

INRS - Institut Armand-Frappier

Caractérisation de la motilité de type « swarming » chez *Pseudomonas aeruginosa*

Par

Julien Tremblay

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Lépine, François	INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Daigle, France	Université de Montréal
Directeur de recherche	Déziel, Éric	INRS – Institut Armand-Frappier

Droits réservés de TREMBLAY, Julien 2007 ©

RÉSUMÉ

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram-négatif vivant dans le sol et les environnements aqueux. C'est un pathogène opportuniste pouvant causer des infections pulmonaires chroniques chez les individus atteints de la fibrose kystique (FK). En plus des motilités de type « swimming » et « twitching », *P. aeruginosa* est capable d'un autre type de motilité : le « swarming ». Ce type de motilité se manifeste par un mouvement rapide et coordonné d'une population bactérienne sur une surface semi-solide, résultant d'une activité intercellulaire ainsi que d'une différenciation morphologique des cellules. Celles-ci se regroupent en radeaux multicellulaires, deviennent hyperflagellées et hyperallongées, allant jusqu'à doubler leur taille. *In vitro*, le « swarming » se traduit par la formation de dendrites qui migrent selon des motifs particuliers à partir du point d'inoculation. Un mélange de molécules tensio-actives, qui agirait en réduisant la friction entre les cellules et le milieu sur lequel elles circulent, est produit par les bactéries et est absolument nécessaire pour ce type de motilité. Ce biosurfactant est composé de rhamnolipides (RL) et de leurs précurseurs, les acides 3-(3-hydroxyalcanoïxy) alcanoïques (HAA). Des études récentes suggèrent aussi que les RL sont intimement impliqués dans la formation de biofilms. Un biofilm est une communauté bactérienne englobée dans une matrice d'exopolymères, ce qui la rend notamment plus résistante à de nombreux antibiotiques. La synthèse du biosurfactant est régulée par le « quorum sensing » (QS), qui est une forme de communication intercellulaire. Il est donc important de mettre en contexte la relation existante entre le « swarming », les biofilms et le QS. La fonction fondamentale du « swarming » est inconnue, mais elle serait la conséquence de l'expression de voies génétiques activées par certains facteurs environnementaux. En effet, il est reconnu que la viscosité et la composition du milieu de culture jouent un rôle déterminant sur l'expression du « swarming ». Un milieu pauvre en nutriments avec une faible concentration d'agar est nécessaire pour déclencher ce type de motilité chez *P. aeruginosa*. Les travaux présentés dans ce mémoire avaient pour but de caractériser la motilité de type « swarming » chez la souche PA14 de *P. aeruginosa*. Cela a été accompli en 1) déterminant plusieurs facteurs qui influencent le « swarming » et 2) en identifiant des gènes impliqués dans ce type de motilité. Les résultats obtenus montrent que le

« swarming » est intimement relié à la composition du milieu nutritionnel ainsi qu'aux propriétés physiques de l'agar et qu'un milieu hautement osmotique entraîne la formation de dendrites hyper-rammifiées. Un total de 67 gènes impliqués dans le « swarming » a été identifié. Finalement, l'influence des RL et des HAA sur le « swarming » a été investigué. Des RL purifiés attirent les dendrites et favorisent le « swarming ». Par contre, les HAA repoussent les dendrites et inhibent le « swarming ». Les résultats de ces travaux permettront d'améliorer les connaissances sur la motilité de type « swarming », mais aussi sur la motilité de surface en général, qui est un phénomène encore mal compris et peu étudié.

Étudiant

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier spécialement le Dr. Éric Déziel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour les nombreuses suggestions et discussions très enrichissantes. Je remercie aussi tous mes collègues de laboratoire (maintenant nombreux) avec qui il a été très agréable de travailler, particulièrement Sandra pour son aide et les nombreuses discussions portant sur le « swarming ». Je remercie aussi mon amoureuse Annie, ma mère Michelle et mon père André pour leur aide et support.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES APPENDICES	9
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	10
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	11
1.1 Introduction.....	11
1.2 La multicellularité chez les bactéries	13
1.3- La motilité chez les bactéries	14
1.3.1- Différents types de motilité bactérienne.....	14
1.3.2 – Motilité de type « swarming ».....	15
1.3.3 - Les différents phénotypes de « swarming ».....	16
1.3.4 – Différenciation cellulaire et motilité de type « swarming ».....	17
1.4 – Motilité de type « swarming » chez <i>Serratia</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> et <i>Vibrio cholerae</i>	19
1.4.1 – <i>Serratia</i>	20
1.4.1.1 - Milieu nutritionnel et « swarming ».....	20
1.4.1.2 – Gènes impliqués dans le « swarming ».....	20
1.4.1.3 – Biosurfactants, QS et « swarming ».....	21
1.4.1.4 – Virulence et motilité de type « swarming ».....	23
1.4.2 – <i>Proteus mirabilis</i>	23
1.4.2.1- Milieu nutritionnel et « swarming ».....	23
1.4.2.2 - Facteurs génétiques du « swarming ».....	24
1.4.2.3 – Matrice extracellulaire et « swarming ».....	27
1.4.2.4 – Virulence et « swarming ».....	28
1.4.3 – <i>Salmonella</i>	29
1.4.3.1 – Milieu nutritionnel et « swarming ».....	29
1.4.3.2 – Génétique du « swarming ».....	29
1.4.3.3 - Facteurs requis pour le « swarming ».....	30
1.4.3.4 – Virulence et « swarming ».....	30
1.4.4 – <i>Bacillus subtilis</i>	31
1.4.4.1 – Milieu nutritionnel et « swarming ».....	31
1.4.4.2 – Gènes impliqués dans le « swarming ».....	32
1.4.4.3 - QS et surfactine.....	32
1.4.4.4 - Virulence et « swarming ».....	33
1.4.5 – <i>Vibrio</i>	34
1.4.5.1 - Milieu nutritionnel et « swarming ».....	34

1.4.5.2 - Génétique du « swarming ».....	36
1.4.5.3 - Opacité des colonies et « swarming ».....	36
1.5.6 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
1.5.6.1 - Milieu nutritionnel et « swarming ».....	38
1.5.6.2 - Gènes impliqués dans le « swarming ».....	39
1.5.6.3 – QS et Rhamnolipides.....	41
1.5.6.4 – « Swarming » biofilms et virulence.....	43
1.6 - Chimiotactisme et « swarming ».....	43
2. MÉTHODOLOGIE.....	45
2.1 – Bactéries et plasmides.....	45
2.2 – Milieux de culture.....	46
2.2.1 – Milieux de culture liquide.....	46
2.2.2 – Milieu de culture solide.....	46
2.2.2.1 – Géloses « swarming ».....	46
2.2.2.2 – Géloses de confirmation par colonies.....	46
2.3 – Croissance des bactéries.....	47
2.3.1 – Courbes de croissance des transposants.....	47
2.4 – Préparation de géloses « swarming ».....	47
2.4.1 – Préparation de géloses « swarming » optimisées.....	47
2.4.2 – Préparation de géloses « swarming » pour l'étape d'optimisation du milieu « swarming ».....	49
2.4.2.1 – Variation du temps de séchage.....	49
2.4.2.2 – Variation de la concentration d'un élément du milieu nutritionnel.....	49
2.4.2.3 – Variation du pH des géloses « swarming ».....	50
2.5 – Ensemencement de géloses « swarming ».....	50
2.6 – Incubation de géloses « swarming ».....	51
2.7 – Prise de photos de géloses « swarming ».....	52
2.8 – Génération d'une banque de mutants par insertion transpositionnel aléatoire.....	52
2.8.1 – Précultures de conjugaison.....	53
2.8.2 – Conjugaison de <i>E. coli</i> SM10 <i>pir</i> /pIT2 avec PA14.....	53
2.8.3 – Étalement des conjuguants sur géloses de sélection.....	54
2.8.4 – Repiquage des colonies.....	54
2.9 – Détermination du site d'insertion des transposons.....	55
2.9.1 – Extraction de l'ADN total des transposants.....	55
2.9.2 - Réaction PCR semi-arbitraire en deux rondes.....	56
2.9.2.1 – Généralités.....	56
2.9.2.2 – Ronde 1.....	57
2.9.2.3 – Ronde 2.....	58
2.9.2.4 – Migration sur gel d'agarose.....	58
2.9.2.5 – Préparation des produits PCR pour le séquençage.....	59

3. RÉSULTATS.....	60
3.1 - Optimisation des conditions induisant le « swarming ».....	60
3.1.1 - Temps de séchage sous hotte à flux laminaire et température d'incubation.....	61
3.1.2 – Influence de la densité cellulaire de l'inoculum.	64
3.1.3 - Influence de différentes sources d'azote.....	64
3.1.4 - Influence de différentes sources de Carbone.	66
3.1.5 - Influence de l'osmolarité.....	70
3.1.6 - Influence de différents métaux sur la motilité de type « swarming ».	72
3.1.7 - Influence du pH sur la motilité de type « swarming ».	73
3.1.8 - Influence de conditions dénitrifiantes sur le « swarming ».	74
3.1.9 – Optimisation des géloses « swarming ».....	74
3.2 – Mutagenèse par transposition et gènes impliqués dans la motilité de type « swarming ».....	76
3.2.1 – Génération d'une banque de transposants.....	76
3.2.2 – Criblage des transposants affectés dans la motilité de type « swarming ».	78
3.2.3 – Caractérisation des transposants.....	80
3.2.4 – Amplification des gènes dans lequel un transposon est inséré.....	81
3.2.5 – Séquençage et analyse des produits PCR obtenus.	82
3.2.6 – Identification des gènes affectés impliqués dans la motilité de type « swarming ».....	83
3.2.7 – Phénotype de « swarming » des transposants sélectionnés.....	91
3.2.7.1 – Exemples de phénotype de transposants inhibés dans la motilité de type « swarming ».	91
3.2.7.2 – Exemples de phénotype de transposants affectés dans la motilité de type « swarming ».	93
3.2.7.3 – Influence sur le « swarming » de la position d'insertions différentes dans un même gène.	94
4- DISCUSSION.....	96
4.1 - Séchage des géloses « swarming ».	96
4.2 - Densité cellulaire de l'inoculum.	97
4.3 - L'effet de l'osmolarité sur la motilité de type « swarming ».	97
4.4 - Influence des métaux sur le « swarming ».....	101
4.5 - Influence du pH sur la motilité de type « swarming ».	102
4.6 - Anoxie et « swarming ».	103
4.7 - Mutagénèse par transposition aléatoire.	104
4.8 - Conclusion	110
BIBLIOGRAPHIE.....	111
APPENDICE A	124

APPENDICE B	130
APPENDICE C	134
APPENDICE D	137
APPENDICE F.....	146
APPENDICE H.....	172

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La motilité de type « swarming » se manifeste différemment selon les espèces et selon le milieu nutritionnel.	16
Figure 2. Les cellules « swarming » différenciées ont une taille et un nombre de flagelles supérieurs aux cellules végétatives (non-différenciées).	18
Figure 3. Les cellules différenciées pour la motilité de type « swarming » forment des structures de radeaux multicellulaires.	19
Figure 4. Synthèse de SerrawettinW2 et QS chez <i>S. liquefaciens</i>	22
Figure 5. Le circuit de QS chez <i>B. subtilis</i>	33
Figure 6. L'inhibition de la rotation du flagelle polaire entraîne l'expression des gènes flagellaires latéraux (<i>laf</i>) chez <i>V. parahaemolyticus</i>	35
Figure 7. OpaR et SwrZ inhibent l'expression des gènes flagellaires latéraux (<i>laf</i>).	37
Figure 8. Schéma du système de QS chez <i>P. aeruginosa</i>	41
Figure 9. Transposon utilisé pour effectuer la mutagenèse par insertion.	45
Figure 10. Schéma de la méthode utilisée pour faire varier la concentration d'un élément sur plusieurs géloses de milieu « swarming ».	50
Figure 11. Schéma général des étapes de la construction de la banque de transposants <i>ISlacZ/hah</i>	53
Figure 12. Schéma de la réaction PCR en deux rondes.	57
Figure 13. Le temps de séchage sous hotte à flux laminaire ainsi que la température ont des effets déterminant sur le « swarming » en milieu A) M9D et B) NBD..	62
Figure 14. Phénotype « swarming » de référence obtenu avec un milieu M9D solidifié avec 0,5% d'agar.	63
Figure 15. Influence de la DO de l'inoculum sur le « swarming ».	64
Figure 16. Effet de différentes concentrations d'azote sur le phénotype de « swarming ».	65
Figure 17. Effet de différentes concentrations de dextrose sur le « swarming ».	67
Figure 18. Influences du fructose sur la motilité de type « swarming ».	68
Figure 19. Influence du sucrose sur la motilité de type « swarming ».	69
Figure 20. Influence du citrate de sodium sur la motilité de type « swarming ».	70
Figure 21. Influences de différentes concentrations A) de KCl et B) de NaCl sur la motilité de type « swarming ».	71
Figure 22. L'influence de différentes concentrations de cobalt, cuivre, fer et zinc sur la motilité de type « swarming ».	72

Figure 23. Le pH affecte la motilité de type « swarming ».....	73
Figure 24. La motilité de type « swarming » peut avoir lieu aussi bien en conditions aérobiques qu'anoxiques.....	74
Figure 25. L'influence de différentes concentrations de CAA sur la motilité de type « swarming ». Observations prises 16 heures après l'incubation.....	75
Figure 26. Gélose de criblage « swarming ».	79
Figure 27. Exemple de produits PCR obtenus par la réaction PCR arbitraires en deux rondes.....	82
Figure 28. Schéma de produit de séquençage typique obtenu.....	83
Figure 29. Résumé des différentes fonctions des gènes de transposants affectés dans le « swarming ».....	84
Figure 30. Résumé des différentes fonctions des gènes des transposants inhibés dans le « swarming ».....	85
Figure 31. Exemples de transposants ayant perdus leur capacité d'effectuer du « swarming ».....	92
Figure 32. Exemples de transposants étant affectés dans la motilité de type « swarming ».....	94
Figure 33. Le phénotype de « swarming » de transposants affectés dans le même gène peut varier selon la position de l'insertion du transposon.....	95
Figure 34. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans la production et le fonctionnement des flagelles.....	137
Figure 35. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des régions intergéniques.	137
Figure 36. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de perméases, pompes à efflux ou transporteurs.	138
Figure 37. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels.....	138
Figure 38. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire.....	138
Figure 39. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des protéines hypothétiques.	139
Figure 40. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de fonction diverses.....	139
Figure 41. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de protéines membranaires externes.....	140
Figure 42. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de perméases, pompes à efflux ou transporteurs.	141

Figure 43. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels.....	141
Figure 44. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire.....	142
Figure 45. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des protéines de stress.....	142
Figure 46. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans la maturation/réplication de l'ADN/ARN.....	143
Figure 47. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des protéines hypothétiques.	144
Figure 48. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des éléments de la machinerie flagellaire.....	144
Figure 49. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de fonctions diverses.	145
Figure 50. Phénotype de « swarming » des transposants ayant des insertions dans une région intergénique.....	145

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Gènes impliqués dans la différenciation cellulaire chez <i>P. mirabilis</i>.	25
Tableau II. Gènes impliqués dans la motilité de type « swarming » chez <i>B. subtilis</i>.	32
Tableau III. Caractéristiques des transposants affectés dans la motilité de type « Swarming ».	86
Tableau IV. Caractéristiques des transposants inhibés dans la motilité de type « Swarming ».	89
Tableau V. Données relatives à la figure 17A.	124
Tableau VI. Données relatives à la figure 17B.	125
Tableau VII. Données relatives aux figures 18 et 22.	126
Tableau VIII. Données relatives aux figures 19, 20 et 21.	127
Tableau IX. Données relatives à la figure 23.	128
Tableau X. Séquences des amorces utilisées pour les réactions PCR.	134
Tableau XI. Concentrations des réactifs utilisés pour les réactions PCR.	134
Tableau XII. Programme des réactions PCR réalisées.	135

LISTE DES APPENDICES

Appendice A. Tableaux des calculs pour les expériences de la section 3.1 ayant nécessité des variations dans la composition du milieu M9D.

Appendice B. Composition des milieux de cultures et solutions utilisées

Appendice C. Amorces et conditions des réactions PCR réalisées.

Appendice D. Photos des transposants incapables de « swarming ».

Appendice E. Photos des transposants affectés dans le « swarming ».

Appendice F. Contexte insertionnel des transposants affectés dans le « swarming ».

Appendice G. Contexte insertionnel des transposants inhibés dans le « swarming ».

Appendice H. Article soumis à *Environmental microbiology*.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

QS: « Quorum sensing »

ASL : « Airway surface liquid »

FK : fibrose kystique

HAA : Acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy) alcanoïque

LB : Lysis Broth (Bouillon LB)

NB : Nutrient broth (Bouillon nutritif)

RL : Rhamnolipides

TSB : « Tryptic Soy Broth »

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires mesurant quelques micromètres et qui peuvent présenter plusieurs formes incluant des sphères, bâtonnets et spirales. Ce sont des procaryotes et, contrairement aux animaux et autres eucaryotes, elles ne possèdent pas de noyau et autres organelles encapsulées dans des membranes. Malgré que la vaste majorité des bactéries soient inoffensives voir même bénéfiques pour les animaux, certaines d'entre elles peuvent causer des maladies infectieuses incluant le choléra, syphilis, l'anthrax, la tuberculose, etc. Les infections bactériennes respiratoires sont les plus fatales et les plus répandues. Dans les pays développés, des antibiotiques sont couramment utilisés pour traiter des infections bactériennes et conséquemment, un nombre croissant de bactéries sont devenues résistantes aux antibiotiques.

Les bactéries sont souvent perçues comme étant de simples créatures unicellulaires isolées les unes les autres lorsque comparées à des organismes « supérieurs ». Plusieurs études sur le développement microbien ont toutefois montré que celles-ci sont capables de différenciations élaborées, de comportements sociaux complexes et de communication. Parmi ces comportements, il y a entre autre la formation de spores, la motilité, la sécrétion de facteurs de virulence et la formation de biofilms.

Les communautés microbiennes les mieux étudiées sont les biofilms, qui sont une matrice de polysaccharides dans laquelle les bactéries s'englobent. La formation de biofilms peut avoir lieu grâce à la division du travail et à la spécialisation de certaines cellules de la population. Sous forme de biofilms, les microorganismes sont plus résistants aux antibiotiques et causent de nombreuses infections chroniques.

Pour bouger dans leur environnement, les bactéries utilisent généralement un à plusieurs flagelles ainsi qu'un système de chimiotactisme qui permet aux cellules de diriger leurs mouvements en réponse à des gradients chimiques. Par exemple, une bactérie est généralement attirée par une source de nutriments et repoussée par des produits toxiques. Les gradients chimiques sont détectés par des senseurs membranaires qui transmettent des signaux vers l'intérieur de la cellule à des protéines spécialisées dans

le chimiotactisme. Ces protéines modulent la rotation des flagelles qui fait en sorte que la bactérie se rapproche ou s'éloigne du gradient chimique. Les connaissances actuelles sur la motilité bactérienne ont été acquises en étudiant les bactéries dans des environnements aqueux en condition de laboratoire. Cependant, dans leur environnement naturel, les bactéries sont très souvent associées à des surfaces. La motilité de surface demeure très peu comprise chez les microorganismes et de plus en plus d'indices laissent croire que ce processus est très complexe.

Le « swarming » est un exemple de motilité de surface faisant appel au concept de multicellularité. La fonction fondamentale du « swarming » est inconnue. Des indices permettent de croire que le « swarming » serait déclenché par l'expression de voies génétiques activées par certains facteurs environnementaux.

1.2 La multicellularité chez les bactéries

Les bactéries ont longtemps été perçues comme étant des organismes solitaires unicellulaires. Cependant, de plus en plus d'évidences montrent que les bactéries sont capables de communication intercellulaire leur permettant de réaliser des activités coordonnées (Fuqua *et al.*, 2001; O'Toole *et al.*, 2000). Dans leurs écosystèmes naturels, les bactéries persistent en tant que communautés où elles ont développé des systèmes d'interaction et de communication leur permettant de s'adapter aux changements environnementaux. Pour arriver à cette coordination, le « quorum sensing » (QS) est le moyen de communication utilisé par les bactéries pour réguler leur expression génétique en réponse à leur densité cellulaire.

Le QS peut avoir lieu grâce à des molécules-signaux appelées autoinducteurs. Comme chez les organismes supérieurs, l'information véhiculée par ces autoinducteurs est essentielle pour synchroniser des activités multicellulaires tel que la bioluminescence, la motilité, la formation de biofilm, la virulence, la production d'antibiotique et la sporulation (Camilli & Bassler, 2006). En effet ces activités nécessitent l'action concertée de nombreuses cellules pour être productives (Waters & Bassler, 2005).

Les communautés bactériennes les mieux étudiées sont les biofilms, qui sont des structures hautement organisées de microorganismes englobés dans une matrice d'exopolymères attachées à une surface (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Les biofilms peuvent se trouver dans une variété d'environnements biotiques ou abiotiques, tel qu'un tractus intestinal, une surface inerte ou dans la rhizosphère (Davey & O'Toole G, 2000; Stoodley *et al.*, 2002). Par exemple, la plupart des infections chroniques pulmonaires des individus atteints de la fibrose kystique sont causés par la formation de biofilms de *P. aeruginosa* (Costerton *et al.*, 1999). Sous forme de biofilm, les bactéries peuvent efficacement résister aux défenses de l'hôte et font preuve d'une grande tolérance aux agents antimicrobiens et toxiques à des concentrations qui leur seraient fatales à l'extérieur d'un biofilm (Hogan & Kolter, 2002).

1.3- La motilité chez les bactéries

1.3.1- Différents types de motilité bactérienne.

Les bactéries possèdent la faculté de coloniser de nombreux environnements. Selon les nutriments disponibles et les propriétés de la surface sur laquelle elles se trouvent, elles peuvent demeurer au même endroit, migrer vers d'autres surfaces, envahir des tissus de différents hôtes ou bien développer des biofilms ou produire des spores et attendre un moment plus favorable à leur développement (Harshey, 2003). En interagissant de façon dynamique avec leur surface, les bactéries sont en mesure de détecter des signaux de leur environnement immédiat et d'adopter un comportement conséquent à ces signaux. Il y a plusieurs années, J. Henrichsen (1972) sonda la motilité de surface de plus d'une centaine de microorganismes différents. Il identifia alors six catégories de motilités de surface, soit le « swimming », « swarming », « gliding », « twitching », « sliding » et « darting ». Parmi tout ces type de motilités, seul le « swimming » et le « swarming » requièrent l'utilisation de flagelles fonctionnels (Harshey, 2003).

La forme de motilité qui a été la plus étudiée est sans aucun doute le « swimming ». Dans ce type de motilité, les bactéries nagent isolées les unes des autres dans un environnement aquatique et migrent selon un système de chimiotactisme largement documenté. De manière générale, les cellules en « swimming » migrent vers des niches riches en nutriments.

La motilité de type « twitching » est un mode de translocation de bactéries sur une surface solide et requiert des pili (fimbriae) de type IV fonctionnels (Mattick, 2002). Comme la motilité de type « swarming », le « twitching » est sous le contrôle du QS. La motilité de type « twitching » a été la plus étudiée chez *P. aeruginosa* et existe notamment aussi chez *Neisseria gonorrhoeae* et *Escherichia coli* (McBride, 2001).

La motilité de type « gliding », simplement définie comme étant une translocation de cellules sur une surface, est peu comprise (McBride, 2001). Le « gliding » ne requiert pas de flagelles et le mouvement des cellules s'effectue le long de l'axe le plus long de la cellule (McBride, 2001). Typiquement des bactéries en « gliding » actif produisent des dendrites miniatures (McBride, 2001). *Myxococcus xanthus*, un organisme modèle pour

l'étude de la motilité de surface, utilise les pili de type IV pour effectuer le « gliding » de type social (McBride, 2001). *M. xanthus* peut aussi effectuer un autre type de motilité ne requérant pas de pili de type IV, soit le « gliding » aventureux (McBride, 2001). À première vue, le « gliding » ressemble à la motilité de type « swarming ». Cependant le « swarming » requiert absolument des flagelles fonctionnels chez toutes les espèces où ce type de motilité a été rapporté (Harshey, 1994; Harshey, 2003). Finalement, peu ou pas de données sont disponibles à propos du « sliding » et du « darting » (Harshey, 2003).

1.3.2 – Motilité de type « swarming ».

Par définition, le « swarming » est un déplacement rapide (2 à 10 $\mu\text{m}/\text{sec.}$) et coordonné d'une population bactérienne sur une surface semi-solide. La motilité de type « swarming » est un bel exemple du phénomène de multicellularité impliquant le QS chez les bactéries (Daniels *et al.*, 2004). D'ailleurs, des études récentes suggèrent l'existence d'un lien entre le QS, la formation de biofilms et le « swarming » (Boles *et al.*, 2005; Shrout *et al.*, 2006). Bien que l'existence du « swarming » ait été rapportée pour la première fois il y a plusieurs années, peu d'études portant sur ce sujet ont été réalisées.

Les genres bactériens chez lesquels le « swarming » a été significativement étudié peuvent se diviser en deux groupes. Le premier groupe comprend les genres chez lesquels le « swarming » a lieu de manière optimale sur de l'agar semi solide (0,5 à 0,7%) : *Serratia* (Alberti & Harshey, 1990; Eberl *et al.*, 1999), *Salmonella* (Harshey, 1994), *Aeromonas*, (Kirov *et al.*, 2002), *Bacillus* (Kearns & Losick, 2003), *Yersinia* (Young *et al.*, 1999), *Pseudomonas* (Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000) alors que le deuxième groupe inclut les genres pouvant faire du « swarming » sur des surfaces solides ou de haute concentration d'agar (1,5 à 2%), soit *Proteus* (Rather, 2005) et *Vibrio* (McCarter & Silverman, 1990; McCarter, 2004). Le « swarming » n'a que peu été étudié chez l'espèce modèle *E. coli* (Harshey, 1994). Pour chaque genre bactérien, voir pour chaque espèce, les conditions nécessaires au « swarming » de même que les phénotypes de « swarming » varient grandement. Cependant, chez toutes ces espèces, le « swarming » est étroitement lié à deux facteurs du milieu nutritionnel dont l'importance relative peut varier, soit 1) la composition en nutriments et 2) la concentration en agar utilisé pour les géloses, ou la viscosité/élasticité du milieu.

1.3.3 - Les différents phénotypes de « swarming ».

L'aspect le plus caractéristique de la motilité de type « swarming » est probablement la formation de motifs dendritiques en forme de fractals (Fig. 1). Cependant, le phénotype de « swarming » peut varier considérablement pour une même espèce dépendamment du milieu nutritionnel sur lequel la bactérie se trouve. Une espèce qui présente un phénotype « swarming » très différent des autres genres bactériens est *Proteus mirabilis*. Chez cet organisme, le « swarming » se manifeste sous forme de cercles concentriques autour du point d'inoculation tel qu'illustré à la figure 1E. Chez *Salmonella*, *Serratia*, et *Vibrio*, la formation de motifs de fractal ou d'anneau concentrique n'a pas été rapportée. Bien que *M. xanthus* n'effectue pas de véritable motilité « swarming », elle est toutefois capable de motilité de type « gliding » s'apparentant quelque peu au « swarming » (Fig. 1B).

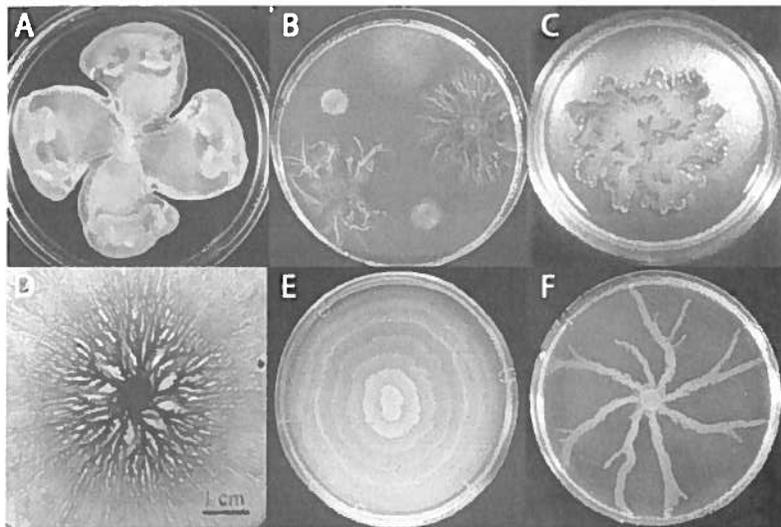


Figure 1. La motilité de type « swarming » se manifeste différemment selon les espèces et selon le milieu nutritionnel.

(A) *E. coli* (Burkart *et al.*, 1998), (B) *M. xanthus* – motilité de type « gliding » (Velicer & Yu, 2003), (C & D) *Bacillus subtilis* (Julkowska *et al.*, 2004; Kearns & Losick, 2003), (E) *P. mirabilis* et (F) *P. aeruginosa* (Laboratoire Éric Déziel).

1.3.4 – Différenciation cellulaire et motilité de type « swarming ».

Pour entrer en « swarming », les bactéries doivent subir une différenciation morphologique qui comprend 1) une élongation cellulaire ainsi que 2) la synthèse de flagelles supplémentaires. Chez la plupart des micro-organismes capables de « swarming », la différenciation de cellules végétatives (ou indifférenciées) en cellules « swarming » est initiée par le contact des bactéries avec une surface solide, ce qui entraîne l'inhibition de la rotation des flagelles, ainsi que par l'activation du QS (Fraser & Hughes, 1999; Harshey, 1994; Rauprich *et al.*, 1996; Sturgill & Rather, 2004). Une fois les cellules « swarming » complètement différenciées, celles-ci entreprennent une migration coordonnée à partir du site original d'inoculation qui est dépendante d'interactions multicellulaires et de signalements intercellulaires (Daniels *et al.*, 2004). Certaines bactéries, tel que *P. mirabilis*, voient leur taille et leur nombre de flagelles augmenter de 20 à 40 fois (Harshey, 1994), alors que d'autres, tel que *P. aeruginosa*, voient leur taille et nombre de flagelles doubler (Fig. 2) (Kohler *et al.*, 2000).

En plus des propriétés de surface du milieu nutritionnel, le déclenchement de la motilité de type « swarming » est intimement relié à la composition du milieu. Quoique la plupart des espèces requièrent un milieu riche pour le déclenchement du « swarming », quelques-unes peuvent effectuer ce type de motilité sur milieu minimal supplémenté en source de carbone, tel un sucre, plus des acides aminés. Certains genres, tel *Serratia*, requièrent absolument des acides aminés pour entrer en « swarming » (Eberl *et al.*, 1999). Ce besoin apparemment indispensable en acides aminés pourrait être dû au fait que la synthèse et l'opération de flagelles additionnels lors de la différenciation en cellules « swarming » demande une énorme quantité d'énergie. Par exemple, il a été estimé que la synthèse et l'opération de seulement 5 à 10 flagelles chez *E. coli* en « swimming » demande 2% de l'énergie total de la cellule (Macnab, 1987).

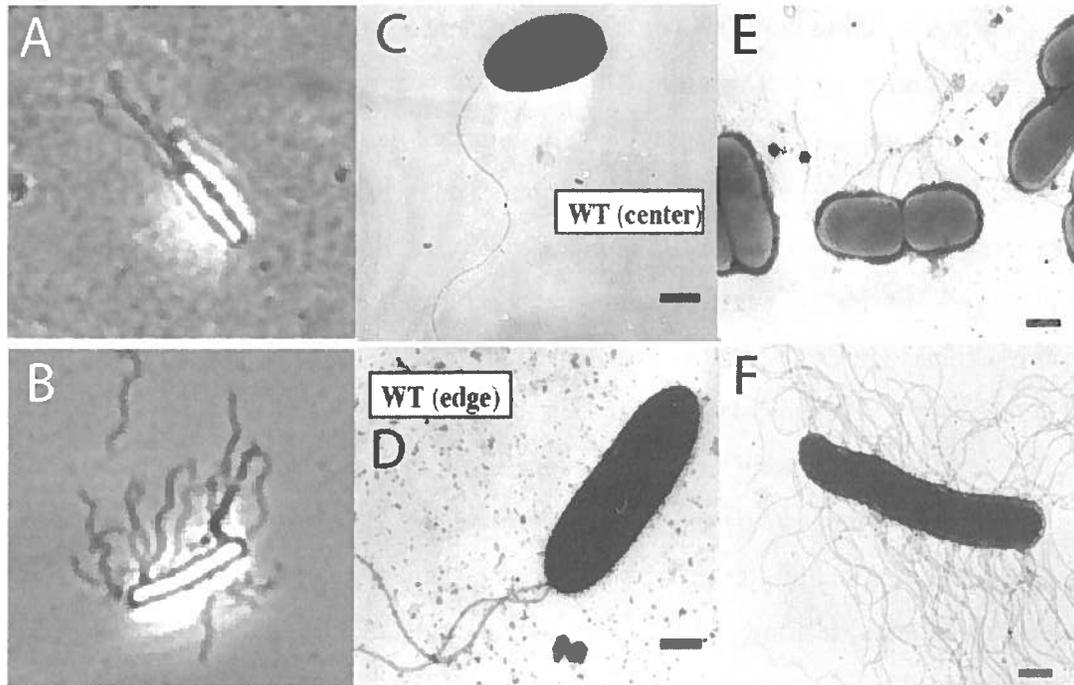


Figure 2. Les cellules « swarming » différenciées ont une taille et un nombre de flagelles supérieurs aux cellules végétatives (non-différenciées).

A) *B. subtilis* non-différencié en motilité de type « swimming », B) *B. subtilis* différencié en cellule « swarming », C) *P. aeruginosa* non différencié localisé au centre d'une colonie en « swarming », D) *P. aeruginosa* différenciée en cellule « swarming » prise à l'extrémité d'un front de migration, E) *Serratia liquefaciens* en « swimming » et F) *S. liquefaciens* différencié en cellule « swarming ». Figure adaptée de (Eberl *et al.*, 1996a; Kearns & Losick, 2003; Rashid & Kornberg, 2000).

Les cellules « swarming » différenciées sont typiquement alignées sous forme de radeaux multicellulaires (Fig. 3) et sont englobées dans une matrice extracellulaire visqueuse qui faciliterait leurs mouvements (Allison *et al.*, 1993; Gygi *et al.*, 1995b; Jones *et al.*, 2004; Stahl *et al.*, 1983). Plusieurs évidences suggèrent que des facteurs importants pour le « swarming » se trouvent dans cette matrice. Lorsque des bactéries entreprennent de migrer en « swarming », seules les cellules localisées aux extrémités des fronts de migration sont différenciées; les autres, spécialement celles immobiles se situant au centre de la colonie, demeurent dans un état végétatif indifférencié (Harshey, 2003). Les mécanismes responsables de la formation de radeaux multicellulaires demeurent inconnus.

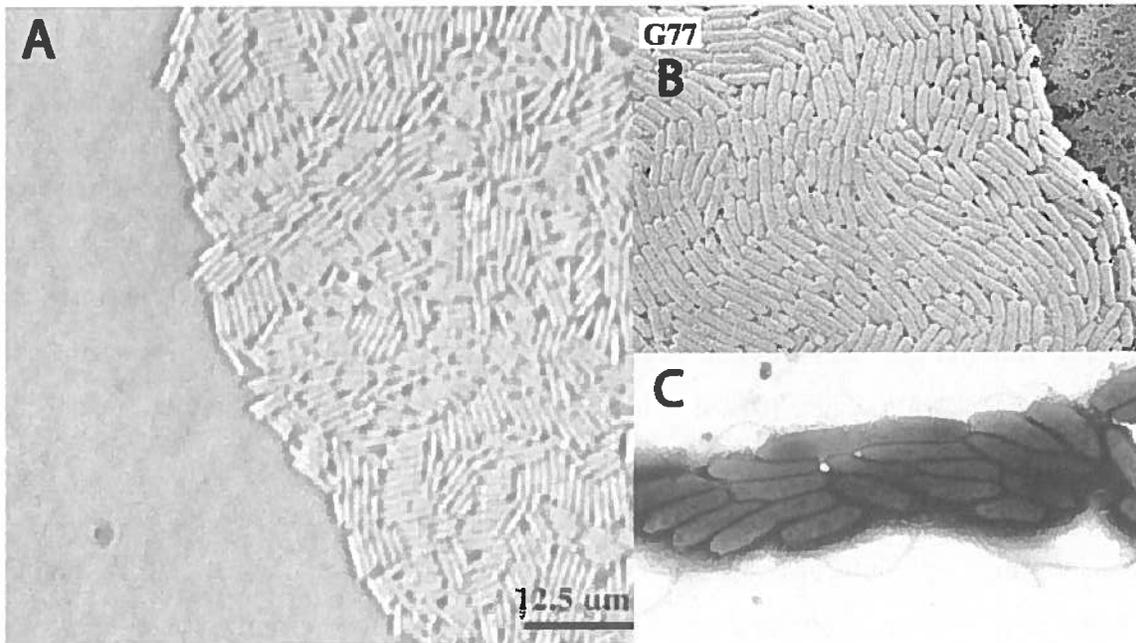


Figure 3. Les cellules différenciées pour la motilité de type « swarming » forment des structures de radeaux multicellulaires.

A) *B. subtilis*, B) *P. mirabilis*, C) *P. aeruginosa*. Figure adaptée de (Jones *et al.*, 2004; Julkowska *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2000).

Chez de nombreux genres bactériens capables de « swarming », l'action d'un biosurfactant synthétisé par les bactéries elles-mêmes est absolument requise pour ce type de motilité. Ces biosurfactants agiraient en diminuant la tension de surface, permettant ainsi aux bactéries de se mouvoir sur une surface semi-solide (Harshey, 1994). Le rôle des biosurfactants sera discuté plus en détail pour chacune des espèces présentées. De manière généralisée, la synthèse des biosurfactants est sous le contrôle du QS.

1.4 – Motilité de type « swarming » chez *Serratia*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* et *Vibrio cholerae*.

Tel que mentionné ci-dessus, plusieurs microorganismes sont capables de « swarming » et il apparaît que ce type de motilité est hautement répandu chez de nombreux genres bactériens. Ici, plusieurs aspects du « swarming » des espèces chez lesquelles ce type de motilité a été significativement étudié sont décrits.

1.4.1 – *Serratia*.

1.4.1.1 - Milieu nutritionnel et « swarming ».

Chez *S. liquefaciens* MG1, le facteur critique qui détermine si les cellules entrent en motilité de type « swimming », se différencient en cellules « swarming » ou forment des colonies régulières est la concentration d'agar et par conséquent, la viscosité du milieu (Eberl *et al.*, 1999). Lorsque cette bactérie se trouve sur un milieu contenant une faible concentration d'agar (0,4%), elle effectue du « swimming », alors que lorsqu'elle se situe en milieu solidifié avec une concentration d'agar allant de 0,4 à 1,2%, elle se différencie en cellule « swarming ». À des concentrations d'agar plus élevées, le « swarming » est inhibé et il y a alors formation de colonies peu étendues et peu motiles (Eberl *et al.*, 1996a). Comme c'est le cas chez *Proteus*, le « swarming » de *Serratia* est fortement favorisé par un milieu de culture riche (Eberl *et al.*, 1996b; Eberl *et al.*, 1999). Le « swarming » peut avoir lieu sur milieu minimal seulement si ce dernier est supplémenté avec des acides aminés (i.e. « Casamino acids »). Cependant, aucun des acides aminés ajoutés individuellement à un milieu minimal ne parvient à déclencher le « swarming » chez *Serratia* (Eberl *et al.*, 1996a; Eberl *et al.*, 1996b). Des colonies en « swarming » de *S. liquefaciens* MG1 exhibent des motifs de dendrites en fractals lorsque celles-ci se trouvent en milieu nutritionnel minimal contenant de la gélatine comme agent solidifiant (Eberl *et al.*, 1996a). Par contre, en milieu riche avec de l'agar comme agent solidifiant, le phénotype de « swarming » est plutôt circulaire et non-dendritique (Eberl *et al.*, 1999).

1.4.1.2 – Gènes impliqués dans le « swarming ».

Deux régulateurs-clefs impliqués dans la régulation du « swarming » de *S. liquefaciens* ont été identifiés, soit 1) l'opéron régulateur de flagelles FlhDC et 2) un système de QS à base de *N*-acyl-L-homosérine lactone (Eberl *et al.*, 1996b). Un mutant dans les gènes *flhDC* ne synthétise pas de flagelles et ne peut donc pas effectuer de « swarming » ni de « swimming » (Eberl *et al.*, 1999). Aussi, la surexpression de *flhDC* dans un milieu liquide induisait la différenciation de cellules végétatives en cellules « swarming » complètement différenciées, c'est-à-dire filamenteuses, multinucléées et

hyperflagellées non-distinguables de cellules en véritable « swarming » actif (Eberl *et al.*, 1999). L'expression contrôlée de *flhDC* par un promoteur inductible à l'IPTG peut complètement restaurer le « swimming » et le « swarming ». Ainsi, la stimulation artificielle de *flhDC* permet à la bactérie d'entrer en « swarming » sans passer par un contact de surface qui serait obligatoire en temps normal. Ceci indique que le contact de surface, qui est un stimulus d'importance majeure pour déclencher la différenciation en cellules « swarming », est un événement qui passe absolument par l'opéron *flhDC*. Chez *P. mirabilis*, le niveau d'ARNm de *flhDC* est 30 fois plus haut chez les cellules en « swarming » actif. Cependant, il n'y a pas de hausse significative de transcription de cet ARNm chez *Serratia* (Eberl *et al.*, 1999).

1.4.1.3 – Biosurfactants, QS et « swarming ».

Le système de QS de *Serratia* est basé sur deux molécules signal extracellulaires, soit les *N*-butyrylhomosérine lactone (BHL) et les *N*-hexanoylhomosérine lactone (HHL) (Fig. 4). Chez cette bactérie, le gène *swrI* code pour une AHL synthase qui contrôle la synthèse de BHL et de HHL (Eberl *et al.*, 1996b). Lorsque *swrI* est inactivé, le « swarming » est grandement diminué. Cependant le « swarming » peut être restauré en ajoutant des BHL ou des HHL exogènes au milieu nutritionnel (Eberl *et al.*, 1996b). Parmi ces deux molécules, BHL est la plus efficace pour restaurer le « swarming ». Il est intéressant de noter que l'inactivation de *swrI* n'affecte aucunement la croissance ou la motilité de type « swimming », mais réduit de manière importante l'habileté de la bactérie à se différencier en cellules « swarming » (Eberl *et al.*, 1996b). Les cellules de *Serratia* produisent un film qui conditionne la surface en altérant son humidité et par le fait même, sa tension (Lindum *et al.*, 1998) et la formation de ce film est dépendante des gènes *swrI* et *swrA*. Dans un mutant *swrI*, le conditionnement de la surface est restauré avec l'ajout de BHL exogène au milieu (Lindum *et al.*, 1998). En aval de *swrI* se trouve un cadre de lecture codant pour un polypeptide nommé SwrR. Lorsque SwrR se lie à son inducteur (BHL), le complexe formé active l'expression du gène *swrA*, une peptidase synthase qui catalyse la production de la serrawettin W2 un lipopeptide extracellulaire entraînant une réduction de la tension de surface (Lindum *et al.*, 1998). Ce surfactant est un lipodepsipeptide attaché à une chaîne d'acide gras 3-hydroxy-C₁₀. L'importance

biologique de ce biosurfactant est illustrée par un mutant non-flagellé de *Serratia* qui est capable de coloniser la surface d'un milieu de culture à faible concentration d'agar et ce, possiblement à cause de l'action du biosurfactant réduisant la tension de surface (Eberl *et al.*, 1999). Aussi, un milieu de culture auquel est ajouté de la serrawettin W2, de la surfactine (biosurfactant produit par *B. subtilis*), ou même un surfactant synthétique, tel que le SDS, peut restaurer le « swarming » chez un double mutant *swrI* et *swrA* de *Serratia*. Ces résultats montrent bien que la production de molécules abaissant la tension de surface est cruciale à la motilité de type « swarming » chez *Serratia*. Ils expliquent aussi que l'absence de « swarming » sur milieu LB ou « brain heart infusion » est dû au fait que *Serratia* ne produit qu'une faible quantité de surfactant lorsque cultivée sur ces milieux (Eberl *et al.*, 1999).

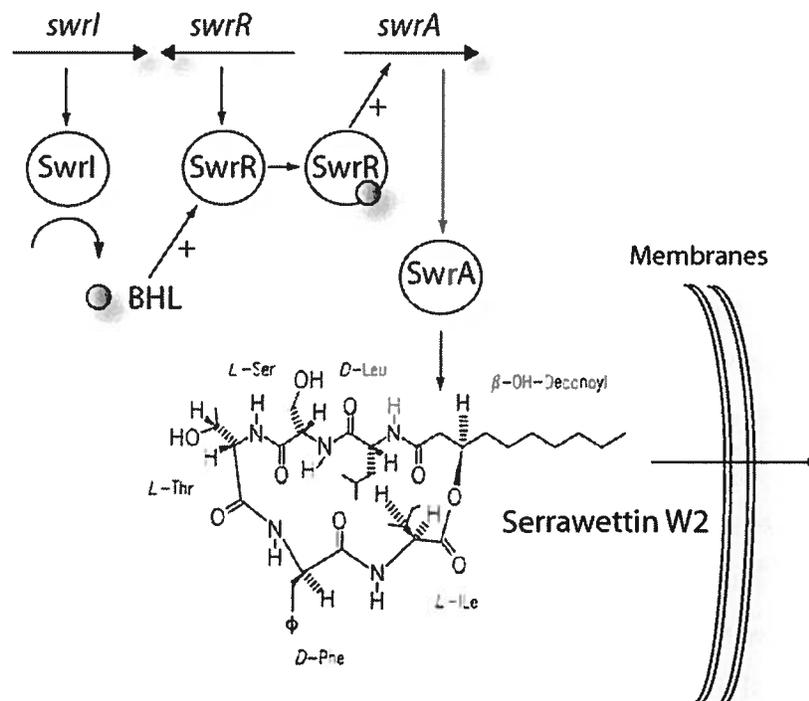


Figure 4. Synthèse de SerrawettinW2 et QS chez *S. liquefaciens*.

Schéma adapté de (Eberl *et al.*, 1999).

1.4.1.4 – Virulence et motilité de type « swarming ».

S. marcescens et *S. liquefaciens* sont des pathogènes humains opportunistes causant des infections des voies respiratoires et urinaires (Eberl *et al.*, 1999). Est-ce que la capacité de *Serratia* à se différencier dans du mucus ou dans les voies respiratoires ou urinaires contribue à sa pathogénécité ? Une étude a démontré que des cellules en « swarming » de *S. liquefaciens* présentent une résistance accrue à la prédation par des protozoaires ciliés du genre *Tetrahymena* (Ammendola *et al.*, 1998). Cela est la seule étude établissant un lien direct entre le « swarming » et la résistance de *Serratia* à la prédation.

1.4.2 – *Proteus mirabilis*.

1.4.2.1- Milieu nutritionnel et « swarming ».

La motilité de type « swarming » de *P. mirabilis* se distingue de celle des autres bactéries par la formation de cercles concentriques hautement ordonnés partant d'un point d'inoculation tel qu'illustré à la figure 1E. Le « swarming » chez *P. mirabilis* est aussi exceptionnel en ce qu'il a lieu sur des surfaces solides (i.e. 1,5 à 2% agar). Les motifs circulaires sont la conséquence d'une différenciation périodique de cellules végétatives en cellules « swarming » et vice-versa appelée phase de consolidation (Fraser & Hughes, 1999; Rauprich *et al.*, 1996). Les cellules en « swarming » différenciées sont caractérisées par une importante élongation allant de 10 à 40 fois leur taille originale et une augmentation dramatique du nombre de flagelles latéraux (Rather, 2005).

En culture liquide, *P. mirabilis* est incapable de se différencier en cellules « swarming ». Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la nécessité d'une surface solide (1,5 à 2% d'agar) pour permettre aux cellules de se différencier. Il a été suggéré que l'inhibition de la rotation du flagelle puisse être un signal impliqué dans le déclenchement du processus de différenciation (Alavi & Belas, 2001). À cet effet, il a été démontré que chez *V. parahemolyticus*, l'inhibition du mouvement des flagelles polaires peut déclencher l'expression des flagelles latéraux (Belas *et al.*, 1986; McCarter, 1998). Chez *P. mirabilis*, l'obstruction artificielle des flagelles avec des anticorps anti-flagelles aboutit à une élongation cellulaire (Alavi & Belas, 2001). Certaines mutations

au niveau de gènes flagellaires résultent en des cellules « swarming » constitutivement différenciées (Belas *et al.*, 1995; Gygi *et al.*, 1995a). Il est donc très probable que chez *P. mirabilis*, le flagelle agisse en tant que senseur de surface et joue un rôle dans la différenciation en cellule « swarming ». Les mécanismes impliqués dans un tel processus demeurent toutefois inconnus.

Un facteur nutritionnel influençant le « swarming » de *P. mirabilis* est la glutamine (Allison *et al.*, 1993). Normalement, *P. mirabilis* est incapable de se différencier en cellule « swarming » en milieu minimal. Cependant, en présence de glutamine, cette différenciation peut avoir lieu (Allison *et al.*, 1993). Toutefois, le phénotype de « swarming » sous milieu minimal supplémenté avec de la glutamine est très différent du phénotype observé sur milieu riche de par l'absence de cercles concentriques (Rather, 2005).

1.4.2.2 - Facteurs génétiques du « swarming ».

Chez *P. mirabilis*, l'identification des loci requis pour la différenciation des cellules « swarming » résulte principalement de mutagenèses par transposons. Cette stratégie s'est avérée très efficace et a révélé que plusieurs processus physiologiques différents sont nécessaires à la différenciation cellulaire (Rather, 2005). Des gènes impliqués dans le « swarming » de *P. mirabilis* sont résumés au tableau I et sont discutés ci-dessous. *P. mirabilis* est une des espèces bactérienne chez laquelle le « swarming » a été le plus étudié et par conséquent, un nombre considérable de gènes impliqués ont été identifiés.

Tableau I. Gènes impliqués dans la différenciation cellulaire chez *P. mirabilis*.

Gène ou homologue	Fonction
<i>cheW</i>	Requis pour la fonction de CheA
<i>flaA</i>	Flagelline
<i>flhDC</i>	Activateur hétérodimérique de gènes
<i>gidA</i>	Inhibition de la division par le glucose
<i>galU</i>	UTP glucose-1-phosphate
<i>lrp</i>	Régulateur transcriptionnel
<i>pepQ</i>	Dipeptidase de la proline
<i>ppaA</i>	ATPase de type p
<i>rfaD</i>	ADP-L-glycéro-mannoheptose-6-
<i>speA</i>	Arginine décarboxylase
<i>speB</i>	Agmatine uréohydrolase
<i>umoB</i>	Inconnue, similaire à YrtF
<i>umoD</i>	Inconnue, similaire à YcfJ
<i>cld</i>	« Polysaccharide chain length »
<i>dsbA</i>	« Thiol disulfide exchange protein »
<i>rsmA (csrA)</i>	Régulateur pléiotropique de la stabilité des ARNm.
<i>fliL</i>	Protéine flagellaire
<i>rsbA (yojN)</i>	« phospho transfer immediate protein »
<i>rscC</i>	Senseur de type histidine kinase

Tableau adapté de Rather et collègues (Rather, 2005).

***flaA*.** *P. mirabilis* contient deux copies de gènes codant pour de la flagelline, mais un seul est exprimé. Une mutation dans ce gène empêche les cellules de devenir hyperallongées (Gygi *et al.*, 1995a). Ceci est en accord avec le fait que la rotation flagellaire est un important stimulus pour la différenciation cellulaire et qu'un manque de flagelles dû à une absence de flagelline pourrait empêcher la transmission de ce stimulus. De plus, *flhA* est fortement induit lors de la différenciation en cellules « swarming » (Gygi *et al.*, 1995a).

***flhDC*.** L'expression élevée de la flagelline chez les cellules « swarming » est régulé entre autre par FlhDC, un activateur hétérodimérique qui agit en faisant le lien entre la transcription de flagelline et la différenciation cellulaire (Furness *et al.*, 1997). Chez *P. mirabilis*, l'expression de l'opéron *flhDC* est entre autre régulé par une protéine

nommée « leucine-responsive regulator protein » (Lrp). Des mutations dans *lrp* empêchent la différenciation en cellules « swarming ». La surexpression artificielle de FlhDC entraîne une différenciation prématurée des cellules « swarming » ainsi qu'une plus grande vitesse de mouvement pendant la migration (Furness *et al.*, 1997). Aussi, des analyses par buvardage de type Northern ont permis de révéler que la quantité d'ARNm de *flhDC* est d'environ 30 fois supérieure chez des cellules « swarming » que chez des cellules végétatives (Furness *et al.*, 1997).

lrp. La « leucine responsive protein » est un régulateur qui relie la disponibilité des acides aminés à la régulation de plusieurs fonctions, telles que la biosynthèse et la dégradation d'acides aminés, le transport de peptides ainsi que la synthèse de pili. La perte de *lrp* chez *P. mirabilis*, résulte en une incapacité à s'hyperallonger et à exprimer la flagelline et l'hémolysine, qui sont normalement exprimées lors de la différenciation en cellules « swarming ». Il est intéressant de souligner que le « swarming » chez un mutant *lrp* peut être restauré en surexprimant artificiellement *flhDC* (Hay *et al.*, 1997).

ppaA. Un mutant Tn5*phoA* dans le gène *ppaA* affecte la différenciation en cellule « swarming » et entraîne un délai dans la migration (Lai *et al.*, 1998). Le gène *ppaA* code pour une ATPase putative de type P. Il a été démontré que l'expression de *ppaA* est maximale chez les cellules « swarming » différenciées. Le niveau de transcrits de *flhDC* et *lrp* est plus bas chez un mutant *ppaA*. Il a été proposé que PpaA effectue la liaison entre l'homéostasie et la différenciation en cellules « swarming » (Lai *et al.*, 1998).

rfaD. Le produit du gène *rfaD* (ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimérase) est requis pour la synthèse des LPS ainsi que pour l'élongation cellulaire (Belas *et al.*, 1995; Coleman, 1983). L'inactivation de *rfaD* mène à des perturbations de la membrane externe et active des réponses au stress. L'incapacité d'un mutant *rfaD* à s'hyperallonger pourrait être due à des défauts dans les flagelles, un manque de LPS ou une combinaison de ces deux facteurs (Rather, 2005).

speA/B. L'inactivation de *speA* ou *speB* entraîne un retard sévère dans le déclenchement de la différenciation cellulaire (Sturgill & Rather, 2004). Ce délai résulte entre autre de l'incapacité à produire de la polyamine putrescine. L'addition de putrescine exogène restaure la période normale du déclenchement du « swarming » chez des mutants *speA* ou *speB*. Cela demeure une spéculation, car la putrescine pourrait agir dans

le signallement intercellulaire et ainsi déclencher le « swarming » (Sturgill & Rather, 2004).

fliL. Une insertion dans *fliL* induit des cellules constitutivement hyperallongées (Belas *et al.*, 1995). La fonction de FliL est inconnue.

rscC – yojN – rcsB. Une insertion dans le gene *rsbA* a été rapportée comme induisant un type de « swarming » appelé « swarming précoce ». Ce comportement est caractérisé par des bactéries qui sont dans un état de « swarming » perpétuel même lorsque celles-ci sont sous des conditions qui empêchent le « swarming » en temps normal (i.e. milieu liquide) (Belas *et al.*, 1998). RsbA est homologue à la protéine YojN de *E. coli* qui agit en tant qu'intermédiaire dans le transfert du phosphore entre la protéine kinase sensible RcsC et son régulateur RcsB (Rather, 2005). Chez *E. coli*, la perte de *rscC* et *yojN* résulte aussi en du « swarming » précoce. Il a été suggéré que RcsC, YojN et RcsB puissent être impliqués dans la réponse extracellulaire (Belas *et al.*, 1998). Chez *E. coli*, les signaux activant les protéines de la famille des Rcs sont le type de surface, la concentration en zinc, l'osmolarité, l'altération dans la glycolyse et les perturbations membranaires (Rather, 2005). Une autre possibilité pourrait être que le système Rcs altérerait la composition ou la quantité de glue extracellulaire requise pour le « swarming » (Rather, 2005).

rsmA (csrA). La protéine RsmA de *P. mirabilis* est presque identique à la protéine CsrA qui inhibe la synthèse du glycogène et active le régulateur FhlDC du système flagellaire de *E. coli* (Rather, 2005). Il a été rapporté que la surexpression de *rsmA* inhibait la différenciation en cellules « swarming ». Les ou les mécanismes responsables de cette inhibition sont inconnus. Alors que *fhlDC* est un gène central dans la différenciation en cellules « swarming », il est paradoxal de constater que la surexpression de *rsmA* (ce qui active *fhlDC*) inhibe le « swarming » (Rather, 2005).

1.4.2.3 – Matrice extracellulaire et « swarming ».

La différenciation en cellules « swarming » pourrait impliquer la matrice extracellulaire visqueuse produite par la bactérie; cette dernière a été proposée comme facilitant le déplacement physique des cellules tout en contenant des molécules-signaux déclenchant la différenciation cellulaire (Gygi *et al.*, 1995b; Stahl *et al.*, 1983; Toguchi *et*

al., 2000). Une des composantes de cette matrice visqueuse est un polysaccharide de surface (Cmf). Cmf est requis pour du « swarming » efficace chez *P. mirabilis*, mais pas pour la différenciation cellulaire (Gygi *et al.*, 1995b). Il agit probablement en réduisant la tension de surface et en facilitant ainsi le mouvement des cellules. Ceci est consistant avec le phénotype du mutant *cmf*, qui présente des anneaux de « swarming » plus rapprochés les uns les autres comparativement à la souche sauvage. Chez *P. mirabilis*, des signaux extracellulaires ont été identifiés en utilisant une variété d'approches différentes (Rather, 2005; Sturgill & Rather, 2004). Parmi ces signaux, on retrouve l'autoinducteur du QS AI-2, des dipeptides cycliques et la putrescine. Seule cette dernière semble jouer un rôle dans le « swarming » (Sturgill & Rather, 2004). Tel qu'expliqué précédemment, la perte d'une des deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de la putrescine, soit SpeA et SpeB, mène à un délai de 2 à 3 h dans la différenciation cellulaire. Ce délai peut être supprimé avec l'ajout de putrescine exogène à des concentrations aussi faibles que 25 μ M (Sturgill & Rather, 2004). Le mécanisme d'action de la putrescine demeure toutefois inconnu.

1.4.2.4 – Virulence et « swarming ».

Le rôle du « swarming » dans la virulence de *P. mirabilis* fait présentement l'objet d'un débat. Les premières études ont démontrées que les cellules en « swarming » avaient une capacité supérieure aux cellules végétatives à envahir des cellules uroépithéliales (Allison *et al.*, 1992). Dans cette étude, des mutants incapables de faire du « swarming » étaient 25 fois moins invasifs que des cellules de souches sauvages. Des tests sur des souris ont montré qu'une injection intraveineuse d'un mutant affecté dans le « swarming » était moins susceptible de tuer la souris que la souche sauvage (Allison *et al.*, 1994). De plus, une analyse histologique du tissu rénal de ces souris a révélé la présence prédominante de cellules différenciées. Dans des modèles utilisant une inoculation directe dans la vessie, des mutants ne faisant pas de « swarming » se révèlent incapables d'établir une infection (Allison *et al.*, 1994). Cependant, des études récentes ont démontré que lors d'infections ascendantes du tractus urinaire chez la souris, les types de cellules prédominantes sont du type « swimming » et non « swarming » (Jansen *et al.*, 2003). La différence entre ces résultats pourrait être expliquée par le fait que les

paramètres expérimentaux sont très différents entre les deux études. Il demeure néanmoins probable que les cellules « swarming » sont un type cellulaire important dans différents stades d'infection de *P. mirabilis* (Rather, 2005). Les cellules différenciées pourraient avoir un rôle direct dans la virulence par le fait que l'expression des gènes de virulence codant pour l'uréase (*ureDABCEFG*), l'hémolysine (*hmpBA*) et la métalloprotéase (*zapA*) est supérieure chez les cellules « swarming » différenciées que chez les cellules végétative (Fraser *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 1999).

1.4.3 – *Salmonella*.

1.4.3.1 – Milieu nutritionnel et « swarming ».

La motilité de type « swarming » chez *Salmonella* a été rapportée pour la première fois chez *S. typhimurium* en 1994 (Harshey & Matsuyama, 1994). Le phénotype du « swarming » de cette bactérie est très semblable à celui trouvé chez *P. mirabilis* avec la présence d'anneaux concentriques partant d'un point d'inoculation central (Harshey & Matsuyama, 1994). La source d'agar ainsi que la composition du milieu nutritionnel se sont avérés importants sur le « swarming » (Harshey & Matsuyama, 1994). En effet, de l'agar de marque Eiken favorisait grandement le « swarming » comparativement à d'autres marques d'agar. La concentration d'agar optimale pour déclencher le « swarming » chez *S. typhimurium* est de 0,5 à 0,8% (Harshey & Matsuyama, 1994). Un milieu nutritionnel riche supplémenté avec 0,5% de glucose est optimal pour déclencher le « swarming ». Sur milieu minimal, la bactérie est incapable d'entrer en « swarming ». Aussi, la température d'incubation optimale pour déclencher le « swarming » est de 30°C (Harshey & Matsuyama, 1994).

1.4.3.2 – Génétique du « swarming ».

Chez *S. typhimurium* comme chez d'autres bactéries capables de « swarming », l'opéron *fhlDC* joue un rôle central. Cet opéron code pour des facteurs de transcriptions qui contrôlent une série de gènes impliqués dans la synthèse du crochet flagellaire, ainsi que pour le facteur de transcription FliA qui régule des gènes codant pour les filaments des flagelles, les protéines motrices et certaines composantes du chimiotactisme.

L'expression de l'opéron *flhDC* est influencée par des signaux environnementaux tels que la disponibilité du glucose, l'osmolarité et la température (Harshey, 2003).

Récemment, une étude transcriptomique du « swarming » de *S. typhimurium* a été effectuée à l'aide de biopuces (Wang *et al.*, 2006). Le profil d'expression de nombreux gènes impliqués dans le « swarming » ont été obtenus sur une période de 8 h suivant l'inoculation. Parallèlement, les profils d'expression en milieu liquide et solide de ces mêmes gènes ont été effectués. Il ressort de ces travaux qu'environ un tiers du génome de *S. typhimurium* est exprimé à des niveaux significativement différents selon que les bactéries se trouvent sur une surface ou en milieu liquide. L'expression des gènes spécifiques à la surface comprend ceux responsables de la synthèse des LPS, du métabolisme du fer et de sécrétion de type III. Étonnamment, les gènes flagellaires n'ont pas été surexprimés en condition « swarming ».

1.4.3.3 - Facteurs requis pour le « swarming ».

Chez *S. typhimurium*, il a été proposé que les signaux nécessaires à la différenciation en cellules « swarming » sont contenues dans la glue extracellulaire produite lors du « swarming » (Toguchi *et al.*, 2000). Il semblerait que ces signaux soient des polysaccharides provenant de la synthèse de l'antigène O, de polysaccharides capsulaires ainsi que de glycolipides (Toguchi *et al.*, 2000). De plus, un nombre important de gènes nécessaires au « swarming » sont impliqués dans la synthèse des LPS (Toguchi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). Il a été suggéré que les LPS pourraient agir comme surfactant, car l'ajout de surfactine (surfactant produit par *B. subtilis*) peut compléter le « swarming » défectueux de mutants LPS chez *S. typhimurium* (Toguchi *et al.*, 2000).

1.4.3.4 – Virulence et « swarming ».

Chez *S. typhimurium*, il existe un système de régulation (PmrAB) à deux composantes impliquées dans une variété de modifications des LPS et de l'enveloppe cellulaire (Zhou *et al.*, 2001). PmrA régule la transcription de l'opéron *pmrHFIJKLM* qui à son tour ajoute des résidus 4-aminoarabinose au lipide A des LPS (Gunn *et al.*, 2000; Trent *et al.*, 2001; Wosten & Groisman, 1999). Cette modification apporte une charge

positive supplémentaire au LPS, ce qui réduit le potentiel de liaison des peptides antimicrobiens cationiques tel que la polymyxine et l'azurodicine (Kim *et al.*, 2003). La virulence de mutants dans l'opéron *pmrHFIJKLM* était réduite comparée à celle de la souche sauvage lorsque testée sur des souris (Gunn *et al.*, 2000). Récemment, il a été rapporté qu'une mutation dans le gène *pmrK* résulte en la perte de motilité de type « swarming » et que l'expression de *pmrK* était plus élevée dans des conditions favorisant le « swarming » (Kim *et al.*, 2003). De plus, les cellules de souche sauvage différenciées présentent une expression du gène *pmrK* accrue comparativement aux cellules végétatives non-différenciées (Kim *et al.*, 2003). Finalement, les cellules en « swarming » de *S. typhimurium* exhibent aussi une certaine résistance à une variété d'antibiotiques (Kim *et al.*, 2003). Il est intéressant de constater que l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des cellules en « swarming » survient à cause d'un changement phénotypique des cellules et non par la sélection génétique (Kim *et al.*, 2003).

1.4.4 – *Bacillus subtilis*.

1.4.4.1 – Milieu nutritionnel et « swarming ».

Plusieurs études portant sur le « swarming » de *B. subtilis* rapportent l'utilisation de milieux nutritionnels complexes contenant du peptone, de l'extrait de bœuf et du LB (Ben-Jacob *et al.*, 1994; Dixit *et al.*, 2002; Mendelson & Salhi, 1996). Ces travaux ont révélé l'existence de différents motifs de « swarming » allant de simples zones de croissances à des embranchements radiaux simples ou complexes. Des motifs en formes d'anneaux concentriques répétitifs semblables à ceux formés par *P. mirabilis* ont aussi été rapportés (Julkowska *et al.*, 2004). Bien que la composition du milieu nutritionnel soit importante pour les différents phénotypes de « swarming », la concentration d'agar est encore plus déterminante (Mendelson & Salhi, 1996). La concentration d'agar optimale pour induire le « swarming » chez *B. subtilis* est de 0,7% (Julkowska *et al.*, 2004; Kearns & Losick, 2003; Mendelson & Salhi, 1996; Park *et al.*, 2006). Il a été suggéré qu'une faible concentration d'agar était requise afin que les bactéries en « swarming » puissent extraire l'eau de l'agar et ainsi diminuer la tension de surface (Matsuyama *et al.*, 1989). En effet, comme chez la majorité des espèces chez lesquelles le « swarming » a été

rapporté, des surfactants semblent être impliqués dans la diminution de la tension de surface chez cette espèce (Matsuyama *et al.*, 1989).

1.4.4.2 – Gènes impliqués dans le « swarming ».

Des souches de *B. subtilis* non domestiquées, c.à-d. ayant subi peu de sous-cultures en laboratoire, affichent un phénotype de « swarming » beaucoup plus robuste que des souches de laboratoire (Kearns *et al.*, 2004). Une mutagenèse par insertion d'un transposon Tn10 sur une souche non-domestiquée a permis de trouver quatre gènes requis pour le « swarming » (Kearns *et al.*, 2004). Il semblerait que le défaut dans le « swarming » des souches de laboratoire soit causé par des mutations dans les gènes *sfp* et *swrA* (Kearns *et al.*, 2004). Un fait intéressant est qu'une mutation dans *swrA* a une tendance naturelle à réverter à une fréquence élevée, ce qui suggère que le « swarming » soit sujet à la variation de phase (Kearns & Shimkets, 1998). Les gènes impliqués dans le « swarming » rapportés dans cette étude sont résumés dans le tableau II.

Tableau II. Gènes impliqués dans la motilité de type « swarming » chez *B. subtilis*.

Gène	Fonction
<i>cheC</i>	Protéine de chimiotactisme
<i>cheD</i>	Protéine de chimiotactisme
<i>comP</i>	kinase spécifique à ComX
<i>Efp</i>	Facteur d'élongation P
RrnB-16S	ARN ribosomal 16S
<i>urfAABC</i>	Surfactine synthase
<i>swrA</i>	Fonction inconnue
<i>swrB</i>	Fonction inconnue
<i>swrC</i>	Pompe à efflux putative
<i>yabR</i>	Similaire au domaine de liaison de la protéine ribosomale S1
<i>ylxH</i>	Similaire à l'ATPase impliquée dans la ségrégation des chromosomes
<i>ymfl</i>	Similaire à l'alcool déshydrogénase

Tableau adapté de Kearns et collègues (Kearns *et al.*, 2004)

1.4.4.3 - QS et surfactine.

La surfactine, un surfactant antibiotique lipopeptidique, dont la synthèse est contrôlée par le QS (Fig. 5) (Solomon *et al.*, 1995) est impliquée dans le « swarming » chez *B. subtilis* (Kearns & Losick, 2003). La synthèse de surfactine est contrôlée par un

système de QS comprenant deux peptides signaux (ou phéromones) appelés ComX et CSF (Fig. 5) (Lazazzera *et al.*, 1997; Solomon *et al.*, 1996).

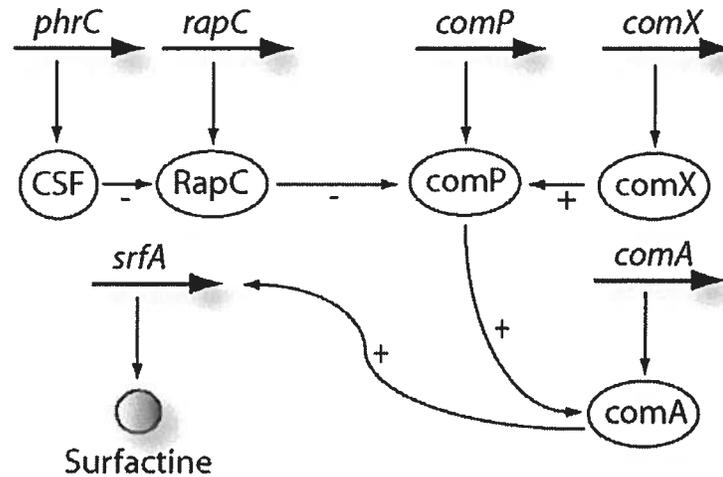


Figure 5. Le circuit de QS chez *B. subtilis*.

Schéma inspiré de Lazazzera et collègues (Lazazzera *et al.*, 1997).

Le phénotype « swarming » aberrant d'un mutant *comP* de *B. subtilis* pourrait être causé par un niveau de production de surfactine réduit. D'ailleurs, l'addition de surfactine exogène au milieu nutritionnel a permis de compléter le « swarming » des mutants *comP* et *srf* (Kearns *et al.*, 2004).

Une activité protéolytique extracellulaire est aussi nécessaire au « swarming » et à la formation de biofilms chez *B. subtilis* (Connelly *et al.*, 2004). Il a été suggéré que des protéines de surface seraient clivées par des protéases pour devenir fonctionnelles et ainsi favoriser les interactions entre les bactéries et par conséquent, la motilité de type « swarming » (Connelly *et al.*, 2004).

1.4.4.4 - Virulence et « swarming ».

B. subtilis est une bactérie du sol qui forme des spores et qui peut occasionnellement causer des infections humaines oculaires, cutanées et pulmonaires (Drobniewski, 1993). Ces infections sont souvent associées à des épisodes

d'immunosuppression, de présence de cathéters ou de prothèses artificielles (Drobniowski, 1993).

La majorité du fer extracellulaire chez les mammifères est lié à des glycoprotéines, incluant la transferrine, qui sont considérées importantes dans l'immunité non-spécifique. En général, il est difficile pour les bactéries d'acquérir le fer de la transferrine. Les protéases extracellulaires, en plus de leur rôle dans le « swarming » (Park *et al.*, 2006), peuvent augmenter l'acquisition du fer contenues dans la transferrine via un clivage protéolytique de celle-ci (Britigan *et al.*, 1993; Okujo *et al.*, 1996; Shigematsu *et al.*, 2001). Ce clivage pourrait faciliter la croissance des bactéries productrices de protéases et pourrait ainsi jouer un rôle dans la pathogenèse des infections humaines. Récemment, il a été démontré qu'un isolat clinique de *B. subtilis* produisant de grandes quantités de protéases tout en présentant un phénotype « swarming » robuste, était capable de digérer de la transferrine humaine efficacement (Park *et al.*, 2006). Ceci suggère donc un lien entre la virulence de cette souche de *B. subtilis* et la motilité de type « swarming » (Park *et al.*, 2006).

1.4.5 – *Vibrio*.

1.4.5.1 - Milieu nutritionnel et « swarming ».

La motilité de type « swarming » chez *Vibrio parahaemolyticus* se traduit par un étalement progressif d'une colonie sur toute la surface disponible. La formation de dendrites ou d'anneaux concentriques n'a pas été rapportée. La différenciation cellulaire chez *V. parahaemolyticus* se produit lorsque la bactérie se trouve sur un milieu solide (i.e. 2% d'agar). Chez cette bactérie, l'unique flagelle polaire n'est pas impliqué dans le processus même de la migration « swarming ». Il est cependant suggéré que ce flagelle agisse comme un senseur tactile régulant l'expression de gènes impliqués dans le « swarming » tel que généralement observé chez les autres genres bactériens capables de « swarming » (McCarter & Silverman, 1990).

La différenciation cellulaire chez *V. parahaemolyticus* se traduit par un arrêt de la division cellulaire, l'élongation des cellules (de 1 μM à 30 μM) et la synthèse de nombreux flagelles latéraux additionnels (McCarter & Silverman, 1990). Les stimuli

causant la différenciation en cellules « swarming » chez cette espèce sont de nature physique (Fig. 6) (McCarter & Silverman, 1990). Les gènes impliqués dans le « swarming » sont activés lorsque la bactérie se trouve sur un milieu nutritionnel solide (i.e. 2% agar), suspendue dans un milieu de haute viscosité ou lorsque les cellules sont agglutinées avec des anticorps à leur surface (McCarter & Silverman, 1990).

En plus de la viscosité, la limitation en fer dans le milieu nutritionnel contrôle la différenciation en cellules « swarming ». Les bactéries sont incapables de se différencier en cellules « swarming » lorsqu'elles sont inoculées sur milieu riche « brain heart infusion » avec 2% d'agar (McCarter & Silverman, 1990). L'addition de chélateurs de fer à ce milieu favorise la synthèse des flagelles latéraux (McCarter & Silverman, 1990). En somme, l'expression des gènes nécessaires à la différenciation en cellules « swarming » requiert à la fois une limitation en fer et une interférence avec la rotation du flagelle polaire (McCarter & Silverman, 1990).

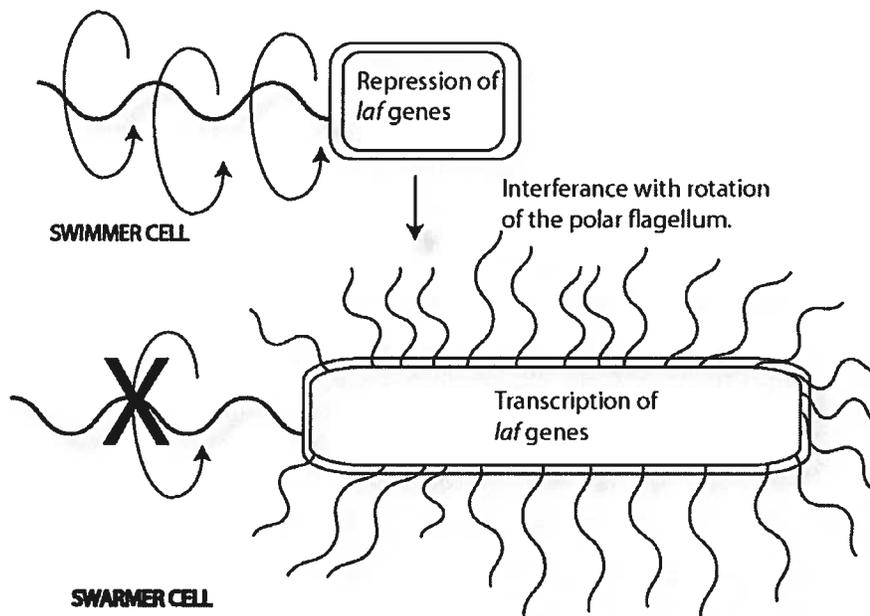


Figure 6. L'inhibition de la rotation du flagelle polaire entraîne l'expression des gènes flagellaires latéraux (*laf*) chez *V. parahaemolyticus*

Schéma adapté de (McCarter & Silverman, 1990).

1.4.5.2 - Génétique du « swarming ».

Chez *V. haemolyticus*, il y a quatre gènes codant pour des sous-unités de flagellines, soit *flaA*, *flaB*, *flaC* et *flaD* (McCarter & Silverman, 1990). Ces gènes sont séparés en deux opérons différents : *flaAB* et *flaCD*. Le « swarming » de mutants dans les gènes *flaA* ou *flaB* n'est pas affecté. Par contre, des mutants contenant des délétions dans *flaC* possèdent un flagelle polaire défectueux et présentent un phénotype « swarming » aberrant. La cause de cette défectuosité semble être due à l'absence d'enrobage de flagelline des flagelles latéraux pleinement fonctionnels (McCarter & Silverman, 1990).

Des mutants dans les gènes *mot* et *che* sont aussi affectés dans le « swarming ». Des mutants avec un phénotype *Mot*⁻ possèdent des flagelles intacts, mais sont incapables d'effectuer la rotation du flagelle. Ceux avec le phénotype *Che*⁻ sont affectés dans le contrôle chimiotactique de la rotation du flagelle. Cela se traduit par une absence de motilité sur milieu solide. Tous ces mutants expriment constitutivement le phénotype de cellule « swarming » différenciée sans toutefois être en mesure de se déplacer.

1.4.5.3 - Opacité des colonies et « swarming ».

En plus de la transition de cellules végétatives en cellules « swarming », *V. parahaemolyticus* peut passer d'un phénotype de cellules d'aspect opaque (OP) à un phénotype transparent (TR). Les cellules OP produisent des polysaccharides capsulaires (CPS) qui favorisent l'adhésion de cellules à une surface ainsi que l'adhésion intercellulaire (Enos-Berlage & McCarter, 2000; McCarter, 1998). La production de CPS par les souches OP affecte la structure des colonies et est un facteur primordial de leur opacité (Enos-Berlage & McCarter, 2000; McCarter, 1998). Les signaux responsables du passage d'un phénotype à l'autre demeurent incompris. Récemment, il a été suggéré que OpaR, qui est le régulateur responsable du passage d'un phénotype à l'autre, pourrait aussi être impliqué dans le « swarming » des souches de phénotype OP (Fig. 7). Dans cette même étude il a été démontré que OpaR inhibe le « swarming » en inhibant l'expression des gènes flagellaires latéraux (Jaques & McCarter, 2006). Le « swarming » des souches TR a été investigué à l'aide de mutagenèses par transposons. Deux gènes impliqués dans le « swarming » ont ainsi été découverts. Il s'agit des gènes *swrT* et *swrZ* (à ne pas confondre avec les gènes *swr* responsable de la synthèse de serrawettin chez

Serratia). Un mutant *swrT* était incapable d'effectuer du « swarming » et l'expression de ses gènes flagellaires latéraux était aussi inhibée. La surexpression du gène *swrZ* induit une répression du « swarming » ainsi que de la synthèse des gènes flagellaires latéraux. Finalement, il a été rapporté que SwrT régule l'expression des gènes flagellaires latéraux en inhibant l'expression de *swrZ* (Jaques & McCarter, 2006).

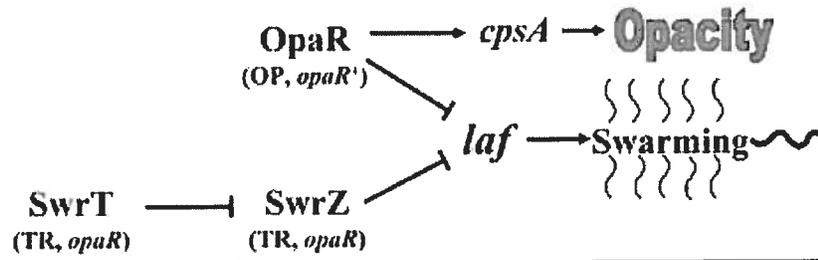


Figure 7. OpaR et SwrZ inhibent l'expression des gènes flagellaires latéraux (*laf*)

Figure adapté de Jaques et collègues (Jaques & McCarter, 2006).

1.5.6 - *Pseudomonas aeruginosa*

1.5.6.1 - Milieu nutritionnel et « swarming ».

Chez *P. aeruginosa*, comme chez bien d'autres espèces, le déclenchement du « swarming » est intimement relié à l'humidité de la surface. Cette bactérie peut effectuer du « swarming » sur un milieu nutritionnel concentré avec 0,4 à 0,8% d'agar (Caiazza *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000). Le « swarming » a été observé sur milieu riche « nutrient broth » (NB) supplémenté en dextrose et sur milieu minimal M9 supplémenté en dextrose et acides aminés (« casamino acids »). En milieu NB, le « swarming » consiste en une expansion plutôt circulaire d'un tapis bactérien à partir d'un point d'inoculation central. Par contre, en milieu minéral, *P. aeruginosa* exhibe un phénotype « swarming » en forme de fractal avec des dendrites bien définies (Fig. 1F). Généralement c'est ce dernier milieu nutritionnel qui a été le plus utilisé pour étudier ce type de motilité chez *P. aeruginosa* (Caiazza *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000).

Kohler et collègues (Kohler *et al.*, 2000) ont rapporté que certains acides aminés (e.g. glutamate et aspartate) comme unique source d'azote sont suffisants pour déclencher le « swarming ». Le phénotype de « swarming » est aussi directement influencé par la source de carbone présente dans le milieu nutritionnel. Un milieu comprenant du dextrose comme seule source de carbone entraîne la formation de dendrites bien définies, alors que le succinate ou le glycérol n'en induisent que quelques-uns ou aucuns (Kohler *et al.*, 2000).

Déziel et collègues (2003) ont rapporté que le « swarming » est réprimé par des concentrations croissantes de fer et aussi par du NH_4Cl comme seule source d'azote, des éléments favorisant la croissance. Par contre, le NaNO_3 comme unique source d'azote favorise le « swarming ». Tel que discuté ci-dessous, les conditions nutritionnelles inhibant le « swarming », réduisent aussi la production de biosurfactants. Les résultats de cette étude suggèrent que des conditions nutritionnelles favorables (présence de fer et de NH_4Cl) empêchent le « swarming » d'être déclenché, alors que des conditions moins favorables (fer limitant et NaNO_3 comme source d'azote) favorisent le « swarming ». Les

auteurs proposent que ce phénomène puisse être un moyen pour la bactérie de se déplacer afin de trouver de meilleures conditions nutritionnelles.

1.5.6.2 - Gènes impliqués dans le « swarming ».

***fliC* et *pilA*.** La différenciation en cellules « swarming » chez *P. aeruginosa* comprend une élongation cellulaire ainsi que la synthèse d'un flagelle polaire additionnel (Kohler *et al.*, 2000). En plus de se différencier, les cellules se regroupent en forme de radeaux multicellulaires (Rashid & Kornberg, 2000). L'importance de flagelles et de pili pour le swarming chez cette espèce est sujette à controverse. Alors que Kohler *et al.* (Kohler *et al.*, 2000) ont rapporté que des mutants dans le gène flagellaire *fliC* sont partiellement capables d'effectuer du « swarming » et que le gène *pilA* est absolument nécessaire à ce type de motilité, des résultats contradictoires ont été obtenus par Rashid et collègues (Rashid & Kornberg, 2000). Ces derniers ont rapportés que le gène *fliC* était nécessaire au « swarming » alors que *pilA* était lui aussi impliqué, mais non essentiel. La différence entre ces deux résultats est probablement due au fait que les souches utilisées n'étaient pas les mêmes. Il demeure néanmoins que ces deux gènes sont requis pour du « swarming » normal. Très récemment, il a été démontré que le gène *flhF* est requis pour le « swarming » et qu'en son absence le flagelle supplémentaire nécessaire au « swarming » est bien synthétisé, mais n'est pas dirigé vers le pôle de la cellule (Murray & Kazmierczak, 2006).

***ppK*.** Le gène *ppK* est impliqué dans la formation de longues chaînes de phosphates appelées polyP. Les polyP sont essentiels pour de nombreuses fonctions biologiques (Kornberg *et al.*, 1999). Un mutant *ppK* de *P. aeruginosa* était autant déficient dans la motilité de type « twitching », qui requiert le pili de type IV, que dans le « swarming ». La relation entre *ppK* et le « swarming » demeure obscure.

***rhlAB* – *rhlC*.** Le gène *rhlA* est absolument requis pour la motilité de type « swarming » (Caiazza *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2000). *rhlA* fait partie de l'opéron *rhlAB* qui est requis pour la synthèse de monoRL. Bien que la fonction exacte de RhlA demeure inconnue, cette enzyme est nécessaire pour la synthèse des HAA (acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)-alcanoïque) (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006; Déziel *et al.*, 2003). *rhlB* exprime une rhamnosyltransférase (RhlB) qui ajoute ensuite un

groupement rhamnose aux molécules de HAA. Finalement, *rhIC* code pour une seconde rhamnosyltransférase (RhlC), laquelle ajoute un deuxième groupement rhamnose, ce qui donne comme produit final, des diRL.

Les HAA ont des propriétés surfactantes et sont suffisants pour supporter le « swarming » (Déziel *et al.*, 2003). Ainsi, un mutant *rhIB* est encore capable de « swarming » (Caiazza *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003). Caiazza et collègues (Caiazza *et al.*, 2005) ont démontrés que des mutants *rhIB* (produisant des HAA, mais pas de monoRL ni de diRL) et *rhIC* (produisant des HAA et monoRL, mais pas de diRL) sont affectés dans le « swarming », ce qui entraîne la production de ramifications peu définies. Donc les HAA représentent l'agent minimal requis pour induire la motilité de type « swarming » mais les RL contribuent aussi à ce phénotype.

RsmA. RsmA est un régulateur transcriptionnel faisant partie de la voie métabolique GacS/GacA qui opère l'activation du métabolisme secondaire chez plusieurs bactéries à Gram(-) (Heeb & Haas, 2001). Il a été suggéré que RsmA chez *P. aeruginosa* pourrait être un élément de contrôle positif à l'expression de gènes de virulence, du « swarming », et de la synthèse de RL (Heurlier *et al.*, 2004). Chez *P. aeruginosa*, GacA active le QS et l'expression de plusieurs facteurs de virulence via un mécanisme qui implique la participation de RsmA comme élément de contrôle négatif (Reimann *et al.*, 1997). Un mutant *gacA* forme des biofilms peu robuste, mais effectue du « swarming » plus vigoureux que la souche sauvage (Parkins *et al.*, 2001). Tel que noté plus haut, il est intéressant de constater que la surexpression de *rsmA* chez *P. mirabilis* réprime le « swarming ».

Récemment, Potvin et collègues (2003) ont rapportés plusieurs gènes impliqués dans le « swarming » chez *P. aeruginosa* par criblage de transposants connus pour être atténués lors d'infections pulmonaires chroniques chez la souris. Parmi les gènes identifiés, se trouvait *pilL* (motilité et attachement), *pepA* (métabolisme de la leucine), *metE* (méthyltransférase d'homocystéine), *nrqB* (oxidoreductase), *modA* (fixation du molybdate) et plusieurs autres gènes codant pour des protéines hypothétiques ou de fonction inconnue. À l'exception de *pilL*, qui est impliqué dans la synthèse des pili, la relation entre la fonction de ces gènes et le « swarming » demeure obscure.

1.5.6.3 – QS et Rhamnolipides.

Les RL sont un biosurfactant produit par *P. aeruginosa* et sont impliqués dans la motilité de type « swarming » chez cette bactérie. Tel que mentionné plus haut, les gènes directement impliqués dans la synthèse des RL sont *rhlA*, *rhlB* et *rhlC*. Les gènes *rhlA* et *rhlB* sont regroupés en un opéron *rhlAB* dont l'expression est contrôlée par un système de QS tel qu'illustré à la figure 8.

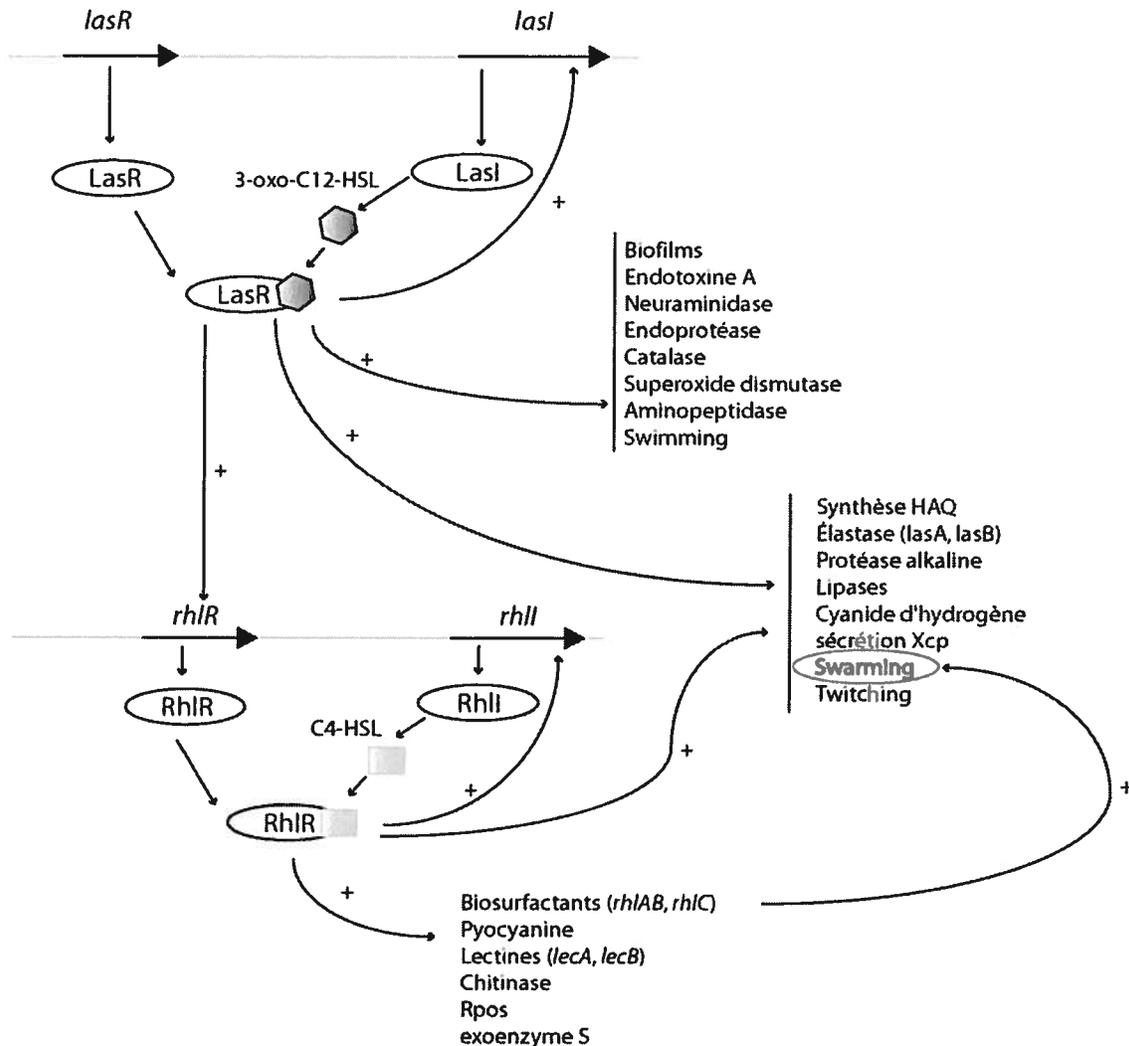


Figure 8. Schéma du système de QS chez *P. aeruginosa*.

Schéma adapté de Daniels et collègues (2004)

Dans ce système, *lasI* code pour un auto-inducteur synthase (LasI) qui synthétise des molécules de 3-oxo-C₁₂-HSL (homoserine lactone) qui eux-mêmes se lient à leur

récepteur LasR exprimé par *lasR*. Le complexe LasR lié à une molécule auto-inductrice active l'expression de *lasI*, ce qui crée une boucle de rétroaction positive. Ce complexe active aussi plusieurs facteurs de virulence ainsi que l'expression de *rhlR* et *rhlI*. Ce dernier code pour un autoinducteur synthase (RhlI) qui synthétise des molécules de C₄-HSL se liant à leur récepteur RhlR. Le complexe formé par RhlR et C₄-HSL active l'expression de *rhlI*, ce qui crée une autre boucle de rétroaction. En plus, ce complexe active l'expression de plusieurs et facteurs de virulence et autres métabolites et enzymes, incluant *rhlAB*.

Malgré que les RL aient été étudiés abondamment (Soberon-Chavez *et al.*, 2005), leur fonction naturelle demeure spéculative. Les RL sont capables de solubiliser et de favoriser l'acquisition de substrats hydrophobes, spécialement des hydrocarbures (Beal & Betts, 2000; Soberon-Chavez *et al.*, 2005; Zhang & Miller, 1995). Ils favorisent aussi la biodégradation de molécules peu solubles en modifiant la paroi cellulaire des bactéries rendant celles-ci plus hydrophobes (Al-Tahhan *et al.*, 2000).

Il a été suggéré que les RL peuvent solubiliser les phospholipides contenus dans les fluides pulmonaires, rendant ces derniers plus accessibles à être clivé par des phospholipases C (Kurioka & Liu, 1967). D'autres études rapportent que les RL peuvent interférer avec la réponse chimiotactique leucocytaire, stimuler la sécrétion de cytokines des cellules épithéliales pulmonaires et interférer avec les fonctions normales des cils trachéales (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). De plus la présence de RL a été détectée dans du sputum de patients atteints de fibrose kystique (Kownatzki *et al.*, 1987).

Les RL sont toxiques pour une variété de microorganismes, ce qui donnerait à *P. aeruginosa* un avantage compétitif pour la colonisation de niches écologiques, *P. aeruginosa* étant une bactérie ubiquitaire. Les RL démontrent une activité antibactérienne envers plusieurs bactéries à Gram (+) et dans une moindre mesure, des bactéries à Gram (-). Des activités antivirales, antifongiques et algicides ont aussi été rapportées (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Comme la majorité des facteurs de virulence produits par cette bactérie, les RL sont sous le contrôle du QS (Smith & Iglewski, 2003). C'est une des raisons pour laquelle ils sont souvent perçus eux aussi comme étant des produits associés à la virulence.

1.5.6.4 – « Swarming » biofilms et virulence.

Aucun lien direct entre le « swarming » et la virulence n'a été rapporté à ce jour chez *P. aeruginosa*. Cependant il est bien établi que le « swarming » dépend des RL (Caiazza *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2000). Or, plusieurs travaux ont été effectués sur la relation entre les RL et la virulence (Soberon-Chavez *et al.*, 2005).

Récemment, plusieurs études ont rapporté que les RL jouent un rôle central dans le développement des biofilms (Boles *et al.*, 2005; Davey *et al.*, 2003; Lequette & Greenberg, 2005; Schooling *et al.*, 2004) qui sont intimement impliqués dans les infections causées par *P. aeruginosa* (Costerton *et al.*, 1999). Étant donné que les RL sont aussi étroitement liés au « swarming », il existe assurément un lien entre les biofilms et le « swarming ». D'ailleurs, Shrouf et collègues (2006) ont récemment rapportés que des conditions limitant le « swarming » favorisent la formation de biofilms structurés alors qu'en conditions favorisant le « swarming », les biofilms formés étaient plats sans structures bien définies.

1.6 - Chimiotactisme et « swarming ».

Le contrôle de la motilité de surface chez les microorganismes motiles est un phénomène largement incompris et peu documenté. Il n'existe presque aucune étude expliquant les mécanismes chimiotactiques gouvernant la motilité de « swarming ».

Il est cependant connu que chez *E. coli* et *S. typhimurium*, des mutations dans la voie de signallement du chimiotactisme inhibent la différenciation en cellules « swarming » (Harshey, 2003). Le chimiotactisme n'était cependant pas requis pour la migration de cellules « swarming » différenciées (Harshey, 2003). Aussi, chez *Vibrio*, certaines composantes du système de chimiotactisme sont essentielles pour la migration « swarming », mais pas pour la différenciation cellulaire (Harshey, 2003). Les gènes de chimiotactisme, sont cependant très importants pour plusieurs activités cellulaires. Il n'est donc pas étonnant de constater des défauts dans la motilité de type « swarming » chez des mutants dans le chimiotactisme.

Certaines études rapportant des indices de chimiotactisme pour la motilité de type « twitching » ont été publiés (Kearns & Shimkets, 1998; Kearns *et al.*, 2001; Kearns & Shimkets, 2001). Kearns et collègues (Kearns & Shimkets, 1998) ont rapporté l'existence

d'un chémoattractant lipidique chez *M. xanthus*. Cet organisme, lorsqu'en motilité de type « twitching », migre en suivant un gradient de molécules de phosphatidyléthanolamine (PE) purifiés de ses propres membranes cellulaires. Les PE ont aussi été identifiés comme dirigeant la motilité de type « twitching » chez *P. aeruginosa* (Kearns *et al.*, 2001). Plusieurs possibilités ont été proposées concernant le rôle des PE dans la motilité de type « twitching », mais celle-ci demeurent spéculatives (Kearns & Shimkets, 2001).

Le seul cas où une réponse chimiotactique a affecté la motilité de type « swarming » a été observée est chez *P. mirabilis*. Il a été rapporté que la glutamine agit comme un chémoattractant envers les cellules « swarming » différenciées, mais pas envers les cellules en motilité de type « swimming » (Allison *et al.*, 1993). Pour plusieurs raisons, la signification de cette découverte ne fait pas l'unanimité (Rather, 2005), notamment parce que le phénotype « swarming » observé dans cette étude est plutôt unique et ne présente pas de cercles concentriques typiquement observables chez cette espèce.

2. MÉTHODOLOGIE

2.1 – Bactéries et plasmides.

La bactérie utilisée pour réaliser les travaux présentés dans ce mémoire est *Pseudomonas aeruginosa* souche UCBPP-PA14 (PA14). Cette souche particulièrement virulente (Choi *et al.*, 2002; Jander *et al.*, 2000; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999), est un isolat clinique prélevé d'un patient grand brûlé (Rahme *et al.*, 1995). La souche *E. coli* SM10*pir* contenant le plasmide pIT2 de 6,16 kpb sur lequel se trouve le transposon IS/*lacZ*/hah (Fig. 9) dérivé de Tn5 a été obtenue directement du Dr. Michael Jacobs (Jacobs *et al.*, 2003). Le transposon IS/*lacZ*/hah est dérivé de l'élément IS50L du transposon Tn5 et peut générer une fusion β -galactosidase (*LacZ*) avec un gène s'il est inséré de façon appropriée dans le gène cible (Bailey & Manoil, 2002). Un promoteur d'une phosphotransférase de néomycine est inséré dans la partie terminale du transposon afin de réduire les effets polaires sur l'expression des gènes en aval dans le cas d'éventuelles insertions correctement orientées. Une recombinaison par l'enzyme Cre permet d'exciser toute la partie du transposon située entre les deux sites loxP, laissant une insertion de 63 codons (hah) codant pour un épitope d'hémagglutinine d'influenza, ainsi qu'une étiquette hexahistidine offrant la possibilité d'effectuer une purification par affinité métallique (Bailey & Manoil, 2002).

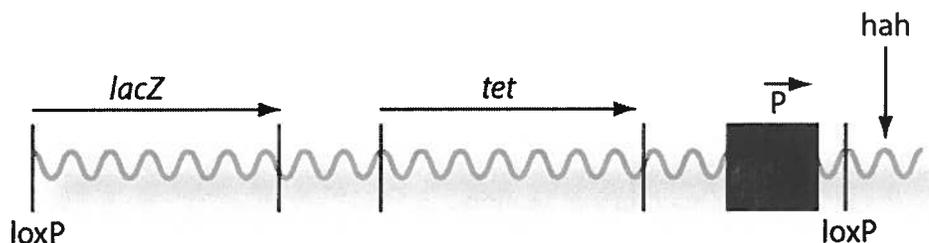


Figure 9. Transposon utilisé pour effectuer la mutagenèse par insertion.

lacZ, code pour la β -galactosidase; *tet*, gène de résistance à la tétracycline; P, promoteur de la phosphotransférase de la néomycine; hah, étiquette de purification. (Jacobs *et al.*, 2003)

Le plasmide sur lequel se trouve le transposon contient aussi une origine de répllication R6K requérant l'élément λ -pir. Étant donné que *P. aeruginosa* n'est pas λ -pir, le plasmide ne peut pas se répliquer une fois à l'intérieur de cette bactérie et agit donc comme vecteur-suicide.

2.2 – Milieux de culture.

2.2.1 – Milieux de culture liquide.

Pour toutes les expériences effectuées, les pré-cultures des différentes bactéries ont été effectuées avec du milieu de culture liquide appelé « tryptic soy broth » (TSB) (Difco). Du milieu liquide TSB supplémenté avec 70 $\mu\text{g/mL}$ de tétracycline a été utilisé pour cultiver les transposants *ISlacZ/hah*.

2.2.2 – Milieu de culture solide.

2.2.2.1 – Géloses « swarming ».

Trois milieux nutritionnels ont été utilisés pour préparer des géloses « swarming » : 1) Le milieu M9 supplémenté avec du dextrose (M9D), 2) M9 supplémenté avec du dextrose et de la caséine hydrolysée à l'acide (« casamino acids ») (M9DCAA) pour source d'acides aminés et 3) du bouillon nutritif « Nutrient broth » (NB) (Difco) supplémenté avec du dextrose (NBD). Toutes les géloses « swarming » étaient solidifiées avec 0,5% d'agar-Bacto (Difco). Les recettes de chacun de ces milieux sont décrites en détails à l'appendice B. Les détails de préparation des géloses « swarming » sont décrits plus loin à la section 2.3.5.

2.2.2.2 – Géloses de confirmation par colonies.

Les géloses de confirmation par colonies étaient constituées de Tryptic Soy Agar (TSA;Difco) supplémenté avec 70 $\mu\text{g/mL}$ de tétracycline.

2.3 – Croissance des bactéries.

Chacune des souches utilisées pour mes travaux était congelée à -80°C dans des tubes cryogéniques de 2 mL ou dans un puits d'une plaque de 96 puits contenant du milieu de culture supplémenté avec 15% de glycérol. La veille d'une expérience, la ou les souches utilisées étaientensemencées dans une éprouvette contenant 2 mL de milieu TSB, puis incubées 16h dans un agitateur rotatoire situé dans un incubateur ajusté à une température de 37°C . Les précultures de transposants IS*lacZ*/hah étaientensemencées dans des éprouvettes contenant du milieu TSB supplémenté avec $70\ \mu\text{g/mL}$ de tétracycline.

2.3.1 – Courbes de croissance des transposants.

Les courbes de croissances des transposants affectés ou inhibés dans le « swarming » furent effectuées en incubant des microplaques de 96 puits dans lesquels il y avait $150\ \mu\text{L}$ de culture de chacun des transposants testés. Les plaques étaient enrobées de papier parafilm et agitées à 350 tours par minute. La $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a été prise aux temps 0, 2, 4, 6, 8 et 24 heures.

2.4 – Préparation de géloses « swarming ».

Toutes les expériences rapportées à la section 3.1 concernant la mise au point de géloses « swarming » ont été effectuées avec des géloses préparées le jour même. Pour les expériences rapportées à la section 3.2, les géloses pouvaient avoir été conservées à 4°C jusqu'à deux semaines après leur préparation avant d'être utilisées.

2.4.1 – Préparation de géloses « swarming » optimisées.

Le protocole de préparation de géloses « swarming » qui suit représente le protocole optimisé final ayant été utilisé pour tous les essais de « swarming » présentés à la section 3.2, puis pour ceux de l'article présenté en annexe.

La première étape pour préparer des géloses « swarming » consistait à ajouter dans un flacon Erlenmeyer de volume approprié 20 mM de NH_4Cl , 12 mM de Na_2HPO_4 ,

22 mM de K_2HPO_4 , 8,6 mM de NaCl, 11 mM de dextrose, 0,5 % de « casamino acids » (CAA), puis 0,5% d'agar de marque Bacto.

Ensuite, un volume d'eau obtenue par osmose inverse était ajouté dans le flacon Erlenmeyer, puis bien mélangé avec chacun des éléments précédemment ajoutés. Le milieu était ensuite autoclavé pour une période de 20 min.

Pendant la stérilisation, chacune des boîtes de Pétri était identifiée et le matériel pour préparer/couler les géloses était regroupé afin d'être prêt à utiliser. Chacune des boîtes de Pétri était disposée dans une hotte à flux laminaire de manière à former deux rangées localisées au centre de la hotte. Cette étape était nécessaire car chacune des géloses qui étaient coulées dans les boîtes de Pétri devaient sécher également. En les disposant ainsi dans la hotte, on s'assurait que chaque boîte de Pétri était soumise à une quantité égale du flux d'air sortant à chaque extrémité de la hotte. Il était important de tout préparer le matériel requis et de l'avoir à portée de main, car les géloses devaient être coulées le plus rapidement possible pour éviter que le milieu encore chaud contenu dans le flacon Erlenmeyer ne refroidisse.

Ensuite, 1 mM de $MgSO_4$ et 1 mM de $CaCl_2$ sous forme de solution étaient ajoutés au milieu, puis 40 mL de milieu « swarming » chaud était versé dans un tube Falcon® de 50 mL. À ce moment précis, un chronomètre était démarré. À partir de ce tube, 20 mL de milieu était versé dans deux boîtes de Pétri. Cette dernière étape était répétée pour toutes les boîtes de Pétri restantes.

Une fois toutes les boîtes de Pétri remplies, le temps affiché par le chronomètre démarré précédemment était noté, puis divisé par le nombre total de boîtes de Pétri divisé par deux. Ce temps représente le temps approximatif utilisé pour remplir deux boîtes de Pétri de milieu « swarming » chaud.

Lorsque le chronomètre atteignait 60 min, la première paire de boîte de Pétri était retirée de la hotte, puis la période de temps précédemment calculée étaient attendue avant de retirer chacune des autres paires de boîtes de Pétri. Cette étape assurait un temps de séchage égal pour toutes les géloses « swarming ». Comme il sera discuté plus loin, le temps de séchage est un élément critique pour l'obtention d'un « swarming » reproductible.

Les géloses pouvaient par la suite être directement inoculées ou bien entreposées à 4°C dans un sac de plastique fermé hermétiquement pour une utilisation ultérieure.

2.4.2 – Préparation de géloses « swarming » pour l'étape d'optimisation du milieu « swarming ».

2.4.2.1 – Variation du temps de séchage.

Avant d'en arriver au protocole final de préparation de géloses « swarming » décrit ci-haut, plusieurs paramètres ont dû être optimisés. À la section 3.1.1, des expériences faisant varier le temps de séchage et la composition en nutriments des géloses « swarming » sont rapportées. La variation du temps de séchage sous la hotte à flux laminaire consistait simplement à laisser sécher les géloses « swarming » pour des périodes variables à la place de la période de référence de 60 minutes.

2.4.2.2 – Variation de la concentration d'un élément du milieu nutritionnel.

Plusieurs expériences à la section 3.1 ont nécessité des variations de concentrations de certains éléments du milieu « swarming » M9D. La difficulté consistait à faire varier la concentration d'un seul élément du milieu nutritionnel sans toutefois affecter la concentration d'agar et de toutes les autres composantes du milieu M9D. Une possibilité était d'ajouter une quantité de poudre plus élevée (ou moindre) de l'élément à être testé afin d'obtenir la concentration finale désirée. Cependant, cela impliquait de préparer plusieurs flacons Erlenmeyer en pesant chaque fois chacun des éléments du milieu nutritionnel. Procéder de cette manière aurait fait augmenter le risque d'erreurs ainsi qu'affecter la reproductibilité des résultats.

La manière de procéder privilégiée a consisté à préparer un milieu nutritionnel avec une concentration plus élevée que normal de chacune des composantes du milieu M9D de façon à ce que l'ajout d'un certain volume d'eau permette de rétablir les concentrations normales des composantes du milieu. Ainsi il était possible de calculer le volume de l'élément en solution à ajouter (NH_4Cl 2M, NaNO_3 2M, NaCl 5M, KCl 2M, dextrose 1M, sucrose 1M, ribose 1M, fructose 1M, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) à un volume de milieu M9D « hyper concentré » (Fig. 10).

Finalement, un certain volume d'eau stérile était ajouté si nécessaire pour rétablir les concentrations normales des composantes du milieu M9D. En procédant de cette manière, les concentrations normales de chacun des éléments du milieu M9D demeuraient inchangées, mais celle de l'élément à tester pouvait varier (jusqu'à une certaine limite). Pour chacune des expériences de la section 3.1 effectuées à l'aide de cette méthode, les calculs et les concentrations sont disponibles à l'appendice A.

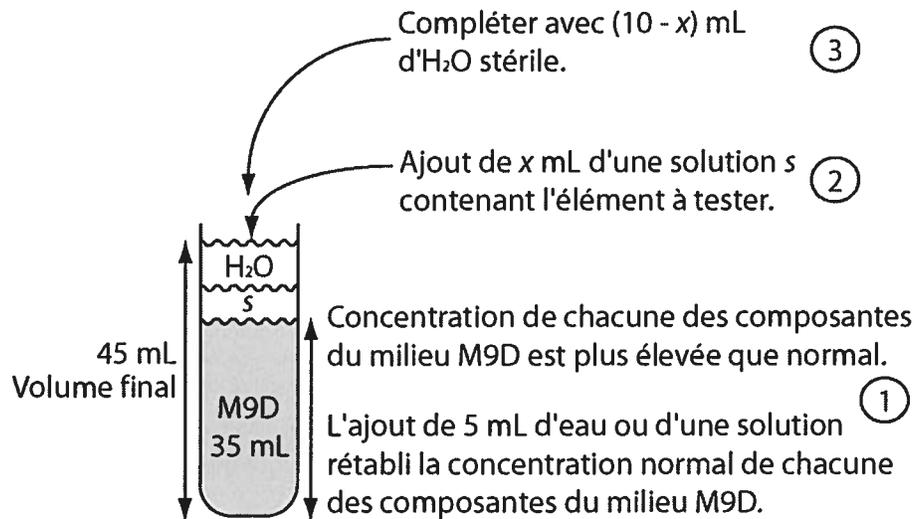


Figure 10. Schéma de la méthode utilisée pour faire varier la concentration d'un élément sur plusieurs géloses de milieu « swarming ».

2.4.2.3 – Variation du pH des géloses « swarming ».

Le pH des géloses « swarming » a été ajusté directement dans les flacons Erlenmeyers contenant le milieu « swarming » très chaud immédiatement après leur sortie de l'autoclave. Le pH était ajusté à l'aide d'un pH-mètre « pHmeter accumet® 15 » (FisherScientific) en ajoutant soit du NaOH ou du HCl concentrés. Le pH-mètre utilisé prenait en compte la température pour calculer le pH.

2.5 – Ensemencement de géloses « swarming ».

Chacune des géloses « swarming » illustrées à la section 3.1 était inoculée avec 5 μ L d'une culture de *P. aeruginosa* ayant une $DO_{(600nm)}$ se situant entre 3,0 et 5,0. Tel que

décrit à la section 2.3, une préculture était démarrée la veille de chaque expérience. Le matin même de l'expérience, plusieurs dilutions de cette préculture (1:2, 1:100, 1:500, 1:1000 et 1:2000) était effectuées dans le but de maximiser les chances d'obtenir une culture bactérienne avec une $DO_{(600nm)}$ adéquate au moment de l'inoculation. La seule exception consiste en l'expérience impliquant l'inoculation de géloses « swarming » avec des cultures de *P. aeruginosa* ayant des $DO_{(600nm)}$ différentes (section 3.1.2).

Procéder de la même manière lors de l'inoculation de géloses « swarming » avec les transposants (résultats de la section 3.2), impliquait la gestion de beaucoup trop de cultures bactériennes. La façon de procéder a été d'effectuer des précultures de chacun des transposants tel que décrit à la section 2.3. Le lendemain, plutôt que d'effectuer plusieurs dilutions pour chacune des différentes souches, celles-ci ont plutôt été diluées de façon à ce qu'elles aient toute une $DO_{(600nm)}$ similaire immédiatement avant l'inoculation. Pour en arriver à une même $DO_{(600nm)}$ finale pour chaque transposant, la $DO_{(600nm)}$ initiale de chacun d'eux étaient noté, puis à l'aide d'un calcul (disponible à l'appendice A), un volume de TSB était ajouté à un volume de culture bactérienne de façon à ce que chaque culture de transposant ait une $DO_{(600nm)}$ de 2,0.

2.6 – Incubation de géloses « swarming ».

Les géloses « swarming » M9D et M9DCAA inoculées étaient incubées à 30°C pendant 16 h. Les géloses « swarming » NBD étaient incubées à 34°C pendant 16 h. Le seul cas où des géloses « swarming » ont été incubées à des températures autres que 30°C et 34°C est à la section 3.1.1 où les températures d'incubation étaient de 30 °C, 32°C et 34°C.

L'incubation en conditions dénitrifiantes de géloses « swarming » a été effectuée en plaçant les géloses dans une jarre anaérobie dans laquelle était inséré un paquet « GasPack™ Plus » (BD BBL™). La jarre était fermée hermétiquement, puis placée 16 h à 30°C.

2.7 – Prise de photos de géloses « swarming ».

Une fois la période d'incubation terminée, des photos de chacune des géloses ont été prises avec un appareil photo numérique Canon 10D équipé d'une lentille Canon ultrasonic 28-80 mm. Chacune des photos était stockée sur une carte mémoire puis transférée sur un ordinateur. Les photos ont été traitées avec le logiciel PaintShopPro™ (Jasc software) afin d'améliorer le contraste et la clarté des images.

2.8 – Génération d'une banque de mutants par insertion transpositionnel aléatoire.

Dans le but de générer des transposants, une conjugaison entre *E. coli* SM10pir/pIT2 contenant le transposon IS*lacZ*/hah et *P. aeruginosa* PA14 a été effectuée. Les transposants obtenus ont ensuite été étalés sur des géloses de sélection. Les colonies formées sur les géloses de sélection ont été repiquées dans des plaques de 96 puits contenant du milieu de culture à l'aide d'un robot repiqueur de colonies. Finalement, ces plaques ont été entreposées à -80°C. Le processus de construction de la banque de mutant est schématisé à la figure 11.

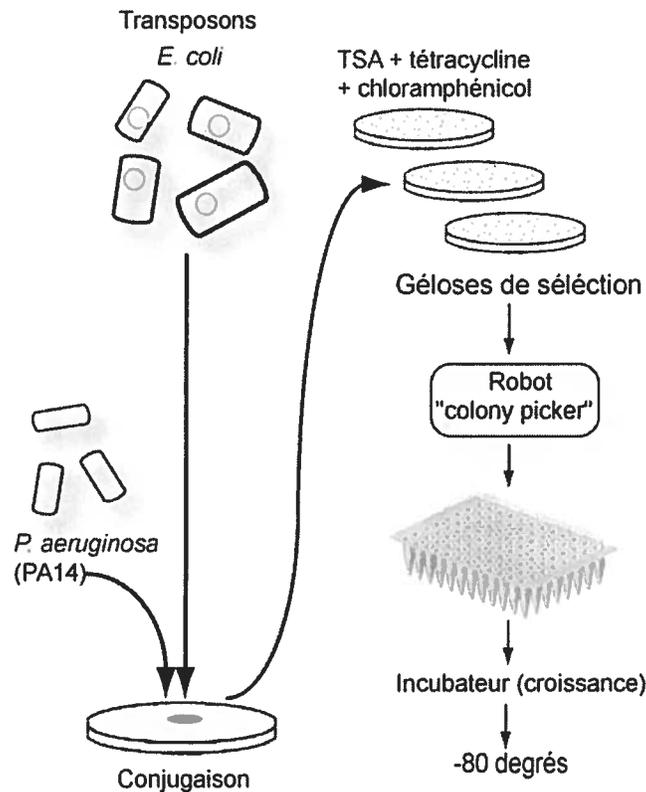


Figure 11. Schéma général des étapes de la construction de la banque de transposants ISlacZ/hah.

2.8.1 – Précultures de conjugaison.

Les précultures de bactéries étaient effectuées sur gélose TSA lorsqu'elles devaient être utilisées à des fins de conjugaison. Les géloses utilisées pour cultiver la souche donneuse *E. coli* SM10*pir*/pIT2 contenaient 70 µg/mL de tétracycline. Aucun antibiotique n'était ajouté aux géloses utilisées pour cultiver PA14. Les géloses de conjugaison de PA14 étaient incubées O/N à 42°C et celles de *E. coli* à 37°C.

2.8.2 – Conjugaison de *E. coli* SM10*pir*/pIT2 avec PA14.

Des précultures de la souche *E. coli* SM10*pir*/pIT2 (contenant le transposon ISlacZ/hah) et de PA14 ont été effectuées sur géloses TSA tel que décrit plus haut. À l'aide d'un fil de platine stérile, les biomasses formées par chacune des deux cultures ont

été recueillies, déposées sur une nouvelle gélose, mélangées ensemble, puis incubées 16 h à 37°C.

Le lendemain, toute la biomasse contenue sur la gélose a été resuspendue dans 5 mL de TSB stérile, puis vortexée jusqu'à l'obtention d'un mélange bien homogène auquel a été ajouté 15% de glycérol. Ce volume a été aliquoté en 25 volumes de 200 µL, puis entreposé à -80°C.

2.8.3 – Étalement des conjuguants sur géloses de sélection.

Avant de procéder à l'étalement à grande échelle des conjuguants, l'efficacité de la conjugaison a été déterminée (6.88^E-07 %), puis une mise au point a été effectuée afin de déterminer la dilution optimale de la solution de conjuguant, qui une fois étalée sur une gélose de sélection engendrait la formation de colonies avec un espacement adéquat pour le robot repiqueur de colonies. Après plusieurs essais, il s'est avéré que l'étalement par billes de verre de 200 µL d'une dilution 1:700 de la solution de conjuguants était optimal pour l'obtention de colonies compatibles avec le robot repiqueur de colonies. Les géloses de sélection étaient constituées de milieu TSB supplémenté avec de la tétracycline (70 µg/mL) et du chloramphénicol (20 µg/mL), puis solidifiés avec 1,5% d'agar et ont été incubées 24 heures à 37 °C, puis 24 heures à 30°C. L'ajout de tétracycline aux géloses de sélection avait pour but de d'empêcher la croissance de toutes les bactéries n'ayant pas intégré de transposon. Étant donné que *E. coli* est naturellement plus sensible que *P. aeruginosa* au chloramphénicol, l'ajout de cet antibiotique visait à inhiber la croissance de cette bactérie, pouvant posséder un transposon, donc un gène de résistance à la tétracycline. Seules les bactéries de *P. aeruginosa* ayant intégré un transposon IS*lacZ*/hah peuvent survivre sur les géloses de sélection

2.8.4 – Repiquage des colonies.

Une fois tous les paramètres concernant la préparation des géloses de sélection optimisés, les colonies étaient repiquées par un robot repiqueur de colonies, le « GeneTAC™ G3 (Genomic Solutions™). Environ 20 géloses de sélection contenant chacune approximativement 100 colonies étaient repiquées quotidiennement par le robot.

À l'aide d'une caméra, le robot était capable de localiser les colonies à la surface d'une gélose. Il a été déterminé que ce dernier était le plus efficace lorsque les colonies étaient bien espacées entre elles, opaques, rondes et de diamètre d'environ 2 à 3 mm. Une fois les colonies localisées par le robot, celui-ci pique chacune d'entre elles à l'aide d'une aiguille pneumatique. La tête du robot comportait 48 aiguilles. Une fois que les 48 aiguilles avaient chacune piqué une colonie, celles-ci allaient ensemercer pendant 1 sec. un puit d'une plaque de 96 puits contenant 700 µL de milieu TSB supplémenté avec 70 µg/mL de tétracycline. Les aiguilles étaient ensuite stérilisées et un nouveau cycle de repiquage pouvait débuter. Un protocole de stérilisation des aiguilles a dû être mis au point avant de débuter le repiquage. Brièvement, avant chaque cycle de repiquage, les aiguilles étaient 1) passées 5 sec. sur des brosses imbibées d'éthanol 70% afin d'enlever les débris d'agar ayant pu y adhérer, 2) trempées dans un bain sonicateur pendant 5 sec. pour faire décoller les débris encore accrochés, 3) trempées dans un bain d'éthanol 70% pendant 5 sec. et enfin 4) chauffées à très haute température pendant 8 sec. afin de détruire toute bactérie pouvant encore se trouver sur une aiguille. Toute la procédure de repiquage par le robot était surveillée en permanence.

2.9 – Détermination du site d'insertion des transposons.

2.9.1 – Extraction de l'ADN total des transposants.

Dans le but d'effectuer la réaction de la PCR décrite plus bas (section 2.9.2), de l'ADN de chacun des transposants a dû être extrait. La méthode employée est une variante d'une technique appelée « colony PCR » (Jacobs *et al.*, 2003).

Un mL d'une culture bactérienne d'un transposant était centrifugé à 5000 x g pendant 5 min. Deux lavages 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 que le surnageant du dernier lavage eut été éliminé, le culot était resuspendu dans 500 µL de PBS, puis 50 µL de cette dilution était transférée dans un microtube. Ce microtube était ensuite placé dans un bloc chauffant à 100°C pour un période de 10 min, transféré sur glace pour une autre période 10 min, puis centrifugé à 13000 x g pendant 10 min.

Finalement, le surnageant contenant l'ADN chromosomique était prélevé du tube, puis entreposé à -20°C.

2.9.2 - Réaction PCR semi-arbitraire en deux rondes.

2.9.2.1 – Généralités

Chacun des transposants sélectionnés lors de l'étape du criblage possèdent en théorie un transposon inséré au hasard dans leur génome. La PCR décrite dans cette section est largement inspirée de celle décrite par Jacobs et collègues (Jacobs *et al.*, 2003) et permet d'amplifier une partie du transposon conjointement avec une partie de la région directement adjacente au site d'insertion du transposon. Pour en arriver à un tel produit, une PCR en deux rondes a été effectuée (Fig. 12). Le but de la première ronde consistait à amplifier une séquence contenant l'extrémité du transposon ainsi qu'une partie de l'ADN génomique adjacent. Trois amorces arbitraires et une amorce spécifique ont été utilisées pour la réaction de première ronde. Les amorces arbitraires ont la capacité de se lier à virtuellement n'importe quel endroit du génome. Le produit de la première ronde consistait donc en une mixture de séquences amplifiées ayant toutes une extrémité en commun. Un détail important concernant les trois amorces arbitraires est qu'elles contiennent toutes une queue ayant une séquence identique qui est utilisée pour la réaction de deuxième ronde. Cette première ronde de PCR permet aussi théoriquement d'obtenir de très faibles concentrations de plusieurs fragments ayant été amplifiés par deux amorces arbitraires suffisamment près l'une de l'autre.

Le but de la deuxième ronde était d'amplifier davantage tous les produits PCR de la première ronde qui contiennent une partie du transposon. Les amorces utilisées dans la deuxième ronde consistaient en une amorce spécifique à une partie du transposon à l'intérieur du produit amplifié précédemment («nested») ainsi qu'une amorce spécifique à la queue terminale des amorces arbitraires utilisées dans la ronde 1. C'est donc une réaction PCR spécifique qui permet d'obtenir une bonne amplification des produits souhaités de la ronde 1. Tous les détails des réactions PCR de ronde 1 et 2 sont indiqués à l'appendice C.

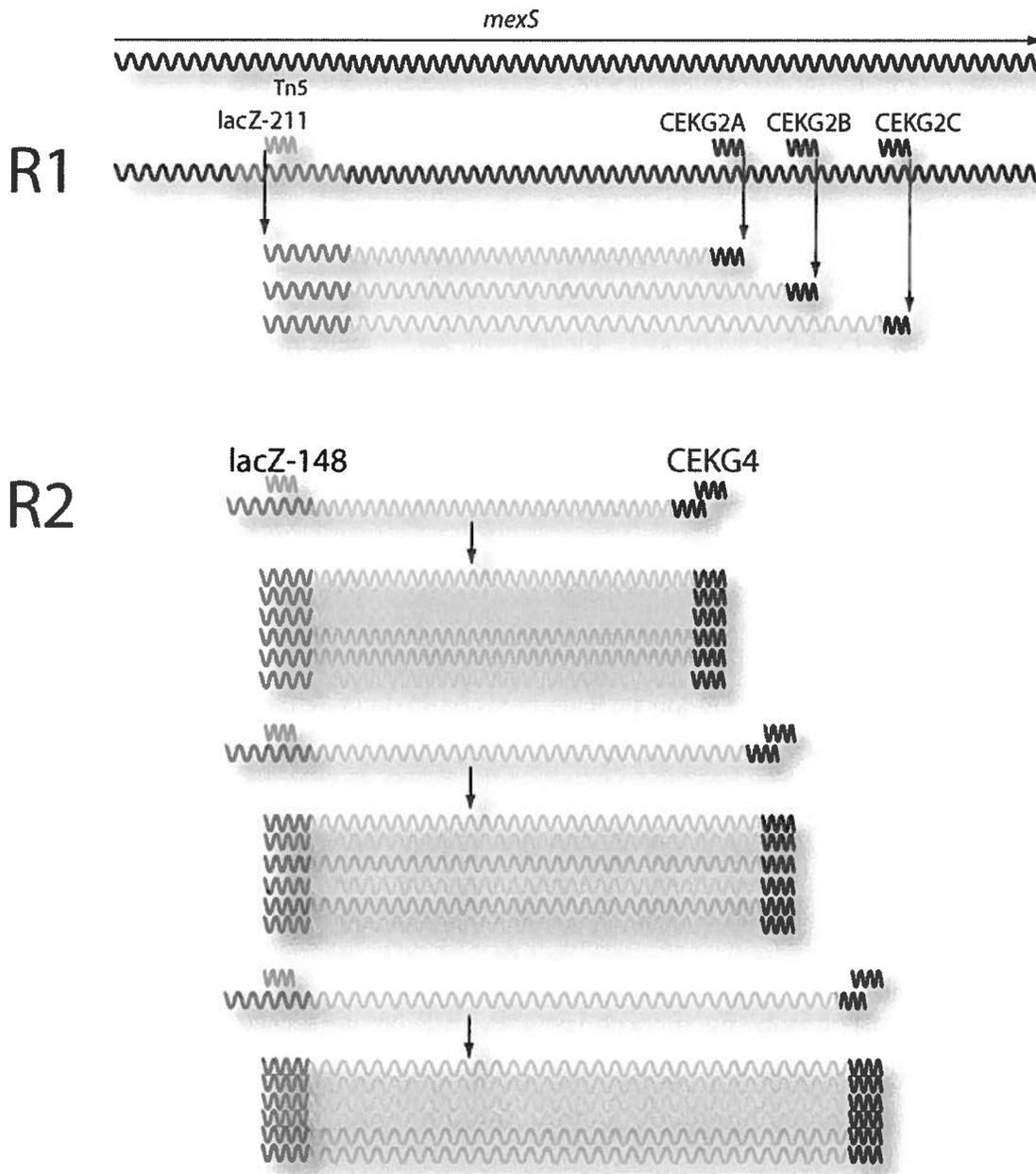


Figure 12. Schéma de la réaction PCR en deux rondes.

Pour la ronde 1, l'utilisation d'une amorce spécifique et de trois amorces arbitraire, permet l'amplification de plusieurs fragments de longueur variables. À la ronde 2, deux amorces spécifiques permettent d'amplifier les produits PCR obtenus de la ronde 1.

2.9.2.2 – Ronde 1.

Dans la première ronde, une amorce spécifique au transposon ainsi que trois amorces arbitraires sont utilisées. Le tableau IX de l'appendice C illustre la concentration

et l'ordre dans lequel chacune des composantes de la réaction ont été ajoutée. En moyenne, 20 réactions PCR (pour 20 transposants) ont été effectuées à la fois. Le nombre de réactions ainsi que les volumes exacts ayant été utilisés sont présentés à l'appendice C. Une fois toutes les composantes (sauf l'ADN) ayant été mélangées dans le même microtube, un volume de 9,5 μL de cette solution a été distribué dans chacun des tubes-PCR bien identifiés. Ensuite, 0,5 μL d'ADN de chacun des transposants, a été ajouté dans chacun des tubes-PCR correspondants. Finalement, les tubes-PCR ont été placés dans une machine à PCR TECHNE genius (MANDEL Scientific). Le programme de la première ronde de la PCR est décrit au tableau X de l'appendice C. Lorsque la réaction était terminée, les produits de la PCR obtenus étaient soit utilisés immédiatement pour la ronde 2, soit congelés à -20°C .

2.9.2.3 – Ronde 2.

Les réactifs (sauf le produit PCR de la ronde 1) de la deuxième ronde (tableau X; appendice C) ont été multipliés par le nombre de réactions à effectuer, puis ajoutés et mélangés dans un microtube. Une fois toutes les composantes (sauf les fragments d'ADN amplifiés à la ronde 1) mélangées dans le même microtube, un volume de 47,5 μL de cette solution a été distribué dans une nouvelle série de tubes-PCR bien identifiés. Ensuite, 2,5 μL de chacun des produits PCR de la ronde 1 a été ajouté dans chacun des tubes-PCR correspondants. Finalement, les tubes-PCR ont été placés dans une machine à PCR TECHNE genius (MANDEL Scientific). Le programme de la deuxième ronde de la réaction PCR est décrit au tableau X de l'appendice C. Les produits PCR obtenus ont été conservés à -20°C .

2.9.2.4 – Migration sur gel d'agarose.

Pour chaque transposant, 5 μL de produit produits PCR de deuxième ronde a été mélangé avec 1 μL de tampon de chargement. Le tout a été chargé dans un gel d'agarose 1% placé dans une cuve rempli de tampon TAE. Les échantillons ont migré pendant 45 min. à 100 Volts. Le gel a ensuite été coloré 10 min dans du bromure d'éthidium et rincé à l'eau milliQ pendant 5 min. Le gel a finalement été placé dans une machine

AlphaImager™ 3400 (Alpha Innotec) équipée d'une caméra numérique, puis éclairé aux rayons UV afin de révéler les bandes d'ADN. L'image captée par la caméra était ensuite transmise à l'ordinateur via le logiciel AlphaImager™.

2.9.2.5 – Préparation des produits PCR pour le séquençage.

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

3. RÉSULTATS

3.1 - Optimisation des conditions induisant le « swarming ».

La préparation de milieu de culture induisant la motilité de type « swarming » chez *P. aeruginosa*, tel que décrit dans la littérature (Caiazza *et al.*, 2005; Déziel *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000), est un processus mal défini et plutôt laborieux. Les méthodes de préparation de milieu « swarming » (ou géloses « swarming ») impliquent un temps d'attente allant de 24 à 48 h, rendant les manipulations et la planification des expériences visant à étudier le « swarming » peu pratiques. De façon générale, le milieu « swarming » consiste en un milieu nutritionnel solidifié avec 0,5% d'agar. Cette concentration d'agar est la seule variable qui fait consensus dans les différents travaux ayant porté sur le « swarming » de *P. aeruginosa*. C'est dans cette optique que portait la première partie de mes travaux de maîtrise, soit l'optimisation d'une méthode de préparation de milieu « swarming » reproductible et rapide dans le but de se donner des moyens efficaces d'étudier et de caractériser ce type de motilité. Les variables ayant été explorées sont 1) le temps de séchage des géloses sous la hotte à flux laminaire, 2) la température d'incubation, 3) l'influence du pH, 4) l'influence de différentes sources d'azote, 5) l'influence de différentes sources de carbone, 6) l'influence de l'osmolarité, 7) l'influence de différents métaux et, finalement, 8) l'influence de la présence/absence d'O₂.

Trois études existantes portant sur le « swarming » de *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000) ont servi de point de départ.

Le milieu « swarming » décrit dans l'étude de Kohler et collègues (Kohler *et al.*, 2000) était basé sur un milieu M9 sans NH₄Cl supplémenté avec 0,2% de glucose, 2 mM de MgSO₄, des acides aminés et des éléments traces. Le tout était solidifié avec 0,5% d'agar, puis brièvement séché. Les géloses étaient inoculées à l'aide d'un cure-dent à partir de colonies individuelles provenant de géloses LB. La température d'incubation était de 37°C.

Le protocole de préparation de milieu « swarming » décrit par Rashid & Kornberg (Rashid & Kornberg, 2000), ainsi que par Déziel et collègues (Déziel *et al.*, 2003), faisait état d'un milieu nutritionnel composé de 8 g/L de Nutrient Broth (NB), solidifié avec

0,5% d'agar, supplémenté avec 5 g/L de glucose et entreposé 16 h à température pièce avant l'inoculation. La température d'incubation était de 30°C.

3.1.1 - Temps de séchage sous hotte à flux laminaire et température d'incubation.

Dans la littérature traitant de la préparation des géloses « swarming », l'entreposage des géloses à température pièce pour une période de 16 heures précédant l'inoculation était un élément redondant (Déziel *et al.*, 2003; Rashid & Kornberg, 2000). De plus, la température d'incubation était variable (30°C ou 37°C). Ce sont donc ces deux aspects qui ont été investigués en premier lieu. Il est important de noter qu'à chaque essai, une seule variable était modifiée. Les variables demeurées constantes sont la densité de l'inoculum ($DO_{(600nm)} = \sim 3,0$) et la composition des deux milieux de culture utilisés, soit le milieu M9D ou NBD.

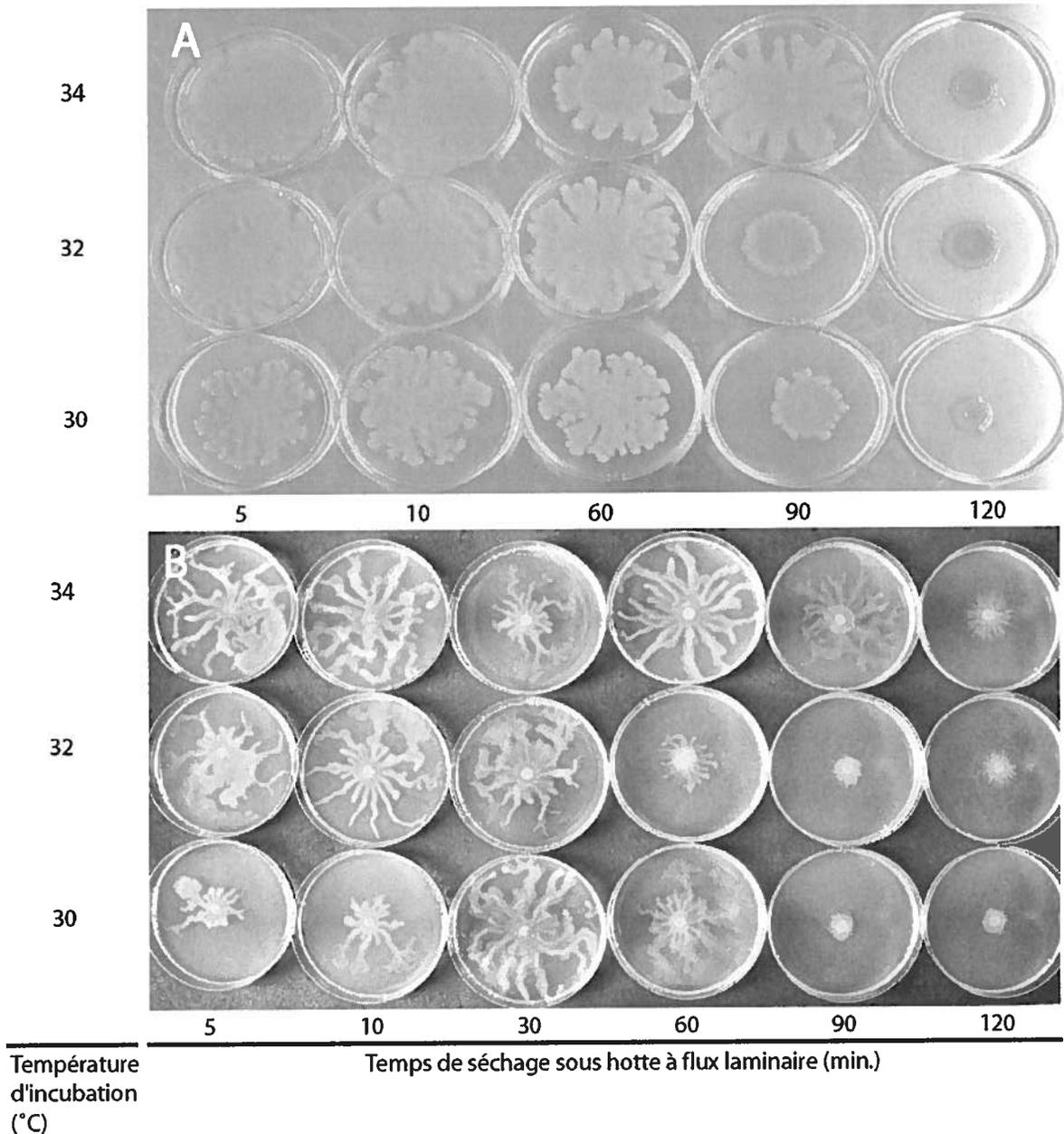


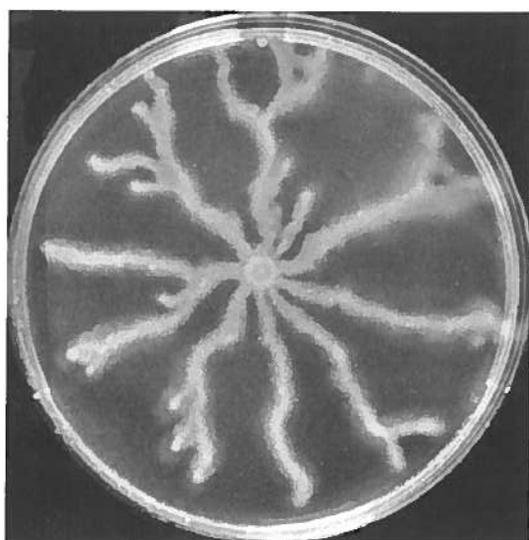
Figure 13. Le temps de séchage sous hotte à flux laminaire ainsi que la température ont des effets déterminant sur le « swarming » en milieu A) NBD et B) M9D.

Le temps de séchage des géloses a un impact considérable sur le « swarming » avec les deux milieux testés (Fig 13). En milieu NBD (Fig. 13A), il apparaît que plus la température d'incubation est élevée, plus les dendrites de « swarming » sont épaisses et plus celles-ci recouvrent une grande partie de la surface disponible. Généralement, un temps de séchage de 90 min et plus semble inhiber la formation de dendrites, comme le

témoigne les colonies circulaires étendues mais non-ramifiées correspondant à ces temps de séchage. Aussi, au temps 120 min, la colonie centrale s'étend très peu sur la surface de la gélose.

En milieu M9D (Fig. 13B), un phénomène sensiblement similaire a lieu, à la différence que les dendrites sont beaucoup mieux définis et minces qu'en NBD. Une différence évidente entre les deux milieux est que la quantité de biomasse est visiblement plus élevée en milieu NBD. Également, la température d'incubation semble jouer un rôle plus important en milieu NBD qu'en milieu M9D. En milieu M9D, une température d'incubation de 34°C permet la formation de dendrites bien définis, alors que ce n'est pas le cas en milieu NBD. Dans tous les cas, le temps de séchage est un facteur déterminant.

Suite à ces résultats initiaux, il a été décidé que toutes les expériences suivantes concernant les conditions nutritionnelles et le « swarming » décrites dans la section 3 seraient effectuées avec le milieu M9D séché pendant 60 min. sous flux laminaire. Un des avantages d'utiliser ce milieu est qu'il est défini. Ainsi, il est possible d'y faire varier chacun des éléments le composant et même d'y en ajouter, afin de déterminer avec précision quelle est l'influence de tel ou tel élément sur le « swarming ». Pour les expériences qui suivent, nous considérerons que le phénotype « swarming » de référence est celui présenté à la figure 14.



NH ₄ Cl	19 mM
Na ₂ HPO ₄	12 mM
KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	8,6 mM
Dextrose	11 mM
Agar (Difco)	0,5%
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mM

Figure 14. Phénotype « swarming » de référence obtenu avec un milieu M9D solidifié avec 0,5% d'agar.

3.1.2 – Influence de la densité cellulaire de l'inoculum.

La motilité de type « swarming » est intimement reliée au QS et à la densité cellulaire chez *P. aeruginosa* (Daniels *et al.*, 2004). Afin de vérifier si la densité cellulaire de l'inoculum influence le « swarming », des géloses ont été inoculées avec 5 μ L de cultures bactériennes ayant atteints différentes DO_(600 nm) (Fig. 15).

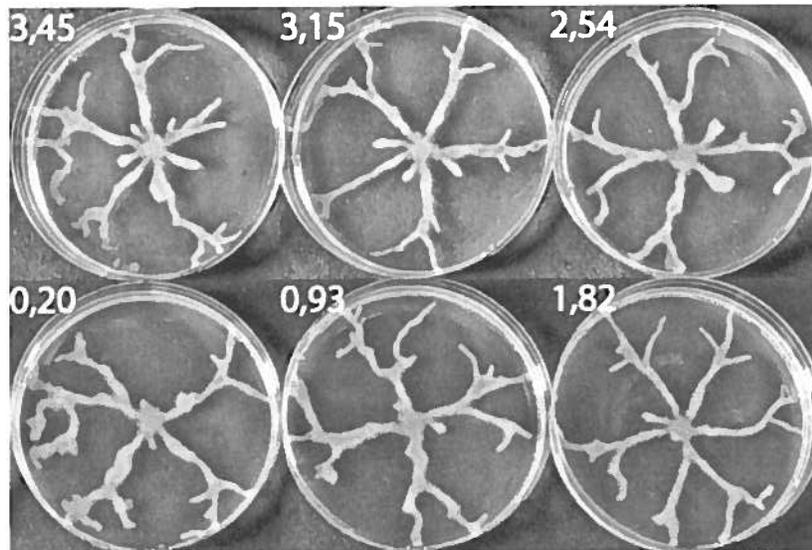


Figure 15. Influence de la DO de l'inoculum sur le « swarming ».

Chaque gélose représente un quadruplicata de gélose « swarming » inoculées avec une culture bactérienne de DO correspondante.

Les phénotypes de « swarming », la quantité de biomasse produite ainsi que le degré de ramification des dendrites étaient essentiellement identiques d'une gélose à l'autre malgré la différence de la densité de l'inoculum (Fig. 15). Ces résultats montrent que pour un même volume d'inoculum (5 μ L), la quantité et le stade de croissance des bactéries déposées lors de l'inoculation n'affectent pas le « swarming » dans les conditions testées.

3.1.3 - Influence de différentes sources d'azote.

Il a été rapporté qu'un milieu « swarming » contenant du NH_4Cl comme unique source d'azote inhibait le « swarming », mais favorisait une haute production de

biomasse en milieu liquide (Déziel *et al.*, 2003). Un milieu de culture contenant du NaNO_3 comme unique source d'azote était plus adéquat pour supporter le « swarming », mais entraînait la production d'une biomasse plus faible (Déziel *et al.*, 2003). Afin d'éclaircir les effets de ces deux sources d'azotes sur le « swarming », des gélases « swarming » contenant différentes concentrations de NH_4Cl ou de NaNO_3 ont été préparées (Fig. 16).

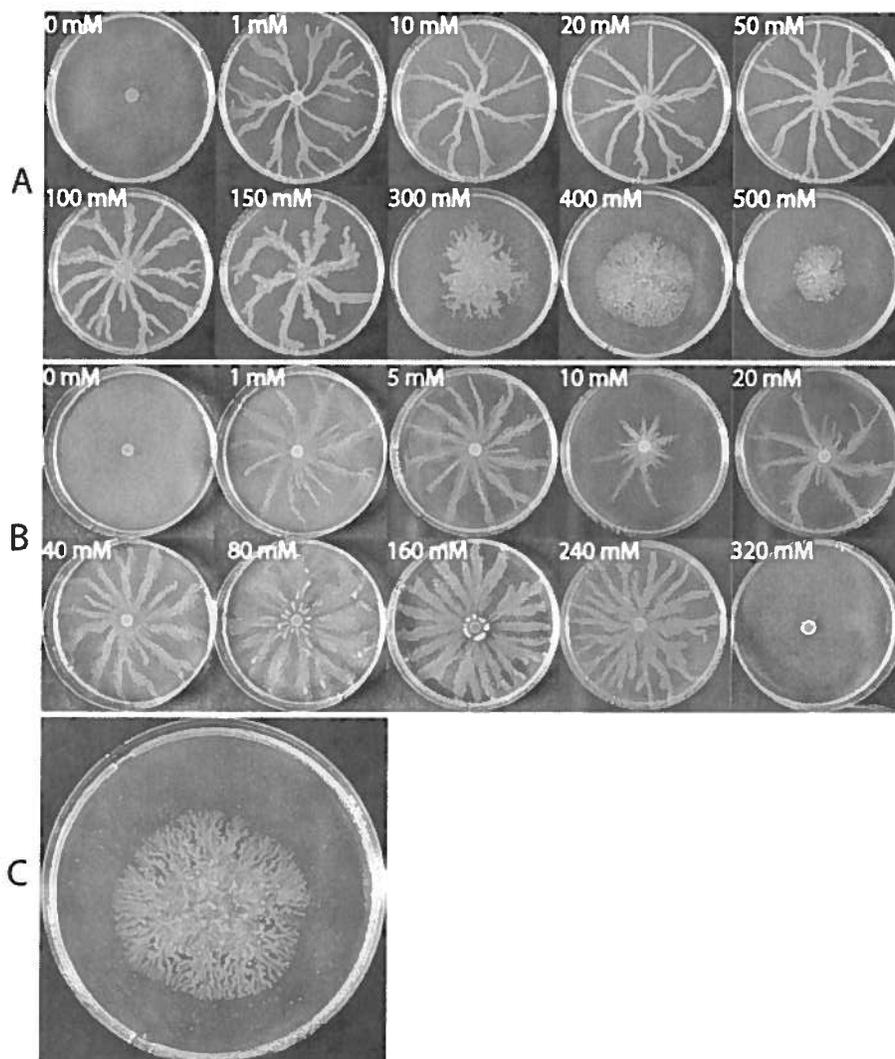


Figure 16. Effet de différentes concentrations d'azote sur le phénotype de « swarming ».

Le A) NH_4Cl ou B) NaNO_3 en tant que seule source d'azote, affectent le phénotype « swarming » selon la concentration. C) « Micro-dendrites » obtenues avec une concentration de 400 mM de NH_4Cl .

Les résultats présentés à la figure 16 montrent que le NH_4Cl et le NaNO_3 induisent des phénotypes « swarming » différents selon leur concentration. Quoique le « swarming » soit semblable selon la source d'azote, le NaNO_3 cause la formation de dendrites légèrement plus courbées et larges que le NH_4Cl .

Les différentes concentrations de NaNO_3 (Fig. 16B) induisent un phénotype « swarming » semblable peu importe la concentration, sauf pour celle de 320 mM qui n'engendre aucune ramification et aucun étalement de la colonie centrale

Pour ce qui est du NH_4Cl , le phénotype apparent est le même pour les concentrations 1 mM à 150 mM. Cependant, à 100 mM et 150 mM, les dendrites formées semblent plus consistantes ou plus épaisses. Les concentrations de NH_4Cl allant de 300 mM à 500 mM entraînent la formation de « micro-dendrites » extrêmement ramifiées comparativement au témoin (10 mM). La figure 16C montre en gros plan les « micro-dendrites ». À une concentration de NH_4Cl de 500 mM, la colonie s'étend sur une surface significativement moindre qu'à chacune des autres concentrations.

Aussi, comme attendu, l'absence d'azote (0 mM) au milieu ne permet pas la motilité de type « swarming » (Fig. 16A et 16B).

3.1.4 - Influence de différentes sources de Carbone.

Tel que décrit dans la section Méthodologie, la source de carbone utilisée dans les géloses « swarming » est le dextrose à une concentration de 11 mM. D'autres sources de carbone ont été mises à l'essai afin de déterminer quels sont leurs effets sur le « swarming ». Les sources de carbone choisies pour être testées en plus du dextrose (Fig. 17), sont le fructose (Fig. 18), le sucrose (Fig. 19) qui n'est pas assimilable par *P. aeruginosa* (Bergey *et al.*, 2001), et le citrate de sodium (Fig. 20).

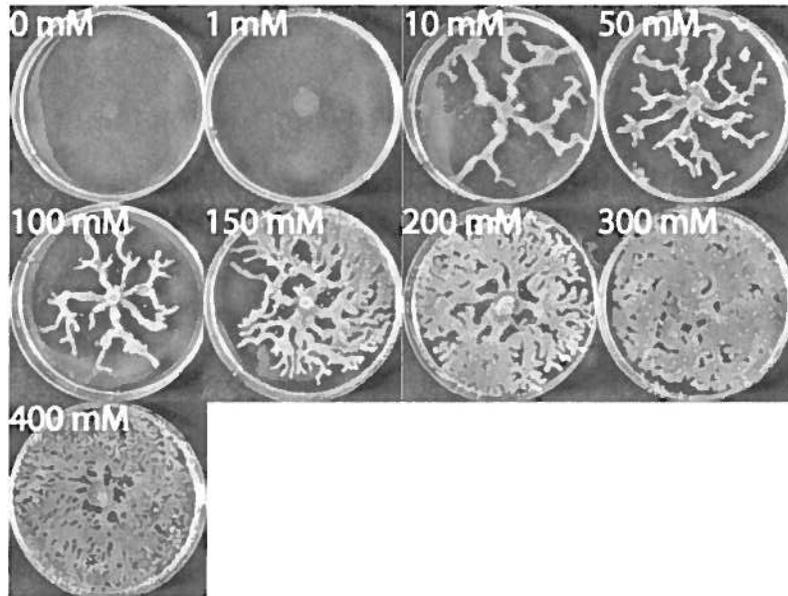


Figure 17. Effet de différentes concentrations de dextrose sur le « swarming ».

La concentration minimale de dextrose requise pour induire du « swarming » est de 10 mM (Fig. 17). Plus la concentration en dextrose augmente, plus la colonie en « swarming » présente des ramifications importantes, plus elle recouvre de surface et plus la biomasse semble élevée.

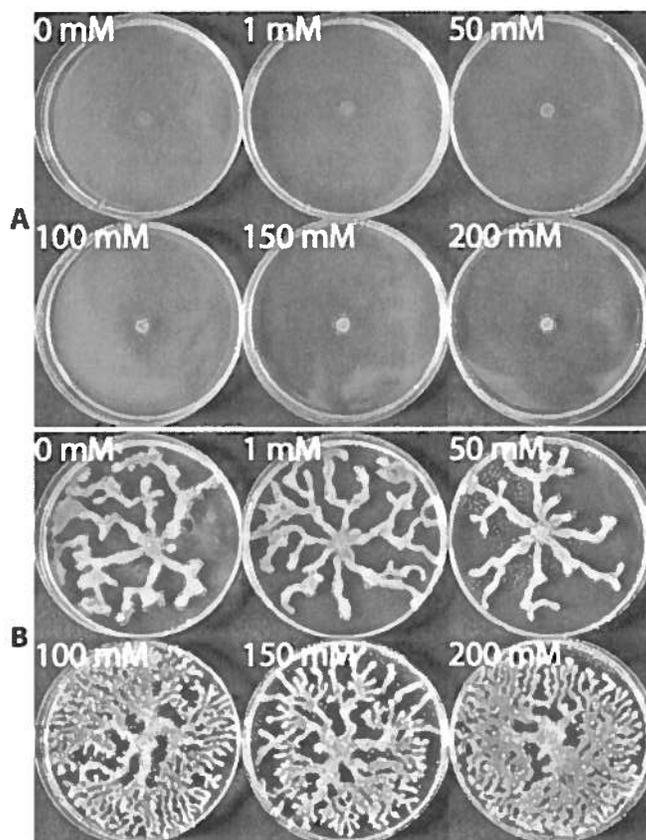


Figure 18. Influences du fructose sur la motilité de type « swarming ».

Géloses « swarming » avec comme source de carbone, A) du fructose et B) du fructose et du dextrose.

Le fructose comme source de carbone unique au milieu « swarming » (Fig. 18A) est incapable de supporter ce type de motilité et produit une biomasse très faible, même lorsque la concentration de fructose est élevée (150 mM et 200 mM), comme en témoigne l'absence de ramification et de migration des colonies. Le milieu « swarming » avec 11 mM de dextrose comme source de carbone, mais supplémenté avec du fructose (Fig. 18B), induit la formation de dendrites bien définies. Plus la concentration de fructose est élevée, plus les dendrites sont ramifiées. Ces résultats montrent qu'il y a augmentation des ramifications, de la biomasse et de l'étalement des colonies en « swarming » sur les géloses où il y a des concentrations élevées de fructose et qui contiennent aussi du dextrose (Fig. 18B).

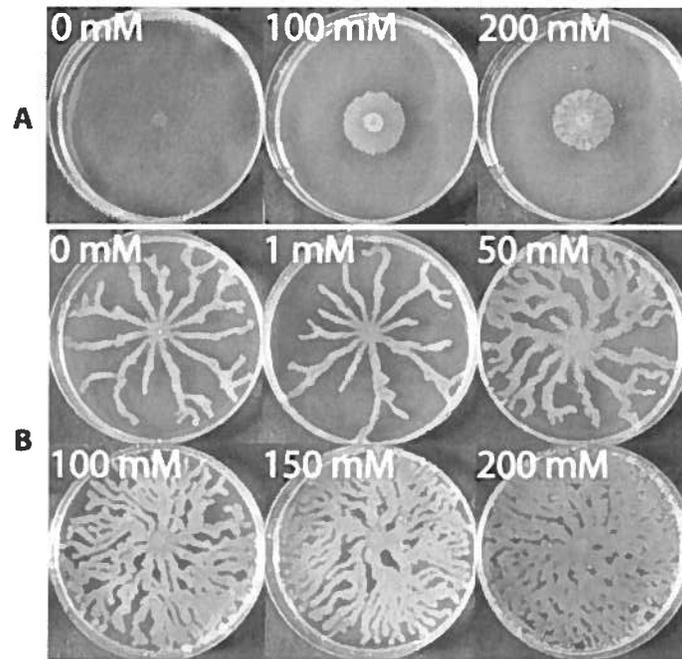


Figure 19. Influence du sucrose sur la motilité de type « swarming ».

Géloses « swarming » avec comme source de carbone, A) du sucrose et B) du sucrose et du dextrose.

Le sucrose comme unique source de carbone n'induit pas de dendrites définies et n'entraîne qu'un étalement mineur et une faible production de biomasse de la colonie en « swarming » (Fig. 19). Lorsque les géloses contiennent du sucrose et du dextrose (Fig. 19), les ramifications ont tendance à être plus importantes, couvrant la totalité la surface disponible, maximisant la production de biomasse.

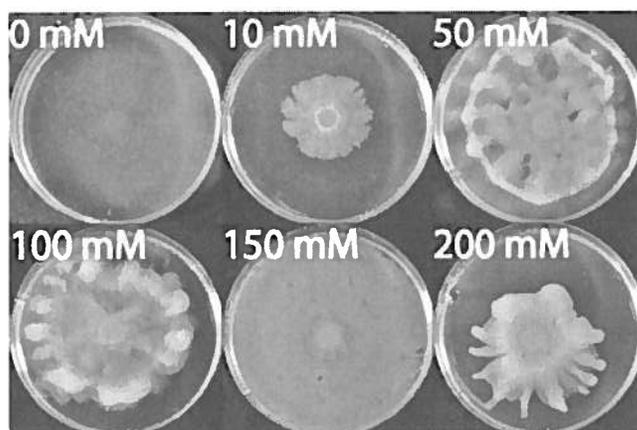


Figure 20. Influence du citrate de sodium sur la motilité de type « swarming ».
Géloses « swarming » contenant du citrate de sodium comme unique source de carbone.

Contrairement aux autres sources de carbone testées, le citrate de sodium n'entraîne pas la formation de dendrites bien définies (Fig. 20). Une concentration de 10 mM de citrate de sodium induit la formation d'une biomasse apparente plus faible que lorsque la source de carbone est du dextrose (Fig. 14). Cependant à des concentrations plus élevées (50 mM à 200 mM), le citrate de sodium semble permettre la production d'une quantité de biomasse plus élevée que celle produite lorsque le dextrose est la seule source de carbone (Fig. 20).

3.1.5 - Influence de l'osmolarité.

Les résultats décrits dans la section précédente (3.1.4) ont suggéré la possibilité que l'hyperramification des dendrites ainsi que la maximisation de l'étalement et de la quantité de biomasse des colonies en « swarming » ne soient pas causées par une augmentation de la quantité totale de carbone dans le milieu nutritionnel, mais plutôt par une augmentation du niveau de l'osmolarité des géloses. En effet, les figures 18 et 19 montrent clairement que le fructose et le sucrose comme seules sources de carbone dans le milieu « swarming » ne parviennent pas à déclencher le « swarming », mais que lorsque jumelé à du dextrose, provoquent une maximisation 1) des ramifications, 2) de l'étalement de la colonie en « swarming » et 3) de la biomasse. Afin de vérifier si l'augmentation de l'osmolarité du milieu « swarming » pourrait être responsable de ces

trois phénotypes, des géloses « swarming » M9D avec différentes concentrations de KCl (Fig. 21A) et de NaCl (Fig. 21B) ont été préparées et testées pour le « swarming ».

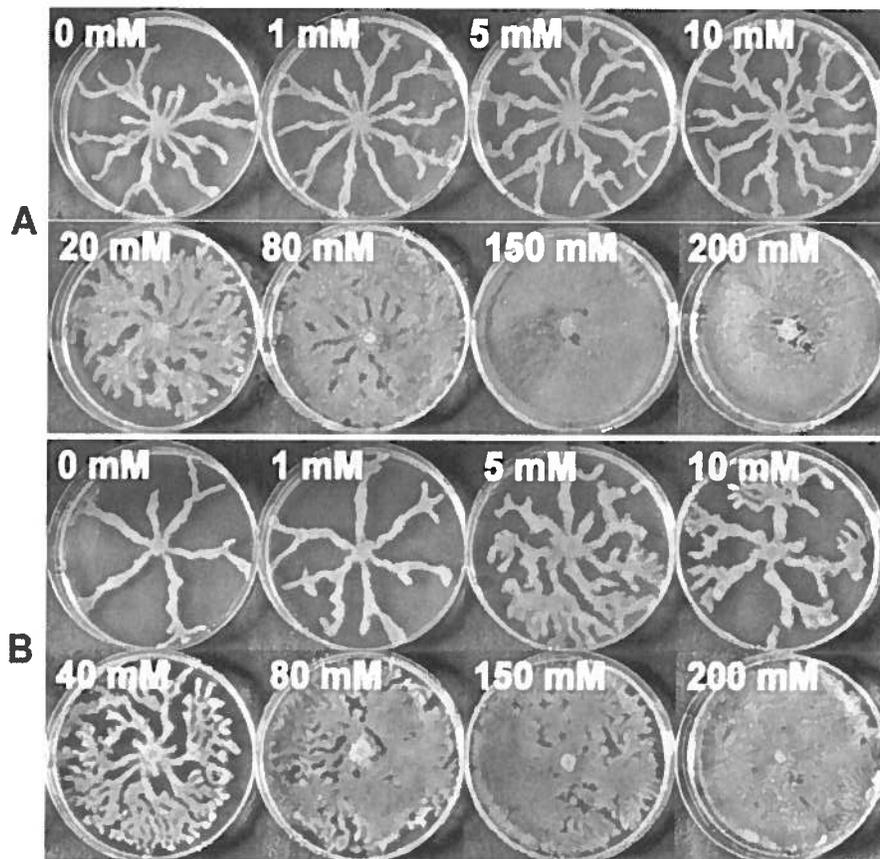


Figure 21. Influences de différentes concentrations A) de KCl et B) de NaCl sur la motilité de type « swarming ».

Les résultats de la figure 21 montrent une corrélation entre la concentration de KCl (Fig. 21A) ou de NaCl (Fig. 21B) et l'hyperramification des dendrites, la maximisation de l'étalement des colonies en « swarming » et leur production de biomasse apparente. Pour le KCl et le NaCl, le nombre de ramification augmente de manière constante de 0 mM à 200 mM. Ces résultats appuient l'hypothèse qu'une osmolarité élevée entraîne l'hyperramification des dendrites, une augmentation de la biomasse et une maximisation de l'étalement des colonies en « swarming ».

3.1.6 - Influence de différents métaux sur la motilité de type « swarming ».

Déziel et collègues (2003) ont rapporté qu'une augmentation du fer en concentration trace (1 à 10 μM) restreint la motilité de type « swarming ». Paradoxalement, l'ajout de ces mêmes concentrations de fer à un milieu liquide favorise la croissance des cellules. Cependant, les géloses « swarming » dans cette étude étaient constituées du milieu riche NBD. Dans le but d'observer plus en détail les effets du fer et de déterminer si d'autres métaux ont un effet sur le « swarming », des essais ont été effectués avec des géloses « swarming » contenant différentes concentrations de fer, cobalt, zinc, et de cuivre (Fig. 22).

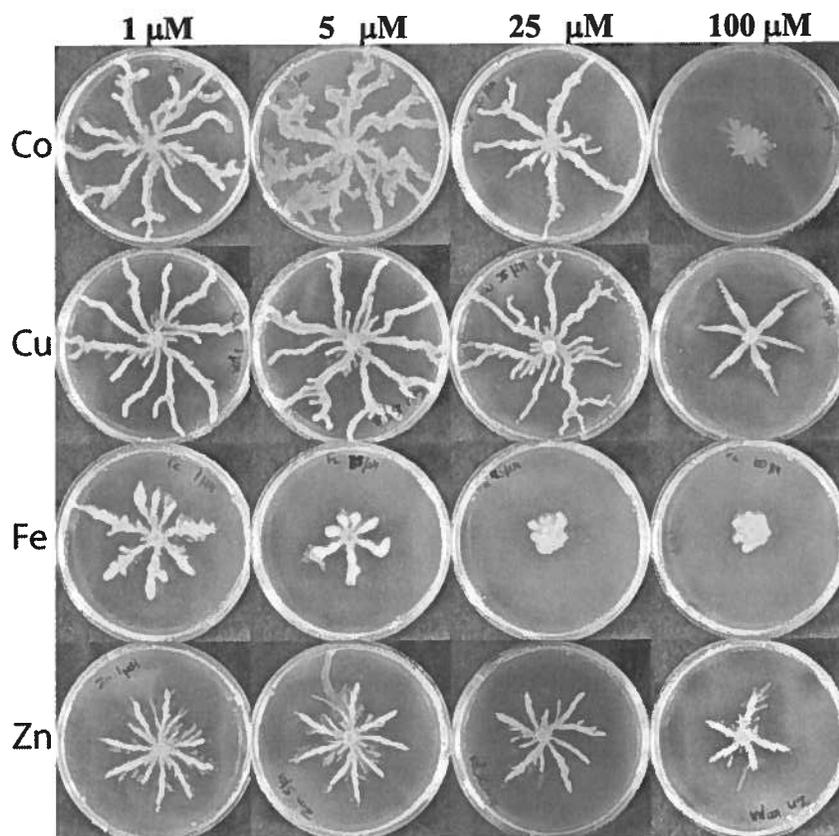


Figure 22. L'influence de différentes concentrations de cobalt, cuivre, fer et zinc sur la motilité de type « swarming ».

À une concentration de 100 μM , tous les métaux semblent inhiber ou diminuer l'expression du « swarming » par rapport à la concentration 1 μM . Parmi tous les métaux

testés, le fer (peu importe la concentration) est celui qui inhibe le plus le « swarming » comme le montre la formation de ramifications courtes et peu nombreuses. Le zinc semble avoir un effet inhibiteur constant peu importe la concentration utilisée. Outre la concentration de 100 μM , le cobalt semble aussi inhiber le « swarming » à une concentration de 25 μM , avec des dendrites moins nombreuses qu'aux concentrations de 1 et 5 μM .

3.1.7 - Influence du pH sur la motilité de type « swarming ».

La valeur du pH du milieu « swarming » M9D est d'environ 6,5. Afin de déterminer quels sont les effets sur le « swarming » de valeurs de pH supérieures ou inférieures à la normale, des géloses « swarming » ont été préparées avec le même protocole qu'à l'habitude, mais en faisant varier le pH pour obtenir des valeurs de 5, 6, 7, 8 et 9 (Fig. 23).

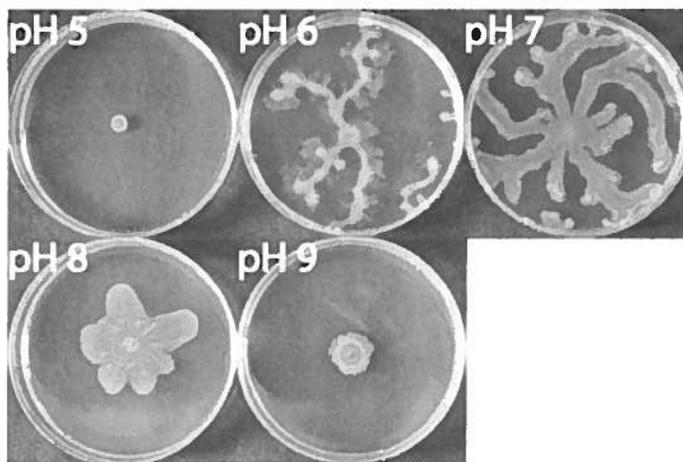


Figure 23. Le pH affecte la motilité de type « swarming ».

À une valeur de pH de 5, le « swarming » est intensément inhibé. La colonie formée n'a produit aucun dendrite, n'a pas migré et seule une petite colonie circulaire est visible. À pH 6, le phénotype de « swarming » ressemble sensiblement à celui qui est normalement observé à pH 6,5 (Fig. 14). Cependant, le nombre de dendrites est relativement faible. À pH 7, il y a plus de dendrites formées et celles-ci sont beaucoup plus larges que celles observées à pH 6. À pH 8, la colonie en « swarming » n'a pas produit de véritables dendrites, mais plutôt de grosses excroissances qui ont migrés sur

une faible distance comparée aux colonies « swarming » des valeurs de pH 6 et 7. Finalement, une valeur de pH 9 empêche la formation de dendrites. Cependant, de toutes petites excroissances dentelées sont visibles tout autour de la colonie.

3.1.8 - Influence de conditions dénitrifiantes sur le « swarming ».

P. aeruginosa possède la faculté de croître en absence d'O₂. Afin de déterminer si le « swarming » peut avoir lieu en absence d'oxygène, deux séries de géloses « swarming » contenant différentes concentrations de NaNO₃ comme seule source d'azote ont été incubées en conditions aérobiques et anoxiques (Fig. 24). Le NaNO₃ a été utilisé comme source d'azote dans le but de fournir du nitrate comme accepteur d'électron à la respiration cellulaire. Les observations de la figure 24 montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre la motilité de type « swarming » en conditions dénitrifiantes et non-dénitrifiantes.

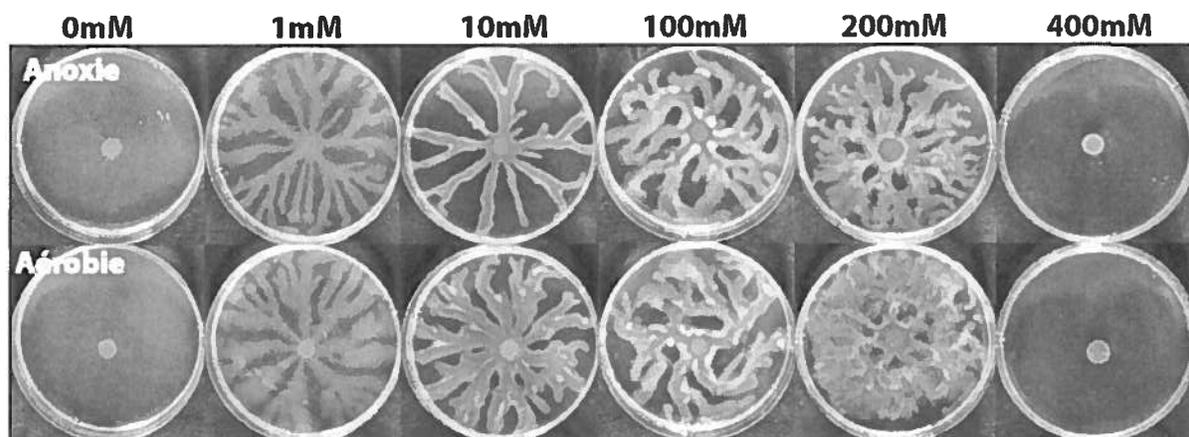


Figure 24. Des conditions anoxiques n'ont pas d'effets sur la motilité de type « swarming ».

3.1.9 – Optimisation des géloses « swarming ».

Toutes les expériences rapportées ci-haut ont été effectuées avec des géloses « swarming » constituées de milieu M9D solidifié avec 0,5% d'agar. Aussi, les observations présentées représentent l'état du « swarming » après 48 heures d'incubation. Dans la littérature, les géloses « swarming » sont parfois supplémentée avec 0,5 % de « casamino acids™ » (CAA), soit de la caséine hydrolysée à l'acide, c.-à-d. une source

d'acides aminés. Plusieurs concentrations de CAA ont été ajoutées à des géloses « swarming » M9D dans le but d'en observer les effets et d'améliorer notre méthode de préparation des géloses (Fig. 25).

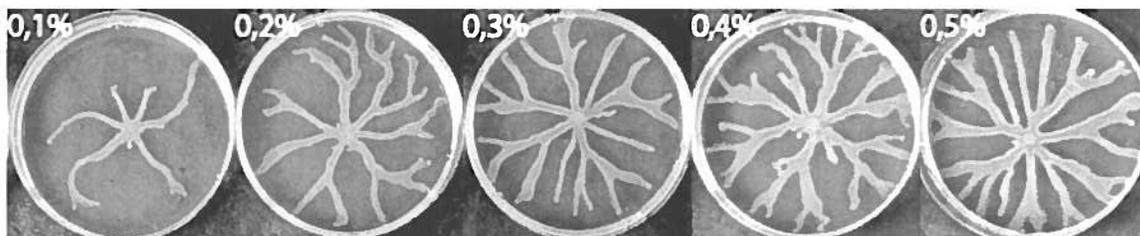


Figure 25. L'influence de différentes concentrations de CAA sur la motilité de type « swarming ». Observations prises 16 heures après l'incubation.

L'ajout de CAA au milieu « swarming » déclenche la motilité de type « swarming » beaucoup rapidement qu'en milieu « swarming » sans CAA (Fig. 25). En effet, après seulement 16 heures, les géloses contenant des CAA induisent un phénotype de « swarming » très robuste et reproductible avec des dendrites bien définies contenant beaucoup de biomasse comparée à un milieu M9D sans CAA (Fig. 14). Les bactéries sur géloses contenant 0,1% de CAA affichent un phénotype de « swarming » moins robuste que celles aux concentrations supérieures.

Généralement, les essais de motilité « swarming » ont été effectués en quadruplicata, à cause d'un niveau de reproductibilité d'environ 70%. Avec l'ajout de CAA dans le milieu « swarming » M9D, le taux de reproductibilité augmente à 90%.

3.2 – Mutagenèse par transposition et gènes impliqués dans la motilité de type

« swarming ».

Les gènes régulant le « swarming » chez *P. aeruginosa* sont largement inconnus. La souche de *P. aeruginosa* utilisée dans mes travaux est la souche clinique PA14. Cette souche possède 392 gènes de plus que la souche de laboratoire PAO1 (Liberati *et al.*, 2006) qui est incapable de motilité de type « swarming ». Le « swarming » est un phénomène complexe qui nécessite plusieurs gènes pour être fonctionnel. Dans le but d'initier l'identification des gènes impliqués dans le swarming, une banque d'environ 10 000 mutants par insertion du transposon IS*lacZ*/hah a été générée. Près de la moitié de ces transposants ont été criblés dans le but de trouver des défauts dans le « swarming ». C'est ainsi qu'un total de 76 transposants a été trouvé comme étant affectés ou inhibés dans la motilité de type « swarming ».

L'obtention de l'identité des gènes impliqués dans le « swarming » est le résultat final d'un long processus qui a impliqué 1) la génération d'une banque de transposants, 2) le criblage de ces transposants, 3) l'amplification de la région dans laquelle un transposon était inséré parmi les transposants sélectionnés, 4) le séquençage de ces régions et 5) leur identification à l'aide d'une base de données contenant le génome annoté de PA14.

Il est à noter que pour toutes les expériences qui suivent, le milieu « swarming » utilisé était supplémenté avec 0,5% de CAA (ou M9DCAA) tel que décrit dans la méthodologie sous la rubrique milieu « swarming » optimisé.

3.2.1 – Génération d'une banque de transposants.

Le protocole de génération de mutants par transposition est expliqué en détails dans la section méthodologie. Brièvement, une souche de *E. coli* possédant un plasmide contenant un transposon IS*lacZ*/hah dans lequel se trouve entre autre un gène de résistance à la tétracycline et un rapporteur *lacZ* a été mis en co-culture 16 heures avec une culture de *P. aeruginosa* PA14. Le plasmide contenant le transposon est construit de manière à ce que l'unique transposon ne soit inséré dans le gène cible (*P. aeruginosa* ou *E. coli*) qu'une seule fois. La culture bactérienne résultante (ou conjuguants) contenait des

transposants à la fois de *P. aeruginosa* et de *E. coli*. Les conjuguants obtenus ont été aliquotés puis conservés à -80°C.

Pour être efficace, le robot repiqueur de colonies devait être utilisé avec des géloses où le nombre de colonies n'était ni trop élevé, ni trop faible. En plus, les colonies devaient être suffisamment espacées les unes par rapport aux autres et avoir une biomasse suffisamment élevée pour être détectable par le robot. Tous ces paramètres font en sorte que plusieurs dilutions des aliquots congelés ont dû être testés afin d'obtenir la dilution optimale permettant d'obtenir des géloses adéquates pour le robot. Aussi, plusieurs températures d'incubation avec plusieurs concentrations d'antibiotiques différentes (afin de ne sélectionner que les colonies de *P. aeruginosa*) ont été testées avec les géloses de sélection, ces deux facteurs affectant la morphologie des colonies.

Une fois les paramètres optimaux déterminés, des centaines de géloses contenant chacune près d'une centaine de colonies de *P. aeruginosa* ont été générées, puis passées au robot repiqueur de colonies. Environ 80% des colonies de chaque gélose ont été repiquées dans des plaques de 96 puits. La raison pour laquelle 80% (et non 100%) des colonies seulement ont été repiquées est que malgré que la majorité des colonies étaient toutes bien espacées, de diamètre adéquat et de forme ronde, il y avait toujours une minorité de colonies de diamètre trop grand, ou de forme non-circulaire ne respectant pas les critères de sélection du robot. De plus, certaines colonies pouvaient se situer sur les rebords des boîtes de Petri, rendant difficile leur accessibilité par le robot.

Au total, 104 plaques de 96 puits ont été obtenues. Considérant que chacun des puits contient un transposant, c'est un total de 9984 transposants potentiels qui a été obtenu. Cependant, il faut considérer qu'environ un à deux transposants par plaque de 96 puits ne parvenait pas à croître. Aucune donnée n'a été conservée à cet égard, mais il est possible de déduire que le nombre total de transposants s'en trouve quelque peu diminué.

Finalement, au cours du repiquage par le robot, en moyenne une colonie par gélose de sélection présentait un diamètre très élevé par rapport aux autres colonies et ne pouvait être repiquée par le robot, qui par mesure de sécurité, refuse de sélectionner les colonies trop étendues. Ces colonies ont été sélectionnées à la main puis repiquées dans une plaque de 96 puits.

3.2.2 – Criblage des transposants affectés dans la motilité de type « swarming ».

Une fois la banque de transposants dûment complétée, celle-ci a été criblée afin de déterminer lesquels parmi ceux-ci sont affectés dans la motilité de type « swarming ». Les détails du criblage sont expliqués en détail dans la section Méthodologie. Brièvement, des transposants contenus dans une plaque de 96 puits congelée à -80°C ont été mis en culture pour la nuit en piquant dans la glace de cette plaque à l'aide de la fonction « repiquage » du robot piqueur de colonies ou à l'aide d'un embout de pipette en plastique si le nombre de transposants à repiquer était faible. Le lendemain, chacun des transposants mis en culture ont été inoculés sur une gélose carrée de grande dimension (30 cm x 30 cm) contenant du milieu « swarming » M9DCAA. Chaque gélose pouvait contenir 11 transposants plus un témoin, soit la souche sauvage. C'est ainsi qu'effectuer le criblage d'une seule plaque de 96 transposants nécessitait neuf grandes géloses carrées.

Un transposant était considéré comme étant affecté dans la motilité de type « swarming » lorsque son phénotype était jugé passablement différent de celui exhibé par la colonie témoin. Ainsi, parmi les transposants sélectionnés, certains ne faisaient pas de « swarming », ne formant qu'une colonie circulaire au lieu d'inoculation alors que d'autres faisaient encore du « swarming », mais de phénotype différent de celui de la souche sauvage. Par exemple, la souche sauvage, avec le milieu M9DCAA exhibe un phénotype de « swarming » constant hautement reproductible avec des ramifications typiques tel qu'illustré à la figure 25. Dès qu'un transposant présentait des dendrites montrant une morphologie différente de quelque façon que ce soit de celle de la souche sauvage, il était considéré comme étant affecté dans la motilité de type « swarming ». Un exemple de gélose de criblage est illustré à la figure 26. Les transposants ainsi sélectionnés ont ensuite été confirmés en les inoculant seuls de manière isolée sur des géloses « swarming » M9DCAA. Cette étape était nécessaire, car lorsque les transposants étaient inoculés sur des géloses de criblage, ils n'avaient pas nécessairement la même $DO_{(600nm)}$, car l'inoculum provenait d'une culture de 16h d'un des 96 puits d'une microplaque. Aussi, des transposants inoculés sur une même gélose pouvaient interférer sur le « swarming » des autres transposants en étendant leurs dendrites les uns vers les autres et possiblement en produisant des signaux extracellulaires (e.g. signaux de QS). Il a en effet été démontré que lorsque deux dendrites en « swarming » de *P. aeruginosa*

s'approchent l'un de l'autre, ils dévient de trajectoires de manière à s'éviter (Caiazza *et al.*, 2005).

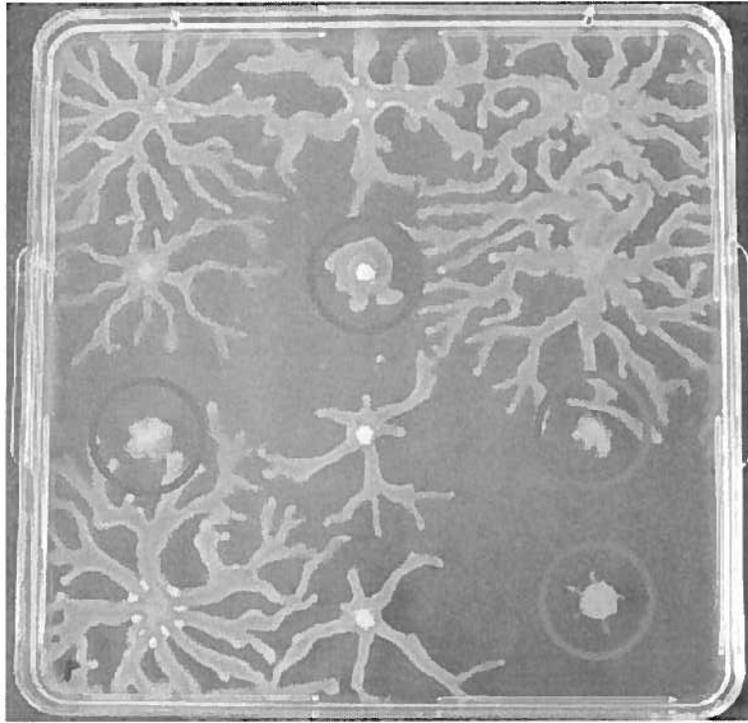


Figure 26. Gélose de criblage « swarming ».

Exemple de transposants sélectionnés (cercle rouge) pour leur défaut dans la motilité de type « swarming ». La colonie témoin se situe dans le coin supérieur gauche.

Il est important de mentionner que les premiers transposants criblés sont ceux qui formaient des colonies au diamètre élevé tel qu'expliqué ci-haut. C'est parmi ce groupe que le plus grand nombre de transposants affectés dans la motilité de type « swarming ont été obtenus. En effet, 31 des 57 transposants de large diamètre manuellement sélectionnés (car ils n'avaient pas été sélectionnés et repiqués par le robot) présentaient un défaut quelconque dans la motilité « swarming ». Parallèlement au criblage que j'ai effectué, ma collègue Sandrai Lai effectuait également un criblage de la banque de transposants en cherchant, par contre, des bactéries non-affectées dans la motilité de type « swarming », mais affectées dans la résistance aux antibiotiques. Sa méthode de criblage était quasi identique à la mienne et c'est ainsi que tout en criblant pour le phénotype qu'elle cherchait, elle a aussi mis en évidence 36 transposants affectés dans la motilité de type

« swarming » sur un total d'environ 3840 transposants criblés. Au total, cela donne un total de 0,9375% de transposants ayant un défaut dans le « swarming ».

Tout le processus de génération de notre banque de transposants s'est effectué dans des conditions stériles. Cependant, malgré la vigilance avec laquelle les manipulations se sont effectuées, il y avait toujours un risque de contamination croisée entre deux cultures de transposants, surtout lors de manipulations des plaques de 96 puits contenant les transposants. Pour confirmer que chaque transposant défectueux dans le « swarming » n'a pas été contaminé avec un autre transposant, des cultures liquides de chacun d'eux ont été étalées par épuisement afin d'obtenir des colonies bien isolées les unes des autres (gélouses de confirmation; section 2.2.2.2). En moyenne trois de ces colonies ont été repiquées dans du milieu liquide, puis retestées pour le « swarming ». Lorsque le phénotype de « swarming » était semblable à celui observé avant la « purification », le transposant était considéré comme étant pur et donc conservé. Cette étape s'est avérée essentielle, car quelques uns des transposants sélectionnés ont effectivement été contaminés avec un autre transposant. Au total, 76 transposants défectueux dans le « swarming » ont été conservés. Parmi ces 76 transposants, il y avait 67 gènes différents, quelques transposants ayant quelquefois une insertion dans un même gène ou dans une région intergénique.

3.2.3 – Caractérisation des transposants.

Le défaut dans le « swarming » observé chez certains transposants peut être la conséquence d'une insertion dans un gène impliqué dans le métabolisme cellulaire. L'inactivation d'un tel gène pourrait affecter des fonctions cellulaires reliées à la croissance de la bactérie, affectant indirectement le « swarming ». Des courbes de croissances en milieu riche TSB ont été effectuées pour quelques transposants faisant du « swarming » peu robuste et pour tous ceux inhibés dans le « swarming ». Aucun des transposants ne présentait de défaut majeur dans la croissance; ceux qui étaient le plus affectés avaient une DO_{600nm} de 80% de la souche sauvage après 8 h d'incubation. Aussi, il est bien établi que le « swarming » nécessite un flagelle fonctionnel. Afin de vérifier la bonne fonctionnalité du flagelle, des tests de motilité « swimming » ont été effectués pour tous les transposants. Ces deux tests ont permis de déterminer le pourcentage de

motilité « swimming » et de croissance en milieu liquide de chaque transposants par rapport à la souche sauvage PA14 (Tableau XI, appendice F). Lors des tests de motilité « swimming », la présence d'une zone circulaire translucide (ou zone mouillée) autour d'une majorité de transposants a pu être observée et notée (Tableau XI, appendice F). Cependant, cette zone était absente chez les transposants complètement inhibés dans le « swarming ». La composition de cette zone est inconnue, mais pourrait possiblement être produite par les rhamnolipides.

3.2.4 – Amplification des gènes dans lequel un transposon est inséré.

Afin d'identifier le site d'insertion des transposons, des cultures liquide des transposants sélectionnés ont été effectuées dans le but d'en extraire l'ADN tel qu'expliqué dans la section Méthodologie. Une fois cela accompli, une réaction PCR imbriquée a été effectuée. Brièvement, cette réaction de PCR en deux étapes permet d'amplifier la partie terminale du transposon à l'aide d'une amorce spécifique jusqu'à une partie de longueur variable de la séquence d'ADN se trouvant immédiatement contiguë au site d'insertion du transposon à l'aide de plusieurs amorces arbitraires (Fig. 12).

Une fois les deux rondes de réactions PCR effectuées, celles-ci étaient vérifiées sur gel d'agarose afin de confirmer la présence de produits PCR et d'évaluer la longueur relative des fragments générés. La figure 27 illustre un gel coloré au bromure d'éthidium contenant des produits PCR typiques de la réaction décrite.

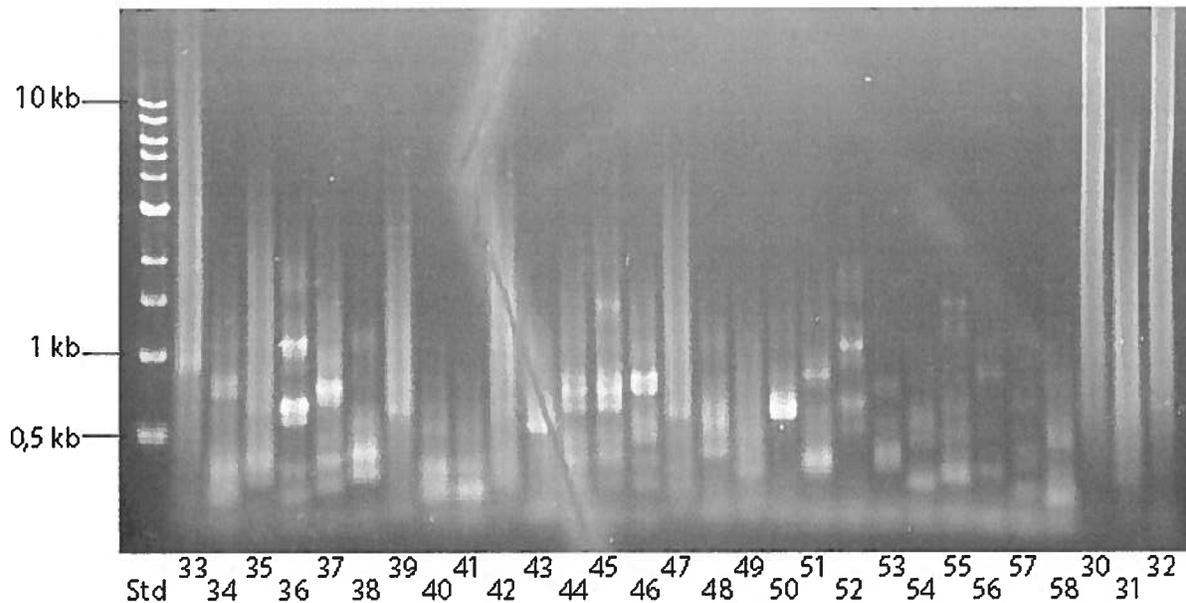


Figure 27. Exemple de produits PCR obtenus par la réaction PCR arbitraires en deux rondes.

Gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium chargé avec 5 μ L de produit de la réaction PCR de ronde 2.

Ces produits PCR ont un poids de moins de 1 kpb et contiennent plusieurs fragments de différentes longueurs. Ceci est dû au fait que la première ronde de la réaction s'est effectuée à l'aide d'une amorce spécifique au transposon et avec trois amorces arbitraires différentes. Ces amorces peuvent se lier à peu près à n'importe quel endroit sur le génome. Cela a comme conséquence que la plupart des produits amplifiés sont le produit d'une amorce spécifique et d'une des trois amorces arbitraires, ce qui résulte en des fragments d'ADN de différentes longueurs. Il est également possible qu'il y ait eu formation de produits PCR obtenus à partir de deux amorces arbitraires. Cependant, de tels produits n'ont pas été retenus dans le processus de séquençage qui utilise une amorce spécifique au transposon, ce qui signifie que seuls les produits PCR contenant l'extrémité du transposon ont été séquencés.

3.2.5 – Séquençage et analyse des produits PCR obtenus.

Les produits des réactions PCR ont été séquencés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. Le logiciel ChromasTM a été employé pour lire les

séquences obtenues. Pour chacune des séquences analysées, il y avait environ 120 nucléotides représentant l'extrémité du transposon, suivi d'une longueur variable de nucléotides correspondant à la séquence génomique amplifiée directement adjacente au site d'insertion du transposon (Fig. 28). C'est cette région qui a été interrompue par le transposon et qui par conséquent a modifié ou inhibé la motilité « swarming ». Le site d'insertion du transposon pour chacun des transposants est présenté dans l'annexe à l'appendice F.

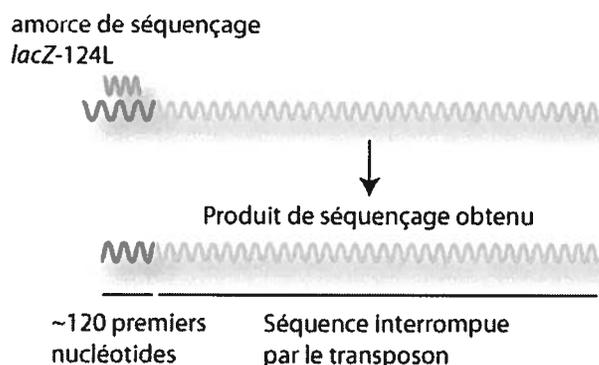


Figure 28. Schéma de produit de séquençage typique obtenu.

L'amorce de séquençage *lacZ-124L* permet d'amplifier environ 120 nucléotides de la partie terminale du transposon conjointement avec la région adjacente au transposon.

3.2.6 – Identification des gènes affectés impliqués dans la motilité de type « swarming ».

Une fois corrigée, la longueur des séquences d'ADN obtenues se situait entre 50 et 400 pb. Ces séquences ont tous été comparées au génome entier de la souche PA14 à l'aide de la fonction BLASTN disponible sur le site www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2005). Étant donné que la comparaison se fait uniquement sur l'organisme (*P. aeruginosa*) dont le génome est complètement séquencé, les scores obtenus pour toutes les requêtes étaient très satisfaisants. Sur un total de 76 transposants sélectionnés, il a été impossible de déterminer avec certitude la localisation de l'insertion pour un seul transposant (Tn5-NS_MET002). Le taux de succès est donc de 98.7%. La majorité des gènes identifiés ne le sont que par leur numéro d'accèsion, par exemple PA14_12345, et ne sont pas annotés. Toutefois, la très grande majorité des gènes ont une fonction putative

suggérée. Aussi, cinq transposants avaient une insertion dans une région intergénique (ou dans un gène non prédit). Enfin, certains gènes sont annotés avec une littérature associée. Les figures 29 et 30 illustrent plusieurs catégories de gènes impliqués dans le « swarming ». Les tableaux III et IV présentent la position exacte des insertions pour chacun des transposants et les appendices F et G montrent le contexte chromosomique des gènes affectés. Le contexte insertionnel permet de visualiser quels gènes sont avoisinants à l'insertion et aussi si l'insertion affecte un seul ou plusieurs gènes, par exemple dans le cas où une insertion se trouve dans un promoteur ou un opéron polycistronique.

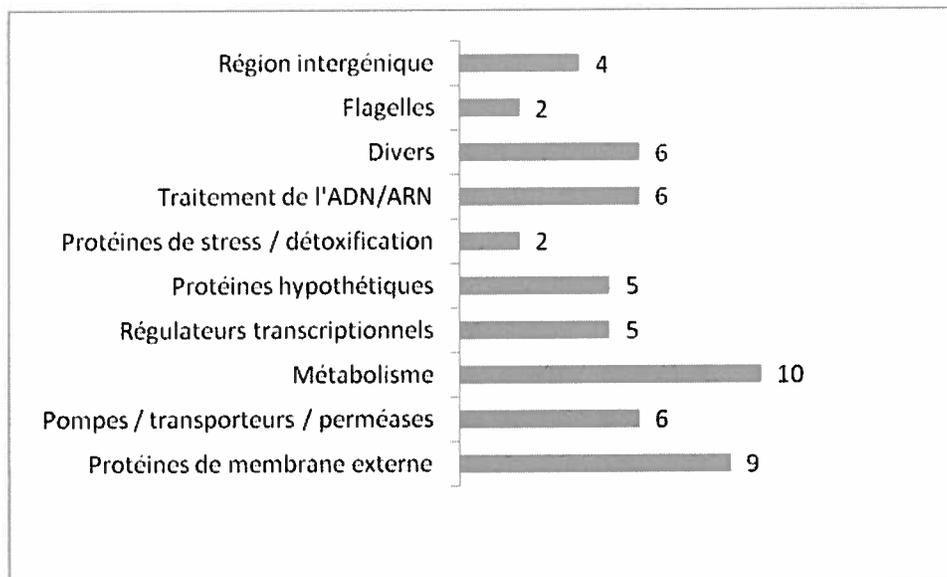


Figure 29. Résumé des différentes fonctions des gènes de transposants affectés dans le « swarming ».

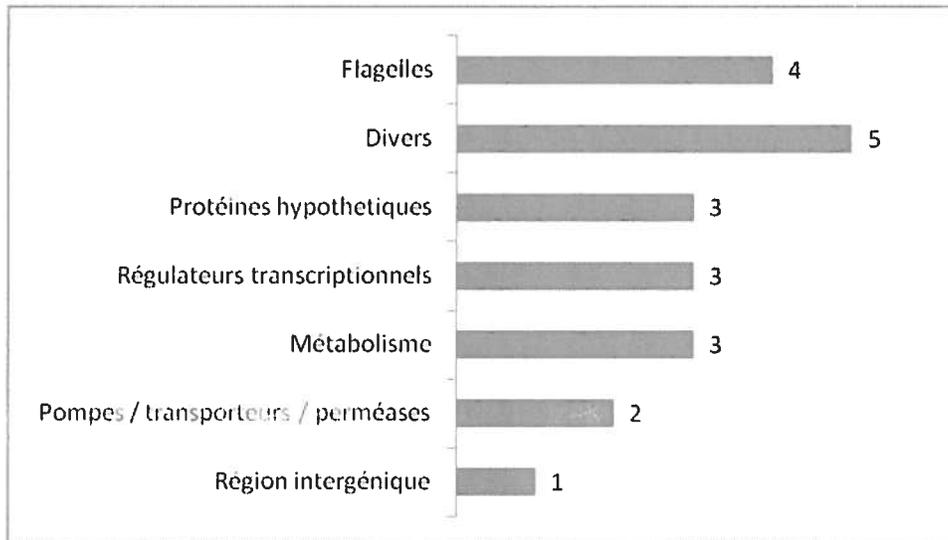


Figure 30. Résumé des différentes fonctions des gènes des transposants inhibés dans le « swarming ».

Tableau III. Caractéristiques des transposants affectés dans la motilité de type « Swarming ».

Le numéro écrit dans la colonne position insertion reflète la position dans le chromosome à laquelle le transposon est inséré. Dans la colonne position dans gène, une valeur négative signifie que le gène est sur le brin complémentaire et une valeur positive, sur le brin direct.

	Nom transposant	# gène	Nom gène	Zone mouillée	Swimming (% de PA14)	Position insertion	Position dans gène	Fonction (www.pseudomonas.com) (Winsor <i>et al.</i> , 2005)
Protéines de membrane externe	Tn5-S_OMP001	PA14_23470	<i>wbpM</i>	oui	89	2042622	1012	« nucleotide sugar epimerase/dehydratase WbpM »
	Tn5-S_OMP002	PA14_52150	<i>lpxO2</i>	oui	105	4624786	441	« lipopolysaccharide biosynthetic protein LpxO2 »
	Tn5-S_OMP003	PA14_23380	<i>orfH</i>	oui	82	2030458	1157	« UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronate dehydrogenase »
	Tn5-S_OMP004	PA14_23430	<i>ORF_I1</i>	oui	84	2037271	905	« putative heparinase »
	Tn5-S_OMP005	PA14_23430	<i>ORF_I1</i>	oui	93	2037651	1285	« putative heparinase »
	Tn5-S_OMP006	PA14_31610	<i>yjgT</i>	oui	91	2746227	-643	« putative membrane protein, TerC family »
	Tn5-S_OMP007	PA14_47540	<i>ompP1</i> ; <i>fadL</i>	oui	86	4234530	434	« putative outer membrane protein precursor »
	Tn5-S_OMP008	PA14_67065	<i>MdoH</i>	oui	86	5986931	-1308	« periplasmic glucans biosynthesis protein MdoH »
	Tn5-S_OMP009	PA14_62350	<i>phuR</i>	oui	90	5562991	1843	« putative haem/haemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR precursor »
	Pompes / transporteurs / perméases	Tn5-S_PTP001	PA14_30450		oui	105	2637061	301
Tn5-S_PTP002		PA14_07870		oui	77	679257	488	« putative binding protein component of ABC transporter »
Tn5-S_PTP003		PA14_37460		oui	93	3334355	-279	« putative permease »
Tn5-S_PTP004		PA14_41140		oui	90	3669201	287	« putative ABC transporter, permease protein »
Tn5-S_PTP005		PA14_41140		oui	55	3669293	379	« putative ABC transporter, permease protein »
Tn5-S_PTP006		PA14_09195	<i>yajR</i>	oui	88	779231	955	« probable major facilitator superfamily (MFS) transporter »
Tn5-S_PTP007		PA14_32390	<i>mexF</i>	oui	77	2817351	2623	« RND multidrug efflux transporter MexF »
Tn5-S_PTP008		PA14_57930		oui	90	5156346	268	« putative ATP-binding component of ABC transporter »

Métabolisme	Tn5-S_MET001	PA14_04630	<i>ilvD</i>	oui	107	410588	-1468	« dihydroxy-acid dehydratase »
	Tn5-S_MET002	PA14_66310	<i>aceF</i>	oui	67	5910274	-72	« dihydroliipoamide acetyltransferase »
	Tn5-S_MET003	PA14_21730	<i>fecA</i>	oui	91	1890052	980	« putative TonB-dependent receptor »
	Tn5-S_MET004	PA14_63020	<i>fir</i>	oui	95	5623602	-406	« ferric uptake regulation protein »
	Tn5-S_MET005	PA14_23070	<i>zwf</i>	oui	94	2000953	794	« glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase »
	Tn5-S_MET006	PA14_17250	<i>yaaJ</i>	oui	105	1478406	619	« putative Na ⁺ /alanine symporter »
	Tn5-S_MET007	PA14_34900		oui	102	3107516	1149	« puccinate dehydrogenase »
	Tn5-S_MET008	PA14_00060	<i>lplA</i>	oui	85	7546	-245	« putative acyltransferase »
	Tn5-S_MET009	PA14_11750		oui	105	1017918	-433	« probable acetyltransferase »
	Tn5-S_MET010	PA14_68370	<i>CysQ</i>	oui	99	6101101	-19	« 3'(2'),5'-biphosphate nucleotidase »
Régulateurs transcriptionnels	Tn5-S_TRR001	PA14_14710		oui	103	1254215	-379	« putative Rrf2 family protein »
	Tn5-S_TRR002	PA14_60860	<i>rjxB</i>	oui	84	5428351	242	« transcriptional regulatory protein NfxB »
	Tn5-S_TRR003	PA14_22550		oui	114	1962153	-239	« putative LysR-family transcriptional regulator »
	Tn5-S_TRR004	PA14_32420	<i>mexS</i>	oui	103	2820156	-182	« putative Zn-dependent oxidoreductase »
Traitement de l'ADN/ARN	Tn5-S_DNA001	PA14_36370		oui	96	3239184	1176	« putative ligase »
	Tn5-S_DNA002	PA14_54300	<i>recO</i>	oui	92	4817440	128	« DNA repair protein RecO »
	Tn5-S_DNA003	PA14_01840		oui	69	168723	-511	« putative sigma-70 factor, ECF subfamily »
	Tn5-S_DNA004	PA14_17500	<i>mutS</i>	oui	81	1501765	1719	« DNA mismatch repair protein MutS »
	Tn5-S_DNA005	PA14_05950	<i>dbpA</i>	oui	82	526954	752	« RNA helicase DbpA »
	Tn5-S_DNA006	PA14_05950	<i>dbpA</i>	oui	99	526952	754	« RNA helicase DbpA »
Protéines de stress / détoxification	Tn5-S_TOX001	PA14_27755	<i>gst</i>	oui	74	2407605	-514	« probable glutathione S-transferase »
	Tn5-S_TOX002	PA14_27450		oui	90	2383163	-98	« putative universal stress protein »
Flagelles	Tn5-S_FLA001	PA14_50110	<i>fliH</i>	oui	0	4454129	577	« probable flagell _{at} assembly protein »
	Tn5-S_FLA002	PA14_45630	<i>fliA</i>	oui	0	4059153	266	« motility sigma factor FliA »
Protéines hypothétiques	Tn5-S_HYP001	PA14_49020		oui	76	4353306	-19	« hypothetical protein »
	Tn5-S_HYP002	PA14_71840		oui	92	6399942	978	« conserved hypothetical protein »
	Tn5-S_HYP003	PA14_41760		oui	90	3728180	696	« conserved hypothetical protein »

	Tn5-S_HYP004	PA14_45400	oui	78	4044018	-1096	« conserved hypothetical protein »
	Tn5-S_HYP005	PA14_51770	oui	89	4598145	-10	« conserved hypothetical protein »
	Tn5-S_HYP006	PA14_12030	oui	49	1040124	-54	« conserved hypothetical protein »
	Tn5-S_HYP007	PA14_59440	oui	98	5292729	37	« conserved hypothetical protein »
Divers	Tn5-S_MSC001	PA14_24400	oui	88	2125972	275	« putative von Willebrand factor type A domain »
	Tn5-S_MSC002	PA14_68390	oui	88	6102464	-655	« putative hydrolase »
	Tn5-S_MSC003	PA14_30230	oui	92	2618931	-1599	« ATP-dependent ctp protease, ATP-binding subunit CtpA »
	Tn5-S_MSC004	PA14_35740	oui	92	3179455	-1948	« putative transposase »
	Tn5-S_MSC005	PA14_21110	oui	89	1825632	-1156	« non-hemolytic phospholipase C precursor »
Région intergénique	Tn5-S_INT001	Région intergénique	oui	97	2803324	N/D	L'insertion est située 103 nucléotides avant le gene PA14_32270
	Tn5-S_INT002	Région intergénique	oui	86	1961069	N/D	L'insertion est située 602 nucléotides avant le gene PA14_22540

Tableau IV. Caractéristiques des transposants inhibés dans la motilité de type « Swarming ».

Le numéro écrit dans la colonne position insertion reflète la position dans le chromosome à laquelle le transposon est inséré. Dans la colonne position dans gène, une valeur négative signifie que le gène est sur le brin complémentaire et une valeur positive, sur le brin direct.

	Nom transposant	# gène	Nom gène	Zone mouillée	Swimming (% de PA14)	Position Début	Position dans gène	Fonction (www.pseudomonas.com) (Winsor <i>et al.</i> , 2005)
Pompes / transporteurs / perméases	Tn5-NS_FTP001	PA14_02690		non	43	239103	-185	« putative amino acid permease »
	Tn5-NS_FTP002	PA14_67340	<i>codB</i>	oui	97	6014481	743	« putative permease for cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin »
Régulateurs transcriptionnels	Tn5-NS_TRR001	PA14_32420	<i>mexS</i>	non	96	2820468	-494	« putative Zn-dependent oxidoreductase »
	Tn5-NS_TRR002	PA14_32420	<i>mexS</i>	non	105	2820477	-503	« putative Zn-dependent oxidoreductase »
	Tn5-NS_TRR003	PA14_53090		oui	91	4706467	-374	« probable transcriptional regulator »
	Tn5-NS_MET001	PA14_25920	<i>cobM;</i> <i>cibF</i>	non	83	2261485	366	« precorrin-3 methylase »
Métabolisme	Tn5-NS_MET002*	PA14_15980	<i>rimM</i>	oui	0	1361549	-237	« 16S rRNA processing protein RimM »
	Tn5-NS_MET003	PA14_07700	<i>apaH</i>	oui	60	662382	597	« bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase »
Flagelles	Tn5-NS_FLA001	PA14_50270	<i>fliD</i>	oui	22	4464176	695	« flagellar capping protein FliD »
	Tn5-NS_FLA002	PA14_50470	<i>flgC</i>	oui	5	4485031	208	« flagellar basal-body rod protein FlgC »
	Tn5-NS_FLA003	PA14_20740	<i>flgA</i>	oui	0	1784767	507	« putative flagella basal body P-ring formation protein »
	Tn5-NS_FLA004	PA14_50270	<i>fliD</i>	oui	9	4464471	400	« flagellar capping protein FliD »
Protéines hypothétiques	Tn5-NS_HYP001	PA14_28895		non	91	2495265	4970	« hypothetical protein »
	Tn5-NS_HYP002*	PA14_39250		oui/non	54	3494951	32	« putative double-glycine peptidase »
Divers	Tn5-NS_MSC001	PA14_50200	<i>fleS</i>	oui	0	4459876	883	« two-component sensor »

	Tb5-NS_MSC002	PA14_45680	<i>flhA</i>	oui	0	4063808	85	« flagellar biosynthesis protein FlhA »
	Tb5-NS_MSC003	PA14_50220	<i>fleQ</i>	oui	0	4461147	1197	« transcriptional regulator FleQ »
	Tb5-NS_MSC004	PA14_44300	<i>aer</i>	oui	49	3944368	-792	« aerotaxis receptor Aer »
	Tb5-NS_MSC005	PA14_33510		oui	95	2949232	-203	« putative MbtH-like protein »
	Tb5-NS_MSC006	PA14_60870	<i>morA</i>	non	99	5429152	-315	« motility regulator »
Région intergénique	Tb5-NS-INT001	PA14_11845		non	101	2653520	N/D	L'insertion est située 494 nucléotides en aval du gène PA14_30630 (<i>pqsH</i>)

* : Résultat de la requête BLASTN non-concluant

3.2.7 – Phénotype de « swarming » des transposants sélectionnés.

Dans cette section, quelques photos représentatives de chacun des transposants affectés dans la motilité de type « swarming » sont affichées. Il faut noter que la totalité des transposants affectés dans le « swarming » présentés ici ont été regroupés selon que le « swarming » est inhibé (21 transposants) ou affecté (55 transposants). Le « swarming » est jugé comme étant inhibé lorsque la colonie formée au point d'inoculation ne forme qu'une colonie circulaire faiblement étendue ne formant pas de dendrites. Aussi les photos de chaque transposants sont illustrés sur deux milieux nutritionnels « swarming » différents : le milieu M9DCAA (rangée du haut) et milieu NBD (rangée du bas).

3.2.7.1 – Exemples de phénotype de transposants inhibés dans la motilité de type « swarming ».

Les transposants ne faisant pas de motilité de type « swarming » forment typiquement une colonie centrale d'opacité relativement élevée au lieu d'inoculation (centre de la gélose) sans dendrites bien définies. Quelques exemples sont illustrés à la figure 31.

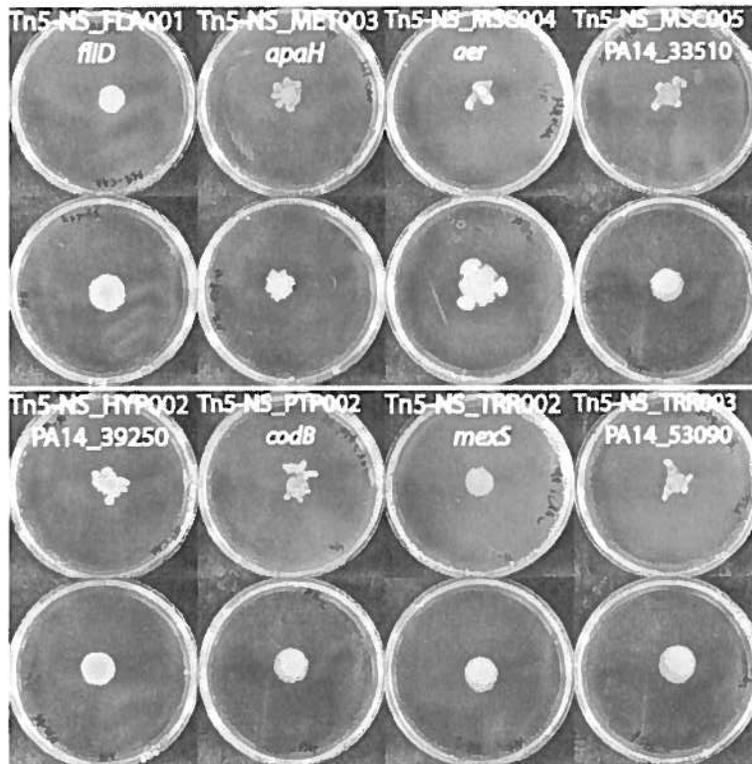


Figure 31. Exemples de transposants ayant perdu leur capacité d'effectuer du « swarming ».

Rangée du haut : Milieu M9DCAA, rangée du bas : Milieu NBD. Les géloses inoculées ont été respectivement incubées à 30°C et 34°C pendant 16 heures.

Bien que la majorité des transposants « non-swarming » présentent habituellement un phénotype de colonie centrale sans aucune ramification (Fig. 31 ; *fliD* et *mexS*), quelques-uns sont tout de même capables de produire des excroissances sans toutefois former de véritables dendrites (Fig. 31 ; *apaH*, *aer*, PA14_33510, PA14_39250, *codB* et PA14_53090). Étant donné que ces derniers exhibent un phénotype de « swarming » très fortement diminué, ils ont été considérés comme ne faisant pas de « swarming ».

3.2.7.2 – Exemples de phénotype de transposants affectés dans la motilité de type « swarming ».

La majorité des transposants sélectionnés lors du criblage présentent un phénotype de « swarming » différent de celui de la souche sauvage, mais demeurent capable de produire des dendrites définies, tel qu'illustré à la figure 32. Une insertion dans certains gènes permet la motilité « swarming » en milieu M9DCAA seulement (Fig. 32 ; PA14_68380). Dans d'autres cas, l'insertion engendre du « swarming » ressemblant à celui de la souche sauvage en milieu M9DCAA, mais qui est dramatiquement affecté en milieu NBD (Fig. 32 ; PA14_49020, *ybgC*). Souvent le « swarming » n'est pas affecté en milieu NBD, mais l'est en milieu M9DCAA (Fig. 32 ; *mutS*). Finalement, il y a la situation où les phénotypes de « swarming » des deux milieux (M9DCAA et NBD) sont affectés (Fig. 32 : PA14_68380, *zwf*, *ilvD*, *wbpM*, *lxp02*, PA14_41140, *gst* et *nfxB*).

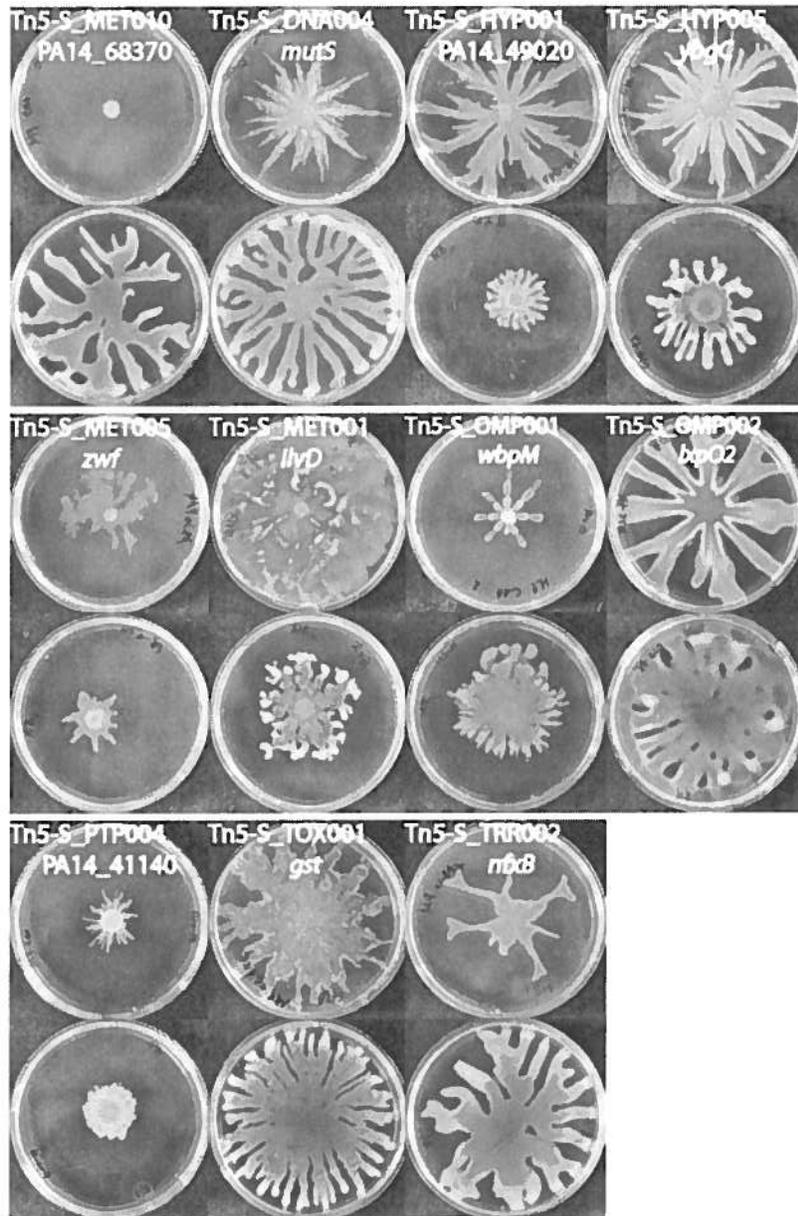


Figure 32. Exemples de transposants étant affectés dans la motilité de type « swarming ».

Rangée du haut : Milieu M9DCAA, rangée du bas : Milieu NBD. Les géloses inoculées ont été respectivement incubées à 30°C et 34°C pendant 16 h.

3.2.7.3 – Influence sur le « swarming » de la position d'insertions différentes dans un même gène.

Le phénotype de « swarming » des transposants ayant une insertion dans le même gène, mais à une position différente, diffère significativement d'un essai à l'autre (Fig.

33). Bien que le phénotype puisse effectivement varier, il n'en demeure pas moins qu'il était toujours différent de celui de la souche sauvage.

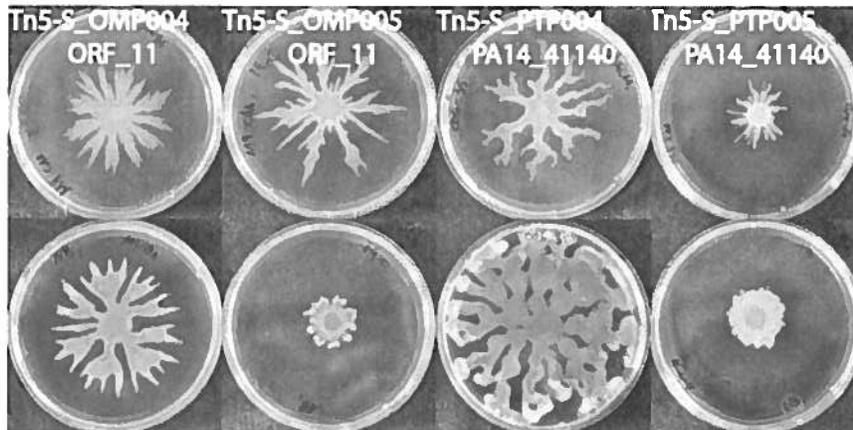


Figure 33. Le phénotype de « swarming » de transposants affectés dans le même gène peut varier selon la position de l'insertion du transposon.

Rangée du haut : Milieu M9DCAA, rangée du bas : Milieu NBD. Les géloses inoculées ont été respectivement incubées à 30°C et 34°C pendant 16 heures.

Les insertions dans les transposants Tn5-S_OMP004-005 se situent respectivement aux positions 905 et 1285 au niveau du gène PA14_23430 (ORF_11), alors que celles des transposants Tn5-S_PTP004-005 se situent respectivement aux positions 62 et 344 du gène PA14_41140.

4- DISCUSSION

4.1 - Séchage des géloses « swarming ».

Les premières expériences que j'ai effectuées visaient à mettre au point un protocole rapide et reproductible de préparation de géloses « swarming ». Un des aspects frappant du processus de préparation est que les géloses contenant la même concentration en agar, mais séchées sous la hotte à flux laminaire pour des durées différentes (Fig. 14) ne permettent pas toutes le « swarming ». Ceci suggère que certaines propriétés physico-chimiques (élasticité, humidité, viscosité) de la surface des géloses varient avec le temps de séchage. Il est intéressant de noter que sur des géloses séchées à des temps élevées, les bactéries sont encore capables de motilité, comme en témoigne le diamètre de la colonie centrale résultante (Fig. 14). Il faut cependant noter que la motilité et le diamètre de ces colonies sont grandement réduits. De plus, la formation de dendrites bien définies est aussi inhibée sur des géloses séchées plus de 60 min. Ceci suggère que les bactéries doivent se trouver sur une surface suffisamment humide pour entrer en mode « swarming », probablement parce qu'elles sont en mesure de vaincre la force de frottement de la surface de la gélose.

La température d'incubation semble aussi avoir une certaine influence sur la motilité de type « swarming », spécialement sur milieu NBD. En effet, à des températures d'incubation de 32°C et 34°C avec des temps de séchage de 5 et 10 min, les dendrites sont moins bien définies. Le phénotype de « swarming » se manifeste plutôt par un étalement circulaire de la colonie. Cependant après un séchage de 60 min. des dendrites sont bel et bien présentes à toutes les températures d'incubation. La température d'incubation ne semble pas avoir d'effet important sur le « swarming » en milieu M9D, comme en témoigne la présence de dendrites définies à toutes les températures d'incubation testées.

D'autres expériences (données non présentées) montrent que des géloses « swarming » M9D séchées 60 min avec une température d'incubation de 30°C résulte en un phénotype de « swarming » robuste et reproductible. Ce sont donc ces paramètres qui ont été conservés pour la préparation de toutes les autres géloses « swarming » des

expériences ultérieures. Il faut noter que les géloses « swarming » NBD étaient aussi séchées pendant 60 min. mais étaient incubées à 34°C.

4.2 - Densité cellulaire de l'inoculum.

La densité cellulaire de l'inoculum ne semble pas avoir d'incidence sur le « swarming » (Fig. 15). Ceci est probablement dû au fait que sur milieu M9D, la croissance des bactéries est lente. De plus, peu importe que le nombre initial de bactéries soit élevé ou non, la biomasse et l'aspect général des dendrites de toutes les géloses finissent par devenir similaires au bout de 48 h d'incubation. Peut-être que la densité de l'inoculum initial n'a pas d'importance parce que toutes les bactéries présentes sur une gélose swarming ne sont pas nécessairement en phénotype « swarming ».

4.3 - L'effet de l'osmolarité sur la motilité de type « swarming ».

Les expériences de la section 3.1 portant sur l'influence de l'osmolarité sur la motilité de type « swarming » ont révélé que ce type de motilité est grandement affecté par l'osmolarité du milieu nutritionnel. À la figure 17, l'effet sur le « swarming » de deux sources d'azote différentes (NH_4Cl et NaNO_3) a été testé à différentes concentrations dans le milieu M9D. Les résultats obtenus montrent qu'une source d'azote, aussi minimale soit-elle, est absolument nécessaire au « swarming ». En effet un milieu M9D ne contenant pas d'azote induit la formation d'une petite colonie non étendue et sans dendrites (Fig. 17). Il est fort probable que cela s'explique par le ralentissement important de la croissance des colonies bactériennes inoculées sur les géloses à cause de l'absence d'azote. En d'autres mots, l'absence d'azote n'aurait pas d'effet sur le « swarming » en tant que tel, mais plutôt sur la croissance des bactéries, celle-ci étant si lente qu'elle ne permette pas un développement suffisant de la population bactérienne pour permettre l'activation du QS et donc du « swarming ».

Le NH_4Cl à des concentrations de 1 mM à 150 mM induit un « swarming » fort semblable d'une concentration à l'autre, comme en témoigne l'aspect similaire des dendrites (Fig. 17A). Cependant, à des concentrations en NH_4Cl plus élevées (300 mM, 400 mM et 500 mM), le phénotype « swarming » est dramatiquement affecté avec la formation de dendrites très petites et très ramifiées (Fig. 17B et 17C). Au-delà d'une

certaine concentration de NH_4Cl , se situant entre 150 mM et 300 mM, il y aurait un effet de seuil déclenchant une motilité de type « swarming » complètement différente de celle observée à de plus faibles concentrations. Aussi, l'étalement de la colonie en « swarming » est beaucoup plus faible aux concentrations au-dessus de 300 mM. Cela pourrait résulter d'une toxicité, ou bien d'un effet régulateur.

Comme dans le cas du NH_4Cl , l'ajout de NaNO_3 à des concentrations de plus en plus élevées entraîne la formation de dendrites ayant une biomasse de plus en plus importante. Paradoxalement, le phénomène d'hyperramification n'a pu être observé avec le NaNO_3 . Toutefois, à une concentration de 320 mM, le NaNO_3 semble toxique pour les bactéries, comme en témoigne l'absence de développement de la colonie à cette concentration (Fig. 17B). Malgré une concentration de NH_4Cl de 500 mM (Fig. 17A), les bactéries parviennent encore à se développer, alors qu'à une concentration de 320 mM de NaNO_3 , la croissance est inhibée. Ces résultats suggèrent que la toxicité du NaNO_3 soit plus grande que celle du NH_4Cl pour les bactéries.

Plusieurs sources de carbones à des concentrations différentes (Fig. 17, 18, 19, 20) ont aussi été testées sur le « swarming ». Il est intéressant de noter que la motilité de type « swarming » typique n'est observée que lorsque du dextrose ou du citrate de sodium est présent dans les géloses « swarming ». Pour chacun de ces substrats (sauf le citrate de sodium), un phénomène d'hyperramification des dendrites et de maximisation de la surface couverte est observé. Le fructose a été choisi, car il est reconnu pour être facilement métabolisé par *P. aeruginosa* en milieu liquide (Bergey *et al.*, 2001). Le fait qu'il ne parvienne pas à déclencher la motilité de type « swarming » est intrigant. Ces résultats indiquent qu'une source de carbone reconnue pour être utilisée par une bactérie en milieu liquide n'entraîne pas nécessairement de motilité de type « swarming ». Le sucrose a été choisi pour son incapacité à être métabolisé par *P. aeruginosa* en milieu liquide (Bergey *et al.*, 2001). Ainsi, une gélose « swarming » contenant 11 mM de dextrose avec une concentration de sucrose élevée (Fig. 19B) entraîne un phénotype de « swarming » hyperramifié qui ne peut en aucun cas être causé par la disponibilité de carbone dans le milieu « swarming ». Ce phénotype semble plutôt être causé par l'osmolarité élevée du milieu. Ceci est plutôt inusité. Comment une colonie bactérienne parvient-elle à maximiser sa biomasse en ayant la même quantité de nutriments

assimilables à sa disposition dans son environnement d'une gélose à une autre ? Déziel et collègues (Déziel *et al.*, 2003) avaient suggéré que *P. aeruginosa* effectue du « swarming » lorsque les conditions de son environnement lui sont défavorables. Il serait tout à fait possible qu'un milieu ayant un haut niveau d'osmolarité puisse être considéré défavorable par les bactéries. Conséquemment, la motilité de type « swarming » serait activée, mais sous une forme maximisée et très robuste. Il serait intéressant de vérifier la croissance bactérienne en milieu hyperosmotique afin de déterminer si la maximisation de la biomasse en de telles conditions est propre au « swarming » ou directement causée par l'hyperosmolarité du milieu nutritionnel. Il faudrait aussi développer une méthode permettant de mesurer directement l'osmolarité dans les géloses « swarming » de façon quantitative afin d'établir des corrélations précises entre la quantité de biomasse et le niveau d'osmolarité. Le phénomène d'hyperramification et de maximisation des dendrites en « swarming » a été confirmé à l'aide de géloses « swarming » contenant différentes concentrations de KCl et de NaCl (Fig 21).

En comparant les figures 18A et 19A, il ressort que la présence de fructose comme seule source de carbone entraîne une croissance bactérienne quasiment nulle, alors que la présence de sucrose seulement semble supporter une certaine croissance des bactéries. Ceci est étonnant, car en théorie, le fructose est assimilable en milieu liquide par *P. aeruginosa* alors que le sucrose ne l'est pas (Bergey *et al.*, 2001). En principe, il y aurait donc dû y avoir croissance sur les géloses contenant du fructose et non sur celles contenant du sucrose. Ces résultats sont difficiles à réconcilier, mais pourraient hypothétiquement être dû au fait que *P. aeruginosa* lorsqu'en « swarming » pourrait subir des changements physiologiques et métaboliques importants. Par exemple, une voie métabolique pourrait être exprimée lorsque les bactéries sont en « swarming », ce qui permettrait une assimilation du sucrose qui est normalement non-assimilable. Un phénomène semblable pourrait avoir lieu pour l'assimilation du fructose, ce qui pourrait expliquer la croissance presque nulle des bactéries en présence de ce sucre (Fig. 18A). Cette hypothèse est hautement spéculative, mais demeure envisageable sachant que chez *S. typhimurium*, des bactéries sur milieu solide présentent des différences physiologiques importantes par rapport à des cellules en milieu liquide avec environ un tiers du génome fonctionnel exprimé différenciellement (Wang *et al.*, 2006).

Il serait intéressant de démystifier les cascades moléculaires expliquant le « swarming » robuste des bactéries sur les géloses hyperosmotiques. L'article récemment soumis annexé à ce mémoire (appendice H) fait état que la formation des dendrites de « swarming » sont régulés par deux familles de molécules : les RL et les HAA. Il s'agit de deux biosurfactants qui sont synthétisés par la bactérie et dont la synthèse dépend du même opéron (*rhlAB*). Ces deux groupes de molécules possèdent des cinétiques de diffusion sur une surface qui sont différentes : les RL diffusent plus rapidement et plus loin que les HAA. Brièvement, l'article rapporte que les bactéries sont repoussées par des HAA, mais sont attirés par des RL. Un ratio de ces deux composés régulerait donc la formation des dendrites. Il serait possible 1) qu'en milieu hyperosmotique, le ratio RL:HAA soit significativement modifié comparativement au ratio normal ou bien que 2) la cinétique de diffusion de ces deux composés soit affectée. Ceci ferait en sorte que les bactéries soient en présence d'une quantité plus élevée ou plus faible d'une de ces deux types de molécules. Toutefois, il serait surprenant que le phénotype de « swarming » robuste typique de conditions hyperosmotiques soit dû à une augmentation du ratio RL:HAA, car naturellement, ce ratio est déjà très élevé (beaucoup de RL et peu de HAA) (Lépine *et al.*, 2002). Une augmentation de ce ratio déjà très élevé aurait-elle une incidence sur le « swarming » ? C'est possible, mais peu probable. Cependant, le contraire serait plus plausible, c'est-à-dire qu'une diminution du ratio RL:HAA entraînerait un déséquilibre marqué du ratio naturel de ces deux molécules et, dans ce cas, le « swarming » serait naturellement affecté. Une série d'expérience devra être effectuée pour déterminer si le ratio RL:HAA est effectivement affecté lors du « swarming » robuste observé sur milieu hyperosmotique comparativement à du « swarming » normal sur milieu isoosmotique.

Chez les individus atteints de la FK, il a été rapporté que le liquide se trouvant à la surface des cellules épithéliales respiratoires (ASL) contient une quantité de sel anormalement élevée (Goldberg & Pier, 2000). Il semblerait que le niveau d'osmolarité résultante puisse entraîner l'inactivation de peptides antimicrobiens appelés défensines. D'autres études ont toutefois rapporté qu'il n'existait pas de différence dans la composition ionique de l'ASL provenant de patients-FK et non-FK (Knowles *et al.*, 1997), quoique l'ASL des patients-FK est hypervisqueux (Matsui *et al.*, 1998). Aussi, il a

été démontré que *S. typhimurium* devient résistante à plusieurs antibiotiques lorsqu'elle est en motilité de type « swarming » (Kim *et al.*, 2003; Kim & Surette, 2003). Ce phénotype de résistance pourrait certainement être répandu chez plusieurs genres bactériens, dont *P. aeruginosa*. La motilité de type « swarming » n'a jamais été mise en cause dans les stades initiaux d'infection par *P. aeruginosa* et devrait à tout le moins être considéré à la lumière des résultats obtenus concernant le « swarming » et l'osmolarité. Les résultats présentés ici suggèrent qu'une grande quantité de sel jumelée avec une surface visqueuse (0,5% d'agar) favorise la maximisation de la biomasse. Si en plus, une haute osmolarité inhibe l'action de peptides antimicrobiens, l'environnement pulmonaire des patients FK deviendrait alors une niche très favorable à l'établissement de *P. aeruginosa* via la motilité de type « swarming ». Sachant que la souche utilisée pour mes travaux (PA14) est un isolat clinique particulièrement virulent prélevé d'un patient grand brûlé et que cette souche est capable de « swarming » robuste comparativement à d'autres souches de laboratoires (i.e. PAO1), il faudra considérer l'hypothèse voulant que la motilité de type « swarming » ait une incidence sur la virulence.

4.4 - Influence des métaux sur le « swarming ».

Tel qu'illustré à la figure 22, différents métaux ont une influence sur la motilité de type « swarming ». De faibles concentrations de cobalt et de cuivre n'ont pas vraiment d'effets sur le « swarming », sauf à une concentration de 100 μM où le « swarming » est ralenti et moins robuste. Le « swarming » est aussi un peu affecté lorsque du zinc est présent dans le milieu. Parmi tous les métaux testés, seul le fer présente un effet inhibiteur évident sur le « swarming ». Cela est frappant pour des concentrations supérieures à 5 μM . Il est possible d'expliquer la diminution de l'expression du « swarming » en présence de certaines concentrations de métaux par leur toxicité. Cependant, Déziel et collègues (Déziel *et al.*, 2003) ont rapporté que l'ajout de fer dans un milieu nutritionnel liquide entraîne une diminution de la production de RL tout en favorisant une production élevée de biomasse. En milieu semi-solide, le fer inhibe aussi le « swarming » (Déziel *et al.*, 2003), ce qui est en concordance avec les résultats présentés ici. Il serait donc fort probable que l'expression diminuée de la motilité de type « swarming » en présence de fer dans le milieu s'explique par une faible production de

RL. Le mécanisme par lequel le fer affecte la biosynthèse des RL demeure cependant mal compris. Le fer pourrait avoir un effet inhibiteur sur le QS, inhibant du même coup la synthèse des RL. Ainsi, il a été rapporté qu'une limitation en fer pouvait déclencher le QS sans égard à la densité de population (Bollinger *et al.*, 2001). Cela pourrait signifier que la biosynthèse de RL connue pour être sous le contrôle du QS (Ochsner & Reiser, 1995), pourrait être activée prématurément en des conditions limitantes en fer et ce, indépendamment du QS. Aussi, il a été rapporté que les cations divalents inhibent généralement la production de RL (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Peut-être que le « swarming » peu robuste observé sur les géloses contenant des concentrations de 100 μM de chaque métal est effectivement causé par une diminution de la synthèse de RL via un mécanisme semblable à celui induit par le fer. La biomasse sur les géloses « swarming » contenant les différents métaux n'a pas été quantifiée, mais par évaluation visuelle, seul le cobalt à une concentration de 100 μM semble être toxique pour les bactéries. Globalement, surtout le fer affecte significativement le « swarming ».

4.5 - Influence du pH sur la motilité de type « swarming ».

Les résultats illustrés à la figure 23 montrent que le « swarming » est fortement dépendant du pH du milieu nutritionnel. À pH 5, le « swarming » est complètement inhibé. À pH 6 et 7, le « swarming » est déclenché, mais les dendrites sont plus étendues et la biomasse est plus importante à pH 7. À pH 8, les bactéries sont encore capables de « swarming », mais les dendrites à peine différenciées donnent un aspect presque circulaire à la colonie en « swarming ». Finalement à pH 9, le « swarming » semble inhibé, mais de façon moins importante qu'à pH 5. De manière générale, l'expression du « swarming » est optimale à un pH neutre. Aux valeurs de pH de 5 et 9, l'absence de « swarming » pourrait simplement être due au faible taux de croissance de *P. aeruginosa* dans des conditions de pH extrêmes.

Champion et collègues (Champion *et al.*, 1995) ont rapporté que les RL peuvent s'agréger pour former différentes structures selon le pH de leur environnement. Brièvement, à un pH d'environ 5, les RL forment de grandes structures lamellaires. À un pH se situant autour de 6 et 6,5, les RL forment de larges vésicules. À pH 7, ils forment de petites micelles. À des valeurs supérieures de pH, aucune structure n'a été détectée.

De plus, les RL, en formant des vésicules ou des micelles, peuvent solubiliser des molécules de la membrane externe des bactéries, notamment des LPS (Al-Tahhan *et al.*, 2000). Il a été rapporté que des bactéries en motilité de type « twitching » chez *P. aeruginosa* et « gliding » chez *M. xanthus*, migrent selon un gradient de phospholipides extrait de leurs propres membranes cellulaires (Kearns & Shimkets, 2001). L'existence d'un mécanisme similaire dirigeant le « swarming » chez *P. aeruginosa* serait tout à fait plausible. L'absence de « swarming » dans un milieu à pH 5 pourrait être due au fait que les RL forment des lamelles et non des micelles. Dans ces conditions, ceux-ci seraient inaptes à solubiliser des molécules de la membrane externe des cellules. Par contre, à pH 6 et 7, les RL forment respectivement des vésicules et des micelles, soit des structures capables de solubiliser des molécules de la membrane externe. À pH 8, les RL peuvent encore former des micelles, mais en quantité très réduite. En somme, il semble que des valeurs de pH permettant la formation de vésicules ou de micelles correspondent à la présence de « swarming » actif. Par contre, lorsque le pH se situe à des valeurs où il n'y a pas formation de vésicules ou de micelles, le « swarming » n'est pas déclenché. Il serait important d'entreprendre une démarche expérimentale permettant de déterminer si les RL solubilisent bel et bien des molécules de la membrane externe et si oui, les identifier.

4.6 - Anoxie et « swarming ».

Les résultats de la figure 24 montrent que la motilité de type « swarming » peut avoir lieu aussi bien en conditions d'aérobiose que d'anoxie. Il existe deux voies métaboliques permettant à *P. aeruginosa* de se développer dans un environnement anaérobie. La première voie requiert la présence de nitrate ou de nitrite comme accepteur d'électron alternatif (Carlson & Ingraham, 1983). La seconde voie passe par la fermentation de l'arginine. Dans un environnement anaérobie, l'absence de nitrate et d'arginine résulte en l'arrêt complet du métabolisme de *P. aeruginosa* (Vander Wauven *et al.*, 1984). Dans cette expérience, la source d'azote était du NaNO_3 et non du NH_4Cl . Ceci avait pour but de permettre la respiration cellulaire en fournissant du nitrate comme accepteur d'électrons.

De plus en plus d'indices suggèrent qu'il existe des liens et des similarités entre la motilité de type « swarming » et le développement des bactéries en biofilms (Daniels *et al.*, 2004). La nature précise de ces liens reste à être déterminée. Cependant, *P. aeruginosa* forme des biofilms robustes en conditions d'anaérobioses dénitrifiantes (Yoon *et al.*, 2002). Une autre étude a rapporté que l'antibiotique gentamicine est moins efficace contre *P. aeruginosa* en absence d'oxygène (Davey *et al.*, 1988). De plus, la motilité de type « swarming » chez *S. typhimurium* entraîne une résistance accrue des bactéries à certains antibiotiques. Le fait que le « swarming » de *P. aeruginosa* ne soit aucunement affecté (en apparence du moins) par des conditions anaérobies est un indice de plus en faveur de l'existence de liens entre le « swarming » et les biofilms.

4.7 - Mutagenèse par transposition aléatoire.

La démarche expérimentale entreprise pour générer une banque de transposants par insertion transpositionnelle était largement inspirée de celle décrite par Jacobs et collègues (Jacobs *et al.*, 2003). En fait, la mutagenèse elle-même ne laissait pas entrevoir de difficulté. Toutefois, l'utilisation du robot repiqueur de colonie a présenté un défi de taille. Il faut mettre en perspective qu'aucun travail d'envergure n'avait été effectué auparavant avec ce robot depuis son acquisition. Beaucoup de mises au point ont donc dû être effectuées. Par exemple, régler le protocole de stérilisation des aiguilles servant à repiquer les colonies, régler les coordonnées des aiguilles pour que celles-ci piquent à la localisation exacte des colonies sur les géloses, etc.

En ce qui concerne la réaction PCR imbriquée semi-arbitraire, exactement le même protocole que celui décrit par Jacobs et collègues a été utilisé. Le taux de succès de 98.7% indique que chez presque tous les transposants, le produit final de la réaction PCR était assez clair pour pouvoir déterminer avec suffisamment de certitude la position de l'insertion. Ainsi, il a été possible d'identifier le site d'insertion de la quasi-totalité de des transposants sélectionnés pour leur défaut dans la motilité de type « swarming ». Un fait intéressant est qu'environ la moitié des transposants sélectionnés ont été trouvés sans effectuer de véritable criblage. En effet, lors du repiquage des transposants sur les géloses de sélection, certaines d'entre elles avaient un diamètre trop large pour satisfaire les critères de sélection du robot. Ces colonies ont toutes été repiquées manuellement dans

des plaques de 96 puits. Étonnamment, la majorité de ces transposants étaient affectés dans la motilité de type « swarming ». Les géloses de sélection sur lesquels ces transposants ont été repiqués étaient solidifiées avec une concentration de 1.5% d'agar. Kearns et collègues (Kearns *et al.*, 2001) ont rapportés que la motilité de type « twitching » chez *P. aeruginosa* peut avoir lieu à une interface air-surface sur des géloses contenant une telle concentration d'agar. Les colonies de large diamètre repiquées manuellement pourraient donc présenter un défaut dans la motilité de type « twitching » et cela expliquerait leur grande taille. Ceci suggère que plusieurs gènes impliqués dans le « twitching » le sont aussi dans le « swarming ». Jacobs et collègues (Jacobs *et al.*, 2003) ont criblé tout leurs transposants pour plusieurs phénotypes dont le « twitching ». Cependant, il s'avère qu'aucun des gènes qu'ils ont rapportés ne correspond aux transposants décrits dans ce mémoire.

Malgré l'identification de plusieurs gènes étant impliqués ou absolument nécessaire à la motilité de type « swarming » (tableau III, IV), il demeure difficile de tirer une conclusion sur leur rôle dans ce type de motilité. Chacun des gènes identifiés a été regroupé selon un groupe fonctionnel proposé. Dans la majorité des cas, cette fonction n'a pas été démontrée mais prédite par des analyses d'homologies des séquences et des algorithmes de prédictions. Les gènes identifiés ont donc été regroupés selon leur fonction (réelle ou prédite) (tableau III, IV). Par exemple tous les gènes codant pour des protéines de membrane externe sont regroupés dans la catégorie protéines de membrane externe et identifiés en conséquence.

À l'avant dernière colonne des tableaux III et IV, il est indiqué si le transposant produit ou non une zone mouillée lorsqu'il est en motilité de type « swimming ». Il est probable que cette zone mouillée résulte de la production de RL, car un mutant *rhlA*⁻ ne produit pas de zone mouillée. Des tests devront être effectués pour confirmer cette hypothèse. Advenant que ce soit le cas, le fait que les RL sont absolument requis pour le « swarming » serait confirmé une fois de plus. Beaucoup des transposants inaptes à faire du « swarming » ne produisaient pas de zone mouillée (tableau III, IV). Parmi ceux-ci, il y a deux transposants dans le gène *mexS*, lequel code pour un répresseur de la pompe à efflux MexEF-OprN qui transporte le chloramphénicol et les quinolones (Sobel *et al.*, 2005). Lorsque *mexS* est inactivé, cette pompe devient active et cela favorise la résistance

des bactéries à plusieurs antibiotiques (Sobel *et al.*, 2005). Avec les connaissances actuelles, toute explication du rôle de *mexS* dans la motilité de type « swarming » demeure spéculative. Cependant, l'absence de zone mouillée chez un transposant *mexS* pourrait signifier que l'inactivation de ce gène entraîne tout simplement une inhibition de la synthèse de RL. L'opéron *rhlAB* est sous le contrôle du QS. Il est donc possible que MexS ait un rôle à jouer dans la communication intercellulaire. En effet, Kohler et collègues (Kohler *et al.*, 2001) ont rapporté qu'un mutant surexprimant la pompe à efflux MexEF-OprN est affecté dans le signalage intercellulaire à cause notamment, d'une diminution de l'expression de *rhlI*, ce qui influence notamment l'expression de l'opéron *rhlAB* responsable de la synthèse des RL. Par ailleurs, un transposant dans le gène *nfxB* (Fig. 43) qui code pour un répresseur de la pompe à efflux MexCD-OprJ effectue du « swarming » différent de celui de la souche sauvage. Cette pompe à efflux est responsable du transport des quinolones, de l'érythromycine (Hamzehpour *et al.*, 1995) et de la céphalosporine (Gotoh *et al.*, 1998; Masuda *et al.*, 1996). L'inactivation de *nfxB* rend cette pompe constitutivement active (Shiba *et al.*, 1995). Il serait fortement probable que la surexpression de la pompe MexCD-OprJ affecte l'expression de régulateurs du QS. En somme, il est intéressant de constater que les deux pompes à efflux MexCD-OprJ et MexEF-OprN ont un effet très différent sur le « swarming ».

Un autre gène dans lequel une insertion semble prévenir la formation d'une zone mouillée est *morA*, qui code pour un senseur de motifs GGDEF et EAL impliqués dans la régulation de la production de di-GMP cyclique (c-di-GMP). Brièvement, le c-di-GMP affecte une variété de fonctions cellulaires reliées à la transition entre l'état motile unicellulaire et l'état adhésif multicellulaire retrouvé dans les biofilms (Jenal & Malone, 2006). Les molécules de c-di-GMP sont synthétisées par une classe d'enzymes contenant des domaines GGDEF et hydrolysées par une autre famille de protéines contenant des domaines EAL (Jenal & Malone, 2006). Un mutant *morA* chez *P. putida* exhibe une expression constitutive de ses flagelles, favorisant la motilité et le chimiotactisme (Choy *et al.*, 2004). Cependant, cette mutation interfère avec la capacité des cellules à établir des biofilms (Choy *et al.*, 2004). Aussi, une variété de mutants dans les domaines GGDEF et EAL chez *P. aeruginosa* exhibent une virulence atténuée (Kulasakara *et al.*, 2006). Il est probable que MorA ait un rôle à jouer dans la synthèse des RL. Sachant que les RL sont

impliqués dans le développement des biofilms (Boles *et al.*, 2005), il serait possible que l'incapacité à établir un biofilm normal chez un mutant *morA* soit au moins partiellement attribuable à un défaut dans la synthèse de RL.

La capacité de chacun des transposants sélectionnés à effectuer de la motilité de type « swimming » a aussi été déterminée. Il en ressort que la majorité des gènes identifiés impliqués dans le « swarming » n'affectent pas la motilité de type « swimming ». Les transposants affectés dans le « swarming » mais pas dans le « swimming » sont particulièrement intéressants car cela signifie que le gène inactivé par l'insertion ne devrait pas avoir de rôle à jouer dans le fonctionnement normal des flagelles. Étant donné que le flagelle est une structure absolument requise pour effectuer du « swarming » (Harshey, 1994; Harshey, 2003), il n'est guère étonnant que des transposants incapables de « swimming » soient aussi altérés, voir inhibés dans le « swarming ». Par conséquent, chez des transposants affectés dans le « swarming » seulement, d'autres facteurs, possiblement directement liés au mécanisme unique du «swarming», sont affectés.

Des transposants dans les gènes flagellaires *fliD*, *flgC* et *flgA* sont incapables de « swimming ». Toutefois, deux transposants dans des gènes flagellaires (*fliA* et *fliH*) sont incapables de « swimming », mais sont tout de même capables d'une certaine forme de « swarming » peu robuste (Fig. 49). La structure d'un flagelle est très complexe et implique plusieurs protéines différentes exprimés selon un ordre hiérarchique (Aldridge & Hughes, 2002; Dasgupta *et al.*, 2003). *fliA* est situé au sommet de la hiérarchie (Dasgupta *et al.*, 2003) et code pour un facteur σ qui régule l'expression de la flagelline (Hughes & Mathee, 1998). *fliH* est un gène de fonction inconnue situé à un niveau hiérarchique plus bas qui code pour un produit qui formerait un complexe avec FliL et seraient tous les deux impliqués dans l'exportation du flagelle (Minamino & MacNab, 2000). Des études plus approfondies sur ces deux gènes nous permettraient d'identifier quelles structures des flagelles sont nécessaires au « swarming ». Une insertion dans *fleS* (NS_MSC001), codant pour une partie d'un senseur à deux composantes avec FleR (système FleR/FleS) (Ritchings *et al.*, 1995) est aussi situé au sommet de la hiérarchie (Dasgupta *et al.*, 2003) et inhibe complètement le « swarming » ainsi que le « swimming », montrant encore une fois un lien étroit entre ces deux types de motilité. Il

sera intéressant de déterminer plus précisément le rôle de FleS dans la motilité de *P. aeruginosa*. Chez *V. parahaemolyticus*, la vitesse de rotation du flagelle est un facteur déterminant qui entraîne la différenciation en cellules « swarming ». Brièvement, la différenciation chez cette espèce est déclenchée lorsque la rotation du flagelle est obstruée par un milieu d'une certaine viscosité (McCarter & Silverman, 1990). Peut-être existe-t-il un mécanisme semblable chez *P. aeruginosa* et qu'un composant à deux senseur tel que FleS/FleR pourrait être impliqué dans la différenciation cellulaire. Par exemple, le fait qu'il n'y ait pas de « swarming » pourrait être causé par un senseur dysfonctionnel ne faisant pas le transfert de l'information entre la diminution de la rotation flagellaire et l'activation des voies de régulation correspondantes.

En observant attentivement les données des tableaux IV (transposants inhibés dans le « swarming »), il ressort que le seul transposant inhibé dans le « swarming », qui exhibe un « swimming » normal et qui est capable de synthétiser une zone mouillée est NS_TR003 (PA14_53090). Pour tous les autres, il y a toujours un défaut soit dans la synthèse de la zone mouillée ou soit dans le « swimming ». Chaque fois qu'un transposant est soit incapable de synthétiser une zone mouillée ou soit affecté dans le « swimming », son « swarming » est déficient.

Plusieurs autres gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans le « swarming » (tableau III, IV). Ceux-ci codent pour des protéines de membrane externe, des pompes à efflux, des protéines impliquées dans le métabolisme et pour des protéines hypothétiques. Aussi, plusieurs transposants affectés dans le « swarming » ont une insertion dans une région intergénique, suggérant la présence de gènes encore inconnus ou bien dans la région promotrice de gènes. S_INT001 et S_INT002 possèdent une insertion située à 103 nucléotides en aval du gène PA14_32270 et 602 nucléotides du gène PA14_22540 respectivement. La transcription de ces gènes pourrait possiblement être affectée par ces insertions. Chez les transposants inhibés dans le « swarming », le transposant NS_INT001 possède une insertion tout près du gène *pqsH*, lequel est impliqué dans le QS (Déziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002; Whiteley *et al.*, 1999). Il sera intéressant de déterminer le rôle exact de cette région et son implication avec *pqsH*. Bien que toutes ces données soient très intéressantes, elles demeurent insuffisantes pour déterminer avec assurance le rôle de chacun de ces gènes dans le « swarming ». Le

criblage qui a été effectué servira en réalité de point de départ à des travaux ultérieurs qui nécessiteront la caractérisation de plusieurs de ces gènes. Néanmoins, les gènes codant pour des protéines de membranes externes sont d'un grand intérêt dans le contexte où ils pourraient être impliqués dans les structures de radeaux multicellulaires typiquement observés chez des cellules en « swarming ». Il est possible que ces protéines soient impliquées dans un phénomène hypothétique d'adhérence entre les cellules « swarming » différenciées.

Une étude récente a rapportée des gènes impliqués dans le « swarming » de *P. aeruginosa* (Potvin *et al.*, 2003). L'identification de ces gènes a également été obtenue par criblage de transposants, mais dans ce cas pour la survie dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat. Cependant, les objectifs des études étant divergents, aucun des gènes rapportés identifié ici n'ont aussi été mis évidence par les travaux de Potvin et collègues (Potvin *et al.*, 2003). Ceci peut être expliqué par plusieurs facteurs. Le milieu « swarming » utilisés dans cette étude était différent de celui utilisé dans ce mémoire. Aussi, la souche de *P. aeruginosa* utilisée était PAO1 alors que celle utilisée ici était PA14. Ceci souligne que de nombreux gènes peuvent affecter le «swarming», et que notre criblage est loin d'être exhaustif. Il faut noter qu'il existe plusieurs souches de PAO1. Celle qui a été la plus étudiée et aussi séquencée (Jacobs *et al.*, 2003), ne fait pas de « swarming » à cause d'un défaut dans le QS. Toutefois, il existe plusieurs souches de PAO1 capables de « swarming », dont celle utilisée par Potvin et collègues.

Un fait intéressant qui ressort du criblage des transposants est que parmi les gènes impliqués dans le « swarming », aucun n'est impliqué directement dans le QS ou dans la synthèse de RL, par exemple *rhlA*, *rhlB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, et *lasR*. Ceci peut être expliqué par le fait que le nombre de transposants criblés n'était assurément pas assez élevé pour identifier tous les gènes impliqués dans le « swarming ». Jacobs et collègues (2003) ont en effet établi une relation entre le nombre de transposants criblés et le nombre total de gènes couverts chez *P. aeruginosa*. Le nombre de transposants criblés dans ce travail est de 3840, ce qui correspond à une couverture théorique d'environ 40-45% du génome de cette bactérie. Ce criblage ne peut donc pas être considéré comme étant exhaustif, mais a tout de même permis de mettre en évidence plusieurs gènes impliqués dans le « swarming ».

4.8 - Conclusion

Les résultats présentés dans ce mémoire indiquent que le « swarming » est un type de motilité qui dépend fortement des conditions régnant à la surface de l'agar et de la composition du milieu nutritionnel. C'est aussi un phénomène qui est régulé par de nombreux gènes. L'identification des gènes impliqués dans la motilité de type « swarming », pourra assurément être utilisée dans d'éventuels projets visant à caractériser ce type de motilité. Étant donné que nous avons maintenant en notre possession 55 transposants affectés dans le « swarming » et 21 transposants inhibés dans le « swarming », des travaux portant entre autre sur la relation entre le « swarming », le chimiotactisme, la virulence et les biofilms pourront être effectués. Les résultats présentés ici tendent à confirmer une fois de plus l'importance des flagelles et des RL pour le « swarming ».

BIBLIOGRAPHIE

Laboratorio de Microbiología. <http://iibceeduuy/microbiologia/nuevo/>.

Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3262-3268.

Alavi, M. & Belas, R. (2001). Surface sensing, swarmer cell differentiation, and biofilm development. *Methods Enzymol* **336**, 29-40.

Alberti, L. & Harshey, R. M. (1990). Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J Bacteriol* **172**, 4322-4328.

Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**, 160-165.

Allison, C., Coleman, N., Jones, P. L. & Hughes, C. (1992). 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.

Ammendola, A., Geisenberger, O., Andersen, J. B., Givskov, M., Schleifer, K. H. & Eberl, L. (1998). *Serratia liquefaciens* swarm cells exhibit enhanced resistance to predation by *Tetrahymena* sp. *FEMS Microbiol Lett* **164**, 69-75.

Bailey, J. & Manoil, C. (2002). Genome-wide internal tagging of bacterial exported proteins. *Nat Biotechnol* **20**, 839-842.

Beal, R. & Betts, W. B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* **89**, 158-168.

Belas, R., Simon, M. & Silverman, M. (1986). Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **167**, 210-218.

- Belas, R., Goldman, M. & Ashliman, K. (1995).** Genetic analysis of *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell elongation. *J Bacteriol* **177**, 823-828.
- Belas, R., Schneider, R. & Melch, M. (1998).** Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of *rsbA*, encoding a regulator of swarming behavior. *J Bacteriol* **180**, 6126-6139.
- Ben-Jacob, E., Schochet, O., Tenenbaum, A., Cohen, I., Czirok, A. & Vicsek, T. (1994).** Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature* **368**, 46-49.
- Bergey, D. H., Garrity, G. M., Staley, J. T. & Boone, D. R. (2001).** Bergey's manual of systematic bacteriology -2nd Ed. *New York Springer*.
- Boles, B., Thoendel, M. & Singh, P. (2005).** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* **57**, 1210-1223.
- Bollinger, N., Hassett, D. J., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & McDermott, T. R. (2001).** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. *J Bacteriol* **183**, 1990-1996.
- Britigan, B. E., Hayek, M. B., Doebbeling, B. N. & Fick, R. B., Jr. (1993).** Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **61**, 5049-5055.
- Burkart, M., Toguchi, A. & Harshey, R. M. (1998).** The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2568-2573.
- Cabrera-Valladares, N., Richardson, A. P., Olvera, C., Trevino, L. G., Deziel, E., Lepine, F. & Soberon-Chavez, G. (2006).** Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Microbiol Biotechnol.* **73**(1):187-94.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q. & O'Toole, G. A. (2005).** Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 7351-7361.
- Camilli, A. & Bassler, B. L. (2006).** Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**, 1113-1116.
- Carlson, C. A. & Ingraham, J. L. (1983).** Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **45**, 1247-1253.

Champion, J. T., Gilkey, J. C., Lamparski, H., Retterer, J. & Miller, R. M. (1995). Electron Microscopy of Rhamnolipid (Biosurfactant) Morphology: Effects of pH, Cadmium, and Octadecane. *J Colloid Interface Sci* **170**, 569-574.

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.

Choy, W. K., Zhou, L., Syn, C. K., Zhang, L. H. & Swarup, S. (2004). MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **186**, 7221-7228.

Coleman, W. G., Jr. (1983). The *rfaD* gene codes for ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase. An enzyme required for lipopolysaccharide core biosynthesis. *J Biol Chem* **258**, 1985-1990.

Connelly, M. B., Young, G. M. & Sloma, A. (2004). Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**, 4159-4167.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 261-289.

Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S. & Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**, 809-824.

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.

Davey, P., Barza, M. & Stuart, M. (1988). Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to killing by ciprofloxacin, gentamicin and imipenem in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* **21**, 395-404.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G. & Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1339-1344.

Déziel, É., Lépine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005-2013.

Dixit, M., Murudkar, C. S. & Rao, K. K. (2002). Epr is transcribed from a final sigma(D) promoter and is involved in swarming of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**, 596-599.

Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* **6**, 324-338.

Eberl, L., Christiansen, G., Molin, S. & Givskov, M. (1996a). Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *J Bacteriol* **178**, 554-559.

Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C. & other authors (1996b). Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**, 127-136.

Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **181**, 1703-1712.

Enos-Berlage, J. L. & McCarter, L. L. (2000). Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **182**, 5513-5520.

Fraser, G. M. & Hughes, C. (1999). Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**, 630-635.

Fraser, G. M., Claret, L., Furness, R., Gupta, S. & Hughes, C. (2002). Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* *hpmBA* haemolysin operon. *Microbiol* **148**, 2191-2201.

Fuqua, C., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**, 439-468.

Furness, R. B., Fraser, G. M., Hay, N. A. & Hughes, C. (1997). Negative feedback from a *Proteus* class II flagellum export defect to the *flhDC* master operon controlling cell division and flagellum assembly. *J Bacteriol* **179**, 5585-5588.

Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C. & Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**, 6472-6480.

- Goldberg, J. B. & Pier, G. B. (2000).** The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* **8**, 514-520.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M. & Nishino, T. (1998).** Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in Delta *mexA-mexB-oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1938-1943.
- Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I. (2000).** Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* **68**, 6139-6146.
- Gygi, D., Bailey, M. J., Allison, C. & Hughes, C. (1995a).** Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **15**, 761-769.
- Gygi, D., Rahman, M. M., Lai, H. C., Carlson, R., Guard-Petter, J. & Hughes, C. (1995b).** A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **17**, 1167-1175.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews* **2**, 95-108.
- Hamzhepour, M. M., Pechere, J. C., Plesiat, P. & Kohler, T. (1995).** OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2392-2396.
- Harshey, R. M. (1994).** Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**, 389-394.
- 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.
- Harshey, R. M. (2003).** Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**, 249-273.
- Hay, N. A., Tipper, D. J., Gygi, D. & Hughes, C. (1997).** A nonswarming mutant of *Proteus mirabilis* lacks the Lrp global transcriptional regulator. *J Bacteriol* **179**, 4741-4746.
- Heeb, S. & Haas, D. (2001).** Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1351-1363.

Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**, 478-503.

Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P. & Haas, D. (2004). Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **186**, 2936–2945.

Hogan, D. & Kolter, R. (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Curr Opin Microbiol* **5**, 472-477.

Hughes, K. T. & Mathee, K. (1998). The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **52**, 231-286.

Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I. & other authors (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.

Jansen, A. M., Lockett, C. V., Johnson, D. E. & Mobley, H. L. (2003). Visualization of *Proteus mirabilis* morphotypes in the urinary tract: the elongated swarmer cell is rarely observed in ascending urinary tract infection. *Infect Immun* **71**, 3607-3613.

Jaques, S. & McCarter, L. L. (2006). Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **188**, 2625-2635.

Jenal, U. & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**, 385-407.

Jones, B. V., Young, R., Mahenthiralingam, E. & Stickler, D. J. (2004). Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infect Immun* **72**, 3941-3950.

Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, B. & Séror, 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. *Microbiol* **150**, 1839–1849.

Kearns, D. B. & Shimkets, L. J. (1998). Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11957-11962.

- Kearns, D. B., Robinson, J. & Shimkets, L. J. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits directed twitching motility up phosphatidylethanolamine gradients. *J Bacteriol* **183**, 763-767.
- Kearns, D. B. & Shimkets, L. J. (2001). Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol* **9**, 126-129.
- Kearns, D. B. & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**, 581-590.
- Kearns, D. B., Chu, F., Rudner, R. & Losick, R. (2004). Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol Microbiol* **52**, 357-369.
- 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.
- 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.
- Kirov, S. M., Tassell, B. C., Semmler, A. B., O'Donovan, L. A., Rabaan, A. A. & Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J Bacteriol* **184**, 547-555.
- Knowles, M. R., Robinson, J. M., Wood, R. E., Pue, C. A., Mentz, W. M., Wager, G. C., Gatzky, J. T. & Boucher, R. C. (1997). Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest* **100**, 2588-2595.
- Kohler, 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.
- Kohler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M. & Pechere, J. C. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 5213-5222.
- Kornberg, A., Rao, N. N. & Ault-Riche, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* **68**, 89-125.
- Kownatzki, R., Tummler, B. & Doring, G. (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* **1**, 1026-1027.

Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A. & other authors (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2839-2844.

Kurioka, S. & Liu, P. V. (1967). Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase c activity. *J Bacteriol* **93**, 670-674.

Lai, H. C., Gygi, D., Fraser, G. M. & Hughes, C. (1998). A swarming-defective mutant of *Proteus mirabilis* lacking a putative cation-transporting membrane P-type ATPase. *Microbiol* **144** (Pt 7), 1957-1961.

Lazazzera, B. A., Solomon, J. M. & Grossman, A. D. (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell* **89**, 917-925.

Lépine, F., Déziel, É., Milot, S. & Villemur, R. (2002). Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Mass Spectrom* **37**, 41-46.

Lequette, Y. & Greenberg, E. P. (2005). Timing and Localization of Rhamnolipid Synthesis Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol* **187**, 37-44.

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.

Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1998). N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**, 6384-6388.

Macnab, R. M. (1987). Motility and chemotaxis. **Umbarger (ed.), 732-759.** In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E.

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.

Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S. & Nishino, T. (1996). Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 909-913.

Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W. & Boucher, R. C. (1998). Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**, 1005-1015.

- Matsuyama, T., Sogawa, M. & Nakagawa, Y. (1989).** Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids. *FEMS Microbiol Lett* **61**, 243-246.
- Mattick, J. S. (2002).** Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**, 289-314.
- McBride, M. J. (2001).** Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* **55**, 49-75.
- McCarter, L. & Silverman, M. (1990).** Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* **4**, 1057-1062.
- McCarter, L. L. (1998).** OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **180**, 3166-3173.
- McCarter, L. L. (2004).** Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**, 18-29.
- 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.
- Minamino, T. & MacNab, R. M. (2000).** FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol* **37**, 1494-1503.
- Murray, T. S. & Kazmierczak, B. I. (2006).** FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 6995-7004.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6424-6428.
- Okujo, N., Akiyama, T., Miyoshi, S., Shinoda, S. & Yamamoto, S. (1996).** Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrin-bound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Immunol* **40**, 595-598.
- Park, R. Y., Sun, H. Y., Choi, M. H., Bai, Y. H., Chung, Y. Y. & Shin, S. H. (2006).** Proteases of a *Bacillus subtilis* clinical isolate facilitate swarming and siderophore-mediated iron uptake via proteolytic cleavage of transferrin. *Biol Pharm Bull* **29**, 850-853.

Parkins, M. D., Ceri, H. & Storey, D. G. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* **40**, 1215-1226.

Potvin, E., Lehoux, D. E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K. L., Sanschagrin, F., Lau, G. W. & Levesque, R. C. (2003). In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**, 1294-1308.

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.

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.

Rather, P. N. (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol* **7**, 1065-1073.

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.

Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24**, 309-319.

Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. (1995). Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun* **63**, 4868-4876.

Schooling, S. R., Charaf, U. K., Allison, D. G. & Gilbert, P. (2004). A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* **1**, 91-99.

Shiba, T., Ishiguro, K., Takemoto, N., Koibuchi, H. & Sugimoto, K. (1995). Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the *nfxB* gene. *J Bacteriol* **177**, 5872-5877.

Shigematsu, T., Fukushima, J., Oyama, M., Tsuda, M., Kawamoto, S. & Okuda, K. (2001). Iron-Mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* **45**, 579-590.

- 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.
- Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003).** *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.
- Sobel, M. L., Neshat, S. & Poole, K. (2005).** Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 1246-1253.
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F. & Deziel, E. (2005).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 718-725.
- Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A. & Grossman, A. D. (1995).** Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **9**, 547-558.
- Solomon, J. M., Lazazzera, B. A. & Grossman, A. D. (1996).** Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **10**, 2014-2024.
- Stahl, S. J., Stewart, K. R. & Williams, F. D. (1983).** Extracellular slime associated with *Proteus mirabilis* during swarming. *J Bacteriol* **154**, 930-937.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209.
- Sturgill, G. & Rather, P. N. (2004).** Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **51**, 437-446.
- 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.
- 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.
- Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. (2001).** An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem* **276**, 43122-43131.

- Vander Wauven, C., Pierard, A., Kley-Raymann, M. & Haas, D. (1984).** *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* **160**, 928-934.
- Velicer, G. J. & Yu, Y. T. (2003).** Evolution of novel cooperative swarming in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* **425**, 75-78.
- Walker, K. E., Moghaddame-Jafari, S., Virginia, L. C., Johnson, D. & Belas, R. (1999).** ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol* **32**, 825-836.
- Wang, Q., Frye, J. G., McClelland, M. & Harshey, R. M. (2006).** Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium* : genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol Microbiol* **52**, 169-197.
- Waters, C. M. & Bassler, B. L. (2005).** Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319-346.
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999).** Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13904-13909.
- 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.
- Wosten, M. M. & Groisman, E. A. (1999).** Molecular characterization of the PmrA regulon. *J Biol Chem* **274**, 27185-27190.
- Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M. & other authors (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental cell* **3**, 593-603.
- Young, G. M., Smith, M. J., Minnich, S. A. & Miller, V. L. (1999).** The *Yersinia enterocolitica* Motility Master Regulatory Operon, *flhDC*, Is Required for Flagellin Production, Swimming Motility, and Swarming Motility. *J Bacteriol* **181**, 2823-2833.
- Zhang, Y. & Miller, R. M. (1995).** Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2247-2251.
- Zhou, Z., Ribeiro, A. A., Lin, S., Cotter, R. J., Miller, S. I. & Raetz, C. R. (2001).** Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem* **276**, 43111-43121.

APPENDICE A

Tableaux des calculs et données.

Calculs et données pour la section 3.1.3 – Variation de NH_4Cl et de NaNO_3

Tableau V. Données relatives à la figure 16A.

Dans cette expérience, la concentration de chaque élément (sauf NH_4Cl) a été calculée pour un volume de 540 mL, mais un volume de 480 mL a été utilisé. Lors du versement du milieu dans les boîtes de Pétri, 40 mL de milieu était versé dans un tube Falcon™. Pour rétablir les concentrations normales de chaque éléments, le volume total dans le tube devait être de 45 mL. Le 5 mL manquant à ajouter était de l'eau à osmose inverse et/ou une solution de NH_4Cl 5M.

M9D

	MW (g/mol)	Molarité (mM)	Quantité (g) (calculée pour un volume de 540 mL)	Volume Réel (mL)	[] pour un volume de 480 mL					
NH_4Cl	53.5	0	0	0	0					
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	268,07	12	1,7371	480	0,01350					
KH_2PO_4	136,09	22	1,6167	480	0,02475					
NaCl	58	8.6	0,2694	480	0,00968					
Dextrose	180,6	11	1,0728	480	0,01238					
Agar	N/A		2,7000	480						
Molarité stock (mM)										
MgSO_4 (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113					
CaCl_2 (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113					
[N] (mM)	0	1	10	20	50	100	150	300	400	500
vol. total	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45

Volume de NH ₄ Cl (5M) à ajouter	0	0,009	0,09	0,18	0,45	0,9	1,35	2,7	3,6	4,5
Vol H ₂ O à ajouter	5,00	4,99	4,91	4,82	4,55	4,10	3,65	2,30	1,40	0,5

Tableau VI. Données relatives à la figure 16B.

Dans cette expérience, la concentration de chaque élément (sauf NH₄Cl) a été calculée pour un volume de 540 mL, mais un volume de 480 mL a été utilisé. Lors du versement du milieu dans les boîtes de Pétri, 40 mL de milieu était versé dans un tube Falcon™. Pour rétablir les concentrations normales de chaque éléments, le volume total dans le tube devait être de 45 mL. Le 5 mL manquant à ajouter était de l'eau à osmose inverse et/ou une solution de NaNO₃ 5M.

M9D

	MW (g/mol)	Molarité (mM)	Quantité (g) (calculée pour un volume de 540 mL)	Volume Réel (mL)	[] pour un volume de 480 mL					
NH ₄ Cl	53,5	0	0	0	0					
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	268,07	12	1,7371	480	0,01350					
KH ₂ PO ₄	136,09	22	1,6167	480	0,02475					
NaCl	58	8.6	0,2694	480	0,00968					
Dextrose	180,6	11	1,0728	480	0,01238					
Agar	N/A		2,7000	480						
Molarité stock (mM)										
MgSO ₄ (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113					
CaCl ₂ (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113					
[] (mM)	00,001	0,005	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,24	0,32	
vol. total	45	45	45	45	45	45	45	45	45	
Volume de NaNO ₃ (5 M) à ajouter	00,009	0,045	0,09	0,18	0,36	0,72	1,44	2,16	2,88	
Vol H ₂ O à ajouter	5,00	4,99	4,96	4,91	4,82	4,64	4,28	3,56	2,84	2,12

Section 3.1.4 – Variation de différentes sources de carbones

Tableau VII. Données relatives aux figures 17 et 20.

Dans cette expérience, la concentration de chaque élément (sauf dextrose) a été calculée pour un volume de 495 mL, mais un volume de 385 mL a été utilisé. Lors du versement du milieu dans les boîtes de Pétri, 40 mL de milieu était versé dans un tube Falcon™. Pour rétablir les concentrations normales de chaque éléments, le volume total dans le tube devait être de 45 mL. Le 5 mL manquant à ajouter était de l'eau à osmose inverse et/ou une solution de dextrose 2M ou citrate de sodium 1M.

M9

	MW (g/mol)	Molarité (mM)	Quantité (g) (calculée pour un volume de 495 mL)	Volume Réel (mL)	[] pour un volume de 385 mL				
NH ₄ Cl	53,5	0	0,5032	0	0				
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	268,07	12	1,5923	480	0,01350				
KH ₂ PO ₄	136,09	22	1,4820	480	0,02475				
NaCl	58	8.6	0,2469	480	0,00968				
Dextrose	180,6	11	0	480	0				
Agar	N/A		2,4750	480					
Molarité stock (mM)									
MgSO ₄ (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113				
CaCl ₂ (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113				
Dextrose									
[] (mM)	0	1	10	50	100	150	200	300	400
vol. total	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Volume de dextrose (2 M)	0	0,0225	0,225	1,125	2,25	3,375	4,5	6,75	9
Vol H ₂ O a ajouter	10,00	9,98	9,78	8,88	7,75	6,63	5,50	3,25	1,00

Citrate Na							
[] (mM)	0	1	10	50	100	150	200
vol. total	45	45	45	45	45	45	45
Volume de citrate Na (1 M)	0	0,045	0,45	2,25	4,5	6,75	9
Vol H ₂ O a ajouter	10,00	9,96	9,55	7,75	5,50	3,25	1,00

Tableau VIII. Données relatives aux figures 18 et 19.

Dans cette expérience, la concentration de chaque élément (sauf le dextrose) a été calculée pour un volume de 495 mL, mais un volume de 385 mL a été utilisé. Lors du versement du milieu dans les boîtes de Pétri, 40 mL de milieu était versé dans un tube Falcon™. Pour rétablir les concentrations normales de chaque éléments, le volume total dans le tube devait être de 45 mL. Le 5 mL manquant à ajouter était de l'eau à osmose inverse et/ou une solution de fructose 1 M ou ribose 1 M ou sucrose 1 M.

M9

	MW (g/mol)	Molarité (mM)	Quantité (g) (calculée pour un volume de 495 mL)	Volume Réel (mL)	[] pour un volume de 385 mL.
NH ₄ Cl	53,5	0	0,5032	0	0
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	268,07	12	1,5923	480	0,01350
KH ₂ PO ₄	136,09	22	1,4820	480	0,02475
NaCl	58	8.6	0,2469	480	0,00968
Dextrose	180,6	11	0	480	0
Agar	N/A		2,4750	480	
Molarité stock (mM)					
MgSO ₄ (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113
CaCl ₂ (solution)	1000	1	0.48	480	0,00113

Fructose							
[] (mM)	0	1	10	50	100	150	200
vol. total	45	45	45	45	45	45	45
Volume de fructose (1 M)	0	0,045	0,45	2,25	4,5	6,75	9
Vol H ₂ O à ajouter	10,00	9,96	9,55	7,75	5,50	3,25	1,00
Ribose							
[] (mM)	0	1	10	50	100	150	200
vol. total	45	45	45	45	45	45	45
Volume de ribose (1 M)	0	0,045	0,45	2,25	4,5	6,75	9
Vol H ₂ O à ajouter	10,00	9,96	9,55	7,75	5,50	3,25	1,00
Sucrose							
[] (mM)	0	1	10	50	100	150	200
vol. total	45	45	45	45	45	45	45
Volume de sucrose (1 M)	0	0,045	0,45	2,25	4,5	6,75	9
Vol H ₂ O à ajouter	10,00	9,96	9,55	7,75	5,50	3,25	1,00

Tableau IX. Données relatives à la figure 21.

Dans cette expérience, la concentration de chaque élément (sauf NH₄Cl) a été calculée pour un volume de 495 mL, mais un volume de 385 mL a été utilisé. Lors du versement du milieu dans les boîtes de Pétri, 40 mL de milieu était versé dans un tube Falcon™. Pour rétablir les concentrations normales de chaque éléments, le volume total dans le tube devait être de 45 mL. Le 5 mL manquant à ajouter était de l'eau par osmose inverse et/ou une solution de dextrose 2M ou citrate de sodium 1M.

M9D

	MW (g/mol)	Molarité (mM)	Quantité (g) (calculée pour un volume de 585 mL)	Volume Réal (mL)	[] pour un volume de 455 mL
NH ₄ Cl	53,5	0	0,5032	455	0
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	268,07	12	1,5923	455	0,01350
KH ₂ PO ₄	136,09	22	1,4820	455	0,02475
NaCl	58	8.6	0	0	0,00968
Dextrose	180,6	11	0,2918	455	0
Agar	N/A		2,4750	455	

Molarité stock (mM)

MgSO ₄ (solution)	1000	1	0.48	455	0,00113
CaCl ₂ (solution)	1000	1	0.48	455	0,00113

NaCl

[] (mM)	0	1	5	10	20	40	80	150	200	250	300
vol. total	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Volume de NaCl (5 M) à ajouter	0	0,009	0,045	0,09	0,18	0,36	0,72	1,35	1,8	2,25	2,7
Vol H ₂ O à ajouter	10,00	9,99	9,96	9,91	9,82	9,64	9,28	8,65	8,20	7,75	7,30

KCl

[] (mM)	0	1	10	20	50	100	200	300	400	500	600
vol. total	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Volume de KCl (4 M) à ajouter	0	0,011	0,112	0,225	0,562	1,125	2,25	3,375	4,5	5,625	6,75
Vol H ₂ O à ajouter	10,00	9,99	9,89	9,78	9,44	8,88	7,75	6,63	5,50	4,38	3,25

APPENDICE B

Composition des milieux de cultures et solutions utilisées

N.B. Tous les milieux rapportés ici ont été effectués avec de l'eau par osmose inverse.

Milieu liquide TSB standard

	[] (g/L)
« Tryptic soy broth »	30

Milieu liquide TSB pour cultiver transposants IS*lacZ*/hah

	[] (g/L)
« Tryptic soy broth »	30
Tétracycline	70 µg/mL

Gélose « swarming » avec milieu M9 + dextrose (M9D)

	<u>MW (g/mol)</u>	<u>Molarité (mM)</u>
NH ₄ Cl	53,5	19
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	268,07	12
KH ₂ PO ₄	136,09	22
NaCl	58	8,6
Dextrose	180,6	11
Agar	N/A	0,5%
	<u>Molarité stock (mM)</u>	
MgSO ₄ (solution)	1000	1

CaCl₂ • 2H₂O (solution) 1000 1

Gélose « swarming » avec milieu M9 + dextrose + « casamino acids » (M9DCAA)

- Milieu M9D auquel a été ajouté 0.5% de CAA.

Gélose « swarming » « Nutrient broth » (NB) + dextrose (NBD)

	[] (g/L)
0.5% Bacto-Agar	5
Nutrient Broth	8
Dextrose	5

Gélose de sélection « Tryptic soy broth » (TSB)

	[]
1.5% agar	15 g/L
“Tryptic soy broth”	30 g/L
Tétracycline	70 µg/mL
Chloramphénicol	20 µg/mL

Tampon TAE 50X

121 g Tris-Base

28.55 mL d'acide acétique glacial

50 mL d'EDTA 0,5M à pH 8

Compléter à 500 mL avec de l'eau distillée à osmose inversé

Filtrer sur 0,22 µM

Garder à température pièce

Fructose 1 M

18,016 g de fructose (MW = 180,16) dans 80 mL d'eau à osmose inversé

Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

Ribose 1 M

15,03 g de Ribose (MW = 150,13) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

Sucrose 1 M

34,23 g de Sucrose (MW = 342,3) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

Dextrose 1 M

18,016 g de Dextrose (MW = 180,16) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

Citrate de sodium 1 M

29,41 g de Citrate de sodium (MW = 294,1) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

NH₄Cl 5 M

26,75 g de NH₄Cl (MW = 53,5) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

NaNO₃ 5 M

42,495 g de NaNO₃ (MW = 84,99) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

NaCl 5 M

29,215 g de NaCl (MW = 58,43) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

KCl 2 M

14,91 g de KCl (MW = 74,56) dans 80 mL d'eau à osmose inversé
Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

Tétracycline (USB Corp.) 10 mg/mL

40 mg de tétracycline dans 40 mL d'éthanol 70%

Chloramphénicol (Sigma) 50 mg/mL

50 mg de chloramphénicol dans 1 mL d'éthanol 70%

FeCl₂ • 4H₂O 1 mM

0,002 g de FeCl₂ • 4H₂O (MW = 198,83) 100 mL d'eau à osmose inversé

CoCl₂ • 6H₂O 1 mM

0,0238 g de CoCl₂ • 6H₂O (MW = 237,93) 100 mL d'eau à osmose inversé

CuSO₄ • 5H₂O 1 mM

0,025 g de CuSO₄ • 5H₂O (MW = 249,7) 100 mL d'eau à osmose inversé

ZnCl₂ • 7H₂O 1 mM

0,029 g de ZnCl₂ (MW = 287,558) 100 mL d'eau à osmose inversé

CaCl₂ • 2H₂O 1 M

14,7 g de CaCl₂ • 2H₂O (MW = 147,02) 50 mL d'eau à osmose inversé

Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

MgSO₄ 1 M

12,04 g de MgSO₄ (MW = 120,38) 50 mL d'eau à osmose inversé

Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau à osmose inversé

APPENDICE C

Amorces et conditions des réactions PCR réalisées.

Tableau X. Séquences des amorces utilisées pour les réactions PCR.

Amorces	Séquence	Longueur	Utilité
LacZ-124L	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACC	24	Séquençage
LacZ-148	GGGTAACGCCAGGGTTTTCC	20	R2
LacZ-211	GGCGGGCCTCTTCGCTATTA	20	R1
CEKG4	CGCCACGCGTCGACTAGTAC	18	R2
CEKG-2A	GGCCACGCGTCGACTAGTANNNNNNNNNNAGAG	34	R1
CEKG-2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC	35	R1
CEKG-2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT	35	R1

Tableau XI. Concentrations des réactifs utilisés pour les réactions PCR.

RONDE 1

Réactifs	µL/Rx (UL) - 1 Rx
10x Tampon Taq	1
dNTPs 10 mM	0,2
Amorce lacZ-211 10 pmol/UL	0,5
Amorce CEKG 2A 10 pmol/µL	0,2
CEKG 2B 10 pmol/UL	0,2
CEKG 2C 10 pmol/UL	0,2
H ₂ O	7,1

Taq (NEB)	0,1
ADN	0,5
Total	10
vol/Rx (UL)	10

RONDE 2

Réactifs	UL/Rx (UL) - 1 Rx
10x TSG Buffer	5
dNTPs 10 mM	1
Amorce de la ronde 2 10 pmol/UL (lacZ-148)	2,5
CEKG 4 10 pmol/UL	2,5
H ₂ O	36
TSG Enzyme	0,5
Produit de la ronde 1 (Template)	2,5
Total	50
vol/Rx (UL)	50

Tableau XII. Programme des réactions PCR réalisées.

RONDE 1

Étape	Température	Temps	Notes
1	94°C	30''	Dénaturation
2	42°C	30''	Appariement; diminuer la température de 1°C à chaque cycle
3	72°C	3'	Extension

4	Aller à l'étape 2		6 cycles; ensuite aller à l'étape 5
5	94°C	30''	Dénaturation
6	64°C	30''	hybridation
7	72°C	3'	Extension
8	Aller à l'étape 6		25 cycles; ensuite aller à l'étape 9
9	72°C	7'	Extension finale
10	4°C	En attente	Fin

RONDE 2

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

APPENDICE D

Photos des transposants incapables de motilité de type « swarming ». Pour toutes les photos, la rangée du haut correspond au milieu M9DCAA et celle du bas au milieu NBD. Les géloses inoculées ont été respectivement incubées à 30°C et 34°C pendant 16 h.

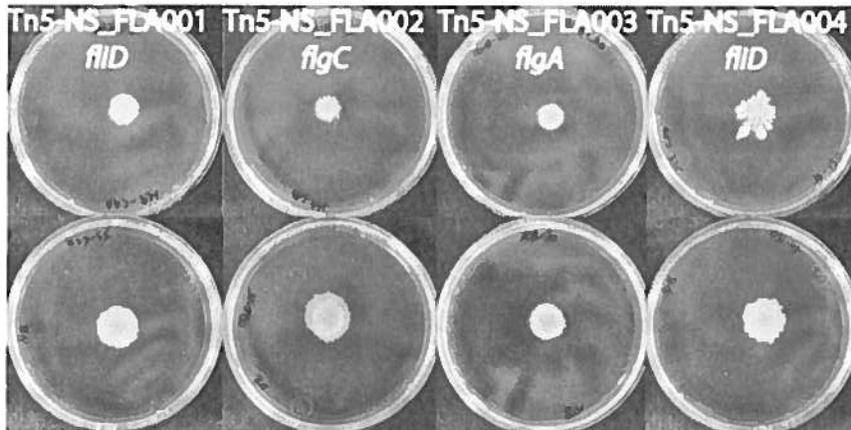


Figure 34. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans la production et le fonctionnement des flagelles.

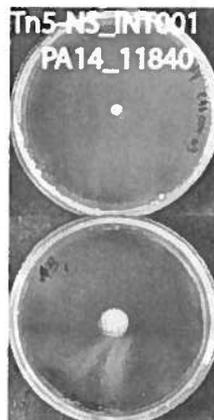


Figure 35. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des régions intergéniques.

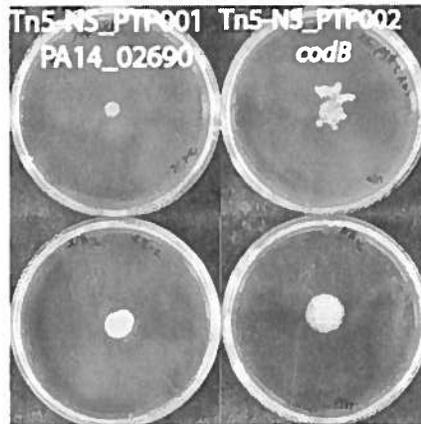


Figure 36. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de perméases, pompes à efflux ou transporteurs.

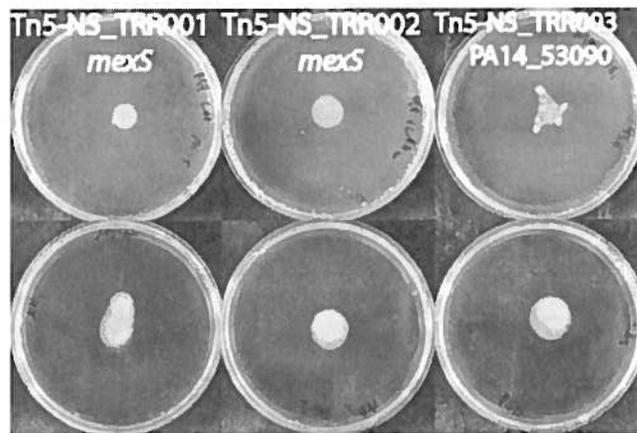


Figure 37. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels.

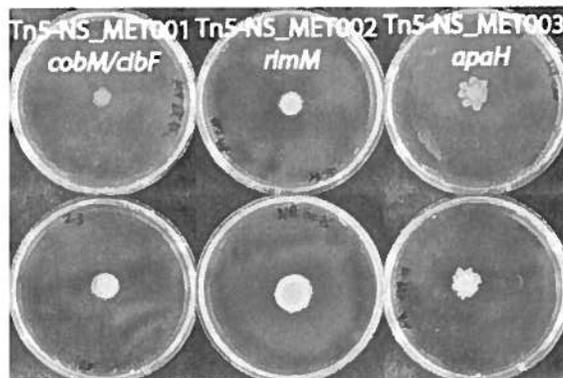


Figure 38. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire.

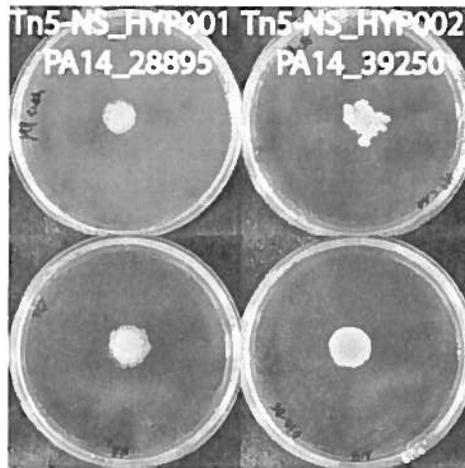


Figure 39. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des protéines hypothétiques.

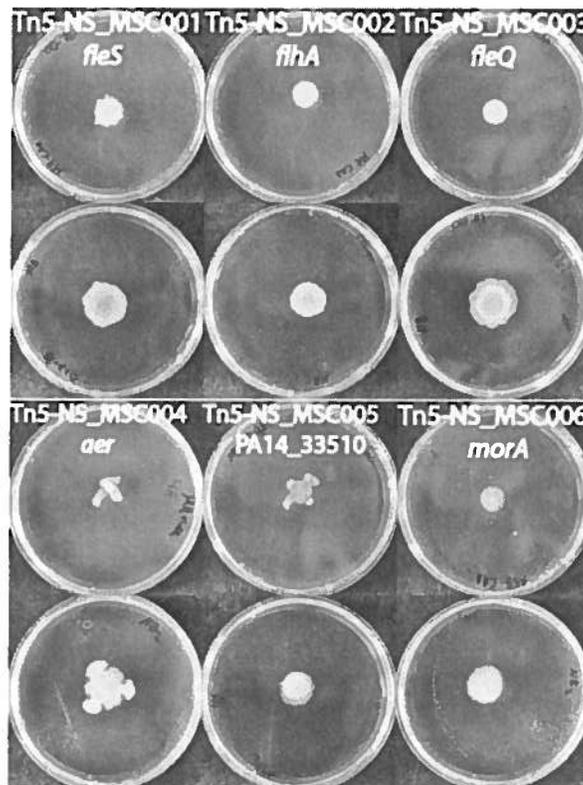


Figure 40. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de fonction diverses.

APPENDICE E

Photos des transposants affectés dans la motilité de type « swarming ». Pour toutes les photos, la rangée du haut correspond au milieu M9DCAA et celle du bas au milieu NBD. Les géloses inoculées ont été respectivement incubées à 30°C et 34°C pendant 16 h.

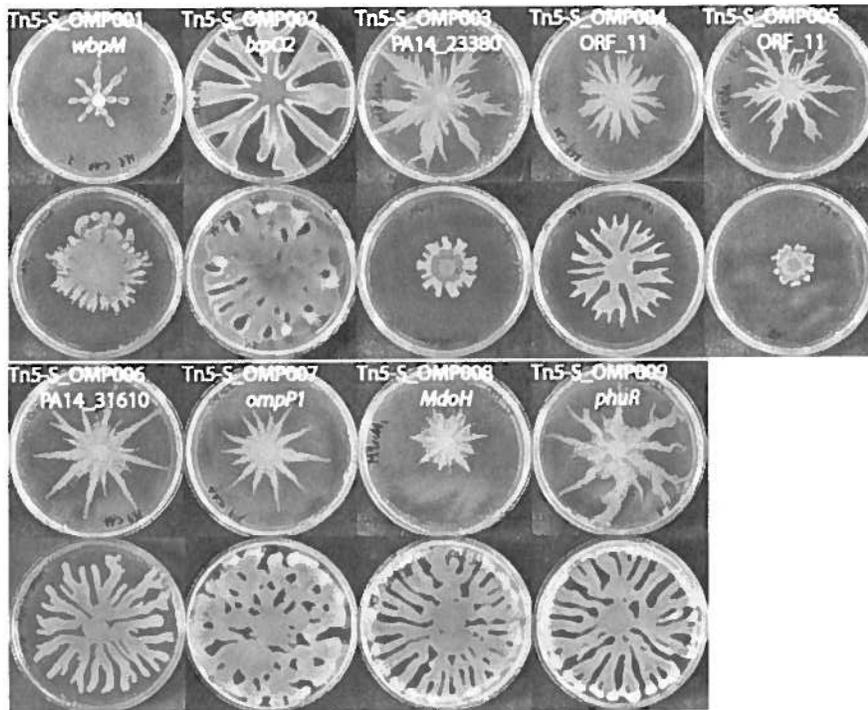


Figure 41. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de protéines membranaires externes.

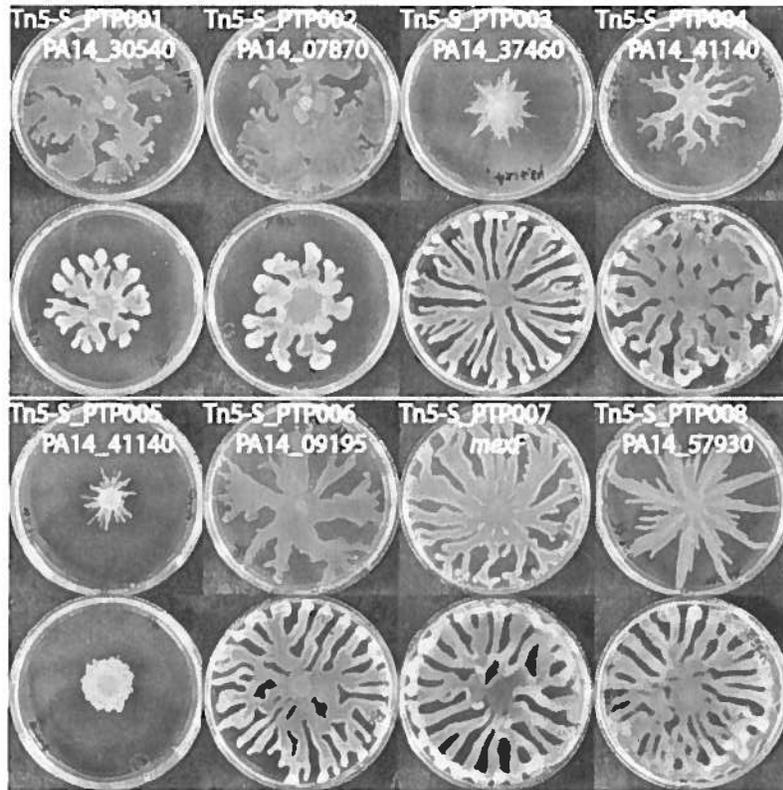


Figure 42. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de perméases, pompes à efflux ou transporteurs.

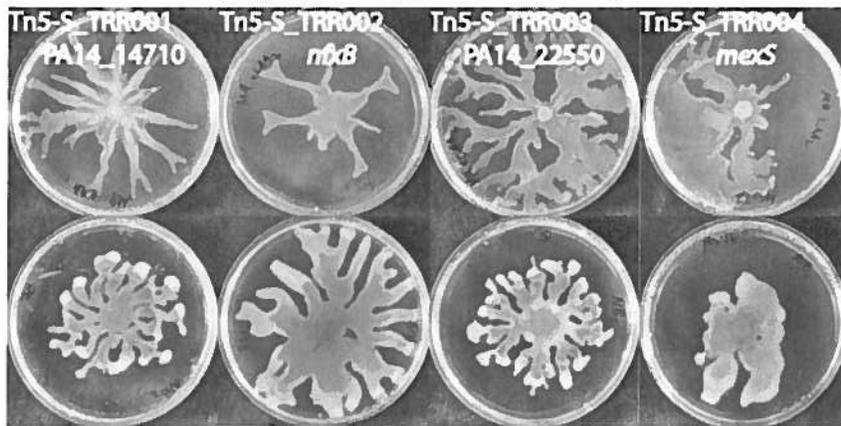


Figure 43. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels.

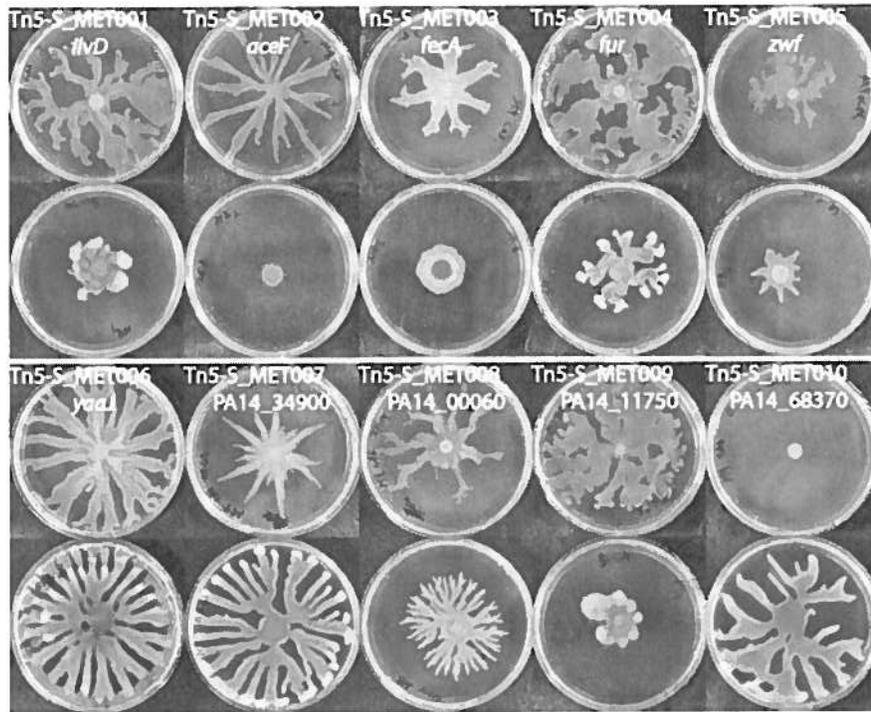


Figure 44. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire.

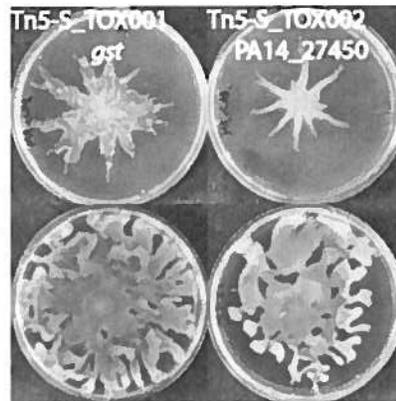


Figure 45. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des protéines de stress.

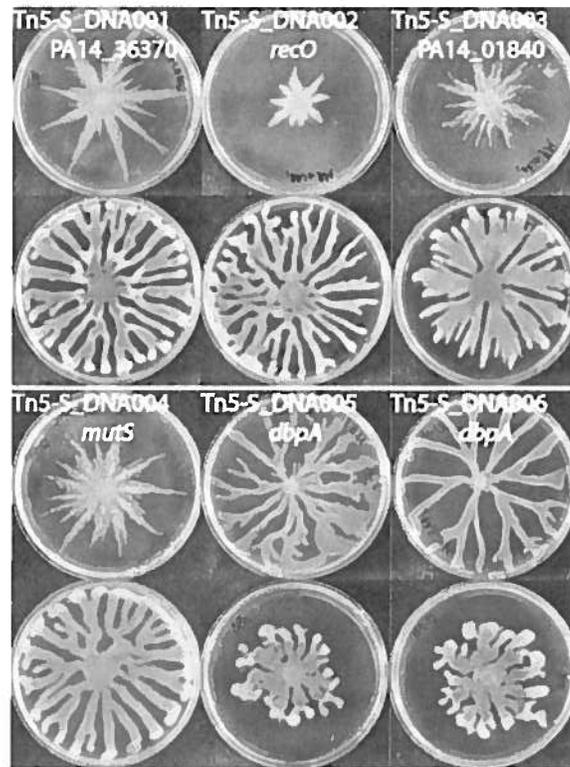


Figure 46. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes impliqués dans la maturation/réplication de l'ADN/ARN.

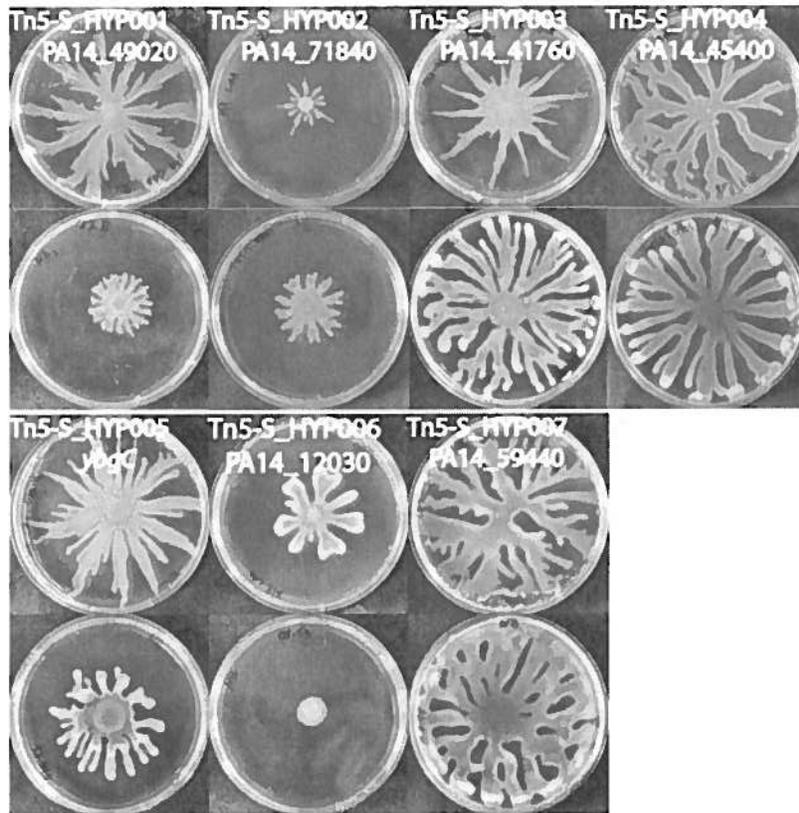


Figure 47. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des protéines hypothétiques.

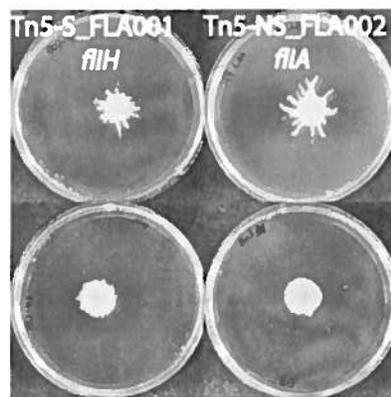


Figure 48. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes codant pour des éléments de la machinerie flagellaire.

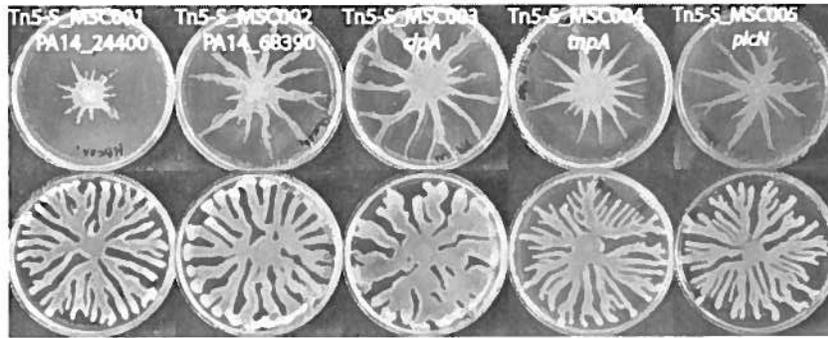


Figure 49. Phénotype de « swarming » des transposants affectés dans des gènes de fonctions diverses.

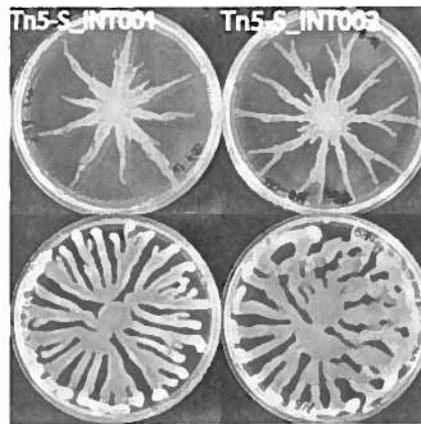
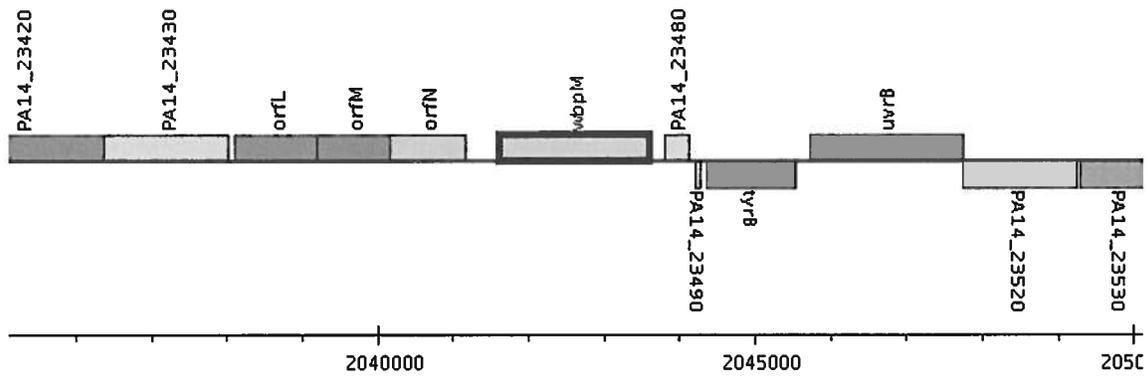


Figure 50. Phénotype de « swarming » des transposants ayant des insertions dans une région intergénique.

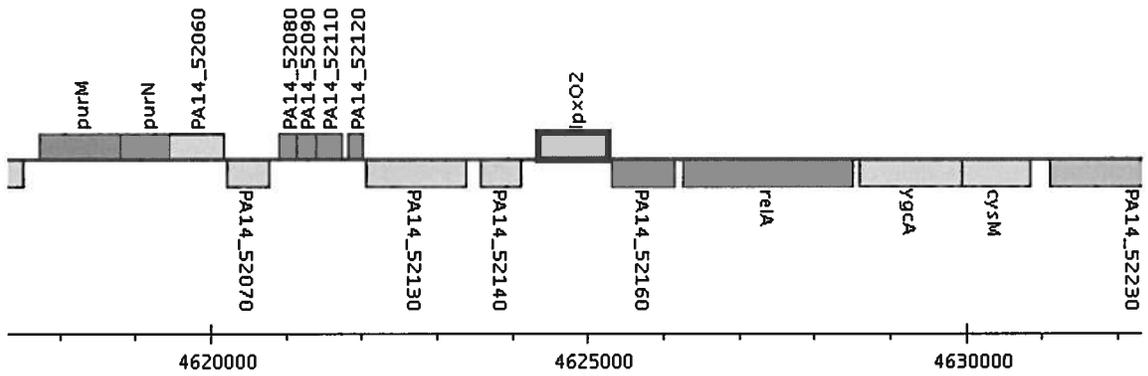
APPENDICE F

Contexte insertionnel des transposants affectés dans le « swarming ». Données prises sur www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2005).

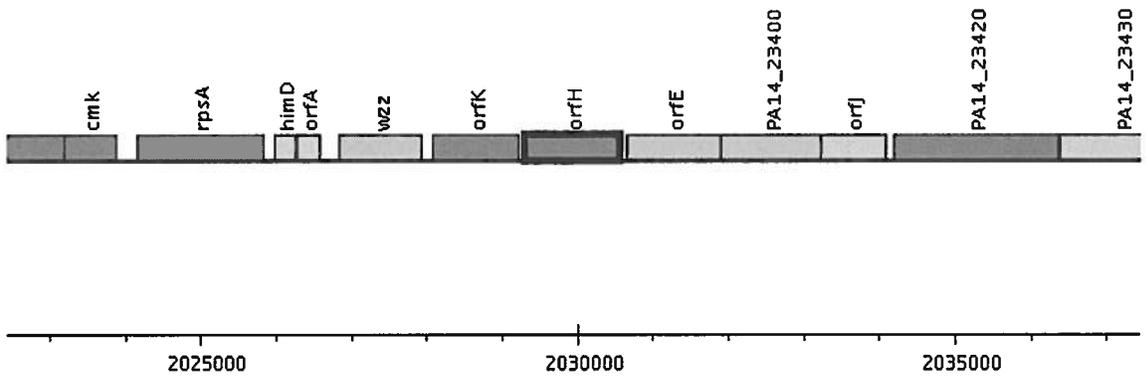
S_OMP001



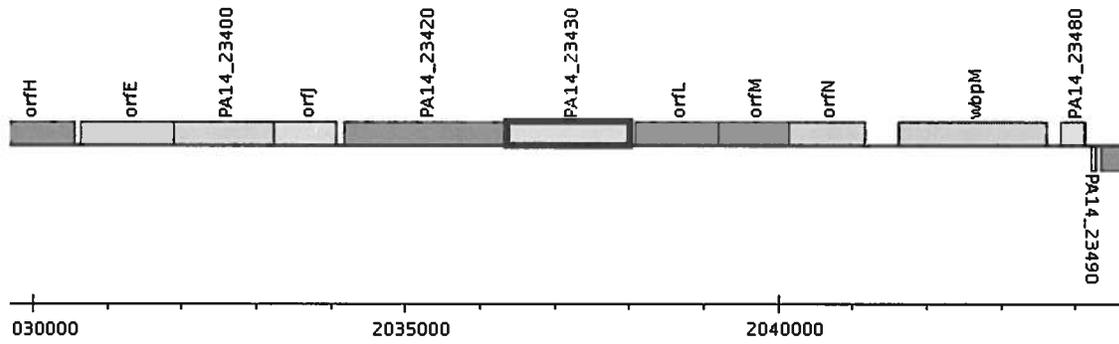
S_OMP002



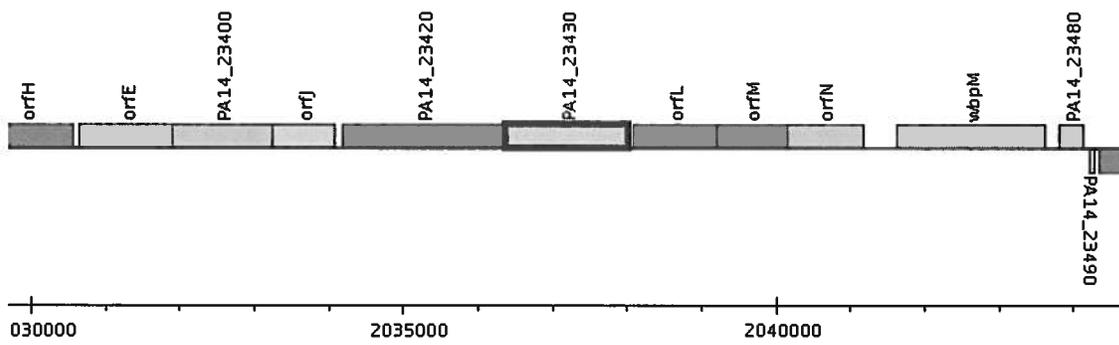
S_OMP003



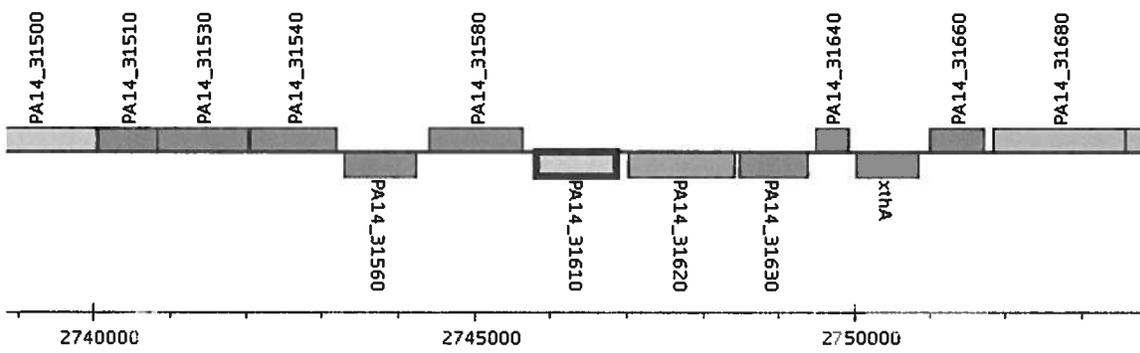
S_OMP004



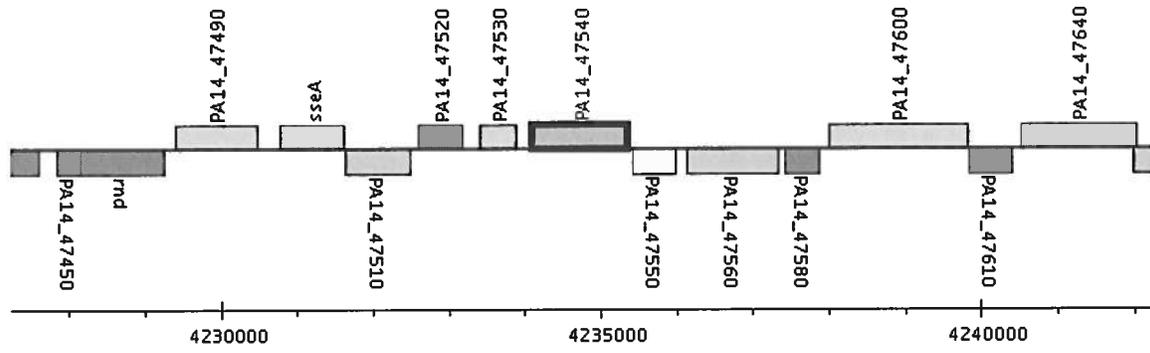
S_OMP005



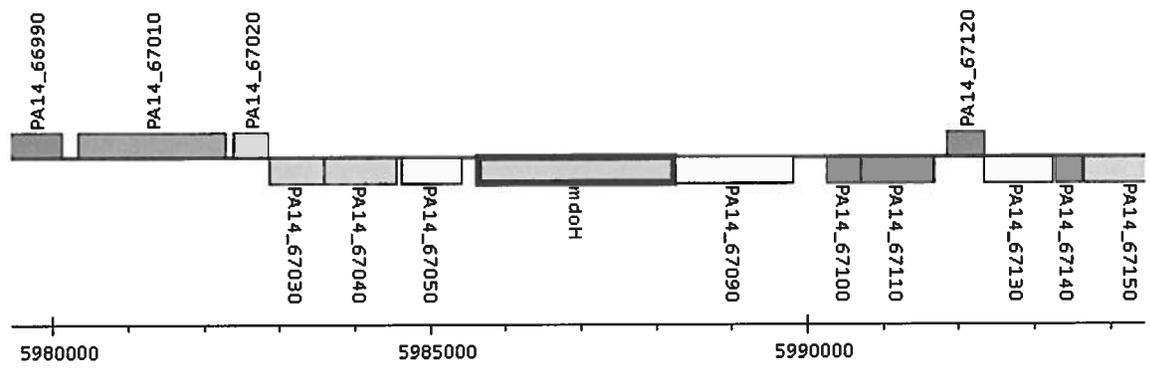
S_OMP006



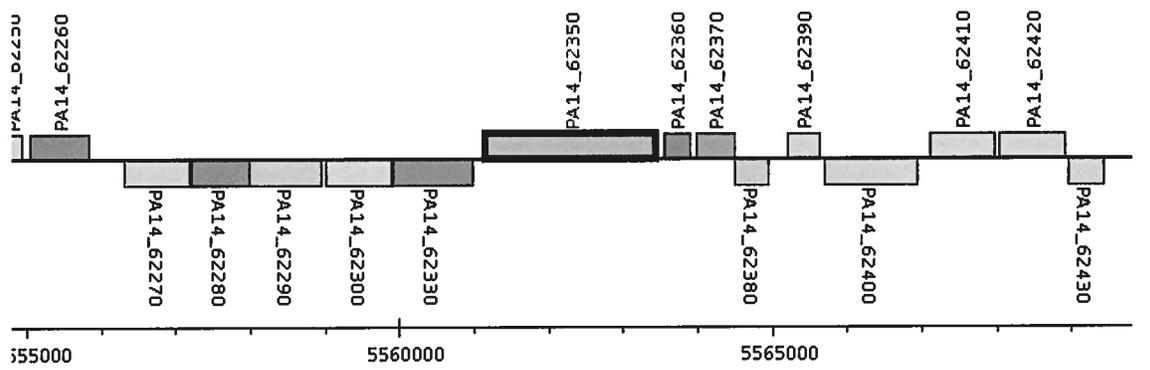
S_OMP007



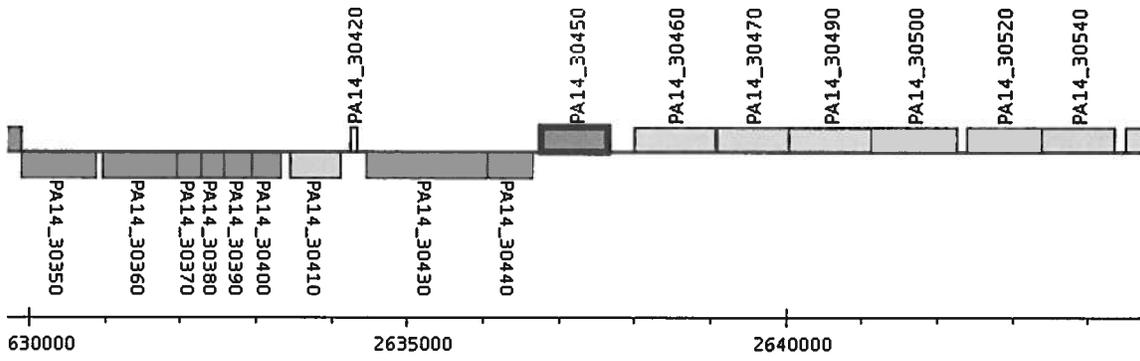
S_OMP008



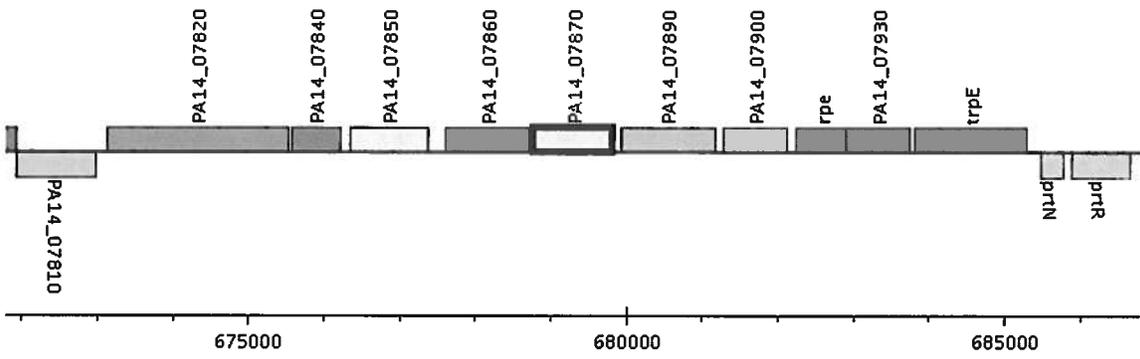
S_OMP009



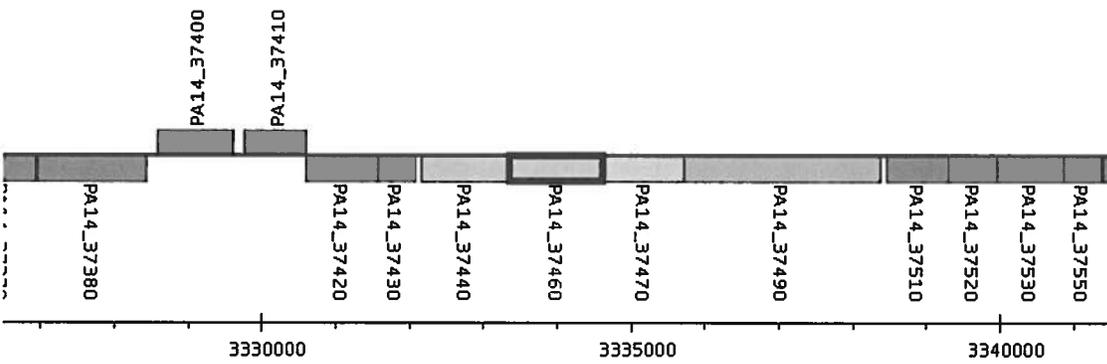
S_PTP001



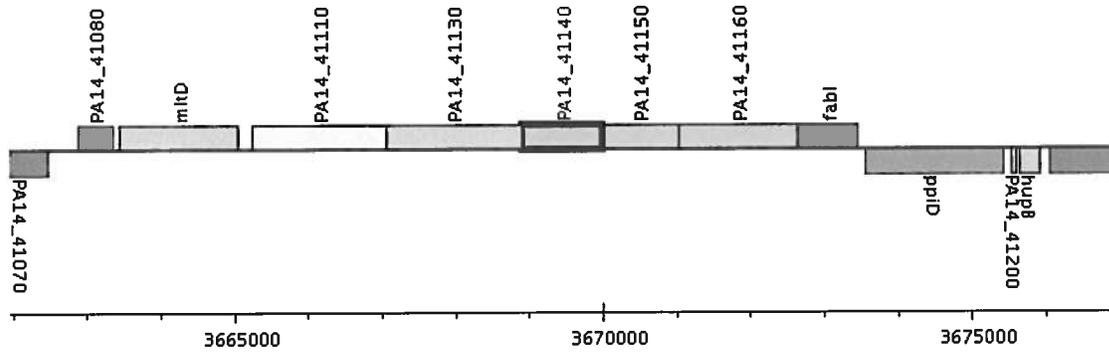
S_PTP002



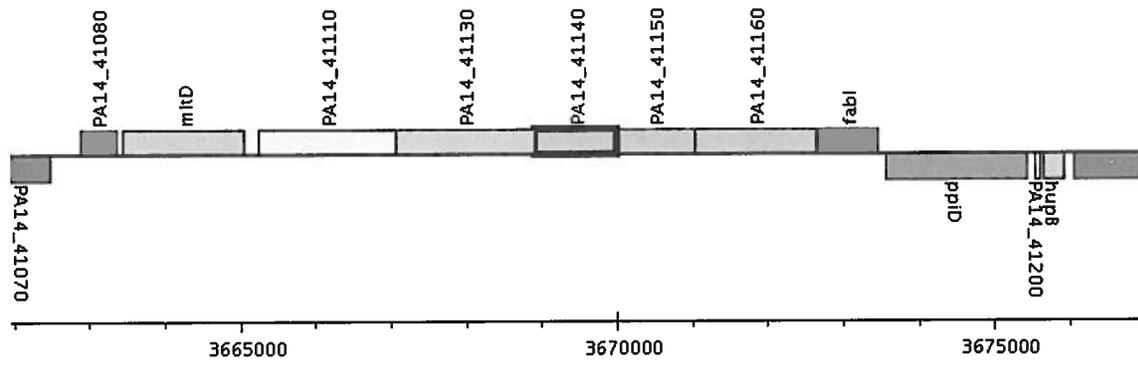
S_PTP003



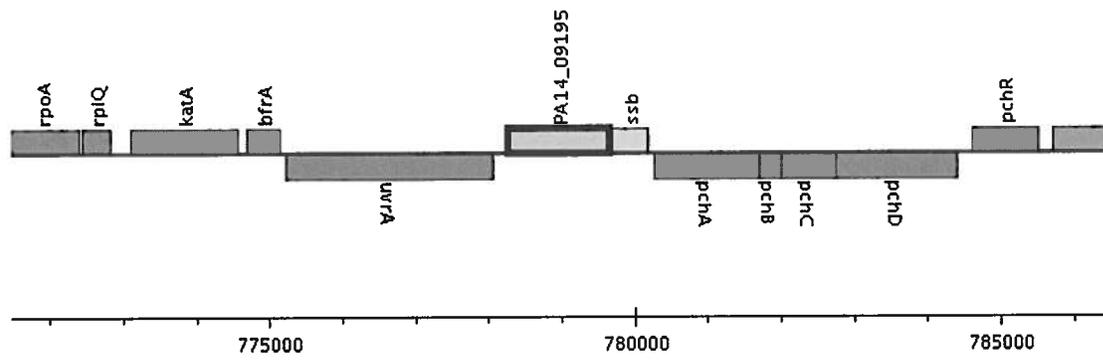
S_PTP004



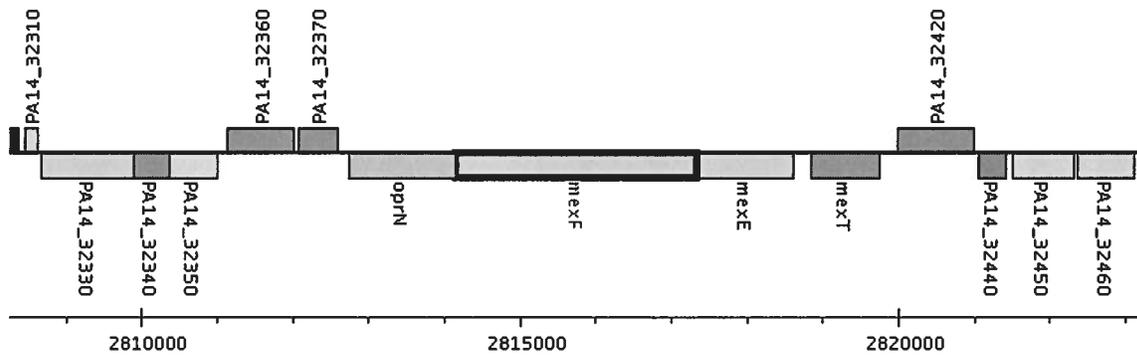
S_PTP005



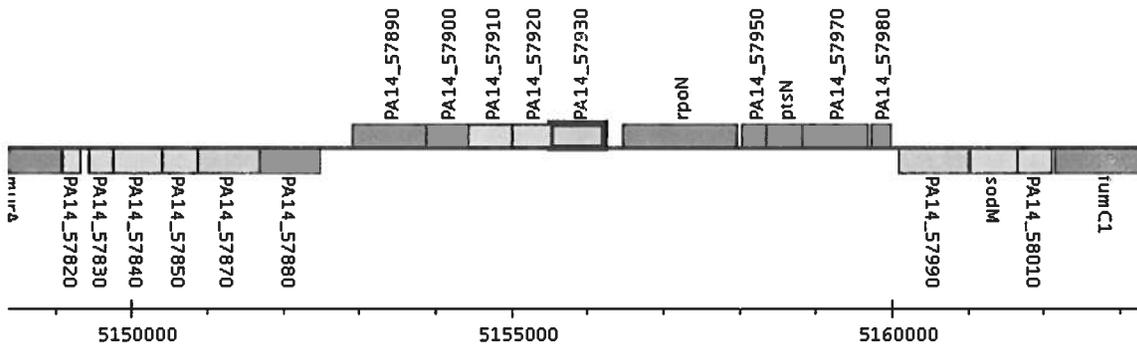
S_PTP006



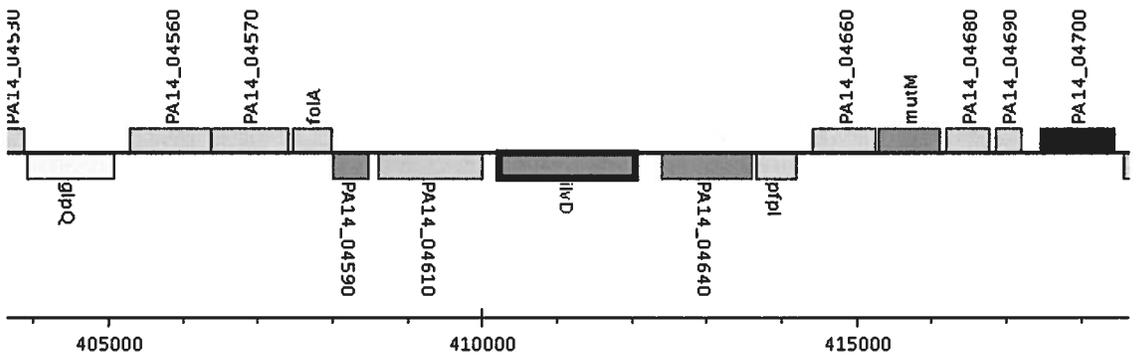
S_PTP007



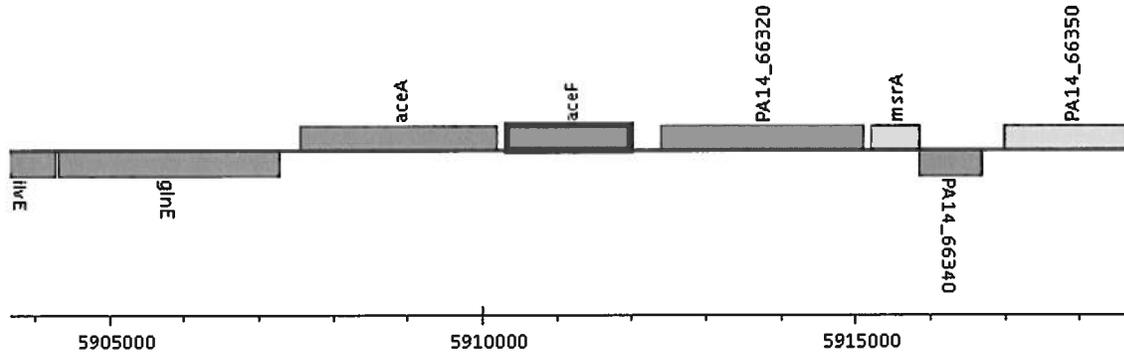
S_PTP008



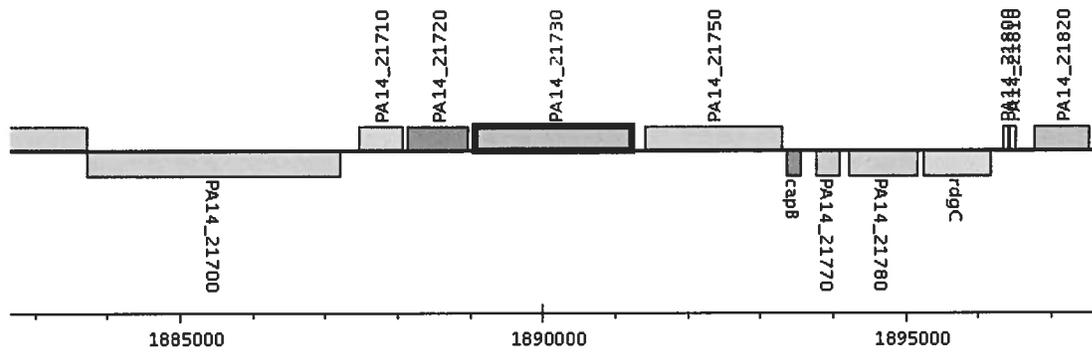
S_MET001



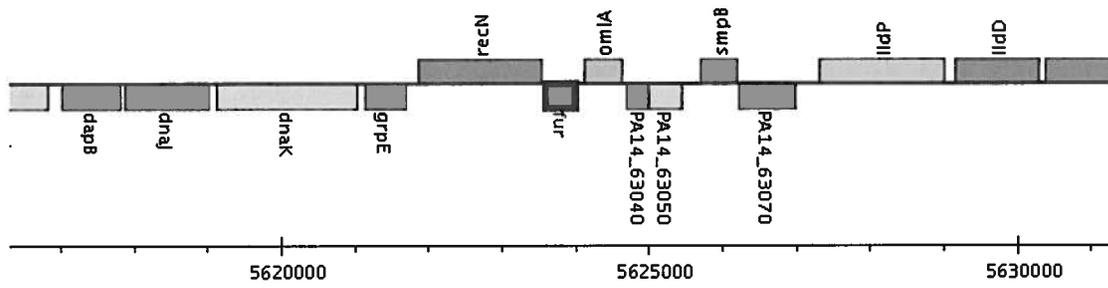
S_MET002



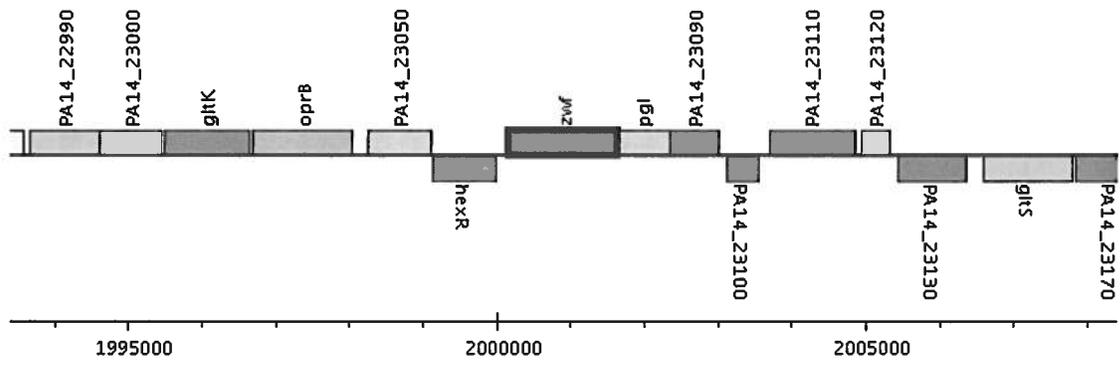
S_MET003



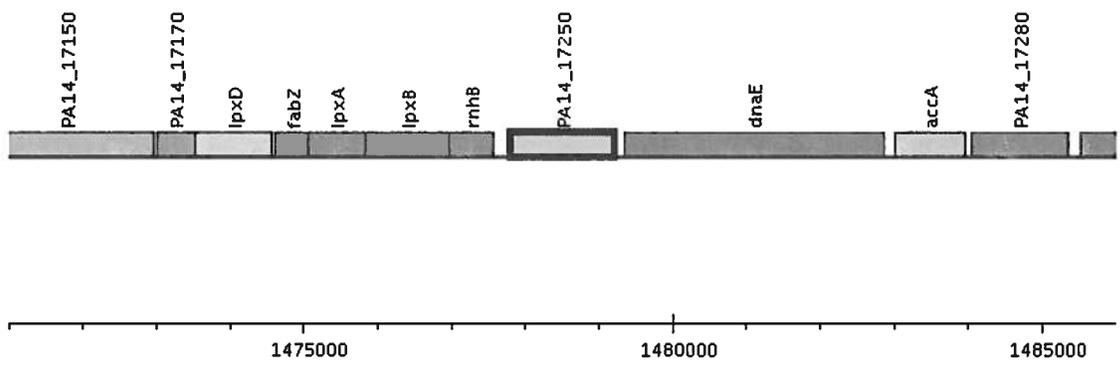
S_MET004



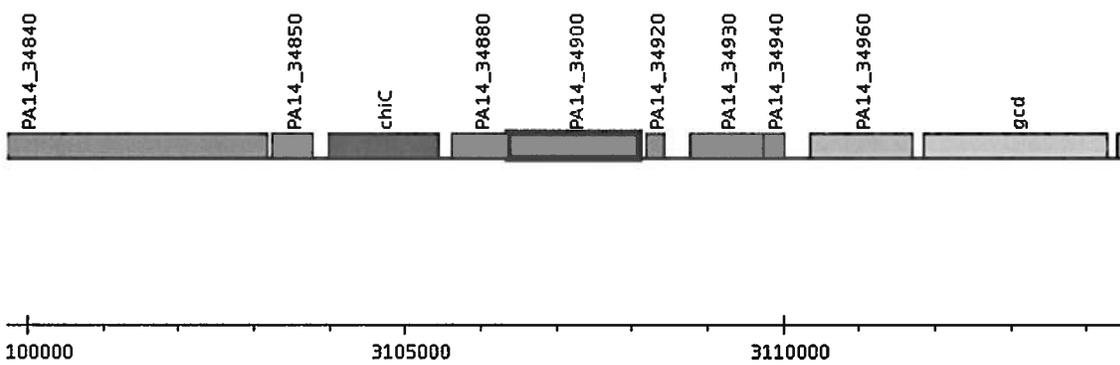
S_MET005



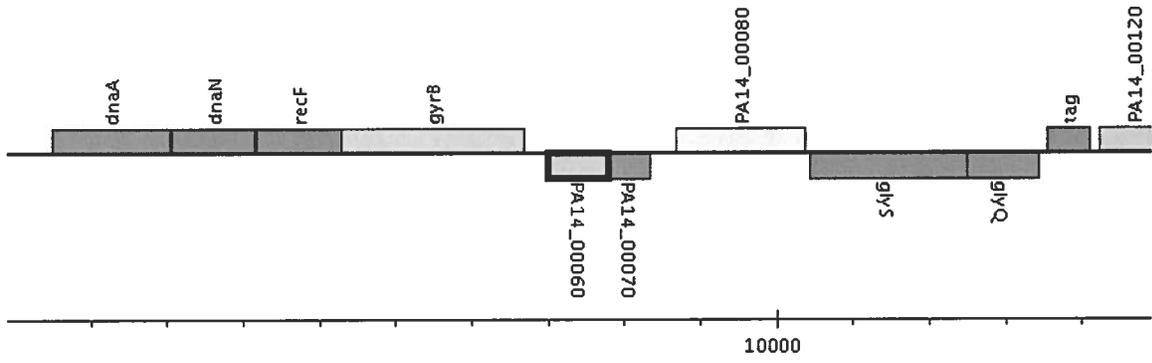
S_MET006



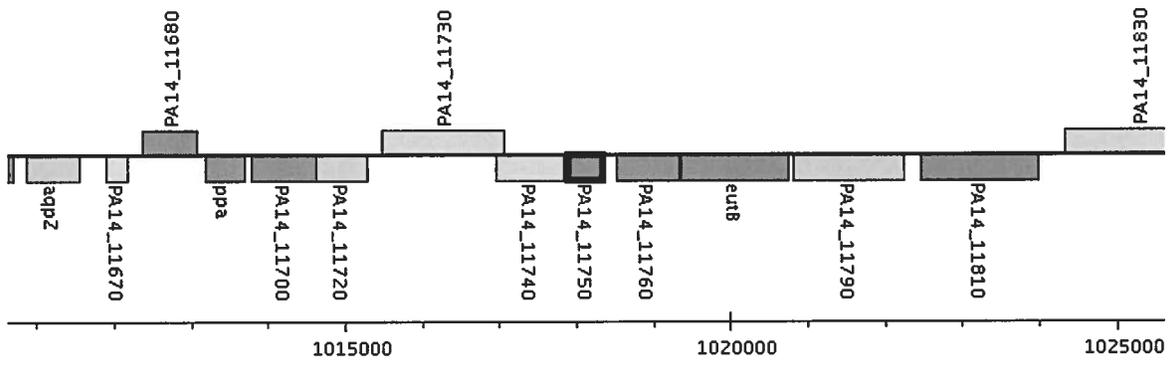
S_MET007



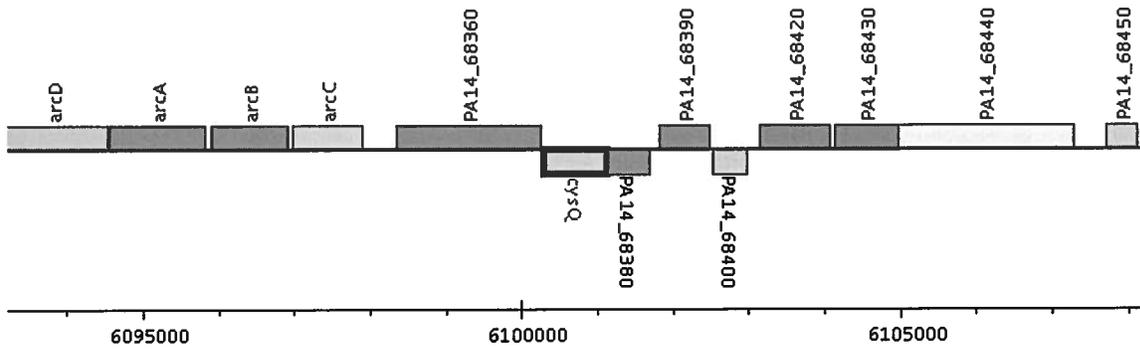
S_MET008



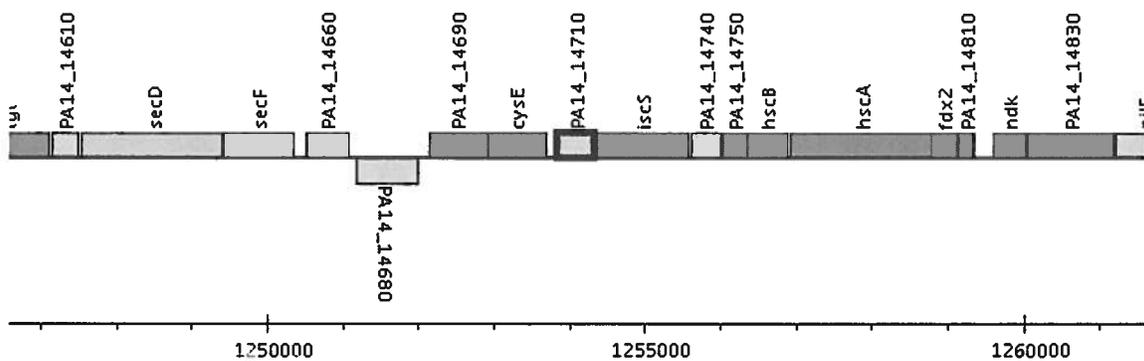
S_MET009



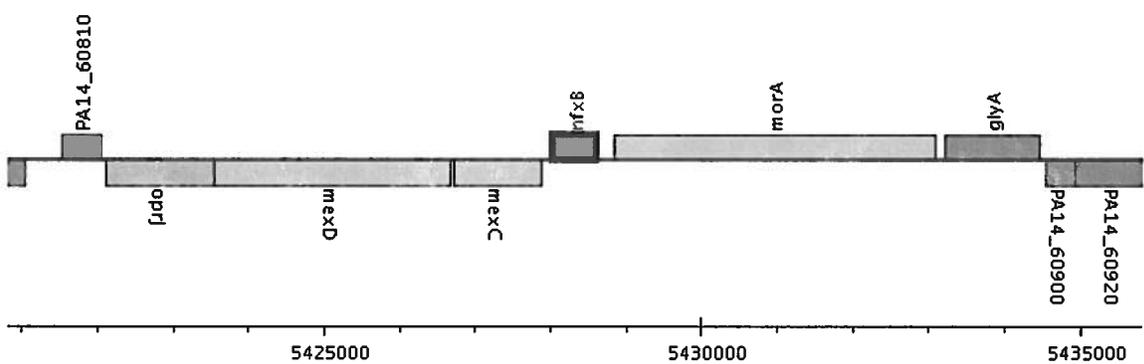
S_MET010



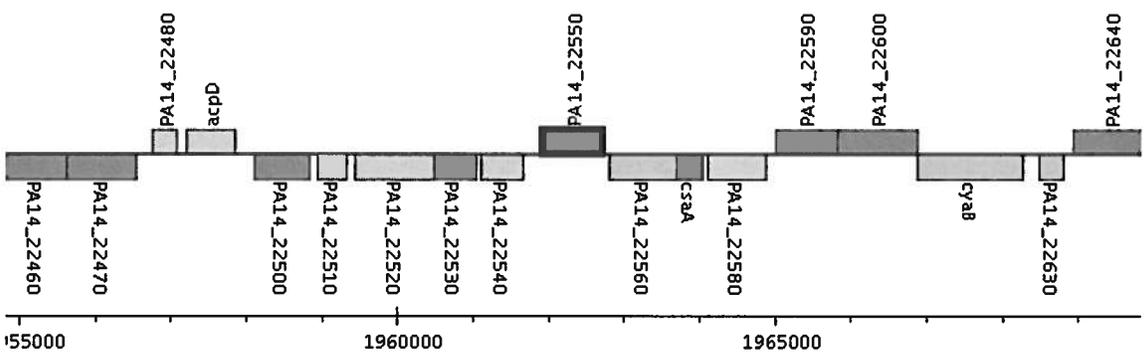
S_TTR001



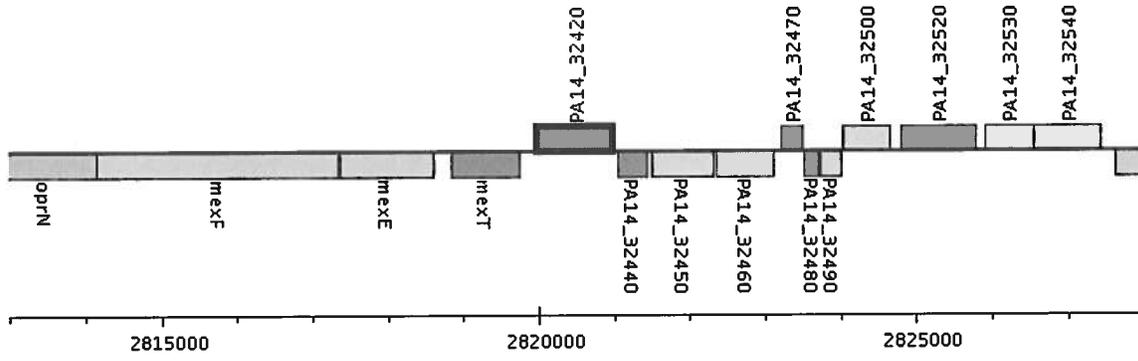
S_TTR002



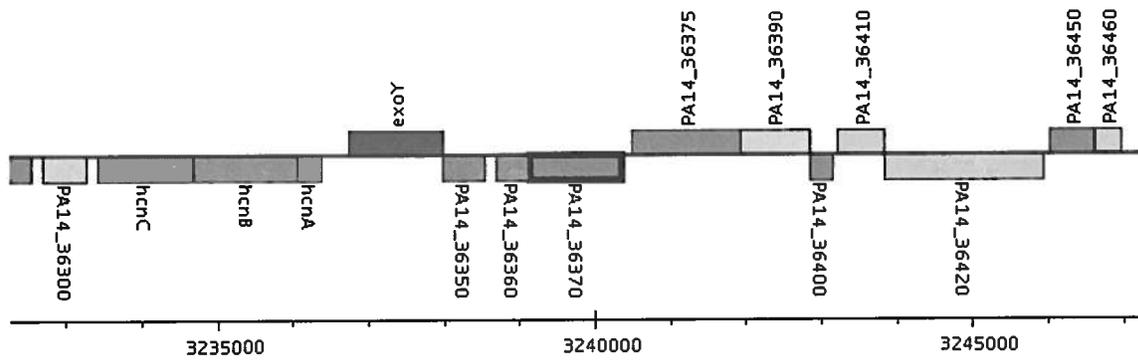
S_TTR003



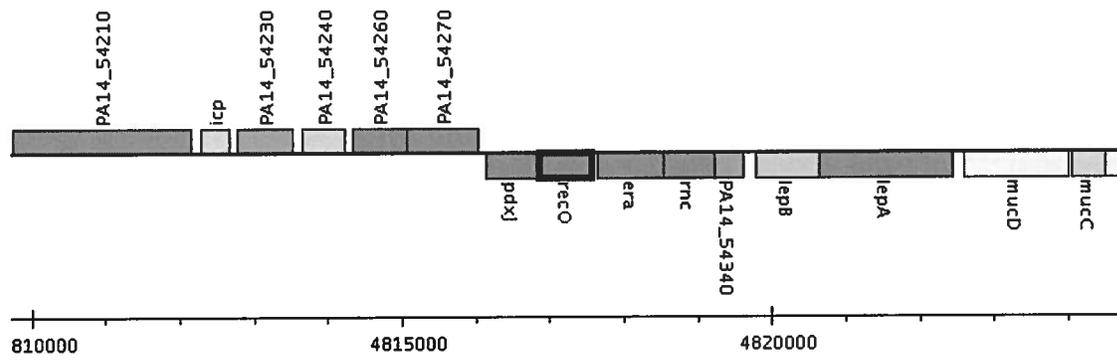
S_TRR004



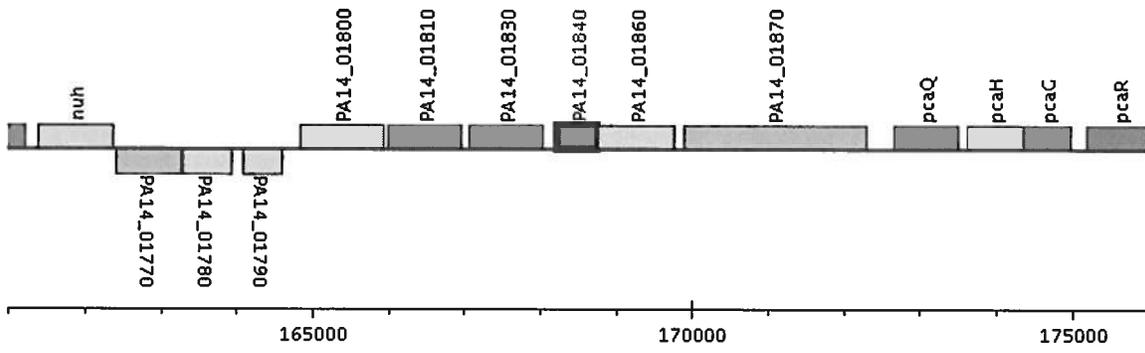
S_DNA001



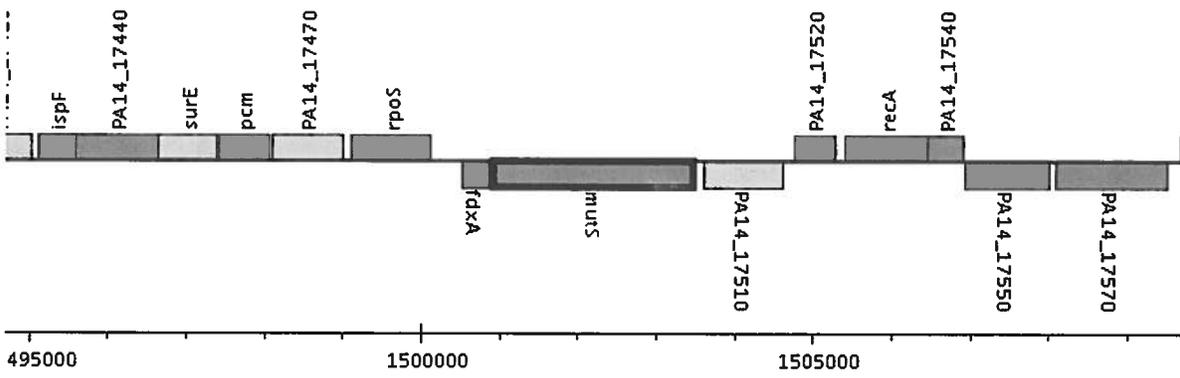
S_DNA002



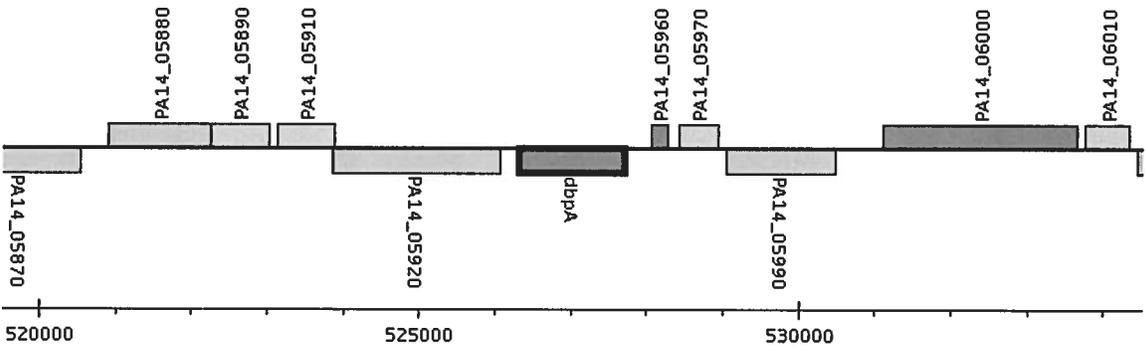
S_DNA003



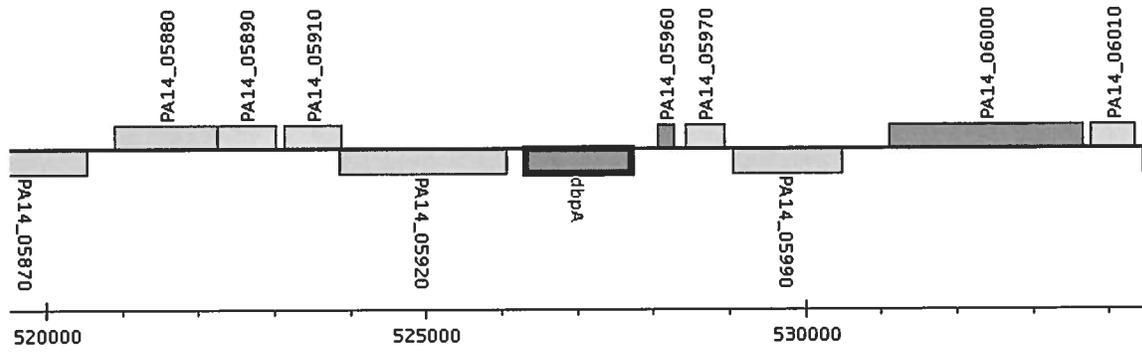
S_DNA004



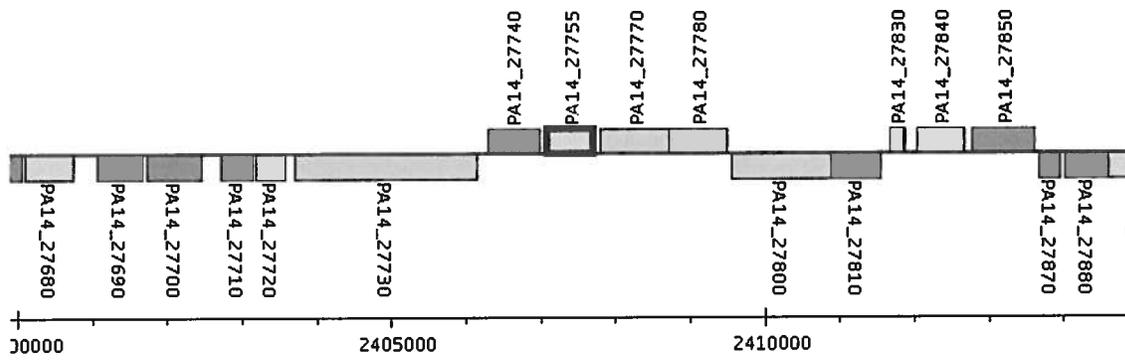
S_DNA005



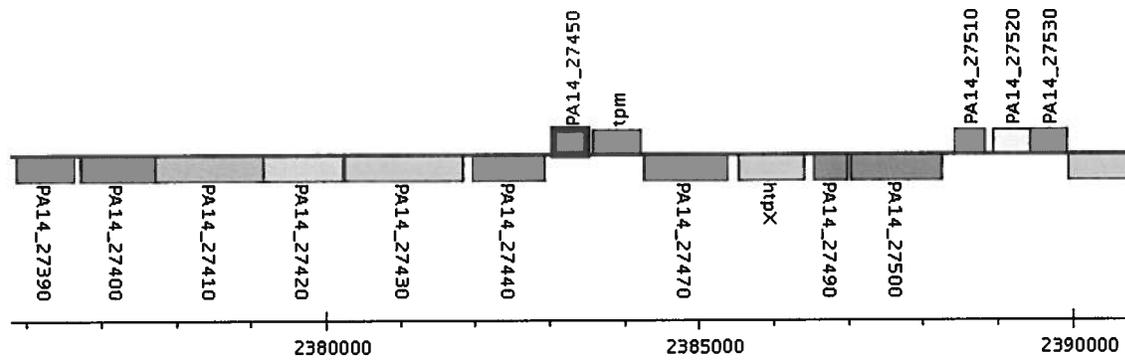
S_DNA006



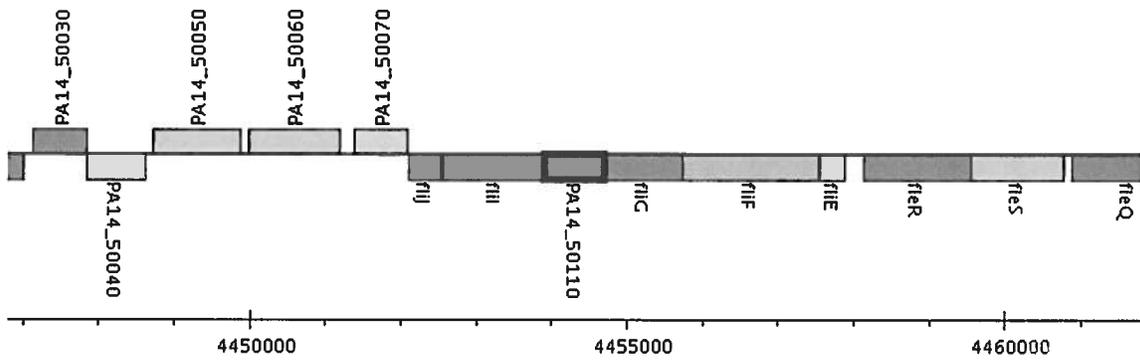
S_TOX001



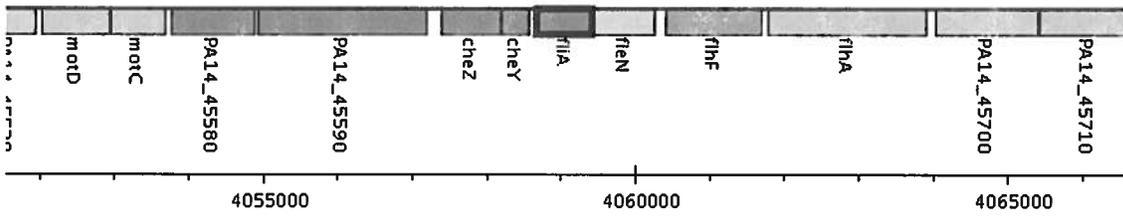
S_TOX002



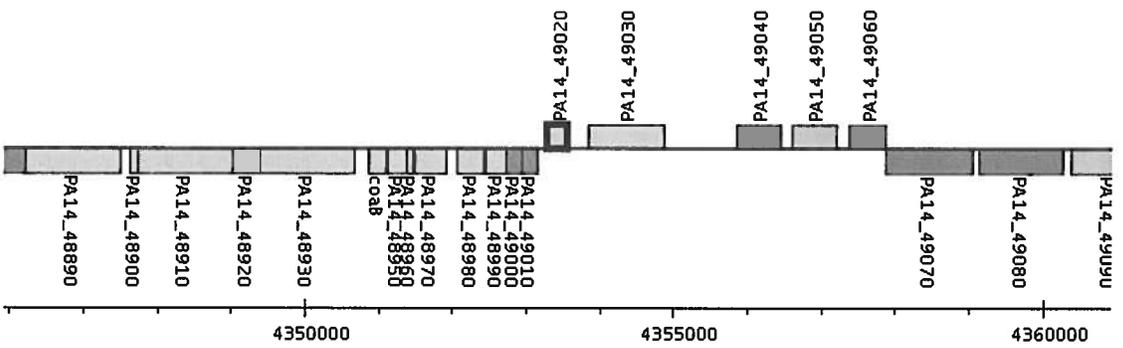
S_FLA001



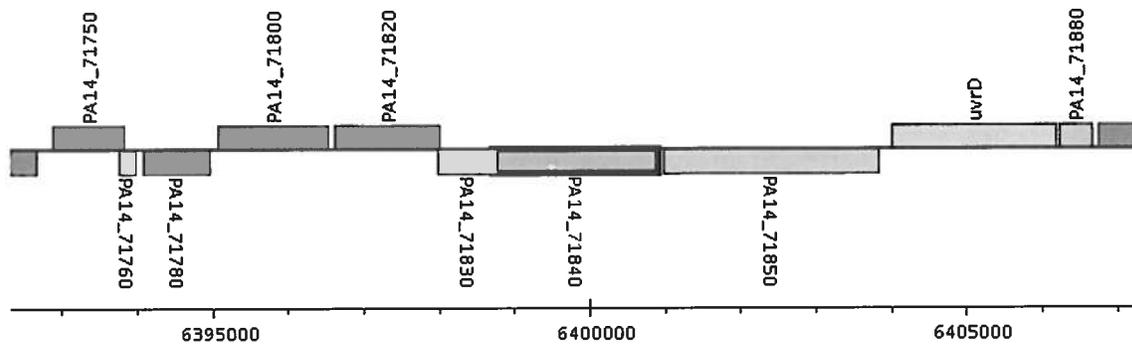
S_FLA002



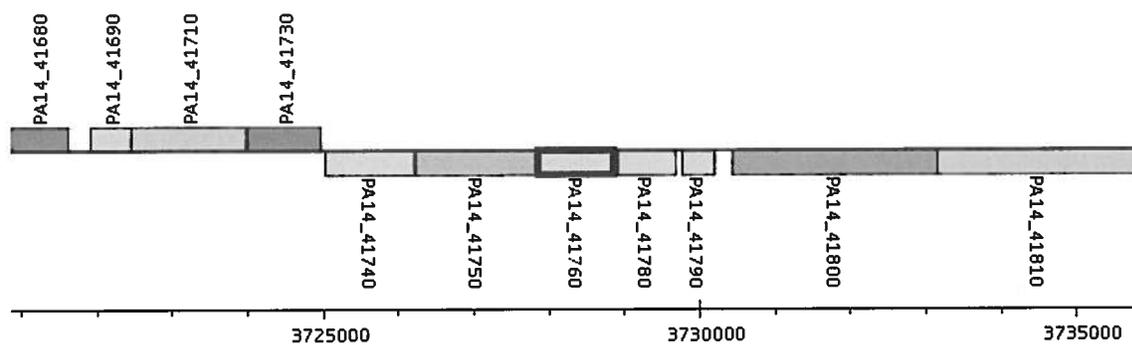
S_HYP001



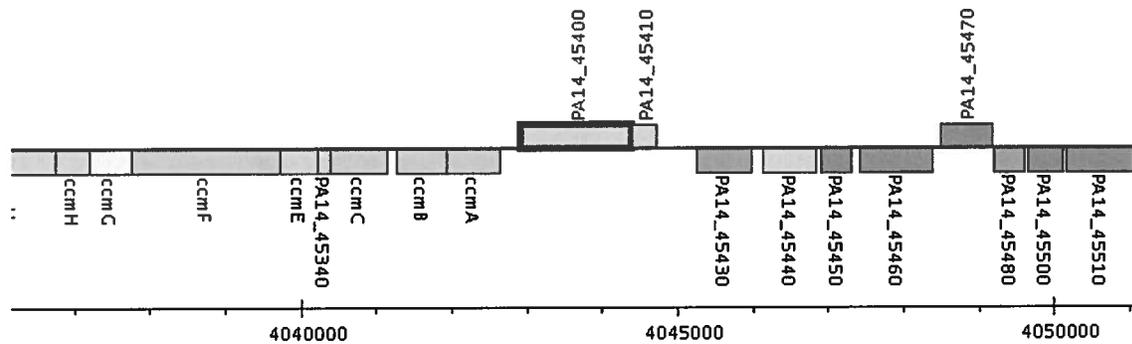
S_HYP002



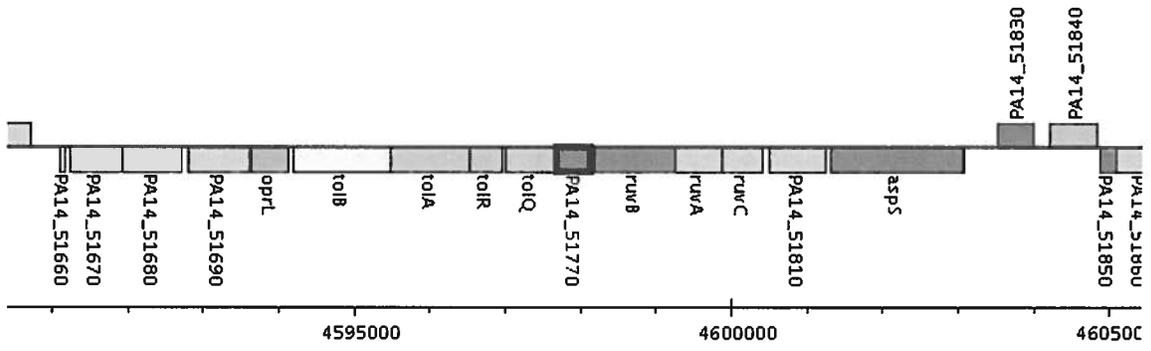
S_HYP003



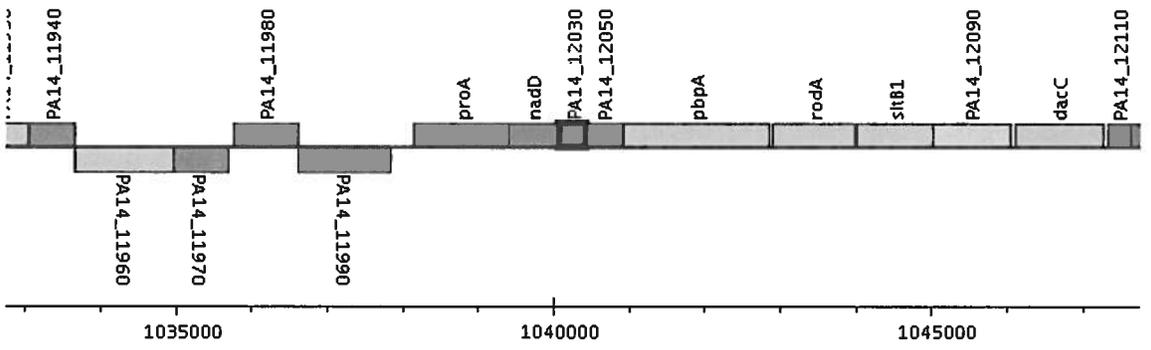
S_HYP004



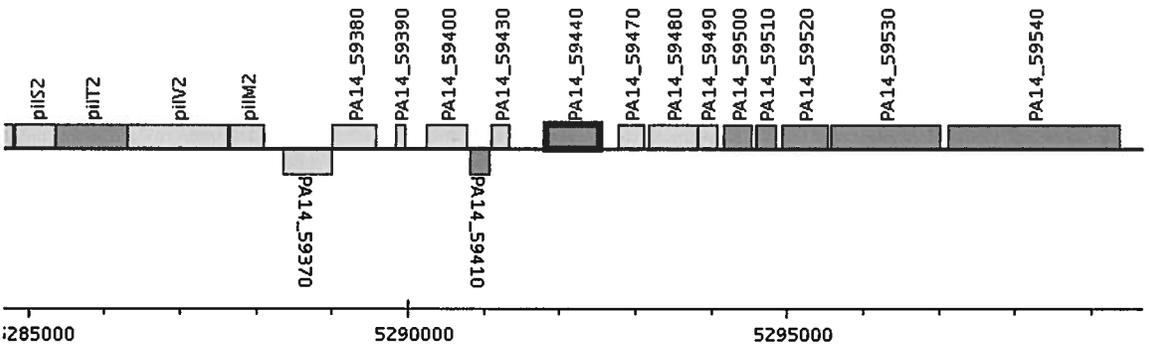
S_HYP005



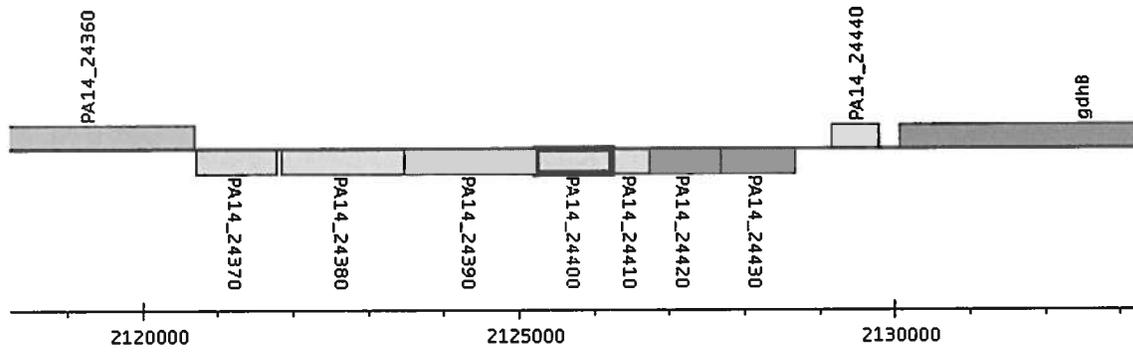
S_HYP006



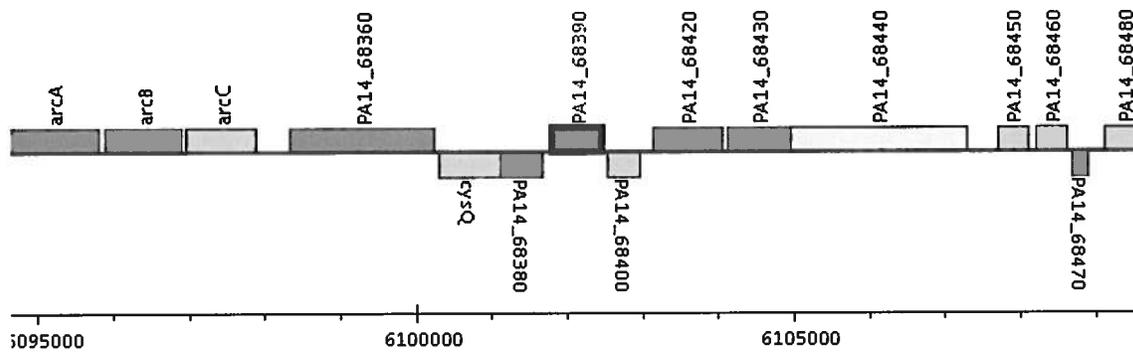
S_HYP007



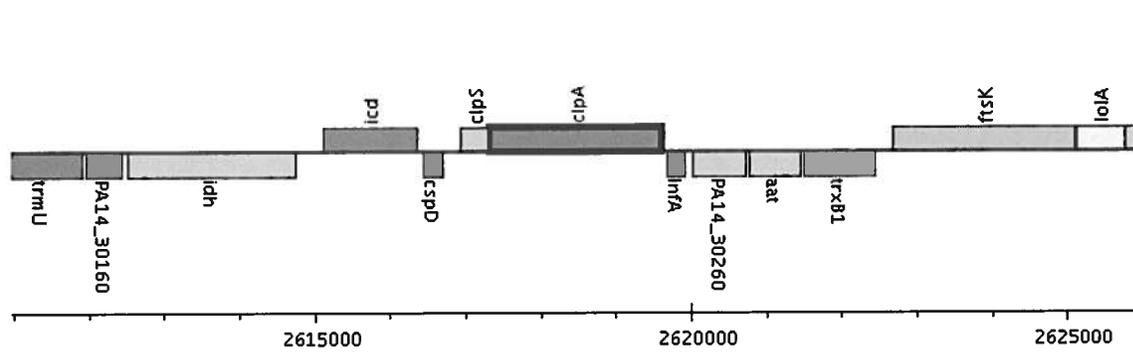
S_MSC001



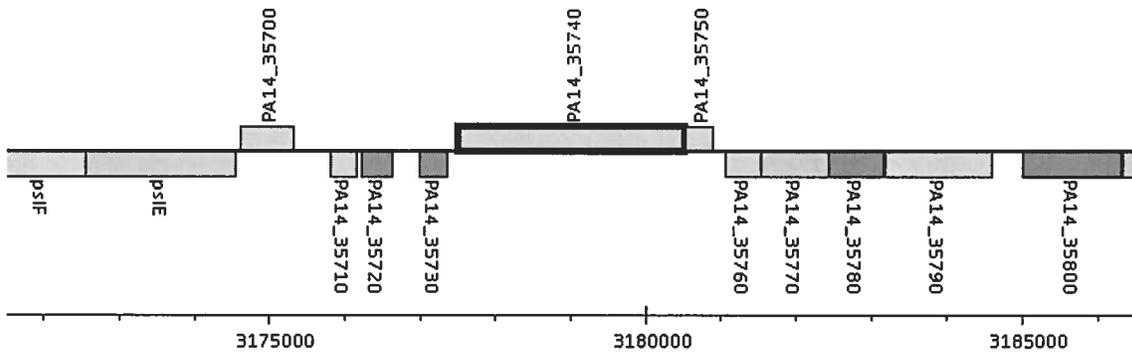
S_MSC002*



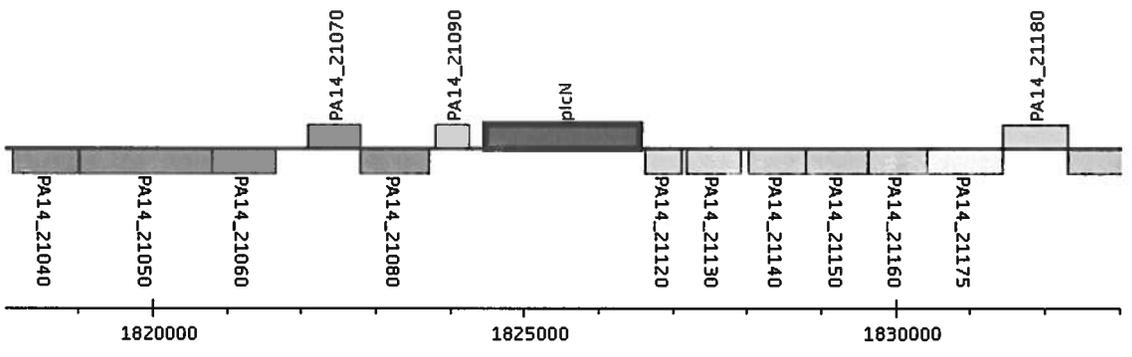
S_MSC003



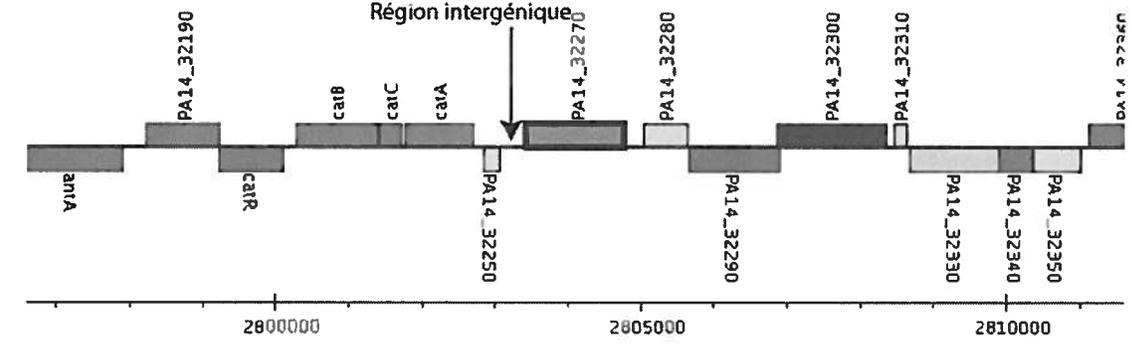
S_MSC004

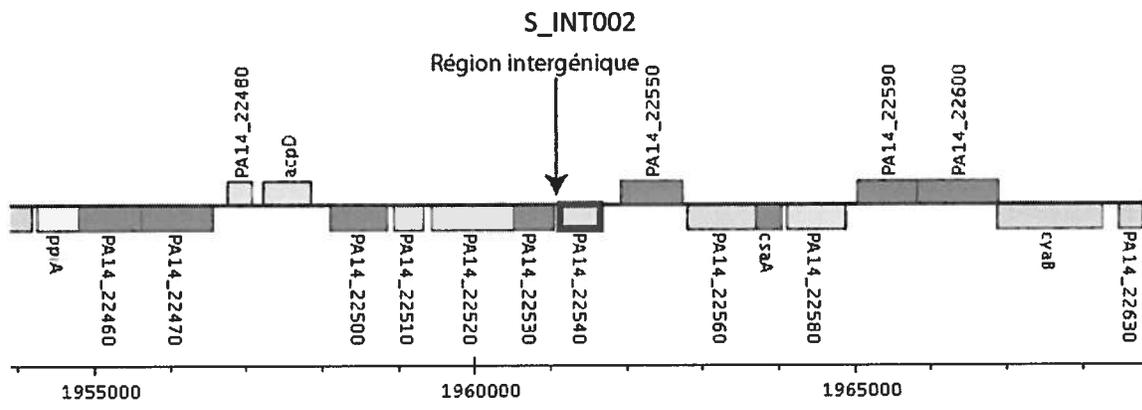


S_MSC005



S_INT001

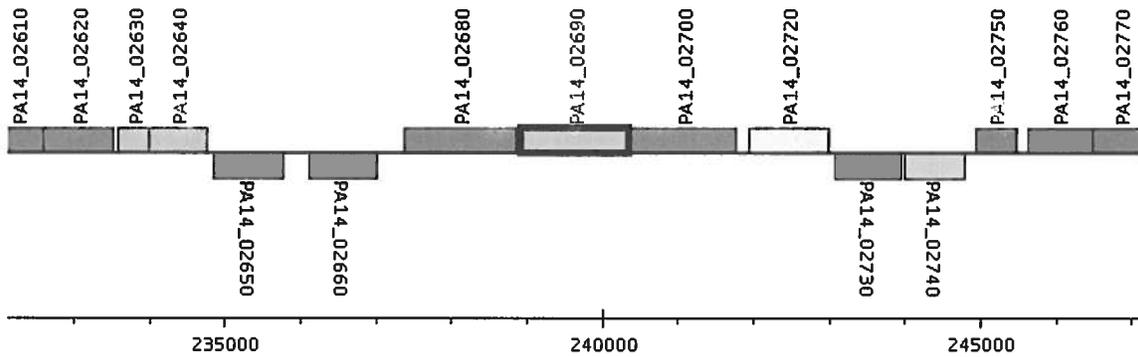




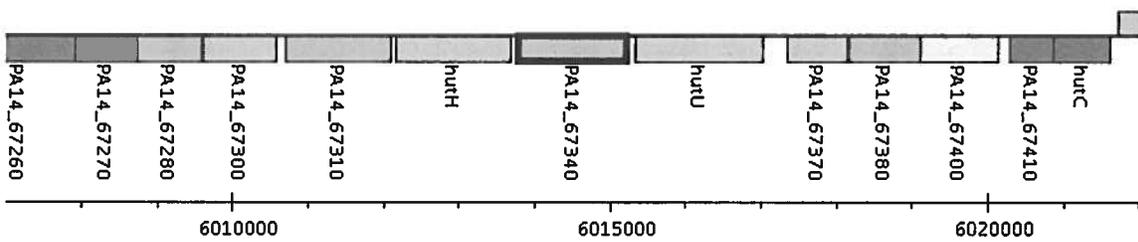
APPENDICE G

Contexte des insertions chez les transposants inhibés dans le « swarming ». Données prises sur www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2005).

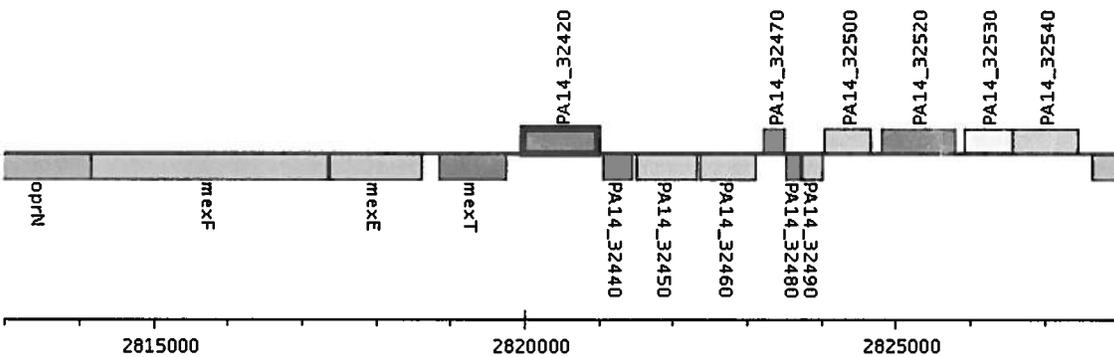
NS_PTP001



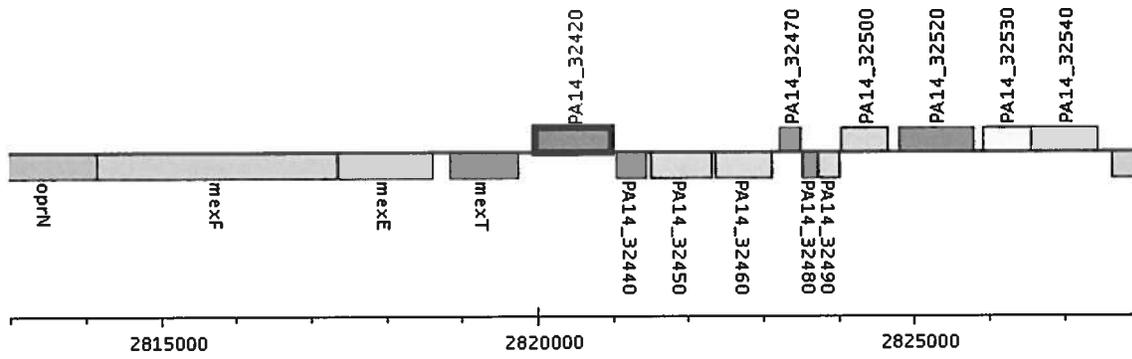
NS_PTP002



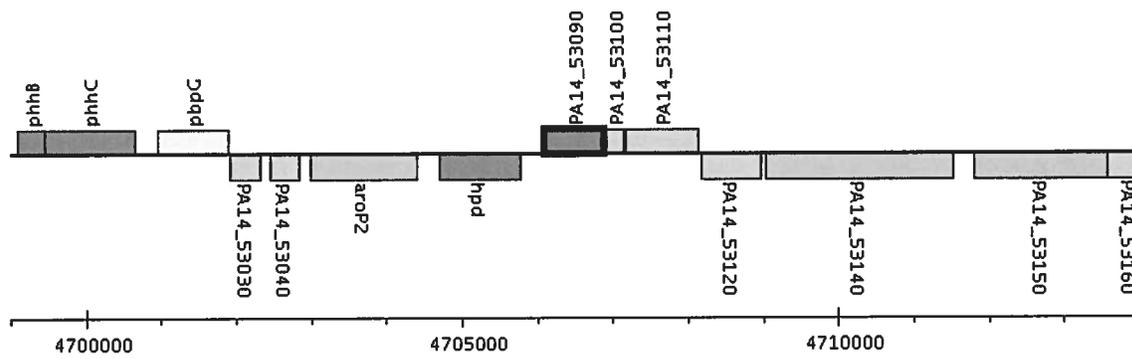
NS_TRR001



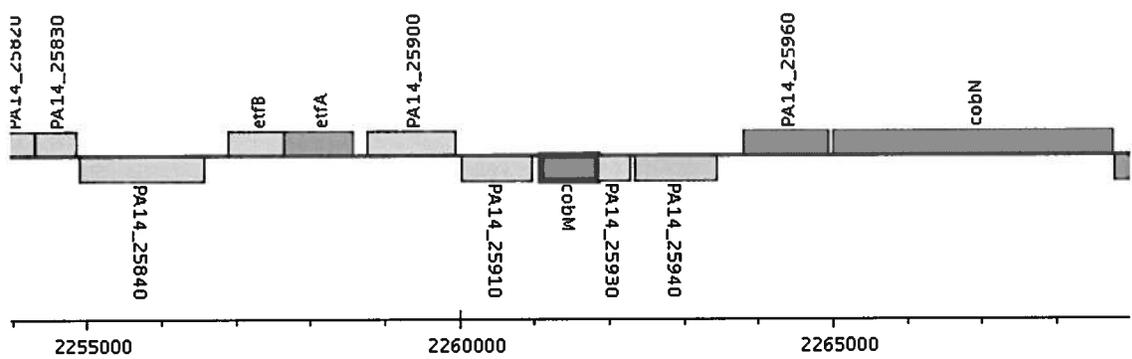
NS_TRR002



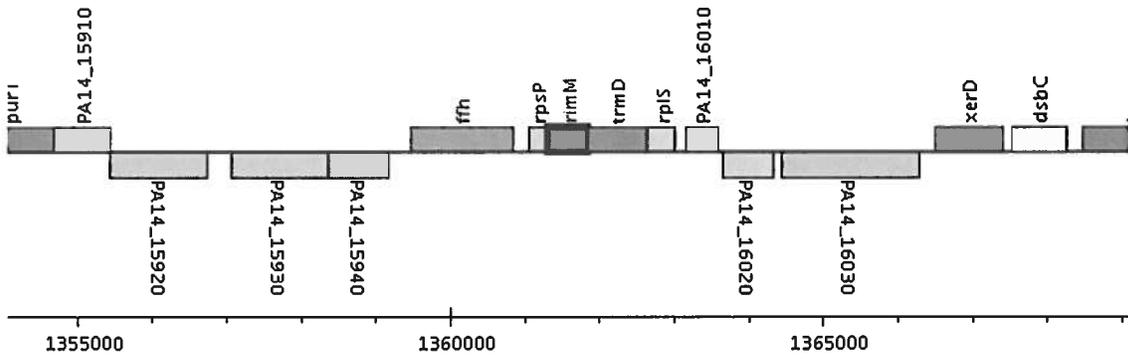
NS_TRR003



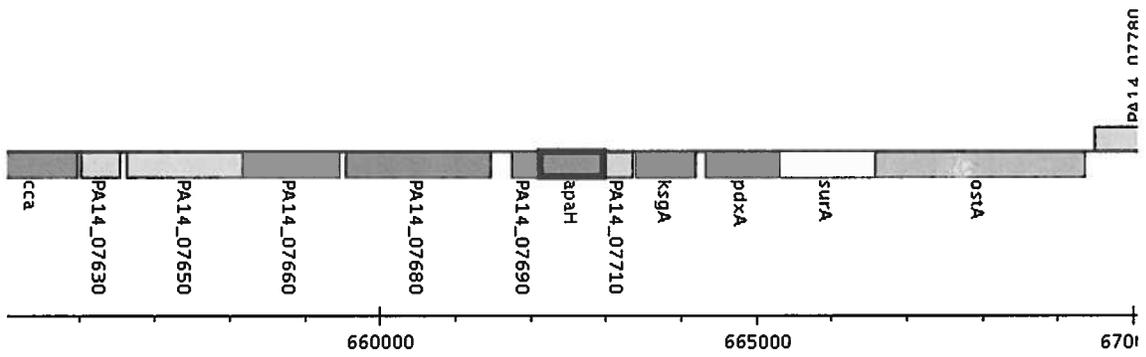
NS_MET001



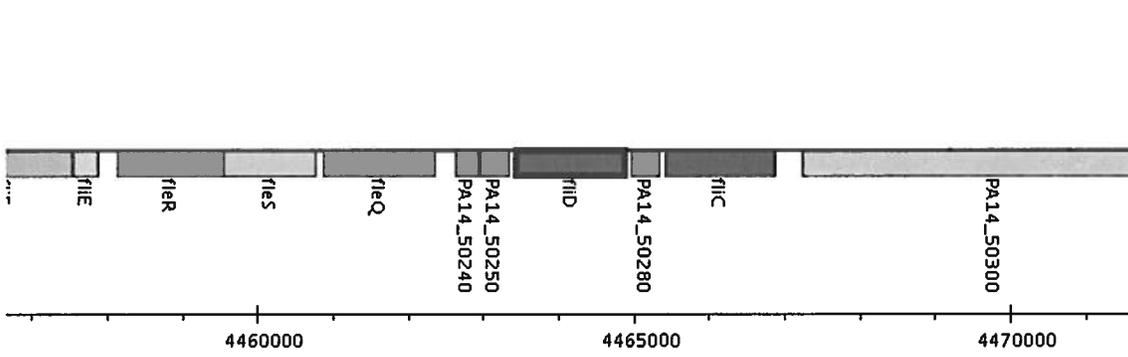
NS_MET002



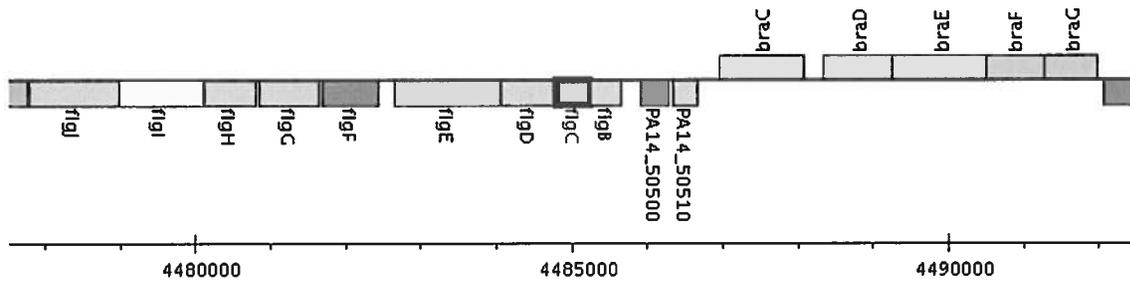
NS_MET003



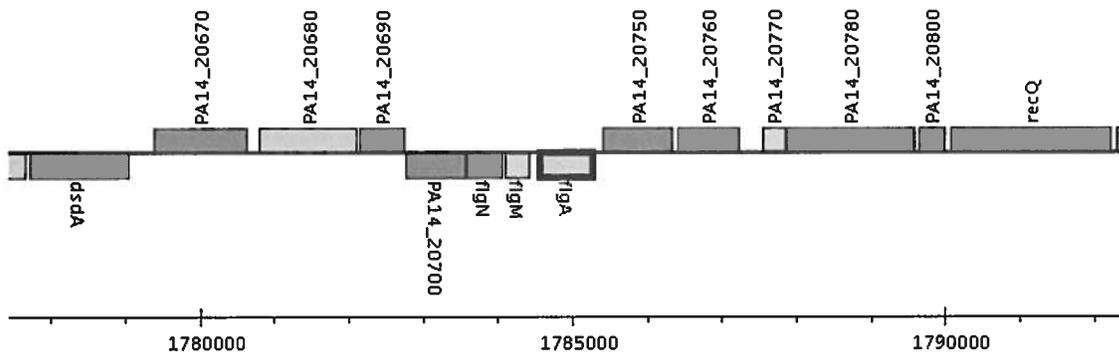
NS_FLA001



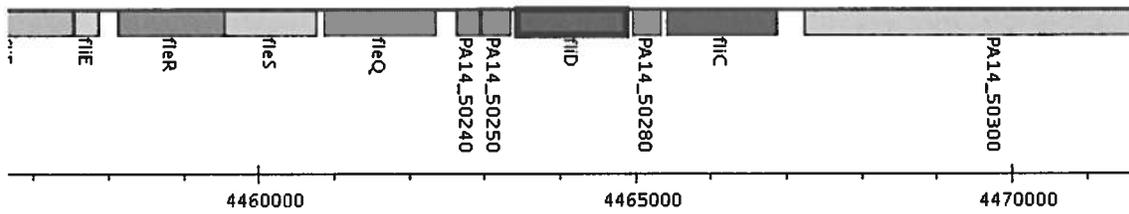
NS_FLA002



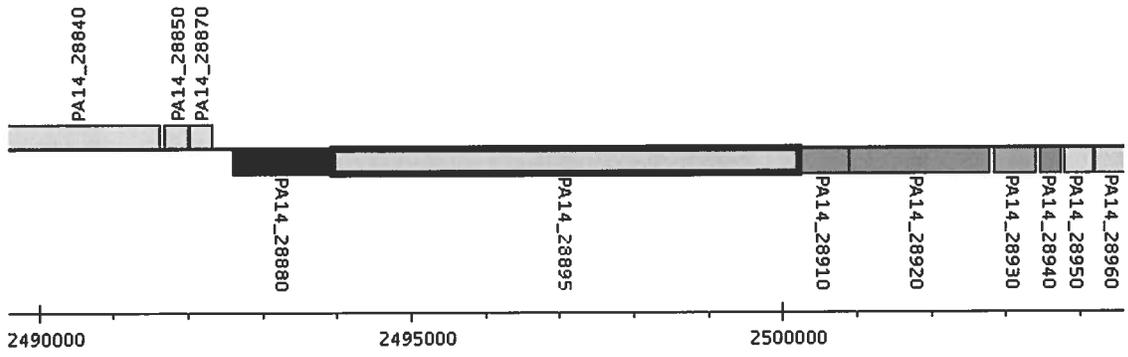
NS_FLA003



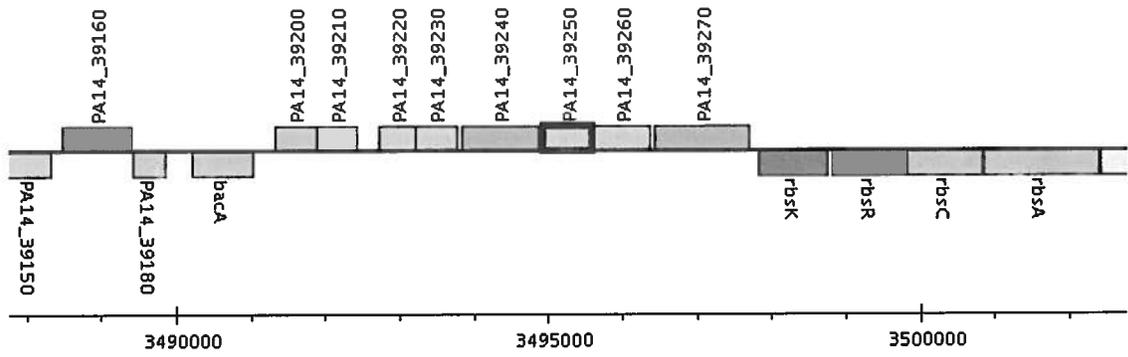
NS_FLA004



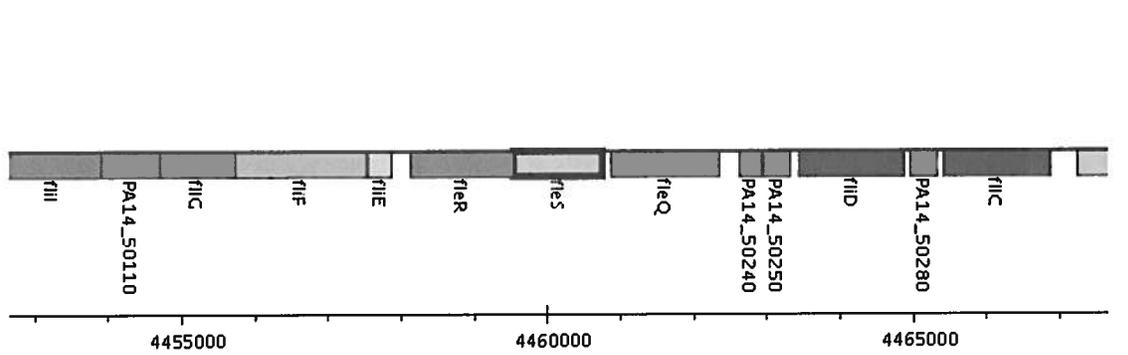
NS_HYP001



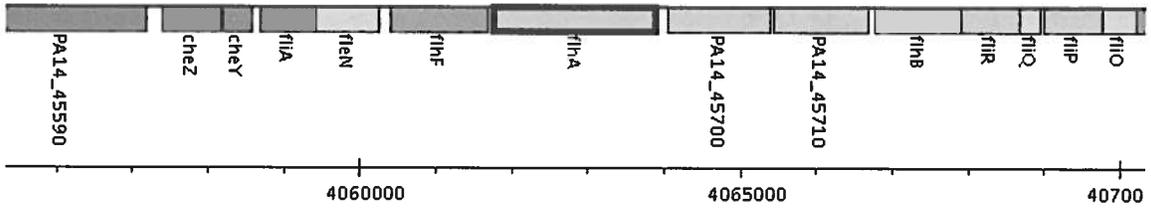
NS_HYP002



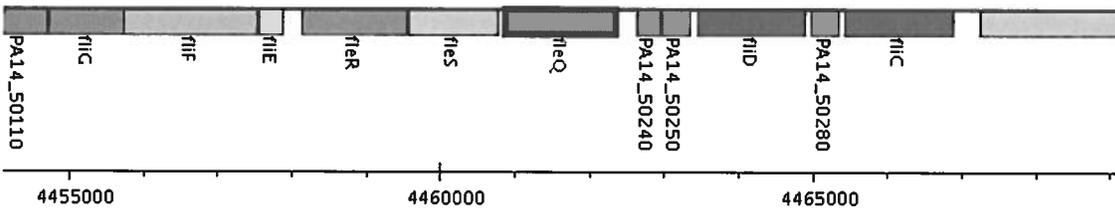
NS_MSC001



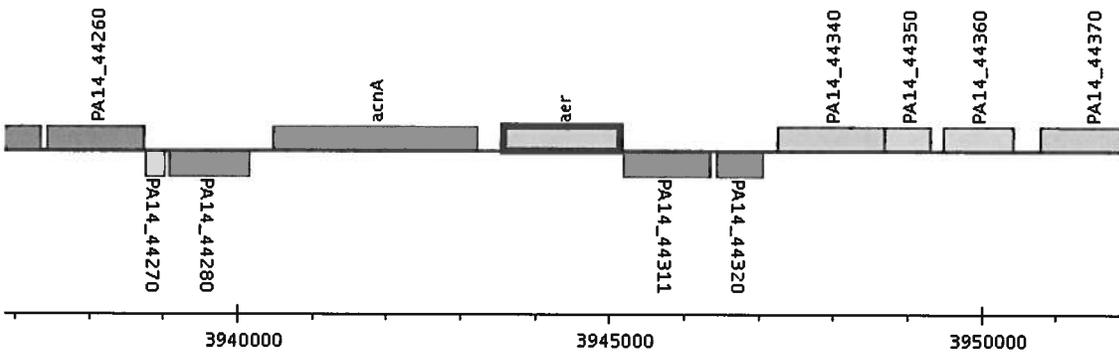
NS_MSC002



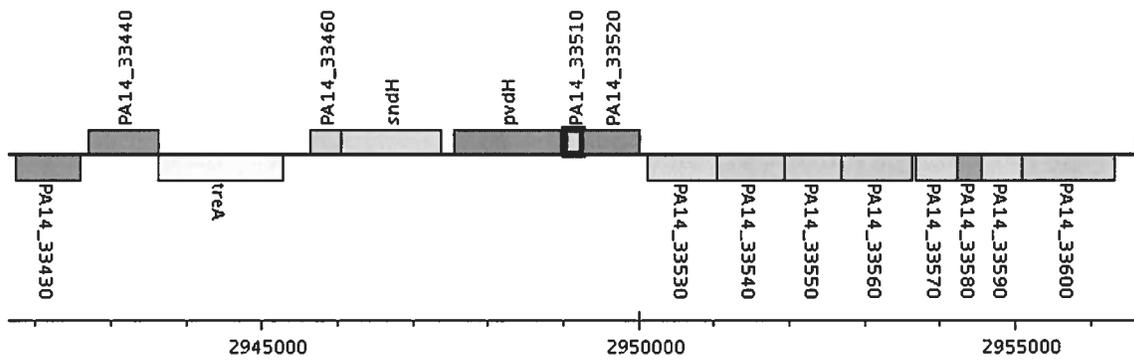
NS_MSC003



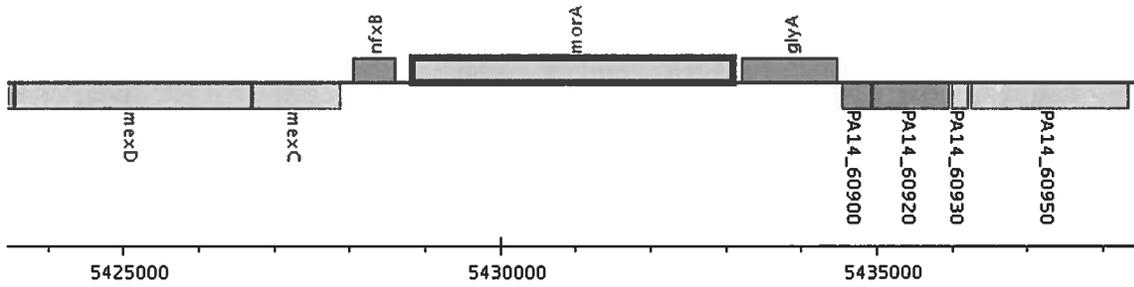
NS_MSC004



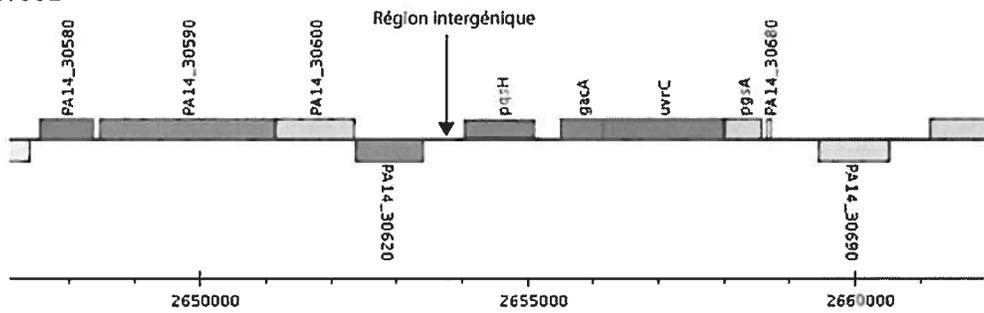
NS_MSC005



NS_MSC006



NS_INT001



APPENDICE H

Article soumis à *Environmental Microbiology* le 12 janvier 2007

Accusé reception de l'article intitulé « Self-produced chemotactic stimuli modulate *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility »

12-Jan-2007

Dear Mr. Tremblay:

A manuscript titled Self-produced chemotactic stimuli modulate *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility (EMI-2007-0023) has been submitted by Dr. Eric Déziel to the Environmental Microbiology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/emi>

USER ID: julien.tremblay@iaf.inrs.ca

PASSWORD:

Please note: Because it has been replaced by the enclosed single use password, your old account password will no longer work.

To enter your account and set a new password, please do the following:

1. Go to: <http://mc.manuscriptcentral.com/emi>
2. Log in using this information:
Your USER ID is julien.tremblay@iaf.inrs.ca
Your case-sensitive single use PASSWORD is 6Trr2xfP
3. Once you log in, you will be prompted to enter a 'permanent' password.
4. The next time you log in, you will use your USER ID and the new password you provided.

Please note that the single use password will expire on Tue, 16 Jan 2007 01:54:13 GMT / Mon, 15 Jan 2007 20:54:13 EST.

If the single use password has expired, you can generate another new single use password by entering your email address into the 'Password Help' function on your site log in page: <http://mc.manuscriptcentral.com/emi>

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <http://mc.manuscriptcentral.com/emi> to update your account information and change your password.

Thank you for your participation.

Sincerely,

Environmental Microbiology Editorial Office

Self-produced chemotactic stimuli modulate *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility

Running title: Chemotaxis in swarming motility of *Pseudomonas*

Julien Tremblay, Anne-Pascale Richardson, François Lépine and Eric Déziel*

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

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa presents three types of motilities: swimming, twitching and swarming. The latter is characterized by rapid and coordinated group movement over a semi-solid surface resulting from morphological differentiation and intercellular interactions. A striking feature of *P. aeruginosa* swarming motility is the formation of migrating tendrils producing colonies with complex fractal-like patterns. Previous studies have shown that normal swarming motility is intimately related to the production of extracellular rhamnolipids (RLs) and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs). In this study, we report that [1] RLs attract active swarming cells while HAAs behave as chemorepellents, [2] RLs promote and HAAs inhibit tendril formation, [3] RLs and HAAs display different diffusion kinetic on a surface as RLs spread faster than HAAs in agar, and [4] RLs and HAAs have no effects on swimming cells, suggesting that swarming cells are different from swimming cells not only in morphology but also on the regulatory level. We propose a model explaining how HAAs and RLs both modulate the behavior of swarming migrating cells by acting as negative and positive chemotactic stimuli.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative rod found in a wide variety of aqueous and soil environments. It is also an opportunistic pathogen responsible for a range of infections in immunocompromised hosts such as individuals suffering from cystic fibrosis and burned patients (Van Delden and Iglewski, 1998; Kipnis *et al.*, 2006).

P. aeruginosa is capable of two well-known types of motilities: swimming motility based on the flagellum and twitching motility, relying on type IV pili. A third less well-understood motility behavior, swarming, which consists of a rapid and coordinated translocation of a bacterial population across a semi-solid surface (i.e. on 0.5% agar), is also displayed by this bacterium. Although swarming motility has been mostly studied in species such as *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*, it was also recently reported in *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Rashid and Kornberg, 2000; Déziel *et al.*, 2001). Swarming motility is a multicellular phenomenon requiring the flagella and, to a lesser extent, type IV pili (Köhler *et al.*, 2000; Rashid and Kornberg, 2000). Swarmer cells are typically hyperflagellated, hyperelongated and grouped in compact multicellular rafts (Köhler *et al.*, 2000; Kearns and Losick, 2003; Julkowska *et al.*, 2004).

Only a few factors modulating this motile behavior have been identified. In order to swarm, differentiated cells need to overcome the surface tension of their surrounding environment (Matsuyama and Nakagawa, 1996). Such a task is generally considered to be achieved by the production of biosurfactants, which act as wetting agents reducing the surface tension between the migrating cells and the surface beneath them (Matsuyama *et al.*, 1992; Matsuyama *et al.*, 1995; Mendelson and Salhi, 1996; Lindum *et al.*, 1998; Toguchi *et al.*, 2000). Swarming of *S. marcescens* relies on the production of lipopeptides named serrawettins (Lindum *et al.*, 1998) and *B. subtilis* produces surfactin (Mendelson and Salhi, 1996). The production of biosurfactants is usually regulated by a quorum sensing communication system (Daniels *et al.*, 2004).

The biosurfactant released by *P. aeruginosa* is composed of rhamnolipids (RLs), amphiphilic glycolipids composed of L-rhamnose and 3-hydroxyalkanoic acids (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). They are usually produced as a complex mixture of congeners containing one or two rhamnose moieties attached to a 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)

alkanoic acid (HAA), the most abundant being L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) (Déziel *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 2000; Maier and Soberon-Chavez, 2000; Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Besides RLs, *P. aeruginosa* is also releasing considerable amount of HAAs, the precursor of RLs (Lépine *et al.*, 2002; Déziel *et al.*, 2003).

RLs are synthesized upon two sequential transfer reactions of glycosyl moieties, each of them being catalyzed by a different rhamnosyltransferase (Burger *et al.*, 1963). The first rhamnosyltransferase is coded by the *rhlAB* operon (Ochsner *et al.*, 1994a; Ochsner *et al.*, 1994b; Ochsner and Reiser, 1995) and catalyzes the transfer of TDP-L-rhamnose to a molecule of HAA: while *rhlB* codes for the catalytic subunit of the rhamnosyltransferase, RhlA is involved in the synthesis of HAAs (Déziel *et al.*, 2003; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Quorum sensing regulates the *rhlAB* operon (Ochsner *et al.*, 1994a; Ochsner *et al.*, 1994b; Pearson *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1997).

Although they have been extensively studied, the exact physiological function of RLs remains unclear, as they actually seem to play multiple roles (reviewed in Soberón-Chávez *et al.*, 2005). For instance, they are known to enhance the uptake of hydrophobic substrates, display antibiotic activities, and also contribute to pathogenesis as a virulence-associated exoproduct (Itoh and Suzuki, 1972; Lang and Wagner, 1993; McClure and Schiller, 1996). More recently, along with HAAs, they have been demonstrated to play a central role in swarming motility (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005). RLs are also implicated in biofilm development (Davey *et al.*, 2003; Boles *et al.*, 2005; Lequette and Greenberg, 2005).

In *P. aeruginosa*, the most striking feature of swarming motility is the fractal-like patterns formed by migrating tendrils migrating away from a core of cells (Köhler *et al.*, 2000; Rashid and Kornberg, 2000; Déziel *et al.*, 2001). A first clue to explain how swarming cells coordinate their behavior was recently proposed by Caiazza *et al.* (2005). They presented a model in which RLs regulate the swarming pattern by helping in tendrils maintenance, while HAAs act solely as wetting agents. Based on their observation that RLs inhibit swarming, they hypothesized that cells radiate away from the inoculating point by swarming down a gradient of RLs. In the present study, we provide evidence

that the complex swarming pattern of *P. aeruginosa* is modulated by a specific chemotactic response where RLs act as a chemoattractant and HAAs as a chemorepellent. Importantly, these stimuli do not affect swimming motility.

RESULTS

Swarming cells are attracted to RLs and repelled by HAAs. Recently, we reported the extracellular production of HAAs, the precursors of RLs, and their involvement in swarming motility of *P. aeruginosa* (Lépine *et al.*, 2002; Déziel *et al.*, 2003). Although their swarming patterns and tendrils radiation are quite less defined than in the wild type, *rhlB* mutants producing HAAs alone are still capable of some aberrant form of swarming (Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005), presumably because of the wetting activity of HAAs. Caiazza *et al.* have recently reported the observation that exogenous addition of a crude RLs extract inhibited swarming motility. Interestingly, an *rhlB* mutant, producing HAAs only and an *rhlC* mutant producing both HAAs and mono-, but not di-, RLs exhibited different swarming patterns (Caiazza *et al.*, 2005). Since we know that HAAs are often co-extracted with RLs (Déziel *et al.*, 2003), we hypothesized that the two products of RhlAB (HAAs and RLs), have distinct modulating effects on swarming patterns.

We first purified RLs and HAAs to see what influence they have on swarming motility. Figure 1 shows that they exhibit complete opposite effects on migrating tendrils. Swarmer cells are clearly attracted to pure RLs (Fig 1A), while they avoid the zone of HAAs (Fig 1B). In presence of a HAAs-impregnated paper disk, the central horizontal radiating tendril even completely stopped migrating (Fig. 1B), presumably because it is trying to avoid both the exogenous zone of HAAs and the neighboring swarming tendrils (also producing HAAs). This same phenomenon is seen in figure 1C, where the effect of the presence of RLs and HAAs together was assessed. The paper disk was soaked with a mixture obtained through the same production and chloroform:methanol extraction protocols used by Caiazza *et al.* (2005). LC`MS analysis showed that the extract contained 14.33 mg/l of RLs and 0.35 mg/l of HAAs, which is in the same range of RLs/HAAs ratio routinely detected in cultures (Déziel *et al.*, 2003). As shown in figure 1C, even in presence of proportionally high concentrations of RLs, HAAs act as a strong

swarming chemorepellent. In contrast, the bacteria completely ignored the control disk (Fig. 1D).

RLs promote and HAAs inhibit tendrils formation. The above observations indicated that HAAs and RLs both modulate the behavior of swarming migrating cells. To investigate how self-produced extracellular metabolites can have opposite effects on swarming motility, undifferentiated *P. aeruginosa* cells were directly exposed to these molecules. Wild type and *rhlA* mutant cells were separately spotted at the center of swarm agar plates after a drop of RLs or HAAs had been deposited and dried at the same spot. Presence of exogenous RLs at the spot of inoculation has at least three effects (Fig. 2A vs Fig. 2C): [1] it promotes the formation of thinner tendrils, [2] that do not divide and instead display a more straightforward aspect than wild type migrating tendrils which, on the opposite, become more and more branched as migration goes on, and [3] there is an accumulation of biomass at the swarm center.

Exogenous addition of HAAs essentially inhibited normal swarming motility (Fig. 2B). In contrast with the swarming-promoting effects of RLs, presence of HAAs does not induce a localized accumulation of biomass at the center and in this case, the cells migrate for a short distance in a disorganized manner. It seems that bacteria are trying to avoid the HAA zone in a chaotic fashion in which no well-defined tendrils are formed. However, there are still some small tendrils around the large central colony, suggesting that when bacteria have reached the border of the zone where HAAs were added, they begin to form tendrils again, presumably because the natural RLs:HAAs ratio returns to normal. The *rhlA* mutant is similarly affected by exogenous HAAs, with the exception that no tendrils are formed at all (Fig 2E). There is however some spreading from the central colony, probably because of the wetting activity displayed by HAAs (Déziel *et al.*, 2003). On the other hand, as shown in figure 2D, the non-swarming phenotype of the *rhlA* mutant is partially rescued by addition of RLs, with the appearance of short defined tendrils.

Production in a heterologous background confirms that HAAs repel swarming tendrils. Consistent with the above observations, and like Caiazza *et al.* (2005), we have also noticed that swarming tendrils avoid wild-type *P. aeruginosa* cells while not sensing *rhlA* mutants. We have recently reported that *E. coli* produces rhamnolipids and HAAs

when expressing *rhlAB* (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Therefore, to corroborate in a heterologous system our hypothesis that HAAs act as swarming chemorepellents, we expressed *rhlA* only under the P_{lac} promoter of pUCP18 in *E. coli*. Figure 3 shows that *P. aeruginosa* swarming tendrils do not change course when they approach control *E. coli* colonies but skirt round a recombinant HAAs-producing *E. coli* colony, further supporting the repelling effect of HAAs.

An additional very interesting incidental observation is that swarming is induced in a normally non-swarming *E. coli* lab strain when *rhlA* is expressed and HAAs produced (Fig. 3B), suggesting that a wetting agent is missing for swarming of this bacterium.

The diffusion of RLs in agar is superior to that of HAAs. Since RLs and HAAs both behave as strong chemotactic stimuli for swarming motility, we wanted to understand how these molecules can simultaneously modulate tendril patterns and influence the spreading of isolated tendrils. Because swarming is mostly a surface phenomenon and RLs and HAAs are both lipidic exoproducts, we reasoned there are differences in the way these molecules behave in the agar. Since they lack a sugar moiety, HAAs should be less water-soluble and would therefore diffuse slower in the agar than RLs. To test this hypothesis, equal amounts of RLs and HAAs were impregnated on a small paper disc which was then deposited in the middle of a swarm plate. After a few min. of diffusion, the agar was sampled at various distances from the disc and the concentration of HAAs and RLs determined. As shown in figure 4, both RLs and HAAs are present over a certain distance from the diffusion origin but beyond a critical distance, only RLs are still present. On the other hand, HAAs have more a tendency to remain near the origin. These data show that RLs diffuse more easily across the agar and that they spread farther than HAAs.

RLs and HAAs do not influence swimming motility. Chemotaxis is usually used by bacteria to direct their movements towards an optimal chemical environment. While this mechanism is well understood in the context of classical swimming motility, its function is less readily predictable in the present context because the role of swarming motility is still unclear. To determine if swimming cells also respond to RLs and HAAs, discs impregnated with RLs or HAAs were deposited at the center of a swimming plate

and bacteria were inoculated at various points around the disc. To our surprise, as shown in figure 5, the swimming path of the bacteria inoculated around the discs was not modified by RLs or HAAs. Hence these molecules do not act as chemotactic stimuli for swimming cells.

DISCUSSION

Bacteria preferentially form multicellular, cooperative communities, often associated with surfaces (Shapiro, 1998). An increasing number of bacterial species are found to migrate rapidly on a surface in an organized manner called swarming motility. In *P. aeruginosa*, formation of the distinctive swarming colony requires a semi-solid surface and production of the surfactants RLs and HAAs (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003). However, the mechanisms responsible for the typical dendritic swarming pattern are largely unknown. Recent observations by Caiazza *et al.* (2005) have provided clues suggesting that RLs contribute by inhibiting swarming motility while HAAs would primarily act as wetting agents.

Following our previous report that *P. aeruginosa* synthesizes HAAs via RhIA activity, and that these compounds are found in the extracellular milieu and contribute to swarming motility (Déziel *et al.*, 2003), we wanted to characterize further their role as RLs associates. The data we have presented here demonstrate that swarming cells are actually attracted to RLs and that these exoproducts promote the formation of swarming tendrils. On the other hand, the effect of HAAs appears in strong contrast: while they do have surface-active properties, HAAs prevents normal expression of swarming motility and even repel migrating tendrils. We are aware that some of the results presented here are not fully in agreement with what was reported by Caiazza *et al.* (2005). We explain these differences by the fact that our chemotactic assays were performed using highly purified RLs and HAAs while the compounds they used, described as “purified RLs”, were in fact crude extracts of supernatants containing both RLs and HAAs. To support this deduction, we performed our chemotactic assay using an extract obtained by following the exact same protocol they reported. As shown in figure 1C, this RLs crude extract strongly repelled the swarming tendrils, and our LC/MS analysis indeed revealed that it contains HAAs. Our own past experience has shown that these two families of congeners have similar physico-chemical properties and can be difficult to separate and

purify (Lépine *et al.*, 2002; Déziel *et al.*, 2003). We therefore believe the preparation used by Caiazza *et al.* (2005) as well still contained HAAs, which would have hence distorted their results. Nevertheless, their work underscored the involvement of a chemical gradient of RLs in directed swarming migration.

We also found that RLs and HAAs diffuse at different rates in agar, RLs migrating faster than HAAs, probably because they are more water-soluble. Interestingly, *P. aeruginosa* produces lower concentrations of extracellular HAAs compared to RLs (Lépine *et al.*, 2002). Combined with slower diffusion, the inhibiting/repelling zone induced by HAAs should therefore be smaller than the RLs promoting/attracting zone. Figure 6 presents a proposed model explaining how these two families of self-produced chemical congeners modulate the formation of a typical swarming colony morphology. Assuming bacteria are moving slower than RLs are diffusing out, and an elevated concentration of HAAs accumulate near the origin because of slower diffusibility, then swarm front bacteria would be driven by two opposite forces: [1] repelled from the HAAs-rich core zone and simultaneously [2] attracted by the outer RLs-rich zone. This outward increasing RLs/HAAs ratio can therefore explain the directionality of swarming tendrils, and also why bacteria in an expending swarming colony are not primarily attracted toward the center, where the concentration of RLs is, at least initially, higher. Furthermore, our model clarifies why tendrils never enter in contact with each other (Caiazza *et al.*, 2005), since areas of high cell density should be rich in HAAs. This can also contribute to explain how tendrils have a tendency to increase their number of ramifications as they get away from the inoculation point. Typically, one can see the presence of small outgrowths at various points on a given tendrils. The ramification of a single tendril occurs only when it is relatively distant from the neighboring tendrils, possibly because it needs sufficient low concentration-HAAs surrounding surface to actually ramificate.

The fact that RLs and HAAs affect swarming, but not swimming, indicate that *P. aeruginosa* swarming cells are quite different from vegetative swimming cells, not only in physiology but also in regulation. A similar phenomenon has been reported in *P. mirabilis*, where the amino acid glutamine was reported to act as a chemoattractant for differentiated swarming cells, but not to swimming cells (Allison *et al.*, 1993).

Furthermore, it was also observed that glutamine-induced differentiation in this strain was further stimulated by surface contact or by increased viscosity.

Together with the avoidance of self-produced metabolites, the dissemination mechanism we have presented here appears an efficient way for a microbial community to colonize a semi-solid surface. The amphiphilic nature of RLs and HAAs makes them ideal as surface-specific stimuli. To our knowledge, the only other organism known to migrate towards a self-generated signaling chemical is *Myxococcus xanthus* (Kearns and Shimkets, 1998, 2001). This gliding bacterium exhibits chemotactic behaviour, necessary for surface coordinated motility, involved in fruiting body formation (Kaiser, 2003). We are not aware of any other previously reported self-produced chemotactic repellent. One condition where *P. aeruginosa* cells are organized, in a semi-solid environment akin to swarming, is in biofilms. Significantly, the concept of a role for RLs in the dissemination of bacteria within and out of biofilm microcolonies is emerging (Davey *et al.*, 2003; Schooling *et al.*, 2004; Boles *et al.*, 2005; Lequette and Greenberg, 2005). We propose that swarming motility is central to normal biofilm development, and that HAAs also play an important role in *P. aeruginosa* multicellularity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains and plasmid. A *rhlA::TnphoA* mutant of *P. aeruginosa* strain PA14 (Rahme *et al.*, 1995) was acquired from the PA14 Transposon Insertion Mutant Database (Liberati *et al.*, 2006). The pAPR3 RhlA expression vector was constructed as follows: The *rhlA* coding sequence was amplified by PCR from *P. aeruginosa* genomic DNA. The PCR product, which contained a *EcoRI* site at the 5' end and a *HindIII* site at the 3' end, was then subcloned into the pUCP18 vector (West *et al.*, 1994) under the P_{lac} promoter and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), a non-swarming bacterium.

Media and growth conditions. Bacteria were typically grown at 37°C in TSB medium on a rotary shaker. Plates consisted of modified M9 medium (20 mM NH₄Cl; 12 mM Na₂HPO₄; 8.6 mM NaCl; 1 mM MgSO₄ and 1 mM CaCl₂ · 2H₂O; 11 mM dextrose; supplemented with 0.5% casamino acids (Difco)) solidified with 0.5 or 0.25% Bacto-agar (Difco) for swarming and swimming, respectively. Freshly autoclaved medium was

poured in Petri dishes and dried under laminar flow during 60 min. for swarming agar and 20 min. for swimming agar. After the drying period, the swarm plates were immediately inoculated with 5 μ L of bacterial culture ($OD_{600} = 3.0 - 5.0$) and incubated at 30°C for 16 hrs.

RLs and HAAs purification and analysis. Crude extract of PA14 supernatant was obtained essentially as described (Caiazza *et al.*, 2005). Briefly, cells were grown in M9 medium supplemented with 0.5% CAA for 24 h at 37°C and removed by centrifugation (10 min. at 6,000 x g). The supernatant was acidified at pH 2 and extracted with chloroform:methanol (2:1). The organic phase was then evaporated to dryness, resuspended in methanol and centrifuged (5 min. at 10,000 x g) to remove insoluble particles. The result was a 30-fold concentration of rhamnolipids and HAAs.

To obtain pure RLs, a crude RL extract was purified by chromatography using an Amberlite XAD-7 column. The extract was dissolved in water, adsorbed onto the column and then eluted using a 1:1 water:methanol mixture. The early eluting major RLs were collected and lyophilized. These early fractions contained predominantly the Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ congener and were free of HAAs.

Pure HAAs were prepared by acid hydrolysis of pure RLs. Briefly, 400 mg of RLs were digested at 100°C for 40 min. in 100 ml of a 1:1 solution of dioxane and HCl 1N. The reaction was stopped by adding 35% Na₂HCO₃ up to pH 6. The resulting mixture was then evaporated to dryness, resuspended in 10 ml H₂O, extracted three times with 40 ml ethyl acetate, evaporated to dryness and resuspended in 2 ml MeOH. HAAs were then isolated from the digested mixture on 1 mm thick preparative thin layer chromatography plates (Partisil PK6F, Whatman). The plates were eluted with 40% ethyl acetate in hexane, and finally HAAs were harvested by extraction with 80% ethyl acetate:20% MeOH.

The purity of RLs and HAAs was confirmed and concentrations determined by LC/MS, as described previously (Déziel *et al.*, 1999; Lépine *et al.*, 2002).

Chemotaxis assays. Sterile filter paper discs (6 mm diam.; Becton-Dickinson) were soaked with 160 μg of RLs or HAAs dissolved in MeOH and then dried. Impregnated discs were deposited on the surface of swarm plates and left for 20 min. before bacteria inoculation.

RLs and HAAs agar diffusion measurements. Impregnated paper discs, prepared as above but containing 80 μg each RLs and HAAs, were placed on swarm plates. After 15 min., 0.5 cm diam. coupons were cut out of the agar with a puncher at various distance from the disc. For each equal distance from the disc, four plugs of agar were pooled in a tube containing 1 mL 1% KHCO_3 (pH 9), vortexed, and incubated for 2 hrs at room temperature. The pH was then adjusted to 4 with concentrated HCl and the whole content extracted three times with 500 μL ethyl acetate. The organic fractions were pooled, dried and the solvent evaporated. The residue was resuspended in 36% acetonitrile and 4 mM ammonium acetate, for LC/MS analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sylvain Milot for excellent technical assistance.

This study was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant to ED.

REFERENCES

- Allison, C., Lai, H.C., Gygi, D., and Hughes, C. (1993) Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemoattractant for swarming cells. *Mol Microbiol* 8: 53-60.
- Boles, B., Thoendel, M., and Singh, P. (2005) Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology* 57: 1210-1223.
- Burger, M.M., Glaser, L., and Burton, R.M. (1963) The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-Containing Glycolipid by Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 238: 2595-2602.
- Cabrera-Valladares, N., Richardson, A.P., Olvera, C., Trevino, L.G., Deziel, E., Lépine, F., and Soberon-Chavez, G. (2006) Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 187-194.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q., and O'Toole, G.A. (2005) Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 187: 7351-7361.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 28: 261-289.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., and O'Toole, G.A. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185: 1027-1036.
- Déziel, E., Comeau, Y., and Villemur, R. (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 183: 1195-1204.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., and 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., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A., and Villemur, R. (1999) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids

- produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1440: 244-252.
- Déziel, É., Lépine, F., Milot, S., and Villemur, R. (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149: 2005-2013.
- Itoh, S., and Suzuki, T. (1972) Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in *n*-paraffin-utilizing ability. *Agr. Biol. Chem.* 36: 2233-2235.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, B., and S  ror, 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.
- Kaiser, D. (2003) Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nat Rev Microbiol* 1: 45-54.
- Kearns, D.B., and Shimkets, L.J. (1998) Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11957-11962.
- Kearns, D.B., and Shimkets, L.J. (2001) Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol* 9: 126-129.
- Kearns, D.B., and Losick, R. (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 49: 581–590.
- Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36: 78-91.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C., and Pech  re, J.-C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182: 5990-5996.
- Lang, S., and Wagner, F. (1993) Biological activities of biosurfactants. In *Biosurfactants: production, properties, applications*. Kosaric, N. (ed). New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 251-268.
- Lépine, F., Déziel,   ., Milot, S., and Villemur, R. (2002) Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of

- rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Journal of Mass Spectrometry* 37: 41-46.
- Lequette, Y., and Greenberg, E.P. (2005) Timing and Localization of Rhamnolipid Synthesis Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology* 187: 37-44.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G. *et al.* (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2833-2838.
- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S., and Givskov, M. (1998) *N*-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 180: 6384-6388.
- Maier, R.M., and Soberon-Chavez, G. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 625-633.
- Matsuyama, T., and Nakagawa, Y. (1996) Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J. Microbiol. Methods* 25: 165-175.
- Matsuyama, T., Bhasin, A., and 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., and Yano, I. (1992) A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 174: 1769-1776.
- McClure, C.D., and Schiller, N.L. (1996) Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol* 33: 109-117.
- Mendelson, N.H., and Salhi, B. (1996) Patterns of reporter gene expression in the phase diagram of *Bacillus subtilis* colony forms. *J Bacteriol* 178: 1980-1989.
- Ochsner, U.A., and Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6424-6428.

- Ochsner, U.A., Fiechter, A., and Reiser, J. (1994a) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* 269: 19787-19795.
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., and Reiser, J. (1994b) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176: 2044-2054.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C., and 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.
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179: 3127-3132.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.
- Rashid, M.H., and 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.
- Schooling, S.R., Charaf, U.K., Allison, D.G., and Gilbert, P. (2004) A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* 1: 91-99.
- Shapiro, J.A. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 81-104.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., and Déziel, E. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 718-725.
- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., and Harshey, R.M. (2000) Genetics of Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Critical Role for Lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 182: 6308-6321.
- Van Delden, C., and Iglewski, B.H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 4: 551-560.
- West, S.E., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J. (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from

pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148: 81-86.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Swarming tendrils are attracted to RLs and repelled by HAAs. *P. aeruginosa* was spotted on a swarm agar plate on which a disc impregnated with (A) RLs, (B) HAAs, (C) crude organic extract of PA14 culture supernatant or (D) MeOH, as a control, had been deposited.

Figure 2. Addition of RLs promotes swarming while addition of HAAs inhibits swarming. WT or *rhlA* mutant were spotted on a swarm agar plate on which a drop of (A) RLs, (B) HAAs or (C) methanol (as a control) had been previously deposited and dried. All pictures were taken after 16 hrs of incubation.

Figure 3. *P. aeruginosa* swarming is repelled by *E. coli* producing HAAs. (A) Migration direction of *P. aeruginosa* wild-type (WT) swarming tendrils is not affected by colonies of control *E. coli* carrying the pUCP18 vector, but is modified by (B) the HAA-producing recombinant *E. coli* strain expressing *rhlA* (pAPR3).

Figure 4. RLs diffuse faster and farther than HAAs. Discs impregnated with RLs and HAAs were spotted on swarm agar plates and left for 15 min. Then, RLs and HAAs were extracted from the agar, and analyzed by LC/MS as described in Material and methods.

Figure 5. RLs and HAAs do not attract or repel swimming cells. WT or *rhlA* mutant were inoculated on a swimming agar plate on which a disc impregnated with (A) RLs, (B) HAAs and (C) MeOH had been deposited.

Figure 6. Proposed *P. aeruginosa* swarming motility model. RLs diffuse faster than HAAs from the inoculation origin, creating an increasing RLs/HAAs gradient. Cells localized at the swarming front are attracted by RLs and at the same time, repelled by HAAs. Swarmer cells migrate outwardly in response to these two forces, moving up the RLs/HAAs ratio. Tendrils never enter in contact with each other since areas of high cell

density are enriched in HAAs. Furthermore, they have a tendency to ramificate, instead of becoming larger, as they get away from the inoculation point.

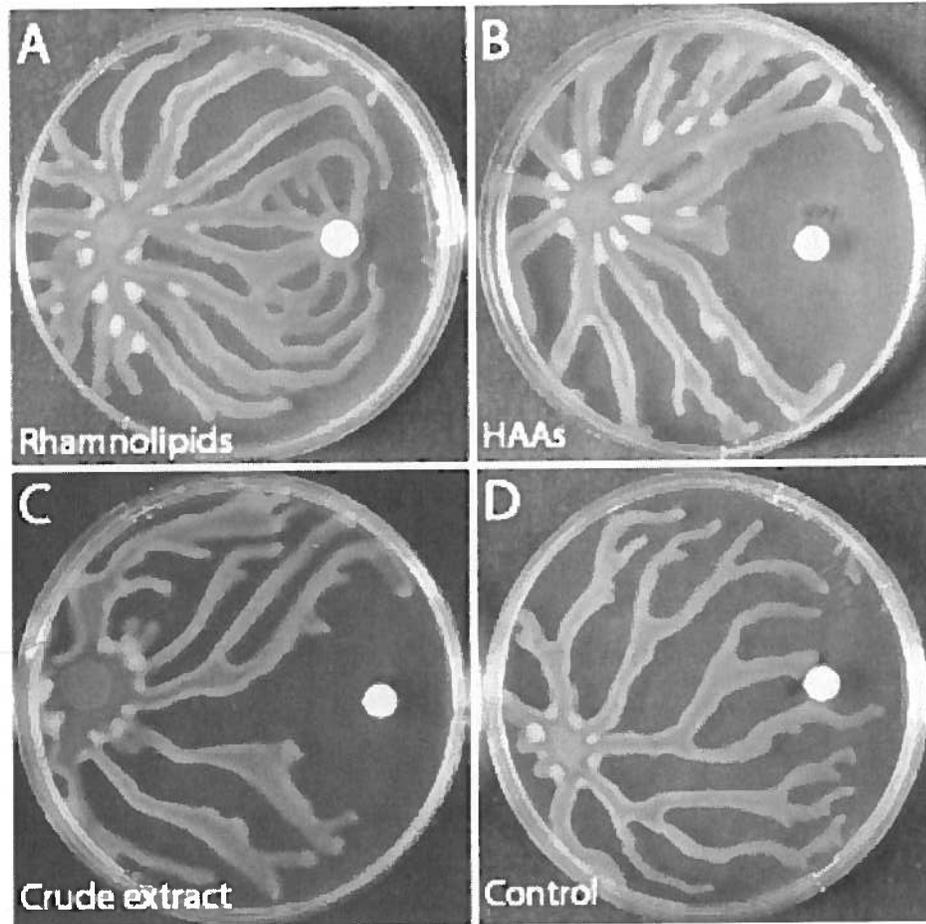


Figure 1

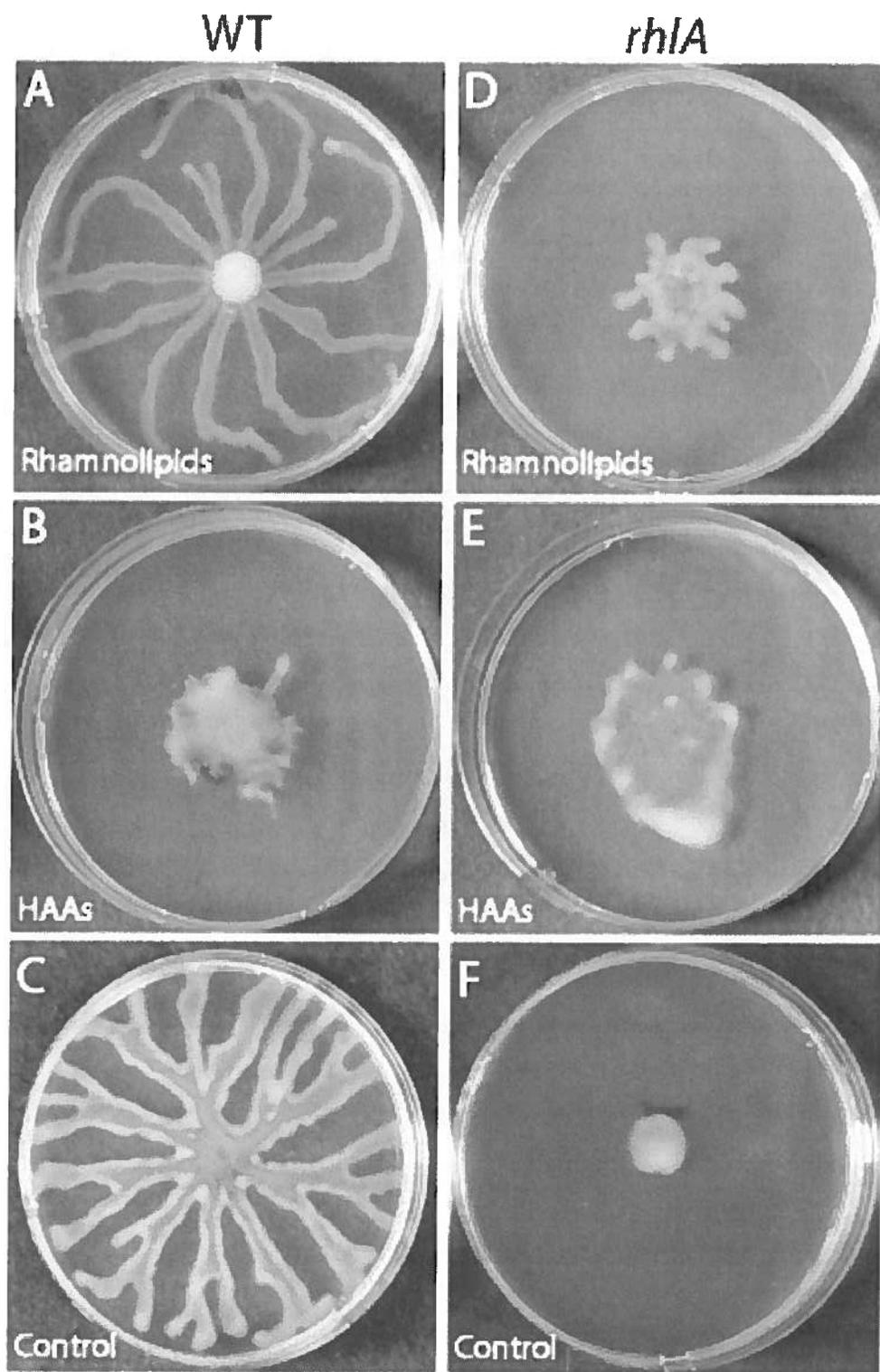


Figure 2

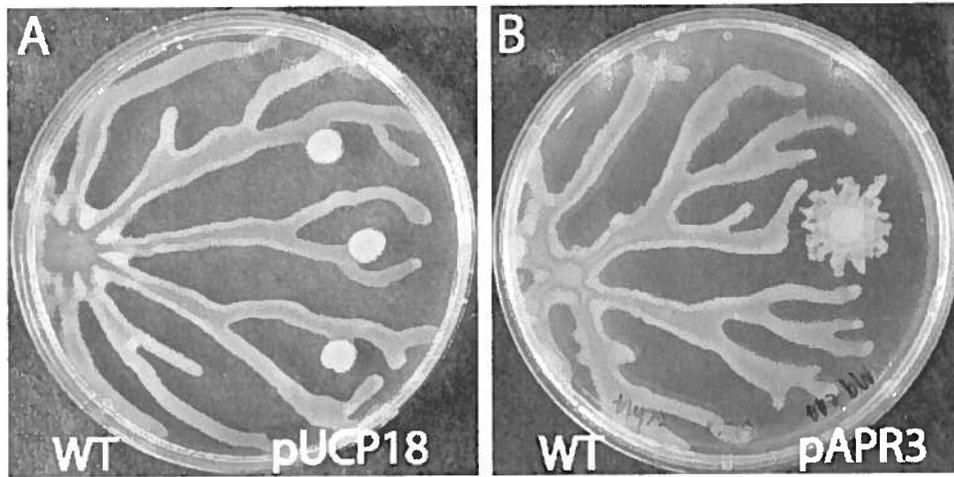


Figure 3

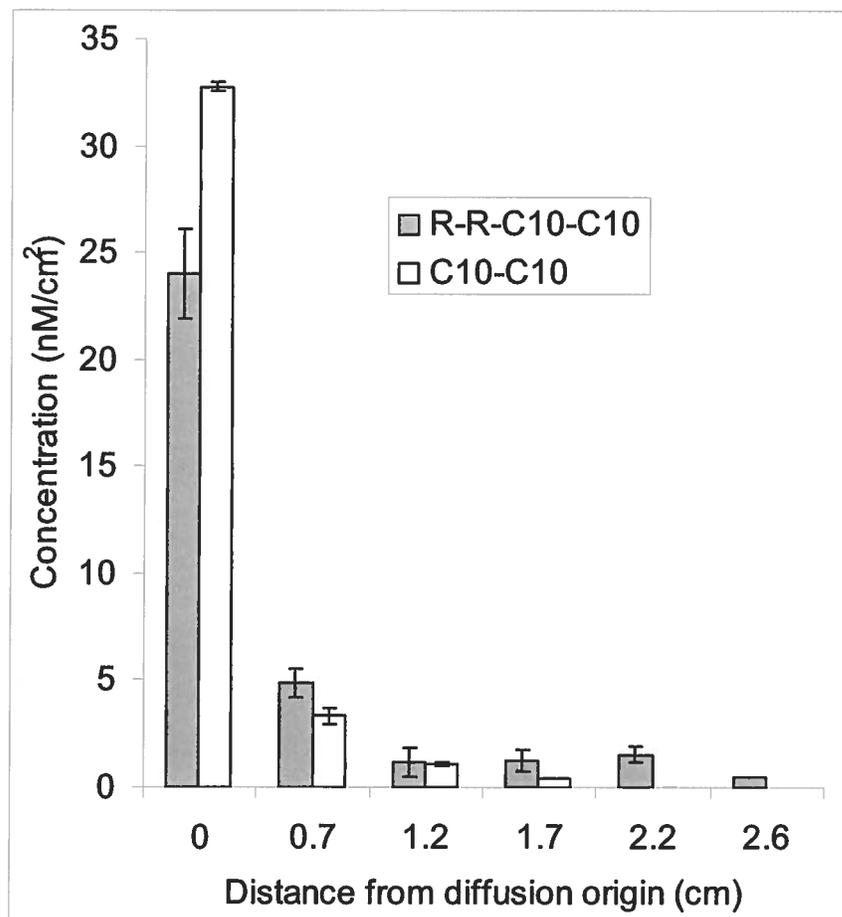


Figure 4

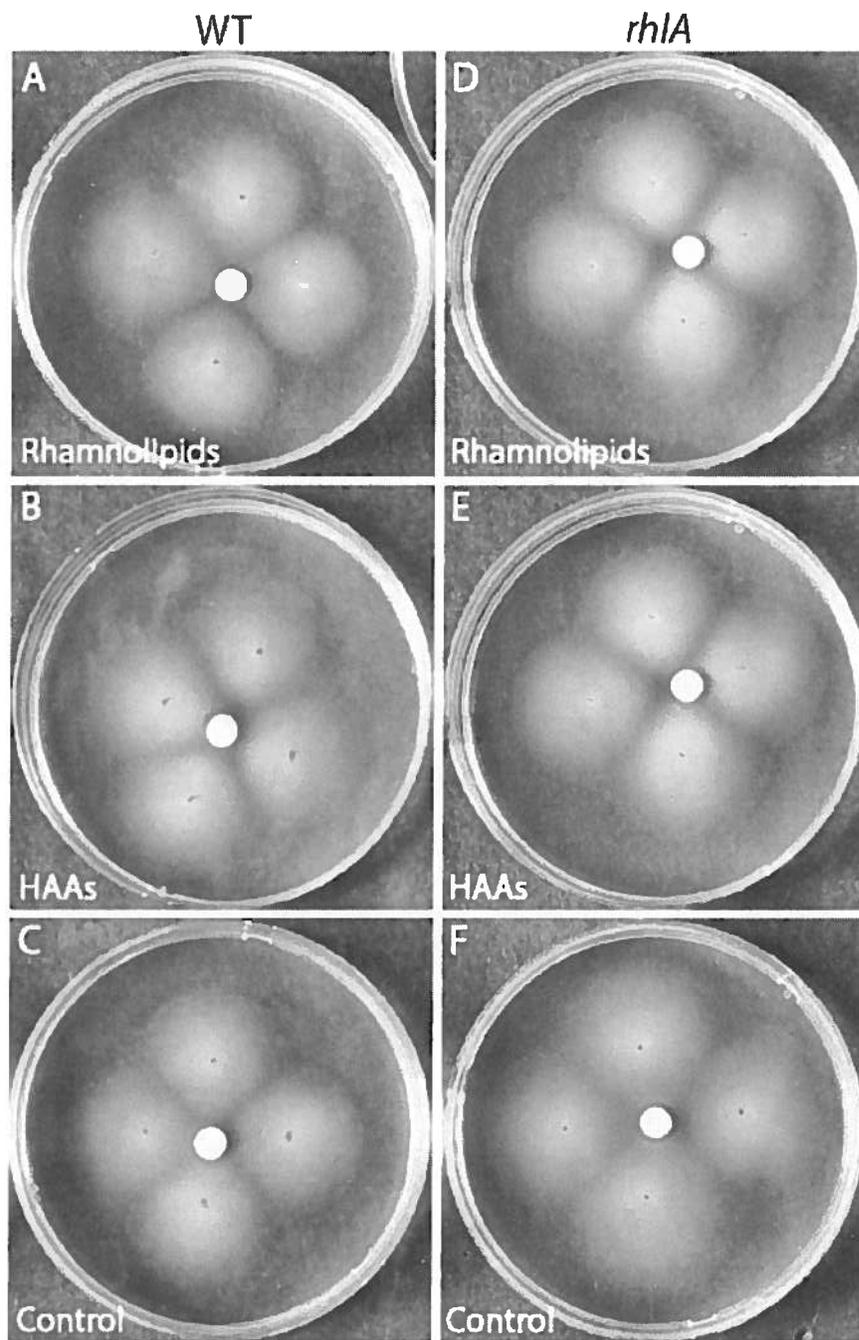


Figure 5

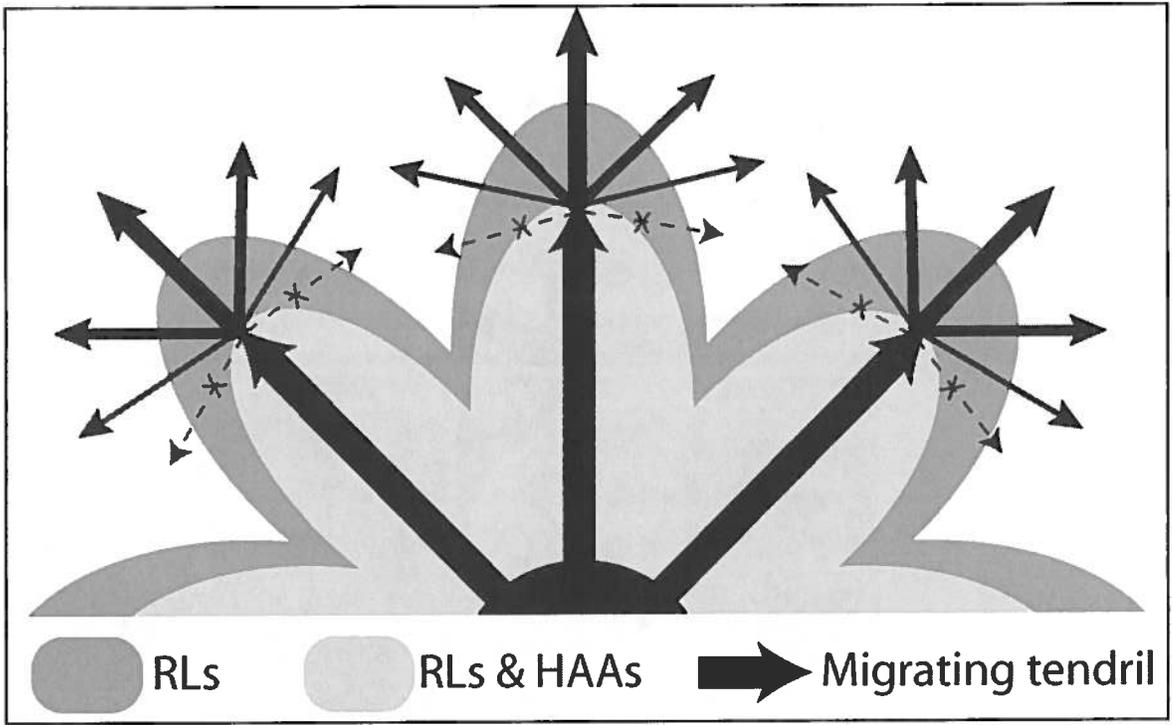


Figure 6