

INRS - Institut Armand-Frappier

**La résistance aux agents antimicrobiens des bactéries engagées
dans la motilité de type *swarming*.**

Par

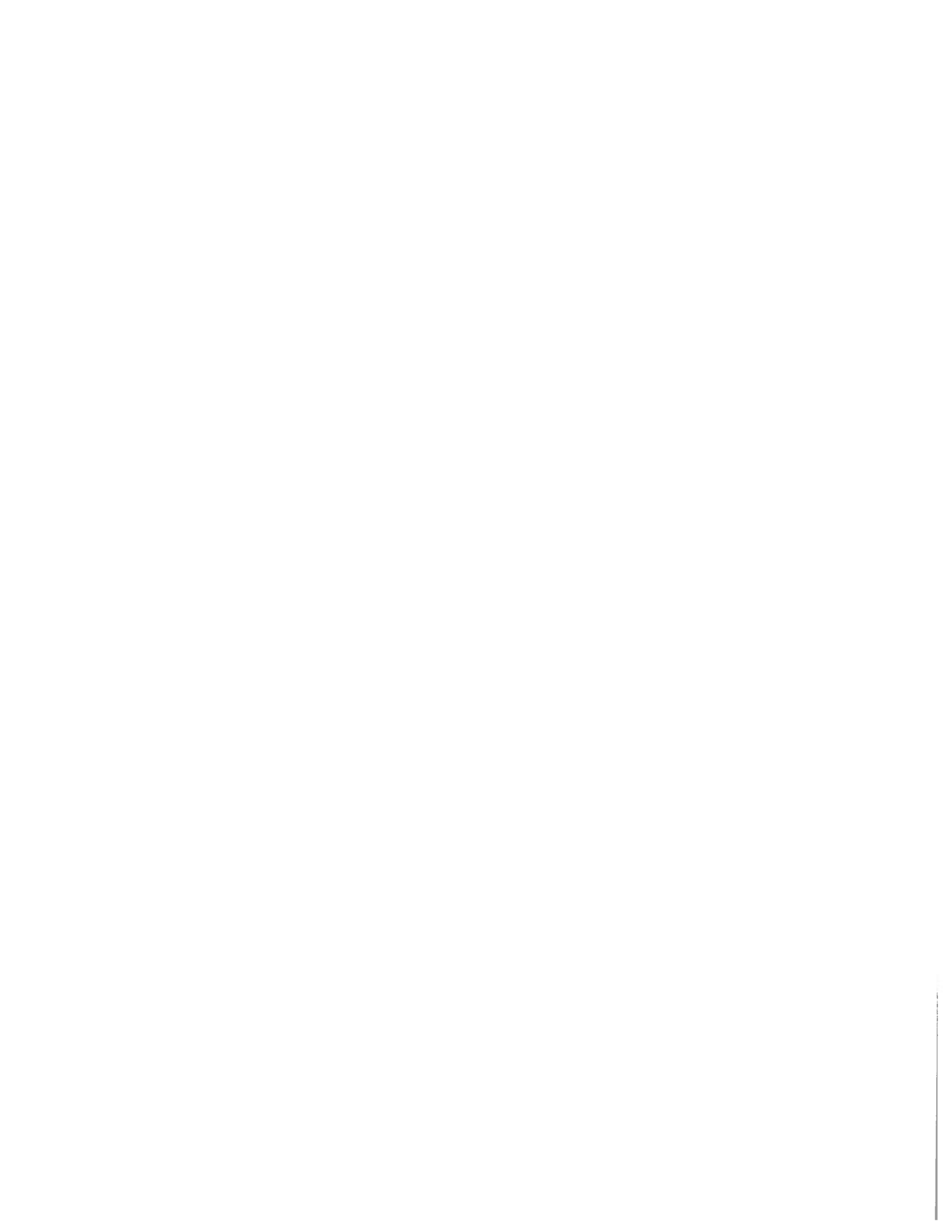
Sandra Lai

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

Jury d'évaluation

Président du jury et Examineur interne	Cellier, Mathieu	INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Mourez, Michaël	Université de Montréal
Directeur de recherche	Déziel, Éric	INRS-Institut Armand-Frappier

Droits réservés de Lai, Sandra 2007©



RÉSUMÉ

La motilité de type *swarming* est caractérisée par la migration rapide et coordonnée d'une population bactérienne sur une surface. Il s'agit d'un comportement social marqué par une différenciation en cellules hyperallongées et multiflagellées, et par la production de biosurfactant. Le *swarming* partage des similitudes avec le biofilm, notamment son caractère multicellulaire et une implication des systèmes de *quorum sensing*. L'une des caractéristiques importantes d'un biofilm est sa résistance élevée envers de nombreux agents antimicrobiens. Mes travaux ont consisté à vérifier si cette propriété se retrouvait également chez les bactéries en *swarming*. Cinq espèces ont été choisies : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia thailandensis*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*. Les profils de résistance des cellules végétatives et des cellules en *swarming* ont été déterminés à l'aide d'antibiogrammes couvrant divers antibiotiques de familles différentes. Il a été trouvé que les bactéries en *swarming* présentaient une résistance accrue envers tous les antibiotiques testés, sauf les peptides antimicrobiens. Ceci indique que la résistance aux antibiotiques est effectivement une caractéristique générale du *swarming*. Afin de mieux caractériser le phénotype résistant des bactéries en *swarming*, *P. aeruginosa* PA14 a été choisie comme bactérie modèle. Des tests de résistance envers d'autres agents antimicrobiens comme les métaux lourds ont montré une plus grande résistance des bactéries en *swarming* envers l'arsenite. La résistance envers le triclosan a été observée chez les bactéries en *swarming* de *B. subtilis* et *E. coli*. Le triclosan n'a pas pu être testé avec *P. aeruginosa* étant donné sa résistance naturelle à ce biocide. Des mutants dans des pompes à efflux (gènes *mexA*, *mexC* et *mexE* inactivés) et un mutant dans un mécanisme de résistance associé au biofilm (gène *ndvB* muté) présentent la même résistance que la souche sauvage PA14, suggérant que ces mécanismes ne sont pas impliqués. Dans le but d'identifier des gènes de *P. aeruginosa* PA14 impliqués dans cette résistance associée au *swarming*, une banque d'environ 10 000 mutants a été générée par insertion transpositionnelle aléatoire. Suite au criblage d'environ 4 000 de ces mutants (couverture théorique de 40-45% du génome), aucun gène n'a pu être mis à jour. Finalement, des tests de perméabilité utilisant une sonde fluorescente, le 1-N-phénylnaphtylamine (NPN), ont révélé que la membrane externe des bactéries en *swarming* de *P. aeruginosa* PA14 incorporait moins de NPN que celle des bactéries végétatives. Ceci

suggère qu'une réduction de la perméabilité membranaire serait un mécanisme de résistance associé au *swarming*, du moins chez les bactéries à Gram-négatif. Étant plus facile à investiguer que les biofilms, le *swarming* peut par conséquent représenter un bon modèle d'étude de la résistance aux agents antimicrobiens des comportements multicellulaires bactériens.

Étudiante

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Éric Déziel pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette maîtrise au sein de son laboratoire, ainsi que pour sa grande patience, sa grande disponibilité et sa compréhension envers ses étudiants. Je remercie également mes collègues de laboratoire, en particulier Julien Tremblay avec qui j'ai beaucoup travaillé et qui a grandement pavé la voie des études sur le *swarming* dans notre laboratoire, facilitant ainsi la réalisation de mes propres expériences. Je remercie également mes parents qui me laissent réaliser les études que je souhaite bien que je sois loin d'eux, ainsi que mon ami Antoine Marcot chez qui je travaille souvent et qui m'a soutenue tout le long de cette maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	1
LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE	9
1.1. LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	9
1.1.1. Problématique.....	9
1.1.2. Familles d'antibiotiques majeures	9
1.1.3. Les mécanismes classiques de résistance aux antibiotiques	10
1.1.3.1. Destruction ou modifications enzymatiques de l'antibiotique	10
1.1.3.2. Modification de la cible	11
1.1.3.3. Imperméabilité	11
1.1.3.4. Pompes à efflux.....	13
1.3. LA MULTICELLULARITÉ CHEZ LES BACTÉRIES	14
1.4. LES BIOFILMS BACTÉRIENS	15
1.4.1. Qu'est-ce qu'un biofilm bactérien ?.....	15
1.4.2. Mécanismes de résistance des biofilms	16
1.4.2.1. Matrice	16
1.4.2.2. Hétérogénéité	16
1.4.2.3. Phénotypes particuliers.....	17
1.4.2.4. Les persisters et les variants phénotypiques	18
1.5. LES TYPES DE MOTILITÉ CHEZ LES BACTÉRIES.....	20
1.6. LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING.....	22
1.6.1. Le swarming chez les bactéries	22
1.6.1.1. Swarming et différenciation cellulaire	22
1.6.1.2. Stimuli induisant le swarming	24
1.6.1.3. Régulation génétique du swarming	24
1.6.1.4. Implication du swarming dans la virulence	28
1.6.2. Le swarming chez <i>P. aeruginosa</i>	29
1.6.2.1. Description du swarming de <i>P. aeruginosa</i>	29
1.6.2.2. Quorum sensing et rhamnolipides	30
1.6.2.3. Lien entre swarming et biofilms chez <i>P. aeruginosa</i>	32
1.6.3. Swarming et résistance aux antibiotiques	34
CHAPITRE 2. SWARMING MOTILITY: A MULTICELLULAR BEHAVIOUR CONFERRING ANTIMICROBIAL RESISTANCE	37

2.1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE	37
2.2. CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	38
2.3. ARTICLE.....	39
2.3.1. Summary.....	40
2.3.2. Introduction.....	41
2.3.3. Results.....	43
2.3.4. Discussion	46
2.3.5. Experimental procedures	52
2.3.6. Acknowledgments	54
2.3.7. Tables	55
2.3.8. Figures	58
CHAPITRE 3. GÉNÉRATION ET CRIBLAGE D'UNE BANQUE DE TRANSPOSANTS DE <i>P. AERUGINOSA</i> PA14	66
3.1. MISE EN CONTEXTE	66
3.2. MÉTHODOLOGIE.....	67
3.2.1. Bactéries et plasmides	67
3.2.2. Milieux de culture	67
3.2.2.1. <i>Milieux de culture liquide</i>	67
3.2.2.2. <i>Milieux de culture solides</i>	68
3.2.3. Précultures bactériennes	68
3.2.4. Préparation des géloses M9DCAA	68
3.2.5. Génération d'une banque de transposants	70
3.2.5.1. <i>Conjugaison de <i>E. coli</i> SM10pir/PIT2 avec <i>P. aeruginosa</i> PA14</i>	70
3.2.5.2. <i>Étalement sur géloses de sélection</i>	70
3.2.5.3. <i>Repiquage des colonies</i>	71
3.2.6. Criblage de la banque de transposants ISlacZ/hah.....	71
3.2.6.1. <i>Réplication des plaques de 96 puits de la banque</i>	72
3.2.6.2. <i>Préparation des plaques de criblage</i>	72
3.2.6.3. <i>Préparation et dépôt des bandes d'antibiotiques</i>	72
3.2.6.4. <i>Inoculation et incubation des plaques de criblage</i>	73
3.2.7. Sélection et confirmation de transposants	73
3.2.8. Détermination du site d'insertion du transposon.....	74
3.2.8.1. <i>Extraction de l'ADN total du transposant</i>	74
3.2.8.2. <i>Réaction de PCR semi-arbitraire en deux rondes</i>	74
3.2.8.3. <i>Migration sur gel d'agarose</i>	76
3.2.8.4. <i>Séquençage</i>	77
3.2.9. Prise de photos des géloses	77
3.3. RÉSULTATS	77
3.3.1. Génération de la banque de transposants.....	77
3.3.2. Criblage de la banque de transposants	78
3.3.3. Le cas du transposant #022-39.....	80
3.4. DISCUSSION.....	84
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	91
APPENDICE A	102

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1.1.** L'aspect macroscopique des colonies en *swarming* varie selon les espèces et le milieu de culture.....23
- Figure 1.2.** Système de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR des bactéries à Gram-négatif...26
- Figure 1.3.** Résumé des deux systèmes de régulation majeurs impliqués dans la différenciation cellulaire et la motilité de type *swarming*.....28
- Figure 1.4.** Cellules en *swarming* de *P. aeruginosa*.....30
- Figure 1.5.** Modèle de migration des *tendrils* en fonction de la diffusion des di-RLs et des HAAs.....32
- Figure 1.6.** Modèle du contrôle inverse entre la formation de biofilm et la motilité de type *swarming*.....34

CHAPITRE 2

- Figure 2.1.** Comparison of antibiotic resistance of vegetative cells and swarm cells of (A) *P. aeruginosa*, (B) *E. coli*, (C) *B. subtilis*, (D) *S. marcescens* and (E) *B. thailandensis*.....58
- Figure 2.2.** Antibiograms showing resistance patterns of vegetative and swarm cells of several species.....59
- Figure 2.3.** E-test comparison of tobramycin MIC for vegetative and swarm cells of several species.....60
- Figure 2.4.** Secondary swarm fronts of *E. coli* challenged with meropenem.....61
- Figure 2.5.** Progression of swarming with or without prior exposure to antibiotic.....62
- Figure 2.6.** Antibiograms showing resistance of vegetative and swarm cells of *P. aeruginosa* PA14 against heavy metals.....63
- Figure 2.7.** Antibiograms showing resistance of vegetative and swarm cells of (A) *B. subtilis* and (B) *E. coli* against triclosan.....64
- Figure 2.8.** Comparison of resistance of cells on swim, swarm and solid plates of four *P. aeruginosa* PA14 mutant strains towards (A) tobramycin and (B) trimethoprim.....65

CHAPITRE 3

Figure 3.1. Schéma du transposon IS <i>lacZ</i> /hah utilisé pour réaliser la banque de transposants de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	67
Figure 3.2. Schéma de la réaction de PCR en deux rondes.....	75
Figure 3.3. Gélose de criblage avec bandes d'antibiotique.....	80
Figure 3.4. Géloses représentatives des tests de confirmation du transposant #022-39 avec un disque de tobramycine.....	82
Figure 3.5. Tests de confirmation du transposant #022-39 avec une bande de tobramycine.....	83
Figure 3.6. Vérification de l'aspect des colonies en <i>swarming</i> du transposant #022-39.....	83

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 2.1. Concentrations of antibiotics used for antibiograms.....	55
Table 2.2. Tobramycin resistance of vegetative and swarm cells of five species.....	56
Table 2.3. NPN uptake of vegetative and swarm cells of <i>P. aeruginosa</i>	57

CHAPITRE 3

Tableau 3.1. Résultats des tests de confirmation du mutant #022-39.....	81
--	----

APPENDICE A

Tableau A.1. Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR.....	102
Tableau A.2. Concentrations des réactifs utilisés pour les réactions de PCR.....	103
Tableau A.3. Programmes des réactions de PCR semi-arbitraire à deux rondes.....	103

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

QS : *quorum sensing*

AHL : acylhomosérine lactone

LPS : lipopolysaccharide

HAA : acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alcanoïque

RL : rhamnolipide

TSB : « Tryptic Soy Broth »

INTRODUCTION

L'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques suite à l'utilisation massive et inadéquate de ces produits constitue actuellement un problème majeur dans les milieux hospitaliers. Les bactéries planctoniques ont développé des mécanismes nombreux et variés de résistance aux antibiotiques. Récemment, des niveaux de résistance aux agents antimicrobiens encore plus élevés ont été rapportés chez les bactéries vivant en biofilms. Le biofilm est constitué d'une communauté bactérienne adhérente à une surface et enveloppée d'une matrice exopolymérique auto-sécrétée. Le biofilm est un comportement multicellulaire bactérien. La vision de la microbiologie se modifie depuis la découverte que les bactéries ont tendance à s'associer avec des surfaces et qu'elles sont capables de communication et de comportements sociaux élaborés. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries en biofilm restent encore mal compris, mais semblent être distincts de ceux employés par les bactéries planctoniques. Le *swarming* est une motilité de surface très répandue chez les eubactéries, bien que son rôle exact ne soit pas encore déterminé. La découverte que des bactéries engagées dans la motilité de type *swarming*, un autre comportement multicellulaire bactérien, présentent elles aussi une importante multirésistance envers les antibiotiques suggère un lien entre les comportements multicellulaires et une résistance aux antibiotiques accrue. La résistance associée à la multicellularité bactérienne offre une manière différente d'appréhender les moyens dont les bactéries disposent pour se protéger des agressions.

La résistance des bactéries en *swarming* n'a été rapportée que chez une seule espèce, *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium. Les objectifs de cette étude consistent donc en premier lieu à évaluer la résistance aux antibiotiques et à d'autres agents antimicrobiens des bactéries en *swarming* chez plusieurs autres espèces bactériennes afin de s'assurer que cette propriété est bien généralisable et, en second lieu, à tenter d'identifier des mécanismes de résistance associés au *swarming*.

Pour atteindre ces objectifs, la résistance des cellules végétatives et des cellules en *swarming* de cinq espèces, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia thailandensis*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*, a été déterminée en réalisant des antibiogrammes avec plusieurs antibiotiques de six familles différentes. D'autres agents toxiques comme des métaux lourds et le biocide triclosan ont également été testés. Par la

suite, les mécanismes de résistance associés au *swarming* ont été recherchés en utilisant *P. aeruginosa* souche PA14 comme bactérie modèle. Des mutants dans des gènes de résistance connus (gènes *mexA*, *mexC* et *mexE* codant pour des pompes à efflux, et gène *ndvB* codant pour une glycosyltransférase) ont été testés. Une banque d'environ 10 000 mutants a été générée par insertion transpositionnelle aléatoire, puis criblée partiellement. Enfin, des tests de perméabilité de la membrane externe avec une sonde fluorescente, le 1-N-phénylnaphtylamine, ont été réalisés.

Ce mémoire de maîtrise est structuré de la manière suivante : le premier chapitre présente les connaissances rapportées dans la littérature sur le sujet d'étude et son contexte, le deuxième chapitre est constitué d'un article de recherche en anglais soumis à une revue scientifique, le troisième chapitre contient la partie concernant la création et le criblage de la banque de transposants et la dernière partie comporte une conclusion sur l'ensemble des résultats obtenus.

CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

1.1.1. Problématique

Les antibiotiques ont constitué une découverte scientifique majeure du 20^e siècle et les infections bactériennes furent considérées comme désormais faciles à soigner. On pensa à tort que grâce aux antibiotiques, de nombreuses maladies bactériennes comme la syphilis et le choléra seraient éradiquées de la planète. Cependant, l'utilisation massive et non appropriée des antibiotiques au cours des années a imposé des pressions de sélection immenses sur les bactéries et il s'en est ensuivi l'émergence de souches de pathogènes résistantes, voire multirésistantes, aux antibiotiques (Kumar & Schweizer, 2005). Les gènes qui permettent aux bactéries du sol de se protéger des antibiotiques qu'elles-mêmes sécrètent, ou que d'autres bactéries produisent, pourraient avoir été l'origine des gènes de résistance (Spratt, 1994). Le phénomène de résistance s'étend rapidement, particulièrement en milieu hospitalier, où la pression des antibiotiques est constante et où plusieurs bactéries peuvent se côtoyer, propageant ainsi leurs gènes de résistance (Kumar & Schweizer, 2005). Les souches résistantes portent des altérations dans leurs chromosomes, ou ont acquis d'autres microorganismes des plasmides de résistance (plasmides R) ou des transposons porteurs de gènes de résistance (Nikaido, 1994).

1.1.2. Familles d'antibiotiques majeures

Les antibiotiques sont regroupés en familles selon que leurs cibles se trouvent sur la surface cellulaire ou à l'intérieur de la cellule (Walsh, 2003). Quatre cibles majeures des antibiotiques ont été largement validées. (1) La biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne peut être inhibée par les β -lactames et les glycopeptides de la famille de la vancomycine. Les β -lactames, par leur ressemblance structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala des peptidoglycanes, bloquent l'activité des transpeptidases impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne. Les glycopeptides agissent en se complexant avec les sous-unités de

peptidoglycanes, les rendant ainsi inaccessibles aux transpeptidases. Le blocage stérique de la transpeptidation peut également avoir des effets sur les transglycosylases impliquées dans la synthèse des peptidoglycanes. (2) La synthèse protéique peut être arrêtée par des antibiotiques qui se lient aux ribosomes. Les ribosomes bactériens peuvent être sélectivement bloqués au niveau de la sous-unité 30S par les aminoglycosides et les tétracyclines, et au niveau de la sous-unité 50S par les macrolides. (3) La réplication de l'ADN peut être bloquée par les quinolones, qui agissent en stabilisant des intermédiaires catalytiques dans les réactions catalysées par les ADN gyrases. (4) La voie de biosynthèse de l'acide folique, un élément essentiel à la synthèse des bases de l'ADN, peut être compromise par les sulfamides et le triméthoprim, qui inhibent deux enzymes de cette voie, respectivement la dihydroptéroate synthase et la dihydrofolate réductase. Quelques autres familles d'antibiotiques ayant des cibles particulières existent. Par exemple, les peptides antimicrobiens cationiques, produits aussi bien par les bactéries, les champignons, les plantes et les humains, perturbent l'intégrité de la membrane plasmique en s'y insérant et en y formant des pores. On trouve aussi les rifamycines, qui bloquent la transcription de l'ADN par l'inhibition de l'ARN polymérase bactérienne (Walsh, 2003).

1.1.3. Les mécanismes classiques de résistance aux antibiotiques

Il existe divers mécanismes de résistance aux antibiotiques. Certains mécanismes sont plutôt spécifiques à un antibiotique ou à une classe d'antibiotiques. Parmi ceux-ci, on retrouve la dégradation ou inactivation de l'antibiotique par modifications enzymatiques et l'altération de la cible de l'antibiotique. D'autres mécanismes sont plus généraux et visent à empêcher l'accès de l'antibiotique à sa cible en tirant partie des capacités de barrière et de transport actif des membranes biologiques (Nikaido, 1994).

1.1.3.1. Destruction ou modifications enzymatiques de l'antibiotique

Un exemple bien connu de ce type de mécanisme est la résistance aux β -lactames médié par les β -lactamases, des enzymes qui hydrolysent le noyau β -lactame de la molécule. Quatre classes de β -lactamases ont été répertoriées : les pénicillinases de la classe A, les métallo- β -lactamases de la classe B, les céphalosporinases de la classe C et les oxacillinases de classe D. La résistance apparaît par la dérégulation naturelle ou mutationnelle de gènes chromosomiques ou l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons)

porteurs des gènes de résistance. De manière similaire, les aminoglycosides peuvent aussi subir des modifications chimiques qui vont empêcher la liaison aux ribosomes-cibles. Ces modifications sont catalysées par des *O*-phosphotransférases, des *O*-adényltransférases ou des *N*-acétyltransférases, issues de gènes portés le plus souvent par des éléments génétiques mobiles, et parfois par le chromosome (Poole, 2002).

1.1.3.2. Modification de la cible

Plusieurs types de modification de la cible sont retrouvés chez les isolats cliniques résistants aux antibiotiques. Il s'agit le plus souvent du développement d'une forme modifiée des cibles normales ayant une résistance plus grande envers les antibiotiques. Ceci peut se produire suite à l'acquisition de gènes portés sur des plasmides ou des transposons qui vont permettre une modification enzymatique de la cible normale de manière à ce qu'elle ne puisse plus lier l'antibiotique (Spratt, 1994). C'est le cas pour la résistance aux macrolides, où le ribosome-cible est modifié par la méthylation d'un résidu adénine du domaine V de l'ARNr 23S par les *N*-méthyltransférases de la famille Erm (Poole, 2002). Alternativement, la résistance peut provenir de mutations ou de recombinaisons génétiques qui résultent en des enzymes cibles ayant des affinités réduites pour l'antibiotique. La résistance envers les fluoroquinolones a été attribuée à des modifications des cibles, l'ADN gyrase (*gyrA*) et la topoisomérase (*parC*), tandis que la résistance aux aminoglycosides comme la streptomycine peut provenir de mutations touchant des sites cibles du ribosome. La résistance envers les β -lactames est aussi souvent reliée à des altérations des cibles, les protéines de liaison à la pénicilline (Poole, 2002).

Pour quelques antibiotiques, la résistance apparaît suite à l'acquisition d'une nouvelle enzyme qui a une affinité bien plus faible pour l'antibiotique que l'enzyme cible normale. La résistance envers les sulfonamides et le triméthoprime, qui inhibent deux enzymes dans la voie de biosynthèse de l'acide folique (respectivement la dihydroptéroate synthase et la dihydrofolate réductase), apparaît grâce à ce mécanisme, bien que la ou les sources des enzymes cibles résistantes ne soi(en)t pas clair (Spratt, 1994).

1.1.3.3. Imperméabilité

Les antibiotiques doivent accéder à leurs cibles intracellulaires pour exercer leur action bactériostatique ou bactéricide (Poole, 2002). Les bactéries à Gram-positif sont entourées d'une épaisse paroi de peptidoglycane. Cette structure, bien que résistante du point de vue mécanique, empêche peu la diffusion de petites molécules comme les antibiotiques. Au contraire, les bactéries à Gram-négatif possèdent une seconde membrane, la membrane externe, qui représente une barrière de perméabilité efficace. La membrane externe est asymétrique et son feuillet externe est composé de lipopolysaccharides (LPS) plutôt que des glycérophospholipides habituellement retrouvés dans la plupart des autres membranes biologiques (Nikaido, 1994). Le LPS est constitué d'un lipide A, d'un noyau polysaccharide et de l'antigène O. Les chaînes d'acides gras dans les LPS sont toutes saturées, ce qui donne une structure ayant une faible fluidité. La nature fortement chargée négativement de l'antigène O, ainsi que les ponts formés entre les noyaux centraux via les groupes phosphonates et les cations divalents contribuent également à la faible perméabilité des LPS. Par conséquent, la membrane externe est une barrière efficace qui empêche la pénétration rapide des antibiotiques lipophiles (Nikaido, 1994; Kumar & Schweizer, 2005). Étant donné les propriétés de barrière de la membrane externe, afin de permettre l'entrée de nutriments, des structures spéciales appelées porines forment des canaux aqueux non spécifiques dans la membrane externe. Les antibiotiques hydrophiles comme le chloramphénicol et les fluoroquinolones peuvent traverser la membrane externe par les porines. Ainsi, des changements au niveau du nombre de porines, de leur taille ou de leur sélectivité peuvent changer les taux de diffusion de ces antibiotiques. De nombreux exemples de résistance accrue aux antibiotiques due à une perte de porines ou à des mutations rendant le canal central plus étroit ont été rapportés (Kumar & Schweizer, 2005). Par exemple, l'imipenem, un β -lactame non classique, exerce son activité sur *Pseudomonas aeruginosa* après sa diffusion à travers un canal spécifique, OprD, dont la fonction physiologique semble être le transport des acides aminés basiques. Une large fraction des souches de *P. aeruginosa* isolées dans les hôpitaux présentant une résistance à ce composé sont devenues résistantes suite à la perte du canal OprD (Nikaido, 1994).

Des modifications de la surface cellulaire peuvent également aider à exclure de la bactérie certains antibiotiques. Chez certaines bactéries à Gram-négatif, la résistance envers les peptides antimicrobiens cationiques est médiée par l'opéron *pmrHFIJKLM*, qui est

responsable de l'addition de résidus 4-aminoarabinose sur les lipides A des LPS. Ces résidus de charge positive font ainsi diminuer la charge négative des LPS, ce qui, par conséquent, diminue le potentiel de liaison des antibiotiques polycationiques (McCoy *et al.*, 2001; Tamayo *et al.*, 2002). Chez les bactéries à Gram-positif, la résistance aux peptides antimicrobiens peut aussi impliquer l'ajout de résidus chargés positivement (Peschel & Sahl, 2006). Par exemple, l'opéron *dlt* de *Staphylococcus aureus* neutralise les charges négatives des acides téichoïques et lipotéichoïques de la paroi cellulaire en ajoutant des résidus D-alanine (Peschel *et al.*, 1999).

Cependant, malgré ces propriétés de barrière efficace, pour arriver à des taux de résistance significatifs, la membrane externe doit souvent fonctionner en synergie avec d'autres mécanismes, comme des β -lactamases ou plus couramment, une pompe à efflux (Nikaido, 1994, 1998; Poole, 2002).

1.1.3.4. Pompes à efflux

Les systèmes d'efflux bactériens peuvent pomper hors du cytoplasme une série de composés chimiquement et structurellement différents, sans les altérer ou les dégrader. La résistance envers les agents antimicrobiens procurée par les systèmes d'efflux a été rapportée chez un grand nombre d'espèces bactériennes. Les substrats des pompes incluent plusieurs antibiotiques, solvants et biocides (un biocide étant un produit chimique doté d'une activité antiseptique, désinfectante et/ou préservative, et ayant des cibles cellulaires multiples (Russell, 2003)). Les pompes à efflux sont classées en cinq familles : (1) la superfamille des MFS (*major facilitator superfamily*), (2) la superfamille des ABC (*adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette superfamily*), (3) la famille des SMR (*small multidrug resistance family*), (4) la superfamille des RND (*resistance-nodulation-cell division superfamily*) et (5) la famille des MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*) (Kumar & Schweizer, 2005). Les systèmes d'efflux peuvent être composés d'une ou plusieurs composantes. Les pompes à une composante transportent leur substrat à travers la membrane cytoplasmique. Celles à plusieurs composantes, qu'on retrouve chez les bactéries à Gram-négatif, fonctionnent en association avec une protéine de fusion périplasmique (MFP) et une protéine de la membrane externe (OMP), et transportent le substrat à travers toute l'enveloppe cellulaire. (Kumar & Schweizer, 2005). Chez *P. aeruginosa*, le système

MexAB-OprM (pompe de type RND) contribue à la résistance intrinsèque élevée des souches sauvages et possède la gamme de substrats la plus étendue de toutes les pompes de cet organisme. Les substrats de cette pompe incluent les β -lactames, les inhibiteurs de β -lactamases, les quinolones, les macrolides, la tétracycline, le chloramphénicol, la novobiocine, les sulfonamides, le triméthoprim et la thiolactomycine (Nikaido, 1994; Kumar & Schweizer, 2005). La surexpression d'une pompe peut amener à une résistance encore plus grande. Par exemple, chez *Escherichia coli*, la surexpression de la pompe principale AcrAB est due à la production plus élevée de MarR, un régulateur global qui réagit à la présence d'antibiotiques dans l'environnement. Dans d'autres cas, des résistances acquises peuvent provenir de mutations dans des gènes régulateurs, ce qui entraîne l'hyperexpression de pompes à efflux (Poole & Srikumar, 2001).

1.3. LA MULTICELLULARITÉ CHEZ LES BACTÉRIES

Les bactéries sont des organismes unicellulaires qui vivent de manière solitaire et indépendamment les unes des autres : c'est la vision qui a largement dominé la microbiologie depuis ses débuts. En réalité, plutôt que de mener une vie planctonique indépendante, dans leurs environnements naturels, les bactéries démontrent une affinité envers les surfaces et s'organisent typiquement en communautés complexes au sein de biofilms (Davey & O'Toole, 2000). Le biofilm consiste en une population microbienne attachée à une surface et enveloppée d'une matrice extracellulaire sécrétée par les bactéries et composée d'exopolymères (Davey & O'Toole, 2000; Drenkard, 2003). D'autres comportements collectifs ont été retrouvés chez plusieurs espèces bactériennes sous diverses conditions. Ainsi, la vision des populations bactériennes en tant qu'organismes multicellulaires proposée par Shapiro (1998) commence à prévaloir en microbiologie. Toujours selon Shapiro (1998), la clé de la multicellularité repose sur la capacité de chaque cellule à recevoir, interpréter et répondre à l'information provenant de ses voisines. La découverte de la capacité des bactéries à communiquer entre elles à travers les systèmes de *quorum sensing* (QS) a renforcé cette notion de coopération bactérienne.

Le QS est dépendant de la densité bactérienne et se fait par l'intermédiaire de molécules-signal, appelées autoinducteurs (Suga & Smith, 2003; Ruimy & Andremont,

2004). Chez les bactéries à Gram-négatif, les molécules de communication sont des acylhomosérines lactones, qui diffusent librement à travers les membranes bactériennes ou qui sont activement pompées hors de la cellule (Withers *et al.*, 2001), et chez les bactéries à Gram-positif, ce sont de petits peptides qui sont sécrétés à l'extérieur par un transporteur ABC (*ATP-binding cassette*) (Schauder & Bassler, 2001; Otto, 2004). Le QS est un moyen qui permet aux bactéries de contrôler l'expression de gènes au niveau de la communauté entière. Cette coordination à travers ce système de communication leur permet d'agir à la manière d'un organisme multicellulaire (Schauder & Bassler, 2001). Le QS permet aux bactéries de synchroniser des activités aussi diverses que la virulence (Suga & Smith, 2003), la bioluminescence, la symbiose, la production d'antibiotiques (Schauder & Bassler, 2001), la motilité de type *swarming* (Daniels *et al.*, 2004) et la formation de biofilms (Hentzer *et al.*, 2003; Hentzer & Givskov, 2003).

Le QS sert ainsi à réguler l'organisation des bactéries individuelles en structures complexes. En particulier, l'agrégation en biofilm permet une division des tâches et une différenciation cellulaire, une démarche qui s'apparente à un processus développemental multicellulaire (Stewart & Costerton, 2001).

1.4. LES BIOFILMS BACTÉRIENS

1.4.1. Qu'est-ce qu'un biofilm bactérien ?

Un biofilm peut se retrouver sur n'importe quelle surface en contact avec de l'eau qu'elle soit biotique (racines de plantes, tractus intestinal ou autres tissus corporels) ou abiotique (roche, coque de bateau, tuyaux). Le biofilm est composé de denses communautés bactériennes attachées à une surface et enveloppées dans une matrice extracellulaire d'exopolymères (Drenkard, 2003). Les biofilms constituent des systèmes biologiques extrêmement organisés avec des communautés structurées, coordonnées et fonctionnelles. Ce comportement multicellulaire nécessite des interactions et des communications intercellulaires entre une ou même plusieurs populations bactériennes (Davey & O'Toole, 2000).

Dans les hôpitaux, la colonisation de matériel médical comme les cathéters veineux centraux, les cathéters urinaires ou autres implants médicaux par des biofilms pose un

problème important. Les biofilms causent des bactériémies qui perdurent malgré l'usage d'antibiotiques, et ce, jusqu'au retrait de la surface colonisée (Stewart & Costerton, 2001). Il est maintenant estimé que plus de 60 % de toutes les infections bactériennes impliquent des biofilms (Hentzer *et al.*, 2003). La pneumopathie des sujets atteints de la fibrose kystique, la parodontite, l'endocardite ou encore l'ostéomyélite sont quelques exemples d'infections persistantes associées à des biofilms (Drenkard, 2003). Une des caractéristiques importantes d'un biofilm est sa résistance envers les antibiotiques, les désinfectants et la réponse immunitaire de l'hôte. Les bactéries au sein de biofilms peuvent présenter une résistance aux composés antibactériens des centaines, voire des milliers de fois plus élevée que les bactéries planctoniques (Stewart & Costerton, 2001). Lorsque les bactéries sont dispersées du biofilm, elles retrouvent par contre rapidement leur sensibilité aux antibiotiques, indiquant que la résistance en biofilm n'est due ni à des mutations, ni à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (Stewart & Costerton, 2001). Etant donné les niveaux élevés de résistance d'un biofilm, les mécanismes de résistance des biofilms semblent différents de ceux employés par les bactéries planctoniques. La résistance des biofilms n'est pas encore complètement élucidée, mais serait attribuable à une combinaison de plusieurs mécanismes (Drenkard, 2003).

1.4.2. Mécanismes de résistance des biofilms

1.4.2.1. Matrice

La matrice d'exopolysaccharides en elle-même forme une barrière limitant la diffusion de certains antibiotiques à l'intérieur du biofilm. Elle ne constitue cependant pas le mécanisme de résistance majeur puisque, bien que les aminoglycosides y pénètrent moins facilement, d'autres comme les fluoroquinolones diffusent dans la matrice sans aucun délai (Drenkard, 2003).

1.4.2.2. Hétérogénéité

Dans un biofilm, la densité cellulaire importante crée des gradients de nutriments et d'oxygène dans la structure de celui-ci. Ceci résulte en une population bactérienne hétérogène ayant des activités métaboliques différentes. L'hétérogénéité de la population d'un biofilm semble jouer un rôle important dans la protection (Stewart & Costerton, 2001).

Les bactéries qui ont un taux de croissance faible ou nul sont protégées des antibiotiques comme les β -lactames, qui ne sont efficaces que contre les bactéries en croissance (Tuomanen *et al.*, 1986). Une large proportion de la population du biofilm expérimente une limitation en oxygène, particulièrement dans les couches profondes du biofilm. Il est connu que certains antibiotiques, comme les aminoglycosides, sont moins efficaces en conditions anaérobies qu'en aérobies (Tack & Sabath, 1985). L'absence d'oxygène pourrait déclencher des modifications physiologiques et phénotypiques rendant les bactéries en biofilm plus résistantes aux antibiotiques. De plus, les conditions dans le biofilm (manque de nutriments, accumulation de déchets métaboliques, pH) pourraient induire les mécanismes de réponse au stress, ce qui permettrait une protection contre les stress environnementaux et les agents antimicrobiens (Drenkard, 2003). Effectivement, il a été rapporté que l'action de la ciprofloxacine et de la tobramycine sur les biofilms de *P. aeruginosa* n'agissaient que dans les zones où la concentration en oxygène était plus élevée et les bactéries métaboliquement actives (Walters *et al.*, 2003).

1.4.2.3. Phénotypes particuliers

Les bactéries qui s'attachent à une surface subissent un grand nombre de changements physiologiques, métaboliques et phénotypiques. Les bactéries dans un biofilm présentent un phénotype spécifique, avec des expressions protéiques et génétiques différentes des bactéries planctoniques (Drenkard, 2003). Par exemple, chez *P. aeruginosa*, Whiteley *et al.* (2001) ont trouvé que des gènes de bactériophage et des gènes codant pour des protéines impliquées dans la traduction, le métabolisme, le transport à travers les membranes et la régulation de gènes étaient induits en mode biofilm, tandis que les gènes de synthèse des pili et des flagelles étaient réprimés. Suite à l'exposition des biofilms à de la tobramycine, l'expression de 20 gènes a été modifiée (14 activés et six réprimés), dont 12 gènes codant pour des protéines hypothétiques de fonctions inconnues. Ces derniers représentent de bons candidats dans la recherche des mécanismes de résistance des biofilms. Le gène *tolA*, dont le produit fait diminuer l'affinité des aminoglycosides avec la membrane externe en affectant la structure du LPS, est surexprimé dans un biofilm. Des gènes impliqués dans la réponse au stress (*dnaK*, *groES*) et des gènes codant pour deux pompes à efflux hypothétiques sont aussi activés. Les gènes codant pour la cytochrome c oxydase sont par contre réprimés. En

croissance aérobie, la cytochrome c oxydase sert d'accepteur terminal des électrons et sa répression devrait diminuer la sensibilité de *P. aeruginosa* aux aminoglycosides. Ces auteurs ont formulé l'hypothèse que le biofilm permet un niveau de résistance modéré à tous les agents antimicrobiens, ceci donnant l'opportunité au biofilm d'induire, en cas d'exposition à un antibiotique donné, des gènes de résistance spécifiques à celui-ci.

D'autres composantes génétiques expliquant en partie la résistance des biofilms ont été découvertes. Mah *et al.* (2003) ont rapporté qu'un gène de *P. aeruginosa* PA14 nommé *ndvB* était surexprimé en mode biofilm. Un mutant *ndvB* forme un biofilm d'une architecture normale, mais qui est plus sensible à cinq antibiotiques de trois familles structurellement différentes. En culture liquide, la croissance de ce mutant et sa sensibilité envers les antibiotiques sont similaires à celles de la souche sauvage. Le gène *ndvB* code pour une glucosyltransférase nécessaire pour la synthèse de glucanes périplasmiques cycliques. Localisés dans le périplasma et pouvant également être sécrétés dans le milieu extracellulaire, les glucanes périplasmiques cycliques sont capables de lier et de séquestrer hors du cytoplasme les antibiotiques comme la tobramycine. La production de glucanes périplasmiques cycliques a ainsi été proposée comme mécanisme de résistance spécifique aux biofilms.

Ainsi, l'induction de gènes spécifiques au biofilm pourrait mener à un phénotype particulier avec l'activation de mécanismes permettant la résistance aux agents antimicrobiens (Drenkard, 2003).

1.4.2.4. Les persisters et les variants phénotypiques

Il a été noté que bien que les antibiotiques puissent tuer rapidement la majorité des bactéries d'un biofilm, il existe une fraction de cellules (1% ou moins de la population originale) capables de survivre et persister malgré une exposition prolongée à l'antibiotique. Brooun *et al.* (2000) ont de ce fait évoqué l'existence d'une fraction de cellules « superrésistantes » qui seraient responsables des hauts taux de résistance des biofilms. Cette petite proportion des cellules d'un biofilm, appelées « *persister variants* », se différencieraient en une population ayant un état phénotypique unique extrêmement protégé, rappelant celui d'une spore (Stewart & Costerton, 2001). Les *persisters*, cellules dormantes qui ne croissent pas et qui ne meurent pas en présence d'agents bactéricides, sont de rares

cellules spécialisées dont la production apparaît être régulée par le stade de croissance de la population (Lewis, 2005). En effet, une population en début de phase logarithmique ne produit pratiquement pas de *persisters*. Le taux de *persisters* augmente au fur et à mesure que la population atteint la phase de croissance stationnaire (Spoering & Lewis, 2001). L'hypothèse avancée pour expliquer la survie des *persisters* suggère un mécanisme de « tolérance », plutôt que de « résistance ». Les mécanismes de résistance aux antibiotiques visent essentiellement à empêcher l'antibiotique d'atteindre sa cible. Dans le cas des *persisters*, le mécanisme n'empêcherait pas l'antibiotique de se lier à sa cible, mais inactiverait toutes les cibles des antibiotiques de manière à bloquer l'action létale des cibles corrompues. Les profils d'expression de *persisters* chez *E. coli* ont révélé une expression élevée de modules « toxine-antitoxine » (TA) et d'autres gènes capables de stopper d'importantes fonctions cellulaires. Les modules TA sont encodés par un opéron de deux gènes, avec l'« antitoxine » agissant généralement en tant que répresseur. La « toxine » est une protéine qui inhibe d'importantes fonctions cellulaires comme la traduction des protéines ou la réplication, et qui devient inactive lorsqu'elle se lie avec l'« antitoxine ». Lorsqu'un antibiotique bactéricide se lie à sa protéine cible, il compromet la fonction de la cible, ce qui génère des produits létaux pour la cellule (par exemple, les aminoglycosides bloquent la traduction en se liant aux ribosomes, ce qui résulte en des protéines tronquées qui endommagent la cellule). Les *persisters* seraient de rares cellules exprimant des taux élevés de « toxines ». La tolérance des *persisters* serait due à la liaison de « toxines » avec les cibles d'antibiotiques : les antibiotiques pourront toujours se lier avec leurs cibles (bloquées par les « toxines »), mais ne pourront plus corrompre ses fonctions, d'où la tolérance. Le gène *hipA*, qui fait partie du module TA *hipBA*, a été le premier gène de *persisters* validé. La délétion de *hipAB* induit une forte diminution de la production de *persisters* des cellules en phase stationnaire et en mode biofilm (Lewis, 2005).

Chez *P. aeruginosa*, il a aussi été trouvé des variants phénotypiques résistants à de fortes concentrations d'antibiotiques à une fréquence d'environ 10^{-6} . Il a été proposé que ceux-ci soient partiellement responsables des niveaux élevés de résistance dans les biofilms. La variation phénotypique et la résistance aux antibiotiques semblent reliées. En effet, la protéine de régulation *pvrR*, qui contrôle la conversion entre une forme résistante aux

antibiotiques et une forme susceptible, régulerait également la formation de biofilm et la résistance aux antibiotiques (Drenkard & Ausubel, 2002).

Ces deux variants seraient capables d'assurer la survie des biofilms aux traitements antimicrobiens : les *persisters* par leur capacité à survivre à l'action des agents antimicrobiens et les variants phénotypiques par leur aptitude à croître normalement en présence de concentrations élevées d'antibiotiques (Drenkard, 2003).

Les bactéries bénéficient donc de propriétés nouvelles grâce à la vie en communauté et il semblerait même qu'un ou des phénotypes particuliers émergent au cours de cette organisation. Même si les mécanismes de résistance des biofilms ne sont pas tous connus, il paraît évident que c'est la nature multicellulaire du biofilm qui confère la protection contre les agressions extérieures. L'observation du retour de la susceptibilité aux antibiotiques des cellules retirées d'un biofilm souligne la nature collective de la défense.

Ainsi, une meilleure compréhension de la multicellularité microbienne est nécessaire pour développer des stratégies thérapeutiques visant le traitement des infections associées aux biofilms (Stewart et Costerton, 2001).

1.5. LES TYPES DE MOTILITÉ CHEZ LES BACTÉRIES

La motilité a depuis longtemps été observée sur les géloses solides communément utilisées pour cultiver les microorganismes. En 1972, Henrichsen répertorie six types de translocation bactérienne sur les surfaces : le *swimming*, le *swarming*, le *gliding*, le *twitching*, le *sliding* et le *darting*.

Le *swimming* est un comportement individuel qui se retrouve dans un milieu liquide ou à faible concentration d'agar. Les bactéries se propulsent à l'aide de leurs flagelles de manière désorganisée (Henrichsen, 1972). Les flagelles sont des organelles de locomotion qui sortent de la surface cellulaire. Un flagelle se compose d'un long filament, d'un crochet et d'un corps basal qui est enfoui dans la cellule. Le moteur situé à la base du flagelle, fonctionnant grâce à une force proton-motrice, permet un déplacement relativement linéaire s'il tourne dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. Une rotation du moteur dans le sens opposé résulte en un mouvement de culbutage, qui va permettre à la bactérie de réorienter sa trajectoire relativement aléatoire (Harshey, 2003).

Le *swarming* représente de loin le type de motilité le plus rapide parmi tous les autres. Tout comme le *swimming*, le *swarming* nécessite la présence de flagelles mais se distingue par son caractère multicellulaire et une morphologie cellulaire particulière. Les bactéries passent par une différenciation cellulaire importante : elles deviennent hyperflagellées, multinuclées et généralement plus allongées que dans leur forme végétative (Harshey, 2003). Ces cellules différenciées sont appelées *swarmers*. Le *swarming* est une activité coordonnée d'un groupe de bactéries puisque les cellules différenciées isolées ne se déplacent pratiquement pas (Henrichsen, 1972). On peut observer du *swarming* optimal sur des milieux semi-solides à 0,5-0,7% d'agar, bien que certaines espèces des genres *Proteus*, *Vibrio* et *Clostridium* soient capables de faire du *swarming* sur des géloses à 1,5%-2% d'agar (Sharma & Anand, 2002; Harshey, 2003). Généralement, un biosurfactant est produit pour abaisser la tension de surface et faciliter le déplacement sur la surface mouillée. On retrouve par exemple la serrawettin chez *Serratia marcescens*, la surfactine chez *Bacillus subtilis* et les rhamnolipides chez *P. aeruginosa* (Daniels *et al.*, 2004).

Le *twitching* est un autre exemple de motilité sociale. Tout comme dans le *swarming*, les bactéries s'alignent en radeaux et migrent en suivant l'axe longitudinal des cellules. On ne retrouve par contre pas de différenciation cellulaire et les flagelles ne sont pas nécessaires (Henrichsen, 1972). Le *twitching* résulte de l'extension et de la rétraction des pili de type IV. Ces appendices, mesurant jusqu'à 4 µm de long et d'un diamètre de 6 nm, se retrouvent typiquement à l'un ou aux deux pôles des cellules (Harshey, 2003). Chez *Myxococcus xanthus*, le *twitching* peut aussi bien permettre la colonisation d'un milieu riche que le rapprochement des cellules visant à la formation d'organes de fructification en conditions appauvries (Harshey, 2003).

Le *gliding* s'observe seulement chez les bactéries non flagellées ; on le retrouve particulièrement dans trois groupes bactériens, les myxobactéries, les cyanobactéries, et dans le groupe des *Cytophaga-Flavobacterium*. Plusieurs hypothèses existent quant aux mécanismes impliqués, mais aucune évidence ne permet d'en valider une en particulier (Harshey, 2003).

Le *sliding* est un mode translocation passif qui met en jeu les forces d'expansion d'une colonie grandissante aidé par une surface de tension réduite possiblement par la production de surfactants comme des lipopeptides, lipopolysaccharides et des glycolipides. Il

s'agit du déplacement d'une couche dense et uniforme de cellules, sans qu'il y ait un mouvement des cellules les unes par rapport aux autres (Henrichsen, 1972).

L'observation de *darting* a été faite chez seulement des *staphylococci*. Le phénomène de *darting* serait dû à l'éjection de paires de coques en dehors des agrégats cellulaires provoquée par des tensions créées par la multiplication cellulaire. Henrichsen (1972) précise que pour le *sliding* et le *darting*, on parle de « mouvement cellulaire » (*cell motion*) plutôt que « motilité ». Le *darting* n'a jamais fait l'objet d'études poussées (Harshey, 2003).

1.6. LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING

1.6.1. Le *swarming* chez les bactéries

1.6.1.1. *Swarming* et différenciation cellulaire

Le *swarming* est un type de motilité sociale permettant une migration rapide et coordonnée d'une population bactérienne sur une surface. Le *swarming* a d'abord été rapporté chez *Proteus mirabilis* il y a plus d'un siècle. Depuis, ce type de motilité a pu être observé chez un grand nombre d'espèces, aussi bien à Gram-négatif qu'à Gram-positif, appartenant à divers genres bactériens dont les genres *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Vibrio* (Harshey, 1994; Sharma & Anand, 2002). Comme mentionné précédemment, le *swarming* est caractérisé par la différenciation cellulaire marquée qui précède la migration. Les cellules *swarmers* sont toujours hyperflagellées, et sont généralement allongées et d'apparence multinuclées. Les cellules restent en contact intime les unes avec les autres et migrent en radeaux multicellulaires selon l'axe longitudinal des cellules. Le *swarming* le plus actif se retrouve à la périphérie du front de migration. C'est à ce niveau que sont observées les cellules les plus allongées et les plus flagellées. Au centre de la colonie, on trouve des cellules moins mobiles qui ont une morphologie plus proche du stade végétatif (Harshey, 1994, 2003). Une colonie en *swarming* est ainsi constituée de cellules spécialisées organisées en sous-populations (Eberl *et al.*, 1999). Le phénotype *swarming* est transitoire et le transfert de cellules différenciées de la surface de l'agar à un milieu de culture liquide les ramène rapidement à leur forme végétative (Harshey, 1994, 2003).

L'aspect macroscopique des colonies en *swarming* varie selon plusieurs facteurs (Fig.1.1) : l'espèce bactérienne, le milieu de culture, la concentration d'agar (la quantité d'eau) et la température d'incubation (Harshey, 1994). Chez *P. mirabilis*, le *swarming* est caractérisé par la formation de cercles concentriques d'une étonnante régularité. Ceux-ci sont causés par des cycles temporels : une vague de *swarming* est suivie d'une période de consolidation, pendant laquelle les bactéries se différencient en cellules végétatives avant de repartir une nouvelle phase de *swarming* (Rauprich *et al.*, 1996). Chez d'autres espèces comme *B. subtilis* (Julkowska *et al.*, 2004, 2005), *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007) et *Serratia liquefaciens* (Eberl *et al.*, 1999), on peut voir un *swarming* d'apparence « dendritique ». D'autres espèces présentent quant à elles un *swarming* en couche fine qui avance continuellement (Harshey, 1994).

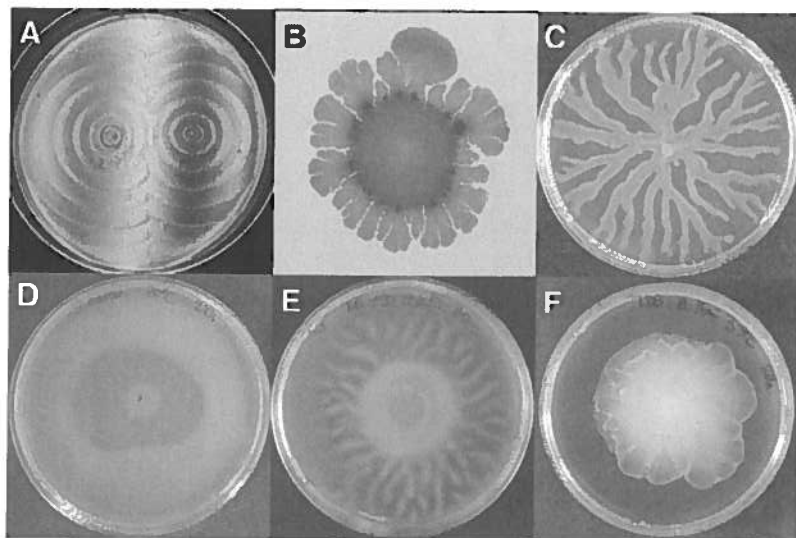


Figure 1.1. L'aspect macroscopique des colonies en *swarming* varie selon les espèces et le milieu de culture. (A) *P. mirabilis* (deux inocula; Rauprich *et al.*, 1996), (B) *B. subtilis* (Julkowska *et al.*, 2004), (C) *P. aeruginosa* (Laboratoire Éric Déziel), (D) *S. marcescens* (Laboratoire Éric Déziel), (E) *E. coli* (Laboratoire Éric Déziel) et *Burkholderia thailandensis* (Laboratoire Éric Déziel).

1.6.1.2. Stimuli induisant le swarming

Plusieurs facteurs induisent la différenciation en cellules *swarming*, mais il semblerait que le stimulus le plus important soit de nature physique. Le contact avec une surface et l'augmentation de la viscosité du milieu déclenchent l'apparition du phénotype *swarmer* chez *P. mirabilis* (Allison *et al.*, 1993), *S. marcescens* (Alberti & Harshey, 1990) et *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter & Silverman, 1990). Chez ce dernier, il a été montré que le flagelle polaire agit comme senseur mécanique capable de détecter des forces externes limitant son mouvement (par exemple, un milieu visqueux ou une surface). Toute condition restreignant le flagelle polaire provoque la différenciation en cellules *swarmers* (McCarter & Silverman, 1990). Le phénomène de *swarming* n'apparaît pas en réponse à un manque de nutriments; on le retrouve au contraire plus facilement sur des milieux riches (Harshey, 1994). Par contre, il est probable qu'il s'agisse bien d'un changement de comportement en réponse à des facteurs environnementaux particuliers. Chez *V. parahaemolyticus*, une limitation en fer dans le milieu est un second signal induisant la différenciation en *swarmers* (McCarter & Silverman, 1990) et chez *P. mirabilis*, un acide aminé spécifique, la glutamine, est capable d'induire le *swarming* (Allison *et al.*, 1993). Plusieurs espèces telles que *Salmonella typhimurium*, *S. marcescens*, *E. coli* ne sont pas capables de réaliser un *swarming* optimal sur un milieu minimal, ce qui suggère que des signaux nutritionnels pourraient également être employés par ces organismes (Harshey, 1994).

1.6.1.3. Régulation génétique du swarming

Deux systèmes régulateurs-clés du comportement de *swarming* ont été identifiés : (1) l'opéron régulateur de flagelles *flhDC*, qui contrôle la voie développementale du *swarming*, et (2) un système de QS, qui dirige la voie biosynthétique du *swarming* (Eberl *et al.*, 1999).

◆ La voie développementale

L'opéron *flhDC* code pour deux régulateurs transcriptionnels, FlhD et FlhC, qui contrôlent l'expression d'environ 50 gènes en relation avec la structure du flagelle, le chimiotactisme et la division cellulaire. Un mutant *flhDC* de *S. liquefaciens* ne présente aucun flagelle et n'est capable de faire ni du *swimming*, ni du *swarming*. La surexpression de *flhDC* en milieu liquide induit une différenciation en cellules filamenteuses multinucléées et

hyperflagellées ressemblant fortement à celles qu'on peut isoler au bout d'un front de *swarming*. Ainsi, la stimulation artificielle de *flhDC* induit la différenciation cellulaire en cellules *swarmers* sans avoir à passer par le prérequis, normalement obligatoire, du contact avec une surface. Ceci montre que la détection du contact avec une surface est bien un stimulus majeur pour la différenciation des cellules végétatives en *swarmers* et que ceci passe par l'opéron *flhDC*. Plusieurs autres études avec *P. mirabilis* et *Yersinia enterocolitica* ont montré que l'opéron *flhDC* constitue effectivement un régulateur majeur du comportement de *swarming* (Eberl *et al.*, 1999).

◆ La voie biosynthétique

Le *swarming* est un phénomène dépendant de la densité cellulaire et nécessite un système de QS fonctionnel afin de contrôler la production du biosurfactant nécessaire au conditionnement de la surface. Chez les bactéries à Gram-négatif, dont les systèmes de communication sont mieux connus, les systèmes de QS sont de type LuxI/LuxR et les molécules servant à la communication (aussi appelées autoinducteurs) sont des acylhomosérines lactones (AHLs) (Fig. 1.2). Le QS nécessite deux protéines : une *N*-acyl-homosérine lactone synthase (famille de LuxI) et un facteur de transcription (famille de LuxR) dont l'activité est dépendante des AHLs (Miller & Bassler, 2001). Les AHLs produites par la synthase de la famille LuxI peuvent traverser librement les membranes bactériennes ou sont activement pompées hors de la cellule (Withers *et al.*, 2001). Lorsque la quantité d'AHLs dans le milieu devient élevée (signe d'une forte densité cellulaire) et atteint un seuil critique suffisant pour la détection et la liaison des AHLs aux homologues de LuxR, l'interaction de LuxR avec les AHLs induit une dimérisation et met à jour le site de liaison à l'ADN de LuxR. Le complexe LuxR/AHL activé déclenche la transcription de gènes cibles (Miller & Bassler, 2001; Withers *et al.*, 2001). Le complexe LuxR/AHL stimule aussi la transcription du gène de la synthase LuxI, créant ainsi une boucle de rétroaction positive (Miller & Bassler, 2001).

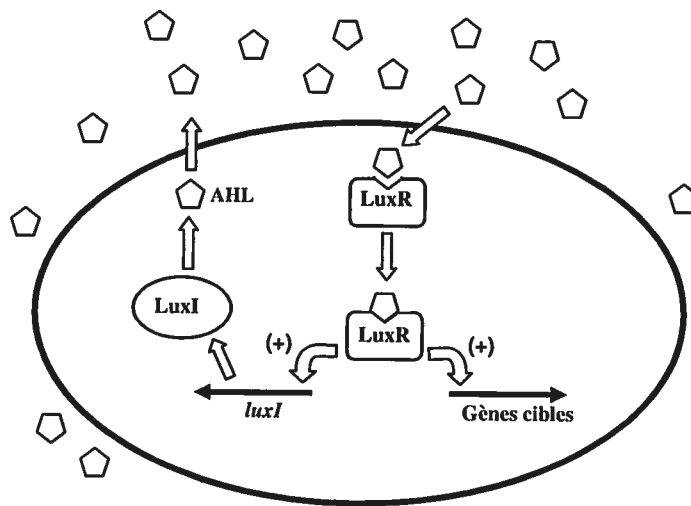


Figure 1.2. Système de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR des bactéries à Gram-négatif. La synthèse homologue de LuxI produit les autoinducteurs, les acylhomosérines lactones (AHL), qui sont relâchées dans le milieu. Les AHLs s'accumulent en cas de forte densité cellulaire. À une forte concentration des autoinducteurs, les homologues de LuxR lient les AHLs et le complexe LuxR/AHL se lie aux promoteurs des gènes cibles pour activer leur transcription. Ce complexe active également la transcription du gène de la synthase *luxI*, créant ainsi une boucle de rétroaction positive.

Afin de se mouvoir sur une surface, les bactéries doivent surmonter la tension de surface créée par l'eau autour de la colonie (Matsuyama & Nakagawa, 1996). Les bactéries en *swarming* vont souvent préalablement conditionner la surface en produisant des composés tensioactifs qui vont agir en tant qu'agents mouillants (Matsuyama *et al.*, 1992; Mendelson & Salhi, 1996; Toguchi *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003). Les bactéries du genre *Serratia* produisent des lipopeptides extracellulaires appelés serrawettins (Matsuyama *et al.*, 1992; Matsuyama *et al.*, 1995). Chez *S. liquefaciens*, la production du biosurfactant, la serrawettin W2, par le complexe enzymatique SwrA est sous le contrôle du système de QS *swrI/swrR*. Une mutation dans *swrI* réduit considérablement la capacité de *swarming* de la souche, sans pour autant affecter la capacité des cellules à se différencier en *swarmers* lorsqu'exposées à une surface. Le *swarming* du mutant *swrI* peut être déclenché par l'ajout d'AHLs exogènes ou par l'addition de serrawettin W2 purifiée. En fait, un double mutant *swrI swrA* peut

arriver à réaliser du *swarming* simplement si le milieu est supplémenté avec un surfactant, que ce soit la serrawettin W2, la serrawettin W1 (biosurfactant produit par *S. marcescens*), la surfactine (biosurfactant produit par *B. subtilis*) ou des surfactants synthétiques, comme le sodium dodécyl sulfate ou le Nonidet P-40 (Eberl *et al.*, 1999). Ceci démontre l'importance de la production de molécules servant à abaisser la tension de surface. Chez d'autres bactéries, on retrouve le même contrôle de la production de biosurfactants par un système de QS : le système *smaI/smaR* chez *S. marcescens*, *rhlI/rhlR* chez *P. aeruginosa*, et chez la bactérie à Gram-positif *B. subtilis*, le système de QS basé sur la phéromone ComX (Daniels *et al.*, 2004).

En résumé, la voie développementale et la voie biosynthétique sont collectivement responsables du comportement de *swarming*. L'opéron régulateur de flagelles *flhDC* est responsable de la différenciation des cellules végétatives en cellules *swarmers*. Lorsque les cellules de la colonie atteignent une densité fortement élevée, la stimulation du système de QS déclenche la transcription des gènes responsables de la production d'un biosurfactant. Ce dernier réduit la tension de surface du milieu, ce qui permet ainsi la migration des cellules *swarmers* sur la surface. Parallèlement, un métabolisme générateur d'énergie est aussi requis pour le comportement de *swarming* (Eberl *et al.*, 1999; Sharma & Anand, 2002). Ces étapes sont illustrées à la figure 1.3.

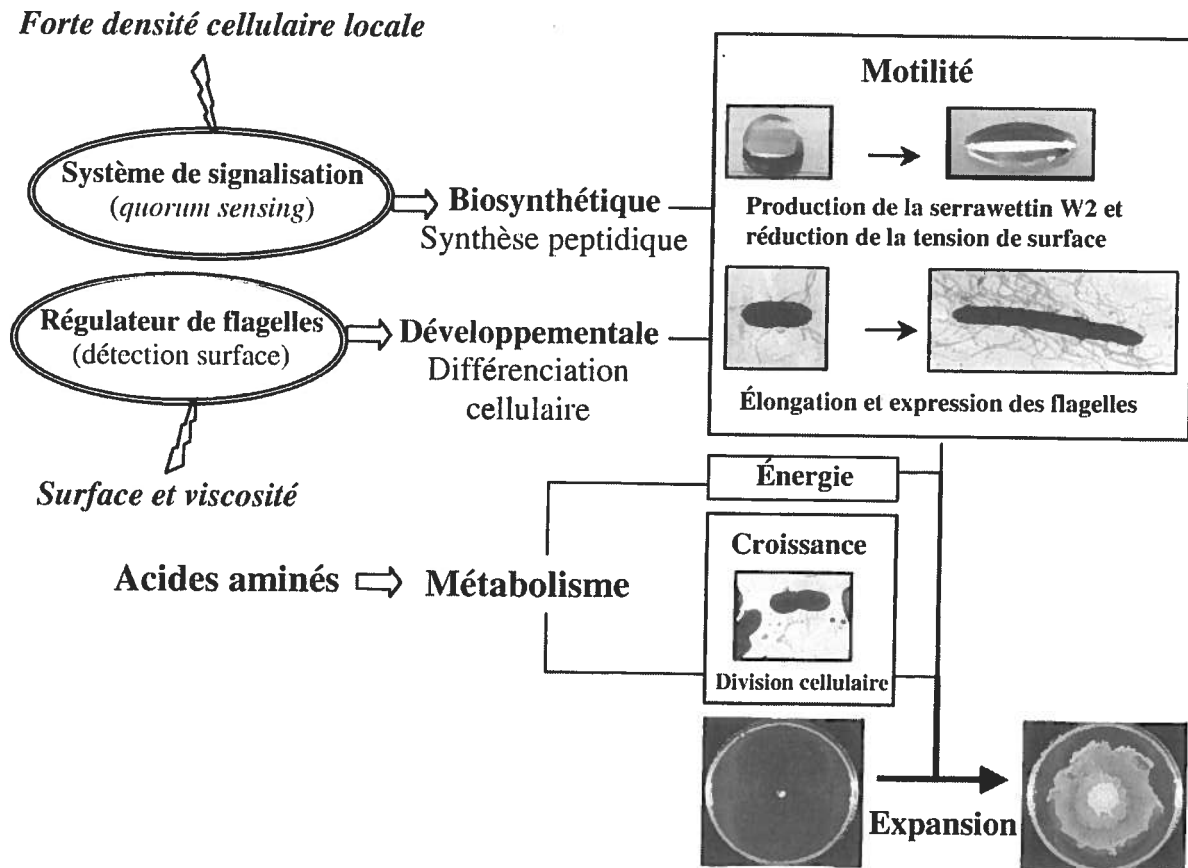


Figure 1.3. Résumé des deux systèmes de régulation majeurs (ovales) impliqués dans la différenciation cellulaire et la motilité de type *swarming* chez *S. liquefaciens*. Les stimuli inducteurs (éclaircs) pointent vers leurs systèmes de détection respectifs. Les grandes flèches blanches indiquent les voies ciblées par les systèmes régulateurs. Les rectangles résument les processus biologiques dont la combinaison amène à l'expansion de la colonie. Figure adaptée de Eberl *et al.*, 1999.

1.6.1.4. Implication du *swarming* dans la virulence

Le rôle exact du *swarming* demeure encore imprécis. La prévalence du *swarming* chez les eubactéries suggère que ce type de motilité joue un rôle important dans la colonisation des environnements naturels par les microorganismes (Harshey, 1994). Plusieurs indices suggèrent une implication du *swarming* dans la colonisation de l'hôte et la virulence bactérienne. Chez l'uropathogène *P. mirabilis*, le *swarming* facilite l'ascension du tractus urinaire et les cellules différenciées en *swarmers* constituent une forme cellulaire

invasive pour les cellules urothéliales humaines (Allison *et al.*, 1992b; Allison *et al.*, 1994). On observe également une expression coordonnée des flagelles et des facteurs de virulence. Ainsi, la différenciation en cellules *swarmers* hyperflagellées chez *P. mirabilis* est liée à une surproduction de protéines de virulence, comme des hémolysines, uréases et métalloprotéases (Allison *et al.*, 1992a). Chez *S. liquefaciens*, l'expression des flagelles est couplée à la synthèse et la sécrétion d'une phospholipase extracellulaire (Givskov *et al.*, 1995) tandis que chez *S. typhimurium*, la régulation des flagelles est liée à celle d'un système de sécrétion de type III (Wang *et al.*, 2005). Certaines substances sécrétées nécessaires pour la réalisation du *swarming* représentent eux mêmes des facteurs de virulence (Sharma & Anand, 2002). Par exemple, les rhamnolipides constituent un biosurfactant nécessaire pour la migration des *swarmers* de *P. aeruginosa*, mais ces molécules sont aussi capables entre autres de présenter une activité hémolytique, d'inhiber la phagocytose des macrophages, de stimuler la libération de cytokines de cellules épithéliales et d'interférer avec la fonction des cils dans la trachée (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

1.6.2. Le *swarming* chez *P. aeruginosa*

1.6.2.1. Description du *swarming* de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie à Gram-négatif qui possède un flagelle polaire unique et des pili de type IV, ce qui lui permet de réaliser respectivement du *swimming* en milieu liquide et du *twitching* sur milieu solide. La motilité de type *swarming* a été rapportée chez *P. aeruginosa* relativement récemment (Köhler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000; Déziel *et al.*, 2001). Les premières observations de *swarming* ont été faites sur des géloses semi-solides à 0,5% d'agar, sur un milieu minimal M9 supplémenté avec du glucose et des acides aminés (Köhler *et al.*, 2000) ou sur un milieu riche à base de « Bouillon Nutritif » et de glucose (Rashid & Kornberg, 2000). Sur les deux types de milieux, le *swarming* présente un motif de type dendritique, avec l'apparition de plusieurs branches, ou *tendrils* (terme anglais signifiant « vrille »), s'éloignant du point d'inoculation. Les bactéries au bout des *tendrils* ont un aspect deux fois plus allongé que celles trouvées au centre de la colonie en *swarming* et possèdent généralement deux flagelles polaires (Köhler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000) (Fig. 1.4). Certaines cellules au centre de la colonie portent aussi deux flagelles (Köhler *et al.*, 2000). Contrairement aux « forts *swarmers* » comme *P. mirabilis* et

V. parahaemoliticus qui peuvent synthétiser jusqu'à 50 fois plus de flagelles et qui peuvent réaliser du *swarming* sur des géloses à 2% d'agar, *P. aeruginosa* tombe dans la classe des « faibles *swarmers* ». Les espèces de cette catégorie, qui comprend entre autres *S. marcescens*, *E. coli* et *S. typhimurium*, ne produisent que deux à trois fois plus de flagelles sur certains types de milieux et font du *swarming* préférentiellement sur des géloses ayant en dessous de 0,8% d'agar (Rashid & Kornberg, 2000).

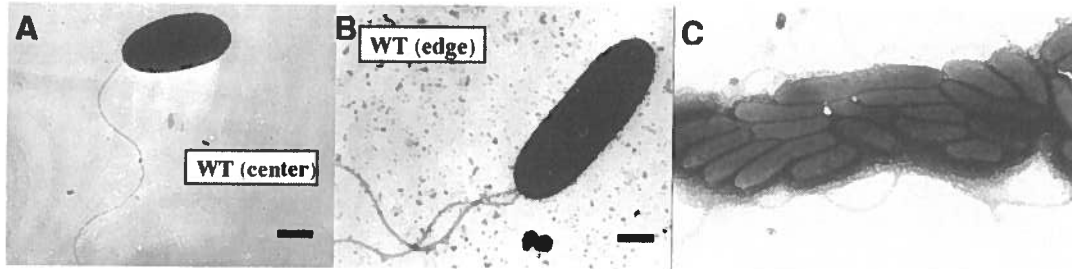


Figure 1.4. Cellules en *swarming* de *P. aeruginosa*. (A) Cellule isolée du centre de la colonie en *swarming* ayant une apparence proche d'une cellule végétative et (B) cellule isolée de l'extrémité d'un front de *swarming* (Rashid & Kornberg, 2000). (C) Radeaux multicellulaires formés par les cellules en *swarming* (Köhler *et al.*, 2000).

1.6.2.2. *Quorum sensing et rhamnolipides*

Comme mentionné précédemment, la production des biosurfactants nécessaires pour le *swarming* est sous le contrôle du QS chez *P. aeruginosa* (Daniels *et al.*, 2004). Cette bactérie possède deux systèmes bien connus de QS : *lasI/lasR* et *rhlI/rhlR*. Elle produit donc majoritairement deux molécules-signal (autoinducteurs), le *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) et le *N*-butyryl-*L*-homosérine lactone (C₄-HSL). Les deux systèmes sont hiérarchiquement arrangés, le système *las* étant placé au-dessus du système *rhl* (Ruimy & Andremont, 2004). Concernant le système *rhl*, il contrôle entre autres l'opéron *rhlAB* et le gène *rhlC*, qui sont responsables de la production des rhamnolipides (Ochsner *et al.*, 1994a; Ochsner *et al.*, 1994b; Pearson *et al.*, 1997; Rahim *et al.*, 2001). Les rhamnolipides sécrétés sont en fait un mélange de congénères contenant un ou deux acides gras 3-hydroxy de longueur variable, liés à un mono- ou un dirhamnose, les plus abondants en conditions de cultures liquides habituelles étant le monorhamnolipide *L*-rhamnosyl-3-hydroxydécanoyl-3-hydroxydécanoate et le dirhamnolipide *L*-rhamnosyl-*L*-rhamnosyl-3-

hydroxydécanoïl-3-hydroxydécanoate (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000; Maier & Soberón-Chávez, 2000; Déziel *et al.*, 2003). La rhamnosyltransférase codée par l'opéron *rhlAB* catalyse la synthèse de monorhamnolipides (mono-RLs) à partir de dTDP-L-rhamnose et de groupements d'acides 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alcanoïques (HAAs) de longueurs variées (Ochsner *et al.*, 1994a; Ochsner *et al.*, 1994b). RhlA est impliquée dans la synthèse des HAAs, tandis que RhlB catalyse le transfert du dTDP-L-rhamnose à une molécule de HAA (Déziel *et al.*, 2003; Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Une partie des mono-RLs est transformée en dirhamnolipides (di-RLs) par la rhamnosyltransférase RhlC (Rahim *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* peut en fait réaliser un certain *swarming* en présence des HAAs seulement, et non de tous les rhamnolipides, étant donné que les HAAs possèdent également des propriétés tensio-actives (Déziel *et al.*, 2003).

En plus de leur rôle en tant que biosurfactants, les rhamnolipides jouent également un rôle dans l'apparition des *tendrils* typiquement observés lors du *swarming* de *P. aeruginosa*. En effet, des di-RLs purifiés attirent les cellules en *swarming* et stimulent la formation de *tendrils* tandis que des HAAs purifiés, au contraire, repoussent les cellules en *swarming*. Dans l'agar, les taux de diffusion différents des HAAs et des di-RLs, ces derniers migrant plus vite et plus loin que les premiers, créent un gradient croissant de di-RLs/HAAs qui module la formation des *tendrils*. Les bactéries situées au bout d'un front de *swarming* sont attirées par les concentrations plus fortes de di-RLs retrouvées vers l'extérieur et sont en même temps repoussées par les concentrations plus hautes de HAAs trouvées au centre de la colonie. Ceci donne des *tendrils* qui migrent en s'éloignant du point d'inoculation initial. De plus, les *tendrils* en migration ne se croisent pas, mais s'évitent mutuellement, puisque les zones à forte densité cellulaire sont également riches en HAAs. Les mono-RLs, quant à eux, n'ont pas d'effet sur les cellules en *swarming* et ne serviraient que d'agent mouillant. Tous ces effets ne sont pas observés chez les cellules en *swimming*, ce qui souligne les particularités des cellules en *swarming* (Tremblay *et al.*, 2007). Le modèle est présenté à la figure 1.5.

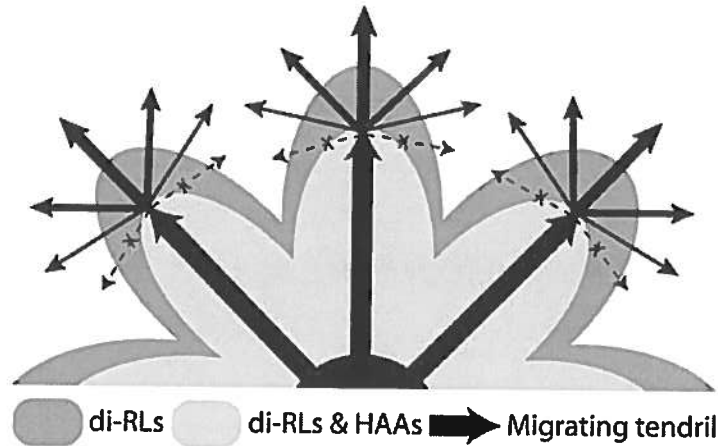


Figure 1.5. Modèle de migration des *tendrils* en fonction de la diffusion des di-RLs et des HAAs. Les cellules du front de *swarming* sont attirées par les di-RLs et sont en même temps repoussées par les HAAs. Les cellules *swarmers* migrent vers l'extérieur en réponse à ces deux forces, en suivant le ratio de RLs/HAAs. Figure adaptée de Tremblay *et al.*, 2007.

1.6.2.3. Lien entre *swarming* et biofilms chez *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est l'une des bactéries modèles pour les études portant sur les biofilms bactériens (Caiazza *et al.*, 2007; Haagensen *et al.*, 2007). Le biofilm de *P. aeruginosa* cultivé en laboratoire se présente typiquement sous la forme de micro-colonies en forme de champignons et de piliers séparées par des canaux aqueux. Les canaux aqueux servent à desservir la communauté en nutriments et en oxygène, et aussi à évacuer les déchets métaboliques (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). On sait que l'étape initiale de formation d'un biofilm est fortement dépendante de la motilité cellulaire. Le flagelle sert au maintien initial des cellules à la surface et le *twitching*, médié par les pili de type IV, permet l'agrégation des cellules et le développement des micro-colonies (O'Toole & Kolter, 1998; Chiang & Burrows, 2003). Le QS est impliqué dans l'étape de structuration des biofilms. Des mutants incapables de produire les molécules de QS peuvent initier la formation d'un biofilm, mais ne peuvent pas constituer un biofilm d'une architecture normale (Davies *et al.*, 1998). Les rhamnolipides jouent aussi un rôle dans la forme du biofilm mature et il a été suggéré que les rhamnolipides produits par les cellules du biofilm serviraient à maintenir ouverts les canaux aqueux du biofilm mature en empêchant l'attachement des bactéries sur la surface (Davey *et al.*, 2003).

On retrouve ainsi dans les comportements de *swarming* et de biofilm de *P. aeruginosa* des éléments similaires : une activité multicellulaire avec une certaine spécialisation des cellules au sein de la population, l'utilisation de systèmes de QS et l'implication des rhamnolipides dans le maintien des espaces entre les cellules. Suite à des simulations mathématiques appuyées par des résultats expérimentaux, Shrouf *et al.* (2006) ont proposé que le degré de motilité de type *swarming* influence la structure finale du biofilm. Le *swarming* est dépendant des conditions nutritionnelles du milieu. Dans les premiers stades de formation du biofilm, des conditions favorables au *swarming* donneront lieu à un biofilm plat et homogène, tandis que des conditions inhibant le *swarming* feront apparaître un biofilm plus structuré possédant des agrégats de cellules (Shrouf *et al.*, 2006). Très récemment, une régulation inverse entre la formation de biofilms et la motilité de type *swarming*, impliquant le gène *sadB*, a été proposée (Caiazza *et al.*, 2007). La surexpression de la protéine de fonction inconnue SadB stimule la formation d'un biofilm et l'attachement des bactéries sur la surface, tandis qu'un mutant *sadB* présente une capacité de *swarming* plus importante que la souche sauvage. Selon le modèle formulé par Caiazza *et al.* (2007), au moment où des bactéries interagissent avec une surface, un système de régulation impliquant SadB déclenche la décision d'initier un biofilm ou de se déplacer en faisant du *swarming*. SadB contrôle, via le complexe de chimiotaxie CheIV, le taux d'inversion de rotation du flagelle (*flagellar reversal rate*) et influence la production du polysaccharide de la matrice produit par le locus *pel*. La formation de biofilm est associée à une augmentation de la production du polysaccharide Pel (formation de la matrice du biofilm) et une diminution du taux d'inversion de rotation du flagelle (augmentation du temps d'interaction des bactéries avec le substrat). Le *swarming* au contraire est associé à une diminution du polysaccharide Pel et une augmentation du taux d'inversion de rotation du flagelle (Fig. 1.6). Le rôle de SadB dans ces activités ne s'observe qu'en conditions de haute viscosité, et non dans une condition favorable au *swimming*. La régulation inverse de ces deux comportements de surface, le biofilm et le *swarming*, permettrait à la bactérie de s'adapter rapidement aux conditions changeantes de son substrat en milieu naturel.

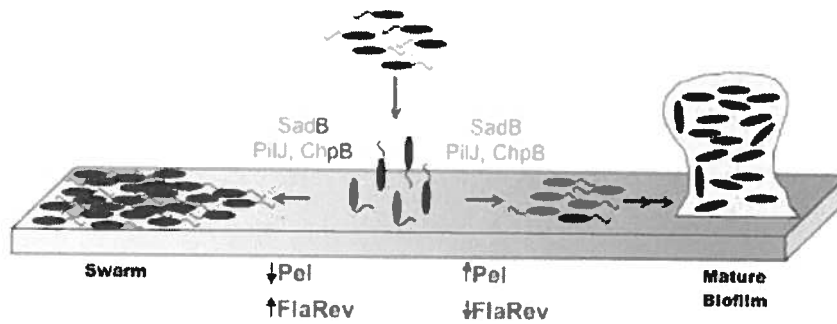


Figure 1.6. Modèle du contrôle inverse entre la formation de biofilm et la motilité de type *swarming*. Les bactéries planctoniques interagissent initialement avec la surface. Une voie incluant SadB et les composants du complexe de chimiotaxie CheIV (PilJ et ChpB) contrôle la décision d'initier la formation d'un biofilm ou de migrer en faisant du *swarming*. La formation de biofilm est associée à une augmentation de la production du polysaccharide Pel et une diminution du taux d'inversion de rotation du flagelle (FlaRev). Au contraire, le *swarming* est associé à une diminution du polysaccharide Pel et une augmentation du taux d'inversion de rotation du flagelle. Le substrat est illustré en un gradient de gris pour représenter le fait que des variations de la surface (viscosité, humidité, etc.) pourraient également influencer la décision biofilm ou *swarming*. Figure tirée de Caiazza *et al.*, 2007.

Pour finir, l'équipe de Haagensen *et al.* (2007) a rapporté un lien entre la résistance à la colistine et au sodium dodecyl sulfate de la sous-population de cellules formant le capuchon des micro-colonies en forme de champignons et une motilité de surface qui impliquerait les pili de type IV. La résistance de ces sous-populations motiles du biofilm suggère un lien entre la motilité multicellulaire et la résistance aux agents antimicrobiens. Plus directement, une résistance des cellules en *swarming* à plusieurs antibiotiques a d'ailleurs été rapportée chez *Salmonella* (Kim *et al.*, 2003; Kim & Surette, 2003).

1.6.3. *Swarming* et résistance aux antibiotiques

Kim et ses collaborateurs (2003) ont rapporté que le *swarming* chez *S. enterica* serotype Typhimurium était couplé à une résistance élevée à une variété d'antibiotiques appartenant à des classes structurellement et fonctionnellement distinctes. Ils ont ainsi trouvé une résistance au moins huit fois supérieure pour la polymyxine B, au moins cinq fois supérieure pour la colistine et pour trois β -lactames, au moins 20 fois supérieure envers des

aminoglycosides, des quinolones et la rifampine et 93 fois supérieure pour la ciprofloxacine. La résistance aux antibiotiques des cellules *swarmers* provient d'un état physiologique transitoire. En effet, lorsque les cellules *swarmers* se différencient en cellules végétatives (culture en milieu liquide), elles perdent rapidement leur résistance aux antibiotiques. Selon les auteurs, une expression génique modifiée chez les *swarmers* confère la résistance.

Un des gènes impliqués dans ce phénomène de résistance serait le gène *pmrK*. Une mutation de ce gène se traduit par une perte de la motilité de type *swarming*. Bien que la bactérie mutée soit toujours capable de se différencier en cellule *swarmer*, elle n'est plus capable de migrer. Le gène *pmrK* fait partie de l'opéron *pmrHFIJKLM* et code pour une enzyme de la membrane interne responsable de l'ajout de résidus 4-aminoarabinose aux lipides A des LPS. Cette modification ajoute une charge positive supplémentaire au LPS, ce qui réduit par là même le potentiel de liaison de peptides antimicrobiens cationiques comme la polymyxine (Kim *et al.*, 2003). Le suivi d'un gène rapporteur *lux* fusionné avec le promoteur du gène *pmr* a montré que l'opéron *pmr* était significativement surexprimé dans des conditions qui stimulent le *swarming*. Son expression la plus forte se retrouve sur le milieu ayant la concentration d'agar qui favorise le plus le *swarming* (0,5%). Lorsque l'on passe des cellules d'un milieu *swarming* à 0,5% d'agar à un milieu liquide, l'activité du gène chute d'environ 50% après 30 min et continue à diminuer rapidement (Kim & Surette, 2003).

Considérant l'étendue de la résistance aux antibiotiques des cellules en *swarming*, l'implication d'autres mécanismes de résistance est probable. Même si les mécanismes spécifiques de résistance aux antibiotiques ne sont pas encore élucidés, il se pourrait qu'il y ait des traits communs avec la plus grande résistance observée chez les cellules dans un biofilm (Kim *et al.*, 2003; Kim & Surette, 2003).

L'importance des comportements sociaux bactériens dans la nature est maintenant reconnue en microbiologie et les caractéristiques nouvelles dont bénéficient les bactéries regroupées en collectivité poussent à envisager sous un nouvel angle des aspects qui avaient pourtant été largement étudiés chez les bactéries planctoniques, tels les mécanismes de résistance envers les antibiotiques. Le lien entre deux comportements sociaux bactériens répandus, le biofilm et la motilité de type *swarming*, est de plus en plus rapporté dans la littérature, et l'étude d'une propriété commune, la résistance aux agents antimicrobiens

permettrait entre autre de mieux cerner ce lien. Le phénotype multirésistant des bactéries en *swarming* n'a à ce jour été rapporté que chez une seule espèce bactérienne. L'hypothèse de travail de cette étude est que la résistance aux agents antimicrobiens est une propriété générale des bactéries qui s'engagent dans la motilité de type *swarming*. Les objectifs de l'étude ont ainsi consisté à évaluer la résistance aux antibiotiques et à d'autres agents antimicrobiens des bactéries en *swarming* chez plusieurs espèces bactériennes et à tenter d'identifier des mécanismes de résistance associés au *swarming*.

CHAPITRE 2. SWARMING MOTILITY: A MULTICELLULAR BEHAVIOUR CONFERRING ANTIMICROBIAL RESISTANCE

2.1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE

Le *swarming* est un type de motilité permettant la migration de cellules bactériennes hautement différenciées. Le *swarming* partage de nombreuses similarités avec les communautés de biofilms, qui sont connues pour leur résistance élevée envers les agents antimicrobiens. Nous avons cherché ici à vérifier si le comportement de *swarming* pouvait être associé de manière générale à un phénotype résistant. Testés avec 13 antibiotiques, les bactéries en *swarming* de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia thailandensis* et *Bacillus subtilis* ont montré une résistance plus élevée que leurs contreparties végétatives à tous les antibiotiques, exceptés les peptides antimicrobiens. En utilisant *P. aeruginosa* comme bactérie modèle, il a été montré que ce phénotype multirésistant était transitoire et intimement lié à l'état de *swarming*. La résistance de bactéries en *swarming* envers d'autres agents antimicrobiens, tel le triclosan et un métal lourd (l'arsénite) a également été observée. Trois pompes à efflux majeures n'ont pas paru contribuer à la résistance des bactéries en *swarming*. Cependant, des tests de perméabilité chez *P. aeruginosa* ont révélé une incorporation de NPN moins importante pour la membrane externe des bactéries en *swarming*, ce qui pourrait indiquer qu'une perméabilité moindre pourrait contribuer au moins en partie à la résistance aux agents antimicrobiens des bactéries en *swarming*. Considérée avec la résistance élevée retrouvée dans les biofilms, la résistance en *swarming* suggère que la résistance aux agents antimicrobiens pourrait être une propriété générale de la multicellularité bactérienne. La motilité de type *swarming* pourrait ainsi représenter une forme de comportement social pouvant servir de modèle pour l'étude de la résistance aux antibiotiques des biofilms.

2.2. CONTRIBUTION DES AUTEURS

Les auteurs de l'article sont l'étudiante, Sandra Lai (premier auteur) et son directeur, le Dr Éric Déziel. En tant que directeur de recherche, Éric Déziel a guidé l'étudiante lors de la planification du travail au laboratoire, ainsi que lors de la rédaction de l'article. L'étudiante a planifié et réalisé les expériences, analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

2.3. ARTICLE

Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance

Running title: Swarming confers antimicrobial resistance

Sandra Lai and Eric Déziel*

Manuscrit soumis à *Environmental Microbiology* pour une publication

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval (Québec), H7V 1B7, Canada

* Corresponding author.

Mailing address: 531 Boul. des Prairies, Laval (Québec), Canada H7V 1B7.

Phone: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5501.

Email: eric.deziel@iaf.inrs.ca

2.3.1. Summary

Swarming is a type of social motility allowing the migration of highly differentiated bacterial cells. Swarming shares many similarities with biofilms communities, which are notable for their high resistance to antimicrobial agents. We investigate here if the swarming behaviour could also be associated with a prevalent antimicrobial resistant phenotype. Challenged with 13 antibiotics, swarm cells of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia thailandensis* and *Bacillus subtilis* showed a higher resistance than their vegetative counterparts to all the antibiotics tested, except for the antimicrobial peptides. Using *P. aeruginosa* as a model, this multiresistant phenotype was shown to be transient and intrinsically linked to the swarming state. Resistance of swarm cells toward other antimicrobial agents, such as triclosan and a heavy metal (arsenite) was also observed. Three major efflux pumps did not appear to contribute to the resistance of swarm cells. However, uptake assays revealed that the outer membrane of *P. aeruginosa* swarm cells shows decreased permeability, which could account at least in part for the observed antimicrobial resistance of swarm cells. Together with the high resistance found in biofilms, swarming resistance suggests that antimicrobial resistance could be a general feature of bacterial multicellularity. Swarming motility might thus represent a form of social behaviour useful as a model to investigate biofilm antibiotic resistance.

2.3.2. Introduction

Resistance of bacteria to antibiotics is a major worldwide issue. Multidrug resistance has been mainly attributed to reduced drug intake due to use of low-permeability barriers coupled with active drug export mediated by efflux systems (Nikaido, 1994; Poole, 2002; Kumar & Schweizer, 2005). In Gram-negative bacteria, the asymmetric outer membrane represents an effective permeability barrier, a property which is largely attributed to the presence of lipopolysaccharides (LPS) in the outer leaflet (Nikaido, 1994; Kumar & Schweizer, 2005). Bacteria can become even less permeable to antimicrobials by mutational loss of porins channels or modifications of LPS (Denyer & Maillard, 2002). However, low permeability of the outer membrane does not prevent completely influx of small molecules and must be combined with another resistance mechanism, which is usually efflux (Nikaido, 1994). Efflux systems are numerous and have been reported to actively pump out a wide range of antibiotics, as well as biocides, dyes, detergents and organic solvents (Kumar & Schweizer, 2005). Other mechanisms of drug resistance, more specific, include alteration of antibiotic target sites and enzymatic inactivation or destruction of the drug (Poole, 2002).

Mechanisms underlying resistance of planktonic cells have been extensively studied, but more recently, extremely high levels of resistance to antimicrobial compounds have been associated to growth of bacteria in biofilm mode. Bacterial biofilms are made of dense microcolonies attached to a surface and encased in a self-produced exopolymeric matrix (Drenkard, 2003). Bacteria living in biofilms can survive antimicrobial agents at concentrations hundreds to thousands times higher than free-living, planktonic cells (Stewart & Costerton, 2001). Resistance is not due to mutations since this property is lost upon dispersal of cells from the biofilm (Stewart & Costerton, 2001). Biofilm resistance is not completely understood and involves multiple mechanisms, including restriction of antimicrobial penetration by the exopolysaccharide matrix, reduced metabolism and growth rate (Mah & O'Toole, 2001; Stewart & Costerton, 2001; Drenkard, 2003) and the existence of persisters cells, a small population of cells with a highly protected phenotype (Brooun *et al.*, 2000; Stewart & Costerton, 2001). Biofilm formation has been linked to cell motility such as twitching, a type of surface motility mediated by type IV pili, which is needed for initial cell aggregation and microcolonies development (O'Toole & Kolter, 1998; Chiang & Burrows, 2003). The relationship between biofilm and swarming, another form of surface

motility, is more elusive but is increasingly being reported (Déziel *et al.*, 2001; Caiazza *et al.*, 2005; Caiazza *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2007).

Swarming is characterized by the rapid and coordinated migration of highly differentiated swarm cells on semi-solid surfaces (Harshey & Matsuyama, 1994; Fraser & Hughes, 1999; Sharma & Anand, 2002). Swarming has been reported in many Gram-negative species among the genera *Proteus*, *Vibrio*, *Serratia*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Azospirillum*, *Aeromonas*, but can also be found in a few Gram-positive species of the genera *Bacillus* and *Clostridium* (Fraser & Hughes, 1999; Sharma & Anand, 2002). Swarming migration is preceded by a profound modification of cell morphology, where short vegetative (planktonic) cells differentiate into elongated and multiflagellated swarm cells (Harshey, 2003). Differentiated cells keep themselves in close cell-cell contact and migrate in multicellular rafts along their longitudinal axis (Harshey, 1994). Swarming aspect can vary greatly according to species or even growth conditions used. *Proteus* species form concentric circles (Rauprich *et al.*, 1996) while in *Pseudomonas aeruginosa*, migrating swarm cells form complex fractal-like patterns of radiating tendrils (Köhler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000; Déziel *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). The swarming phenotype is reversible and swarm cells are known to switch back to their vegetative form when transferred into liquid medium (Harshey, 1994, 2003).

The swarming behaviour closely resembles the biofilm state since both represent coordinated social phenomena requiring some degree of cellular differentiation and regulation through cell-to-cell communication. Resistance to a variety of antibiotics has been recently reported for swarm cells of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. This multiresistant phenotype of *Salmonella* swarm cells appears not to be due to mutations and is linked to engagement into group behaviour (Kim *et al.*, 2003; Kim & Surette, 2003). In the process of a better understanding the high resistance of multicellular behaviour, we wanted to investigate whether the swarming phenomenon could be associated with a prevalent and general multiresistant phenotype among bacteria. We challenged vegetative cells and swarming cells of several species with a wide range of antibiotics and other antimicrobials. We observed that migrating swarm cells display an increased resistance to most of the agents tested. Antimicrobial resistance could therefore be a general feature of bacterial multicellular social behaviours.

2.3.3. Results

Antibiotic resistance assays with different species.

We compared the resistance of vegetative cells vs swarm cells to a wide range of antibiotics using the disc diffusion method on swim, swarm and solid plates. Species tested were *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia thailandensis*, and *Bacillus subtilis*. We found that swarm cells of all five bacterial species investigated demonstrate higher resistance to antibiotics than their vegetative counterparts. *P. aeruginosa*, *E. coli* and *B. subtilis* show smaller inhibitory zones on swarm plates for 11 of the 13 antibiotics tested. Polymyxin B and colistin are the only antibiotics towards which swarm cells of those species remain sensitive (Fig. 2.1A-C, Fig. 2.2A). A few antibiotics, notably antimicrobial peptides, could not be tested with *B. thailandensis* and *S. marcescens* due to high intrinsic resistance of their vegetative cells to these compounds. *S. marcescens* swarm cells display greater resistance to the 11 antibiotics tested, with no inhibitory zones visible on any antibiogram swarm plates (Fig. 2.1D). *B. thailandensis* was challenged with ten antibiotics and migrating swarm cells also show resistance to all compounds (Fig. 2.1E).

Swim and solid plates, which support cell growth in the vegetative state, usually yield comparable inhibition zones for all bacteria (Fig. 2.2), thus indicating that differences in agar concentration do not account for the resistance exhibited by swarm cells, e.g. because of differences in antibiotic diffusion kinetics. Inhibitions zones with antimicrobial peptides are slightly larger as agar concentration decreases, but this does not affect the interpretation since inhibition of swarming with these compounds was very clear.

Using E-test strips, precise MICs for tobramycin were determined on swim, swarm and solid plates for all five bacterial species (Fig. 2.3). The increase in resistance levels of swarming cells is not the same between the different species : four times more for *B. thailandensis*, 16 times more for *E. coli*, 85 times more for *B. subtilis* and greater than 11 and 85 times respectively for *S. marcescens* and *P. aeruginosa* (Table 2.2). The two latter species have swarm cells migrating along the entire strip, indicating resistance at concentrations above than the maximum range of the E-test (256 µg/ml).

Secondary waves of swarming.

With *B. subtilis*, *B. thailandensis* and especially *E. coli*, two, and sometimes three, waves of swarm fronts are observed with most antibiotics. Inhibition zones corresponding to those seen on swim and solid plates (or smaller) are visible, accompanied by another advancing swarm front (Fig. 2.2B-C, Fig. 2.4A). Secondary swarm fronts appear thinner than primary fronts of swarming. In order to check if this could be due to selection of a subpopulation of resistant mutants, usual antibiotic assay was performed using *E. coli* cells directly harvested from three spots of a swarm plate (initial inoculation point, initial swarm front, and secondary swarm front) and plated separately on new swarm plates. After incubation, resistance level were similar and thin secondary swarm fronts were again observed on swarm plates inoculated with cells taken from the secondary swarm front, as well as the two other locations (Fig. 2.4B).

Antibiotic resistance assays with *P. aeruginosa* PA14.

P. aeruginosa was chosen as our test organism to gain further insight into the swarming resistance phenotype. First, it was necessary to assess if swarm cells are naturally resistant to antibiotics (a characteristic of the swarming state) or if this property is inducible by the antibiotics (adaptive resistance). If emergence of resistance is due to the presence of antibiotics in the medium, compared to a tendril already in contact with the antibiotic, a tendril without prior exposure would either be stopped completely (no resistance expressed) or slowed down (lag time corresponding to cells developing resistance) when confronted to an antibiotic. In order to determine if the swarming resistance phenotype could be due to exposure of migrating tendrils to antibiotics, an antibiotic resistance assay with *P. aeruginosa* was performed as usual on a 15-cm diameter swarm plate. After overnight incubation, additional antibiotic discs were placed in front of already formed tendrils of *P. aeruginosa* and incubated again. For the four antibiotics tested (tobramycin, ciprofloxacin, meropenem and trimethoprim), tendrils previously not exposed to a given antibiotic were not hindered and progressed the same way as tendrils grown near an antibiotic zone (Fig. 2.5).

Secondly, to confirm that resistance is a transient state associated with the swarming condition, cells from the tip of the tendril closest to the antibiotic disc were harvested with a sterile toothpick, grown overnight in fresh TSB and new antibiograms were performed on

solid plates using this liquid culture as inoculum. These cells de-differentiated from the swarm state were as sensitive as before passage on swarm plate, and this for the two antibiotics tested (tobramycin, piperacillin; data not shown).

Resistance to other antimicrobial agents.

On the basis that biofilms are able to survive diverse toxic compounds, resistance of swarm cells towards other antimicrobial agents was also assessed using the disc diffusion method. First, heavy metal solutions were tested against *P. aeruginosa*. For cobalt, mercury and zinc, although inhibition zones on swim plates are smaller than on solid plates, inhibition of cells on swarm plates is clearly visible as the migrating tendrils either stop (cobalt) or abruptly change their course to bypass the inhibition zone (mercury, zinc), in the same way seen for antimicrobial peptides. In contrast, swarm cells are able to come very close to the disc containing arsenite, indicating resistance to this heavy metal (Fig. 2.6).

The broad-spectrum biocide triclosan was also tested. Since tests could not be carried out with *P. aeruginosa* due to already high intrinsic resistance of this species to the compound (Chuanchien *et al.*, 2003; Russell, 2004; Champlin *et al.*, 2005), two other species, *B. subtilis* and *E. coli*, were investigated. Resistance of swarm cells to triclosan was observed for *B. subtilis* as well as *E. coli* (Fig. 2.7).

***P. aeruginosa* mutants.**

To determine if upregulation of efflux systems could be a mechanism responsible for the multiresistant phenotype of swarm cells, *P. aeruginosa* PA14 *mexA*⁻, *mexC*⁻ and *mexE*⁻ mutants in three of the major *P. aeruginosa* efflux pumps (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN), were tested against tobramycin and trimethoprim. A PA14 *ndvB* mutant strain was also considered on the basis that *ndvB* was reported to contribute to multiresistance to antibiotics of *P. aeruginosa* biofilms (Mah *et al.*, 2003). However, these mechanisms are likely not responsible for the swarming resistance phenotype, as all these mutants swarm normally and display the same resistance pattern as the wild type strain PA14 when exposed to tobramycin (Fig. 2.8A) and trimethoprim (Fig. 2.8B)

Membrane permeability assays.

The standard uptake assays using the fluorescent probe NPN (1-N-phenyl-naphthylamine) were performed to investigate the permeability of the outer membrane of vegetative and swarm cells of *P. aeruginosa*. Vegetative and swarm cells suspensions in HEPES buffer with optical density at 600 nm of 0.5 contained the same amount of cells, respectively 1.18×10^9 cfu/ml and 1.21×10^9 cfu/ml, therefore allowing direct comparison of fluorescence results. After subtraction of all background fluorescence, NPN uptake of swarm cells was in average 3.6 times lower than for vegetative cells (Table 2.3), a result indicating a decreased permeability of swarming bacterial cells.

2.3.4. Discussion

Multicellular behaviours and the social nature of bacteria are increasingly recognized as prevalent (Shapiro, 1998; Ben Jacob *et al.*, 2004). In natural environments, bacteria typically live attached to surfaces in complex communities as biofilms (Davey & O'Toole, 2000). Biofilms are well known for their extremely high tolerance to many antimicrobial agents such as antibiotics, heavy metals, and dyes. Biofilm resistance, while still poorly understood, is considered to be multifactorial and involve diverse mechanisms (Drenkard, 2003). Swarming is a type of social motility allowing rapid colonization of a surface by a population of highly differentiated swarm cells. Since this is also a multicellular behaviour, we wanted to investigate if swarming motility could be broadly associated with an antibiotic resistant phenotype. A previous report had shown swarming to provide resistance only in the species *Salmonella enterica* (Kim *et al.*, 2003; Kim & Surette, 2003). Thus, five other species previously reported to display swarming motility were chosen to investigate this issue. Antibigrams covering 13 antibiotics from six different families (β -lactams, aminoglycosides, antimicrobial peptides, quinolones, macrolides and trimethoprim) revealed that swarm cells of all species tested are more resistant to antimicrobials than vegetative cells. Apart from antimicrobial peptides, resistance of swarm cells was observed for many unrelated antibiotics from five different families with various cellular targets. This demonstrated that the multiresistant property of swarm cells was not restricted to *Salmonella*, a *Gammaproteobacteria*, but could be extended to a variety of species, including other *Gammaproteobacteria* (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. marcescens*), *Betaproteobacteria*

(*B. thailandensis*), and even a Firmicute (*B. subtilis*). Resistance towards tobramycin for all species were determined using E-test strips and revealed that swarm cells display an important level of resistance, going from a four-fold increase in resistance for *B. thailandensis* to greater than 85-fold for *P. aeruginosa*.

Thin secondary swarm fronts nearing antibiotic discs were noted with *B. subtilis*, *B. thailandensis* and *E. coli*, but not with *S. marcescens* and *P. aeruginosa*, although tendrils aspect of the latter were seen to change slightly when approaching certain antibiotics (data not shown). Replating of *E. coli* cells harvested from these advancing swarm fronts resulted in a swarming of usual aspect, showing that this state is only transient. *S. enterica* Typhimurium also produced secondary swarm fronts when challenged with several antibiotics (Kim & Surette, 2003). These authors also attributed apparition of distinct swarm waves to phases of adaptation of swarm cells in response to increasing levels of antibiotics and not to mutations. Since swarm cells of *S. marcescens* were able to reach all antibiotic discs, it could be that the concentrations used here were not high enough to trigger the emergence of secondary swarm fronts.

Antimicrobial peptides is the only class of antibiotics towards which sensitivity is still observed with the three species which could be tested, namely *B. subtilis*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. These results are somewhat surprising since the *S. enterica* Typhimurium swarm cells were found to display an increased resistance to those two agents. In that species, the *pmrHFJKLM* operon appears responsible for the resistance against polymyxin B and was reported to be up-regulated under conditions promoting swarming (Kim & Surette, 2003). Polymyxins are polycationic amphipathic lipopeptides that are attracted to the negatively charged residues of bacterial surfaces (Vaara, 1992). They first permeabilize the outer membrane structure by displacing the divalent cations (Mg^{2+} , Ca^{2+}) cross bridging LPS (Hancock & Bell, 1988), then reach the inner membrane where they insert into the bilayer and form transmembrane pores that results in cell death (McCoy *et al.*, 2001; Tamayo *et al.*, 2002). Resistance of Gram-negative and Gram-positive species to those compounds commonly involve addition of positively charged residues in order to decrease the net negative surface charges and thus, the binding potential of cationic antimicrobial peptides (McCoy *et al.*, 2001; Tamayo *et al.*, 2002; Peschel & Sahl, 2006). Although *E. coli* and *P. aeruginosa* do possess homologues to the *pmr* operon, regulation of these genes is

different than that of *S. enterica* Typhimurium (McPhee *et al.*, 2003; Winfield & Groisman, 2004). Additionally, it could be that requirements of particular cell wall properties for swarming motility prevent the modifications necessary for antimicrobial peptides resistance in these particular species, including *B. subtilis*.

Further studies regarding antibiotic resistance phenotype of swarm cells and mechanisms were mostly conducted with *P. aeruginosa*, which is an important opportunistic pathogen and the most commonly used model organism for biofilm studies (De Kievit *et al.*, 2001a; Haagenen *et al.*, 2007). Swarming in this species requires flagella, type IV pili to a lesser extent (Köhler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000), and extracellular production of biosurfactants as wetting agents and chemotactic-like stimuli (Déziel *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2007). Experiments conducted with *P. aeruginosa* showed that the swarming-associated resistance is unstable and is lost with subculturing swarm cells in liquid media. Vegetative cells de-differentiated from the swarming state show normal susceptibility to the antibiotics tested. This transient resistant phenotype associated with swarm cell differentiation is also seen with *Salmonella* (Kim & Surette, 2003). In addition, tendrils grown without previous exposure to antibiotics can also migrate over a newly produced antibiotic gradient, indicating that swarm cells develop a resistance phenotype as a result of cell differentiation and not in response to antibiotics in the media.

Since biofilms are known to be able to withstand not only antibiotics, but also other toxic agents, resistance of *P. aeruginosa* swarm cells against heavy metals was investigated. Swarm cells show marked resistance only towards arsenite and remain sensitive to cobalt, mercury, and zinc. Heavy metals have to enter the cell to exert their toxic effects. Cobalt and zinc interact with other physiological ions (respectively Fe^{2+} and Mg^{2+}) and mercury with sulfur-containing enzymes (Nies, 1999). Arsenite acts as a specific inhibitor of dithiol enzymes, such as pyruvate and α -ketoglutarate dehydrogenases (Arima & Beppu, 1964). Efflux systems are the best known mechanisms used for resistance against heavy metals (Teitzel & Parsek, 2003). The most common resistance mechanism to arsenite in planktonic cells is mediated by the *ars* genes, which encode a membrane-associated efflux pump (Diorio *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1998; Jackson & Dugas, 2003). In addition to resistance to arsenite of *P. aeruginosa* swarm cells, resistance to another antimicrobial agent, triclosan, was also found for swarm cells of *B. subtilis* and *E. coli*. Triclosan is a broad-spectrum antibacterial

and antifungal biocide which is widely used in various products, such as cosmetics, antiseptic soaps and toothpastes (McMurry *et al.*, 1998a; Russell, 2004). It has a bacteriostatic action at low concentrations, but is bactericidal at higher levels (Russell, 2004). While the growth-inhibitory effect is due to inhibition of the enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI family) implicated in fatty acid biosynthesis (McMurry *et al.*, 1998a; Heath *et al.*, 1999), the lethal effect could be attributed to other mechanisms, such as membrane damage (Villalain *et al.*, 2001; Russell, 2004; Escalada *et al.*, 2005). In *E. coli*, resistance has been attributed to mutations in the *fabI* gene (McMurry *et al.*, 1998a) and overexpression of the *acrAB* efflux system (McMurry *et al.*, 1998b) while in *B. subtilis*, a FabI alternative enzyme, FabL, which is only reversibly inhibited by triclosan, was reported to contribute to higher levels of resistance to this biocide (Heath *et al.*, 2000). Other resistance mechanisms reported include increased expression of the genes encoding the enoyl reductase, enzymatic degradation (Schweizer, 2001) and outer membrane impermeability (Champlin *et al.*, 2005). The specific mechanisms used by swarm cells to sustain higher concentrations of heavy metal (arsenite) and triclosan are not determined, but overall, decreased susceptibility of swarm cells to various antibiotics and other antimicrobial agents clearly remind of the multiresistance trait of biofilms.

Following the finding that swarm cells display resistance to various antimicrobials, possible mechanisms of resistance were considered. *P. aeruginosa* is well known for its intrinsic resistance to many antimicrobial agents, which is largely due to its relatively impermeable outer membrane coupled with active efflux of toxic compounds (Nikaido, 1994). *P. aeruginosa* possess a number of multidrug efflux pumps, including the well-characterized MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexEF-OprN (Poole & Srikumar, 2001; Schweizer, 2003). The MexAB-OprM system is constitutively expressed and is a major contributor to the intrinsic multidrug resistance of *P. aeruginosa*. The MexCD-OprJ and the MexEF-OprN systems are not expressed under typical laboratory growth conditions, but are found hyperexpressed in respectively *nfxB* and *nfxC* mutants. Expression of these efflux systems usually result from mutations in regulatory genes selected under antibiotic pressure (Poole & Srikumar, 2001). In order to test out if over-expression of efflux systems could account for the higher resistance of swarm cells, mutants in these three major efflux pumps were studied. Antibiotics used were trimethoprim, which is known to be extruded through

these pumps (Schweizer, 2003) and the aminoglycoside tobramycin, which can be modestly exported by MexAB-OprM (Li *et al.*, 2003), but is not one of their predilected substrates. Loss of any of these efflux pumps did not result in more sensitive swarm cells and swarming of the mutants showed a level of resistance against trimethoprim similar to that of the wild type PA14. Noticeably, and as expected, the *mexA* mutant was much more sensitive to trimethoprim in the vegetative state (swim and solid plates). However, it remained as resistant as wild type PA14 in the swarm mode, highlighting the distinctiveness of swarming resistance. As expected, no difference was observed with the mutants tested against tobramycin for either vegetative cells or swarm cells, showing that specificity of the pumps do not change. From these observations, the MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexEF-OprN efflux pumps do not seem to contribute to drug resistance of swarm cells. Nevertheless, efflux can still be considered as a potential resistance mechanism used by swarm cells since *P. aeruginosa* possess nine other RND pumps homologues in its genome (Stover *et al.*, 2000), although the contribution to antimicrobial resistance of most of them has yet to be determined (Poole & Srikumar, 2001). The resistance of swarm cells to arsenite and triclosan, compounds which resistance is most commonly mediated by efflux systems, could also point to implication of RND efflux pumps. Interestingly, common efflux pumps have been discarded as a mechanism implicated in the elevated antibiotic resistance of biofilm grown cells (De Kievit *et al.*, 2001b).

Additionally, we also tested a *ndvB* mutant of *P. aeruginosa* PA14, which was reported to be able to form a biofilm of normal aspect, although more sensitive to five antibiotics (tobramycin, gentamicin, ciprofloxacin, chloramphenicol and ofloxacin) than the wild type biofilm (Mah *et al.*, 2003). The *ndvB* gene is preferentially expressed in the biofilm mode and is known to encode a glucosyltransferase involved in the synthesis of cyclic periplasmic glucans. Periplasmic glucans can sequester antibiotics, such as tobramycin, in the periplasm apparently to prevent access to the cytoplasm (Mah *et al.*, 2003). The *ndvB* mutant can swarm normally and swarm cells challenged with tobramycin and trimethoprim still show a resistance similar to the wild type for both antibiotics. Therefore, swarming-associated resistance does not appear to use this particular mechanism of resistance employed by cells in biofilms.

Finally, we investigated the permeability of the outer membrane of vegetative and swarm cells of *P. aeruginosa* using the NPN uptake assay. NPN is a fluorescent probe which fluoresces weakly in aqueous media and strongly in phospholipid environments, thus allowing assessment of permeability changes. It is commonly used to study the permeability of Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa* (Hancock & Wong, 1984; Loh *et al.*, 1984; Helander & Mattila-Sandholm, 2000; Ramos-Aires *et al.*, 2004; Imamura *et al.*, 2005). We found that NPN uptake of swarm cells of *P. aeruginosa* is substantially lower compared to their vegetative counterparts, suggesting a decrease in outer membrane permeability. Consequently, this phenomenon could account for the lower susceptibility of swarm cells to various antimicrobial agents reported here. Considering the elongated phenotype of swarm cells, modifications of the outer membrane structure during swarm cell differentiation would not be surprising. It is to be noted that mutants in the LPS structure are usually swarming-deficient (Toguchi *et al.*, 2000; McCoy *et al.*, 2001), which underlines the importance of LPS integrity in this type of motility. Further analysis of outer membrane components might reveal modifications implicated in the multiresistance of swarm cells.

Recently, in *P. aeruginosa* biofilms, surface-associated motility mediated by type IV pili was linked to the particular resistance to colistin and sodium dodecyl sulfate of the subpopulation forming the caps of mushroom-shaped microcolonies (Haagensen *et al.*, 2007). Considering this resistance of a motile subpopulation in biofilms, the resistance of swarm cells of various species to antimicrobials presented here, and the general resistance of cells in biofilms, the concept of a unique resistant phenotype adopted by cells organized in social activities is emerging. Although swarm cells display a multiresistant phenotype similar to that of biofilm cells, mechanisms used could be different, as suggested by our results with the *ndvB* mutant. Compared to cells in biofilms, swarm cells are not protected within a complex extracellular matrix, are very metabolically active, while still presenting a multiresistant phenotype. We therefore propose that swarming motility represents a good model for understanding mechanisms underlying resistance of multicellular bacterial communities to antimicrobial agents.

2.3.5. Experimental procedures

Bacterial strains and antibiotics. Strains used in this study were *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Burkholderia thailandensis* ATCC 700388, *P. aeruginosa* PA14 (Rahme *et al.*, 1995) and *Bacillus subtilis* QPB467. *TnphoA* insertional mutants of *mexA*, *mexC* and *mexE* in *P. aeruginosa* strain PA14 were acquired from the PA14 Transposon Insertion Mutant Database (Liberati *et al.*, 2006). An *ndvB* knock-out mutant of *P. aeruginosa* PA14 was obtained from Dr. T.-F. Mah (University of Ottawa, Canada). All strains were typically grown at 37°C in Tryptic-Soy Broth [TSB] (Difco). For assays, overnight cultures were diluted in fresh TSB and grown until the desired OD₆₀₀. Ciprofloxacin was obtained from MD Biomedicals, meropenem was kindly provided by AstraZeneca and all other antibiotics used were from Sigma-Aldrich. Erythromycin solutions were prepared in 70% ethanol, meropenem in a 5% sodium bicarbonate solution and trimethoprim in DMSO (dimethyl sulfoxide). All other antibiotics were dissolved in distilled water and filter sterilized. Antibiotics solutions were stored at -20°C between experiments.

Media. *P. aeruginosa* (OD₆₀₀ = 3.0±0.2) and *S. marcescens* (OD₆₀₀ = 6.0±0.2) were grown in standard Polystyrene Petri dishes containing modified M9 medium (20 mM NH₄Cl, 12 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 22 mM KH₂PO₄, 8.6 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 11 mM dextrose, 0.5% casamino acids (Difco)), solidified with 0.25%, 0.5% or 1.5% Bacto-agar (Difco) respectively for swim, swarm or solid plates. Nutrient Broth [NB] swim, swarm or solid plates (NB (Difco) 8 g/l, dextrose 5 g/l and respectively 0.3%, 0.5% and 1.5% Bacto-agar) were used for *B. subtilis* (OD₆₀₀ = 5.0±0.2) and *B. thailandensis* (OD₆₀₀ = 6.0±0.2). Enriched NB plates (NB 18 g/l, dextrose 4 g/l, 0.3%, 0.5% or 1.5% Bacto-agar) adapted from Harshey and Matsuyama (1994) were used for *E. coli* (OD₆₀₀ = 3.0±0.2). Swarm plates were dried for 60 min under laminar flow, except those for *B. thailandensis* and *E. coli* (30 min). Swim and solid plates were dried 15 min.

Antibiotic resistance assays. Antibigrams on swim, swarm and solid plates were performed in order to compare vegetative and swarm cells resistance to various antibiotics. Antibiotic discs were prepared by adding 25 µl of antibiotic at desired concentration (Table

2.1) onto sterile paper discs (6 mm diam.; BD), then dried 10-15 min. Swim plates were inoculated with 2.5 µl of seed culture spotted into the agar at four opposite spots and the antibiotic disc was placed in the middle. For swarm plates, 5 µl of seed culture were spotted on one side of the swarm plate and antibiotic disc was placed on the other side (4.5 cm distance). Solid plates were inoculated with proper inoculum density in order to yield a semi-confluent growth zone as described by the BSCA Working party (Andrews, 2001) and dried briefly before placing the antibiotic disc. Plates were incubated for 20h ± 2h at 37°C for *B. subtilis* and 30°C for the other bacterial species. Inhibition zones were measured as the distance from the closest bacterial growth front to edge of the disc. All assays were performed at least twice in quadruplicate.

Additionally, tobramycin E-test strips (AB Biodisc) were used to obtain the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for all species on swim, swarm and solid plates. Results were interpreted according to manufacturer's instructions. E-test assays were performed at least two times.

Heavy metals and triclosan resistance assays. Heavy metal resistance assays were performed with *P. aeruginosa* in the same manner as described previously for antibiotics. Heavy metals solutions were made from arsenite sodium (AsNaO_2 , 0.5 M), mercuric chloride (HgCl_2 , 1.2 M), zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 M) and cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 M).

To assess resistance of swarm cells to the antibacterial agent triclosan, *B. subtilis* and *E. coli* were used. Triclosan solutions were prepared in methanol and concentrations used were 5 mg/ml for *B. subtilis* and 0.1 mg/ml for *E. coli*.

All assays were performed twice in quadruplicate.

Outer membrane permeability assay. The NPN uptake assay was modified from the method described previously (Hancock & Wong, 1984; Loh *et al.*, 1984; Imamura *et al.*, 2005). Stock and working solutions of NPN (Sigma-Aldrich) were prepared in acetone. Cells used for NPN assays were prepared as followed using a seed culture of *P. aeruginosa* ($\text{OD}_{600} = 3.0$). Swarm plates were each inoculated in the center with a 5 µl spot. Solid plates used to grow cells for NPN assays were dried 60 min under laminar flow. To match the biomass formed on swarm plates, solid plates were spotted with approximately 25 spots of 5 µl. Plates

were incubated for $18\text{h} \pm 2\text{h}$ at 30°C . Cells were harvested from a swarm or solid plate by adding 1 ml of a 5 mM HEPES buffer solution (pH 7.2) and gently scraping cells of agar surface using a flat plastic spatula. Cells were then resuspended in 5 mM HEPES buffer and optical density at 600 nm was adjusted to 0.5. For measurement of fluorescence, cells were placed in a cuvette and NPN was added to a final concentration of 10 μM . Fluorescence was monitored with a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer. Excitation and emission wavelengths were set at 350 and 420 nm, with slit widths of 5 nm. Cell preparations were used within 40 min after start of an assay. Each time, cell counts were performed for swarm and vegetative cells suspensions with OD_{600} value of 0.5.

2.3.6. Acknowledgments

We thank Thien-Fah Mah (University of Ottawa) for providing us the *ndvB* mutant and AstraZeneca for providing meropenem. This study was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant to ED.

2.3.7. Tables

Table 2.1. Concentrations of antibiotics used for antibiograms.

Family	Antibiotic	Concentrations (mg/ml)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>B. thailandensis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>
β-lactam	Ampicillin	1	100	5	50	50
	Piperacillin	3	10	3	3	2.5
	Meropenem	0.05	0.125	0.0025	0.05	0.125
Antimicrobial peptide	Polymyxin B	100	-	100	5	-
	Colistin	100	-	100	25	-
Macrolide	Erythromycin	1	200	100	200	100
Aminoglycoside	Gentamicin	50	50	25	10	50
	Kanamycin	30	25	25	100	50
	Streptomycin	50	-	50	50	100
	Tobramycin	30	50	50	3	20
Quinolone	Nalidixic acid	5	1	0.5	5	2
	Ciprofloxacin	0.05	5	0.05	0.25	0.25
Antimetabolic	Trimethoprim	5	5	25	50	10

- : Not tested

Table 2.2. Tobramycin resistance of vegetative and swarm cells of five species.

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	V _{Swi}	S	V _{Sol}	S/V ratio
<i>B. subtilis</i>	3	256	0.125	85
<i>B. thailandensis</i>	-	256	64	4
<i>E. coli</i>	4	64	4	16
<i>P. aeruginosa</i>	3	>256	3	>85
<i>S. marcescens</i>	24	>256	24	>11

* V_{Swi} and V_{Sol}, values obtained for vegetative cells from swim and solid plates, respectively; S, swarm cells. S/V ratios were calculated using the highest MIC obtained for vegetative cells. *B. thailandensis* MIC value for swim plate could not be obtained due to weak swimming of this species in these conditions.

Table 2.3. NPN uptake of vegetative and swarm cells of *P. aeruginosa*.

Sample		Fluorescence value ^a (mean ± SD)	Fluorescence increase ^b	NPN uptake ^c
Control	Buffer (Blank)	0		
	Buffer+NPN	140.7±15.2	140.7	-
Vegetative	Cells only	324.9±30.2		
	Cells+NPN	591.8±24.4	266.9	126.2
Swarming	Cells only	488.9±17.3		
	Cells+NPN	664.1±31.8	175.2	34.5

^a Fluorescence results are expressed in arbitrary fluorescent units. Values represent mean±standard deviation of six separate experiments.

^b Fluorescence increase is calculated by subtracting fluorescence value of sample after addition of NPN with fluorescence value before NPN addition.

^c NPN uptake represents fluorescence value actually due to NPN taken into the cells and is calculated by subtracting fluorescence increase with background fluorescence of NPN in buffer.

2.3.8. Figures

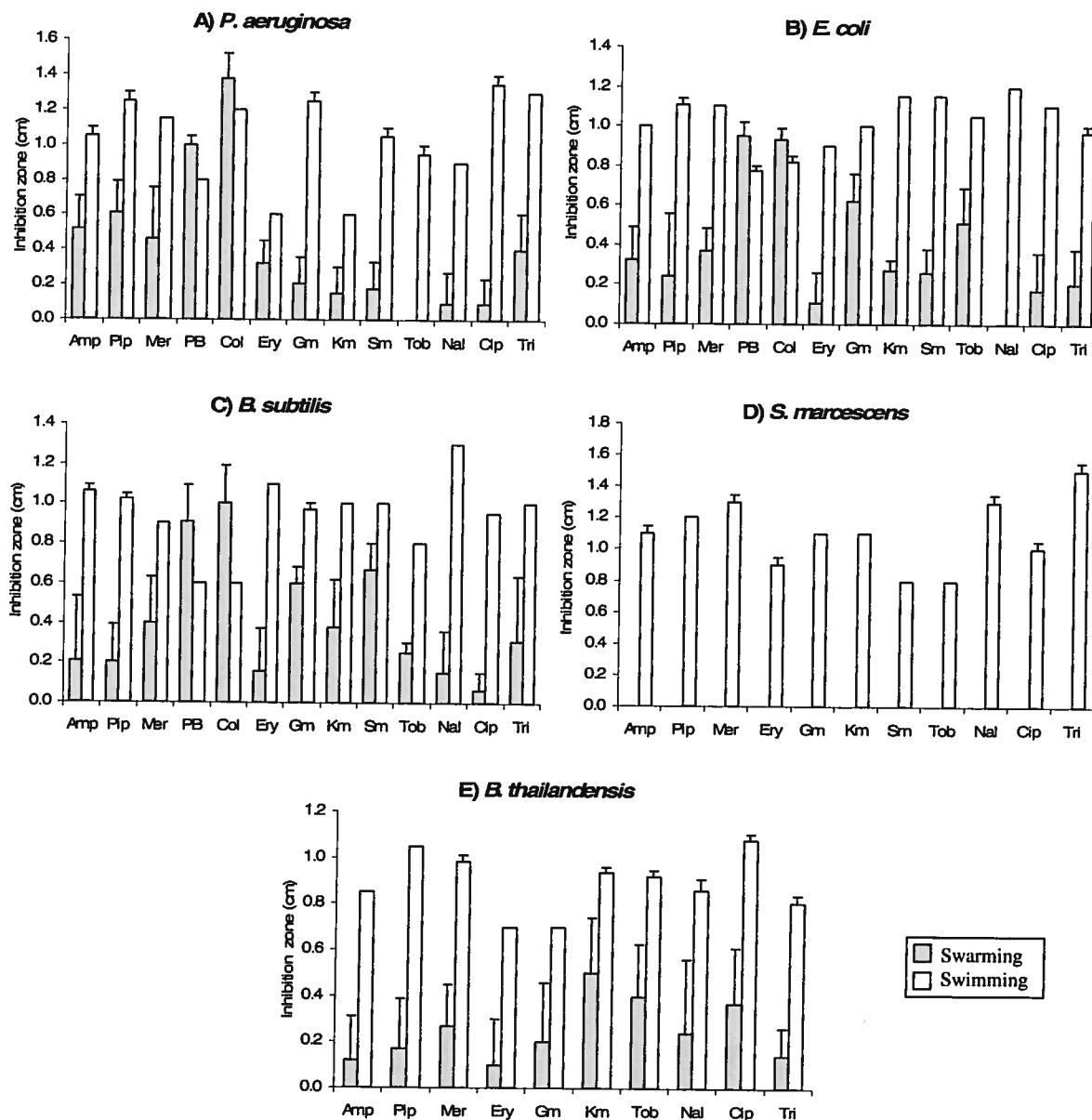
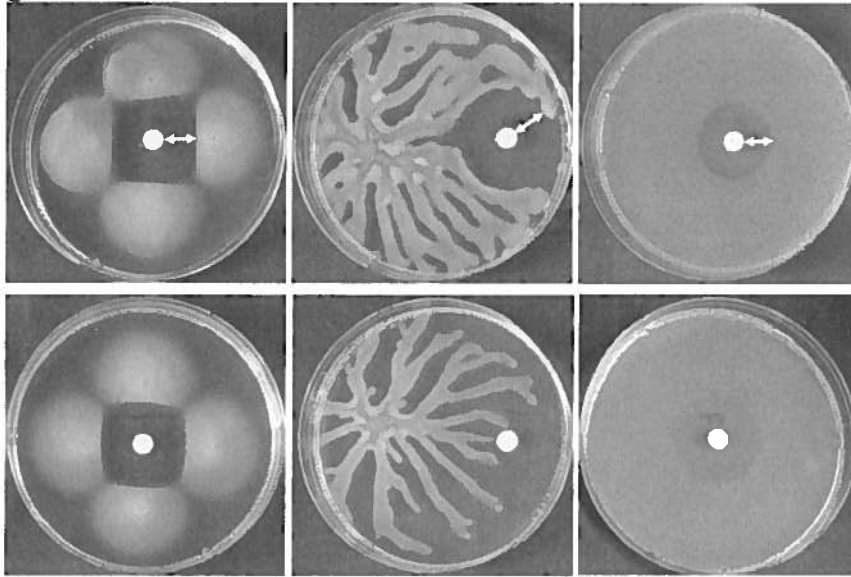


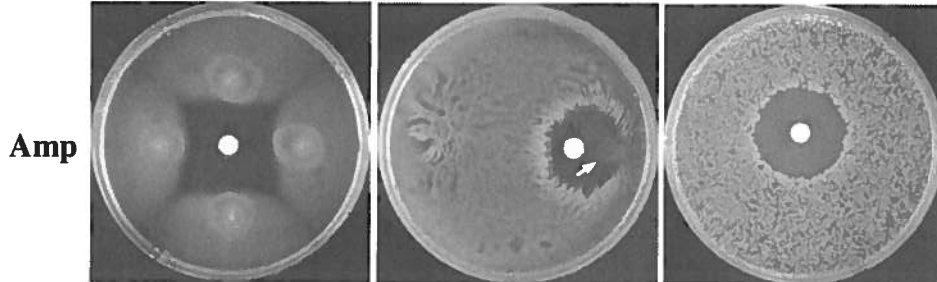
Figure 2.1. Comparison of antibiotic resistance of vegetative cells and swarm cells of (A) *P. aeruginosa*, (B) *E. coli*, (C) *B. subtilis*, (D) *S. marcescens* and (E) *B. thailandensis*. Inhibition zones are presented as mean \pm standard deviation of values obtained for at least eight plates. Values for vegetative cells were taken from solid plates. Abbreviations : Amp, ampicillin; Pip, piperacillin; Mer, meropenem; PB, polymyxin B; Col, colistin; Ery, erythromycin; Gm, gentamicin; Km, kanamycin; Sm, streptomycin; Tob, tobramycin; Nal, nalidixic acid; Cip, ciprofloxacin; Tri, trimethoprim.

A) *P. aeruginosa*



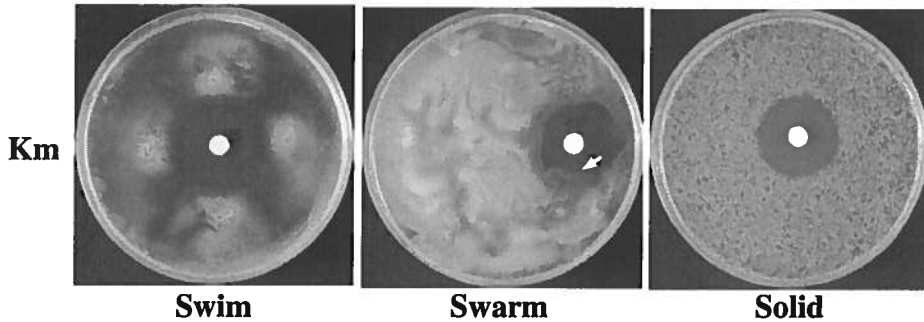
Tob

B) *B. subtilis*



Amp

C) *B. thailandensis*



Km

Swim

Swarm

Solid

Figure 2.2. Antibiograms showing resistance patterns of vegetative and swarm cells of several species. (A) *P. aeruginosa* swarm cells remain sensitive to polymyxin B (PB), but acquire resistance to tobramycin (Tob). (B) *B. subtilis* and (C) *B. thailandensis* swarm cells are more resistant to respectively ampicillin (Amp) and kanamycin (Km). Secondary swarm fronts are observed on plates with those species (single arrows). Inhibition zones were measured as distance from the closest bacterial growth front to edge of the disc, as shown with the double arrows.

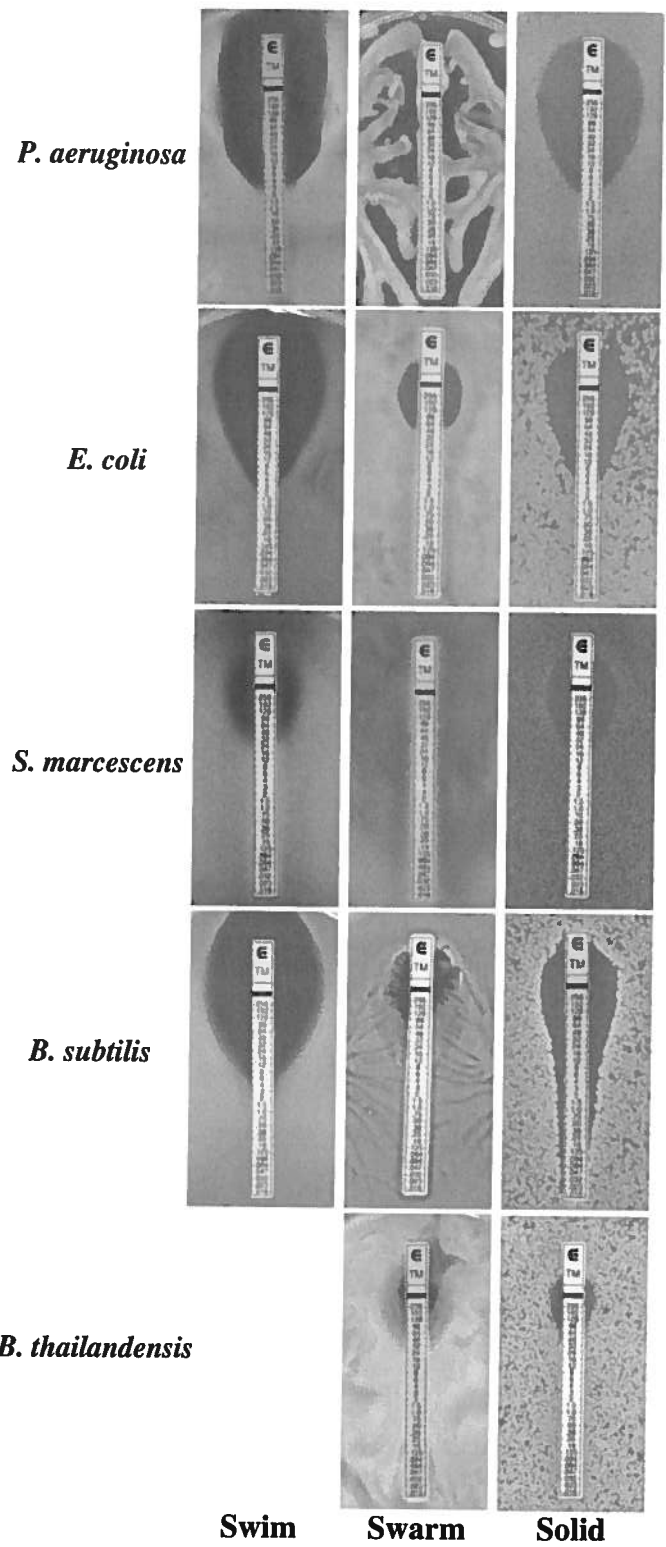
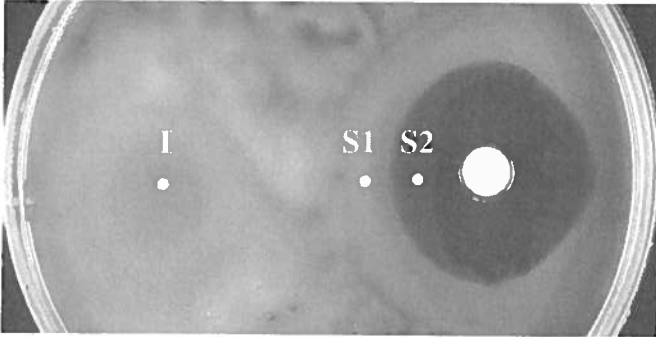


Figure 2.3. E-test comparison of tobramycin MIC for vegetative and swarm cells of several species. Swarm cells of all five species are able to grow at concentrations higher than their vegetative counterparts. See Table 2.2 for MIC values.

A) Initial swarm plate



B) Swarm aspect after replating

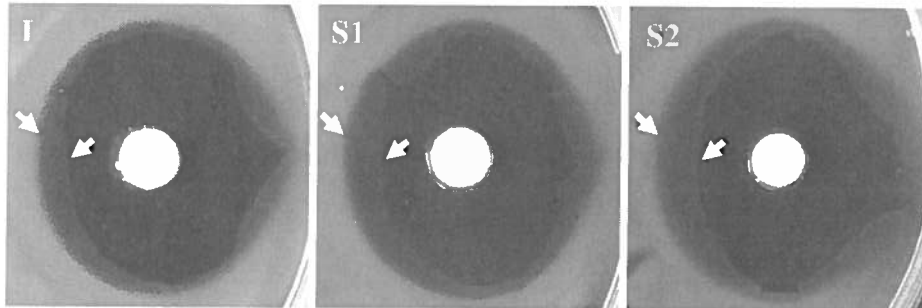


Figure 2.4. Secondary swarm fronts of *E. coli* challenged with meropenem. (A) Cells harvested from the initial swarm plate at three different spots (I, inoculation point; S1, first swarm front; S2, second swarm front) were plated directly on separate new swarm plates. (B) After incubation, cells from I, S1, and S2 formed normal swarming pattern with the same thin secondary swarm front.

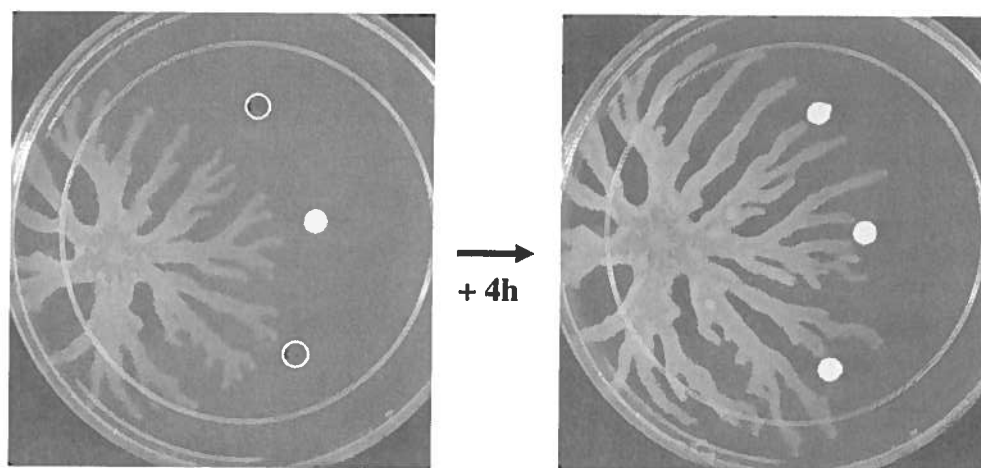


Figure 2.5. Progression of swarming with or without prior exposure to antibiotic. *P. aeruginosa* PA14 cells were spotted on a 15-cm diameter swarm plate and a tobramycin disk was placed on the opposite side. After overnight incubation, new tobramycin discs were placed on the plate (position indicated by hollow circles) in front of fully grown tendrils, and the plates reincubated. Tendrils not previously exposed to the antibiotic progressed in the same manner as tendrils grown in presence of an antibiotic gradient.

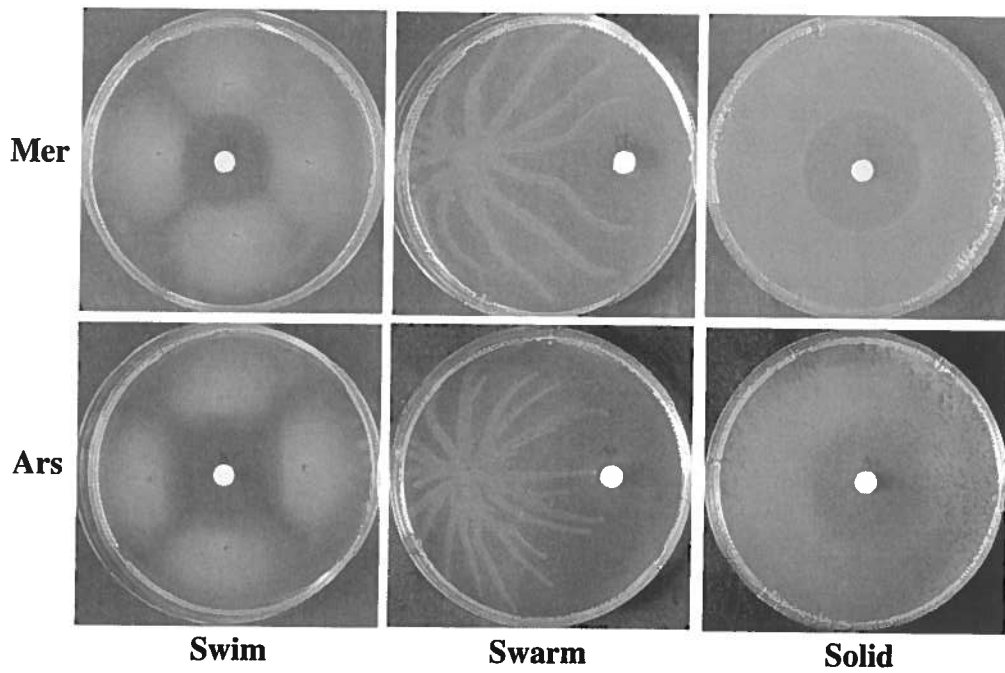
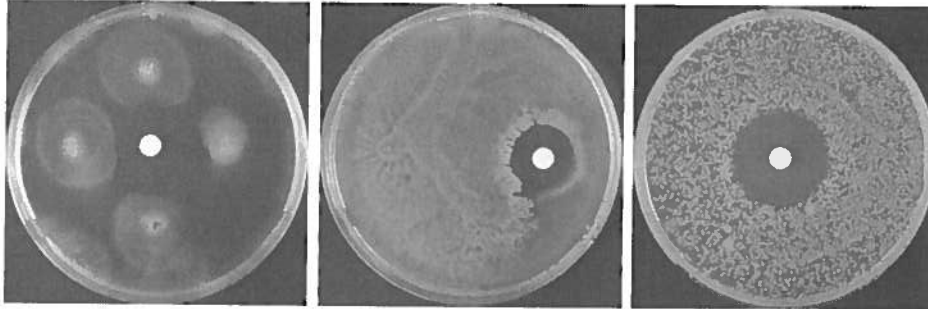
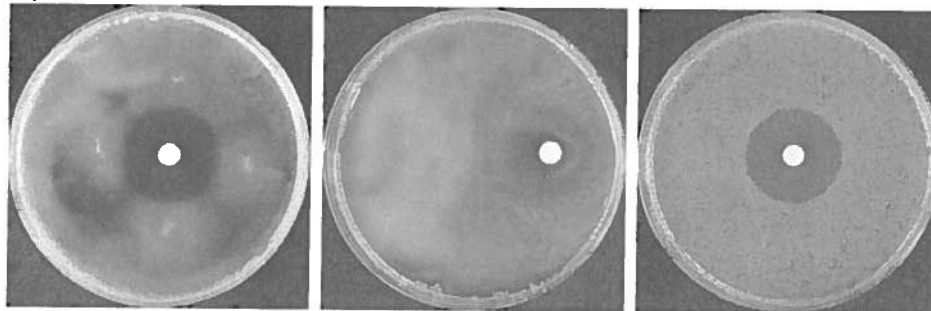


Figure 2.6. Antibiograms showing resistance of vegetative and swarm cells of *P. aeruginosa* PA14 against heavy metals. Swarm cells are still sensible to mercury (Mer), but develop resistance to arsenite (Ars).

A) *B. subtilis*



B) *E. coli*



Swim

Swarm

Solid

Figure 2.7. Antibiograms showing resistance of vegetative and swarm cells of (A) *B. subtilis* and (B) *E. coli* against triclosan.

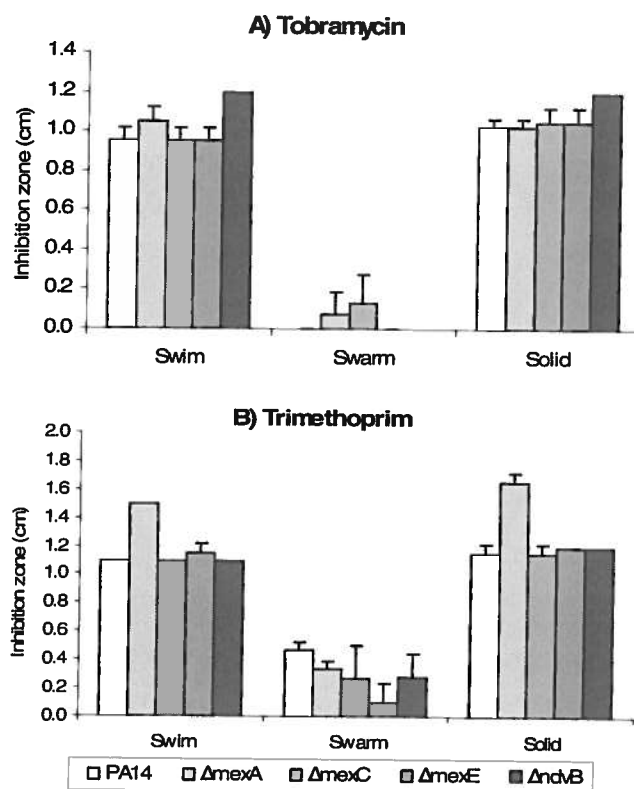


Figure 2.8. Comparison of resistance of cells on swim, swarm and solid plates of four *P. aeruginosa* PA14 mutant strains towards (A) tobramycin and (B) trimethoprim.

CHAPITRE 3. GÉNÉRATION ET CRIBLAGE D'UNE BANQUE DE TRANSPOSANTS DE P. AERUGINOSA PA14

3.1. MISE EN CONTEXTE

Comme rapporté dans l'article du chapitre 2, les bactéries en *swarming* sont capables de supporter des concentrations d'antibiotiques plus élevées que les bactéries en mode végétatif (planctonique). Pour tenter d'identifier un ou des gènes associés à ce phénomène de résistance, il a été entrepris de générer une banque d'environ 10 000 mutants de transposition par mutagenèse aléatoire avec le transposon ISlacZ/hah. La bactérie utilisée pour ces travaux est *P. aeruginosa* souche PA14. Il s'agit d'une souche clinique initialement isolée d'un patient grand brûlé (Rahme *et al.*, 1995) et reconnue comme étant particulièrement virulente (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999; Jander *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002). La méthode utilisée pour faire la banque de transposants par insertion transpositionnelle de ISlacZ/hah est reprise d'un protocole décrit par Jacobs et ses collègues (2003) qui avait été mis au point pour la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. La banque a été ensuite criblée partiellement à la recherche de transposants capables de motilité de type *swarming* mais dont les *tendrils* formés étaient sensibles à la tobramycine, l'antibiotique utilisé pour le criblage.

3.2. MÉTHODOLOGIE

3.2.1. Bactéries et plasmides

La bactérie utilisée pour ces travaux est *P. aeruginosa* souche PA14. La souche d'*E. coli* SM10pir contenant le transposon ISlacZ/hah, un dérivé de l'élément IS50L du transposon Tn5, porté sur le plasmide pIT2 a été obtenue du Dr Michael Jacobs (Jacobs *et al.*, 2003). Le transposon ISlacZ/hah (Fig. 3.1) porte le gène *lacZ* permettant une fusion β -galactosidase avec un gène cible s'il s'insère de façon appropriée, ainsi qu'un gène *tet* de résistance à la tétracycline. Un promoteur d'une phosphotransférase de néomycine situé dans la partie terminale du transposon sert à diminuer d'éventuels effets polaires sur l'expression des gènes en aval en cas d'insertions correctement orientées. Deux sites *loxP* reconnus par l'enzyme Cre permettent une recombinaison qui retire toute la partie du transposon située entre ces deux sites, laissant une insertion de 63 codons (hah) codant pour un épitope d'hémagglutinine d'influenza et une étiquette hexahistidine qui donne la possibilité de réaliser une purification par affinité métallique. Le plasmide pIT2 contenu dans la souche d'*E. coli* SM10pir contient une origine de répllication requérant l'élément λ -pir. *P. aeruginosa* n'est par contre pas λ -pir⁺ et le plasmide une fois dans cette bactérie ne peut pas se répliquer, ce qui fait de pIT2 un vecteur suicide chez *P. aeruginosa*.

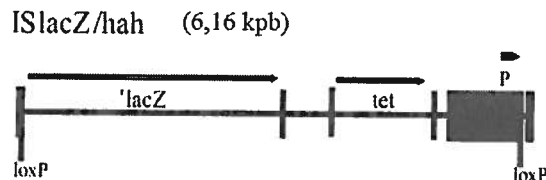


Figure 3.1. Schéma du transposon ISlacZ/hah utilisé pour réaliser la banque de transposants de *P. aeruginosa* PA14. *lacZ*, gène codant pour une β -galactosidase; *tet*, gène de résistance à la tétracycline; P, promoteur de la phosphotransférase de néomycine; *loxP*, séquences de reconnaissance de la recombinase Cre. Figure tirée de Jacobs *et al.*, 2003.

3.2.2. Milieux de culture

3.2.2.1. Milieux de culture liquide

Pour toutes les expériences effectuées, les précultures de différentes bactéries ont été préparées dans du milieu de culture liquide fait de « Tryptic Soy Broth » (TSB, Difco). Le

milieu liquide TSB a été additionné de tétracycline à une concentration de 70 µg/ml pour la culture des transposants IS*lacZ*/hah.

3.2.2.2. Milieux de culture solides

◆ Milieux M9DCAA

Le milieu *swarming* utilisé était un milieu minimal M9 supplémenté avec du dextrose et de la caséine hydrolysée à l'acide (« casamino acids ») comme source d'acides aminés (M9DCAA) et solidifié avec 0,5% d'agar-Bacto (Difco). Les milieux pour réaliser du *swimming* et les milieux solides étaient également du milieu M9DCAA, solidifiés respectivement avec 0,25% et 1,5% d'agar-Bacto (voir détails ci-dessous).

◆ Géloses de sélection

Les géloses de sélection étaient constituées de milieu TSB additionné de tétracycline (70 µg/ml) et de chloramphénicol (15 µg/ml), et solidifié avec 1,5% d'agar.

3.2.3. Précultures bactériennes

Les souches utilisées étaient conservées à -80°C dans des tubes cryogéniques de 2 ml, des mini-tubes à centrifugation de 1,5 ml ou dans un puit d'une plaque de 96 puits contenant du milieu de culture additionné de 15% de glycérol. La veille d'une expérience, la ou les souches à utiliser étaientensemencées dans un tube à essai contenant 3 ml de milieu TSB, puis mises à incuber 16h dans un agitateur rotatoire placé dans un incubateur ayant une température interne ajustée à 37°C. Les précultures de transposants IS*lacZ*/hah étaient réalisées avec du milieu TSB supplémenté avec 70 µg/ml de tétracycline.

3.2.4. Préparation des géloses M9DCAA

Dans un flacon de volume adéquat, 20 mM NH₄Cl, 12 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 22 mM KH₂PO₄, 8,6 mM NaCl, 11 mM dextrose, 0,5% de « casamino acids » (Difco) et 0,5% de Bacto-agar étaient placés et additionnés d'un volume d'eau de qualité Osmose Inverse correspondant. Après avoir bien mélangé les milieux, le flacon était passé à l'autoclave pour une période de 20 min. Durant la période de stérilisation, les boîtes de Pétri étaient identifiées et placées dans une hotte à flux laminaire en deux rangées parallèles dans le

centre de la hotte afin d'assurer un flux d'air égal lors du séchage des géloses. Le matériel nécessaire pour le coulage des géloses était également préparé.

Les géloses étaient coulées directement à la sortie de l'autoclavage. Avant de procéder au coulage, 1 mM de MgSO₄ et de 1 mM CaCl₂ sous forme de solutions étaient ajoutés dans le milieu encore chaud. Un volume de 40 ml de milieu *swarming* était versé dans un tube Falcon® stérile de 50 ml et servait à remplir deux boîtes de Pétri de 20 ml de milieu chacune. Le tube était ensuite réutilisé pour les autres boîtes de Pétri. Un chronomètre était démarré après le remplissage des deux premières géloses et le temps pris pour remplir toutes les boîtes de Pétri était noté, puis divisé par le nombre de boîtes de Pétri divisé par deux. Ce temps représente le temps approximatif utilisé pour remplir deux boîtes de Pétri de milieu.

Les géloses *swarming* étaient séchées 60 min. À la fin du séchage, la première paire de boîtes de Pétri était refermée et après un intervalle de temps correspondant à la période précédemment calculée, les paires de boîtes suivantes étaient refermées. Ceci permettait un temps de séchage égal pour toutes les géloses, ce qui était essentiel pour la reproductibilité du *swarming*. La composition du milieu *swarming* M9DCAA est résumée ci-dessous.

Composition du milieu *swarming* M9DCAA

	<u>MW (g/mol)</u>	<u>Molarité (mM)</u>
NH ₄ Cl	53,5	20 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	268,07	12 mM
KH ₂ PO ₄	136,09	22 mM
NaCl	58	8,6 mM
Dextrose	180,6	11 mM
Casamino acids	N/A	0,5%
Agar-Bacto	N/A	0,5%
	<u>Molarité stock (mM)</u>	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (solution)	1000	1 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O (solution)	1000	1 mM

Pour des milieux gélosés M9DCAA appelés milieux *swimming* et solide, la même procédure était employée que pour les géloses *swarming*. Les quantités d'agar-Bacto pour les milieux *swimming* et solide étaient respectivement de 0,25% et de 1,5%. Le temps de séchage sous hotte laminaire était de 15 min.

3.2.5. Génération d'une banque de transposants

Une banque de transposants a été générée par mutation transpositionnelle aléatoire à l'aide du transposon *ISlacZ/hah*. Pour ce faire, une conjugaison entre *E. coli* SM10pir/pIT2 contenant le transposon et *P. aeruginosa* PA14 a été réalisée. Par la suite, les transposants ainsi obtenus ont été étalés sur des géloses de sélection et les colonies formées ont été repiquées dans des plaques de 96 puits contenant du milieu de culture à l'aide du robot repiqueur de colonies. Les plaques ont ensuite été conservées à -80°C.

3.2.5.1. Conjugaison de *E. coli* SM10pir/PIT2 avec *P. aeruginosa* PA14

En vue de la conjugaison, une préculture de la souche donneuse *E. coli* SM10pir contenant le transposon *ISlacZ/hah* sur le plasmide pIT2 était réalisée sur une gélose TSB contenant 70 µg/ml de tétracycline et incubée O/N à 37°C. Une préculture de la souche receveuse PA14 était effectuée sur une autre gélose TSB sans antibiotique et incubée O/N à 42°C.

Pour réaliser la conjugaison, les biomasses formées par chacune des deux cultures ont été récupérées à l'aide d'un fil de platine, déposées au centre d'une nouvelle gélose TSA, mélangées ensemble, puis incubées à 37°C pendant 16h. Après incubation, toute la biomasse contenue sur la gélose fût recueillie avec un fil de platine, resuspendue dans 5 ml de TSB stérile, puis vortexée afin d'obtenir une solution de conjuguants bien homogène. Après l'ajout de 15% de glycérol, ce volume a été aliquoté en 25 volumes de 200 µl et conservé à -80°C.

3.2.5.2. Étalement sur géloses de sélection

Les géloses de sélection étaient constituées de boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre remplies avec 95 ml de milieu TSB additionné de tétracycline (70 µg/ml) et de chloramphénicol (15 µg/ml), et solidifié avec 1,5% d'agar. Le chloramphénicol, à la concentration choisie, servait à inhiber la croissance de tous les *E. coli* contenus dans le produit de conjugaison tout en permettant la croissance de *P. aeruginosa*. La tétracycline servait à sélectionner les *P. aeruginosa* ayant intégré dans leur génome le transposon *ISlacZ/hah* (qui porte un gène de résistance à la tétracycline). L'efficacité de la conjugaison a été déterminée (nombre de transconjugants/nombre de cellules réceptrices : $6,88 \times 10^{-7}$ %)

avant de procéder à l'étalement à grande échelle des conjuguants obtenus. Plusieurs dilutions ont été réalisées afin de déterminer la dilution optimale de la solution de conjuguants qui permettait d'obtenir sur les géloses de sélection un espacement adéquat des colonies pour le robot repiqueur de colonies. Au final, un volume de 200 µl d'une dilution 1:700 de la solution de conjuguants, étalé avec des billes de verre, donnait une quantité de colonies individuelles compatibles avec le robot repiqueur de colonies. Les géloses de sélection étaient incubées 24h à 37°C, puis transférées à 30°C pour un autre 24h. Ceci permettait d'obtenir des colonies suffisamment espacées, bien rondes, aux contours bien définis et de diamètre d'environ 2 à 3 mm, qui pouvaient être détectées facilement par la caméra du robot.

3.2.5.3. Repiquage des colonies

Les colonies obtenues sur les géloses de sélection étaient repiquées à l'aide du robot repiqueur de colonies GeneTAC™ G3 de la compagnie Genomic Solutions™. Environ 20 géloses de sélection portant chacune approximativement 100 colonies étaient traitées quotidiennement par le robot. L'appareil était muni d'une caméra qui permettait de localiser les colonies à la surface d'une gélose. La tête du robot servant au repiquage était munie de 48 aiguilles pneumatiques. Chaque aiguille piquait une colonie individuelle et lorsque toutes les aiguilles avaient servi, celles-ci allaient ensemençer pendant 1 sec. chacune un puit d'une plaque de 96 puits contenant 700 µl de milieu TSB supplémenté avec 70 µg/ml de tétracycline. Une étape de stérilisation des aiguilles était ensuite effectuée avant de repartir un nouveau cycle de repiquage. Le protocole de stérilisation des aiguilles mis au point était le suivant : 1) un passage de 5 sec. sur des brosses imbibées d'éthanol à 70%, 2) un trempage de 5 sec. dans un bain sonicateur afin de faire décoller les débris d'agar encore présents, 3) un trempage de 5 sec. dans un bain d'éthanol à 70% et 4) un passage sur une plaque chauffante de très haute température pendant 8 sec. Ceci rendait les aiguilles propres et exemptes de bactéries vivantes. Le robot était sous surveillance tout au long des procédures de repiquage.

3.2.6. Criblage de la banque de transposants ISlacZ/hah

Une fois la banque complétée, celle-ci a été criblée à la recherche de transposants capables de faire du *swarming* mais affectés dans la résistance aux antibiotiques.

3.2.6.1. Réplication des plaques de 96 puits de la banque

Une plaque de 96 puits congelée à -80°C était repiquée à l'aide du robot GeneTAC™ G3 en mode « réplication ». La plaque de 96 puits d'origine était conservée sur de la glace sèche, sauf pendant la réplication. Les 96 aiguilles de la tête de réplication s'enfonçaient dans la glace des puits de la plaque d'origine et allaient ensuite ensemercer une micro-plaque de 96 puits dont les puits étaient remplis de 100 µl TSB supplémenté avec 70 µg/ml de tétracycline. Les micro-plaques ensemencées étaient scellées avec du Parafilm et incubées O/N à 37°C sur une plaque agitatrice.

3.2.6.2. Préparation des plaques de criblage

Le criblage s'est effectué avec des plaques carrées en Polystyrène de 25×25 cm. Un marquage avait été fait sur les plaques (extérieur) et divisait le fond d'une plaque en trois sections parallèles d'environ 22×7,5 cm, bordées de leurs deux côtés par des marques de 22×0,6 cm servant à repérer l'emplacement des bandes d'antibiotique (Voir Fig. 3.3). Les plaques pour le criblage étaient remplies de 200 ml du milieu *swarming* M9DCAA préparé de la même manière que décrite dans la section 3.2.4. Ces géloses pouvaient être préparées la veille de leur utilisation et entreposées à 4°C.

3.2.6.3. Préparation et dépôt des bandes d'antibiotiques

L'antibiotique choisi pour effectuer le criblage fut la tobramycine car le phénomène de résistance des *tendrils* est facilement observable et très reproductible avec cet antibiotique. Des bandes de 0,6 cm de largeur et 22 cm de longueur étaient découpées dans du papier filtre Whatman 1 et stérilisées sous U.V. pendant 15-20 min. Les solutions de tobramycine étaient préparées dans de l'eau milliQ, filtrées sur 0,22 µm et conservées à -20°C entre les utilisations. Toute la préparation des bandes d'antibiotique se faisait sous une hotte à flux laminaire. Pour préparer les bandes d'antibiotique, environ 30 à 40 ml d'une solution de tobramycine à une concentration de 3 mg/ml étaient versés dans un cylindre de 100 ml stérile. Une bande était placée dans le cylindre et celui-ci était incliné légèrement afin d'humidifier la totalité de la bande. À l'aide d'une pince, la bande était ensuite retirée du cylindre, placée dans une plaque de 25×25 cm stérile et séchée pendant environ 20 min. Une fois le séchage terminé, les bandes étaient placées à l'aide de deux pinces sur les géloses de

criblage au niveau des marques de repérage faites au fond des plaques carrées en s'assurant que toute la bande entrait en contact avec la gélose. Au préalable, afin de s'assurer que cette méthode de fabrication des bandes de tobramycine permettait d'avoir une zone de diffusion uniforme de l'antibiotique, un test avait été fait dans une plaque carrée en déposant quatre bandes de tobramycine sur une gélose de milieu M9DCAA solidifié avec 1,5% d'agar et ensemencée avec une dilution de PA14. Ceci permettait, après une nuit d'incubation à 30°C, de voir les zones d'inhibition à la manière d'un antibiogramme classique. Les zones d'inhibition formées de chaque côté de la bande montraient une diffusion très égale de l'antibiotique dans la gélose avec toutes les bandes.

3.2.6.4. Inoculation et incubation des plaques de criblage

Une plaque de criblage était divisée en trois sections verticales, délimitées par les bandes d'antibiotique, chaque section portant quatre points d'inoculation placés à égale distance. Les plaques de criblage étaient inoculées avec les transposants issus des microplaques de 96 puits repiquées la veille à partir des plaques de la banque congelées à -80°C. Un volume de 5 µl de chaque puit était prélevé et déposé sur les géloses de criblage. Une plaque de criblage comportait ainsi 11 transposants et 5 µl d'une culture de la souche PA14 inoculés dans le coin supérieur gauche comme témoin. Une plaque de 96 transposants nécessitait la préparation de neuf plaques carrées. Les plaques de criblage étaient ensuite incubées à 30°C pendant 16h.

3.2.7. Sélection et confirmation de transposants

Après incubation, les géloses de criblage portant le *swarming* des transposants étaient observées. Les *tendrils* de la souche PA14 (témoin) sont capables d'atteindre les bandes de tobramycine. Le mutant recherché aurait un phénotype qui se traduirait visuellement par une colonie dont les *tendrils* ne seraient pas capables d'atteindre les bandes de tobramycine. Tous les transposants de ce genre étaient indépendamment repiqués dans des tubes contenant 3 ml de milieu TSB liquide additionné de 70 µg/ml de tétracycline. Ces tubes étaient mis à incuber 16h dans un agitateur rotatoire d'un incubateur à 37°C, puis les transposants étaient conservés à -80°C dans des mini-tubes à centrifugation avec 15% de glycérol.

Pour confirmer que les transposants sélectionnés présentaient bien le phénotype recherché, chaque transposant était vérifié sur des géloses *swarming* dans des boîtes de Pétri individuelles. À partir des stocks de transposants congelés, des précultures étaient reparties dans du milieu TSB supplémenté avec 70 µg/ml de tétracycline. Pour chaque transposant, un antibiogramme sur milieu *swarming* M9DCAA préparé comme indiqué dans la section 3.2.4 était réalisé avec un disque contenant 25 µl de tobramycine à une concentration de 3 mg/ml.

3.2.8. Détermination du site d'insertion du transposon

3.2.8.1. Extraction de l'ADN total du transposant

L'ADN d'un transposant a été extrait en vue de réaliser la réaction de PCR décrite plus bas (section 3.2.8.2). La technique d'extraction de l'ADN employée est une variante d'une technique appelée « colony PCR » (Jacobs *et al.*, 2003).

À partir d'une préculture O/N du transposant, 1 ml était prélevé et centrifugé à 5000×g pendant 5 min. Deux lavages successifs avec 1 ml de PBS étaient ensuite effectués. Pour chaque lavage, le surnageant était éliminé par un prélèvement à l'aide d'une pipette. Après le dernier lavage, le culot était resuspendu dans 500 µl PBS, puis 50 µl de cette mixture était transférée dans un mini-tube à centrifugation. Celui-ci était ensuite placé dans un bloc chauffant à 100°C pour 10 min, transféré immédiatement sur glace pour une autre période 10 min, puis centrifugé à 13000×g pendant 10 min. Enfin, le surnageant contenant l'ADN chromosomique était prélevé du tube, puis entreposé à -20°C.

3.2.8.2. Réaction de PCR semi-arbitraire en deux rondes

La réaction de PCR décrite dans cette section est tirée de la technique décrite par Jacobs *et al.* (2003). Chaque transposant généré par la méthode de mutation par transposition aléatoire possède en théorie un transposon inséré au hasard dans son génome. La réaction de PCR permet d'amplifier une partie du transposon *ISlacZ/hah* conjointement avec une partie de la région du génome directement adjacente au site d'insertion du transposon. Pour ce faire, une réaction de PCR en deux rondes a été effectuée (Fig. 3.2). La première ronde visait à amplifier une séquence contenant l'extrémité du transposon ainsi qu'une partie de l'ADN génomique adjacent. Une amorce spécifique au transposon et trois amorces arbitraires (semi-dégénérées) pouvant se lier aléatoirement sur le génome ont été utilisées pour la réaction de

première ronde. Le produit de la première ronde consistait donc en un mélange de séquences amplifiées de longueurs variables ayant toutes une extrémité en commun. Le but de la deuxième ronde était d'amplifier davantage tous les produits PCR de la première ronde qui contenaient une partie du transposon. Les trois amorces arbitraires de la première ronde contiennent toutes une queue terminale ayant une séquence identique. Les amorces utilisées dans la deuxième ronde consistaient en une amorce spécifique à une partie plus interne du transposon ainsi qu'une amorce spécifique à la queue terminale des amorces arbitraires utilisées dans la première ronde. La deuxième ronde permet ainsi d'amplifier les produits souhaités à partir du mélange obtenu de la première ronde. La réaction de PCR semi-arbitraire en deux rondes a été effectuée sur un seul transposant. Tous les détails des réactions PCR de ronde 1 et 2 sont indiqués à l'appendice A.

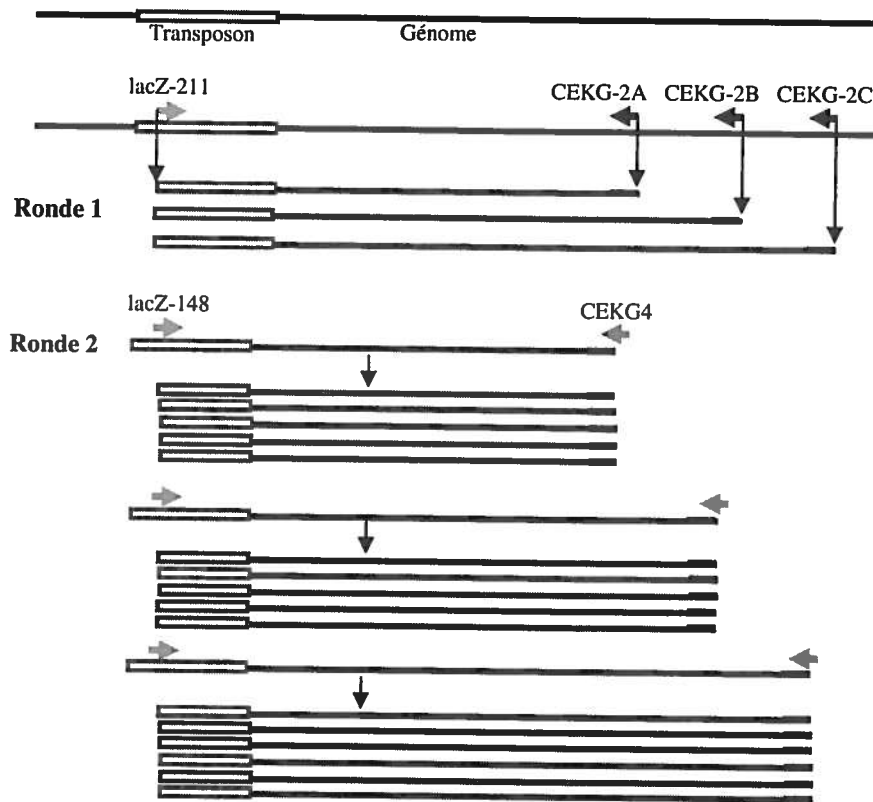


Figure 3.2. Schéma de la réaction de PCR en deux rondes. La ronde 1, avec l'amorce spécifique lacZ-211 et trois amorces arbitraires (CEKG-2A, CEKG-2B, CEKG-2C) résulte en un mélange de fragments amplifiés de longueurs variables. La ronde 2, avec les amorces spécifiques lacZ-148 et CEKG4, permet l'amplification des produits PCR obtenus de la ronde 1.

◆ **Première ronde**

Pour la première ronde de la réaction de PCR, l'amorce spécifique au transposon lacZ-211 ainsi que trois amorces arbitraires (CEKG-2A, CEEKG-2B et CEEKG-2C) ont été utilisées. Le tableau A.2 de l'appendice A indique la concentration et l'ordre dans lequel chacune des composantes de la réaction ont été ajoutées. Tous les réactifs de la réaction de la ronde 1 (sauf l'ADN) ont été mélangés dans un mini-tube à centrifugation, puis un volume de 9,5 µl de cette solution a été transféré dans un tube-PCR identifié. Ensuite, un volume de 0,5 µl de l'ADN du transposant a été rajouté dans le tube-PCR. La réaction de PCR s'est faite dans l'appareil PCR TECHNE genius (MANDEL Scientific). Le programme de la première ronde de la PCR est décrit dans le tableau A.3 de l'appendice A. Le produit de PCR de la première ronde a été conservé à 4°C en attendant la réalisation de la deuxième ronde.

◆ **Deuxième ronde**

Pour la deuxième PCR de la réaction d'amplification, l'amorce interne spécifique au transposon lacZ-148 et l'amorce spécifique à la queue terminale des amorces arbitraires CEEKG4 ont été employées. Les réactifs (sauf le produit PCR de la ronde 1) de la deuxième ronde (tableau A.2 dans l'appendice A) ont été mélangés dans un mini-tube à centrifugation, puis un volume de 47,5 µl de cette solution a été transféré dans un nouveau tube-PCR identifié. Ensuite, un volume de 2,5 µl du produit de PCR de la ronde 1 a été ajouté. Le programme de la deuxième ronde se trouve dans le tableau A.3 de l'appendice A. Le produit PCR final obtenu a ensuite été conservé à -20°C.

3.2.8.3. Migration sur gel d'agarose

Pour vérifier qu'il y a bien eu une bonne amplification, le produit PCR de la ronde 2 a été mis à migrer sur un gel d'agarose 1%. Un volume de 4 µl du produit PCR de la ronde 2, mélangé avec 1 µl de tampon de chargement, a été chargé dans un puit d'un gel d'agarose 1% placé dans une cuve remplie de tampon TAE. Un volume de 5 µl d'une solution d'échelle d'ADN 1kb mélangée à du tampon de chargement a été chargé dans un puit adjacent. La migration a été effectuée à 100 Volts pendant 45 min. Le gel a ensuite été coloré 5 min dans une solution de bromure d'éthidium, puis rincé dans de l'eau pendant 10 min. La photo du

gel a été prise dans un appareil AlphaImager™ 3400 (Alpha Innotec) équipée d'une caméra numérique, sous éclairage aux rayons UV afin de révéler les bandes d'ADN.

3.2.8.4. Séquençage

Les produits PCR de ronde 2 ont été séquencés par le Centre d'Innovation Génome-Québec de l'Université McGill.

3.2.9. Prise de photos des géloses

Les photos des géloses étaient prises avec un appareil photo numérique Canon 10D équipé d'une lentille Canon ultrasonic 28-80 mm. Les photos prises étaient stockées sur une carte mémoire puis transférées sur un ordinateur. Afin d'améliorer le contraste et la clarté des images, les photos étaient traitées avec le logiciel PaintShopPro™ (Jasc software).

3.3. RÉSULTATS

3.3.1. Génération de la banque de transposants

Le protocole détaillé de génération de mutants par transposition se trouve dans la section Méthodologie. Brièvement, la souche de *E. coli* SM10*pir* porteuse du plasmide pIT2 sur lequel se trouve le transposon IS*lacZ*/hah a été mise en contact avec la souche receveuse *P. aeruginosa* PA14 pendant 16 heures. Ce plasmide fonctionne de manière à ce que le transposon qu'il porte ne s'insère qu'une seule fois dans un gène cible (*P. aeruginosa* ou *E. coli*). Le produit de conjugaison obtenu, contenant des transposants à la fois de *P. aeruginosa* et de *E. coli*, a été aliquoté et conservé à -80°C.

Les transposants de *P. aeruginosa* ont été sélectionnés sur des géloses TSB contenant du chloramphénicol pour éliminer les *E. coli* et de la tétracycline afin de ne permettre la croissance que des *P. aeruginosa* ayant intégré le transposon dans leur génome. Plusieurs concentrations différentes des deux antibiotiques ont été testées afin de n'arriver à sélectionner que les *P. aeruginosa* possédant un transposon. Avant de pouvoir repiquer les colonies dans les plaques de 96 puits, plusieurs paramètres ont été ajustés afin d'accommoder le robot repiqueur de colonies. Pour pouvoir être bien détectées par le robot, les colonies sur géloses devaient être isolées, rondes avec une bordure nette, avoir un diamètre suffisamment

grand et être suffisamment opaques. Plusieurs dilutions des aliquots congelés ainsi que différentes températures d'incubation ont été testées afin de trouver la dilution et les conditions optimales permettant d'obtenir une quantité suffisante de colonies individuelles, de taille et de forme adéquates sur les géloses de sélection.

Une fois la mise au point de ces paramètres terminée, une grande quantité de géloses de sélection portant chacune près d'une centaine de colonies de transposants de *P. aeruginosa* ont été générées et passées dans le robot repiqueur de colonies. Étant donné les critères de sélection du robot, les colonies non isolées (deux ou trois colonies qui se touchent), celles au diamètre trop grand ou de forme non circulaire, ainsi que celles trop proches du bord des boîtes de Pétri étaient ignorées. Il faut aussi prendre en compte que lorsque toutes les plaques de 96 puits mises dans le robot étaient remplies, celui-ci arrêta le repiquage même si des colonies étaient encore présentes sur la gélose de sélection en cours de traitement. Une gélose partiellement repiquée par le robot ne pouvait pas être récupérée. Ainsi, environ 80% des colonies de chaque gélose ont pu être repiquées dans des plaques de 96 puits pour constituer la banque de transposants.

La banque finale est composée de 104 plaques de 96 puits. Chaque puit contenant en théorie un transposant, la banque comprend au total 9984 transposants potentiels. Il faut considérer que dans certaines plaques de 96 puits, un à deux transposants ne parvenai(en)t pas à croître. Aucune donnée précise n'a été conservée à cet égard, mais le nombre total réel de transposants composant la banque se retrouve par conséquent légèrement inférieur.

Au cours du processus de repiquage des géloses, il a été remarqué que certaines colonies, en moyenne une par gélose de sélection, présentait un diamètre anormalement grand par rapport aux autres et qu'elles n'étaient par conséquent pas repiquées par le robot. Ces colonies ont été repiquées à la main dans deux plaques de 96 puits (la deuxième plaque n'était pas remplie au complet).

3.3.2. Criblage de la banque de transposants

Une fois la banque de transposants complétée, celle-ci a été criblée partiellement pour trouver un ou des transposants pouvant réaliser du *swarming* tout en étant affecté(s) dans leur capacité de résistance aux antibiotiques. Le protocole suivi pour réaliser le criblage se trouve en détails dans la section Méthodologie. Brièvement, les transposants d'une plaque de 96

puits congelée à -80°C ont été remis en culture dans des micro-plaques de 96 puits à l'aide du robot repiqueur de colonies en mode « réplique ». Le lendemain, ces transposants étaient inoculés sur des grandes géloses de criblage carrées de 25×25 cm remplies de milieu *swarming* M9DCAA. Chaque transposant disposait d'un espace d'environ 7,5×6 cm pour s'étendre, espace limité à droite et à gauche par deux bandes de papier filtre imbibées de tobramycine à une concentration de 3 mg/ml. Chaque gélose de criblage comportait 11 transposants et la souche sauvage PA14 comme témoin. Étant donné que les *tendrils* de la souche PA14 ne sont pas sensibles à la tobramycine et qu'ils sont capables d'atteindre les bandes d'antibiotique, pour assurer que celui-ci était bien actif, un antibiogramme sur une petite gélose M9DCAA solide ensemencée avec la souche PA14 était réalisé chaque fois qu'un criblage avait lieu.

Un transposant était sélectionné en vue de confirmation lorsqu'il présentait un phénotype de *swarming* plus ou moins normal, mais dont les *tendrils* n'arrivaient pas à atteindre les bandes d'antibiotiques. Un exemple de souche sélectionnée est indiqué sur la figure 3.3. Il était possible que le transposant n'ait tout simplement pas eu le temps d'atteindre les bandes ou qu'il possède un autre défaut dans le *swarming*, c'est pourquoi les transposants sélectionnés lors du criblage ont ensuite été retestés individuellement. Des antibiogrammes avec des disques de tobramycine ont été réalisés sur milieu *swarming* M9DCAA. L'étape de confirmation pour un transposant était répétée autant de fois que nécessaire. Les transposants dont un des *tendrils* parvenait à atteindre le disque de tobramycine sur les géloses individuelles étaient éliminés.

Quarante plaques de la banque ont été criblées, ainsi que les deux plaques de 96 puits repiquées à la main (contenant les colonies de grands diamètres), ce qui fait en tout près de 4000 transposants. En moyenne, environ cinq transposants par plaque de 96 puits étaient récupérés et confirmés individuellement. Après les étapes de confirmation, il s'est avéré qu'aucun d'entre eux ne présentait le phénotype recherché. L'un des transposants, appelé #022-39 (022 étant le numéro de la plaque et 39 le numéro du puit de cette plaque contenant le transposant), avait néanmoins nécessité plusieurs tests de confirmation avant de pouvoir déterminer s'il présentait le phénotype recherché ou non.

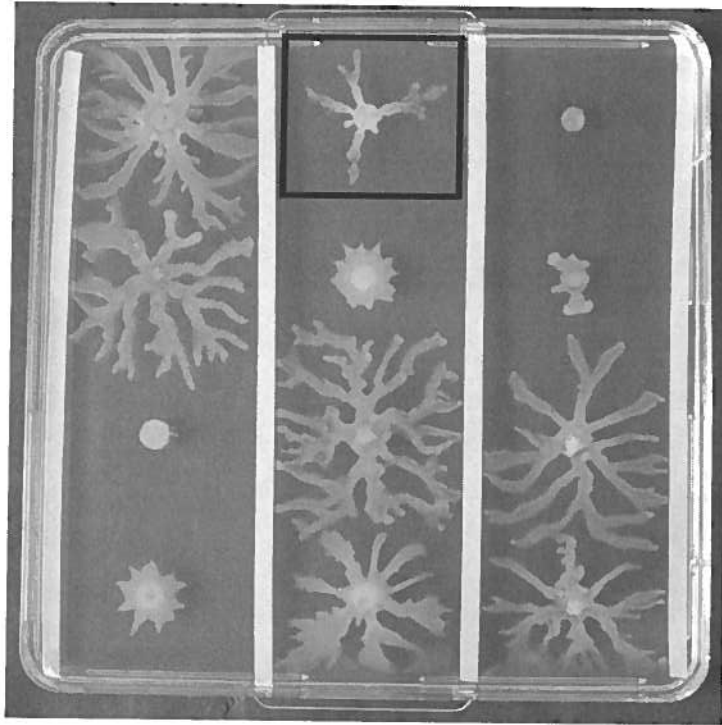


Figure 3.3. Gélose de criblage avec bandes d'antibiotique. Exemple de transposant sélectionné (carré) pour son incapacité à atteindre les bandes de tobramycine. La colonie témoin (PA14) se trouve dans le coin supérieur gauche.

3.3.3. Le cas du transposant #022-39

Le transposant #022-39 semblait présenter une certaine sensibilité envers la tobramycine mais seulement certaines fois. Les résultats des tests de confirmation sont résumés dans le tableau 3.1 et représentés à la figure 3.4. La sensibilité à la tobramycine de #022-39 sur milieu *swimming* et solide (respectivement, Fig 3.4O et 3.4P) est identique à celle de la souche sauvage PA14. Il est à noter que les *tendrils* semblent plus sensibles lorsque deux inocula sont sur la même gélose et le disque de tobramycine placé entre les deux (Fig. 3.4A, 3.4B et 3.4C), bien que dans quatre cas sur 10 un *tendril* parvient à arriver jusqu'à 1 mm du bord du disque (Fig. 3.4D, 3.4G, 3.4J) et à le toucher dans un cas (Fig. 3.4I). Autrement dit, la sensibilité paraît lorsque les *tendrils* disposent de moins de place pour se former avant de rencontrer la zone d'inhibition contenant la tobramycine. En effet, lorsqu'un seul inoculum est placé sur une gélose *swarming* à 4,5 cm du disque de tobramycine, au moins un *tendril* parvient au disque dans huit cas sur les 10 géloses réalisées (Fig. 3.4H, 3.4E, 3.4K, 3.4M, 3.4N). Pour confirmer ceci, des bandes de tobramycine ont été

utilisées pour remplacer le disque afin d'obtenir une plus grande zone d'inhibition (Fig. 3.5C). En effet, sur les six géloses réalisées ainsi, les *tendrils* sont parvenus à toucher la bande dans tous les cas (Fig. 3.5A, 3.5B).

Il est à noter la différence entre l'aspect de la colonie en *swarming* entre les tests de confirmation 1 à 3 (*tendrils* épais) et les tests 4 à 6 (*tendrils* plus définis et plus fins). Il faut mentionner qu'environ trois mois séparent ces deux séries de tests avec #022-39. Pour vérifier l'aspect en *swarming*, des bactéries ont été récupérées directement d'une des boîtes de Pétri du test 1 (qui avait été conservée à 4°C; Fig 3.4A) et repiquées sur six nouvelles géloses *swarming* différentes. L'aspect des colonies en *swarming* des bactéries repiquées de la gélose du test 1 apparaissait semblable à celui des colonies provenant du stock original congelé (Fig. 3.6), indiquant que la différence notée était peut-être simplement due au stock de géloses employées.

Tableau 3.1. Résultats des tests de confirmation du transposant #022-39.

Tests	Gélose 2 inocula			Gélose 1 inoculum		
	Nombre de géloses	<i>Tendrils</i> ne touchent pas le disque	Distance restante*	Nombre de géloses	<i>Tendrils</i> ne touchent pas le disque	Distance restante*
Test 1	2	2/2	4 mm ; 4 mm	-	-	-
Test 2	4	4/4	1 mm ; 2 mm; 2 mm ; 3 mm	2	1/2	2 mm
Test 3	2	2/2	1 mm ; 1 mm	2	0/2	-
Test 4	2	1/2	1 mm	2	1/2	3 mm
Test 5	-	-	-	4	0/4	-
Test 6 (bande)	-	-	-	6	0/6	-

* Lorsque les *tendrils* ne touchent pas le disque (ou la bande) de tobramycine, la mesure de la distance restante représente la distance entre le front de *swarming* le plus proche et le bord du disque.

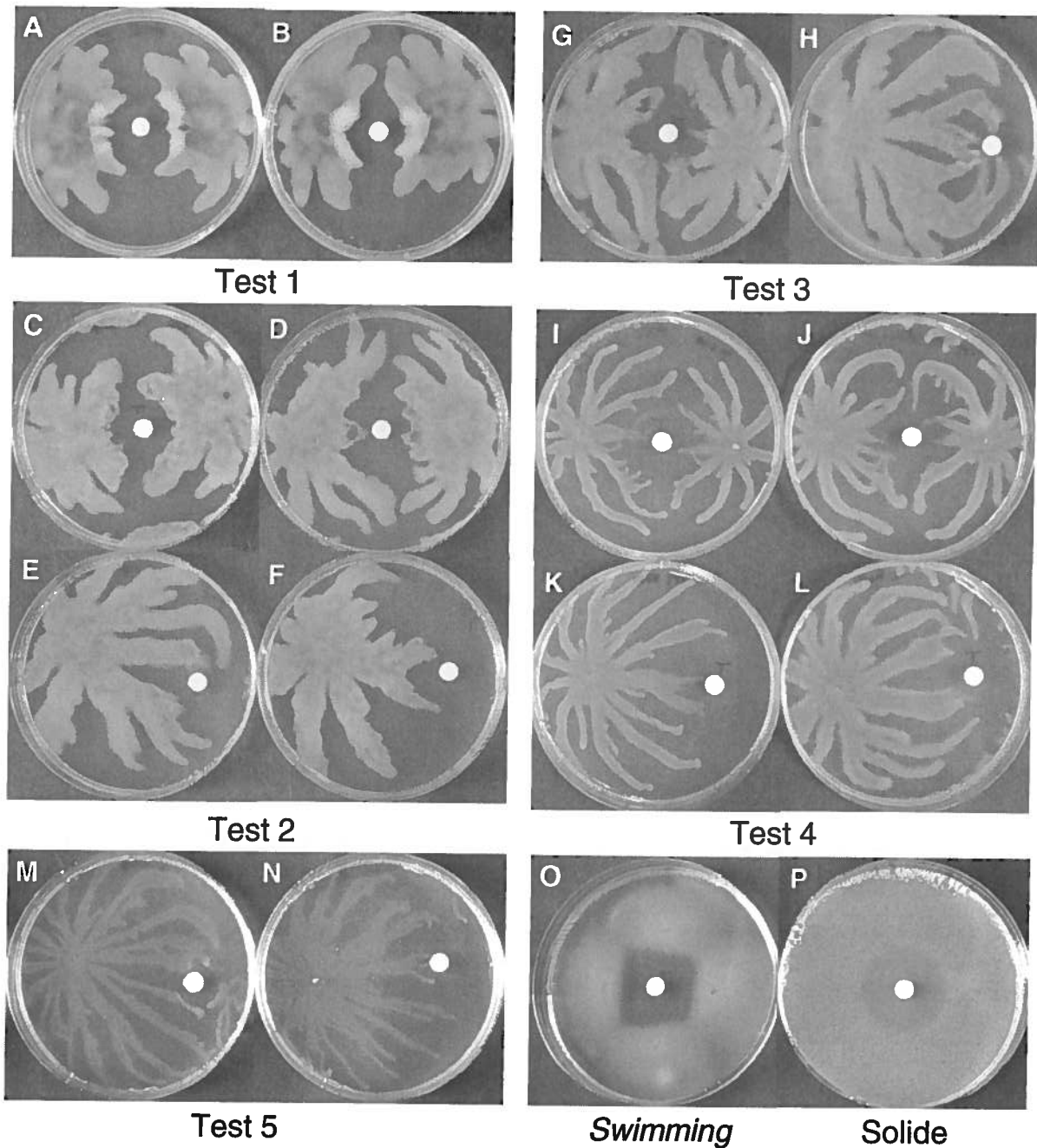
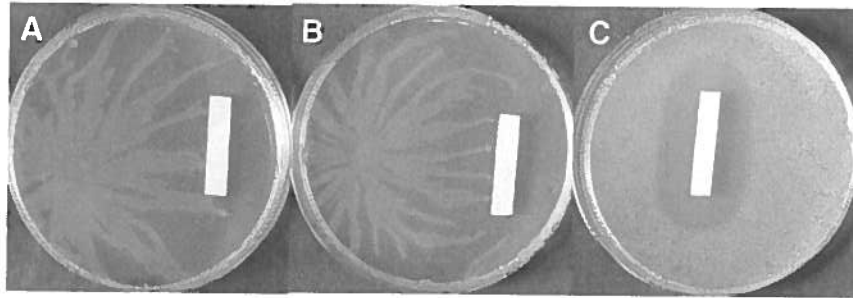


Figure 3.4. Géloses représentatives des tests de confirmation du transposant #022-39 avec un disque de tobramycine. (A, B) Test 1, deux inocula; (C, D) Test 2, deux inocula, (E, F) un inoculum; (G) Test 3, deux inocula, (H) un inoculum; (I, J) Test 4, deux inocula, (K, L) un inoculum; (M, N) Test 5, un inoculum; (O) Antibiogramme sur milieu *swimming* et (P) antibiogramme sur milieu solide.



Test 6

Figure 3.5. Tests de confirmation du transposant #022-39 avec une bande de tobramycine. (A, B) Gélises *swarming* représentatives, et (C) gélose solide montrant la zone d'inhibition formée par la bande de tobramycine.

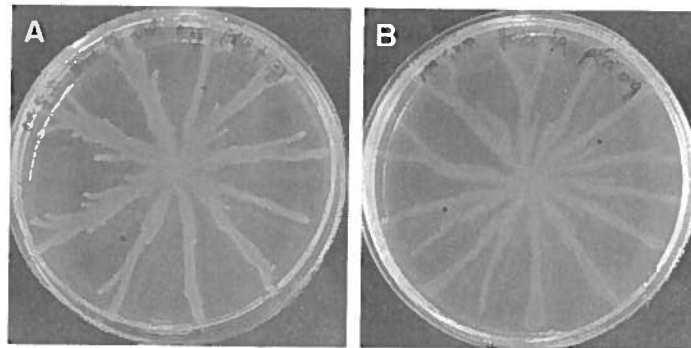


Figure 3.6. Vérification de l'aspect des colonies en *swarming* du transposant #022-39. (A) Gélose inoculée avec une préculture provenant du stock congelé et (B) gélose inoculée avec des bactéries prélevées d'une gélose du test 1 (voir Fig. 3.4A).

Suite à l'incertitude concernant ce transposant, il a été décidé de vérifier le gène dans lequel le transposon s'était inséré. Une réaction de PCR semi-arbitraire à deux rondes a ainsi été réalisée avec #022-39 et le produit final du PCR a été envoyé à séquencer. Une fois la séquence obtenue corrigée avec le logiciel ChromasTM (les 120 premiers nucléotides représentant l'extrémité du transposon sont retirés de la séquence), la séquence a été comparée au génome entier de *P. aeruginosa* PA14 à l'aide de la fonction BLASTN du site www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2005). Le gène dans lequel le transposon s'était inséré s'est avéré être le gène *pilR* de *P. aeruginosa* PA14.

3.4. DISCUSSION

La méthode utilisée pour générer la banque de transposants par insertion transpositionnelle de *ISlacZ/hah* a été largement reprise du protocole décrit par Jacobs *et al.* (2003). Selon cet article, le criblage de 4000 transposants représente une couverture théorique d'environ 40-45% du génome. Le travail de criblage représentant une tâche importante et s'étalant sur un temps considérable (4 mois pour les 4000 mutants), la banque n'a pas pu être criblée en totalité. Le criblage partiel de la banque de transposants n'a pas permis de révéler de gènes impliqués sans équivoque dans le phénotype de résistance aux antibiotiques associé au *swarming*.

Mis à part la raison évidente que la banque n'a pas pu être criblée en totalité, plusieurs autres raisons pourraient être avancées pour expliquer l'absence de mise en évidence, au cours du criblage, d'une composante génétique impliquée dans la résistance aux antibiotiques des cellules en *swarming* de *P. aeruginosa*. Chez *S. enterica* Typhimurium, l'opéron *pmrHFIJKLM* avait pu être associé à la résistance des bactéries en *swarming* envers les peptides antimicrobiens (Kim *et al.*, 2003). Tout d'abord, il faut noter qu'une inactivation d'un des gènes de l'opéron *pmr* chez *Salmonella* résulte en une incapacité totale du mutant à réaliser du *swarming* (Kim *et al.*, 2003). Pour déterminer son rôle dans la résistance associée au *swarming*, l'expression de *pmr* avait été suivie grâce à la fusion d'un rapporteur *lux* avec le promoteur du gène *pmr*. En considérant le rôle de la membrane externe dans la résistance rapporté dans le chapitre 2, il aurait été envisageable de trouver des gènes impliqués dans la biogénèse de cette membrane biologique. Il a précédemment été rapporté que les LPS avaient un rôle important à jouer dans la motilité de type *swarming* (McCoy *et al.*, 2001), mais les mutants dans les gènes reliés aux LPS ne sont également plus capables de réaliser du *swarming* (Toguchi *et al.*, 2000; McCoy *et al.*, 2001). Il est envisageable qu'une mutation dans un gène de résistance abolirait complètement le *swarming* de la souche, par exemple en empêchant la différenciation cellulaire en cellules *swarmers*. Cependant, même si le phénotype recherché lors du criblage était un mutant capable de faire du *swarming* mais affecté dans sa résistance aux antibiotiques, les mutants présentant un *swarming* anormal ou une absence de *swarming* ont également été sélectionnés dans le cadre du projet de mon collègue Julien Tremblay. Les gènes obtenus après séquençage de ces mutants n'ont pas

révélé de gènes impliqués dans un quelconque mécanisme connu de résistance aux antibiotiques.

Ensuite, il faut envisager la possibilité que la résistance aux antibiotiques associée au *swarming* puisse être de nature multifactorielle. Ainsi, il est possible que le lien entre la résistance aux antibiotiques et le *swarming* dépende d'une régulation entre plusieurs gènes et pour pouvoir voir un effet sur la résistance, il faudrait plusieurs mutations et non une seule. Autrement dit, la mutation d'un seul de ces gènes ne permettrait peut-être pas d'atténuer suffisamment la résistance pour que ceci puisse être observable sur les géloses.

Dans le même ordre d'idée que précédemment, il faut aussi savoir que des mécanismes de compensation peuvent se mettre en place pour palier à la mutation d'un gène. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, les pompes à efflux MexAB et MexXY partagent la même protéine de membrane OprM (le gène *oprM* est inclus dans l'opéron *mexA-mexB-oprM*). Tandis que MexAB-OprM est exprimé constitutivement, MexXY est induit seulement suite à l'exposition à certains antibiotiques. En présence d'un antibiotique comme l'ofloxacine, dans un mutant ayant perdu MexAB, OprM peut aller s'associer avec MexXY et former un système de compensation pour l'expulsion de cet antibiotique, bien qu'habituellement, ce système ne contribue pas à la résistance intrinsèque envers l'ofloxacine (Masuda *et al.*, 2000). De même, la pompe MexCD-OprJ peut, chez les souches n'ayant plus la pompe MexAB-OprM, remplacer celle-ci pour effectuer l'extrusion du biocide triclosan (Chuanchuen *et al.*, 2001), tout comme en présence de l'antibiotique tigécycline, l'inhibition de MexXY-OprM peut amener la sélection de systèmes d'efflux compensatoires avec la surexpression de MexAB-OprM ou MexCD-OprJ et possiblement d'autres systèmes d'efflux (Dean *et al.*, 2003). Il est donc possible que la mutation d'un gène par le transposon ne suffise pas à diminuer suffisamment le taux de résistance des bactéries en *swarming* à cause de la compensation par d'autres systèmes.

Finalement, comme le criblage avait été effectué avec un seul antibiotique (la tobramycine), l'emploi d'autres antibiotiques (ciprofloxacine, streptomycine) pourrait peut-être permettre de révéler des gènes d'intérêt impliqués dans la résistance aux antibiotiques des bactéries en *swarming*.

Concernant le transposant #022-39, la sensibilité à la tobramycine observée chez celui-ci dans les premiers tests de confirmation (test 1 à 4), particulièrement sur les géloses

portant deux inocula, était peut-être due au fait que des *tendrils* venant juste de se former présentaient encore une certaine sensibilité à la tobramycine. En effet, lorsque le disque de tobramycine est placé plus loin du point d'inoculation et que les *tendrils* ont le temps de bien se former et de migrer sur une certaine distance, on observe plus fréquemment une résistance des *tendrils* envers l'antibiotique. Les derniers tests avec les bandes de tobramycine ont finalement contribué à éliminer le transposon #022-39 de la sélection. Il a cependant tout de même été préparé pour un séquençage et le gène où le transposon s'est inséré s'est avéré être le gène *pilR*. Le gène *pilR* fait partie d'un système de régulation à deux composantes (PilR/PilS) qui régule la transcription de *pilA*, le gène responsable de la synthèse des sous-unités de pilin des pili de type IV (Ishimoto & Lory, 1992; Boyd & Lory, 1996). Un mutant *pilR*, tout comme un mutant *pilA*, ne possède pas de pili de type IV. L'implication des pili de type IV dans la motilité de type *swarming* est controversée et semble varier selon les souches et/ou le milieu nutritionnel utilisé. Un mutant *pilA* chez la souche PA14 (milieu riche « Bouillon Nutritif ») n'est pas affecté dans ce type de motilité (Rashid & Kornberg, 2000), tandis que les mutants *pil* de la souche PAO1 (dont *pilR*) sont très affectés ou totalement incapables de faire du *swarming* sur un milieu minimal M9 (Köhler *et al.*, 2000) ou minimal BM2 (Overhage *et al.*, 2007). Sur un autre milieu minimal (FAB), ShROUT *et al.* (2006) ont rapporté un *swarming* normal de mutants *pilA* des souches PA14 et PAO1, ainsi qu'un phénotype « *hyperswarmer* » du mutant *pilA* d'une autre souche sauvage de *P. aeruginosa* (ATCC 15692). Bien que l'aspect macroscopique des colonies en *swarming* de notre mutant *pilR* diffère très légèrement du *swarming* typique de la souche sauvage PA14, il reste qu'il est tout à fait capable de réaliser du *swarming* sur milieu minimal M9DCAA, ce qui suggère effectivement que les pili de type IV ne sont pas absolument essentiels au *swarming* chez PA14. Köhler *et al.* (2000) ont proposé que les pili de type IV assisteraient le flagelle lors de la migration ou, alternativement, ils pourraient être impliqués dans la détection de la viscosité de la surface et dans l'envoi d'un signal pour l'initiation du *swarming*. Concernant l'implication de *pilR* dans un mécanisme de résistance des bactéries, rien n'a été rapporté à ce sujet et le mutant #022-39 portant le transposon dans *pilR* a finalement été mis de côté.

DISCUSSION ET CONCLUSION DU MÉMOIRE

Les bactéries peuvent subir de grands changements physiologiques, métaboliques et phénotypiques suite à l'initiation d'entreprendre une activité multicellulaire en association avec une surface. Cette étude a permis de révéler que les bactéries en *swarming* de plusieurs espèces deviennent beaucoup plus résistantes aux agents antimicrobiens que les bactéries végétatives. Une résistance envers des antibiotiques variés appartenant à six familles différentes (β -lactames, aminoglycosides, macrolides, quinolones et antimétaboliques), ainsi qu'envers d'autres agents toxiques comme le triclosan et l'arsenite, a été observée. Il s'agit d'un phénotype multirésistant et transitoire intimement lié au comportement de *swarming*. Les bactéries en *swarming* présentaient une sensibilité seulement envers les peptides antimicrobiens (polymyxine B et colistine). Comme mentionné précédemment, les cellules *swarmers* de *S. enterica* présentaient une résistance envers la polymyxine B et la colistine. Chez *Salmonella* en *swarming*, la résistance aux peptides antimicrobiens a été attribuée à l'opéron *pmrHFIJKLM*. La régulation de cet opéron chez *E. coli* et *P. aeruginosa* est différente de celle opérant chez *S. enterica*. Chez cette dernière, deux systèmes à deux composantes sont capables d'activer l'opéron *pmr*. Le système PmrA/pmrB réagit à une haute concentration en fer Fe^{3+} et contrôle directement *pmrHFIJKLM*, tandis que le système PhoP/PhoQ répond à une faible concentration en magnésium Mg^{2+} et active le système PmrAB par l'intermédiaire de la protéine PmrD (Winfield & Groisman, 2004). La souche de *E. coli* K-12 peut détecter le signal de haute concentration en Fe^{3+} et activer *pmrHFIJKLM* grâce à son système PmrAB, mais sa protéine PmrD étant défectueuse, elle ne réagit pas au signal de faible concentration en Mg^{2+} (Winfield & Groisman, 2004). Étant donné que la présence de fer inhibe le *swarming* (Déziel *et al.*, 2003), les milieux *swarming* utilisés pour les travaux présentés dans ce mémoire ne contiennent pas de Fe^{3+} , ce qui explique peut-être l'absence de résistance aux peptides antimicrobiens des cellules *swarmers* de *E. coli*. Chez *P. aeruginosa*, il n'y a pas de gène homologue au gène *pmrD* de *Salmonella*, et les systèmes PmrAB et PhoPQ répondent tous les deux et de manière indépendante à une faible concentration en Mg^{2+} . Les gènes *pmrAB* peuvent aussi être induits directement par certains peptides antimicrobiens dont la polymyxine B et la colistine (McPhee *et al.*, 2003). Les milieux *swarming* M9DCAA employés avec *P. aeruginosa* contiennent une concentration en

Mg²⁺ relativement élevée (1 mM), il se pourrait par conséquent que les systèmes PhoPQ et PmrAB qui régulent *pmrHFIKML* ne puissent être activés, d'où l'observation de la sensibilité des *swarmers* aux peptides antimicrobiens. Mis à part ces différences de régulation entre les gènes homologues de l'opéron *pmr*, il est à noter que les peptides antimicrobiens exercent leur action principalement aux niveaux de membranes et n'agissent pas en interférant avec des cibles ou l'action de cibles plus précises tels des enzymes ou ribosomes, comme c'est le cas pour les autres classes d'antibiotiques testées. En faisant un parallèle avec les systèmes « toxine-antitoxine » des cellules *persisters* des biofilms, on pourrait avancer l'hypothèse qu'un type de système TA, toxine-antitoxine, empêcherait la corruption des cibles des antibiotiques chez les *swarmers*. Par ailleurs, la surface cellulaire est une composante importante pour les bactéries en *swarming* et certaines modifications de la membrane externe (par exemple, celles impliquées dans la résistance aux peptides antimicrobiens) ne sont peut-être pas compatibles avec les besoins du *swarming* chez certaines espèces.

Dans le cas des biofilms chez *P. aeruginosa*, une résistance plus élevée des bactéries en biofilm comparée à celle des bactéries planctoniques a été rapportée envers plusieurs antibiotiques dont des aminoglycosides (tobramycine, gentamicine), des quinolones (acide nalidixique, ciprofloxacine, ofloxacine), des β -lactames (carbénicilline, ceftazidime) (Whiteley *et al.*, 2001; Mah *et al.*, 2003; Borriello *et al.*, 2004), ainsi qu'envers plusieurs métaux lourds comme le cobalt, le zinc, le cuivre, le plomb, le fer, le nickel et l'aluminium (Teitzel & Parsek, 2003; Harrison *et al.*, 2005). Pour la colistine, seules les cellules formant le capuchon des micro-colonies du biofilm montrent une résistance à ce peptide antimicrobien, tandis que les cellules formant le pied des micro-colonies y sont toujours sensibles (Haagensen *et al.*, 2007). En ce qui concerne les macrolides (par exemple, l'érythromycine), il apparaît que des concentrations même en-dessous du seuil de la MIC inhibent la formation de biofilms. Ceci serait dû à l'inhibition par les macrolides des enzymes responsables de la production de l'alginate, une composante importante de la matrice du biofilm (Schultz, 2004; Wozniak & Keyser, 2004). Pour le triclosan, il a été rapporté que le biofilm de *S. enterica* pouvait bien tolérer le triclosan (Tabak *et al.*, 2007) et que *E. coli* est en mesure de former un biofilm dans un cathéter relarguant du triclosan (Jones *et al.*, 2006). On retrouve ainsi chez les bactéries en *swarming* un profil multirésistant

rappelant celui des bactéries en biofilms, bien que les profils de résistance diffèrent dans certains cas (résistance du biofilm à la colistine et envers plusieurs métaux lourds, et sensibilité à l'érythromycine).

Concernant la recherche des mécanismes possiblement impliqués dans la résistance aux antibiotiques des *swarmers*, trois des pompes à efflux majeures de *P. aeruginosa* PA14 et un mécanisme de résistance associé au biofilm basé sur des glucanes périplasmiques cycliques n'ont pas semblé être impliqués. Ainsi, une résistance aux agents toxiques est observée aussi bien chez les bactéries en *swarming* que celles en biofilm, sans pour autant indiquer que cette résistance soit gouvernée par les mêmes mécanismes. Le criblage partiel d'une banque de transposants de *P. aeruginosa* PA14 n'a pas pu révéler un gène responsable pour la résistance en *swarming*. Une sensibilité à la tobramycine ayant été parfois observée chez le mutant *pilR*, il se pourrait que gène soit tout de même associé à un mécanisme de résistance en *swarming*. Mis à part la possibilité qu'une mutation dans un gène de résistance abolisse le *swarming*, celle que le phénomène de résistance soit de nature multifactorielle et les mécanismes de compensation, il faut tenir compte que le criblage n'a pu recouvrir que 40-45% de la totalité du génome. Une banque non redondante de mutants de *P. aeruginosa* PA14 est en cours de construction (Liberati *et al.*, 2006) et permettra de pouvoir tester des mutants précis tout en connaissant préalablement la nature du gène muté. Bien qu'aucun mécanisme de résistance précis n'ait pu être dévoilé, des tests de perméabilité de la membrane externe chez *P. aeruginosa* ont révélé que celle des bactéries en *swarming* incorpore moins de NPN que les bactéries végétatives. Ceci constitue un indice pour la poursuite des recherches des mécanismes de résistance associés au *swarming*.

Ces résultats tendent à suggérer l'existence d'un phénotype résistant spécifique adopté par les cellules impliquées dans une activité multicellulaire. Il serait intéressant de vérifier également la résistance des bactéries en *twitching*, un autre type de motilité sociale bactérienne. Ceci pourrait également se faire avec *P. aeruginosa* PA14 puisque cette bactérie est l'une des rares chez qui les trois types de motilité bactérienne (*swimming*, *swarming* et *twitching*) ont été rapportés. La signification clinique de ce phénomène de résistance n'est pas à négliger puisque le *swarming* a été associé à la virulence bactérienne et pourrait peut-être avoir un rôle dans la colonisation de l'hôte. Le lien entre la motilité de type *swarming* et les biofilms est encore en cours d'investigation au sein du laboratoire du Dr. Déziel, ainsi

que par d'autres équipes. Il reste à éclaircir si les mécanismes de résistance employés par les bactéries en *swarming* et les bactéries en biofilms sont les mêmes ou s'ils diffèrent. Les bactéries en *swarming*, contrairement aux bactéries des biofilms, sont très métaboliquement actives et ne disposent pas de la protection d'une importante matrice extracellulaire. Malgré cela, elles présentent une résistance élevée envers plusieurs agents toxiques. De plus, le *swarming* est facile à réaliser en laboratoire et ne demande pas autant de matériel que pour l'étude des biofilms. Le *swarming* représente ainsi un bon modèle pour l'étude de la résistance des comportements multicellulaires bactériens.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Alberti, L. & Harshey, R.M.** (1990) Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J Bacteriol* **172**: 4322-4328.
- Allison, C., Lai, H.C. & Hughes, C.** (1992a) Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **6**: 1583-1591.
- Allison, C., Coleman, N., Jones, P.L. & Hughes, C.** (1992b) Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect Immun* **60**: 4740-4746.
- Allison, C., Lai, H.C., Gygi, D. & Hughes, C.** (1993) Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemoattractant for swarming cells. *Mol Microbiol* **8**: 53-60.
- Allison, C., Emody, L., Coleman, N. & Hughes, C.** (1994) The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *J Infect Dis* **169**: 1155-1158.
- Andrews, J.M.** (2001) BSAC standardized disc susceptibility testing method. *J Antimicrob Chemother* **48 Suppl 1**: 43-57.
- Arima, K. & Beppu, M.** (1964) Induction and mechanisms of arsenite resistance in *Pseudomonas pseudomallei*. *J Bacteriol* **88**: 143-150.
- Ben Jacob, E., Becker, I., Shapira, Y. & Levine, H.** (2004) Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol* **12**: 366-372.
- Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A.M., Ehrlich, G.D. & Stewart, P.S.** (2004) Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2659-2664.
- Boyd, J.M. & Lory, S.** (1996) Dual function of PilS during transcriptional activation of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin subunit gene. *J Bacteriol* **178**: 831-839.
- Brooun, A., Liu, S. & Lewis, K.** (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 640-646.
- Cai, J., Salmon, K. & DuBow, M.S.** (1998) A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology* **144** (Pt 10): 2705-2713.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M. & O'Toole, G.A.** (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 7351-7361.

- Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M. & O'Toole, G.A.** (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**: 3603-3612.
- Champlin, F.R., Ellison, M.L., Bullard, J.W. & Conrad, R.S.** (2005) Effect of outer membrane permeabilisation on intrinsic resistance to low triclosan levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **26**: 159-164.
- Chiang, P. & Burrows, L.L.** (2003) Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 2374-2378.
- Choi, J.Y., Sifri, C.D., Goumnerov, B.C., Rahme, L.G., Ausubel, F.M. & Calderwood, S.B.** (2002) Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J Bacteriol* **184**: 952-961.
- Chuanchuen, R., Karkhoff-Schweizer, R.R. & Schweizer, H.P.** (2003) High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. *Am J Infect Control* **31**: 124-127.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R. & Schweizer, H.P.** (2001) Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 428-432.
- Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J.** (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 261-289.
- Davey, M.E. & O'Toole, G.A.** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847-867.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C. & O'Toole, G.A.** (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**: 1027-1036.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. & Greenberg, E.P.** (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C. & Iglewski, B.H.** (2001a) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1865-1873.
- De Kievit, T.R., Parkins, M.D., Gillis, R.J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B.H. & Storey, D.G.** (2001b) Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1761-1770.

- Dean, C.R., Visalli, M.A., Projan, S.J., Sum, P.E. & Bradford, P.A.** (2003) Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 972-978.
- Denyer, S.P. & Maillard, J.Y.** (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* **92 Suppl**: 35S-45S.
- Déziel, E., Comeau, Y. & Villemur, R.** (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **183**: 1195-1204.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. & Villemur, R.** (2000) Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim Biophys Acta* **1485**: 145-152.
- Déziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R.** (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005-2013.
- Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A. & Villemur, R.** (1999) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta* **1440**: 244-252.
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R. & DuBow, M.S.** (1995) An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **177**: 2050-2056.
- Drenkard, E.** (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* **5**: 1213-1219.
- Drenkard, E. & Ausubel, F.M.** (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**: 740-743.
- Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M.** (1999) Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **181**: 1703-1712.
- Escalada, M.G., Harwood, J.L., Maillard, J.Y. & Ochs, D.** (2005) Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **55**: 879-882.
- Espinosa-Urgel, M.** (2003) Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol* **185**: 699-700.
- Fraser, G.M. & Hughes, C.** (1999) Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**: 630-635.

- Givskov, M., Eberl, L., Christiansen, G., Benedik, M.J. & Molin, S.** (1995) Induction of phospholipase- and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. *Mol Microbiol* **15**: 445-454.
- Haagensen, J.A., Klausen, M., Ernst, R.K., Miller, S.I., Folkesson, A., Tolker-Nielsen, T. & Molin, S.** (2007) Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **189**: 28-37.
- Hancock, R.E. & Wong, P.G.** (1984) Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* **26**: 48-52.
- Hancock, R.E. & Bell, A.** (1988) Antibiotic uptake into gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**: 713-720.
- Harrison, J.J., Turner, R.J. & Ceri, H.** (2005) Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **7**: 981-994.
- Harshey, R.M.** (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**: 389-394.
- Harshey, R.M.** (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-273.
- Harshey, R.M. & Matsuyama, T.** (1994) Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8631-8635.
- Heath, R.J., Su, N., Murphy, C.K. & Rock, C.O.** (2000) The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases FabI and FabL from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **275**: 40128-40133.
- Heath, R.J., Rubin, J.R., Holland, D.R., Zhang, E., Snow, M.E. & Rock, C.O.** (1999) Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem* **274**: 11110-11114.
- Helander, I.M. & Mattila-Sandholm, T.** (2000) Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. *J Appl Microbiol* **88**: 213-219.
- Henrichsen, J.** (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**: 478-503.
- Hentzer, M. & Givskov, M.** (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1300-1307.
- Hentzer, M., Eberl, L., Nielsen, J. & Givskov, M.** (2003) Quorum sensing : a novel target for the treatment of biofilm infections. *BioDrugs* **17**: 241-250.

- Imamura, Y., Higashiyama, Y., Tomono, K., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Ohno, H., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J., Iglewski, B.H. & Kohno, S. (2005)** Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1377-1380.
- Ishimoto, K.S. & Lory, S. (1992)** Identification of *pilR*, which encodes a transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin gene. *J Bacteriol* **174**: 3514-3521.
- Jackson, C.R. & Dugas, S.L. (2003)** Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evol Biol* **3**: 18.
- Jacobs, M.A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M.V. & Manoil, C. (2003)** Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14339-14344.
- Jander, G., Rahme, L.G. & Ausubel, F.M. (2000)** Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**: 3843-3845.
- Jones, G.L., Muller, C.T., O'Reilly, M. & Stickler, D.J. (2006)** Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J Antimicrob Chemother* **57**: 266-272.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I.B. & Seror, S.J. (2004)** Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology* **150**: 1839-1849.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I.B. & Seror, S.J. (2005)** Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J Bacteriol* **187**: 65-76.
- Kim, W. & Surette, M.G. (2003)** Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biol Proced Online* **5**: 189-196.
- Kim, W., Killam, T., Sood, V. & Surette, M.G. (2003)** Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J Bacteriol* **185**: 3111-3117.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C. & Pechere, J.C. (2000)** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**: 5990-5996.

- Kumar, A. & Schweizer, H.P.** (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* **57**: 1486-1513.
- Lewis, K.** (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* **70**: 267-274.
- Li, X.Z., Poole, K. & Nikaido, H.** (2003) Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 27-33.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F.M.** (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2833-2838.
- Loh, B., Grant, C. & Hancock, R.E.** (1984) Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **26**: 546-551.
- Mah, T.F. & O'Toole, G.A.** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**: 34-39.
- Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S. & O'Toole, G.A.** (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**: 306-310.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G. & Ausubel, F.M.** (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**: 47-56.
- Maier, R.M. & Soberón-Chávez, G.** (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 625-633.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. & Nishino, T.** (2000) Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2242-2246.
- Matsuyama, T. & Nakagawa, Y.** (1996) Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J Microbiol Methods* **25**: 165-175.
- Matsuyama, T., Bhasin, A. & Harshey, R.M.** (1995) Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J Bacteriol* **177**: 987-991.
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H. & Yano, I.** (1992) A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **174**: 1769-1776.

- McCarter, L. & Silverman, M.** (1990) Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* **4**: 1057-1062.
- McCoy, A.J., Liu, H., Falla, T.J. & Gunn, J.S.** (2001) Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2030-2037.
- McMurry, L.M., Oethinger, M. & Levy, S.B.** (1998a) Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **394**: 531-532.
- McMurry, L.M., Oethinger, M. & Levy, S.B.** (1998b) Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 305-309.
- McPhee, J.B., Lewenza, S. & Hancock, R.E.** (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 205-217.
- Mendelson, N.H. & Salhi, B.** (1996) Patterns of reporter gene expression in the phase diagram of *Bacillus subtilis* colony forms. *J Bacteriol* **178**: 1980-1989.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L.** (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.
- Nies, D.H.** (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730-750.
- Nikaido, H.** (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**: 382-388.
- Nikaido, H.** (1998) The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug Resist Updat* **1**: 93-98.
- O'Toole, G.A. & Kolter, R.** (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- Ochsner, U.A., Fiechter, A. & Reiser, J.** (1994a) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* **269**: 19787-19795.
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A. & Reiser, J.** (1994b) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**: 2044-2054.

- Otto, M.** (2004) Quorum-sensing control in *Staphylococci* -- a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett* **241**: 135-141.
- Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A.K. & Hancock, R.E.** (2007) Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J Bacteriol* **189**: 2164-2169.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C. & Iglewski, B.H.** (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**: 5756-5767.
- Peschel, A. & Sahl, H.G.** (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 529-536.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. & Gotz, F.** (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405-8410.
- Poole, K.** (2002) Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* **92 Suppl**: 55S-64S.
- Poole, K. & Srikumar, R.** (2001) Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* **1**: 59-71.
- Rahim, R., Ochsner, U.A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S. & Soberón-Chávez, G.** (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **40**: 708-718.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G. & Ausubel, F.M.** (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899-1902.
- Ramos-Aires, J., Plesiat, P., Kocjancic-Curty, L. & Köhler, T.** (2004) Selection of an antibiotic-hypersusceptible mutant of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the GlmR transcriptional regulator. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 843-851.
- Rashid, M.H. & Kornberg, A.** (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4885-4890.
- Rauprich, O., Matsushita, M., Weijer, C.J., Siegert, F., Esipov, S.E. & Shapiro, J.A.** (1996) Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J Bacteriol* **178**: 6525-6538.
- Ruimy, R. & Andremont, A.** (2004) Quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique et inhibition. *Réanim* **13**: 176-184.

- Russell, A.D.** (2003) Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* **3**: 794-803.
- Russell, A.D.** (2004) Whither triclosan? *J Antimicrob Chemother* **53**: 693-695.
- Schauder, S. & Bassler, B.L.** (2001) The languages of bacteria. *Genes Dev* **15**: 1468-1480.
- Schultz, M.J.** (2004) Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* **54**: 21-28.
- Schweizer, H.P.** (2001) Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 1-7.
- Schweizer, H.P.** (2003) Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**: 48-62.
- Shapiro, J.A.** (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* **52**: 81-104.
- Sharma, M. & Anand, S.K.** (2002) Swarming: A coordinated bacterial activity. *Curr Sci* **83**: 707-715.
- Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M. & Parsek, M.R.** (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**: 1264-1277.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F. & Déziel, E.** (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 718-725.
- Spoering, A.L. & Lewis, K.** (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* **183**: 6746-6751.
- Spratt, B.G.** (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264**: 388-393.
- Stewart, P.S. & Costerton, J.W.** (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135-138.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. & Olson, M.V.** (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

- Suga, H. & Smith, K.M.** (2003) Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 586-591.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., Chikindas, M.L. & Yaron, S.** (2007) Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **267**: 200-206.
- Tack, K.J. & Sabath, L.D.** (1985) Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy* **31**: 204-210.
- Tamayo, R., Ryan, S.S., McCoy, A.J. & Gunn, J.S.** (2002) Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**: 6770-6778.
- Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G. & Ausubel, F.M.** (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2408-2413.
- Teitzel, G.M. & Parsek, M.R.** (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2313-2320.
- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M. & Harshey, R.M.** (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **182**: 6308-6321.
- Tremblay, J., Richardson, A.P., Lepine, F. & Déziel, E.** (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol* **9**: 2622-2630.
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O. & Tomasz, A.** (1986) The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol* **132**: 1297-1304.
- Vaara, M.** (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**: 395-411.
- Villalain, J., Mateo, C.R., Aranda, F.J., Shapiro, S. & Micol, V.** (2001) Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan. *Arch Biochem Biophys* **390**: 128-136.
- Walsh, C.** (2003) Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. Washington, DC: ASM Press, p. 345.
- Walters, M.C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J. & Stewart, P.S.** (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to

tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 317-323.

Wang, Q., Suzuki, A., Mariconda, S., Porwollik, S. & Harshey, R.M. (2005) Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *Embo J* **24**: 2034-2042.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. & Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.

Winfield, M.D. & Groisman, E.A. (2004) Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17162-17167.

Winsor, G.L., Lo, R., Sui, S.J., Ung, K.S., Huang, S., Cheng, D., Ching, W.K., Hancock, R.E. & Brinkman, F.S. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Res* **33**: D338-343.

Withers, H., Swift, S. & Williams, P. (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 186-193.

Wozniak, D.J. & Keyser, R. (2004) Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* **125**: 62S-69S; quiz 69S.

APPENDICE A

Amorces et conditions des réactions de PCR semi-arbitraire à deux rondes

Tableau A.1. Séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR.

Amorces	Séquence	Longueur	Utilité
LacZ-124L	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACC	24	Séquençage
LacZ-148	GGGTAACGCCAGGGTTTTCC	20	R2
LacZ-211	TGCGGGCCTCTTCGCTATTA	20	R1
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	18	R2
CEKG-2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNAGAG	34	R1
CEKG-2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC	35	R1
CEKG-2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT	35	R1

Tableau A.2. Concentrations des réactifs utilisés pour les réactions de PCR.

RONDE 1

Réactifs	$\mu\text{l/Rx} (\mu\text{l}) - 1 \text{ Rx}$
10× Tampon Taq	1
dNTPs 10 mM	0,2
Amorce lacZ-211 10 pmol/ μl	0,5
Amorce CEKG-2A 10 pmol/ μl	0,2
Amorce CEKG-2B 10 pmol/ μl	0,2
Amorce CEKG-2C 10 pmol/ μl	0,2
H ₂ O stérile	7,1
Enzyme Taq	0,1
ADN	0,5
Total	10

RONDE 2

Réactifs	$\mu\text{l/Rx} (\mu\text{l}) - 1 \text{ Rx}$
10× Tampon Taq	5
dNTPs 10 mM	1
Amorce lacZ-148 10 pmol/ μl	2,5
Amorce CEKG4 10 pmol/ μl	2,5
H ₂ O stérile	36
Enzyme Taq	0,5
Produit PCR de la ronde 1	2,5
Total	50

Tableau A.3. Programmes des réactions de PCR semi-arbitraire à deux rondes.

RONDE 1

Étape	Température	Temps	Notes
1	94°C	12'	Dénaturation initiale
2	94°C	30"	Dénaturation
3	42°C	30"	Hybridation; diminuer la température de 1°C à chaque cycle
4	72°C	3'	Extension
5	Aller à l'étape 2		6 cycles; ensuite aller à l'étape 6
6	94°C	30"	Dénaturation
7	64°C	30"	Hybridation
8	72°C	3'	Extension
9	Aller à l'étape 6		25 cycles, ensuite aller à l'étape 10
10	72°C	7'	Extension finale
11	4°C	En attente	Fin

RONDE 2

Étape	Température	Temps	Notes
1	94°C	10'	Dénaturation initiale
2	94°C	30"	Dénaturation
3	64°C	30"	Hybridation
4	72°C	3'	Extension
5	Aller à l'étape 2		30 cycles; ensuite aller à l'étape 6
6	72°C	7'	
7	4°C	En attente	Fin