiments with *B. multivorans* strains C5393 and C1376 were performed on rat agar bead model (Bernier *et al*, 2003) and the animals once again showed very little signs of pathology. In this case, it was assumed to be because of a lower ability of the microorganism to grow in its host. However, according to our results, poor growth or persistency of the strain cannot explain the lack of pathogenicity from *B. multivorans* towards flies. Experiments performed on *Panagrellus redivivus*, a nematode capable of surviving several days at 37°C revealed that 3 of the 4 *B. multivorans* strains tested were able to kill the model at 37°C compared to only 1 at 25°C (Laws *et al*, 2005).

*B. cepacia* strains used here came from different sources (one was first isolated from onions while the other is a clinical strain) and yet, both were among the most virulent strains in the fly pricking model. These results are similar to what has been obtained with other hosts, murine or alternative models alike (Bernier *et al*, 2003; Seed & Denis, 2008). Interesting parallels

can be drawn with *B. pyrrocinia* or *B. ubonensis* as well. Both strains killed flies in less than 75 hours, hence being among the most lethal to flies. These results, also verified in the *C. elegans* model (Cardona *et al*, 2005), raise the question whether or not the source of origin really matters virulence is involved: *B. ubonensis* LMG20358 was isolated from the soil while *B. pyrrocinia* LMG21824 was recovered from a cystic fibrosis patient.

### ***B. cenocepacia* mutants with reduced virulence in other models produce similar results in the fly**

A functional alternative infection model should allow discrimination between virulent and avirulent bacterial strains. Tests conducted with mutants displaying reduced virulence in other model were thereby performed.

The *cepl* and *cepR* genes are part of a quorum-sensing system widely found in Bcc strains. These genes regulate the expression of various virulence factors (Lewenza *et al*, 1999; Sokol *et al*, 2003). Both *cepl* and *cepR* mutants have shown a decrease in mean percentage of lung inflammation in the rat agar bead infection model when compared to an infection done with the wild type strain K56-2 (Sokol *et al*, 2003). The slight difference was however only observed after 10 days of infection. In our study, no difference in *Drosophila* mortality was observed between those mutants and the K56-2 wild type strain when injected in the fly. Interesting results came up in a recent *P. aeruginosa* study where all wild-type strains killed the flies when injected even though one of them, strain PA103, lacked a functional quorum-sensing system (Lutter *et al*, 2008). It therefore seems reasonable to question whether or not QS is in fact important for septic lethality.

The *zmpA* gene is responsible for the production of a zinc metalloprotease involved in the cleavage of gelatin and of several types of human collagen (Kool *et al*, 2005). Some *Burkholderia* species are also capable of producing a second protease, with different cleavage possibilities. They are both regulated by two quorum-sensing systems: CepIR and CcIR. The *zmpA*<sup>-</sup> mutant proved to be less virulent in a rat chronic respiratory infection model (Corbett *et al*, 2003), as were also the *zmpB* and the double mutant *zmpAzmpB* (Kooi *et al*, 2006). As shown here, similar results were observed with the *Drosophila* pricking assays performed with *zmpA* and *zmpAB* mutant strains. However, infections done with the *zmpB* mutant did not show a reduced pattern of mortality when compared to the wild type K56-2 strain. Kooi and colleagues

have reported that ZmpB is only active when the temperature reaches 28°C (Kooi *et al*, 2006). Since our pricking experiments were conducted under a controlled temperature of 25°C, this could explain the difference of virulence between the three mutants. Nevertheless, if the *zmpB*-mutant could not be differentiated from its parental strain during the pricking experiments, CI results revealed that the mutant is in fact less competitive. Thus, *zmpB* might not be essential for killing its host, but it is beneficial for *in vivo* survival. It was also hard to differentiate the *Drosophila* survival curves of *zmpA* from those of the double mutant *zmpAzmpB*. CI assays unravelled the difference between the strains: as expected, the double *zmpAzmpB* mutant proved less competitive than the single *zmpA* or *zmpB* mutants.

BscN is a Type III secretion system ATP-binding protein that likely generates energy for the secretion of effectors into host cells. In the mouse agar bead model, CFU recovered from the lungs and spleens were significantly lower for *bscN* mutants (Tomich *et al*, 2003). Studies using *B. cenocepacia* H111 and *bscN* mutant gave mixed infection outcomes when performed on *C. elegans* (Markey *et al*, 2006). Our results are in accordance with those published so far: pricking infections with the *bscN* mutant only produced minor differences in *Drosophila* mortality. However, the CI tests shed more light on the importance of *bscN*, as a mutant proved less competitive than WT K56-2.

HtrA is a protease that is highly conserved in bacteria and mammals. It is required for survival during environmental stress and is also known to be involved in virulence of *B. cenocepacia* (Flannagan *et al*, 2007). It is encoded by a six-gene operon that also codes for a two-component regulatory system. *B. cenocepacia* mutant strain RSF12 lacks one component of the system, the BCAL2831 gene, whereas strain RSF13 lacks gene BCAL2829 coding for the HtrA protease. Experiments performed on rat agar bead model showed a RSF13 mutant could not survive *in vivo* during lung infections (Flannagan *et al*, 2007). In fact, in this study, conclusions were based on competitive indices where both RSF12 and RSF13 could not compete against the parental strain K56-2 and were completely cleared by the rats. It was also proven that such mutants were not sensitive to antimicrobial peptides or to oxidative stress, which could therefore not explain their clearance in the animals. *Drosophila* survival experiments showed no difference for RSF12 or RSF13 in regards to the virulence of the wild-type strain. However, CI assays were then performed for RSF12 and produced results that were in concordance with those previously reported for rats.

The CI obtained from experiments conducted with the SAL1 mutant indicated a dramatic defect for in vivo survival. Results on the rat agar bead model of chronic lung infection showed a reduced infectious capability (Loutet *et al*, 2006). The rats had in fact completely cleared the mutant two weeks after infection.

### **Potential and limitations of the *Drosophila* model**

Several pathogens release virulence factors only above particular temperatures. Unlike *G. mellonella* or the murine model, both *D. melanogaster* and *C. elegans* cannot survive very long at 37°C (Mylonakis & Aballay). This could potentially represent a drawback for the fruit fly as a host-model because *Drosophila* experiments are normally performed at temperatures of 21°C or 25°C. Studies with *S. typhimurium* have however been conducted before at temperatures as high as 29°C (Brandt *et al*, 2004); and although the fly's life expectancy was somewhat shortened by the high temperature, it still showed a great difference between the mock and the true infection.

Results obtained in this study clearly demonstrate the validity of the *Drosophila* pricking models in the study of Bcc strain virulence. As well as being a powerful tool for discriminating avirulent from pathogenic bacterial strains, *D. melanogaster* can enhance our comprehension of innate immunity and host responses. The sequenced genome of the fly allows microarrays experiments to be performed (Vodovas *et al*, 2004). Fluorescent proteins, such as GFP, have also been used before to monitor *P. aeruginosa* (Fauvarque *et al*, 2002; Sibley *et al*, 2008), *E. coli* (Elrod-Erickson *et al*, 2000), *S. marcescens* (Nehme *et al*, 2007) and *S. typhimurium* (Brandt *et al*, 2004) proliferation in the fly among others, but also to follow the expression of its immunity factors (Dionne *et al*, 2003; Tzou *et al*, 2002). Such techniques could well be applied to the study of Bcc strains.

Sibley and colleagues (2008) recently reported infection outcomes when *D. melanogaster* was infected concomitantly by *Pseudomonas aeruginosa* as well as bacteria from the CF airways microflora. They discovered that some strains, non-pathogenic on their own, became infectious when in presence of *P. aeruginosa*. Knowing that mostly no environment is colonized by only one bacterium species, *Drosophila* opens an exciting door into polymicrobial interactions investigations with the different Bcc strains.

#### ***4.2.4.6 Acknowledgments***

The authors would like to thank Dr Pamela Sokol (University of Calgary) and Dr Miguel Valvano (University of Western Ontario) for providing bacterial strains and mutants. Oregon R flies were kindly provided by Dr Yiorgos Apidianakis and Dr Laurence Rahme (Massachusetts General Hospital, Harvard), and by Paul Lasko (McGill University). This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Operating grant MOP-77642 to ED. JCV received a M.Sc. scholarship and LV a postdoctoral fellowship both from the Fondation Armand-Frappier.

**Tableau 4.** *Burkholderia cepacia* complex strains

Strains	Source and location	References
<i>B. cepacia</i> (gen. I) LMG1222	Onion, USA	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. cepacia</i> (gen. I) LMG18821	CF, Australia	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. multivorans</i> (gen. II) LMG16660	CF, UK	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. cenocepacia</i> (gen. III) J2315	CF, UK	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. cenocepacia</i> (gen. III) LMG18830	CF, Australia	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. cenocepacia</i> (gen. III) LMG19240	Wheat, Australia	(Vandamme <i>et al</i> , 2003)
<i>B. cenocepacia</i> (gen. III) LMG18829	CF, USA	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. cenocepacia</i> (gen. III) K56-2	CF, Canada	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. stabilis</i> (gen. IV) LMG18870	CF, Canada	(Mahenthiralingam <i>et al</i> , 2000)
<i>B. vietnamiensis</i> (gen.V) LMG22486	Water treatment, USA	(Nelson <i>et al</i> , 1987)
<i>B. vietnamiensis</i> (gen.V) LMG18835	CF, USA	(Nelson <i>et al</i> , 1987)
<i>B. dolosa</i> (gen.VI) LMG21819	CF, USA	(Coenye <i>et al</i> , 2003)
<i>B. dolosa</i> (gen.VI) LMG21443	Root, Senegal	(Coenye <i>et al</i> , 2003)
<i>B. ambifaria</i> (gen. VII) HSJ1	CF, Canada	(Vial <i>et al</i> , 2007)
<i>B. ambifaria</i> (gen. VII) CEP0996	CF, Canada	(Coenye <i>et al</i> , 2001)
<i>B. ambifaria</i> (gen. VII) AU0212	CF, USA	(Coenye <i>et al</i> , 2001)
<i>B. pyrrocinia</i> (gen. IX) LMG21824	CF, UK	(Coenye <i>et al</i> , 2003)
<i>B. ubonensis</i> (gen. X) LMG20358	Soil, Thailand	(Yabuuchi <i>et al</i> , 2000)

For *B. cepacia* complex strains, genomovar status is indicated in parentheses.

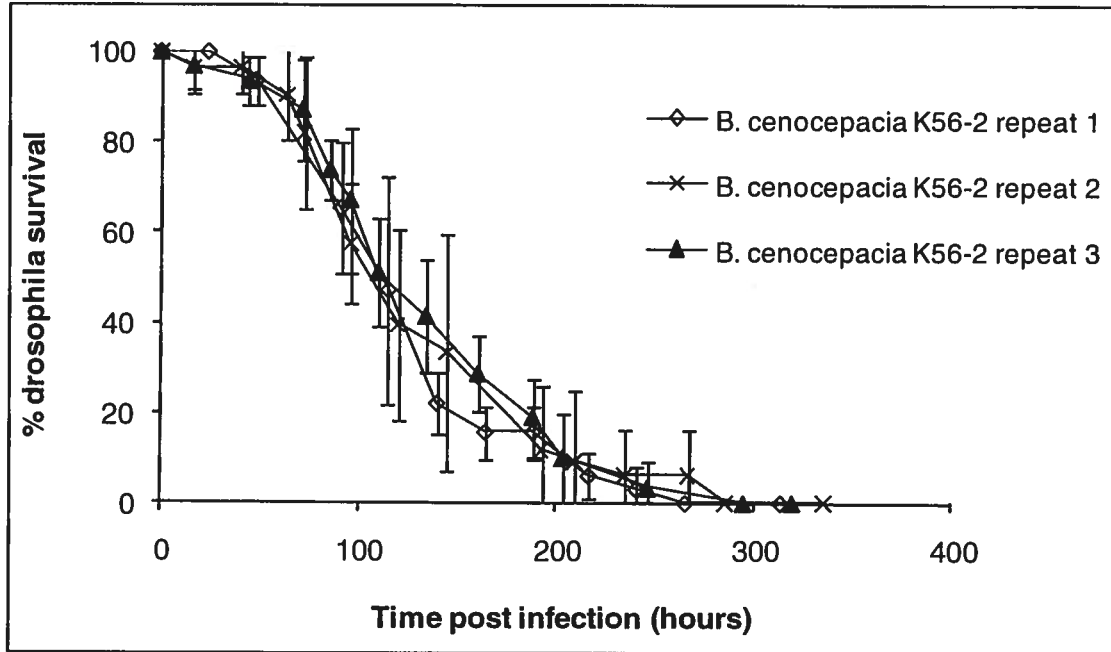
<i>B. cenocepacia</i> K56-2	wild-type	
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 <i>zmpA</i>	<i>zmpA::tp</i> ; Tp <sup>f</sup>	(Corbett <i>et al</i> , 2003)
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 <i>zmpB</i>	<i>zmpB::tp</i> ; Tp <sup>f</sup>	(Kooi <i>et al</i> , 2006)
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 <i>zmpA zmpB</i>	<i>zmpA::tp</i> ; Tp <sup>f</sup> <i>zmpB::pKNOCK-Tet<sup>f</sup></i>	this study
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 <i>cepR</i>	<i>cepR::Tn5-OT182</i> , Tet <sup>f</sup>	(Lewenza <i>et al</i> , 1999)
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 <i>cepl</i>	<i>cepl::pKNOCK-Tet<sup>f</sup></i>	this study
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 <i>bscN</i>	<i>bscN::pKNOCK-Tet<sup>f</sup></i>	this study
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 SALI	<i>hldA::tp</i> ; Tp <sup>f</sup>	(Loutet <i>et al</i> , 2006)
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 RSF12	BCAL2831::pRF103, Tp <sup>f</sup>	(Flannagan <i>et al</i> , 2007)
<i>B. cenocepacia</i> K56-2 RSF13	<i>htrA::pRF109</i> , Tp <sup>f</sup>	(Flannagan <i>et al</i> , 2007)



**Tableau 5.** Primers used in this study

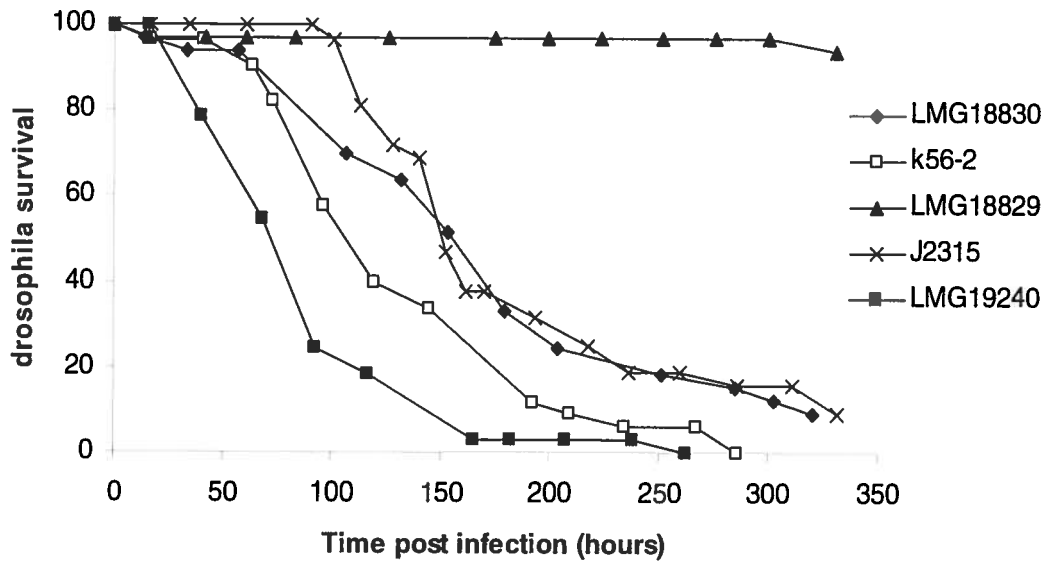
Primer	Primer sequence (5'-3') <sup>a</sup>
cepIF	GGGGT <u>TACCCC</u> AGTTTCGAGCGTGACCAGTT
cepIR	GCTCTAGAGCAGACGCCCATCTACCTGCT
bcscNF	GGGGT <u>TACCCC</u> CGGAATTCATCGAGCACAG
bcscNR	GCTCTAGAGCAGCTCGATCTCCTGGTA
zmpBF	GGGGT <u>TACCCC</u> CGCCGTGAACGTGTACTACCA
zmpBR	GCTCTAGAGCCTTCAGGAACGCCTTGTC

<sup>a</sup> Restriction sites designed into the primers are underlined.

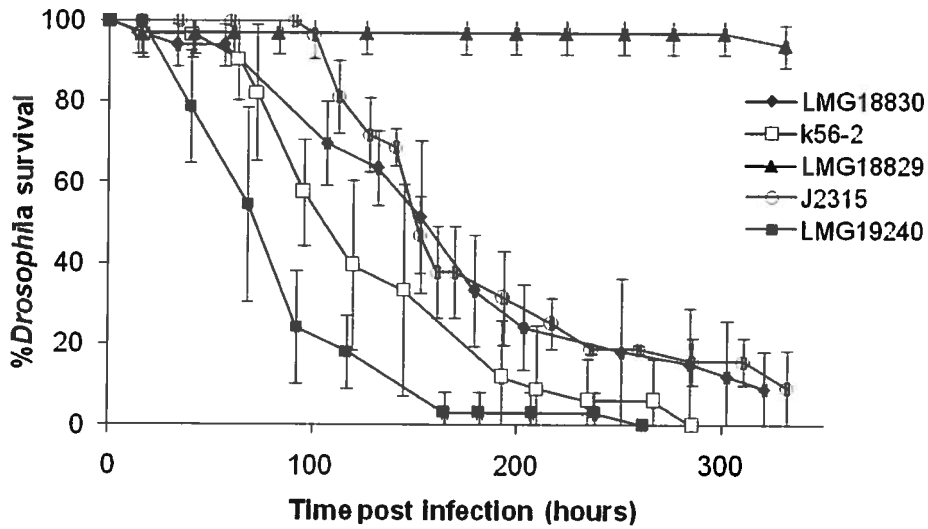


**Figure 11:** Survival curves for *D. melanogaster* flies challenged with *B. cenocepacia* K56-2. Error bars represent standard deviation (SD).

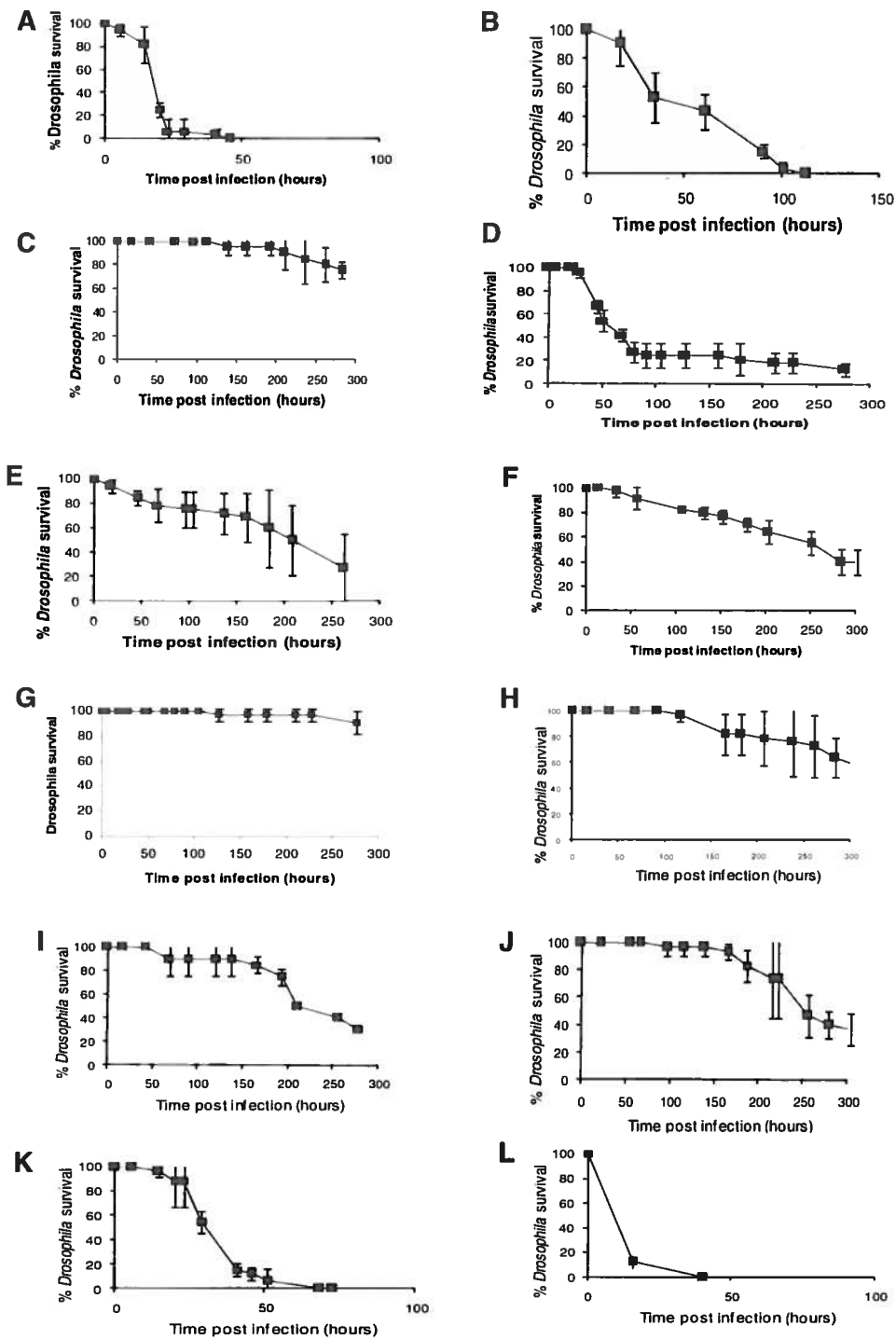
A



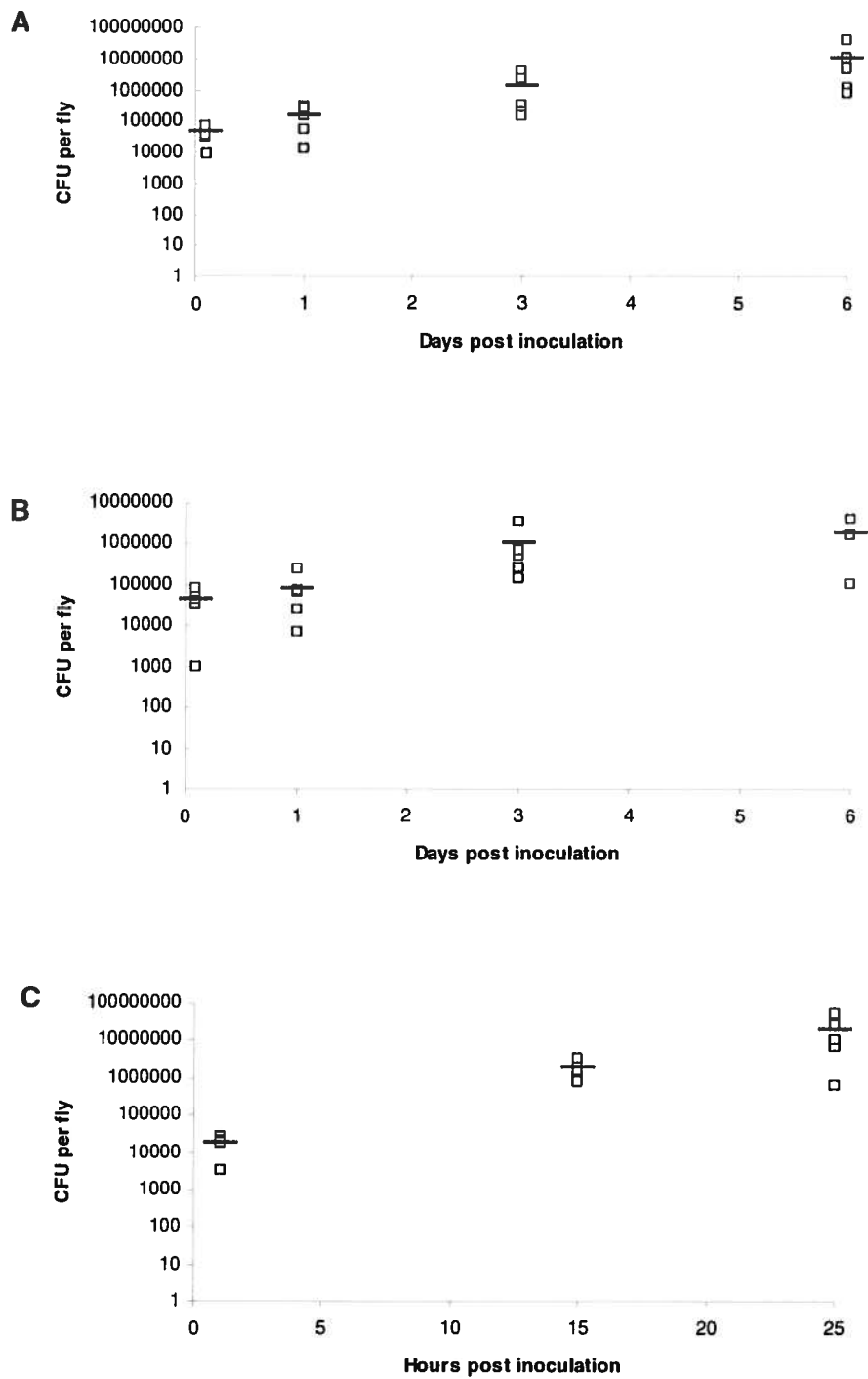
B



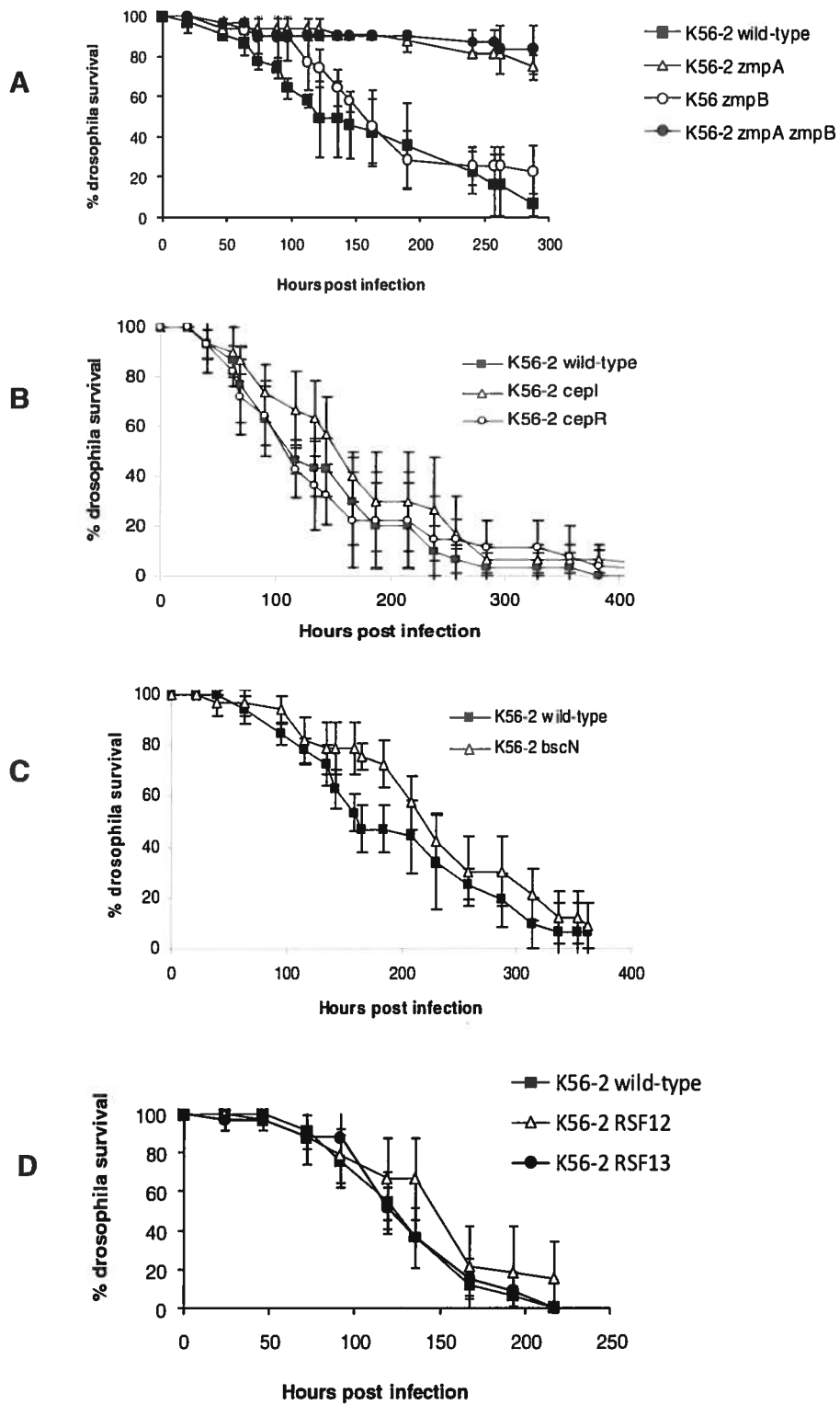
**Figure 12.** Survival curves for *D. melanogaster* when infected with *B. cenocepacia* strains in A, and in B with error bars that represent standard deviation (SD).



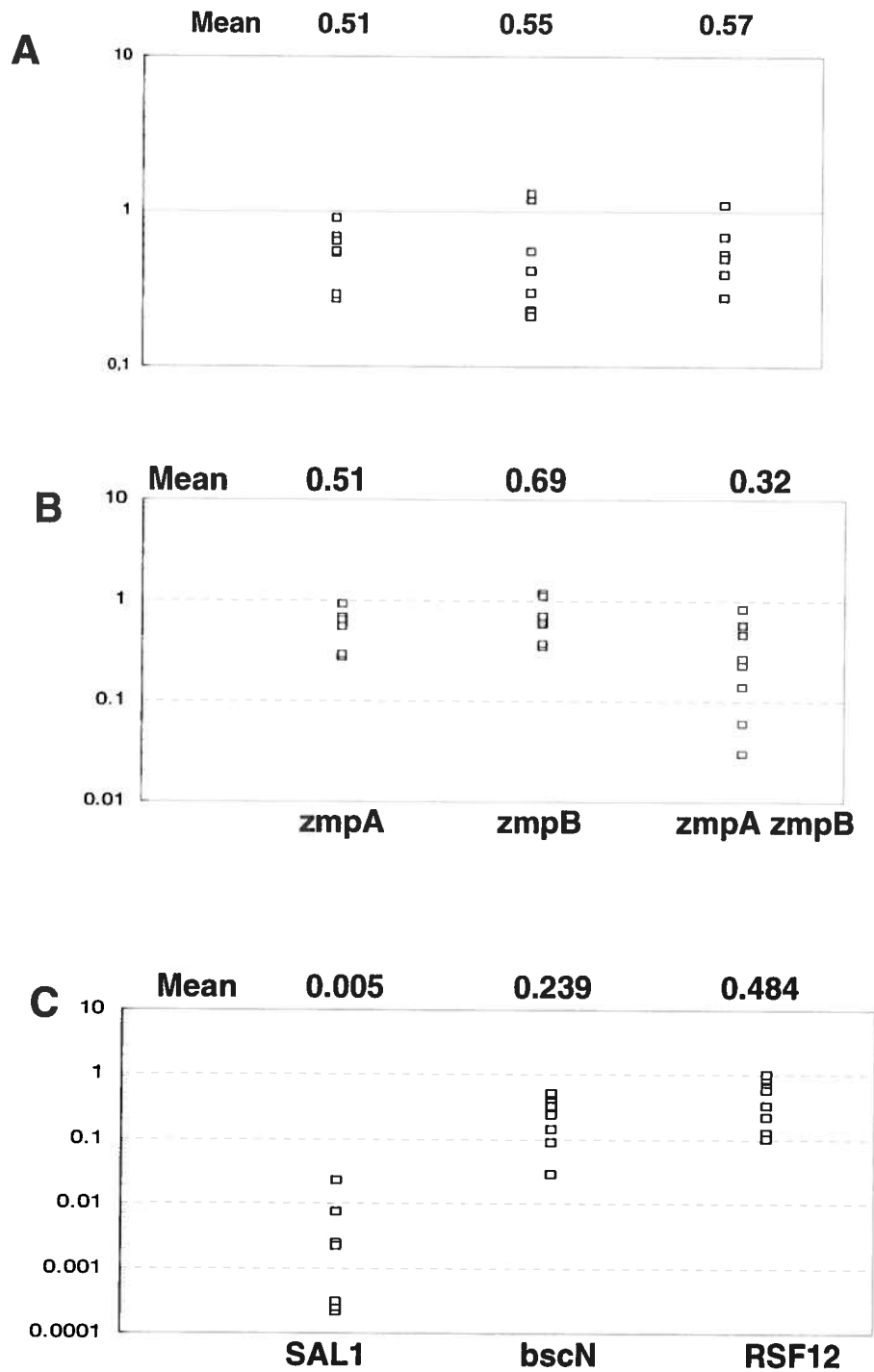
**Figure 13.** Survival curves for *D. melanogaster* when infected with strains from the Bcc. **A:** *B. cepacia* LMG1222, **B:** *B. cepacia* LMG18821, **C:** *B. multivorans* LMG16660, **D:** *B. stabilis* LMG18870, **E:** *B. vietnamiensis* LMG22486, **F:** *B. vietnamiensis* LMG18835, **G:** *B. dolosa* LMG21819, **H:** *B. dolosa* LMG21443, **I:** *B. ambifaria* AU0212, **J:** *B. ambifaria* CEP0996, **K:** *B. pyrrocinia* LMG21824, **L:** *B. ubonensis* LMG20358.



**Figure 14:** Relative bacterial load of flies infected with different Bcc species over time. **A:** *B. cenocepacia* LMG18830, **B:** *B. cenocepacia* K56-2, **C:** *B. cepacia* LMG18821



**Figure 15:** Survival curves for *D. melanogaster* when infectect with Bcc mutant strains.

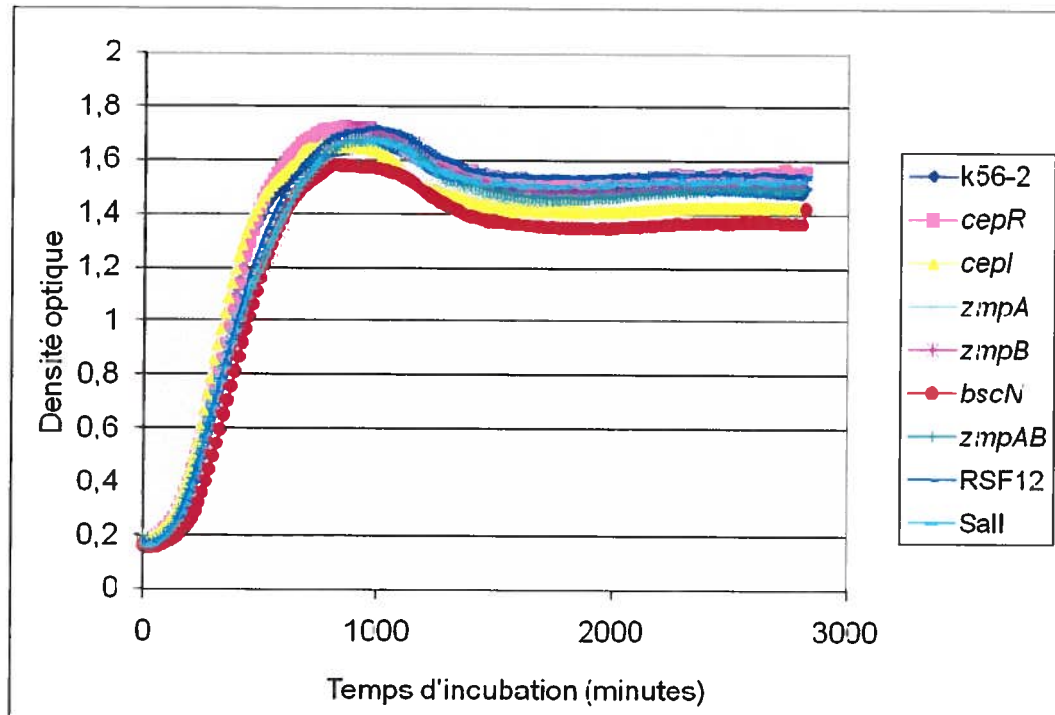


**Figure 16:** Competitive indices.

**A:** *zmpA* mutant performed on 3 independent assays; **B:** *zmpA*, *zmpB* and *zmpAB*; **C:** SAL1, *bscN* and RSF12.

#### 4.2.5 Figure additionnelle

Cette figure n'est incluse dans l'article.



**Figure 17.** Courbes de croissance des mutants utilisés pour l'article, obtenues avec un Microbiology Bioscreen C Reader (Oy Growth Curves Ab Ltd).



### ***4.3 Identification des facteurs pouvant influencer l'infection***

#### **4.3.1 Le cycle de lumière**

Une étude sur l'effet du cycle de lumière sur les courbes de mortalité des drosophiles lors d'une infection bactérienne fut publiée en février 2008 (Lee et Edery, 2008). Cette section du projet fut donc abandonnée. Les conclusions de l'étude de Lee et Edery, réalisée avec *P. aeruginosa* souche PA14, démontraient en effet que le taux de survie des drosophiles infectées par ce microorganisme variait en fonction du moment dans la journée (et donc de la lumière) où se déroulait l'infection.

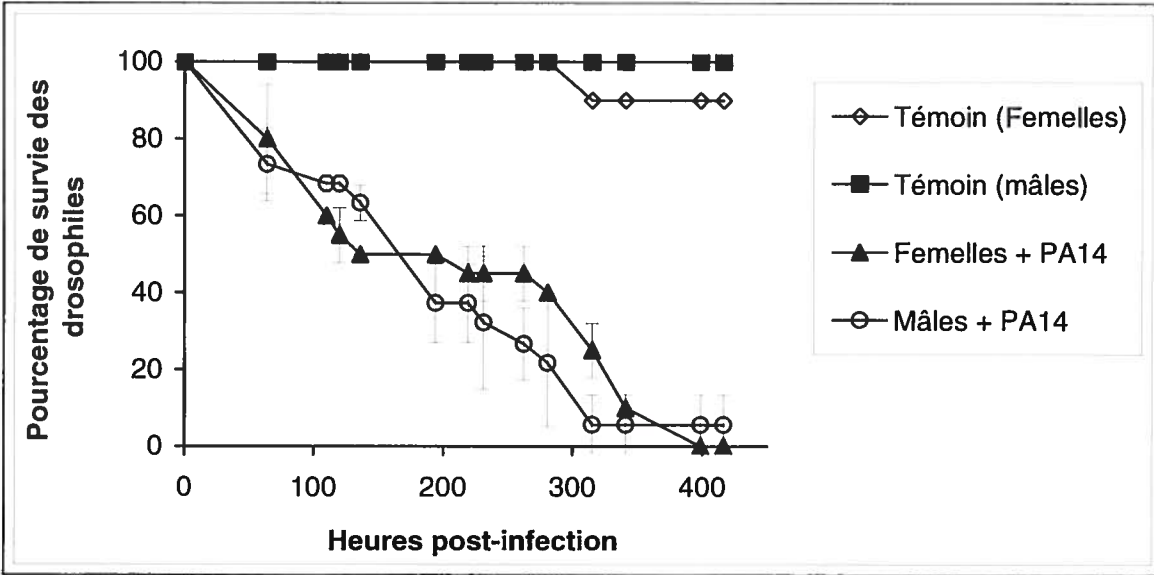
#### **4.3.2 Le durée du jeûne**

Des travaux ont démontré qu'une forte corrélation négative existe entre la distribution spatiale naturelle de *D. melanogaster* et l'abondance de bactéries dans un milieu nutritif donné (Oakeshott *et al*, 1989). Il est ainsi possible de penser que les drosophiles mangeront davantage de bactéries lors d'une infection par ingestion si elles sont affamées, puisque les bactéries ne font pas partie de leur régime alimentaire normal.

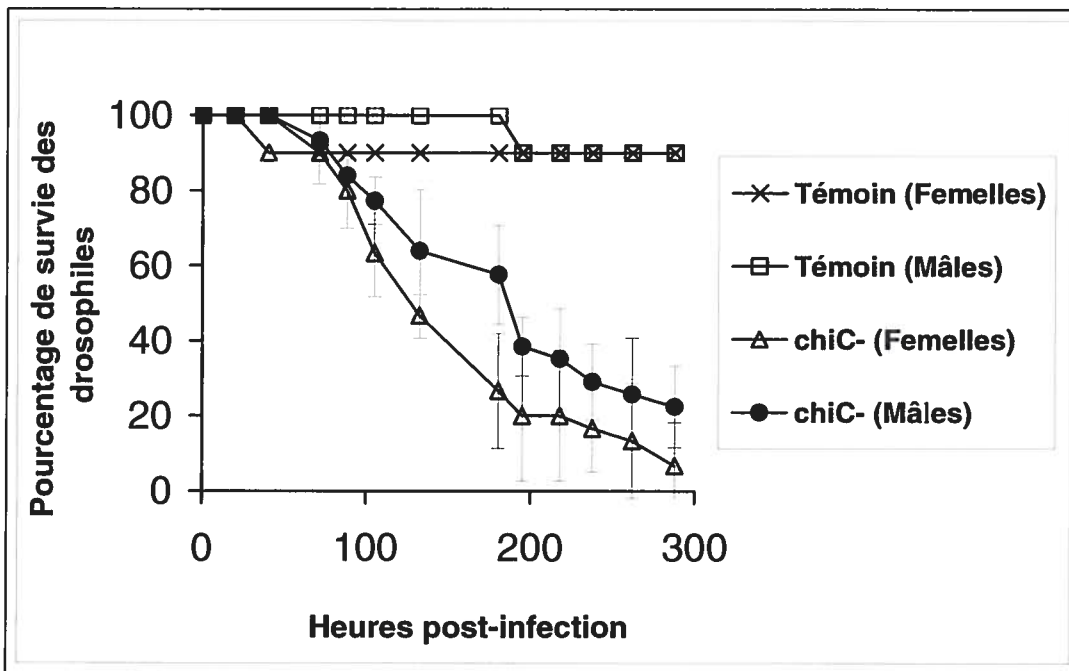
J'ai réalisé des tests afin de déterminer le nombre maximal d'heures sans nourriture ni eau auquel pouvaient survivre les drosophiles adultes. Ce nombre varie de 28 à 45 heures, moment auquel toutes les mouches à fruit meurent. Ces résultats confirment ceux de l'équipe de Harshman (Harshman *et al*, 1999). Cette section du projet reste à être complétée. Des infections par ingestion où les drosophiles sont affamées avant d'être en contact avec l'agent pathogène sont par contre possibles. Ce temps de jeûne ne devra toutefois pas dépasser 45 heures. En effet, les drosophiles mourront affamées plutôt qu'à cause de l'infection.

#### **4.3.3 Le sexe et l'âge de l'animal**

L'effet de l'âge des drosophiles sur les courbes de mortalité n'a pas pu être testé par manque de temps. Plusieurs expériences sur l'effet du sexe des drosophiles furent par contre réalisées. La figure 18 illustre les courbes de mortalité d'infection par ingestion avec la souche sauvage PA14 de *P. aeruginosa*. La figure 19 montre quant à elle les résultats de mortalité obtenus avec un mutant *chiC*-.



**Figure 18.** Effet du sexe des drosophiles sur l'infection par ingestion de *P. aeruginosa* PA14. Drosophiles âgées de 14 jours et affamées 8 heures et maintenues à 25° C.



**Figure 19.** Effet du sexe des drosophiles sur l'infection par ingestion du mutant *chiC-* (système de sécrétion de type III). Drosophiles affamées 7 heures, âgées de 10 à 12 jours et maintenues à 25° C.

Dans les deux cas, aucune différence significative n'a pu être observée entre les courbes de mortalité des femelles et celles des mâles. Poursuivre les tests permettrait de confirmer cette observation. Ceci pourrait cependant avoir des répercussions majeures dans les manipulations reliées aux infections. En effet, éviter d'avoir à diviser les mâles des femelles permettrait une économie de temps non négligeable.

Les courbes de mortalité sont reproductibles d'un test à l'autre. En effet, elles sont similaires aux figures 9 et 18 lorsque l'infection est faite avec la souche sauvage PA14. À 300 heures post-infection, le pourcentage moyen de survie des drosophiles est de moins de 20% dans les deux cas. Les courbes réalisées avec le mutant *chiC*- (figure 9 et 19) permettent aussi d'affirmer que la méthode d'infection produit des résultats reproductibles. Les courbes obtenues avec ce mutant sont similaires et peuvent être superposées.

#### ***4.3.4 Le microbiote***

##### ***4.3.4.1 Le microbiote bactérien cultivable***

Puisque le microbiote des mammifères est connu pour jouer un rôle dans la protection des intestins contre la colonisation de bactéries pathogènes (Berg, 1996), j'ai voulu vérifier si la flore intestinale des drosophiles avait un effet sur les résultats d'infections par ingestion. Pour ce faire, il fallait toutefois caractériser celle-ci. Treize isolats paraissant différents sur géloses et milieux nutritifs liquides (section 3.6) ont donc été récupérés. Leur ADN a été extrait (section 3.7) puis l'amplification d'un fragment du gène codant pour l'ARNr 16S a été effectuée (section 3.9). Un DGGE (section 3.10) a ensuite été réalisé afin de visualiser la diversité bactérienne de ces isolats.



**Figure 20.** Diversité bactérienne du microbiote  
 DGGE à gradient dénaturant de 20 à 60% avec échelle dans le puits de gauche. Les bandes associées aux puits 1 à 13 correspondent à des amplicons de fragments du gène codant pour l'ARNr 16S de treize isolats paraissant différents sur géloses et milieux nutritifs liquides.

La figure 20 indique que les treize isolats correspondent en fait à deux espèces distinctes. Des échantillons représentatifs de cette variété ont ensuite été séquencés (section 3.12) afin de connaître à quelles espèces ils s'apparentent. Les isolats # 4, 5, 9, et 11 appartiendraient à l'espèce *Lactobacillus brevis* et les isolats # 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13 à *Lactobacillus plantarum* ou *pentosus*. Les pourcentages d'homologie avec les séquences des banques de données du NCBI étaient de plus de 99% pour chacun de ces isolats. Il est impossible de distinguer *L. plantarum* de *L. pentosus* selon leurs traits phénotypiques, ni par leurs gènes codant pour l'ARNr 16S, puisque ceux-ci ont un pourcentage d'homologie de plus de 99% (Bringel et al, 2001)<sup>9</sup>.

Les *Lactobacillus* sont des bactéries anaérobies facultatives associées à la fermentation des sucres en acide lactique. *L. plantarum* est souvent retrouvé dans les aliments fermentés et fait également partie de la flore intestinale des mammifères (Bringel et al, 2001).

<sup>9</sup> Il est par contre possible de les différencier facilement par analyse de séquences du gène *recA* (Torriani et al, 2001).

Quelques études furent publiées après les débuts du présent projet sur le microbiote de *D. melanogaster*. Corby-Harris *et al* (2007) publièrent ainsi les résultats de leur recherche sur la flore de *D. melanogaster* sauvages où plusieurs espèces des genres *Lactobacillus* et *Gluconobacter* furent isolées. Cox et Gilmore (2007) isolèrent eux aussi *L. plantarum* à partir de drosophiles de laboratoire. Près du tiers de tous les phylotypes découverts durant cette étude faisait partie du genre *Acetobacter* alors que les autres  $\alpha$ -protéobactéries appartenaient au genre *Gluconobacter*. Deux études collaboratives parurent ensuite à la fin de ce projet en 2008 et identifièrent 10 espèces bactériennes des intestins de drosophiles de laboratoire. Parmi celles-ci : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, 4 espèces du genre *Gluconobacter* et les autres appartenant au genre *Wolbachia* (Roh *et al*, 2008 ; Ryu *et al*, 2008).

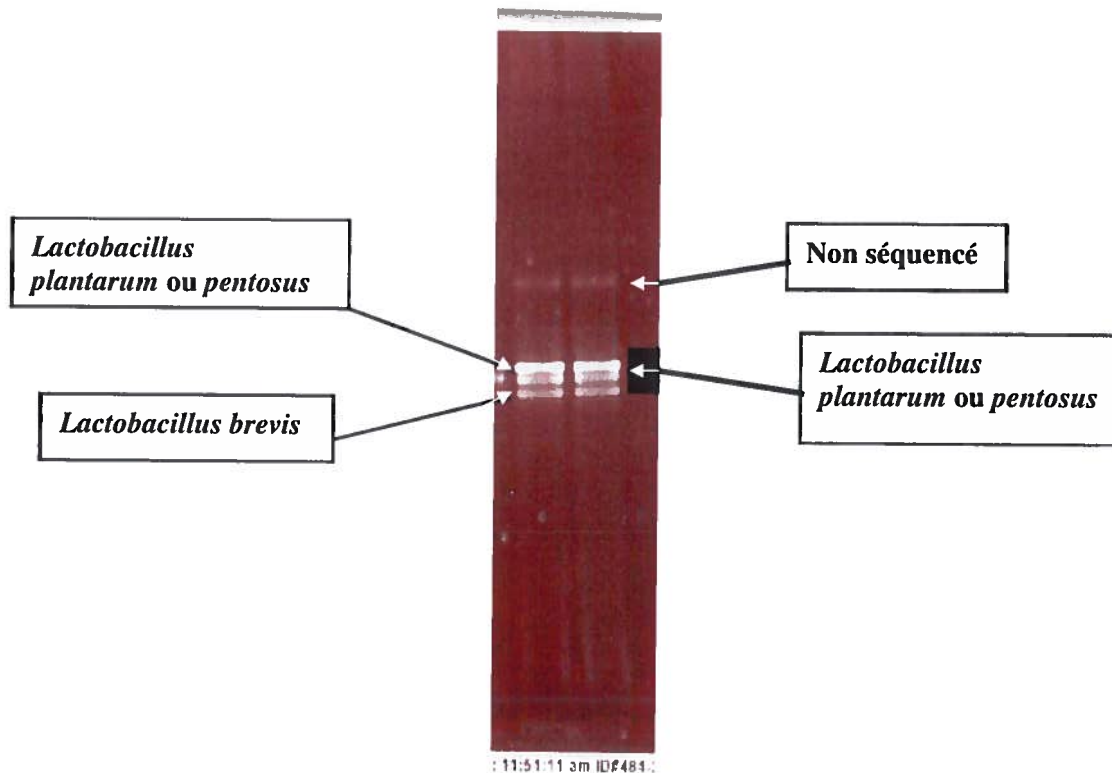
Afin d'être caractérisée comme faisant partie d'une microflore intestinale, une espèce bactérienne devra répondre à certains critères. En effet, cette espèce devra être capable de coloniser de façon stable l'intestin de l'animal. Un microorganisme ne pourra en effet faire véritablement partie de la flore intestinale s'il n'y est qu'en transit parce qu'il était présent dans la nourriture de l'animal. Une grande variation au niveau des microorganismes isolés à partir d'insectes pourrait donc indiquer que ces insectes ne dépendent pas d'espèces particulières pour leur nutrition, leur immunité ou leur digestion. L'identification répétée chez la drosophile de certaines espèces telles que les *Lactobacillus* permet cependant de penser que ces microorganismes sont des colonisateurs véritables de cet environnement intestinal

Puisque les espèces appartenant aux genres *Gluconobacter* ou *Acetobacter* peuvent transformer l'éthanol en acide acétique et qu'elles se retrouvent normalement dans les environnements riches en sucres, les isoler des drosophiles (ou de leur milieu nutritif) aurait été plausible. Ce sont cependant des microorganismes difficiles à cultiver (De Vero *et al*, 2006). Il est donc possible que les espèces appartenant à ces deux genres bactériens n'aient pas été capables de croître dans les conditions ou les milieux de croissance utilisés décrits en section 3,6. Aucune espèce de *Wolbachia* n'a non plus été isolée. Ce genre bactérien étant endosymbionte obligatoire, il ne se cultive donc pas sur des milieux de cultures standards (Dobson *et al*, 2002).

#### **4.3.4.2 Le microbiote bactérien non-cultivable**

Puisque seul un pourcentage restreint des microorganismes de l'environnement est cultivable (Amann *et al*, 1995), il est possible que des espèces bactériennes autres que celles isolées en 4.3.4.1 composent le microbiote des drosophiles, par exemple des espèces appartenant

aux genres *Gluconobacter*, *Acetobacter* ou *Wolbachia*. Des extractions d'ADN ont donc été réalisées sur des homogénats de mouches entières (section 3.7), puis les régions V3 du gène codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiées par PCR (section 3.9). Un DGGE (section 3.10) a ensuite été réalisé afin de visualiser la diversité possible du microbiote bactérien non-cultivable des drosophiles.



**Figure 21.** Diversité microbienne non cultivable.

Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant de 0 à 80%. Se trouve dans chacun des 2 puits les amplicons de fragments du gène codant pour l'ARNr 16S provenant de l'ADN total de mouches homogénéisées. Les amplicons liés à *D. melanogaster* souche sauvage CS sont dans le puits de droite alors que le puits de gauche contient les amplicons liés à la souche sauvage OR.

Les bandes liées à *L. brevis* et *L. plantarum/L. pentosus* ont encore une fois été identifiées. L'ADN des nouvelles bandes (par rapport à celles obtenues précédemment en section 4.3.4.1 avec l'ADN de microorganismes cultivés) apparaissant sur le DGGE (pointées à droite de la figure 21) a été extrait du gel de polyacrylamide, amplifié par PCR puis séquencé. Il n'a pas été possible d'amplifier l'ADN lié à la bande du haut du gel. Il est possible que l'excision de cette section du gel sous rayonnement UV ait dégradé en partie l'ADN de l'échantillon. La deuxième bande qui n'était pas présente sur le gel de la section 4.3.4.1 a toutefois pu être associée à *Lactobacillus plantarum* ou *L. pentosus*. Tel que mentionné dans la section précédente, les espèces *L. plantarum* et *L. pentosus* ne peuvent être différenciées par leurs gènes codant pour l'ARNr 16S lorsqu'une analyse de leur séquence est effectuée dans les bases de données. Cependant, le fait d'obtenir deux bandes détectables dans le gel permet d'affirmer que deux souches différentes ont été isolées du microbiote des drosophiles. Il ne pourrait pas, dans ce cas, s'agir de deux gènes d'ARNr 16S différents pour une même espèce bactérienne. En effet, les profils obtenus à la figure 20 démontre qu'une seule bande apparaît sur le gel lorsqu'on amplifie ce gène, alors qu'il provient d'un isolat de *Lactobacillus plantarum* ou *pentosus* et qu'on le fait migrer sur DGGE. Il s'agirait donc de 2 amplicons appartenant chacun aux deux espèces.

Les amorces 341F-GC et 534R (Tableau 3) se trouvent dans des zones conservées du gène codant pour l'ARNr 16S. Elles permettent en fait de cibler un peu plus de 70% des séquences disponibles dans la banque de données *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>). Malgré cela, elles sont largement utilisées comme amorces pour les PCR ou les DGGE et sont donc dites *universelles* (Watanabe *et al*, 2001)<sup>10</sup>. Il semblerait donc que le microbiote bactérien de la population de drosophiles de notre laboratoire ne soit pas très diversifié.

Cox et Gilmore (2007) suggèrent que le système gastro-intestinal des drosophiles ne comporterait pas de sections anoxiques puisque la diffusion de l'oxygène n'y est nullement limitée. Ceci permettrait donc d'expliquer pourquoi aucun microorganisme strictement anaérobie n'a été isolé durant le présent projet. Les variations obtenues entre les études publiées à ce sujet pourraient être expliquées par le fait que si la flore intestinale des insectes est en partie présente dès la naissance, l'environnement et l'alimentation jouent aussi un rôle important quant à quel microorganisme aura accès à l'hôte.

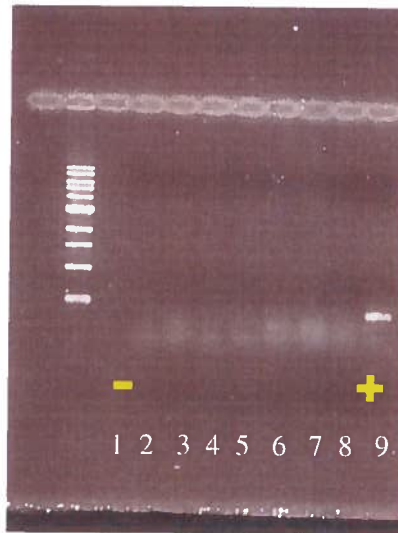
---

<sup>10</sup> Des améliorations aux amorces ont toutefois été proposées par Watanabe *et al* (2001) afin de tenir compte des divisions proposées au sein du domaine *Bacteria* depuis la publication de la séquence de ces amorces.



#### 4.3.4.3 Les mycètes

Il est connu que des eucaryotes (entre autres des protozoaires et des levures) font partie de la flore intestinale des termites. Compte tenu du peu d'études parues sur la drosophile, il fut ainsi vérifié si une telle flore composée de mycètes pouvait être présente chez *D. melanogaster*, ce qu'aucune autre étude n'avait rapporté.

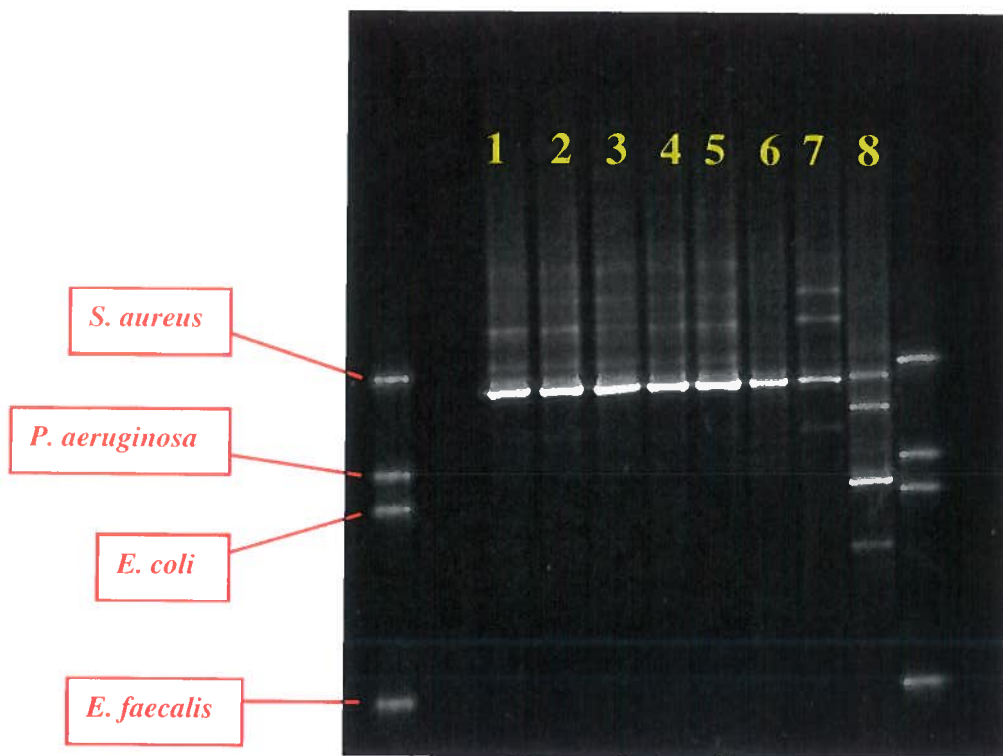


**Figure 22.** Vérification de produits PCR avec amorces FUN3 et FUN4. Ces amorces permettent de cibler tous les groupes taxonomiques majeurs des mycètes. Le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$ sty1 se trouve dans le puits de gauche. Le puits # 1 correspond au contrôle négatif alors que le puits # 9 correspond au contrôle positif (*Saccharomyces cerevisiae*). Les puits # 2 à 8 correspondent à des homogénats de drosophiles entières.

Des amplifications par PCR avec amorces ciblant tous les groupes taxonomiques majeurs des mycètes (Borneman et Hartin, 2000) ont été réalisées à partir d'ADN extrait d'homogénats de mouches entières. Aucun produit PCR n'a été révélé par la coloration du gel pour les sept échantillons d'homogénats testés (puits # 2 à 8, Fig. 22). Un témoin positif (*Saccharomyces cerevisiae*) a été utilisé dans le puits # 9 afin de s'assurer que l'amplification par PCR avait été fonctionnelle. Ainsi, le microbiote des drosophiles de notre laboratoire ne contiendrait donc pas de mycètes.

#### 4.3.4.4 Les autres eucaryotes

Des amplifications par PCR avec des amorces universelles ciblant tous les eucaryotes ont été réalisées à partir d'ADN extrait d'homogénats de mouches entières afin de cibler les eucaryotes autres que mycètes (ou ceux qui n'auraient pas été amplifiés par les amorces FUN 3 et FUN 4) qui pourraient faire partie du microbiote des drosophiles du laboratoire. Un DGGE a ensuite été réalisé afin de visualiser la diversité des eucaryotes potentiellement présents dans le microbiote des drosophiles.



**Figure 23.** Diversité des eucaryotes.

Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant de 30 à 60% avec échelle aux deux extrémités du gel. Les puits # 1 à 6 correspondent aux amplicons de fragments du gène codant pour l'ARNr 18S provenant d'homogénats de drosophiles entières. Le puits # 7 correspond à un homogénat de pattes seulement et le puits # 8 correspond quant à lui à la levure alimentaire utilisée dans le milieu nutritif des mouches à fruit.

Il était à prévoir que des bandes dans le gel correspondraient à l'ADN des drosophiles puisque les amorces utilisées amplifient des fragments du gène codant pour l'ARNr 18S. Afin de distinguer ces bandes de celles correspondant à un hypothétique microbiote d'eucaryotes, l'ADN de pattes de mouches à fruit a été extrait puis amplifié avec les mêmes amorces afin d'être visualisé au DGGE (Figure 23). Les échantillons des puits # 1 à 6 correspondent à l'ADN extrait de drosophiles complètes. Dans ces échantillons, la présence de plusieurs bandes pourrait indiquer qu'il y a eu amplification d'ADN de plusieurs espèces (en plus de celui des drosophiles). Il est cependant possible d'observer les mêmes bandes dans le puit # 7 correspondant à l'ADN de pattes de drosophiles seulement. L'ADN de chacune des 4 bandes de ce puits a d'ailleurs été extrait, amplifié puis séquencé afin de vérifier s'il pouvait appartenir à des espèces d'eucaryotes autres que *D. melanogaster*. Pour chacun de ces 4 échantillons, les pourcentages d'homologie avec les séquences de *D. melanogaster* des banques de données du NCBI ont été de 100%<sup>11</sup>. Le microbiote de la population de drosophiles de notre laboratoire ne semble donc pas compter d'eucaryote détectable par PCR. Le puits # 8 correspond quant à lui à la levure alimentaire utilisée dans le milieu nutritif des mouches à fruit. Chacune des bandes de ce puits correspond à *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agissait ici de vérifier que les bandes obtenues dans les autres puits ne correspondaient pas aux ingrédients du milieu nutritif des drosophiles.

#### 4.3.4.5 Axénisation des drosophiles

Le seul protocole d'axénisation de drosophiles, celui de l'équipe de Brummel (2004), stérilisait entre autres les embryons en surface. Les chorions (membrane la plus externe) d'embryons étaient ainsi dissous 2 minutes dans de l'hypochlorite de sodium 2,7%. Ces embryons étaient ensuite lavés deux fois à l'éthanol 70% puis deux autres fois à l'eau distillée. Cette méthode est cependant longue et laborieuse vu la petite taille des œufs. Une tentative de stériliser directement les larves, basée sur le protocole de stérilisation de larves de *Angiostrongylus vasorum* publié par l'équipe de Barçante (2002), fut ainsi testée. Selon cette méthode, les larves doivent être traitées avec du PBS stérile contenant 0,5% (v/v) d'hypochlorite de sodium durant 10 minutes puis rincées une dernière fois avec du PBS stérile. Ceci n'affectait

---

<sup>11</sup> Bien que le génome de *D. melanogaster* soit connu depuis 9 ans, certaines parties ne le sont toujours pas. C'est le cas des séquences reliées au gène codant pour l'ARNr 18S. Il est donc impossible de savoir si la drosophile possède plusieurs exemplaires de ce gène.

pas la viabilité des larves de *A. vasorum*. Cette méthode fut donc tentée sur des larves de drosophiles de troisième stade, sans toutefois être concluante. Les larves n'ont pas survécu à ce traitement malgré la réduction de l'exposition à l'hypochlorite de sodium à 5 min.

Un protocole de stérilisation des mouches adultes devait donc être développé. Celui de l'équipe de Brummel consistait à stériliser le milieu nutritif des drosophiles par irradiation et d'y ajouter 500 µg/ml d'ampicilline (action sur la paroi bactérienne), 50 µg/ml de tétracycline (action sur les ribosomes bactériens) et 200 µg/ml de rifampicine (blocage de l'ARN polymérase). Les drosophiles étaient maintenues sur ce milieu pour 2 générations. Afin de confirmer la disparition de leur microbiote, les drosophiles étaient homogénéisées puis étalées sur géloses LB (pour ce qui est cultivable) ou amplifiées par PCR avec des amorces ciblant une partie du gène 16S (amorces 149R et 8F). Il avait également été prouvé dans cette étude, que la diminution de longévité n'était pas due à la méthode d'axénisation, mais vraiment à l'absence de microflore. Une recherche plus approfondie, effectuée pour le présent projet, permis de découvrir que les amorces utilisées par cette équipe afin de confirmer l'axénisation de leurs mouches à fruit n'étaient pas universelles. En effet, si l'amorce 8F se trouve dans une zone conservée du gène codant pour l'ARNr 16S, tel n'est pas le cas de 149R. Ces deux amorces ne permettent en fait de cibler que 20 301 des 481 650 séquences disponibles dans la banque de données *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>), soit seulement 4,2% d'entre-elles. Il était ainsi impossible de confirmer que le traitement proposé par Brummel était efficace. Il fallait donc l'optimiser. Un nouveau protocole a été élaboré. Il a été décidé d'ajouter deux antibiotiques à la liste de Brummel *et al* : la triméthoprime (qui agit sur la synthèse de l'acide folique) et le chloramphénicol (qui agit comme la tétracycline sur les ribosomes) afin d'utiliser un cocktail aux cibles plus variées. Les concentrations de départ, celles proposées par Brummel, furent réduites de moitié puisque le nombre d'antimicrobiens choisis était plus grand.

Un antifongique, le cycloheximide en concentration de 250 µg par ml, a également été utilisé afin d'enrayer les mycètes potentiellement présents chez la drosophile. Les expériences ayant déterminées qu'aucun eucaryote ne composait le microbiote des mouches à fruit n'avaient pas encore été conduites (sections 4.3.4.3 et 4.3.4.4) à ce moment. L'ajout de cet antifongique, qui agit sur la synthèse des protéines des eucaryotes, s'est cependant révélé toxique pour les drosophiles. De la nystatine (100 µg/ml) et de l'amphotéricine B (100 µg/ml) ont ainsi été utilisés en remplacement. Ces deux antifongiques se lient aux ergostérols composant la membrane

cellulaire des mycètes et contribuent à y former des pores. Ce mécanisme d'action serait spécifique et les risques pour les autres eucaryotes seraient ainsi minimes. L'ajout de nystatine et d'amphotéricine B ne s'est toutefois pas révélé concluant. Les drosophiles survivaient cette fois-ci sur le nouveau milieu, mais l'éclosion des œufs n'y avait pas lieu. La figure 24 montre bien ce phénomène. Des pupes et des larves sont visibles sur les parois des bouteilles de droite alors que seules les mouches adultes sont visibles dans les cultures de gauche. L'utilisation d'antifongiques n'a donc pas été retenue. Le tableau 6 dresse une liste des antibiotiques de ce premier traitement.

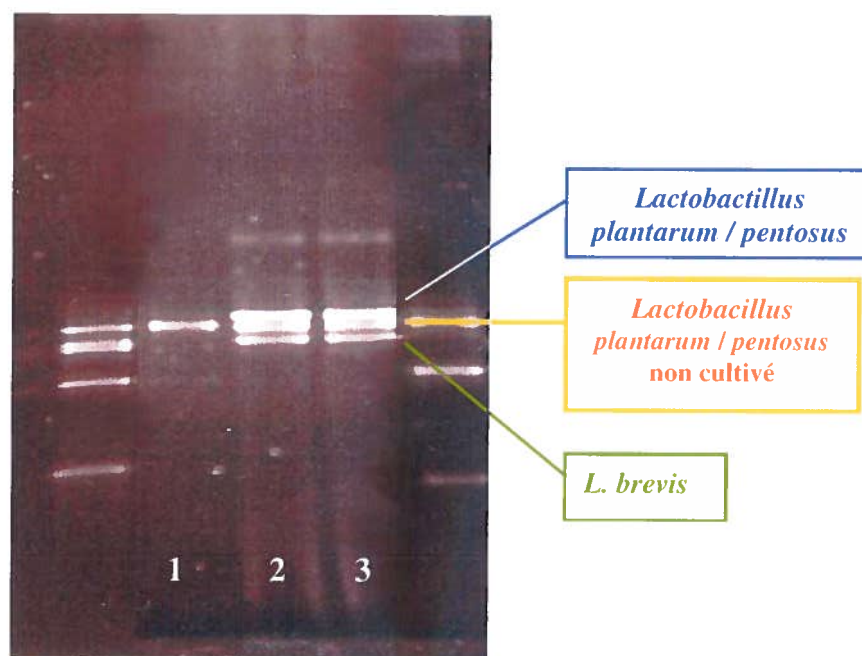


**Figure 24.** Effet de la nystatine et de l'amphotéricine B sur l'éclosion des œufs. Les bouteilles de droite contiennent du milieu nutritif additionné des antibiotiques mentionnés dans le texte, alors que les milieux de gauche contiennent des antifongiques en plus.

**Tableau 6.** Premier traitement aux antibiotiques pour axénisation des mouches.

Antibiotiques	Concentrations
Pipéracilline (Spectre plus large que l'ampicilline parmi les $\beta$ -lactamines)	5 $\mu\text{g/ml}$
Tétracycline	25 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphénicol	25 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicine	100 $\mu\text{g/ml}$
Triméthoprime	50 $\mu\text{g/ml}$

Une population de drosophiles a donc été traitée selon la méthode décrite en section 3.2 en utilisant ce cocktail d'antibiotiques. Des extractions d'ADN ont ensuite été réalisées sur des homogénats de mouches entières, puis les régions V3 du gène codant pour l'ARNr 16S ont été amplifiées par PCR. Un DGGE a ensuite été réalisé afin de visualiser la diversité possible des bactéries qui n'auraient pas été éliminées par ce premier traitement (Fig. 25).



**Figure 25.** Microbiote bactérien, avant et après traitement aux antibiotiques. Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant de 0 à 80% avec échelle dans les puits des deux extrémités. Le puits # 1 correspond aux drosophiles traitées (souche OR) alors que les puits # 2 (souche OR) et # 3 (souche CS) correspondent à celles ayant été gardées sur milieu nutritif normal.

Ce premier traitement aux antibiotiques n'a donc pas permis d'éliminer complètement le microbiote des mouches à fruit : une bande associée à *L. plantarum/L. pentosus* (l'espèce non cultivée identifiée en 4.3.4.2) pouvait encore être détectée dans le premier puits du gel<sup>12</sup>.

Une étude parue en 2002 (Danielsen et Wind, 2002) démontrait pourtant que du chloramphénicol en concentration de 8 µg/ml était suffisant pour inhiber la croissance de toutes les 18 souches de *L. plantarum/pentosus* utilisées. La concentration de 25 µg/ml de

chloramphénicol du présent cocktail aurait donc dû être suffisante. Celle de la rifampicine (100 µg/ml) aussi puisque la croissance de toutes les souches testées dans l'étude de Danielsen et Wind était inhibée par 4 µg/ml de cet antibiotique. Les auteurs soulignaient toutefois que des résistances à la rifampicine, dues à des mutations, n'étaient pas rares chez *L. plantarum/pentosus*. Toujours selon cette étude, les *Lactobacillus* ne seraient pas très susceptibles à la triméthoprim. Il est donc possible que la concentration de 50 µg/ml n'ait eu aucun effet sur l'espèce résistance identifiée dans le présent projet.

D'autres antibiotiques furent ainsi rajoutés au cocktail. Il fut démontré dans une étude subséquente que toutes les souches testées de *L. plantarum* ou de *L. pentosus* étaient susceptibles à l'érythromycine en concentration de 15 µg/ml et à la clindamycine en concentration de 2 µg/ml (Cebeci *et al*, 2003).

**Tableau 7.** Deuxième traitement aux antibiotiques pour axénisation des mouches.

Antibiotiques	Concentrations
Pipéracilline (Spectre plus large que l'ampicilline parmi les β-lactamines)	5 µg/ml
Tétracycline	25 µg/ml
Chloramphénicol	25 µg/ml
Rifampicine	100 µg/ml
Triméthoprim	50 µg/ml
Érythromycine	15 µg/ml
Clindamycine	2 µg/ml

<sup>12</sup> L'ADN lié à cette bande du gel a été extrait, amplifié puis séquencé afin de valider qu'il appartenait bien à cette espèce bactérienne.

L'effet de ce cocktail reste à être confirmé. Une population de drosophiles a été soumise à ce deuxième traitement durant 3 générations. L'ADN totale de ces mouches a également été extrait, mais la durée du présent projet étant terminée, il n'a pas pu être confirmé que la souche de *L. plantarum* ou de *L. pentosus* avait été éradiquée du microbiote des drosophiles.

Une étude, la deuxième présentant un protocole d'axénisation de drosophiles, fut à ce moment publiée dans Science (Ryu et al, 2008). Aucun traitement n'y était appliqué sur les embryons et les mouches adultes étaient maintenues sur milieu nutritif contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 50 µg/ml de vancomycine, 100 µg/ml de néomycine et 100 µg/ml de métronidazole. Ce nouveau protocole pourra éventuellement être essayé si l'exposition des drosophiles au deuxième cocktail d'antibiotiques ne parvient pas à éliminer toutes les souches bactériennes du système gastro-intestinal.



## **5. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES**

### 5.1 Infections par ingestion

Les protocoles d'infection par ingestion ont été optimisés : les courbes de mortalité des drosophiles avec *P. aeruginosa* obtenues par cette méthode sont reproductibles. Afin de valider le modèle, il a été vérifié que des mutants moins pathogènes chez d'autres hôtes, soit murins ou alternatifs, l'étaient également chez *D. melanogaster*. Ainsi, le double mutant *lasR/rhlR* s'est avéré beaucoup moins virulent que la souche sauvage PA14. Ceci confirme le rôle essentiel que joue le quorum sensing dans la virulence du microorganisme chez la drosophile. À l'inverse du double mutant *lasR/rhlR*, le mutant *pscD* s'est révélé aussi pathogène que la souche sauvage PA14 chez *D. melanogaster*. Ce résultat concorde avec les essais faits chez le nématode *C. elegans* ou la plante *A. thaliana* et valident également la drosophile comme modèle.

Si les essais d'infection par ingestion réalisés avec *A. pleuropneumoniae* n'ont pas été létaux pour les mouches à fruit, la méthode par piqûre reste toutefois à tester et pourrait s'avérer concluante. En effet, la méthode d'infection par ingestion avait d'abord été testée avec *B. multivorans* LMG16660, *B. vietnamiensis* LMG 18835, *B. ambifaria* HSJ1, *B. pyrrocinia* LMG21824, *B. cenocepacia* LMG18830, *B. dolosa* LMG21819 et *B. stabilis* LMG18870, sans toutefois parvenir à créer de la mortalité parmi les populations de drosophiles infectées. La méthode par piqûre a donc été tentée.

### 5.2 Infections par piqûre

Les travaux liés à ce projet sont les premiers à faire de *D. melanogaster* un hôte pour les espèces du complexe *Burkholderia cepacia*. Les courbes de mortalité obtenues par piqûre ont permis de différencier les souches selon leur virulence. Ainsi, *B. cepacia* (LMG1222), *B. pyrrocinia* (LMG21824) et *B. ubonensis* (LMG 20358) ont été parmi les plus virulentes, induisant la mort de toutes les drosophiles en 72 heures alors que *B. multivorans* (LMG16660) et *B. dolosa* (LMG21819) ont été avirulents. Comme pour *P. aeruginosa*, des mutants de *B. cenocepacia* K56-2 connus pour être moins pathogènes chez le modèle murin ont été testés avec la drosophile. Ils ont dans ce cas aussi permis de confirmer la validité du modèle. L'utilisation d'indices de compétitivité a quant à elle contribué à augmenter la sensibilité des tests de mortalité.

### **5.3 Modèle par ingestion ou par piqûre ?**

Les résultats obtenus dans le cadre du présent projet indiquent que les deux modèles sont fonctionnels et reproductibles. Des avantages peuvent également être associés à chacun. La méthode par ingestion est simple à réaliser et ne demande pas de travail de précision comme c'est le cas pour les infections par piqûre. C'est donc une méthode qui pourrait par exemple servir lors de criblages à grande échelle (criblage de banques de mutants, etc). La technique par piqûre conduit cependant plus rapidement à la mortalité des mouches à fruit infectées ; moins de 30 heures pour la souche PA01 de *P. aeruginosa* (Vodovar *et al*, 2004) contre près de 300 heures par la méthode par ingestion pour PA14. Le modèle par ingestion se rapprocherait davantage d'une infection chronique, donc à long terme, alors que le modèle par piqûre correspondrait dans la réalité à une infection aiguë (Lutter *et al*, 2008). Les modèles seraient donc distincts : lorsqu'ingérée, une bactérie pathogène devra être capable de traverser la barrière épithéliale alors qu'avec le modèle par piqûre, elle se retrouvera directement dans l'hémolymphe. Ainsi, les résultats obtenus de chacun de ces types d'infection apporteront des connaissances complémentaires sur les gènes impliqués dans la virulence du microorganisme pathogène étudié.

### **5.4 Perspectives**

Plusieurs hypothèses et objectifs liés à ce projet demandent encore à être investigués. En effet, si les protocoles permettent d'avoir un modèle fonctionnel, l'effet de certains facteurs sur les courbes de mortalité reste en partie à être déterminé. Le microbiote de la population du laboratoire a été identifié, alors que très peu d'études portent sur ce sujet. De ce qu'il a été possible d'analyser, trois espèces appartenant au genre *Lactobacillus* en feraient partie : *L. plantarum*, *L. pentosus* et *L. brevis*. L'efficacité du traitement contre celles-ci reste cependant à être confirmée. Il sera ensuite possible de réaliser des infections par ingestion en comparant les courbes de mortalité de drosophiles sans microflore avec celles d'insectes non traités aux antibiotiques. Vérifier l'effet de chacune des souches bactériennes identifiées lors de l'infection pourra ensuite être fait.

Connaître l'influence de facteurs tels le sexe de l'insecte ou la durée d'une période de jeûne sur les résultats des infections pourrait éventuellement inciter les équipes de recherche à revoir leurs protocoles ou pourrait permettre d'épargner beaucoup d'efforts et de temps. S'il est par exemple confirmé que les courbes de mortalité de *P. aeruginosa* obtenues avec des femelles

drosophiles sont les mêmes que celles des mâles, les infections pourront désormais se faire sans avoir à séparer les insectes au préalable. Il en est de même pour le temps de jeûne avant une infection par ingestion. D'autres facteurs non étudiés dans ce projet pourraient également être testés ; la température d'incubation ou l'âge des drosophiles par exemple.

La population de drosophiles du laboratoire est maintenant bien établie et les protocoles pour terminer le projet ont démontré leur efficacité.

## 6. LISTE DES RÉFÉRENCES

AARON, S.D., W. Ferris, D. A. Henry, D. P. Speert, et N. E. Macdonald. 2000. Multiple combination bactericidal antibiotics testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. Am J Respir Crit Care Med, vol. 161, pp. 1206-1212.

ADAMS, M.D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S.E. Scherer, P. W.Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. R. Nelson, G. L. Gabor, J. F. Abril, A. Agbayani, H. J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferreira, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. H. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G. H. Karpen, Z. Ke, J. A. Kennison, K. A. Ketchum, B. E. Kimmel, C. D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S. M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D. M. Muzny, D. L. Nelson, D. R. Nelson, K. A. Nelson, K. Nixon, D. R. Nusskern, J. M. Pacleb, M. Palazzolo, G. S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Sidenkiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A. C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A. H. Wang, X. Wang, Z. Y. Wang, D. A. Wassarman, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, WoodageT, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R. F. Yeh, J. S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X. H. Zheng, F. N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H. O. Smith, R. A. Gibbs, E. W. Myers, G. M. Rubin, et J. C. Venter. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, vol. 287(5461), pp. 2185-2195.

ALEXEYEV, M. F. 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. BioTechniques, vol. 26, pp. 824-828.

ALIBAUD, L., T. Köhler, A. Coudray, C. Prigent-Combaret, E. Bergeret, J. Perrin, M. Benghezal, C. Reimann, Y. Gauthier, C. van Delden, I. Attree, M.-O. Fauvarque, et P. Cosson. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes identified in a *Dictyostelium* host model. Cell Microbiol, vol. 10(3), pp. 729-740.

APIDIANAKIS, Y., L.G. Rahme, J. Heitman, F. M. Ausubel, S. B. Calderwood, et E. Mylonakis. 2004. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. Eukaryot cell, vol. 3, pp. 413-419.

APIDIANAKIS, Y., M.N. Minidrinis, W. Xiao, G.W. Lau, R.L. Baldini, R.W. Davis, et L.G. Rahme. 2005. Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. P Natl Acad Sci USA, vol. 102(7), pp. 2573-2578.

ASHBURNER, M., K.G. Golic, et R.S. Hawley. 2005. Drosophila: A laboratory handbook. Seconde edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 1409 pages.

- AVET-ROCHEX, A., E. Bergeret, I. Attree, M. Meister, et M.O. Fauvarque. 2005. Suppression of *Drosophila* cellular immunity by directed expression of the ExoS toxin GAP domain of *Pseudomonas aeruginosa*. Cell Microbiol, vol. 7, pp. 799-810.
- BALDINI, R.L., G. W. Lau et L. G. Rahme. 2002. Use of plant and insect hosts to model bacterial pathogenesis. Method Enzymol, vol. 358, pp. 3-13.
- BARÇANTE, J.M.P., T.A. Barçante, S.R.C. Dias, L.Q. Vieira, W.S. Lima, et D. Negrão-Corrêa. 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. Parasitol Res, vol. 89(2), pp. 89-93.
- BENGHEZAL, M., et al. 2006. Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. Cell microbiol, vol. 8, pp. 139-148.
- BERG, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol, vol. 4(11), pp. 430-435.
- BERNIER, S.P., L. Silo-Suh, D.E. Woods, D.E. Ohmann, et P.A. Sokol. 2003. Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. Infect Immun, vol. 71, pp. 5306-5313.
- BLOW, S.N., R.N. Salomon, K. Garrity, I. Reveillaud, A. Kopin, F.R. Jackson, et P.I. Watnick. 2005. *Vibrio cholerae* infection of *Drosophila melanogaster* mimics the human disease Cholera. PLoS Pathog, vol.1(1). e8.
- BOEKEMA, B.K.H.L., E.M. Kamp, M.A. Smits, H.E. Smith, et N. Stockhofe-Zurwieden. 2004. Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. Vet Microbiol, vol. 100(1), pp. 17-23.
- BOMAN, H.G., I. Nilsson, et B. Rasmuson. 1972. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. Nature, vol. 237, pp. 232-235.
- BORNEMAN, J. et R.J. Hartin. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Appl Environ Microbiol, vol. 66(10), pp. 4356-4360.
- BOULANGER, N., L. Ehret-Sabatier, R. Brun, D. Zachary, P. Bulet, et J.-L. Imler. 2001. Immune response of *Drosophila melanogaster* to infection with the flagella parasite *Crithidia* spp. Insect Biochem Molec, vol. 31. pp. 129-137.
- BRANDT, S.M., S. Dionne, R. S. Khush, L. N. Pham, T. J. Vigdal, et D. S. Schneider. 2004. Secreted bacterial effectors and host-produced eiger/TNF drive death in a *Salmonella*-infected fruit fly. PLoS Biol 2:e418.
- BRINGEL, F., P. Quénéé, et P. Tailliez. 2001. Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. System Appl Microbiol, vol. 24, pp. 561-571.
- BROWN, P.B. et G.V. Wolfe. 2006. Protist genetic diversity in the acidic hydrothermal environments of Lassen Volcanic National Park, USA. J Eukaryot Microbiol, vol. 53(6), p. 420-431.
- BRUMMEL, T., A. Ching, L. Seroude, A.F. Simon, et S. Benzer. 2004. *Drosophila* lifespan enhanced by exogenous bacteria. P Natl Acad Sci USA, vol. 101(35), pp. 12974-12979.

- BURKHOLDER, W. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology, vol. 64, pp. 468-475.
- CARDONA, S.T., J. Wopperer, L. Eberl, et M.A. Valvano. 2005. Diverse pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex strains in the *Caenorhabditis elegans* host model. FEMS Microbiol Lett, vol. 250, pp.97-104.
- CASADEVALL, A., et L.-A. Pirofski. 2000. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection and disease. Infect Immun, vol. 68(12), pp. 6511-6518.
- CEBECI, A., et C. Gürakan. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiol, vol. 20, pp. 511-518.
- CHIRIFE, J., G. Scarmato, et L. Herszage. 1982. Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. Lancet, i;560-561.
- CHU, K.K., D.J. Davidson, T.K. Halsey, J.W. Chung, et D.P. Speert. 2002. Differential persistence among genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in a murine model of pulmonary infection. Infect Immun , vol. 70, pp. 2715-2720.
- CHUGANI, S.A., M. Whiteley, K.M. Lee, D. D'Argenio, C. Manoil, et E.P. Greenberg. 2001. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. P Natl Acad Sci USA, vol. 98, pp. 2752-2757.
- CLARK, M.E., C.L. Anderson, J. Cande, et T.L. Karr. 2005. Widespread prevalence of *Wolbachia* in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research. Genetics, vol. 170, pp. 1667-1675.
- COENYE, T., P. Vandamme, J.R. Govan, et J.J. LiPuma. 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol, vol. 39, pp.3427-3436.
- COENYE, T., P. Vandamme, J.J. LiPuma, J.R. Govan, et E. Mahenthiralingam. 2003. Updated version of the *Burkholderia cepacia* complex experimental strain panel. J Clin Microbiol, vol. 41, pp. 2797-2798.
- CORBETT, C.R., M.N. Burtnick, C. Kooi, D.E. Woods, et P.A. Sokol. 2003. An extracellular zinc metalloprotease gene of *Burkholderia cepacia*. Microbiology, vol. 149, pp. 2263-2271.
- CORBY-HARRIS, V., A.C. Pontaroli, L.J. Shimkets, J.L. Bennetzen, K.E. Habel, et D.E.L. Promislow. 2007. Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. Appl Environ Microbiol, vol. 73(11), pp. 3470-3479.
- COSSON, P., L. Zulianello, O. Join-Lambert, F. Faurisson, L. Gebbie, M. Benghezal, C. Van Delden, L. Kocjancic Curty, et T. Köhler. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analysed in a *Dictyostelium discoideum* host system. J Bacteriol, vol. 184(11), pp. 3027-3033.
- COX, C.R., et M.S. Gilmore. 2002. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. Infect Immun, vol. 75(4), pp. 1565-1576.
- DANIELSEN, M., et A. Wind. 2002. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int J Food Microbiol, vol. 82, pp. 1-11.



D'ARGENIO, D.A., L.A. Gallager, C.A. Berg, et C. Manoil. 2001. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Bacteriol, vol. 183, pp. 1455-1471.

DAHMAN, C (éd.). 2008. Drosophila, Methods and Protocols. Totowa: Humana Press, 437 pages.

DE GREGORIO, E., S.-J. Han, W.-J. Lee, M.-J. Baek, T. Osaki, S.-I. Kawabata, B.-L. Lee, S. Iwanaga, B. Lemaitre, et P.T. Brey. 2002. An Immune-Responsive serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. Dev Cell, vol. 3, pp. 581-592.

DEKIMPE, V., et É. Déziel. 2009. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. Microbiology, vol. 155, pp. 712-723.

DE VERO, L., E. Gala, M. Gullo, L. Solieri, S. Landi, et P. Giudici. 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. Food Microbiol, vol. 23, pp. 809-813.

DIEZ, B., C. Pedrós-Alió, T.L. Marsh, et R. Massana. 2001. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. Appl Environ Microbiol, vol 67(7), pp. 2942-2951.

DIONNE, M. S., N. Ghorri, et D. S. Schneider. 2003. *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. Infect Immun , vol. 71(6), pp .3540-3550.

DOBSON, S.L., E.J. Marsland, Z. Veneti, K. Bourtzis, et S.L. O'Neill. 2002. Characterization of *Wolbachia* host cell range via the *in vitro* establishment of infections. Appl Environ Microbiol, vol. 68(2), pp. 656-660.

EDWARDS, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, et E.C. Böttger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res, vol. 17, pp. 7843-7853.

EICHENGER, L., J.A. Pachebat, G. Glöckner, M.-A. Rajandream, R. Sucgang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B. A. Konfortov, F. Rivero, A. T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M.A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E.C. Cox, R. L. Chisholm, R. Gibbs, W. F. Loomis, M. Platzer, R. R. Kay, J. Williams, P. H. Dear, A. A. Noegel, B. Barrell, et A. Kuspa. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. Nature, vol. 435(7038), pp.34-57.

ELROD-ERICKSON, M., S. Mishra, et D. Schneider. 2000. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. Curr Biol, vol. 10, pp. 781-784.

ERICKSON, D.L., J.L. Lines, E.C. Pesci, V. Venturi, et D.G. Storey. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* relA contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. Infect Immun, vol. 72(10), pp. 5638-5645.

FALLON, P.G., R.L. Allen, et T. Rich. 2001. Primitive Toll signalling : bugs, flies, worms and man. Trends Immunol., vol. 22, pp. 63-66.

FAUVARQUE, M.O., E. Bergeret, J. Charbert, D. Dacheux, M. Satre, et I. Attrec. 2002. Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. Microb Pathogenesis., vol. 32, pp. 287-295.

FLANNAGAN, R.S., D. Aubert, C. Kooi, P.A. Sokol, et M.A. Valvano. 2007. *Burkholderia cenocepacia* requires a periplasmic HtrA protease for growth under thermal and osmotic stress and for survival in vivo. Infect Immun., vol. 75, pp. 1679-1689.

FLYG, C., K. Kenne, et H.G. Boman. 1980. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. J Gen Microbiol., vol. 121, pp. 173-181.

FLYMOVE, <http://flymove.uni-muenster.de> (consulté le 09/2006).

FOLDERS, J., J. Algra, M.S. Roelofs, L. C. Van Loon, J. Tommassen, et W. Bitter. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. J Bacteriol., vol. 183(24), pp. 7044-7052.

FREY, J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. Trends Microbiol., vol. 3(7), pp. 257-261.

FRYDMAN, H.M., J.M. Li, D.N. Robson, et E. Weischaus. 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. Nature, vol. 441, pp. 509-512.

GALES, A.C., R.N. Jones, J. Turnidge, R. Rennie, et R. Ramphal. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates : occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. Clin Infect Dis., vol. 32, pp. S146-S155.

GOLDSTEIN, L.S.B. et E.A. Fyrberg. 1994. *Drosophila melanogaster*: practical uses in cell and molecular biology. Methods in Cell Biology, vol. 44. Academic Press, 755 pages.

GREENSPAN, R. J. 1997. Fly Pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 150p.

HÄGELE, S. R. Köhler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, et M. Steinert. 2000. *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. Cell Microbiol., vol.2(2), pp. 165-171.

HANCOCK, R.E. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis., vol. 27, pp. S93-S99.

HARDIN, P.E. 2005. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. Curr Biol., vol. 15, pp. 714-722.

HARRIS, A.G., J.E. Wilson, S.J. Danon, M.F. Dixon, K. Donegan, et S.L. Hazell. 2003. Catalase (KatA) and KatA-associated protein (KapA) are essential to persistent colonization in the *Helicobacter pylori* SS1 mouse model. Microbiology., vol. 149, pp. 665-672.

HARSHMAN, L.G., A.A. Hoffmann, et A.G. Clark. 1999. Selection for starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: physiological correlates, enzyme activities and multiple stress responses. J Evol Biol, vol.12, pp. 370-379.

HASEGAWA, H., A. Chatterjee, Y. Cui, et K. Chatterjee. 2005. Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* sbsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, *N*-Acyl homoserine lactone, and extracellular proteins. Appl Environ Microbiol, vol. 71(8), pp. 4655-4663.

HOFFMANN, J.A., et J.-M. Reichhart. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nat immunol, vol. 3(2), pp. 121-126.

JANDER, G., L.G. Rahme, et F.M. Ausubel. 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. J Bacteriol, vol. 182, pp. 3843-3845.

KAVANAGH, K., et E.P. Reeves. 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev., vol. 28(1), pp. 101-112.

KIM, S.-H., S.-Y. Park, Y.-J. Heo, et Y.-H. Cho. 2008. *Drosophila melanogaster*-based screening for multihost virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and identification of a virulence-attenuating factor, HudA. Infect Immun, vol. 76(9), pp. 4152-4162.

KOOI, C., C.R. Corbett, et P.A. Sokol. 2005. Functional analysis of the *Burkholderia cenocepacia* ZmpA metalloprotease. J Bacteriol, vol. 187, pp. 4421-4429.

KOOI, C., B. Subsin, R. Chen, B. Pohorelic, et P.A. Sokol. 2006. *Burkholderia cenocepacia* ZmpB is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence. Infect Immun, vol. 74, pp. 4083-4093.

KURZ, C.L., et J.J. Ewbank. 2007. Infection in a dish: high-throughput analyses of bacterial pathogenesis. Curr opin microbiol, vol. 10, pp. 10-16.

LAMOTHE, J., K.K. Huynh, S. Grinstein, et M.A. Valvano. 2007. Intracellular survival of *Burkholderia cenocepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. Cell Microbiol, vol. 9, pp. 40-53.

LAU, G.W., B.C. Goumnerow, C.L. Walendziewicz, J.Hewitson, W. Xiao, S. Mahajan-Miklos, R.G. Tompkins, L.A. Perkins, et L.G. Rahme. 2003. The *Drosophila melanogaster* Toll pathway participates in resistance to infection by gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, vol. 71(7), p. 4059-4066.

LAU, G.W., B.E. Britigan, et D.J. Hassett. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* OxyR is required for full virulence in rodent and insect models of infection and for resistance to human neutrophils. Infect Immun, vol. 73(4), pp.2550-2554.

LAWS, T.R., S.A. Smith, M.P. Smith, S.V. Harding, T.P. Atkins, et R.W. Titball. 2005. The nematode *Panagrellus redivivus* is susceptible to killing by human pathogens at 37 degrees C. FEMS Microbiol Lett, vol. 250, pp. 77-83.

LE BERRE, K. Faure, S. Nguyen, M. Pierre, F. Ader, et B. Guery. 2006. Quorum sensing : une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. Méd maladies infect, vol. 36, pp. 349-357.

- LEE, J.E., et I. Edery. 2008. Circadian regulation in the ability of *Drosophila* to combat pathogenic infections. Curr Biol, vol. 18, pp. 195-199.
- LEMAITRE, B., et J.A. Hoffmann. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu Rev Immuno, vol. 25, pp. 697-743.
- LEWENZA, S., B. Conway, E.P. Greenberg, et P.A. Sokol. 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J Bacteriol, vol. 181, pp. 748-756.
- LIBERATI, N.T., J.M. Urbach, S. Miyata, D.G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei, et F.M. Ausubel. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. P Natl Acad Sci USA, vol. 103(8), pp. 2833-2838.
- LOUTET, S.A., R.S. Flannagan, C. Kooi, P.A. Sokol, et M.A. Valvano. 2006. A complete lipopolysaccharide inner core oligosaccharide is required for resistance of *Burkholderia cenocepacia* to antimicrobial peptides and bacterial survival *in vivo*. J Bacteriol, vol. 188, pp. 2073-2080.
- LUTTER, E.I., M.M.P. Faria, H.R. Rabin, et D.G. Storey. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates from individual patients demonstrate a range of levels of lethality in two *Drosophila melanogaster* infection models. Infect Immun, vol. 76, pp. 1877-1888.
- LYCZAK, J.B., C.L. Cannon, et G.B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect, vol. 2(9), pp. 1051-1060.
- MAHAJAN-MIKLOS, S., M.-W. Tan, L.G. Rahme, et F.M. Ausubel. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. Cell, vol. 96, pp. 47-56.
- MAHENTHIRALINGAM, E., A. Baldwin, et C.G. Dowson. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J Appl Microbiol, vol. 104, pp. 1539-1551.
- MAHENTHIRALINGAM, E., T. Coenye, J.W. Chung, D.P. Speert, J.R. Govan, P. Taylor, et P. Vandamme. 2000. Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol, vol. 38, pp. 910-913.
- MANSFIELD, B. E., M. S. Dionne, D. S. Schneider, and N. E. Freitag. 2003. Exploration of host-pathogen interactions using *Listeria monocytogenes* and *Drosophila melanogaster*. Cell Microbiol, vol. 5(12), pp. 901-911.
- MARKEY, K.M., K.J. Glendinning, J.A. Morgan, C.A. Hart, et C. Winstanley. 2006. *Caenorhabditis elegans* killing assay as an infection model to study the role of type III secretion in *Burkholderia cenocepacia*. J Med Microbiol, vol. 55, pp. 967-969.
- MAROLDA, C.L., B. Hauröder, M.A. John, R. Michel, et M.A. Valvano. 1999. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoeba. Microbiology, vol. 145(7), pp. 1509-1517.
- MARTIN, D.W., et C.D. Mohr. 2000. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. Infect Immun, vol. 68, pp. 24-29.

- McCLEAN, S., et M. Callaghan. 2009. *Burkholderia cepacia* complex: epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention. J Med Microbiol, vol. 58, pp. 1-12.
- MCDONALD, M.J., et M. Rosbash. 2001. Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. Cell, vol. 107, pp. 567-578.
- MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol, vol. 1, pp. 135-145.
- MEDZHITOV, R., P. Preston-Hurlburt, et C.A. Janeway Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, vol. 388, pp. 394-397.
- MESAROS, N., P. Nordmann, P. Plesiat, M. Roussel-Delvallez, J. Van Eldere, Y. Glupczynski, Y. Van Laethem, F. Jacobs, P. Lebecque, A. Mallroot, P.M. Tulkens, et F. Van Bambeke. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect, vol. 13, pp. 560-578.
- MIYATA, S., M. Casey, D.W. Frank, F.M. Ausubel, et E. Drenkard. 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Infect Immun, vol. 71(5), pp. 2404-2413.
- MUYZER, G., E.C. de Waal et A.G. Uitterlinder. 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, vol. 59, pp. 695-700.
- MYLONAKIS, E., et A. Alballay. 2005. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. Infect Immun, vol. 73, pp. 3833-3841.
- NEHME, N.T., S. Liégeois, B. Kele, P. Giammarinaro, E. Pradel, J.A. Hoffmann, J.J. ewbank et D. Ferrandon. 2007. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. PLoS Pathog, vol. 3 (11).
- NELSON, M.J., S.O. Montgomery, W.R. Mahaffey, et P.H. Pritchard. 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. Appl Environ Microbiol, vol. 53, pp. 949-954.
- NICOLAS, E. J., M. Reichhart, J. A. Hoffmann, et B. Lemaitre. 1998. *In vivo* regulation of the I $\kappa$ B homologue *cactus* during the immune response of *Drosophila*. J Biol Chem, vol. 273(17), pp.10463-10469.
- OAKESHOTT, J. G., D.C. Vacek, et P.R. Anderson. 1989. Effects of microbial floras on the distributions of five domestic *Drosophila* species across fruit resources. Oecologia, vol. 78, pp. 533-541.
- PHAM, L.N., M.S. Dionne, M. Shirasu-Hiza, et D.S. Schneider. 2007. A specific primed immune response in drosophila is dependent on phagocytes. PLoS Pathog, vol. 3, e26.
- PITTENDRIGH, C.S., et D.H. Minis. 1972. Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster*. P Natl Acad Sci USA, vol. 69, pp. 1537-1539.
- POTVIN, E. 2003. *In vivo* functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. Environ Microbiol, vol. 5, pp. 1294-1308.

- PUKATZKI, S., R.H. Kessin, et J.J. Mekalanos. 2002. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *dictyostelium discoideum*. P Natl Acad Sci USA, vol. 99, pp. 3159-3164.
- RAHME, L.G., E.J. Stevens, S.F. Wolfort, J. Shao, R.G. Tompkins, et F.M. Ausubel. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science, vol. 268, pp. 1899-1902.
- RAHME, L.G., M.-W. Tan, L. Le, S.M. Wong, R.G. Tompkins, S.B. Calderwood, et F.M. Ausubel. 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. P Natl Acad Sci USA, vol. 94, pp. 13245-13250.
- ROH, S.W., Y.-D. Chang, H.-W. Chang, K.-H. Kim, M.-S. Kim, J.-H. Ryu, S.-H. Kim, W.J. Lee, et J.-W. Bae. 2008. Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. Appl Environ Microbiol, vol. 74(20), pp. 6171-6177.
- RYU, J.H., S.-H. Kim, H.-Y. Lee, J.Y. Bai, Y.-D. Nam, J.-W. Bae, D.G. Lee, S.C. Shin, E.-M. Ha, et W.-J. Lee. 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *Caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. Science, vol. 319, pp. 777-782.
- SAJJAN, U., G. Thanassoulis, V. Cherapanov, A. Lu, C. Sjolín, B. Steer, Y.J. Wu, O.D. Rotstein, G. Kent, C. McKerlie, J. Forstner, et G.P. Downey. 2001. Enhanced susceptibility to pulmonary infection with *Burkholderia cepacia* in *Cfr<sup>+/+</sup>* mice. Infect Immun, vol. 69, pp. 5138-5150.
- SANDERS, R. Bizarre parasite that kills male insects and disrupts insect sex lives is not all bad: it can make sterile fruit flies fertile again. Communiqué de Presse, 03/07/2002, University of California Berkeley.  
[http://berkeley.edu/news/media/releases/2002/07/03\\_paras.html](http://berkeley.edu/news/media/releases/2002/07/03_paras.html) (Consulté le 09/2006)
- SCHNEIDER, D. 2000. Using *Drosophila* as a model insect. Nat Rev Genet, vol. 1, pp. 218-226.
- SCHNEIDER, D., et M. Shahabuddin. 2000. Malaria parasite development in a *Drosophila* model. Science, vol. 288(5475), pp. 2376-2379.
- SEED, K.D., et J.J. Dennis. 2008. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. Infect Immun, vol. 76, pp. 1267-1275.
- SHIN, D.-H., Y.-S. Choi, et Y.-H. Cho. 2008. Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance. J Bacteriol, vol. 190(8), pp. 2663-2670.
- SHIRASU-HIZA, M.M., et D.S. Schneider. 2007. Confronting physiology: how do infected flies die? Cell Microbiol, vol. 9(12), pp. 2775-2783.
- SIBLEY, C.D., K.M. Duan, C. Fischer, M.D. Parkins, D.G. Storey, H.R. Rabin, et M.G. Surette. 2008. Discerning the complexity of community interactions using a *Drosophila* model of polymicrobial infections. Plos Pathog, vol. 4.
- SIMON, R., U. Priefer, et A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Nat Biotechnol, vol. 1, pp. 784-791.

SKRIWAN, C., M. Fajardo, S. Hägle, M. Horn, M. Wagner, R. Michel, G. Krohne, M. Schleicher, J. Hacker, et M. Steinert. 2002. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. Int J Med Microbiol, vol. 291(8), pp. 615-624.

SOKOL, P.A., U. Sajjan, M.B. Visser, S. Gingues, J. Forstner, et C. Kooi. 2003. The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. Microbiology, vol. 149, pp. 3649-3658.

SOUSA, S.A., M. Ulrich, A. Bragonzi, M. Burke, D. Worlitzsch, J.H. Leitao, C. Meisner, L. Eberl, I. Sa-Correia, et G. Doring. 2007. Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in gp91<sup>phox-/-</sup> mice. Cell Microbiol, vol. 9, pp. 2817-2825

STOLTZ, D.A., E.A. Ozer, P.J. Taft, M. Barry, L. Liu, P.J. Kiss, T.O. Moninger, M.R. Parsek, et J. Zabner. 2008. *Drosophila* are protected from *Pseudomonas aeruginosa* lethality by transgenic expression of paraoxonase-1. J Clin Invest, vol. 118(9), pp. 3123-3131.

STOVER, C.K., X.Q. Pahm, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warren, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuang, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Foldger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K.-S. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E.W. Hancock, S. Lory, et M.V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, vol. 406, pp. 959-964.

TAN, M.-W. 2002. Cross-species infections and their analysis. Annu Rev Microbiol, vol. 56, pp. 539-565.

TAN, M.W., L.G. Rahme, J.A. Sternberg, R.G. Tompkins, et F.M. Ausubel. 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. P Natl Acad Sci USA, vol. 96, pp. 715-720.

TAN, M.-W., S. Mahajan-Miklos, et F.M. Ausubel. 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. P Natl Acad Sci USA, vol. 96, pp. 715-720.

TOMICH, M., A. Griffith, C.A. Herst, J.L. Burns, et C.D. Mohr. 2003. Attenuated virulence of a *Burkholderia cepacia* type III secretion mutant in a murine model of infection. Infect Immun, vol. 71, pp. 1405-1415.

TORRIANI, S., G.E. Felis, et F. Dellaglio. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. Appl Environ Microbiol, vol. 67(8), pp. 3450-3454.

TZOU, P., J.-M. Reicchart, et B. Lemaitre. 2002. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. P Natl Acad Sci USA, vol. 99(4), pp. 2152-2157.

TZOU, P., M. Meister, et B. Lemaitre. 2002. Methods for studying infection and immunity in *Drosophila*. A. Zychlinsky (ed.), Methods in Microbiology. Academic Press, London, pp. 507-529.

TZOU, P., S. Ohresser, D. Ferradon, M. Capovilla, J.-M. Reichhart, B. Lemaitre, J.A. Hoffmann, et J.-L. Imler. 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. Immunity, vol. 13, pp. 737-748.



- VANDAMME, P., B. Holmes, T. Coenye, J. Goris, E. Mahenthiralingam, J.J. LiPuma, et J.R. Govan. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.-a new twist to an old story. Res Microbiol, vol. 154, pp. 91-96.
- VANLAERE, E., J.J. LiPuma, A. Baldwin, D. Henry, E. De Brandt, E. Mahenthiralingam, D. Speert, C. Dowson, et P. Vandamme. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. Int J Syst Evol Microbiol, vol. 58, pp. 1580-1590.
- VIAL, L., M.-C. Groleau, V. Dekimpe, et E. Déziel. 2007. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechn, vol. 17, pp. 1407-1429.
- VIAL, L., F. Lépine, S. Milot, M.-C. Groleau, V. Dekimpe, D.E. Woods, et E. Déziel. 2008. *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. J Bacteriol, vol. 190, pp. 5339-5352.
- VODOVAR, N., C. Acosta, B. Lemaitre, et F. Bocard. 2004. *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. Trends Microbiol, vol. 12, pp. 235-242.
- WATANABE, K., Y. Kodama, et S. Harayama. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. J Microbiol Meth, vol. 44, pp. 253-262.
- WATERS, C.M., et B.L. Bassler. 2005. Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol, vol. 21, pp. 319-346.
- WEBER, D.J., W.A. Rutala, et E.E. Sickbert-Bennett. 2007. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. Antimicrob Agents Ch, vol. 51, pp. 4217-4224.
- YABUUCHI, E., Y. Kawamura, T. Ezaki, M. Ikedo, S. Dejsirilert, N. Fujiwara, T. Naka, et K. Kobayashi. 2000. *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. Microbiol Immunol, vol. 44, pp. 307-317.
- YAHR, T.L., A.J. Vallis, M.K. Hancock, J.T. Barbieri, et D.W. Frank. 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. P Natl Acad Sci USA, vol.95(23), pp. 13899-13904.