

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

**Julien Tremblay**

Thèse de doctorat (PhD)

Laval, août 2011

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

**Julien Tremblay**

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur en biologie  
par l'Institut National de la Recherche Scientifique

Directeur de thèse Dr Éric Déziel  
INRS – Institut Armand-Frappier, Canada

Examineur interne Dr Richard Villemur  
INRS – Institut Armand-Frappier, Canada

Examineur externe Dr Hervé Le Moual  
Université McGill, Canada

Examineur externe Dr Ryszard Brzezinski  
Université de Sherbrooke, Canada

**Julien Tremblay**

Laval, août 2011

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire du Dr Éric Déziel à l'INRS – Institut Armand-Frappier, membre du réseau de l'Université du Québec (UQ). Les travaux décrits dans cette thèse ont été financés par des bourses doctorales du Fonds Québécois de Recherche en Nature et Technologies (FQRNT), et de la Fondation Armand-Frappier, ainsi que par une subvention du Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG).

# 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 et souvent accompagné d'une différenciation cellulaire. Les cellules en *swarming* peuvent parfois se regrouper en radeaux multicellulaires, devenir hyperflagellées et hyperallongées. Sur géloses, le *swarming* se traduit par la formation de dendrites qui migrent selon des motifs particuliers à partir d'un point d'inoculation. Chez *P. aeruginosa*, les deux seuls facteurs absolus requis pour le *swarming* sont la présence d'un flagelle fonctionnel ainsi que la synthèse de biosurfactants (*i.e.* rhamnolipides). Ces molécules présentent des propriétés tensio-actives qui agiraient en réduisant la friction entre les cellules et le milieu sur lequel elles circulent. Le rôle fondamental du *swarming* est inconnu, mais serait la conséquence de l'expression de voies génétiques activées par certains facteurs environnementaux. Le *swarming* constitue une manifestation de multicellularité bactérienne, au même titre que le modèle classique des biofilms microbiens.

Dans cette thèse, je rapporte premièrement des résultats décrivant comment obtenir une bonne reproductibilité des tests de *swarming* en laboratoire, le tout en explorant l'effet de certains facteurs environnementaux sur ce type de motilité. En effet, aucun protocole fiable et reproductible n'existait lorsque j'ai entrepris d'étudier ce phénomène de surface. En deuxième lieu, je décris une étude transcriptomique d'une colonie de *P. aeruginosa* en *swarming* afin de déterminer quels sont les gènes dont l'expression caractérise ce type de motilité. Je rapporte par la suite la découverte d'un gène impliqué dans le *swarming*, mais n'affectant pas la synthèse de rhamnolipides et la fonction flagellaire. Finalement, des résultats visant à

caractériser un mutant dans un gène codant pour un peptide à motif double-glycine (motifs traditionnellement impliqués dans le *quorum sensing* chez les bactéries à Gram(+)) sont décrits.

Les résultats rapportés dans cette thèse améliorent 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. À plus long terme, cet ouvrage contribuera au développement de l'étude de la motilité *swarming* en tant que modèle de multicellularité bactérien.

Dans la vie, la chance aide  
parfois, l'intelligence souvent, le  
travail et la persévérance  
toujours.

Proverbe Brahman

# Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mon amoureuse Annie Delisle pour son amour, support et soutien inconditionnel que j'ai apprécié à un point qui est indescriptible.

Je voudrais aussi offrir de chaleureux remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Éric Déziel qui m'a accueilli dans son laboratoire il y a de cela bientôt six ans et au côté duquel j'ai énormément appris sur la recherche scientifique et sur les qualités requises pour devenir un bon scientifique. Je le remercie aussi pour sa motivation et son dynamisme indestructible. Je lui exprime aussi ma gratitude pour m'avoir laissé autant de latitude dans mes recherches.

Je tiens aussi à remercier Sylvain Milot qui m'a offert à de nombreuses reprises son soutien technique. Je le remercie aussi pour son assistance, son ingéniosité à toute épreuve et sa bonne humeur.

J'exprime aussi de sincères remerciements aux Drs François Lépine et Richard Villemur pour leurs conseils et soutien et nombreuses lettres de recommandation.

Je remercie tous les membres du Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement de l'Institut Armand-Frappier que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ces six dernières années. Je me souviendrai toujours du cadre de travail à l'ambiance conviviale et unique régnant au sein de cette unité de recherche.

Finalement, je voudrais aussi remercier ma famille, mais particulièrement mes parents Michelle et André pour leur soutien et aide inconditionnelle au cours de cette très longue aventure pas toujours facile qu'ont été mes études graduées.

# Table des matières

<b>1 Revue de littérature.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Vue d'ensemble.....	2
1.2 - La multicellularité bactérienne .....	4
1.3 - La motilité chez les bactéries .....	5
1.3.1 - Différents types de motilité bactérienne .....	5
1.3.2 - Motilité de type <i>swarming</i> .....	6
1.3.3 - Les différents phénotypes de <i>swarming</i> .....	7
1.3.4 - Différenciation cellulaire et motilité de type <i>swarming</i> .....	8
1.3.5 - Chimiotactisme et <i>swarming</i> .....	10
1.3.6 - Résistance aux antibiotiques et <i>swarming</i> .....	12
1.3.7 – Biosurfactants et <i>swarming</i> .....	13
1.3.8 - Relation entre le <i>swarming</i> et les biofilms.....	15
1.3.8.1 - Les biofilms .....	15
1.3.8.2 - Le développement d'un biofilm.....	16
1.3.8.3 - La relation entre les biofilms et la motilité de type <i>swarming</i> .....	16
1.4 - Caractéristiques du <i>swarming</i> chez différentes espèces.....	17
1.4.1 - <i>Serratia</i> .....	18
1.4.1.1 - Milieu nutritionnel et <i>swarming</i> .....	18
1.4.1.2 - Gènes impliqués dans le <i>swarming</i> .....	18
1.4.1.3 - Biosurfactants, QS et <i>swarming</i> .....	19
1.4.1.4 - Virulence et motilité de type <i>swarming</i> .....	19
1.4.2 - <i>Proteus mirabilis</i> .....	20
1.4.2.1 - Milieu nutritionnel et <i>swarming</i> .....	20
1.4.2.2 - Facteurs génétiques du <i>swarming</i> .....	21
1.4.2.3 - Matrice extracellulaire et <i>swarming</i> .....	22
1.4.2.4 - Virulence et <i>swarming</i> .....	23
1.4.3 – <i>Salmonella</i> .....	24
1.4.3.1 - Milieu nutritionnel et <i>swarming</i> .....	24
1.4.3.2 - Génétique du <i>swarming</i> .....	24
1.4.3.3 - Facteurs requis pour le <i>swarming</i> .....	25
1.4.3.4 - Virulence et <i>swarming</i> .....	25
1.4.4 - <i>Bacillus subtilis</i> .....	26
1.4.4.1 - Milieu nutritionnel et <i>swarming</i> .....	26
1.4.4.2 - Gènes impliqués dans le <i>swarming</i> .....	26
1.4.4.3 - QS et surfactine .....	27
1.4.4.4 - Virulence et <i>swarming</i> .....	28



1.4.5 – <i>Vibrio</i> .....	28
1.4.5.1 - Milieu nutritionnel et <i>swarming</i> .....	28
1.4.5.2 - Génétique du <i>swarming</i> .....	29
1.4.5.3 - Opacité des colonies et <i>swarming</i> .....	30
1.4.6 - <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	31
1.4.7 - <i>Escherichia coli</i> .....	31
1.4.8 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
1.4.8.1 - Milieu nutritionnel et <i>swarming</i> .....	32
1.4.8.2 – Rôle du flagelle et des pili dans le <i>swarming</i> .....	33
1.4.8.3 - Les rhamnolipides.....	34
1.4.8.4 – Relation entre les rhamnolipides et le <i>swarming</i> .....	38
1.4.8.4 – Relation entre le di-GMP cyclique et le <i>swarming</i> .....	38
1.4.8.5 - Autres gènes impliqués dans le <i>swarming</i> .....	41
1.4.8.6 - <i>Swarming</i> , biofilms et virulence .....	42
<b>2 Objectifs</b> .....	<b>44</b>
2.1 - Objectif général.....	45
2.2 - Hypothèses.....	45
2.3 - Objectifs spécifiques .....	45
<b>3 Résultats</b> .....	<b>47</b>
3.1 - Identification des facteurs affectant la reproductibilité du test de motilité <i>swarming</i> chez <i>P. aeruginosa</i> .....	48
3.1.1 - Mise en contexte .....	48
3.1.2 - Contribution de l'étudiant.....	48
3.1.3 – Résumé en français.....	48
3.1.4 - Article .....	50
3.1.4.1 - Abstract.....	51
3.1.4.2 - Introduction .....	51
3.1.4.3 - Materials and methods.....	52
3.1.4.3.1 - Bacterial strains, media and growth conditions.....	52
3.1.4.3.2 - Swarm plates assay.....	52
3.1.4.3.3 - Dry weight determination .....	53
3.1.4.3.4 - Swarm plate surface coverage .....	53
3.1.4.3.5 - dRLs and HAAs agar diffusion measurements.....	53
3.1.4.4 - Results and discussion .....	54
3.1.4.4.1 - <i>Swarming motility depends on agar % and drying time under laminar flow</i> .....	54
3.1.4.4.2 - Incubation temperature influences <i>swarming motility</i> .....	58
3.1.4.4.3 - <i>Swarming motility is influenced by pH</i> .....	60
3.1.4.4.4 - <i>Swarming of different P. aeruginosa strains</i> .....	63
3.1.4.5 - Concluding remarks .....	65
3.1.4.6 - Acknowledgments .....	65
3.2 – Transcriptome de la motilité de type <i>swarming</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	66
3.2.1 - Mise en contexte .....	66
3.2.2 - Contribution de l'étudiant.....	66

3.2.3 – Résumé en français.....	67
3.2.4 - Article .....	69
3.2.4.1 - Abstract.....	70
3.2.4.2 - Background .....	71
3.2.4.3 – Methods.....	73
3.2.4.3.1 - Bacteria.....	73
3.2.4.3.2 - Motility assays .....	73
3.2.4.3.3 - Sample preparation for microarray hybridization.....	73
3.2.4.3.4 - Microarray hybridization and data analysis .....	74
3.2.4.3.5 - qRT-PCR .....	75
3.2.4.4 - Results and discussion .....	75
3.2.4.4.1 - Experimental design to identify differentially expressed genes in a <i>P. aeruginosa</i> swarming colony - significant transcriptional changes.....	75
3.2.4.4.2 - Validation of microarray results by qRT-PCR.....	78
3.2.4.4.3 - Genes positively regulated in tendril tip cells .....	79
3.2.4.4.4 - Genes negatively regulated in tendril tip cells .....	81
3.2.4.4.5 - Genes up-regulated in the swarm center.....	84
3.2.4.4.6 - Tendril tip and swarm center bacteria constitute two distinct populations .....	86
3.2.4.5 - Conclusions.....	89
3.2.4.6 - Authors' contribution .....	90
3.2.4.7 - Acknowledgements .....	90
3.2.4.8 - Tables.....	91
3.3 - Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en <i>swarming</i> .....	98
3.3.1 - Condition HAA .....	98
3.3.2 - Criblage <i>swarming</i> .....	100
3.3.2.1 - Mutants inhibés dans le <i>swarming</i> .....	107
3.4 - Régulation de la motilité de type <i>swarming</i> par HptB chez <i>P. aeruginosa</i> .....	113
3.4.1 - Résumé .....	113
3.4.2 - Introduction.....	114
3.4.3 - Méthodologie .....	119
3.4.3.1 - Bactéries .....	119
3.4.3.2 - Tests de motilité .....	119
3.4.3.3 - Préparation des échantillons pour hybridation sur biopuces .....	120
3.4.3.4 - Hybridation des biopuces et analyse des données. ....	120
3.4.3.5 - qRT-PCR.....	120
3.4.3.6 - Techniques moléculaires .....	121
3.4.3.7 - Formation de biofilms en milieu statique .....	122
3.4.3.8 - Fixation de rouge Congo.....	122
3.4.3.9 - Quantification de Hcp1.....	122
3.4.3.10 - Test de mortalité de drosophiles.....	123
3.4.3.11 - Test de croissance.....	124
3.4.3.12 - Quantification des biosurfactants .....	124
3.4.4 - Résultats .....	126

3.4.4.1 - Un mutant dans le gène <i>hptB</i> est inhibé dans le <i>swarming</i> .....	126
3.4.4.2 - Les gènes du système de sécrétion de type VI sont surexprimés chez un mutant $\Delta hptB$ .....	129
3.4.4.3 – Un mutant $\Delta hptB$ est insensible aux rhamnolipides .....	135
3.4.4.4 - Des bactéries cultivées en surface montrent une expression génique différente de cellules en bouillon. ....	137
3.4.5 - Discussion .....	140
3.4.6 - Conclusion .....	145
3.5 - Rôle du gène PA1768 dans le <i>swarming</i> .....	146
3.5.1 - Mise en contexte .....	146
3.5.1.1 - <i>Quorum-sensing</i> et peptides avec motifs GG .....	147
3.5.2 - Méthodologie .....	148
3.5.2.1 – Bactéries et tests phénotypiques .....	148
3.5.2.2 – Hybridation sur biopuce et analyse de données .....	149
3.5.2.3 - Profils de protéines extracellulaires .....	149
3.5.3 - Résultats .....	149
3.5.3.1 - Caractérisation d'un mutant PA1768 <sup>-</sup> .....	149
3.5.3.2 - Profil d'expression d'un mutant PA1768 <sup>-</sup> sur biopuces .....	151
3.5.3.3 - Autres gènes impliqués dans des voies de signalisation GG .....	153
3.5.3.4 - Vérification que le peptide PA1768 est sécrété .....	154
3.5.4 - Discussion .....	154
3.5.5 - Perspectives .....	158
<b>4 Conclusion .....</b>	<b>160</b>
4.1 - Vue d'ensemble .....	161
4.1.1 - Récapitulation .....	161
4.1.2 - Signification écologique du <i>swarming</i> .....	162
4.1.3 - Communication intercolonie .....	166
4.1.4 - Difficultés inhérentes à l'étude du <i>swarming</i> .....	168
4.2 - Perspectives .....	169
<b>5 Références .....</b>	<b>172</b>
<b>6 Annexe .....</b>	<b>198</b>
6.1 - Publications .....	199
6.2 - Communications par affiches .....	199
6.3 - Autre communication .....	200
6.4 - Données supplémentaires à la section 3.4 .....	201
6.4.1- Transcriptome du mutant $\Delta hptB$ .....	201
6.5 - Données supplémentaires de la section .....	208
3.2 - Transcriptome de la motilité de type <i>swarming</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	208
6.5.1 - Additional file 1 .....	208
6.5.2 - Additional file 2 .....	209
6.5.3 - Additional file 3 .....	255
6.5.4 - Additional file 4 .....	256
6.5.5 - Additional file 5 .....	257
6.5.6 - Additional file 6 .....	258

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.3.1.</b> Quelques agents mouillants ayant des rôles importants dans le <i>swarming</i> . .....	15
<b>Tableau 1.4.1.</b> Gènes impliqués dans la différenciation cellulaire chez <i>P. mirabilis</i> .....	21
<b>Tableau 1.4.2.</b> Gènes impliqués dans la motilité de type <i>swarming</i> chez <i>B. subtilis</i> .....	27
<b>Table 3.2.1.</b> Differentially expressed genes by pairwise comparison. ....	91
<b>Table 3.2.2.</b> Selected genes up-regulated in tendril tip cells. ....	92
<b>Table 3.2.3.</b> Selected genes down-regulated in tendril tip cells. ....	94
<b>Table 3.2.4.</b> Selected genes up-regulated in swarm center. ....	96
<b>Table 3.2.5.</b> Genes used for microarray validation with qRT-PCR. ....	97
<b>Tableau 3.3.1.</b> Gènes différentiellement exprimés dans la condition HAA vs extrémité de dendrite.....	100
<b>Tableau 3.3.2.</b> Mutants dans les gènes différentiellement exprimés dans une colonie <i>swarming</i> disponibles dans la banque PA14NR. ....	101
<b>Tableau 3.3.3.</b> Mutants dans les gènes différentiellement exprimés dans une colonie <i>swarming</i> non-disponibles dans la banque PA14NR. ....	102
<b>Tableau 3.3.4.</b> Phénotypes des mutants affectés dans le <i>swarming</i> . ....	103
<b>Tableau 3.4.1.</b> Souches.....	125
<b>Tableau 3.4.2.</b> Amorces.....	126
<b>Tableau 3.4.3.</b> Criblage pour la motilité <i>swarming</i> de mutants dans des gènes codant pour des senseurs à deux composantes hybrides ou impliqués dans la voie de signalisation HptB. ....	128
<b>Tableau 3.4.4.</b> Sélection de gènes différentiellement exprimés chez le mutant $\Delta hptB$ .....	132
<b>Tableau 3.4.5.</b> Validation des résultats de biopuces par qRT-PCR.....	133
<b>Tableau 3.5.1.</b> Gènes différentiellement exprimés chez le mutant PA1768'.....	152
<b>Tableau 6.4.1.</b> Gènes exclusivement différentiellement chez $\Delta hptB$ vs extrémité de dendrite. ....	202
<b>Tableau 6.4.2.</b> Gènes exclusivement différentiellement chez $\Delta hptB$ vs centre de <i>swarming</i> . .	204
<b>Tableau 6.4.3.</b> Gènes exclusivement différentiellement exprimés chez $\Delta hptB$ vs non- <i>swarming</i> (C), $\Delta hptB$ vs. extrémité de dendrite et $\Delta hptB$ vs centre de <i>swarming</i> (D) et $\Delta hptB$ vs extrémité de dendrite et $\Delta hptB$ vs non- <i>swarming</i> (E). ....	205
<b>Tableau 6.4.4.</b> Gènes exclusivement différentiellement exprimés chez $\Delta hptB$ vs centre de <i>swarming</i> et $\Delta hptB$ vs non- <i>swarming</i> (F), $\Delta hptB$ vs extrémité de dendrite, $\Delta hptB$ vs centre de <i>swarming</i> et $\Delta hptB$ vs non- <i>swarming</i> (G).....	206

<b>Table 3.2.6.</b> Differentially expressed genes of tendril tip, swarm center and non-swarming bacterial populations. ....	210
<b>Table 3.2.7.</b> Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. ....	223
<b>Table 3.2.8.</b> Product and function for genes up-regulated in tendril vs. NS. ....	233
<b>Table 3.2.8.</b> Product and function for genes up-regulated in tendril vs. NS. ( <i>continued...</i> ).....	235
<b>Table 3.2.9.</b> Product and function for genes down-regulated in swarm center vs. NS. ....	236
<b>Table 3.2.10.</b> Product and function for genes up-regulated in swarm center vs. NS. ....	238
<b>Table 3.2.11.</b> Product and function for genes down-regulated in tendril vs. swarm center. ....	240
<b>Table 3.2.12.</b> Product and function for genes up-regulated in tendril vs. swarm center. ....	245
<b>Table 3.2.13.</b> Differentially expressed genes exclusively found in the tendril vs. NS, swarm center vs. NS and tendrils vs. swarm center comparisons. ....	246
<b>Table 3.2.14.</b> Differentially expressed genes exclusively found in the D) tendril vs. NS and swarm center vs. NS, E) tendril vs. NS and tendrils vs. swarm center and F) swarm center vs. NS and tendril vs. swarm center comparisons. ....	251
<b>Table 3.2.15.</b> Differentially expressed genes exclusively found in the tendril vs. NS, swarm center vs. NS and tendril vs. swarm center comparisons. ....	254
<b>Table 3.2.16.</b> List of primers used in the qRT-PCR experiments. ....	255

# Liste des figures

<b>Figure 1.3.1.</b> La motilité de type <i>swarming</i> se manifeste différemment selon les espèces et le milieu nutritionnel. ....	8
<b>Figure 1.3.2.</b> Les cellules <i>swarming</i> différenciées ont une taille et un nombre de flagelles supérieurs aux cellules végétatives (non-différenciées). ....	9
<b>Figure 1.3.3.</b> Les cellules différenciées pour la motilité de type <i>swarming</i> forment des structures de radeaux multicellulaires.....	10
<b>Figure 1.4.1.</b> L'inhibition de la rotation du flagelle polaire entraîne l'expression des gènes flagellaires latéraux ( <i>laf</i> ) chez <i>V. parahaemolyticus</i> . ....	29
<b>Figure 1.4.2.</b> OpaR et SwrZ inhibent l'expression des gènes flagellaires latéraux ( <i>laf</i> ). ....	30
<b>Figure 1.4.3.</b> Schéma du système de QS chez <i>P. aeruginosa</i> . ....	35
<b>Figure 1.4.4.</b> Voie de synthèse des rhamnolipides.....	37
<b>Figure 1.4.5.</b> Voie régulatoire du système SadC/SadB/BifA.....	40
<b>Figure 3.1.1.</b> Swarming motility is dependant on agar % and drying time under laminar flow. .	56
<b>Figure 3.1.2.</b> dRLs and HAAs diffusion speed is affected by the agar concentration of swarm plates.....	57
<b>Figure 3.1.3.</b> Swarming expression is dependant on the incubation temperature. ....	59
<b>Figure 3.1.4.</b> Swarming expression is pH-dependant.....	62
<b>Figure 3.1.5.</b> Swarming motility phenotype of various <i>P. aeruginosa</i> strains under conditions optimized for strain PA14 (0.5% agar, 60 min. drying, 30°C O/N incubation). ....	64
<b>Figure 3.2.1.</b> Global gene expression pattern with a change in expression level greater than 1.5 log <sub>2</sub> -fold in the three tested conditions.....	77
<b>Figure 3.2.2.</b> Microarray results validation by qRT-PCR.....	78
<b>Figure 3.2.3.</b> Proposed model of the transcriptional dynamics displayed in tendril tips and swarm center of a <i>P. aeruginosa</i> swarming colony.....	89
<b>Figure 3.3.1.</b> Design expérimental de la condition HAA.....	99
<b>Figure 3.3.2.</b> Contexte génomique des transposants rapportés au tableau 3.3.4.....	104
<b>Figure 3.3.3.</b> Phénotypes de mutants affectés dans la motilité de type <i>swarming</i> .....	106
<b>Figure 3.4.1.</b> Diagramme schématique inspiré de Bijlsma <i>et al.</i> , (2003) montrant le transfert de groupement phosphate dans un 2CS de type hybride. ....	115
<b>Figure 3.4.2.</b> Voie de signalisation RsmA/RsmY/RsmZ.....	118
<b>Figure 3.4.3.</b> Phénotypes reliés à la motilité <i>swarming</i> chez $\Delta hptB$ .....	129
<b>Figure 3.4.4.</b> Expression des gènes ayant un seuil de changement d'expression supérieur à 1.3 à l'échelle log <sub>2</sub> .....	134

<b>Figure 3.4.5.</b> Hcp1 est hypersécrété chez $\Delta hptB$ par rapport à la souche sauvage.....	135
<b>Figure 3.4.6.</b> Un produit hypothétique sécrété via l'inactivation de <i>hptB</i> entraîne un effet d'évitement de dendrites en <i>swarming</i> et rend les bactéries insensibles aux biosurfactants produits par <i>P. aeruginosa</i> .....	137
<b>Figure 3.4.7.</b> Expression de différents gènes chez le mutant $\Delta hptB$ déterminé par qRT-PCR...	139
<b>Figure 3.5.1.</b> Contexte génomique du gène PA1768.....	147
<b>Figure 3.5.2.</b> Modèle de système régulateur à base de peptide chez les bactéries à Gram(+). Schéma adapté de (Sturme <i>et al.</i> , 2002). .....	148
<b>Figure 3.5.3.</b> Différents phénotypes du mutant PA1768 <sup>-</sup> .....	150
<b>Figure 3.5.4.</b> Profils des protéines extracellulaires du mutant PA1768 <sup>-</sup> et de la souche sauvage. ....	154
<b>Figure 4.1.1.</b> Voie de signalisation hypothétique dans laquelle HptB et PA1611 ont un rôle central. Schéma adapté de Bordi <i>et al.</i> , (2010) et Hsu <i>et al.</i> , (2008). .....	165
<b>Figure 4.1.2.</b> Réponse de <i>P. aeruginosa</i> face à des rhamnolipides/HAA exogènes. ....	168
<b>Figure 6.4.1.</b> Résumé des résultats de séquençage de peptides par spectrométrie de masse se rapportant à la section 3.4.....	207
<b>Figure 3.2.4.</b> Venn diagram representing differentially expressed genes for each conditions and possible combinations. ....	256
<b>Figure 3.2.5.</b> Flagella observations. ....	257
<b>Figure 3.2.6.</b> Swarm center population contains more dead cells than non-swarming bacteria. ....	258

# Liste des abréviations

RL	Rhamnolipides (la plupart du temps, ce terme désigne l'ensemble des surfactants (HAA, mRL et dRL) synthétisés par <i>P. aeruginosa</i> )
HAA	Acide 3-(3 hydroxyalcanoyloxy)-alcanoïque
dRL	Di-rhamnolipides
mRL	Mono-rhamnolipides
QS	<i>Quorum sensing</i>
kDa	Kilo Dalton
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
RPM	Révolutions par minute
PBS	Tampon phosphate salin
PE	Phosphatidyléthanolamine
pb	Paire de bases
2CS	Système à deux composantes
SST6	Système de sécrétion de type VI
GG	Motif double-glycine



**1**

# **Revue de littérature**

# 1.1 - Vue d'ensemble

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, ne possèdent pas de noyau et autres organelles encapsulés 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, la 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 des 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 autres la formation de spores, la motilité, la sécrétion de facteurs de virulence et la formation de biofilms.

Les communautés microbiennes les mieux étudiées sont d'ailleurs les biofilms, soit des bactéries englobées dans une matrice de polysaccharides autoproduite. La formation de biofilms peut avoir lieu grâce à la division du travail et à la spécialisation de certaines cellules d'une 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 molécules 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

## 1.1 Vue d'ensemble

---

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 la plupart du temps associées à des surfaces. Or, 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 bactérienne

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 (O'Toole *et al.*, 2000; Aguilar, 2007 #499; Fuqua *et al.*, 2001). 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 (Atkinson & Williams, 2009; Ng & Bassler, 2009).

Le QS est possible grâce à des molécules de signalisation appelées auto-inducteurs. Comme chez les organismes supérieurs, l'information véhiculée par ces auto-inducteurs est essentielle pour synchroniser des activités multicellulaires telles 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 attachée à une surface (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Flemming & Wingender, 2010). 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, 2000; Stoodley *et al.*, 2002). Par exemple, la plupart des infections chroniques pulmonaires des individus atteints de la fibrose kystique sont causées par la formation de biofilms de la bactérie *Pseudomonas 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 (Henrichsen, 1972). Il identifia alors six catégories de motilités de surface, soit le *swimming*, *swarming*, *gliding*, *twitching*, *sliding* et *darting*. Parmi tous ces types de motilités, seuls le *swimming* et le *swarming* requièrent l'utilisation de flagelles fonctionnels (Harshey, 2003; Kearns, 2010).

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). La motilité de type *twitching* a été la plus étudiée chez *P. aeruginosa* et à aussi été observée 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; Mauriello *et al.*, 2010). 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; Mauriello *et al.*, 2010). Typiquement des bactéries en *gliding* actif produisent des dendrites miniatures (McBride, 2001 ; Mauriello *et al.*, 2010). *Myxococcus xanthus*, un organisme-modèle pour l'étude de la motilité de surface, utilise les pili de type IV

### 1.3 La motilité chez les bactéries

---

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; Mauriello *et al.*, 2010). 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). Notons que la motilité *sliding* a été observée chez une souche mutante de *P. aeruginosa* inhibée dans la synthèse de flagelles et pili de type IV (Murray & Kazmierczak, 2008).

#### 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; Netotea *et al.*, 2009; Kearns, 2010; Venturi *et al.*, 2010). D'ailleurs, plusieurs études 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, relativement peu d'études portant sur ce sujet ont été réalisées.

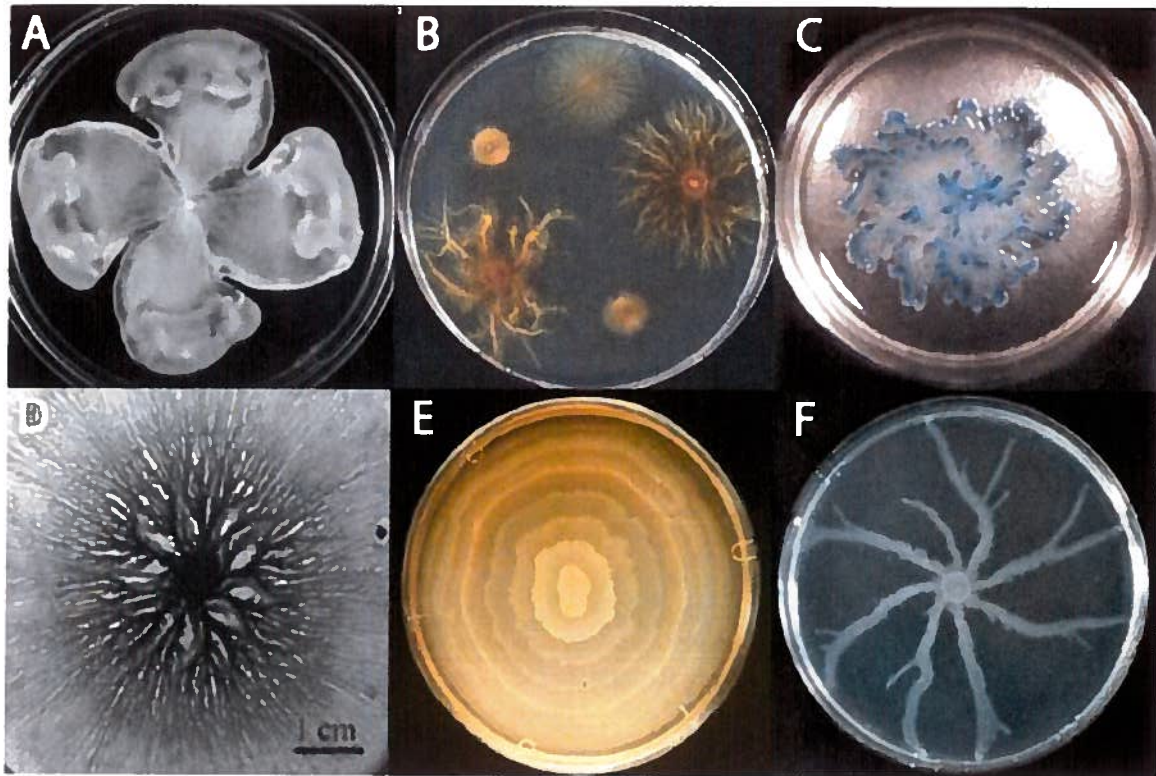
Les genres bactériens chez lesquels le *swarming* a été significativement étudié peuvent se diviser en deux groupes. Le premier groupe comprend les genres chez lesquels le *swarming* a lieu de manière optimale sur de l'agar semi solide (0,5 à 0,7%) : *Serratia* (Alberti & Harshey, 1990; Eberl *et al.*, 1999), *Salmonella* (Harshey, 1994), *Aeromonas* (Kirov *et al.*, 2002), *Bacillus* (Kearns & Losick, 2003), *Yersinia* (Young *et al.*, 1999) et *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 à haute concentration d'agar (1,5 à 2%), soit *Proteus* (Rather, 2005) et *Vibrio* (McCarter & Silverman, 1990; McCarter, 2004). Le *swarming* n'a été que peu étudié chez l'espèce modèle *E. coli* (Harshey, 1994). Pour chaque genre bactérien, voire 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

### 1.3 La motilité chez les bactéries

peut varier, soit 1) la composition en nutriments et 2) la concentration en agar utilisée 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 fractale (Fig. 1.3.1). 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 1.3.1E. Chez *Salmonella*, *Serratia*, et *Vibrio*, la formation de motifs de fractals ou d'anneaux concentriques 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 au *swarming* (Fig. 1.3.1B).



## 1.3 La motilité chez les bactéries

---

**Figure 1.3.1.** La motilité de type *swarming* se manifeste différemment selon les espèces et le milieu nutritionnel.

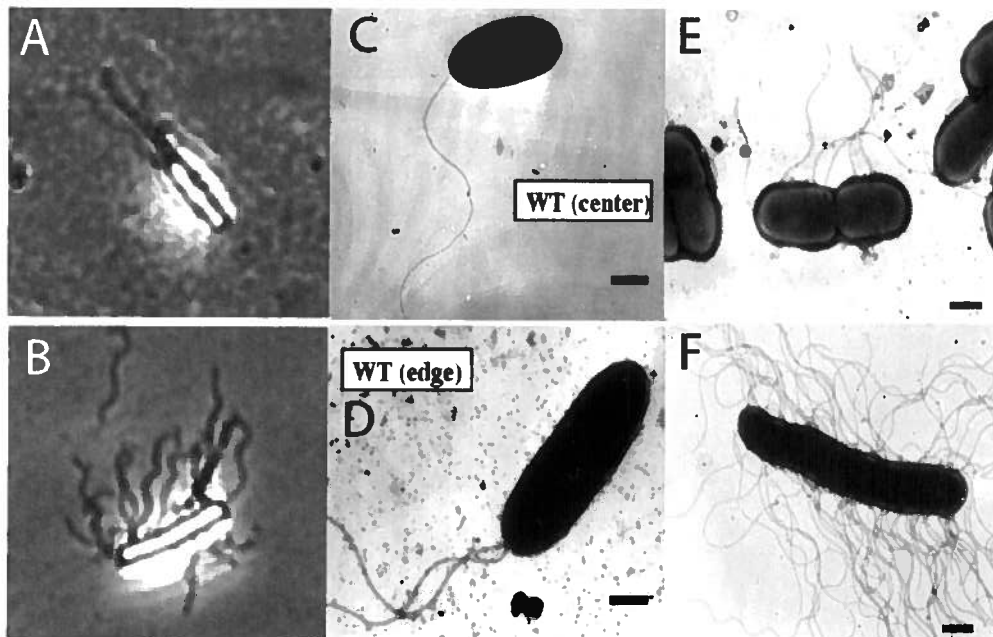
(A) *E. coli* (Burkart *et al.*, 1998), (B) *M. xanthus* – motilité de type *gliding* (Velicer & Yu, 2003), (C & D) *Bacillus subtilis* (Kearns & Losick, 2003; Julkowska *et al.*, 2004), (E) *P. mirabilis* et (F) *P. aeruginosa* (Laboratoire Éric Déziel).

### 1.3.4 - Différenciation cellulaire et motilité de type *swarming*

Chez plusieurs espèces, pour entrer en *swarming*, les bactéries subissent 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 (Harshey, 1994; Rauprich *et al.*, 1996; Fraser & Hughes, 1999; 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 signalisation intercellulaire (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, tels que *P. aeruginosa*, voient leur taille et nombre de flagelles doubler (Fig. 1.3.2) (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 minéral 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* demandent 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 totale de la cellule (Macnab, 1987).



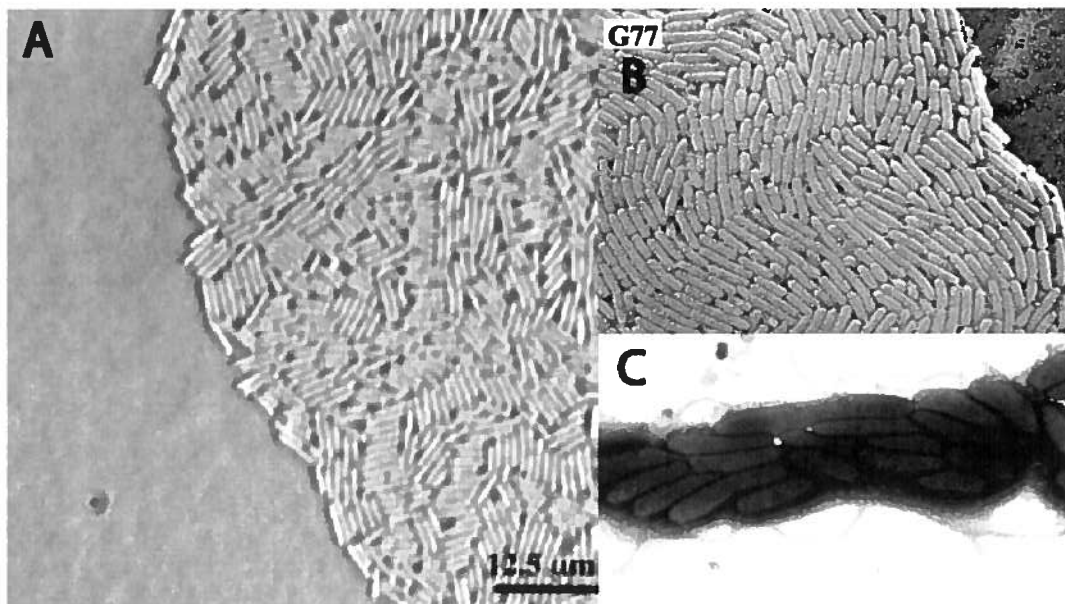
### 1.3 La motilité chez les bactéries



**Figure 1.3.2.** 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.*, 1996; Rashid & Kornberg, 2000; Kearns & Losick, 2003).

Les cellules *swarming* différenciées sont typiquement alignées sous forme de radeaux multicellulaires (Fig. 1.3.3) et sont englobées dans une matrice extracellulaire visqueuse qui faciliterait leurs mouvements (Stahl *et al.*, 1983; Allison *et al.*, 1993; Gygi *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2004). 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, en particulier 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 1.3.3.** 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 (Kohler *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2004; Julkowska *et al.*, 2004).

Chez de nombreux genres bactériens capables de *swarming*, l'action d'un agent tensioactif (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 de biosurfactants est sous le contrôle du QS.

#### 1.3.5 - 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 aucune étude expliquant avec précision les mécanismes chimiotactiques gouvernant la motilité *swarming*. Il est cependant connu que chez *E. coli* et *S. typhimurium*, des mutations dans la voie de signalment du chimiotactisme inhibent la différenciation en cellules *swarming* (Harshey & Matsuyama, 1994).

Chez *E. coli*, la machinerie impliquée dans le chimiotactisme est requise pour le *swarming*, mais nécessiterait un stimulus autre que celui connu pour être spécifique à cet appareil chimiotactique (Burkart *et al.*, 1998). Aussi, chez *Vibrio*, certaines composantes du

### 1.3 La motilité chez les bactéries

---

système de chimiotactisme sont essentielles pour qu'une population puisse se différencier en colonie *swarming* (McCarter, 1999). 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. Un système de chimiotactisme spécifique à la motilité de type *twitching* impliquant des phospholipides a été décrit pour la première fois chez *M. xanthus* (Kearns & Shimkets, 1998; Kearns & Shimkets, 2001), puis chez *P. aeruginosa* (Kearns *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2008). Lorsqu'elle effectue du *twitching*, *M. xanthus* migre en suivant un gradient de molécules de phosphatidyléthanolamine (PE) purifiés de ses propres membranes cellulaires (Kearns & Shimkets, 1998). Les PE ont aussi été identifiés comme dirigeant le *twitching* chez *P. aeruginosa* et plusieurs hypothèses ont été proposées concernant le rôle de ces molécules dans ce type de motilité, mais celles-ci demeurent spéculatives (Kearns *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2008). Le seul autre cas où une réponse chimiotactique a affecté la motilité de type *swarming* est chez *P. mirabilis* pour qui 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.

Dernièrement, il a été rapporté que le comportement typique observé chez des bactéries en *swimming*, soit mouvement en ligne droite – culbutage – mouvement en ligne droite, n'a pas lieu chez des bactéries en *swarming* de *E. coli* (Darnton *et al.*, 2010). En fait, les bactéries en *swarming* actif se réorientent continuellement par collision aléatoire avec leurs voisins, ce qui détermine leur « nouvelle » direction en à peine quelques dixièmes de seconde. De plus, ils ont observé qu'à l'extrémité des fronts de *swarming*, les cellules font souvent des pauses, puis reviennent vers l'arrière du centre de *swarming*. À l'aide de techniques d'imagerie moléculaire, plusieurs type de mouvements ont été observés chez des cellules en *swarming* (Turner *et al.*, 2010). Ceci a permis de mettre en lumière un type de motion cellulaire propre à des cellules en *swarming* : le mouvement de réversion (Chen *et al.*, 2007). Ce type de

### 1.3 La motilité chez les bactéries

---

mouvement est exhibé principalement par des bactéries se situant au front de migration (Turner *et al.*, 2010). Ce genre de variation de direction de migration chez une cellule a été suggéré comme favorisant l'extraction d'eau provenant de l'agar via le mouvement brusque de flagelles collés à l'agar (Mariconda *et al.*, 2006). Ceci résulterait en une augmentation de l'humidité de surface favorisant ainsi le mouvement bactérien.

#### 1.3.6 - Résistance aux antibiotiques et *swarming*

Un phénomène très particulier et répandu chez plusieurs espèces bactériennes capables de *swarming* a lieu pendant que les bactéries migrent à l'aide de ce type de motilité : elles deviennent hautement résistantes à de nombreuses molécules antimicrobiennes. Les premiers travaux sur le *swarming* et la résistance aux antibiotiques ont été effectués avec *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Kim *et al.*, 2003; Kim & Surette, 2003). En effet, des bactéries en *swarming* montraient une résistance à la polymyxine, kanamycine, ciprofloxacine et tobramycine plus élevée que des cellules non-différenciées (Kim & Surette, 2003).

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 (Wosten & Groisman, 1999; Gunn *et al.*, 2000; Trent *et al.*, 2001). Cette modification apporte une charge positive supplémentaire au LPS, ce qui réduit le potentiel de liaison des peptides antimicrobiens cationiques tels que la polymyxine et l'azurodicine (Kim *et al.*, 2003). Cet opéron est surexprimé en condition de *swarming* chez *S. typhimurium* et entraîne une résistance à la polymyxine (Kim *et al.*, 2003). 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).

L'acide aminé cystéine avec ses propriétés antioxydantes est impliqué dans ce haut niveau de résistance aux antibiotiques chez *S. typhimurium* (Turnbull & Surette, 2008; Turnbull & Surette, 2010). Des bactéries en *swarming* des organismes modèles *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Burkholderia thailandensis* et *Serratia marcescens* montrent aussi une résistance accrue à plusieurs agents antimicrobiens (Overhage *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa*,

### 1.3 La motilité chez les bactéries

---

seule la colistine (un peptide antimicrobien – aussi connu sous le nom de polymyxine E) présente un niveau de toxicité supérieur chez des bactéries en *swarming* comparé à des bactéries en *swimming* (cellules planctoniques). Ces observations contradictoires peuvent sembler étonnantes étant donné que *Salmonella* en *swarming* est résistante à la polymyxine et pourraient être expliquées par le fait que l'opéron *pmr*, impliqué dans la résistance à la polymyxine chez *S. typhimurium*, est régulé différemment chez *P. aeruginosa* (McPhee *et al.*, 2003; Winfield & Groisman, 2004). Dans tous les cas, il semble que ni les pompes à efflux de type RND et ni un mécanisme de résistance associé aux biofilms (impliquant des glucans périplasmiques) ne soit impliqués dans cette résistance accrue de cellules en *swarming* face à des agents antimicrobiens (Lai *et al.*, 2009). La plus récente hypothèse suggère que le simple fait que les bactéries en *swarming* soient en conditions de haute densité cellulaire et soient en mouvement rapide leur confère une capacité à résister à des hautes concentrations d'antibiotiques, qui leur seraient autrement létales (Butler *et al.*, 2010).

#### 1.3.7 – Biosurfactants et *swarming*

Une colonie *swarming* en développement présente typiquement une zone mouillée translucide précédant les fronts de migration (Alberti & Harshey, 1990; Rashid & Kornberg, 2000; Kearns & Losick, 2003; Julkowska *et al.*, 2004; Caiazza *et al.*, 2005; Calvio *et al.*, 2005). Dépendant des espèces, cette zone est constituée de surfactants ou d'agents osmotiques (Tableau 1.3.1). Un surfactant est une molécule amphipathique qui réduit la tension de surface entre la surface et la cellule, permettant la dispersion des bactéries. Certaines espèces sont incapables de produire des agents tensioactifs, mais sont capables de se déplacer sur de l'agar aux propriétés particulières (*i.e.* agar de marque Eiken) présentant une faible tension de surface (Harshey & Matsuyama, 1994; Matsuyama *et al.*, 1995; Toguchi *et al.*, 2000; Kirov *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2010). Les auteurs de ces études ont suggéré que cet agar présente une surface plus humide ou contenant même des surfactants (Kearns, 2010). Cet aspect souligne l'importance du type d'agar utilisé pour l'étude du *swarming*.

Les espèces *E. coli* et *S. enterica* semblent être capables de *swarming* sans synthétiser de surfactants. Les LPS pourraient agir en tant que surfactants chez ces organismes (Toguchi *et*

### 1.3 La motilité chez les bactéries

---

*al.*, 2000). Cependant, des travaux supplémentaires suggèrent plutôt que les LPS ne sont pas des surfactants et ne soient pas absolument nécessaires au *swarming* (Francez-Charlot *et al.*, 2003; Morgenstein *et al.*, 2010). Une molécule appelée *enterobacterial complex antigen* (ECA) a aussi été suggérée comme pouvant agir en tant qu'agent humidifiant favorisant le *swarming* (Inoue *et al.*, 2007). De plus, chez *S. enterica*, l'agent humidifiant la surface entourant une colonie bactérienne en *swarming* n'est pas un surfactant, mais plutôt un agent osmotique et il est possible qu'un phénomène semblable ait aussi lieu chez *E. coli* (Chen *et al.*, 2007). Un agent osmotique est une molécule qui agit en retirant l'eau se localisant à l'intérieur de l'agar vers la surface, ce qui humidifie celle-ci suffisamment pour réduire la tension de surface et permettre aux cellules de migrer. Les LPS précédemment proposés comme étant des surfactants (Toguchi *et al.*, 2000) agiraient en réalité en tant qu'agent osmotique (Chen *et al.*, 2007). Le rôle du LPS et des surfactants dans le *swarming* de ces deux espèces reste à être élucidé (Kearns, 2010).

Chez *P. mirabilis*, *cmfA* présente des similitudes avec des gènes impliqués dans la synthèse de LPS et a été proposé pour coder pour un produit réduisant la tension de surface (Gygi *et al.*, 1995). Le *cmf* est un polysaccharide (Rahman *et al.*, 1999).

La surfactine et la serrawettin, deux lipopeptides sécrétés respectivement par *B. subtilis* et *S. liquefaciens*, sont composées de polypeptides reliés par un anneau d'acide gras et sont synthétisées par des enzymes homologues (Arima *et al.*, 1968; Matsuyama *et al.*, 1992; Lindum *et al.*, 1998; Kearns & Losick, 2003). Ces surfactants sont absolument nécessaires au *swarming* chez ces deux espèces.

Chez *P. aeruginosa*, le terme rhamnolipide fait souvent référence à trois molécules distinctes, soit les 3-(3-hydroxyalcanoyloxy) alcanoliques (HAA), mono-rhamnolipides (mRL) et di-rhamnolipides (dRL). Ces molécules ainsi que la régulation et voie de biosynthèse qui y sont associées sont décrits en détail à la section 1.4.8.3. Elles sont impliquées dans le *swarming* et exercent des effets distincts sur la formation d'une colonie *swarming* de *P. aeruginosa*.

### 1.3 La motilité chez les bactéries

**Tableau 1.3.1.** Quelques agents mouillants ayant des rôles importants dans le *swarming*.

Surfactant	Détails	Espèce(s)	Référence
Surfactine	Lipopeptide	<i>B. subtilis</i>	(Solomon <i>et al.</i> , 1995; Solomon <i>et al.</i> , 1996; Lazizzera <i>et al.</i> , 1997; Kearns <i>et al.</i> , 2004)
Serrawettin W2	Lipopeptide	<i>Serratia liquefaciens</i>	(Lindum <i>et al.</i> , 1998; Eberl <i>et al.</i> , 1999).
Rhamnolipides	Glycolipide	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Burkholderia</i>	(Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> , 2010)
LPS*	Complex lipid-polysaccharide hybrid	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	(Toguchi <i>et al.</i> , 2000; Chen <i>et al.</i> , 2007)
ECA*	<i>Enterobacterial common antigen</i>	<i>E. coli</i>	(Inoue <i>et al.</i> , 2007)
Cmf*	( <i>capsular migration factor</i> ) polysaccharide de surface	<i>P. mirabilis</i>	(Gygi <i>et al.</i> , 1995; Rahman <i>et al.</i> , 1999)

\*Les LPS, ECA et Cmf ne sont pas des surfactants, mais semblent jouer un rôle important dans le *swarming* de plusieurs espèces.

#### 1.3.8 - Relation entre le *swarming* et les biofilms

##### 1.3.8.1 - Les biofilms

Un biofilm est défini comme étant une communauté structurée de bactéries englobées dans une matrice d'exopolysaccharides autoproduite et adhérente à une surface inerte ou vivante (Costerton *et al.*, 1999). Les biofilms constituent un mode de croissance qui permet la survie des bactéries en environnement hostile (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Les biofilms constituent un modèle de multicellularité largement documenté (Harmsen *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2010). Selon la région du biofilm dans laquelle elles se trouvent, les cellules expriment leurs gènes selon différentes configurations (Sauer *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003; Lequette & Greenberg, 2005; Waite *et al.*, 2006; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). Le mode de vie sessile sous forme de biofilm confère d'énormes avantages aux bactéries. Le biofilm les protège des rayons UV, de la toxicité des métaux, de l'exposition à l'acide, de la déshydratation, de la phagocytose et de plusieurs antibiotiques et agents antimicrobiens (Costerton *et al.*, 1995; Davey & O'Toole, 2000).

## 1.3 La motilité chez les bactéries

---

### 1.3.8.2 - Le développement d'un biofilm

Selon le modèle faisant consensus, le développement d'un biofilm comporte cinq étapes, soit 1) une association réversible, 2) une association irréversible, 3) une agrégation de microcolonies, 4) une maturation des microcolonies et 5) le détachement ou la dispersion du biofilm, c'est-à-dire le moment où des bactéries planctoniques s'échappent du biofilm pour aller coloniser d'autres niches (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Harmsen *et al.*, 2010). À ce jour les séquences de développement des biofilms ont été le plus étudiées chez *P. aeruginosa*, mais ont aussi été mises à jour chez *E. coli* (Pratt & Kolter, 1998; Tremoulet *et al.*, 2002; Reisner *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2006) (revue par Beloin *et al.*, 2008).

Une des étapes du cycle de formation d'un biofilm qui retient beaucoup l'attention est la phase de détachement ou de dispersion du biofilm. La dispersion d'un biofilm semble être un phénomène actif qui permettrait possiblement aux bactéries s'étant échappées du biofilm de coloniser de nouvelles niches (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Harmsen *et al.*, 2010).

### 1.3.8.3 - La relation entre les biofilms et la motilité de type *swarming*

Il est bien établi que le *swarming* dépend des RL et HAA (Kohler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007) et que les RL jouent un rôle central dans le développement des biofilms. Les RL sont principalement synthétisés dans la région basale du biofilm (Lequette & Greenberg, 2005) et sont nécessaires à la dispersion des bactéries formant le biofilm (Schooling *et al.*, 2004; Boles *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2009), mais aussi à maintenir leur architecture (Davey *et al.*, 2003). Les biosurfactants ont un rôle à jouer dans l'établissement initial de microcolonies et la migration des bactéries dans la partie la plus haute des microcolonies est facilitée par ceux-ci (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). Étant donné que les RL sont aussi étroitement liés au *swarming*, un lien fonctionnel semble exister entre ce type de motilité et la formation de biofilms, du moins chez *P. aeruginosa*.

Chez les bactéries le di-GMP cyclique est une molécule intracellulaire clef dans la transition entre les modes de vie sessile et motile (Hengge, 2009). Les protéines ayant un domaine GGDEF (diguanylate cyclase) sont responsables de la synthèse de di-GMP cyclique alors que les domaines EAL et HD-GYP (phosphodiesterase) sont impliqués dans son hydrolyse



### 1.3 La motilité chez les bactéries

---

(Paul *et al.*, 2004; Christen *et al.*, 2005; Tamayo *et al.*, 2005). Le di-GMP cyclique exerce aussi un contrôle sur une variété de processus tel que la virulence (Dow *et al.*, 2006; Cotter & Stibitz, 2007; Ryan *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2008; Kumagai *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2010; Sultan *et al.*, 2010), le cycle cellulaire (Duerig *et al.*, 2009; Christen *et al.*, 2010) et production d'antibiotiques (Fineran *et al.*, 2007).

Le consensus actuel veut que la présence de di-GMP cyclique soit associée à la phase sessile (biofilms) et son absence à la phase motile (*swarming*) (Verstraeten *et al.*, 2008). Le di-GMP cyclique est notamment impliqué dans une relation inverse entre le *swarming* et la formation de biofilms chez *S. typhimurium* (Simm *et al.*, 2007; Wolfe & Visick, 2008), *V. parahaemolyticus* (Boles & McCarter, 2002; Guvener & Harwood, 2007; Kim & McCarter, 2007) et *P. aeruginosa* (Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007; Ueda & Wood, 2009; Yeung *et al.*, 2009; Kuchma *et al.*, 2010; Merritt *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2011).

Les LPS jouent un rôle important dans le *swarming* de certaines espèces. Chez *P. aeruginosa*, le rôle des LPS dans le *swarming* n'a pas été beaucoup étudié, mais il semble que des cellules produisant des LPS tronqués soient diminuées dans le *swarming* et favorisées dans l'attachement de surface (Lindhout *et al.*, 2009).

## 1.4 - Caractéristiques du *swarming* chez différentes espèces

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 - *Serratia*

#### 1.4.1.1 - Milieu nutritionnel et *swarming*

Chez *S. liquefaciens* MG1, le facteur critique déterminant 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*, tandis 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.*, 1996). Comme c'est le cas chez *Proteus*, le *swarming* de *Serratia* est fortement favorisé par un milieu de culture riche (Eberl *et al.*, 1996; Eberl *et al.*, 1999). Le *swarming* peut avoir lieu sur milieu minimal seulement si ce dernier est supplémenté avec des acides aminés. Cependant, aucun des acides aminés ajoutés individuellement à un milieu minimal ne parvient à déclencher le *swarming* chez *Serratia* (Eberl *et al.*, 1996; Eberl *et al.*, 1996). Des colonies en *swarming* de *S. liquefaciens* MG1 exhibent des motifs de dendrites en fractales lorsque celles-ci se trouvent en milieu nutritionnel minimal contenant de la gélatine comme agent solidifiant (Eberl *et al.*, 1996). 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 *FhDC* et 2) un système de QS à base de *N* acyl-L-homosérine lactone (Eberl *et al.*, 1996). Un mutant dans les gènes *fhDC* ne synthétise pas de flagelles et ne peut donc pas effectuer de *swarming* ni de *swimming* (Eberl *et al.*, 1999). Aussi, la surexpression de *fhDC* 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

### 1.4.1 *Serratia*

---

*et al.*, 1999). Chez cet organisme, le contact de surface est un stimulus d'importance majeure pour déclencher la différenciation en cellules *swarming* et passe absolument par l'expression de l'opéron *flhDC*.

#### 1.4.1.3 - Biosurfactants, QS et *swarming*

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 *swrl* et *swrA*. Ces deux gènes sont impliqués dans une voie de signalisation menant ultimement à la synthèse de serrawettin W2, un lipopeptide extracellulaire entraînant une réduction de la tension de surface (Lindum *et al.*, 1998). Ce surfactant est un lipodepsipentapeptide attaché à une chaîne d'acide gras 3-hydroxy-C<sub>10</sub>. L'importance biologique de ce biosurfactant est illustrée par un mutant non flagellé de *Serratia*, 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 *swrl* et *swrA* de *Serratia*. Ces résultats montrent bien que la production de molécules abaissant la tension de surface est cruciale au *swarming* chez *Serratia*. Ils expliquent aussi que l'absence de *swarming* sur milieu LB ou *brain heart infusion* est due au fait que *Serratia* ne produit qu'une faible quantité de surfactant lorsque cultivée sur ces milieux (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

### 1.4.1 *Serratia*

---

*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.

Très récemment, l'utilisation de modèles d'infection cellulaire et animal a permis d'observer qu'un mutant *swarming* précoce chez *S. marcescens* (mutant *rssBA*<sup>-</sup>) est hypervirulent, menant à d'importantes réponses inflammatoires ainsi qu'à des infections destructrices et systémiques (Lin *et al.*, 2010).

### 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 1.3.1E. Le *swarming* chez *P. mirabilis* est aussi exceptionnel en ce qu'il a lieu sur des concentrations d'agar considérées élevées (*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 (Rauprich *et al.*, 1996; Fraser & Hughes, 1999). 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).

L'inhibition de la rotation du flagelle pourrait être un signal impliqué dans le déclenchement du processus de différenciation (Alavi & Belas, 2001). 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.*, 1995). 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.

## 1.4.2 *Proteus mirabilis*

### 1.4.2.2 - Facteurs génétiques du *swarming*

Chez *P. mirabilis*, l'identification des loci requis pour la différenciation en cellules *swarming* résulte principalement de mutagenèses par transposons. Cette stratégie s'est avérée 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 1.4.1. *P. mirabilis* est une des espèces bactériennes chez laquelle le *swarming* a été le plus étudié et par conséquent, un nombre considérable de gènes jouant un rôle dans ce phénomène ont été identifiés.

Tableau 1.4.1. 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
<i>wosA</i>	Fonction inconnue
<i>lon</i>	Protéase Lon
<i>waal(rfaL)</i>	Ligase de l'antigène-O

Tableau adapté de Rather et collègues (Rather, 2005; Clemmer & Rather, 2008; Hatt & Rather, 2008; Nielubowicz *et al.*, 2010)

***flhDC***. L'expression élevée de la flagelline chez les cellules en *swarming* est régulée entre autres 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 autres régulée par une protéine nommée *leucine-responsive regulator protein* (Lrp). Des mutations dans *lrp* empêchent la différenciation en

### 1.4.2 *Proteus mirabilis*

---

cellules *swarming*. La surexpression artificielle de FlhDC entraîne une différenciation prématurée en 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 en *swarming* que chez des cellules végétatives (Furness *et al.*, 1997).

***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 FlhDC du système flagellaire de *E. coli* (Rather, 2005). La surexpression de *rsmA* inhibe la différenciation en cellules *swarming*. Le ou les mécanismes responsables de cette inhibition sont inconnus. Alors que *flhDC* est un gène central dans la différenciation en cellules *swarming*, il est paradoxal de constater que la surexpression de *rsmA* (ce qui active *flhDC*) inhibe le *swarming* (Rather, 2005).

Récemment, le transcriptome de *P. mirabilis* en motilité *swarming* a été établi en comparant des bactéries en phase de consolidation et phase de *swarming* avec des cellules cultivées en bouillon (milieu liquide) (Pearson *et al.*, 2010). Les auteurs ont rapporté que 136 gènes sont surexprimés lors des phases de consolidation et *swarming* comparativement à 376 qui sont régulés à la baisse. Sans surprise, plusieurs gènes impliqués dans l'assemblage de l'appareil flagellaire sont régulés à la hausse dans les phases de consolidation et de *swarming*. De nombreux gènes impliqués dans la synthèse et importation d'acides aminés sont aussi régulés à la hausse chez les cellules en phase de consolidation.

#### 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 de signalisation déclenchant la différenciation cellulaire (Stahl *et al.*, 1983; Gygi *et al.*, 1995; 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.*, 1995). Cette molécule agit probablement en réduisant la tension de surface, facilitant ainsi le mouvement des cellules. Ceci est consistant avec le

## 1.4.2 *Proteus mirabilis*

---

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 (Sturgill & Rather, 2004; Rather, 2005). 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).

### 1.4.2.4 - Virulence et *swarming*

Le rôle du *swarming* dans la virulence de *P. mirabilis* est nébuleux. Les premières études ont démontré que les cellules en *swarming* ont 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 subséquentes 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* représentent un type cellulaire important dans certains stades d'infection de *P. mirabilis* (Rather, 2005). Les cellules différenciées pourraient avoir un rôle direct dans la virulence à cause du 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 lorsque comparée à des cellules végétatives (Walker *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2002).

#### 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 sont déterminantes pour le *swarming* chez cette espèce (Harshey & Matsuyama, 1994). En effet, de l'agar de marque Eiken favorise 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 *fhDC* joue un rôle central. Cet opéron code pour des facteurs de transcription contrôlant l'expression d'une série de gènes impliqués dans la synthèse du crochet flagellaire et du facteur de transcription FliA. Ce dernier régule des gènes codant pour des filaments flagellaires, des protéines motrices et certaines composantes du chimiotactisme. L'expression de l'opéron *fhDC* est influencée par des signaux environnementaux tels que la disponibilité du glucose, l'osmolarité et la température (Harshey, 2003). Le profil transcriptomique de cellules en *swarming* de *S. typhimurium* a été réalisé à l'aide de biopuces (Wang *et al.*, 2006). Le profil d'expression de nombreux gènes impliqués dans le *swarming* a été effectué à plusieurs points 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



### 1.4.3 *Salmonella*

---

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 ne sont pas surexprimés en condition de *swarming*.

#### 1.4.3.3 - Facteurs requis pour le *swarming*

Chez *S. typhimurium*, les signaux nécessaires à la différenciation en cellules *swarming* seraient contenus dans la matrice 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). 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). La biosynthèse de la cystéine est aussi cruciale pour une différenciation complète en cellule *swarming* chez *S. typhimurium* (Turnbull & Surette, 2008).

#### 1.4.3.4 - Virulence et *swarming*

Tel que mentionné précédemment, l'opéron *pmrHFIJKLM* est surexprimé chez des cellules *swarming* différenciées chez *S. typhimurium* et une mutation dans le gène *pmrK* résulte en la perte de *swarming*. La virulence de mutants dans l'opéron *pmrHFIJKLM* était également réduite comparée à celle de la souche sauvage, lorsque testée sur des modèles d'infection de souris (Gunn *et al.*, 2000). 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).

Chez *S. enterica*, les gènes STM0278 et STM0650, codant respectivement pour une protéine périplasmique putative ainsi qu'une hydrolase putative sont nécessaires pour une colonisation efficace de graines d'alfalfa (une légumineuse) et sont aussi déficients dans la

### 1.4.3 *Salmonella*

---

motilité *swarming* (Barak *et al.*, 2009). De plus le produit codé par STM0278 a un rôle à jouer dans la synthèse d'un biosurfactant ou agent osmotique, ce qui pourrait expliquer sa déficience en *swarming* (Barak *et al.*, 2009).

### 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 boeuf et du LB (Ben-Jacob *et al.*, 1994; Mendelson & Salhi, 1996; Dixit *et al.*, 2002). Ces travaux ont révélé l'existence de différents motifs de *swarming* allant de simples zones de croissances à des embranchements radiaux simples ou complexes. Bien que la composition du milieu nutritionnel soit déterminante pour les différents phénotypes de *swarming*, la concentration d'agar est d'une plus grande importance (Mendelson & Salhi, 1996). La concentration d'agar optimale pour induire le *swarming* chez *B. subtilis* est de 0,7% (Mendelson & Salhi, 1996; Kearns & Losick, 2003; Julkowska *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006). Une faible concentration d'agar serait 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 c'est le cas chez la majorité des espèces chez lesquelles le *swarming* a été rapporté, des molécules tensio-actives semblent être impliquées 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'est-à-dire 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; Patrick & Kearns, 2009). 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) (Tableau 1.4.2). Le gène *swrA* est absolument requis pour la différenciation *swarming* de *B. subtilis* (Calvio *et al.*, 2005). En plus

#### 1.4.4 *Bacillus subtilis*

d'être nécessaire pour le *swarming*, le produit de *swrA* est responsable de la transcription des gènes de l'opéron *pgs* codant pour un polymère extracellulaire (gamma-PGA) (Osera *et al.*, 2009).

**Tableau 1.4.2.** Gènes impliqués dans la motilité de type *swarming* chez *B. subtilis*.

Gène ou homologue	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>srfAABC</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 le ségrégation des chromosomes
<i>ymfI</i>	Similaire à l'alcool déshydrogénase
<i>degU</i>	Régulateur transcriptionnel
<i>phrC</i>	Fonction inconnue
<i>yvcA</i>	Lipoprotéine putative
<i>epR</i>	Protéase extracellulaire

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. 1.4.2) (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 des peptides signaux (ou phéromones) (Solomon *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1997).

D'ailleurs, l'addition de surfactine exogène au milieu nutritionnel a permis de compléter le *swarming* des mutants ne produisant pas ce composé (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).

## 1.4.4 *Bacillus subtilis*

---

### 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 (Drobniewski, 1993). La majorité du fer extracellulaire chez les mammifères est lié à des glycoprotéines, incluant la transferrine, qui est considérée importante 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 contenu 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. Il a été rapporté 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). À la lumière de ces résultats, les auteurs suggèrent un lien entre la virulence de cette souche de *B. subtilis* et la motilité de type *swarming* (Park *et al.*, 2006).

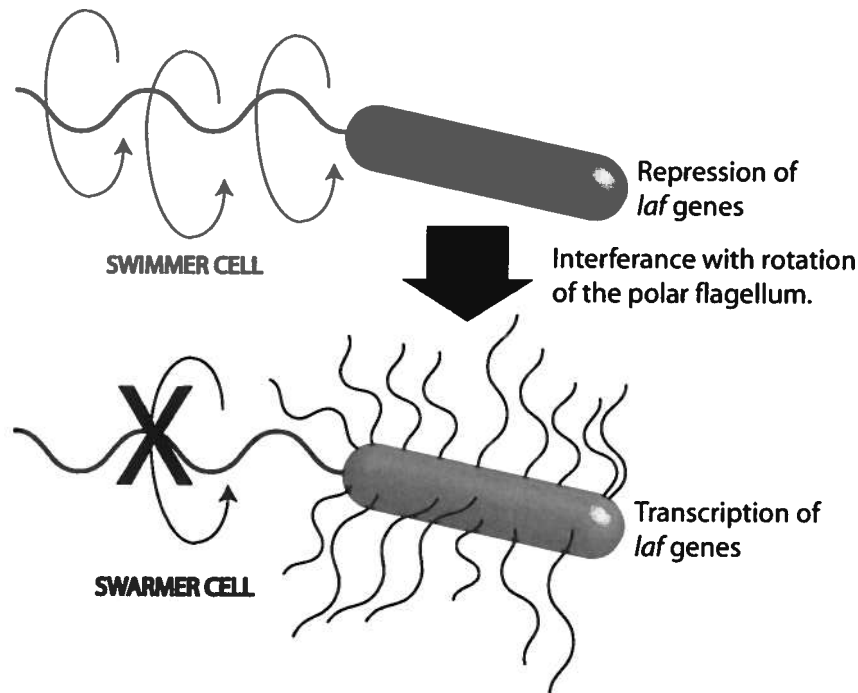
## 1.4.5 – *Vibrio*

### 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

### 1.4.5 Vibrio

d'autres genres bactériens capables de *swarming* (McCarter & Silverman, 1990) (Fig. 1.4.1). La différenciation cellulaire chez *V. parahaemolyticus* se traduit par un arrêt de la division cellulaire, l'élongation des cellules (de 1  $\mu\text{M}$  à 30  $\mu\text{M}$ ) et la synthèse de nombreux flagelles latéraux additionnels (McCarter & Silverman, 1990).



**Figure 1.4.1.** 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*

Des mutants dans les gènes *mot* et *che* sont affectés dans le *swarming*. Des mutants avec un phénotype *Mot*<sup>-</sup> possèdent des flagelles intacts, mais sont incapables d'effectuer la rotation du flagelle. Ceux avec le phénotype *Che*<sup>-</sup> 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.

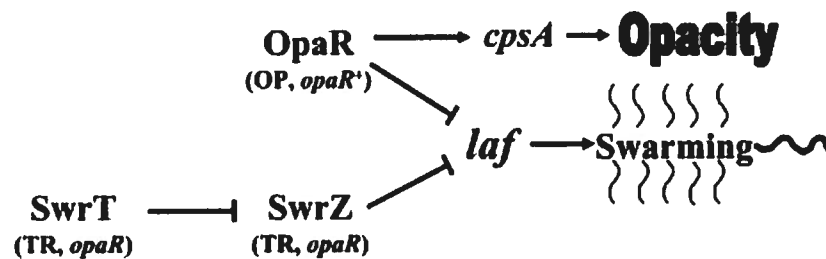
L'opéron *scrABC* chez *V. haemolyticus* code pour trois protéines, dont une (*scrC*) contenant des motifs GGDEF et EAL (Boles & McCarter, 2002; Ferreira *et al.*, 2008). Ces motifs

## 1.4.5 *Vibrio*

sont connus pour jouer un rôle dans la régulation du di-GMP cyclique, une molécule de signalisation intracellulaire connue pour réguler la transition entre la phase motile et sessile chez plusieurs bactéries (Hengge, 2009). Un autre gène, *scrG*, codant pour une protéine avec ces motifs a aussi été rapporté comme étant impliqué dans le *swarming* (Kim & McCarter, 2007).

### 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) (Fig. 1.4.2). Les cellules OP produisent des polysaccharides capsulaires (CPS) qui sont primordiaux pour le phénotype opaque et favorisent l'adhésion des cellules à une surface ainsi que l'adhésion intercellulaire (McCarter, 1998; Enos-Berlage & McCarter, 2000). 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* responsables de la synthèse de serrawettin chez *Serratia* et *swrAB* chez *B. subtilis*). Un mutant *swrT* est incapable d'effectuer du *swarming* et l'expression de ses gènes flagellaires latéraux est aussi inhibée. La surexpression de *swrZ* induit une répression du *swarming* ainsi que de la synthèse des gènes flagellaires latéraux. Finalement, SwrT régule l'expression des gènes flagellaires latéraux en inhibant l'expression de *swrZ* (Jaques & McCarter, 2006).



**Figure 1.4.2.** OpaR et SwrZ inhibent l'expression des gènes flagellaires latéraux (*laf*).  
Figure adaptée de Jaques et collègues (Jaques & McCarter, 2006).

### **1.4.6 - *Sinorhizobium meliloti***

*S. meliloti* est un microorganisme symbiotique associé aux racines de plantes (Jones *et al.*, 2007). Le *swarming* n'a été rapporté que relativement récemment chez ce bâtonnet à Gram(-) fixateur d'azote chez un mutant *fadD*<sup>-</sup> (gène codant pour une ligase d'acide gras long) (Soto *et al.*, 2002) chez lequel ce type de motilité est activé contrairement à sa souche parentale. Cependant, ce mutant présentait un défaut dans sa capacité d'induire la nodulation chez des racines de plantes (*i.e.* des nodules sont des organes abritant des bactéries fixatrices d'azote retrouvées dans les racines de plantes). Afin d'obtenir des indices sur le processus d'adaptation impliqué dans ce type de motilité, Nogales et collègues (2010) ont comparé le profil transcriptomique d'un mutant *fadD*<sup>-</sup> (*i.e.* un mutant capable de *swarming* robuste) cultivé en condition de *swarming* à ceux de bactéries cultivées sur milieu solide et liquide (Nogales *et al.*, 2010). Tel qu'attendu, leurs résultats ont montré que les bactéries cultivées dans ces trois conditions présentent des transcriptomes significativement différents les uns les autres avec l'expression différentielle de plus d'un millier de gènes. En condition de *swarming*, plusieurs gènes impliqués dans la prise du fer sont surexprimés. Il y a notamment surabondance de transcrits associés à la rhizobactine, un sidérophore.

### **1.4.7 - *Escherichia coli***

Plusieurs études sur le *swarming* ont été effectuées en utilisant l'organisme modèle *E. coli*. Elles portent sur des aspects particulièrement fondamentaux du *swarming* et proviennent essentiellement du groupe de recherche de Howard C. Berg, tel que rapporté à la section 1.3.5.

Un criblage de la souche K-12 de *E. coli* a permis d'identifier 216 mutants ayant un défaut dans le *swarming*, mais pas dans le *swimming* (Inoue *et al.*, 2007). Parmi eux, se trouvait plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de LPS et dans l'antigène commun entérobactérien (ECA). Les LPS à l'état libre (extrait de la membrane cellulaire) agiraient en tant qu'agent mouillant et réduiraient la tension de surface, favorisant le *swarming* (Harshey, 2003). Les auteurs ont suggéré que les ECA puissent eux aussi agir en tant qu'agent tensio-actif favorisant le *swarming*. La fonction des ECA demeure à ce jour largement incomprise. Tel que mentionné

## 1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*

---

précédemment, les LPS agiraient en tant qu'agent osmotique et non en tant que surfactant (Chen *et al.*, 2007).

Le gène *recA* code pour une protéine impliquée dans la stabilité et réparation de l'ADN lors de conditions de stress causant des dommages à l'ADN (Friedberg, 2005). Ce gène est aussi nécessaire pour le *swarming* chez *E. coli*, suggérant un nouveau rôle associé à la motilité pour cette protéine (Gomez-Gomez *et al.*, 2007).

### 1.4.8 - *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.4.8.1 - Milieu nutritionnel et *swarming*

Chez *P. aeruginosa*, comme chez bien d'autres espèces, le déclenchement du *swarming* est intimement relié à l'humidité de surface. Cette bactérie peut effectuer du *swarming* sur un milieu nutritionnel solidifié avec 0,4 à 0,8% d'agar (Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005). Le *swarming* a été observé sur milieu riche *bouillon nutritif* (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 fractale avec des dendrites bien définies (Fig. 1.3.1F). Généralement c'est ce dernier milieu nutritionnel qui a été le plus utilisé pour étudier ce type de motilité chez *P. aeruginosa* (Kohler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg, 2000; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2009).

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).



### 1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*

---

Le *swarming* est réprimé par des concentrations croissantes de fer et aussi par du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  comme seule source d'azote, des éléments favorisant la croissance (Déziel *et al.*, 2003). Par contre, le  $\text{NaNO}_3$  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  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) empêchent le *swarming* d'être déclenché, alors que des conditions moins favorables (fer limitant et  $\text{NaNO}_3$  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.

#### 1.4.8.2 – Role du flagelle et des pili dans le *swarming*

L'importance de flagelles et de pili pour le *swarming* chez cette espèce est sujette à controverse. Alors que Köhler *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 rapporté que le gène *fliC* est nécessaire au *swarming* alors que *pilA* est lui aussi impliqué, mais non essentiel. La différence entre ces deux résultats est possiblement 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. De plus, le gène *flhF* est requis pour le *swarming* et en son absence, le flagelle est bien synthétisé mais n'est pas dirigé vers le pôle de la cellule (Murray & Kazmierczak, 2006).

Tel que mentionné précédemment, plusieurs espèces capables de *swarming* voient leur nombre de flagelles augmenter chez les cellules différenciées. Köhler et collègues (2000) ont rapporté que les bactéries se situant au front de migration d'une colonie en *swarming* possédaient deux flagelles polaires au lieu de l'unique flagelle polaire présent chez des cellules végétatives (Kohler *et al.*, 2000). Cependant, d'autres travaux ont montré que des bactéries du front de migration d'une colonie en *swarming* ne présentaient pas de différences physiologiques évidentes par rapport à des bactéries cultivées en surface solide ne permettant

## **1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa***

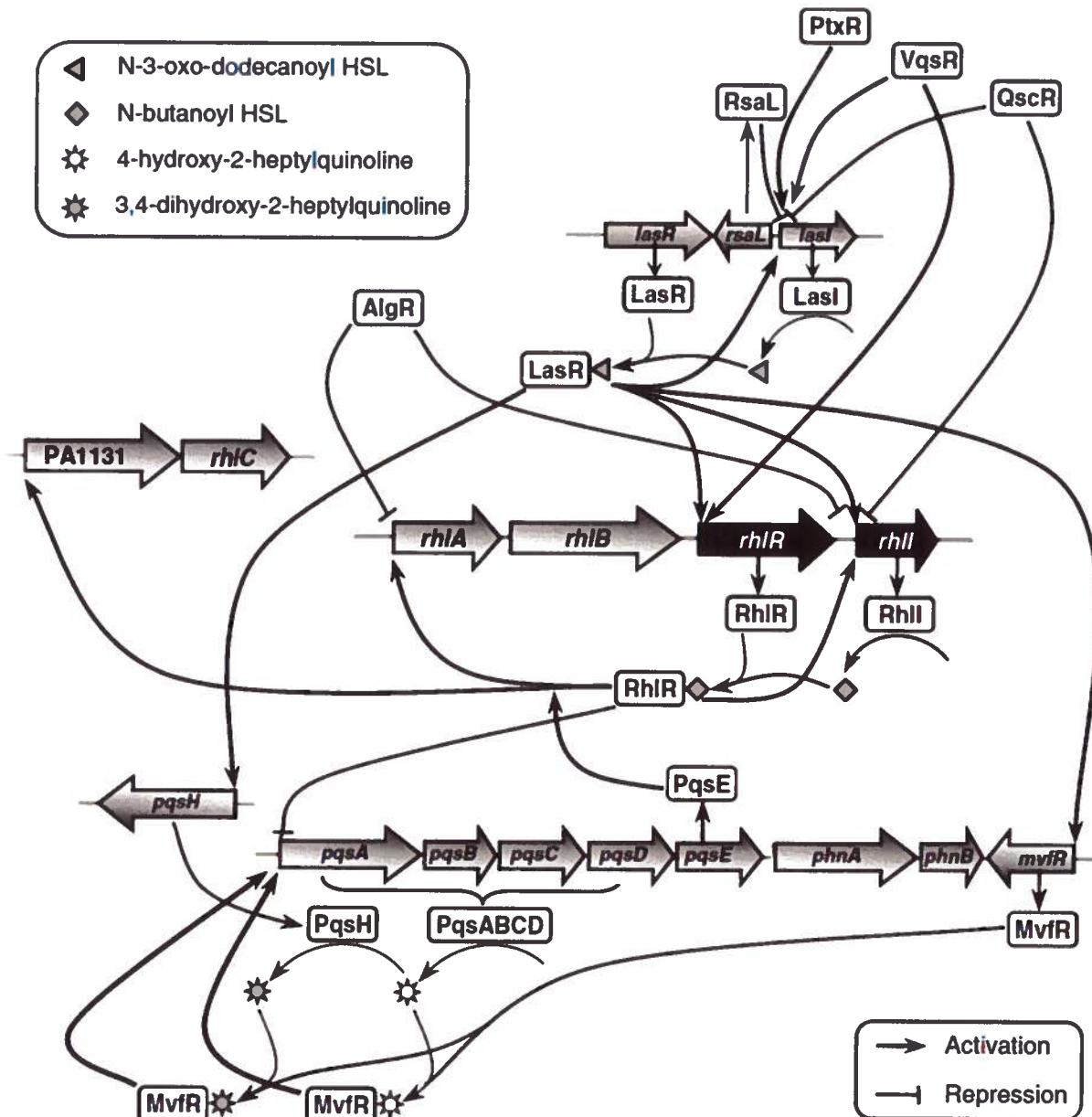
---

pas de *swarming* (Takahashi *et al.*, 2008) et en bouillon nutritif (Toutain *et al.*, 2005); les cellules étaient équipées d'un seul flagelle polaire et présentaient une taille semblable.

### **1.4.8.3 - Les rhamnolipides**

Les RL et HAA constituent des biosurfactants produits par *P. aeruginosa* essentiels pour la motilité de type *swarming* chez cette bactérie. Tel que mentionné plus haut, les gènes directement impliqués dans la synthèse des HAA et RL (mRL et dRL) sont *rhIA*, *rhIB* et *rhIC*. Les gènes *rhIA* et *rhIB* sont regroupés en un opéron dont l'expression est contrôlée par un système de QS tel qu'illustré à la figure 1.4.3.

## 1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*



**Figure 1.4.3.** Schéma du système de QS chez *P. aeruginosa*. Schéma tiré de (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

Dans ce système, *lasI* code pour une synthèse d'auto-inducteur (LasI) qui synthétise des molécules de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (homoserine lactone) qui elles-mêmes se lient à leur récepteur LasR codé 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 une synthèse d'autoinducteur (RhlI) qui synthétise des molécules de C<sub>4</sub>-HSL se liant à leur récepteur RhlR.

#### 1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*

---

L'ensemble formé par RhIR et C<sub>4</sub>-HSL active l'expression de *rhlI*, ce qui crée une autre boucle de rétroaction. En plus, ce complexe active l'expression de plusieurs facteurs de virulence et autres métabolites et enzymes, incluant *rhlAB*. Malgré que les RL aient été étudiés abondamment (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010), leur fonction naturelle n'est pas précisément définie. Les études par rapport à ce sujet suggèrent que les RL ont plusieurs fonctions.

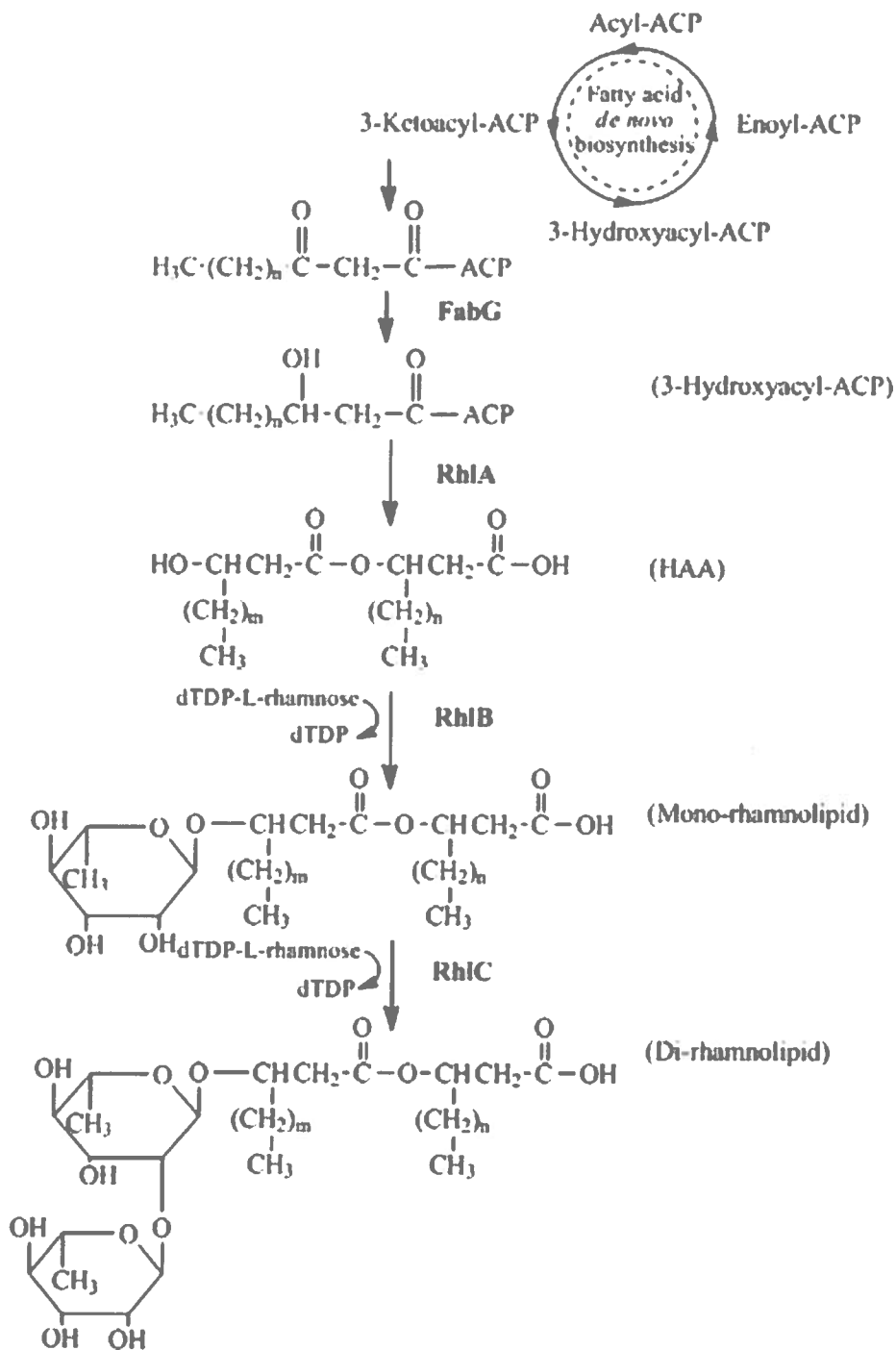
Les RL sont capables de solubiliser et de favoriser l'acquisition de substrats hydrophobes, spécialement des hydrocarbures (Koch *et al.*, 1991; Shreve *et al.*, 1995; Zhang & Miller, 1995; Beal & Betts, 2000; Noordman & Janssen, 2002; Noordman *et al.*, 2002). Ils favorisent aussi la biodégradation de molécules peu solubles en modifiant la paroi cellulaire des bactéries rendant celles-ci plus hydrophobes (Shreve *et al.*, 1995; Zhang & Miller, 1995; Al-Tahhan *et al.*, 2000). Les RL peuvent solubiliser les phospholipides contenus dans les fluides pulmonaires, rendant ces derniers plus accessibles à être clivés par des phospholipases C (Kurioka & Liu, 1967).

D'autres études rapportent que les RL peuvent interférer avec la réponse chimiotactique leucocytaire (Kharazmi *et al.*, 1989), stimuler la sécrétion de cytokines des cellules épithéliales pulmonaires (Bedard *et al.*, 1993) et interférer avec les fonctions normales des cils trachéaux (Hingley *et al.*, 1986; Read *et al.*, 1992). La présence de RL a été détectée dans du sputum de patients atteints de fibrose kystique (Kownatzki *et al.*, 1987; Read *et al.*, 1992). Les RL sont impliqués dans l'établissement d'infections de cellules épithéliales respiratoires (Zulianello *et al.*, 2006; Van Gennip *et al.*, 2009). Les RL démontrent aussi une activité antibactérienne envers plusieurs bactéries à Gram (+) et dans une moindre mesure, des bactéries à Gram (-) (Itoh *et al.*, 1971; Lang *et al.*, 1989). Des activités antivirales, antifongiques et algicides ont aussi été rapportées (Abalos *et al.*, 2001; Haba *et al.*, 2003; Benincasa *et al.*, 2004).

Le gène *rhlA* est absolument requis pour la motilité de type *swarming* (Kohler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005). *rhlA* fait partie de l'opéron *rhlAB* qui est requis pour la synthèse de mRL. RhIA est impliqué dans la synthèse des HAA à partir de précurseurs acide gras 3-hydroxy (Lépine *et al.*, 2002; Déziel *et al.*, 2003; Zhu & Rock, 2008). *rhlB* exprime une rhamnosyltransférase liée à la membrane cytoplasmique (RhIB) qui ajoute ensuite un

### 1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*

groupement rhamnose aux molécules de HAA, ce qui donne des mRL (Ochsner *et al.*, 1994). Finalement, *rhIC* code pour une seconde rhamnosyltransférase (RhIC), laquelle ajoute un deuxième groupement rhamnose, ce qui donne comme produit final, des dRL (Rahim *et al.*, 2001) (Fig. 1.4.4).



**Figure 1.4.4.** Voie de synthèse des rhamnolipides. Schéma adapté de (Déziel *et al.*, 2003).

### 1.4.8.4 – Relation entre les rhamnolipides et le *swarming*

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

Nous avons aussi démontré que les HAA ont la capacité de repousser des dendrites en *swarming* et qu'ils provoquent aussi un effet d'inhibition sur ce type de motilité (Tremblay *et al.*, 2007). De manière opposée, les di-RL ont un effet attracteur sur des dendrites en migration et favorisent aussi la formation de dendrites d'une colonie en *swarming* (Tremblay *et al.*, 2007). Des acides gras à doubles branches, ayant une structure moléculaire semblable à des HAA ont aussi été rapportés comme inhibant le *swarming* (Inoue *et al.*, 2008). Chez *B. subtilis*, la surfactine est aussi impliquée dans un phénomène similaire modulant la trajectoire de dendrites (James *et al.*, 2009).

### 1.4.8.4 – Relation entre le di-GMP cyclique et le *swarming*

Chez *P. aeruginosa*, le di-GMP cyclique a surtout été investigué pour son rôle dans la transition entre les phases motiles (*swarming*) et sessiles (biofilms) via l'étude des voies de signalement *sadB/sadC/bifA* (Fig. 1.4.5) et *wsp*.

Le gène *sadB* code pour une protéine impliquée dans la progression vers un attachement irréversible. Un mutant *sadB*<sup>-</sup> présente un important défaut dans l'attachement de surface (initiation de la formation d'un biofilm) (Caiazza & O'Toole, 2004) et recouvre une plus grande surface lorsqu'en *swarming* (Caiazza *et al.*, 2007). SadB influence aussi la synthèse d'exopolysaccharides ainsi que la fréquence de changement de direction (via le sens de rotation du flagelle) des cellules (Caiazza *et al.*, 2007). SadB est impliqué dans le phénomène d'évitement observé lorsque deux dendrites de deux colonies distinctes de *P. aeruginosa* en *swarming* se rencontrent (Caiazza *et al.*, 2005).

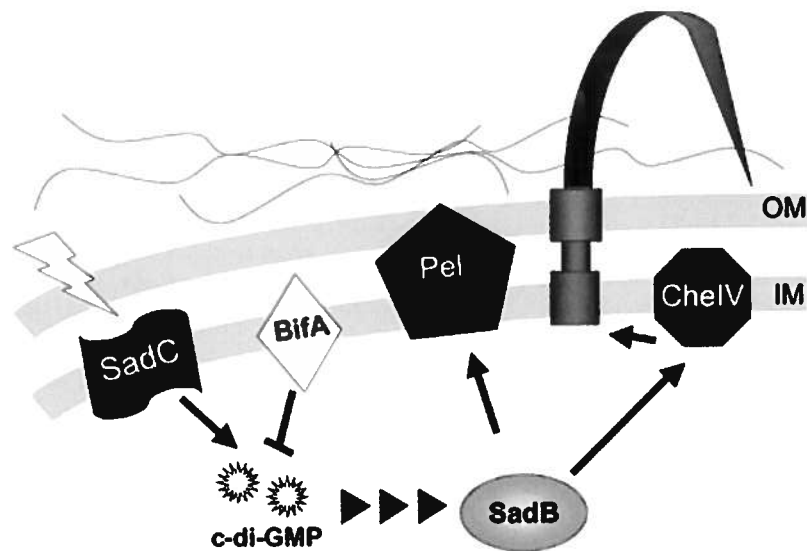
### 1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*

---

SadC, une diguanylate cyclase, présente des similarités fonctionnelles avec SadB. Un mutant *sadC* présente aussi une défaillance dans l'attachement de surface tout en ayant une motilité *swarming* plus robuste que la souche sauvage (Merritt *et al.*, 2007). Un mutant *sadC* possède également un défaut dans la synthèse d'exopolysaccharides et est altéré dans la fréquence de retournement cellulaire (Merritt *et al.*, 2007).

Le gène *bifA* code pour une phosphodiesterase spécifique au di-GMP cyclique (EAL) (Kuchma *et al.*, 2007). Contrairement à des mutants *sadB*<sup>-</sup> et *sadC*<sup>-</sup>, une souche *bifA*<sup>-</sup> est fortement inhibée dans le *swarming* et produit des biofilms plus robustes que la souche parentale (Kuchma *et al.*, 2007). Finalement, PiliY1, une protéine impliquée dans la biosynthèse du pili de type IV, a été rapportée comme étant impliquée dans les comportements de surface et serait aussi régulée par SadC (Kuchma *et al.*). Tout comme SadC, RoaE est une diguanylate cyclase (Merritt *et al.*, 2010). Toutefois, un mutant *roaE*<sup>-</sup> présente des phénotypes partiellement différents de ceux de *sadC*<sup>-</sup>. Il montre en effet une défaillance dans l'attachement de surface, mais peu ou pas d'effet sur le *swarming* (Merritt *et al.*, 2010). Ce dernier résultat contredit le dogme voulant qu'en général, une haute concentration de di-GMP cyclique intracellulaire favorise la phase sessile et qu'une faible quantité soit associée à la phase motile.

La tyrosine phosphatase TbpA exerce un contrôle négatif sur la synthèse de di-GMP cyclique synthétisé par TbpB, une diguanylate cyclase (Ueda & Wood, 2009). Un mutant *tbpA*<sup>-</sup> favorise la formation de biofilms et entraîne une diminution de la motilité (*swarming* et *swimming*) (Ueda & Wood, 2009).



**Figure 1.4.5.** Voie régulatoire du système SadC/SadB/BifA. Schéma adapté de (Merritt *et al.*, 2007).

Les gènes PA4108 et PA4781 possèdent des domaines HD-GYP responsables de l'hydrolyse du di-GMP cyclique (Ryan *et al.*, 2009). Sans clairement démontrer un lien inverse entre le *swarming* et la formation de biofilm, des mutants dans ces gènes sont diminués dans le *swarming* et présentent une architecture de biofilms différente de la souche sauvage (Ryan *et al.*, 2009).

Le gène *wspF* a initialement attiré l'attention à cause de son défaut dans l'adhérence de surface et sa morphologie de colonie rugueuse (D'Argenio *et al.*, 2002). Le produit codé par ce gène fait parti d'un complexe protéique structurellement semblable à l'appareillage Che, responsable de la réponse chimiotactique. WspF contient un motif GGDEF et est aussi un homologue de CheB, une méthyltransférase impliquée dans le chimiotactisme (D'Argenio *et al.*, 2002). L'inactivation de *wspF* mène à une augmentation de la quantité intracellulaire de di-GMP cyclique, ce qui favorise la formation de biofilms (Hickman *et al.*, 2005). À l'inverse, une faible concentration de cette molécule entraîne un défaut dans la formation de biofilms (Hickman *et al.*, 2005). De plus, le mode de vie en surface stimule la production de di-GMP cyclique via la voie de signalment Wsp (Guvener & Harwood, 2007). De manière intéressante, le complexe Wsp synthétise ces molécules à des endroits précis à l'intérieur de la cellule, suggérant une distribution localisée des cibles du di-GMP cyclique (Guvener & Harwood, 2007).



### 1.4.8.5 - Autres gènes impliqués dans le *swarming*

RsmA est un régulateur transcriptionnel faisant partie de la voie GacS/GacA impliquée dans la régulation du métabolisme secondaire chez plusieurs bactéries à Gram(-) (Lapouge *et al.*, 2008). RsmA chez *P. aeruginosa* est impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes de virulence, du *swarming*, et de la synthèse de RL (Heurlier *et al.*, 2004). La relation entre *rsmA* et le *swarming* est abordée en détail à la section 3.4.

Potvin et collègues (2003) ont rapporté 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 (Potvin *et al.*, 2003). 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 indéterminée.

Un autre criblage visant à identifier des gènes nécessaires au *swarming* chez la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (Overhage *et al.*, 2007) a été rapporté. Ceci a permis de mettre en évidence 36 gènes, principalement impliqués dans la synthèse du flagelle, pili de type IV, métabolisme, chimiotactisme et sécrétion de type II. Ce groupe a aussi rapporté que plusieurs des mutants diminués dans le *swarming* étaient aussi affectés dans la formation de biofilms. Un criblage semblable a par la suite été effectué avec la souche PA14 de *P. aeruginosa* et cette fois-ci, 233 gènes ont été identifiés comme ayant un rôle dans le *swarming* (Yeung *et al.*, 2009). Encore une fois, de nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle et des pili de type IV ont été identifiés. Toutefois, 35 gènes codants pour des régulateurs transcriptionnels ont aussi été identifiés pour jouer un rôle dans ce type de motilité. Deux de ces gènes (*metR* et *cbrA*) ont été étudiés plus en détail. Le transcriptome d'un mutant *metR* a montré qu'en condition de *swarming*, plusieurs gènes associés à la virulence sont régulés à la hausse chez cette souche alors que les gènes régulés à la baisse comprennent surtout des transcrits associés à des bactériophages (Yeung *et al.*, 2009). Un mutant *cbrA*<sup>-</sup> est déficient dans le *swarming* et

### 1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*

---

favorisé dans la production de biofilms. Ce mutant démontre aussi une cytotoxicité accrue envers des cellules épithéliales de bronches pulmonaires humaines ainsi qu'une résistance accrue envers plusieurs antibiotiques (Yeung *et al.*, 2011).

Ce même groupe de recherche a aussi établi le transcriptome de cellules se trouvant au front de migration d'une colonie en *swarming* de *P. aeruginosa* en utilisant comme témoin des bactéries cultivées en bouillon (milieu liquide). Ils ont trouvé que plusieurs gènes de virulence et de sécrétion de type III étaient plus fortement exprimés chez les bactéries isolées du front de migration de colonies en *swarming* (Overhage *et al.*, 2008).

#### 1.4.8.6 - *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 (Kohler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). Or, plusieurs travaux ont été effectués sur la relation entre les RL et la virulence (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Plusieurs études ont rapporté que les RL jouent un rôle central dans le développement des biofilms (Davey *et al.*, 2003; Schooling *et al.*, 2004; Boles *et al.*, 2005; Lequette & Greenberg, 2005; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007; Ryan *et al.*, 2009; Glick *et al.*, 2010) 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 rapporté 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 (Shrouf *et al.*, 2006). Il est d'ailleurs bien documenté que la composition en nutriment du milieu de culture joue un rôle important sur l'architecture des biofilms (Davies *et al.*, 1998; Heydorn *et al.*, 2000; Heydorn *et al.*, 2002).

Récemment, une étude visant à caractériser la capacité de *swarming* de 237 isolats cliniques provenant de patients atteints de la fibrose kystique a été effectuée (Murray *et al.*, 2010). Leurs résultats ont montré que ces isolats cliniques présentaient des phénotypes

#### **1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa***

---

diversifiés de *swarming*, formation de biofilms et de sécrétions. Le *swarming* ne semble pas être une variable essentielle chez ces isolats.

# 2

# Objectifs

### 2.1 - Objectif général

L'objectif général des travaux décrits ici est de caractériser la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*. Le défi particulier des études portant sur le *swarming* est que ce phénotype n'est pour l'instant seulement observé qu'en cultivant les cellules en conditions particulières sur géloses, la nature même de ce phénomène de surface étant absent en cultures liquides. Retirer les cellules de leur colonie *swarming* amène aussi à une perte des caractéristiques spécifiques au *swarming*. De plus, comparativement aux autres bactéries chez lesquelles ce type de motilité est étudié, l'investigation de ce phénomène chez *P. aeruginosa* est particulièrement problématique à cause de l'absence de différenciation morphologique chez des cellules *swarming* (absence d'hyperflagellation et d'élongation). Ce manque de marqueurs « visuels » amène à privilégier, en plus des techniques de microbiologie traditionnelles, des techniques de biologie moléculaire et de chimie analytique afin de déterminer par exemple quels sont les gènes exprimés ou quelles molécules sont produites en condition de *swarming*.

### 2.2 - Hypothèses

L'étude proposée se base sur le fait que la motilité de type *swarming* est un comportement multicellulaire nécessitant l'action coordonnée de nombreuses populations bactériennes pour avoir lieu. En plus de la littérature scientifique appropriée, les résultats rapportés dans mon mémoire de maîtrise (Tremblay *et al.*, 2007) ont servi de base à la planification de ce projet.

### 2.3 - Objectifs spécifiques

- 1- **Caractérisation de la relation entre les conditions environnementales et la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*.**

## 2 Objectifs

---

- 2- Caractérisation de l'expression génique d'une colonie de *P. aeruginosa* en *swarming*.
  
- 3- Caractérisation de gènes impliqués dans la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*.

# 3

# Résultats

## **3.1 - Identification des facteurs affectant la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa***

### **3.1.1 - Mise en contexte**

La motilité de type *swarming* est un phénomène qui reçoit de plus en plus d'attention, notamment parce que de nombreux indices indiquent que cette motilité est reliée d'une certaine manière à la formation de biofilms, un modèle de multicellularité largement documenté chez *P. aeruginosa*. Malheureusement, les protocoles de préparation de géloses *swarming* sont très différents d'une étude à une autre, ce qui empêche souvent d'obtenir des données reproductibles et comparables. Cet article présente le développement d'un protocole de préparation de géloses *swarming* hautement reproductible et jette les bases pour l'élaboration de protocoles chez d'autres espèces bactériennes.

### **3.1.2 - Contribution de l'étudiant**

Pour cet article j'ai effectué toutes les expériences et construit les figures et tableaux. Le Dr Éric Déziel m'a aidé pour la planification expérimentale et à la rédaction de l'article.

### **3.1.3 – Résumé en français**

La motilité de type *swarming* est une migration rapide et coordonnée d'une population bactérienne à travers une surface semi-solide. Ce phénomène multicellulaire reçoit de plus en plus d'attention, car il est soupçonné d'être relié au développement de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. Les protocoles de préparation de géloses *swarming* diffèrent largement d'une étude à l'autre et aucun protocole standardisé n'a été proposé pour étudier ce phénomène avec précision. Ici, nous rapportons un protocole de préparation de géloses *swarming* rapide et hautement reproductible pour *P. aeruginosa* et montrons comment différents paramètres clefs affectent ce type de motilité (*i.e.* % d'agar, temps de séchage sous flux laminaire, température d'incubation et pH). Les résultats rapportés ici permettront de



### **3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité *swarming* chez *P. aeruginosa***

standardiser les tests de motilité *swarming* et de développer des protocoles de préparations de géloses *swarming* pour d'autres espèces bactériennes.

**3.1.4 - Article**

**Julien Tremblay & Eric Déziel.  
Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa*  
swarming motility assays  
Journal of Basic Microbiology  
2008, 48(6):509-15  
PMID: 18785657**

#### **3.1.4.1 - Abstract**

Swarming motility is a rapid and coordinated migration of a bacterial population across a semi-solid surface. This multicellular phenomenon is getting increasing attention as it is suspected to be related to biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa*. Published swarm plate preparation protocols differ greatly from one study to another and no reproducible and standardized protocols have been proposed to accurately study this phenomenon. We report here a rapid and highly reproducible swarm plate protocol for *P. aeruginosa* and show how different key parameters affect this type of motility (*i.e.* agar %, drying time under laminar flow, incubation temperature and pH). Results reported here will help to standardize swarming motility assays and develop effective swarm plate protocols for other bacterial species.

#### **3.1.4.2 - Introduction**

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous Gram-negative rod shaped bacterium responsible for many infections in immunocompromised hosts, burn patients and individuals suffering from cystic fibrosis. Besides well-known swimming and twitching motilities, this bacterium is capable of another type of migration called swarming. This complex type of motility is usually defined as a rapid and coordinated translocation of a bacterial population across a semi-solid surface (Harshey, 1994; Fraser & Hughes, 1999). In addition to flagella, swarming of *P. aeruginosa* requires the production of two biosurfactants, rhamnolipids (RLs) and 3-hydroxyalkanoic acids (HAAs) (Kohler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). Since RLs are also implicated in many aspects of biofilm development (Davey *et al.*, 2003; Boles *et al.*, 2005; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007), it is believed that these two multicellular behaviors are linked. Moreover, recent reports suggest a complex relationship between swarming motility and biofilm development (Shrout *et al.*, 2006; Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007).

The ability to display swarming motility is usually evaluated using various swarm plate assays in which special agar plates are spot-inoculated at the center and incubated for several

### **3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa***

hours. The diameter of the resulting “motility zone” formed by migrating bacteria is then measured. However, *P. aeruginosa* and other bacterial species have been reported to form complex branched fractal patterns while swarming. Measuring a fractal motif formed by a living organism can prove to be a difficult and unreliable exercise. Moreover, as protocols for swarm plate preparation are quite different from one study to another, it is difficult to compare swarming behaviors between different published reports. Additionally, swarming assays have been notoriously unpredictable, presenting poor reproducibility. In order to help prevent such inconsistencies, we present here a rapid swarm plate preparation protocol for *P. aeruginosa* providing highly reproducible results while also reporting different parameters (*i.e.* % agar, temperature, drying time, pH) affecting this type of motility.

#### **3.1.4.3 - Materials and methods**

##### **3.1.4.3.1 - Bacterial strains, media and growth conditions**

*P. aeruginosa* strain PA14 (Rahme *et al.*, 1995) was used for the experiments, unless stated otherwise. Also, various assayed PAO1 *P. aeruginosa* strains were kindly provided by G. Soberón-Chávez (Universidad Nacional Autónoma de México), Pradeep Singh (University of Iowa), Colin Manoil (University of Washington), Keith Poole (Queen's University, Ontario) and Steve Lory (Harvard Medical School), while strain PAK was from John Mattick (University of Queensland, Australia). Bacteria were typically regrown from frozen stocks at 37°C in TSB medium in a rotary shaker. Plates consisted of modified M9 medium [20 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8.6 mM NaCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 11 mM dextrose; 0.5 % casamino acids (Difco)] solidified with Bacto-agar (Difco) (Tremblay *et al.*, 2007).

##### **3.1.4.3.2 - Swarm plates assay**

Freshly autoclaved medium, to which sterile MgSO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O was added thereafter, was poured into Petri dishes disposed in two rows at the center of a laminar flow cabinet on the length axis. Plates were allowed to dry for 60 min., unless stated otherwise. Five

### **3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa***

μL of bacteria suspended in phosphate-buffered saline adjusted to OD<sub>600</sub> 3.0 were spotted on each plate, which were then incubated at 30°C, unless stated otherwise, for 16 hrs. The pH was adjusted after autoclaving with HCl and NaOH. Plates were dried under laminar flow for 60 min. but with the first 20 min. under UV light to ensure plates were sterile following pH adjustment.

#### **3.1.4.3.3 - Dry weight determination**

Surface-grown bacteria were homogenized with 1 mL reverse-osmosis water, gently harvested with a pipette and plastic scraper, transferred to a preweighed small aluminum cup, dried O/N at 60°C and finally weighed. Dry weight determination on swarming medium was done using a single inoculum (5 μL) on each plate while non-swarming plates were inoculated with 10 distinct spots (because of limited growth area in this condition) and divided by 10 to obtain dry weight produced by a single colony.

#### **3.1.4.3.4 - Swarm plate surface coverage**

Determination of the percentage of swarm plate surface coverage was performed essentially as described (Caiazza *et al.*, 2007). Briefly, a swarm plate image was captured with a digital camera (Canon EOS 10D), false colored using PaintShopPro (Jasc) to provide ample contrast between the bacterial swarms and the agar surface in order for the pixels to be counted using ImageJ (NIH). Comparison between swarming pixels and total plate pixels was performed.

#### **3.1.4.3.5 - dRLs and HAAs agar diffusion measurements.**

Measurements were performed as described (Tremblay *et al.*, 2007). Briefly, a small paper disc soaked with dRLs and HAAs was deposited at the center of a plate solidified with 0.3 %, 0.5 % or 1 % agar. After 10 min. of diffusion, 5.5 mm diameter agar coupons were extracted at various distances from the disc. dRLS and HAAs were then extracted from agar coupons and quantified by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

### **3.1.4.4 - Results and discussion**

#### **3.1.4.4.1 - Swarming motility depends on agar % and drying time under laminar flow**

Previous reports on *P. aeruginosa* swarming motility have shown that swarm plates preparation protocols used to observe this phenomenon are quite arbitrary. For instance, Caiazza *et al.*, (2005) used a swarm plate protocol in which the medium (modified M8 with 0.5% agar) was poured into Petri dishes in the morning and allowed to dry on the bench throughout the day (Caiazza *et al.*, 2005). Plates were then inoculated in triplicate and incubated for 16 hrs at 37°C followed by 32 hrs at room temperature (total time of incubation: 48 hrs.). They also reported that comparison of swarming experiments were made only among plates poured from the same batch of agar, presumably because of reproducibility issues. Another protocol described swarm plates (Difco nutrient broth supplemented with glucose and solidified with 0.5% agar) dried at room temperature overnight before being inoculated then incubated at 30°C (Deziel *et al.*, 2001; Déziel *et al.*, 2003). Kohler *et al.*, (2000) reported a protocol into which swarm plates were composed of modified M8 medium also solidified with 0.5% agar. They allowed plates to solidify and briefly dry before being inoculated and incubated at 37°C (Kohler *et al.*, 2000). Published protocols for preparation of swarm plates are quite diverse, which inevitably results in non-comparable swarming phenotypes from one study to another.

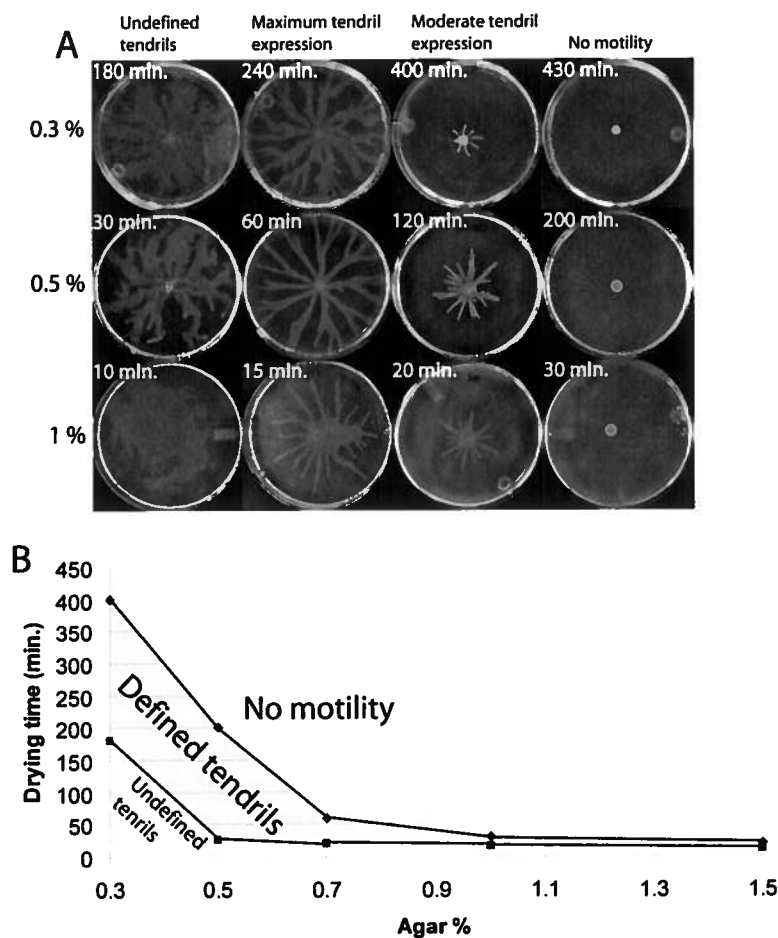
Although an agar concentration of 0.5% is a variable that remains constant throughout most published swarming reports with *P. aeruginosa*, the drying time is quite variable from one procedure to another. We therefore investigated the effect of various agar concentrations (0.3, 0.5, 0.7, 1 and 1.5 %) vs. drying periods on the expression of swarming motility. We found that swarming is modulated not only by the agar concentration but also by the drying time under laminar flow (Fig. 3.1.1). Longer drying times and higher agar % plates generally inhibit swarming while low agar % and shorter drying times support an unorganized type of swarming motility with formation of undefined tendrils. For instance, 1 % agar plates allow swarming with tendrils for a drying period between 15 and 20 min. (Fig. 3.1.1A). However, plates solidified with 0.5 % agar support robust and reproducible swarming when dried between 30 and 200

### **3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa***

min. Moreover, the distance traveled by tendrils migrating gradually gets shorter as the drying time increases, ultimately resulting in the absence of tendrils beyond a critical drying period.

Swarming morphologies of figure 3.1.1A have been plotted (Fig. 3.1.1B) to illustrate under which values of agar % and drying time swarming with tendril formation does occur. Thus, plates can be divided in three zones: 1) swarming with undefined tendrils, 2) swarming with defined tendrils and 3) absence of swarming. Between 0.3 and 0.7 % agar, swarming occurs under a quite large drying time interval. However, higher values of agar concentration still allow swarming expression, in contrast to what is generally considered in the literature. Thus, for a given agar concentration, swarming motility can occur under an appropriate plate-drying period. On plates dried for a short period, bacteria are generally capable of a poorly defined and not reproducible kind of rapid disorganized surface motility covering large areas. Plates dried for a longer period promote the formation of defined migrating tendrils and as drying time increases, tendrils migrating speed steadily decreases to eventually reach a critical point where no motility is observed. Our data shows that a key factor to induce robust swarming expression is to find an appropriate compromise between agar concentration and drying time (Fig. 3.1.1B).

### 3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa*



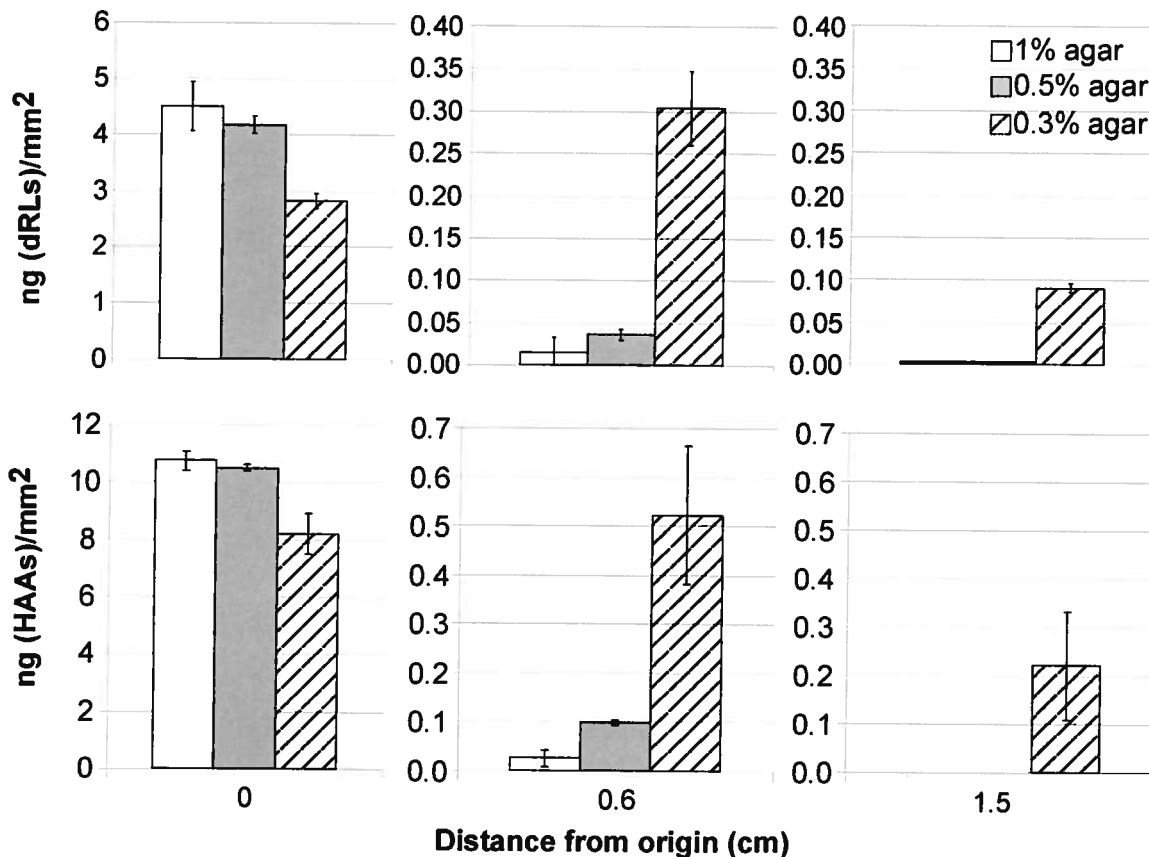
**Figure 3.1.1.** Swarming motility is dependant on agar % and drying time under laminar flow. A) Swarming phenotype of *P. aeruginosa* inoculated on swarm plates solidified with various agar % and dried for periods of time representing typical drying length for unorganized swarming (first column), maximum tendril expression (second column), moderate tendril expression (third column) and absence of motility (fourth column). B) Graphical representation of swarming phenotype in relation with agar % and drying time values showing three distinct zones in which there is undefined, defined and no tendril expression.

We and others recently reported that swarming motility in *P. aeruginosa* relies on HAAs and RLs (Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). These two types of molecules respectively inhibit and promote tendril formation while displaying different diffusion kinetics in the agar (Tremblay *et al.*, 2007). Drying time should affect the wetness of the agar. Plates dried for a shorter time should have water more readily available compared to plates dried for longer periods resulting in different diffusion kinetics of biosurfactants, which



### 3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa*

require an aqueous environment to diffuse. To confirm this hypothesis, we performed diffusion experiments of di-rhamnolipids (dRLs) and HAAs (Fig. 3.1.2). Results show that diffusion kinetics of both molecules is inversely proportional to the agar concentration. Diffusion of dRLs and HAAs is especially rapid in 0.3% agar, which would disturb their regulatory effects on tendrils formation and migration. On plates dried for a longer period still supporting swarming, the presence of short tendrils is possibly caused by the slow diffusion rates of HAAs and dRLs which consequently slow down the migration of tendrils.



**Figure 3.1.2.** dRLs and HAAs diffusion speed is affected by the agar concentration of swarm plates.

6 mm paper discs impregnated with dRLs and HAAs were deposited on plates for 10 min. Then, dRLs and HAAs were extracted from the agar at increasing distance from the centre, and quantified. The diffusion kinetics of HAAs and dRLs increase with decreasing agar concentration.

### **3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa***

We noticed that an important factor for swarming reproducibility is the position of swarm plates under laminar flow during the drying period. Indeed, swarming colonies on plates dried at the center of the laminar cabinet surface display higher average surface coverage ( $29.18 \% \pm 4.01$ ) compared to the ones dried on the cabinet's sides ( $18.41 \% \pm 3.22$ ) with a significant difference in overall morphology (data not shown). This is probably because plates localized at the borders of the laminar cabinet (near ventilating vents) are kept under a higher airflow intensity compared to plates placed in the middle of the cabinet. The airflow intensity is not the same from one cabinet to another. Therefore, the drying time of 60 min. reported here reflects the optimal drying time using our own cabinet and is not necessarily equivalent to the drying time of other cabinets.

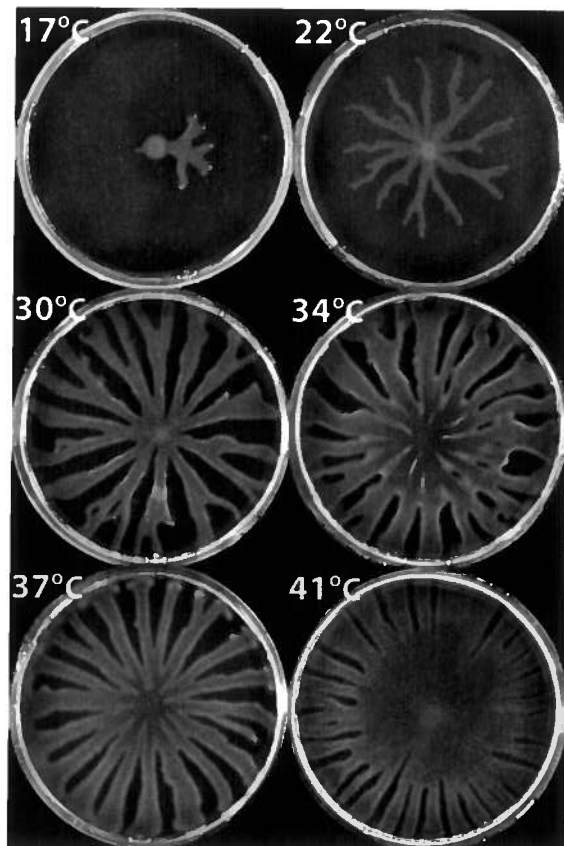
Our data indicates that the swarming phenotype of *P. aeruginosa* PA14 is optimally reproducible and robust on a modified M9 medium solidified with 0.5 % agar (described in Materials and methods) and dried for 60 min. under laminar flow.

#### **3.1.4.4.2 - Incubation temperature influences swarming motility**

Incubation temperature has an effect on the width and length of tendrils as low temperatures (17 and 22°C) elicit short tendril migration distances compared to temperatures of 30°C and above (Fig. 3.1.3). Tendrils sharpness is better at 22°C and decreases steadily as the incubation temperature gets higher. Bacteria incubated at inferior temperatures have a lower metabolic activity compared to bacteria incubated at higher temperatures, thus likely explaining why swarming colony expansion increases as the temperature gets higher. Coverage area of swarming colonies is also proportional to temperature and is the highest at 41°C, even though tendril length is the same above 30°C, indicating larger/less defined tendrils. Swarming expression is significantly reduced at 17°C and 22°C. Additional swarming experiments were performed on large Petri dishes (150 mm) incubated at 34°C, 37°C and 41°C. This showed that colony morphology is essentially the same at every temperature. However, migration speed of tendrils at these higher temperatures is faster than the one observed at 30°C (data not shown). This means that the difference in colony morphology observed in standard 100 mm Petri dishes is caused by a "boundary effect". When there is no more available space to be colonized

### 3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa*

onward by the migrating front, the biomass of the entire colony grows, the tendrils display a tendency to get larger, and eventually cover the free space between them (confirmed with time-lapse movie; data not shown). Even if swarming is possible under all tested incubation temperatures, the optimal temperature should be the one that allows appropriate development of swarming (tendrils migration length and covered area) over a convenient period of time. We found that PA14 swarming tendrils reach the Petri dish's border after a 30°C incubation period of about 16 hrs, which is a well-suited time period for daily-basis experiments. Thus, 30°C appears to be an ideal temperature for swarming motility assays of *P. aeruginosa* PA14 because it triggers the formation of well-defined tendrils with a proper migration speed.



**Figure 3.1.3.** Swarming expression is dependant on the incubation temperature. Swarming phenotype of *P. aeruginosa* inoculated on swarm plates dried for 60 min. under laminar flow, solidified with 0.5 % agar and incubated under various temperatures.

### **3.1.4.4.3 - Swarming motility is influenced by pH**

To determine if swarming motility is affected by acidic/alkaline conditions, swarm assays were performed under various pH levels. We found that bacterial colonies do not expand at pH 3 and 4, but are well developed between pH 5 and 9 (Fig. 3.1.4A). Inhibition of swarming at pH 3 is correlated with a very low dry weight biomass (Fig. 3.1.4B), suggesting that swarming does not occur because of altered bacterial growth. Plates at pH 5, 6 and 6.35 present similar swarming patterns, with numerous ramifications at pH 5 (Fig. 3.1.4A). Between pH 7 and 9, swarming colonies display a high number of tendrils with reduced migration compared to lower pH values (Fig. 3.1.4A).

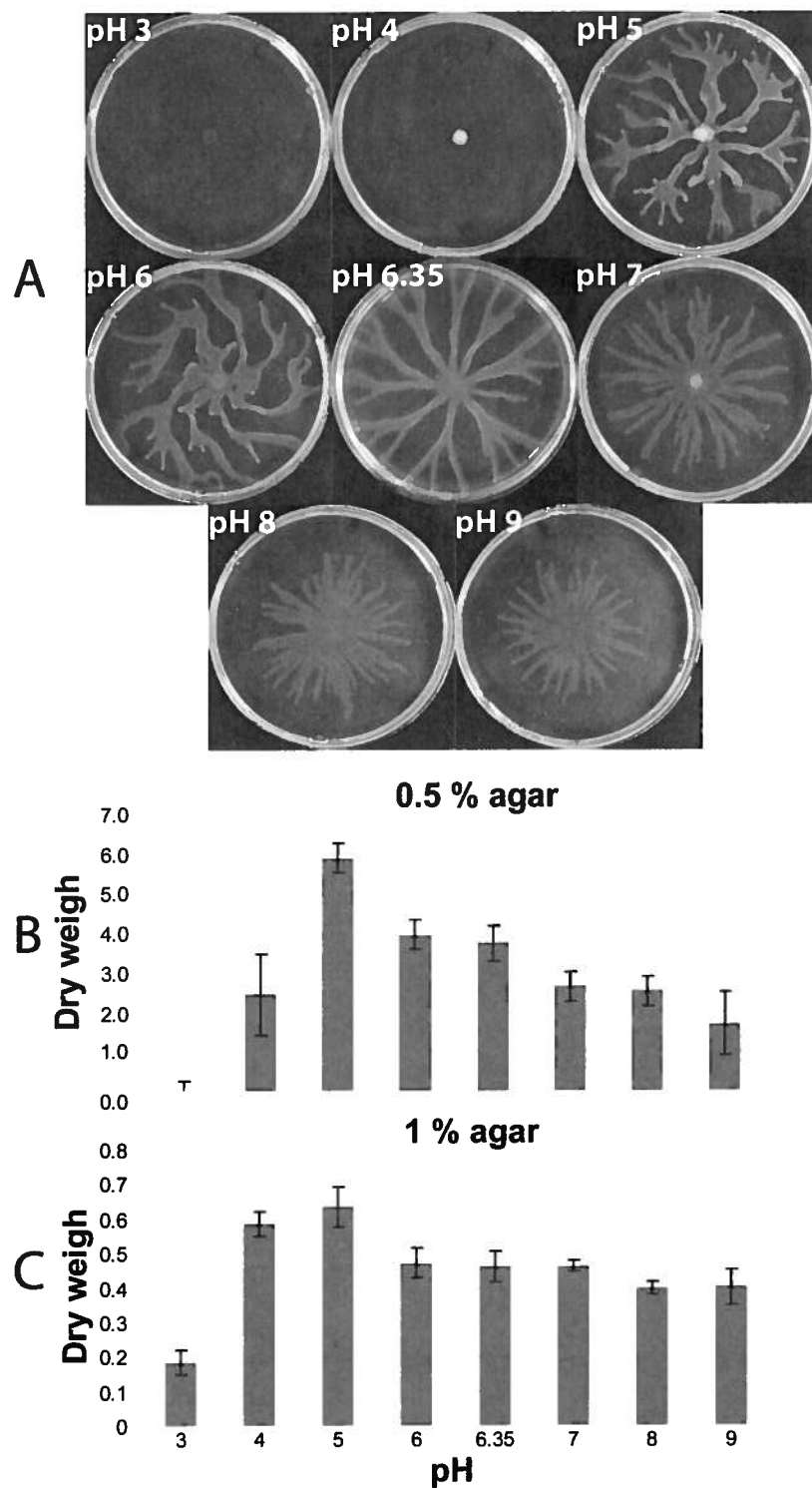
To determine if there is a relationship between the swarming phenotype and bacterial growth, the total dry weight of swarming colonies at each pH value was determined (Fig. 3.1.4B). We found that biomass production on swarm plates is maximal at pH 5 and then decreases with increasing pH. Dry weight is comparable for pH 4 and pH 9, while swarming motility is expressed only at the latter pH. It is interesting to notice that the biomass is the same at both pH 4 and 9, while the surface coverage is quite different, indicating that swarming tendrils observed at pH 9 contain a very thin layer of bacteria. Interestingly, total biomass of colonies at pH 7, 8 and 9 are comparable to the one obtained at pH 4 where no swarming is observed (Fig. 3.1.4B). Thus the non-swarming phenotype observed at pH 4 is unlikely to result from a growth defect. This might be related to the fact that aggregation of rhamnolipid monomers as micelles and vesicles is pH dependant; a low pH value (pH 5.5) prevents micelle formation at the expense of lamellar structures as where higher values (pH 6 to 7.5) promote formation of large vesicles (Champion *et al.*, 1995). Autoclaved swarming medium used in this study typically presents a pH varying between 6.3 and 6.4. Since this pH range induces an identical swarming phenotype (data not shown), we found that adjusting the pH after autoclaving is not necessary.

To determine if bacterial biomass production is affected solely by pH and not by the agar concentration, biomass production at various pH values on plates not allowing swarming expression (*i.e.* 1 % agar, dried for 60 min.) was also investigated (Fig. 3.1.4C). Biomass production pH preference was similar to the one observed on swarm plates (0.5 % agar) (Fig.

### **3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa***

3.1.4C) but allows about ten times less biomass production. This indicates that swarming motility not only maximizes surface colonization but also biomass production. Bacterial growth was also determined in broth culture to confirm results on agar-solidified media. As it is the case for solid and semi-solid conditions, growth in liquid cultures presents a maximal value at pH 5 and then gets lower as pH gets higher. However, in contrast with agar surface growth, *P. aeruginosa* is not able to grow at pH 4 in liquid under our conditions (data not shown).

### 3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa*



**Figure 3.1.4.** Swarming expression is pH-dependant.

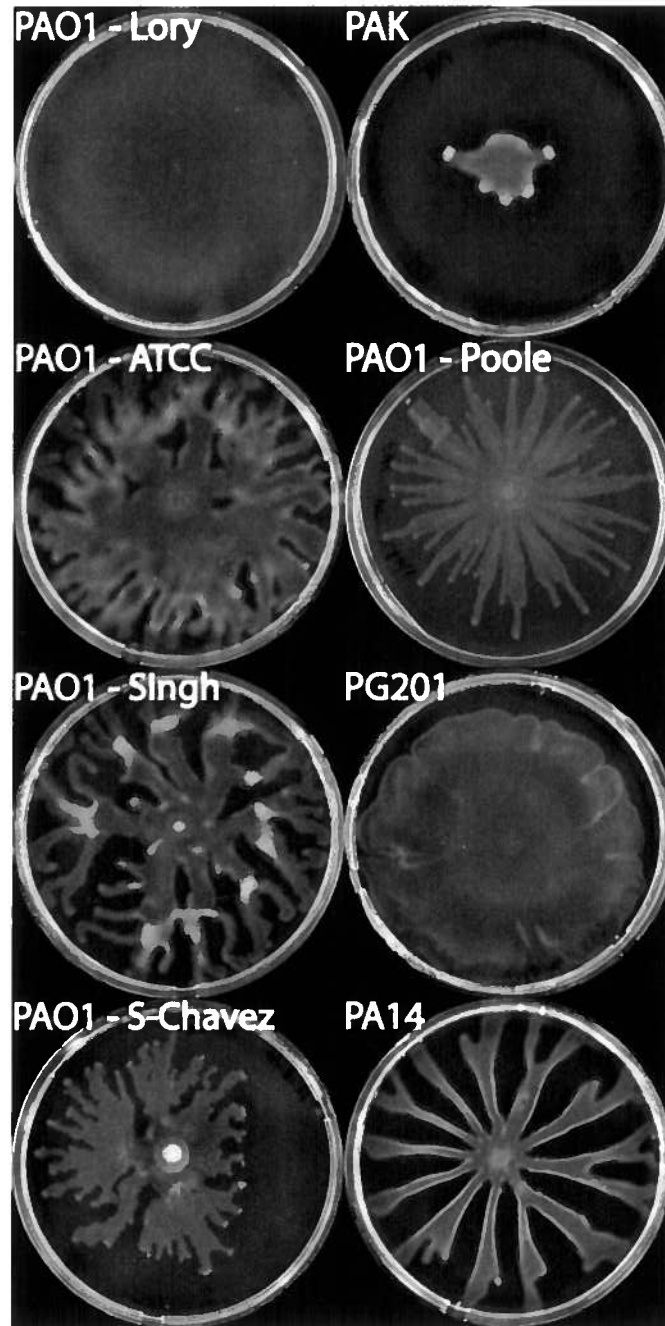
*P. aeruginosa* was inoculated on plates dried for 60 min. under laminar flow, solidified with 0.5 or 1 % agar and adjusted to various pH values. A) Swarming phenotype under various pH values. B) Dry weight of swarming colonies. C) Dry weight of non-swarming colonies.

#### 3.1.4.4.4 - Swarming of different *P. aeruginosa* strains

Experiments described here show that different factors can affect the swarming motility of *P. aeruginosa* strain PA14. However, other strains of this specie are routinely used in many laboratories. Swarming motility, under conditions we found optimal for strain PA14 (*i.e.* 0.5 % agar with 60 min. drying) were tested with strains PAK, PG201 and various PAO1 isolates (Fig. 3.1.5). Although the swarming phenotype is sometimes quite different from the one displayed by PA14, all strains tested were capable of swarming motility. PAO1-Lory strain did not produce tendrils but was able to colonize the entire available surface, while PG201 displayed a flowery pattern. PAK was also able to produce faint tendrils. Presumably, the defective expression of tendrils by these three strains is caused by an improper agar % and/or drying period, suggesting that they possibly require different conditions than PA14. Indeed, from Fig. 3.1.1, motility with absence of tendril formation is a characteristic of plates having low agar % and/or low drying time. However, the PAO1-Lory strain is known to carry a frame-shift mutation in *pilC* which encodes a type IV fimbrial biogenesis protein, making it deficient in twitching motility (Ferrandez *et al.*, 2002). Köhler *et al.*, (2000) reported that a *pilA* (coding for type IV pilin) mutant lacking twitching was also deficient in swarming (Kohler *et al.*, 2000). However, it was also reported that a mutant in the same gene (*pilA*) was capable of swarming motility (Rashid & Kornberg, 2000) and even hyper-swarming (Shrout *et al.*, 2006). Involvement of type IV pili in swarming is still unclear and may have a still unknown role on this type of motility. All the other PAO1 strains (ATCC, Singh, Soberón-Chávez, Poole) produced tendrils, with more ramifications than the ones displayed by PA14. To confirm that the ratio of drying time/agar % shown in Fig. 3.1.1 can be applied to other *P. aeruginosa* strains, swarming experiments were performed with PAO1-Lory and PAK on plates solidified with 0.5 % and 1 % agar and dried for different time periods. This showed that the diameter of swarming colonies produced by both these strains is inversely proportional to the agar % and drying time, as expected (data not shown). Also, extended incubation of both these strains at 17°C on 0.5% agar dried for 30 min. to 200 min. allowed the formation of short tendrils. As observed with PAO1-Lory and PAK, we suggest that varying slightly the parameters within the limits described

### 3.1 Amélioration de la reproductibilité du test de motilité swarming chez *P. aeruginosa*

here (agar %, drying time, incubation temperature and also pH) will modulate the swarming phenotype of other strains, and even other bacterial species.



**Figure 3.1.5.** Swarming motility phenotype of various *P. aeruginosa* strains under conditions optimized for strain PA14 (0.5% agar, 60 min. drying, 30°C O/N incubation).



### **3.1.4.5 - Concluding remarks**

Swarming motility of *P. aeruginosa* is gaining increasing attention as many connections between this multicellular behavior and biofilm development are being demonstrated. The purpose of this study was to assess the factors influencing the formation of a swarming motility phenotype by *P. aeruginosa*. Published protocols on the preparation of swarm plates differ a lot from one study to another, which inevitably results in having low reproducible and non-standardized swarming results. We provide key insights to develop adequate swarming medium that should be relevant to other bacterial species as well. Key factors for this type of motility are agar concentration, plate drying time, temperature of incubation, and pH of the medium.

### **3.1.4.6 - Acknowledgments**

We acknowledge Danielle Dubeau for helpful comments. This study was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant to E.D.

## 3.2 – Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.2.1 - Mise en contexte

La motilité de type *swarming* est encore mal comprise. Au cours des dernières années, quelques études transcriptomiques portant sur le sujet chez différentes espèces bactériennes (*S. typhimurium*, *S. meliloti* et *P. mirabilis*) ont été publiées. Chez *P. aeruginosa*, le transcriptome de bactéries situées au front de migration d'une colonie en *swarming* a été effectué chez la souche PAO1 (Overhage *et al.*, 2008). Cependant, la culture témoin employée dans ces travaux consistait en des bactéries cultivées en milieu liquide. Par conséquent, nous avons conclu que les gènes différentiellement exprimés rapportés dans cet article sont le reflet de la comparaison entre le style de vie en surface vs. en liquide. Nous avons donc proposé une étude transcriptomique basée sur un *design* expérimental différent, dans lequel la culture témoin était obtenue de cellules cultivées en géloses. Cette approche s'est avérée fructueuse et à fourni de précieuses informations sur l'expression différentielle de gènes en *swarming*.

Des résultats complémentaires à l'article sont aussi discutés. Parmi eux, le profil transcriptomique de populations d'extrémité de dendrites soumis à des HAA exogènes est présenté. Ensuite, un criblage de mutants dans des gènes différentiellement exprimés dans une colonie *swarming* de même que la caractérisation de certains phénotypes de ces mutants sont rapportés et discutés.

### 3.2.2 - Contribution de l'étudiant

Pour cet article, j'ai effectué toutes les expériences, rédigé l'article, construit les figures, tableaux et données supplémentaires et complémentaires. Le Dr. Éric Déziel a contribué à la planification du *design* expérimental, à la rédaction de l'article et à l'analyse des données.

### 3.2.3 – Résumé en français

**Survol:** La bactérie *P. aeruginosa* est capable de trois types de motilités, le *swimming*, le *twitching* et le *swarming*. Ce dernier type de motilité est caractérisé par un mouvement de groupe rapide et coordonné sur une surface résultant d'interactions intercellulaires et d'une différenciation morphologique. Un aspect singulier de la motilité *swarming* est la formation de motifs complexes en formes de fractales produits par les bactéries lorsqu'elles migrent en s'éloignant de leur point d'ensemencement. Ce type de comportement de groupe demeure largement incompris et sa caractérisation met en lumière d'importantes informations concernant les communautés bactériennes structurées tel que les biofilms. En utilisant les biopuces GeneChip® (Affymetrix), nous avons obtenu les profils transcriptomiques des populations bactériennes localisées à l'extrémité de dendrites en migration et au centre de colonies en *swarming* et comparé ces profils à celui d'une population témoin cultivée sur le même milieu de culture, mais solidifié de manière à inhiber la motilité *swarming*.

**Résultats :** Les données brutes des biopuces ont été corrigées de leur bruit de fond à l'aide de l'algorithme RMA puis normalisées à l'aide de la méthode des quantiles. Les gènes différentiellement exprimés entre les trois conditions ont été sélectionnés en utilisant un seuil de différence de 1,5 à l'échelle  $\log_2$ , ce qui a donné un total de 378 gènes (6,3% des cadres de lectures codants prédits de la souche PA14). Des changements majeurs dans l'expression des gènes ont été observés pour chacune des conditions étudiées, soulignant la présence de populations bactériennes distinctes à l'intérieur même d'une colonie en *swarming* (extrémité de dendrite vs. centre de *swarming*). De façon inattendue, les données d'expression des biopuces ont révélé qu'une minorité de gènes sont surexprimés dans la population de l'extrémité de dendrites. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes reliés au métabolisme de l'énergie, aux protéines ribosomales et au transport de petites molécules. D'autre part, plusieurs gènes codant pour des facteurs de virulence bien connus sont globalement exprimés à la baisse chez les cellules des extrémités des dendrites. La population située au centre d'une colonie en *swarming* est distincte et semble subir un stress oxydatif causé par le cuivre.

**Conclusions:** Les résultats rapportés dans cette étude montrent qu'à l'opposé des cellules du centre d'une colonie en *swarming*, les populations des extrémités des dendrites

### **3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa***

expriment à la baisse des gènes associés à la virulence et à la hausse des gènes associés au métabolisme énergétique. Ces résultats nous permettent de proposer un modèle où les cellules des extrémités des dendrites fonctionnent comme des « éclaireurs » dont la tâche principale est de rapidement recouvrir des surfaces non-colonisées alors que la population du centre de *swarming* demeure dans un état permettant l'établissement permanent de la surface colonisée (état ressemblant à celui retrouvé chez un biofilm).

**3.2.4 - Article**

**Julien Tremblay & Eric Déziel.  
Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility  
BMC Genomics  
2010, 11(1):587  
PMID: 20961425**

\*Les données supplémentaires (*additional file* dans le texte) sont présentés en annexe (section 6.5).

## 3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.2.4.1 - Abstract

**Background:** The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is capable of three types of motilities: swimming, twitching and swarming. The latter is characterized by a fast and coordinated group movement over a semi-solid surface resulting from intercellular interactions and morphological differentiation. A striking feature of swarming motility is the complex fractal-like patterns displayed by migrating bacteria while they move away from their inoculation point. This type of group behaviour is still poorly understood and its characterization provides important information on bacterial structured communities such as biofilms. Using GeneChip® Affymetrix microarrays, we obtained the transcriptomic profiles of both bacterial populations located at the tip of migrating tendrils and swarm center of swarming colonies and compared these profiles to the one of a control population of bacteria grown on the same media but solidified to not allow swarming motility.

**Results:** Microarray raw data were corrected for background noise with the RMA algorithm and quantile normalized. Differentially expressed genes between the three conditions were selected using a threshold of 1.5 log<sub>2</sub>-fold, which gave a total of 378 selected genes (6.3% of the predicted open reading frames of strain PA14). Major shifts in gene expression patterns are observed in each growth conditions, highlighting the presence of distinct bacterial subpopulations within a swarming colony (tendrils tips vs. swarm center). Unexpectedly, microarrays expression data reveal that a minority of genes are up-regulated in tendrils tip populations. Among them, we found energy metabolism, ribosomal protein and transport of small molecules related genes. On the other hand, many well-known virulence factors genes were globally repressed in tendrils tip cells. Swarm center cells are distinct and appear to be under oxidative and copper stress responses.

**Conclusions:** Results reported in this study show that, as opposed to swarm center cells, tendrils tip populations of a swarming colony displays general down-regulation of genes associated with virulence and up-regulation of genes involved in energy metabolism. These results allow us to

## 3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*

propose a model where tendrill tip cells function as «scouts» whose main purpose is to rapidly spread on uncolonized surfaces while swarm center population are in a state allowing a permanent settlement of the colonized area (biofilm-like).

### 3.2.4.2 - Background

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous Gram-negative rod-shaped bacterium responsible for many infections among immunocompromised hosts, burned patients and individuals suffering from cystic fibrosis. Besides well-known swimming and twitching motilities, this bacterium is capable of another type of migration called swarming. This complex type of motility is usually defined as a rapid and coordinated translocation of a bacterial population across a semi-solid surface (See additional file 1 (movie)) (Harshey, 1994; Fraser & Hughes, 1999). In addition to flagella, swarming of *P. aeruginosa* requires the release of two exoproducts, rhamnolipids (RLs) and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), which act as wetting agents and chemotactic-like stimuli (Kohler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). The best studied bacterial social behaviour is the formation of attached communities called biofilms. Besides playing a role in swarming motility, RLs and HAAs are also implicated in many aspects of biofilm development (Davey *et al.*, 2003; Boles *et al.*, 2005; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). Interestingly, swarmer cells of a range of bacteria, including *P. aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*, display enhanced resistance to a variety of antibiotics (Lai *et al.*, 2009; Butler *et al.*), a well-known feature of the biofilm way of life. A complex relationship exists between swarming motility and biofilm development (Shrout *et al.*, 2006; Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007).

A striking feature of *P. aeruginosa* colonies displaying swarming motility is the formation of complex dendritic, fractal-like patterns. Little is known about the gene regulation of the different bacterial subpopulation comprised in a swarming colony. Recently Overhage and coworkers (Overhage *et al.*, 2008) presented a microarray analysis in which a swarmer cell population harvested at the edge of a swarming colony migrating front was compared with broth cultured bacteria. Their data showed that swarm edge cells exhibited up-regulation of

### **3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa***

genes associated with virulence (e.g. Type III secretion system, extracellular proteases and iron transport) compared with cells cultured in broth.

Besides *P. aeruginosa*, the other bacterial species for which a transcriptomic study of the swarming state has been reported are *Salmonella typhimurium* (Wang *et al.*, 2006), *Sinorhizobium meliloti* (Nogales *et al.*), and *Proteus mirabilis* (Pearson *et al.*). In their experimental design, Wang *et al.*, (2006) compared entire bacterial colonies grown on swarm medium to cells grown on hard surface not allowing swarming using broth culture for control (Wang *et al.*, 2006). They pointed out differentially expressed genes specific to the swarming motility of *Salmonella* and also determined that the expression of many genes associated with type III secretion, LPS synthesis and iron metabolism was surface-specific and not specifically associated with swarming. Very recently, Nogales *et al.*, (2010) reported the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti* grown on a semi-solid surface. One of their conclusions was that rhizobactin and iron metabolism genes play an important role in swarming motility of this bacterium (Nogales *et al.*, 2010). The swarming transcriptome of *Proteus mirabilis* was also recently established (Pearson *et al.*, 2010). Swarming motility in this bacterium displays concentric circles radiating from an inoculating point formed by successive swarming and consolidation phases and is quite different from what is observed in *P. aeruginosa*. The authors reported that flagellar genes were highly up-regulated in both swarming and consolidation cells compared to cells cultured in broth. Interestingly, comparison of these two phases revealed that only 9 genes were up-regulated during the swarm extension process.

Here we further dissect the whole-genome transcriptomic profile of *P. aeruginosa* swarming motility by comparing gene expression between different bacterial populations localized: 1) at the tip of migrating swarming tendrils, 2) at the center of a swarming colony, and 3) cultured in exactly the same growth conditions except for a harder surface not allowing this type of motility, as control.



### **3.2.4.3 – Methods**

#### **3.2.4.3.1 - Bacteria**

This study was performed with *P. aeruginosa* strain PA14. Bacteria from frozen stocks were typically grown at 37°C in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco) in a rotary shaker. For swarming assays, overnight cultures were diluted in PBS to the desired OD<sub>600</sub>.

#### **3.2.4.3.2 - Motility assays**

Swarming motility assays were performed as previously described (Tremblay & Deziel, 2008). Medium M9DCAA [20 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8.6 mM NaCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 11 mM dextrose; 0.5% casamino acids (Difco)] was solidified with 0.5% Bacto-agar (Difco) and dried for 60 min under laminar flow in two rows following the length axis of the laminar cabinet. Control non-swarming plates were identically prepared but instead dried for 240 min. All plates were inoculated at their center with 5 µL of cell suspension (OD<sub>600</sub> = 3.0) and incubated at 30°C.

#### **3.2.4.3.3 - Sample preparation for microarray hybridization**

Actively migrating cells were harvested from the tip of migrating tendrils of swarming colonies 12 hrs post-inoculation by pipeting 8 µL of RNAlater (Qiagen) on the edge of a given tendril. Cells were resuspended by robustly pipeting back and forth while slightly inclining the Petri dish and were directly transferred into a 1.5 mL microtube kept on dry ice. An average of eight tendril migrating fronts per plate was harvested, with twenty plates for each replicate. Cells localized in the center of swarming colonies were harvested using a hole-cutter of 1 cm diameter and transferred into a clean Petri dish. Cells adhering to the agar plugs were then collected by vigorously pipeting back and forth 1 mL of RNAlater and transferred into a 1.5 mL microtube on dry ice. Ten swarm centers were sampled for each replicate. Non-swarming colonies were harvested by vigorously pipeting back and forth 1 mL of RNAlater directly on bacteria and were transferred into a 1.5 mL microtube kept on dry ice. Ten non-swarming colonies were used for each replicate.

### **3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa***

RNA was extracted using the RiboPure™ kit (Ambion). All manipulations were performed according to the manufacturer's instruction. RNA purity was assessed by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000). Samples showing ratios of  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$  superior to 2.0 were selected. RNA quality was then assessed with a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Samples having a RIN of 8.9 and greater were kept.

To maximize cDNA synthesis yield, reverse transcription was performed twice with 6 µg of purified RNA for each replicate (total of 12 µg / replicate) using random hexamer primers (Invitrogen) and Superscript II (Invitrogen) reverse transcriptase (Invitrogen). GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix) was integrated in each sample for quality control for the hybridization process. Thermocycler routine was performed according to Affymetrix's guidelines. RNA was eliminated with a HCl/NaOH 1N treatment and cDNA was purified with the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen). Resulting cDNA was digested with DNaseI (Roche) to give fragments between 50 and 200 bases. Samples were tagged with Biotin with the GeneChip® DNA Labeling Reagent (Affymetrix) according to the manufacturer's instructions. Quality control of biotin tagging was performed with a gel-shift assay using the ImmunoPure NeutrAvidin Protein (Pierce chemicals) and SybrGold (Invitrogen) for revelation.

#### **3.2.4.3.4 - Microarray hybridization and data analysis**

Hybridizations were performed at the Genome Québec Innovation Centre (McGill University, Montréal, Canada). Raw data were corrected for background using the RMA algorithm and quantile normalization (Irizarry *et al.*, 2003). Expression levels obtained from three replicates for each condition were compared using the FlexArray 1.3 software (Blazejczyk *et al.*, 2007). Only genes showing a *p*-value < 0.05 using the Empirical Bayes (Wright and Simon) algorithm were considered for data analysis. Since the RMA algorithm decreases the false positive rate and compresses the fold change, a 1.5-fold change cut-off value was used for determination of the differentially expressed genes (Irizarry *et al.*, 2003). Functional classification and over-representational analysis were performed using the PseudoCAP functional classes ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) (Winsor *et al.*, 2009). Expression data of all differentially expressed genes is available in additional file 2.

### **3.2.4.3.5 - qRT-PCR**

Quantitative real-time PCR was performed using qScript™ One-Step SYBR Green kit (Quanta Bioscience) and a RotorGene 6000 thermocycler (Corbett). Primers were designed to give products between 80 and 150 bp. The *nadB* gene was used as a housekeeping control. Each qRT-PCR run was done in triplicate and for each reaction, the calculated threshold cycle (Ct) was normalized to the Ct of *nadB* amplified from the corresponding sample. The fold-change was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001). Sequences of primers used for qRT-PCR analysis are available in additional file 3.

### **3.2.4.4 - Results and discussion**

#### **3.2.4.4.1 - Experimental design to identify differentially expressed genes in a *P. aeruginosa* swarming colony - significant transcriptional changes**

Previous reports on swarming motility of *P. aeruginosa* showed that this social phenomenon relies on the expression of many genes (Potvin *et al.*, 2003; Overhage *et al.*, 2007; Yeung *et al.*, 2009). These studies presented genes that are essential to swarming motility by screening transposon mutant libraries. This approach has provided precious insights but no information on the expression of genes involved in this multicellular behavior. The only published transcriptomic study on *P. aeruginosa* swarming motility was performed by Overhage and coworkers (Overhage *et al.*, 2008). They reported that many genes associated with virulence were overexpressed at the swarming migration front compared to cells cultured in broth. However, because of the nature of their control condition (*i.e.* broth suspended cells), results reported in that study essentially gave information on transcriptional differences between surface and broth lifestyles.

Therefore, to further understand the complexity of *P. aeruginosa* swarming migration, microarrays gene expression profiles of bacterial populations localized at the tip of swarming tendrils and swarm centers were established using for control bacteria grown in the same culture conditions but on plates dried longer to prevent swarming motility (Tremblay and Deziel

### **3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa***

2008). Analysis of three independent experiments for each three conditions reveals a total of 378 differentially expressed genes ( $p < 0.05$  by Empirical Bayes statistical test) using a threshold of  $\pm 1.5$  fold ( $\log_2$ ). These differently expressed genes are obtained by comparing each three conditions to one another: swarm center vs. non-swarming, tendril tip vs. non-swarming and tendril edge vs. swarm center. A selection of genes from our analysis is discussed below and presented in Tables 3.2.2, 3.2.3 and 3.2.4. A complete list of all differentially expressed genes is available (see additional file 2).

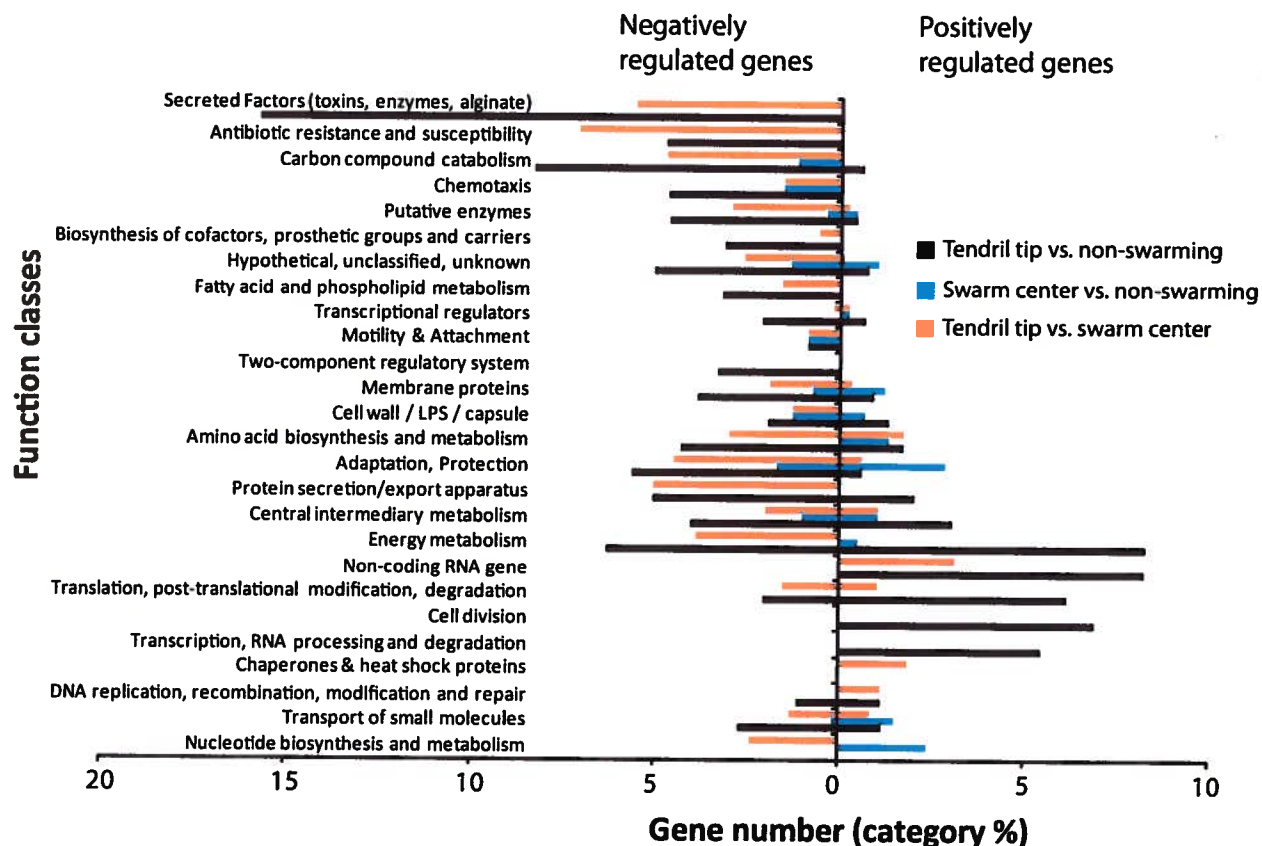
Pairwise comparisons of differentially expressed genes show that a majority of them were differentially expressed in the tendril tip vs. non-swarming category followed by tendril tip vs. swarm center then swarm center vs. non-swarming, respectively (Table 3.2.1). Interestingly, much more genes were repressed in tendril tip bacteria (232) compared to the up-regulated ones (75) in the tendril tip vs. non-swarming category, while 121 genes were down-regulated and 20 up-regulated in tendril tip compared to swarm center. The other category (swarm center vs. non-swarming) showed a more even distribution of up-regulated (45) and down-regulated (43) genes. To further expose their complexity, the expression data have been scattered in a Venn diagram (additional file 4). Genes ID and fold-change ( $\log_2$ ) values can be found in additional file 2 (excel file) under the *summary* tab.

The most striking aspect of the expression data overview is that an important majority of differentially expressed genes are down-regulated in the tendril tip populations compared to the non-swarming control and to the swarm center. Furthermore, there are far less genes differentially expressed between the swarm center and non-swarming control than there are between tendril tip and non-swarming control. This suggests that swarm center cells are metabolically closer to non-swarming condition cells than to tendril tip cells. Interestingly, the few differentially expressed genes present in the swarm center vs. non-swarming category in general present a higher fold-change value than those observed in the tendril tip vs. non-swarming category.

Fig. 3.2.1 presents an over-representation analysis of gene expression data based on their PseudoCAP function classes (Winsor *et al.*, 2009) in function of class category %. We can see that a lot of genes belonging to the Secreted factors (toxins, enzymes, alginate) and Carbon

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

compound catabolism categories are down-regulated in tendril tip cells. On the other hand, swarming tendril tip populations up-regulate genes in the Translational, post-translational modification, degradation, Non-coding RNA gene, Cell division and Transcription, RNA processing and degradation categories. The Energy metabolism category is also dysregulated in swarm tip cells. Also noteworthy is that the tendril tip vs. non-swarming category shows a majority of genes down-regulated in membrane proteins, transport of small molecules, two-component regulatory systems, biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers and transcriptional regulators. We note that no genes coding for products of the flagellar apparatus are seen in our analysis. This agrees with our microscopic observations of PA14 tendril tip and swarm center cells, which always show single flagella-equipped bacteria (additional file 5).

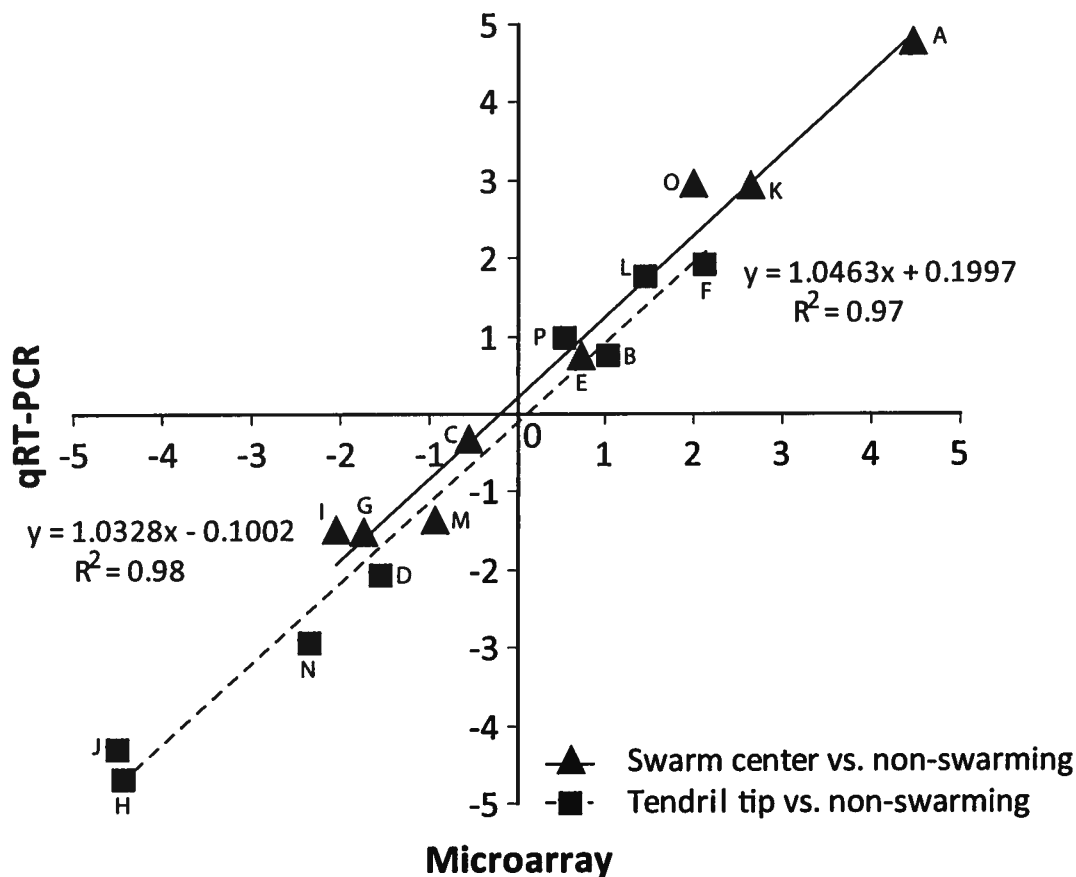


**Figure 3.2.1.** Global gene expression pattern with a change in expression level greater than 1.5 log<sub>2</sub>-fold in the three tested conditions.

Overrepresentation analysis in functional class percentage for each PseudoCAP function classes according to up- and down-regulated genes showing the differential regulation of all gene classes in tendril tip vs. non-swarming, swarm center vs. non-swarming and tendril tip vs. swarm center.

3.2.4.4.2 - Validation of microarray results by qRT-PCR

Validation of microarray data was performed using qRT-PCR. Eight genes in tendril tip vs. non-swarming (1 up-, 4 down-regulated and 3 non-differentially expressed genes) and swarm center vs. non-swarming (3 up-, 2 down-regulated and 3 non-differentially expressed genes) were selected for this comparative analysis (Table 3.2.5). Expression data of microarray and qRT-PCR are plotted in figure 3.2.2 and demonstrate an excellent concordance between the two datasets. Pearson correlation values scored 0.97 and 0.98 for center vs. non-swarming and vs. tendril tip, respectively.



**Figure 3.2.2.** Microarray results validation by qRT-PCR. Mean log<sub>2</sub> ratios of the qRT-PCR experiments are plotted against the mean log<sub>2</sub> ratios of the microarray experiments. Numbers on the graph refer to genes listed in Table 3.2.5.

### 3.2.4.4.3 - Genes positively regulated in tendrill tip cells

Among the genes up-regulated in tendrill tip bacterial population are found a high number of genes involved in the energy metabolism functional class. These genes products include many cytochromes (PA1552-PA4429-PA4430) and cytochrome oxidase subunits (PA1553-PA1554-PA4133), which are involved in the production of ATP via the respiratory electron transport chain. We also found the *atpIBEFHAGFC* cluster coding for the only ATP synthase complex of *P. aeruginosa*. This suggests that fast moving swarmer cells in tendrill tips require more energy than non-swarmer and swarm center cells.

Bacterial heme-copper oxidases, such as cytochrome *c* oxidases, are key components of cellular energy transduction systems and contribute to the establishment of the electrochemical gradient subsequently used for ATP production by the ATP synthases (Pitcher & Watmough, 2004). At the tip of swarming tendrills, PA4429-31 is overexpressed (Table 3.2.2). This operon shows high similarity to *petABC* (also known as *fbCFBC*) encoding for polypeptides of the cytochrome *bc1* complex (ubihydroquinone : cytochrome *c* oxidoreductase) (Williams *et al.*, 2007). A third group of cytochromes having a very high affinity for O<sub>2</sub> has been described in recent years among proteobacteria, the cytochrome *cbb*<sub>3</sub> oxidase (Shapleigh *et al.*, 1992). *P. aeruginosa* contains two *ccoNOQP* operons (*ccoNOQP-1* and *ccoNOQP-2*) coding for cytochrome *cbb*<sub>3</sub> oxidases (PA1552- PA1554 and PA1555-PA1557, respectively). Intriguingly, *ccoNOQP-1*, but not *ccoNOQP-2*, is up-regulated in tendrill tip cells (Table 3.2.2). Most studies on several bacterial *cbb3* oxidases have indicated that these enzymes are primarily expressed under oxygen limitation and are critical for respiration in microaerobic conditions. However, the *P. aeruginosa* homologues show different expression patterns depending on oxygen availability (Comolli & Donohue, 2004): the first operon (*ccoNOQP1*) displays higher expression under high oxygen availability while the second one is up-regulated under oxygen-limiting condition (Comolli & Donohue, 2004). Actually, recent results indicate that Cbb3-1 plays a primary role in aerobic growth irrespective of oxygen concentration; Kawakami *et al.*, (2009) have observed a phase-dependent regulation of *ccoNOQP-1* expression, with much higher transcription levels in exponential phase compared to stationary phase growth (Kawakami *et al.*, 2009).

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

In the end, our data indicates that two cytochrome *c* oxidases are specifically induced in tendrils tip cells; they are not differentially regulated in the swarm center and non-swarming conditions. Since the ATP synthase gene cluster is also up-regulated at the tip (Table 3.2.2), we conclude that swarming tip cells are highly metabolically active; their elevated energy requirements, presumably mostly for motility purposes, involve elevated O<sub>2</sub> consumption.

We also obtained an up-regulation of many ribosomal proteins in tendril tip cells. Ribosomal proteins assist in the assembly and increase the stability of rRNA, without requiring ATP for their action (Semrad *et al.*, 2004). Synthesis of ribosomal proteins and rRNA is tightly regulated and coordinated so they are never in excess (Snyder & Champness, 1997). This, along with the up-regulation of many tRNA genes in tendril tips (see additional file 2), suggests that tip cells display a high protein synthesis rate. Swarming cells of *S. meliloti* were also reported to display an up-regulation of many ribosomal proteins (Nogales *et al.*, 2010).

A number of tendril tip overexpressed genes are involved in the transport of small molecules (Table 3.2.2). Among them, *bfrB* was up-regulated 2.74 log<sub>2</sub>-fold. This gene codes for a bacterioferritin, a protein involved in the controlled storage and release of iron (Andrews *et al.*, 2003) that acts as a buffer against iron overload and deficiency (Chasteen, 1998). An investigation of the global transcriptional response of iron-starved cultures of *P. aeruginosa* to iron exposure showed that mRNA levels of *bfrB* increased significantly when iron was made available, whereas *bfrA* mRNA levels remained unchanged (Palma *et al.*, 2003). Since tendril migrating front cells are colonizing still unpopulated (*i.e.* iron rich) area, *bfrB* up-regulation is in agreement with previous findings that BfrB is induced by iron-replete conditions while BfrA is constitutively expressed (Palma *et al.*, 2003; Wilderman *et al.*, 2004).

Both the proline and the glutamate symporters (*putP* and *gltP*) are induced at the swarming tip. In bacteria, glutamate serves as the general amino group donor for amino acid and nucleotide biosynthesis, and may also act as a source of carbon and nitrogen under nitrogen-limiting conditions. In many bacteria, proline is needed as an osmoprotectant in growth environments with high osmotic stress (Wood, 1988). It is also catabolically converted into glutamate by the product of *putA* (encoding for a proline dehydrogenase) (Meile & Leisinger, 1982) which was also up-regulated in tip cells. Activation of the lysine permease and



### **3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa***

genes coding for the GltF-GltG-GltK high-affinity glucose transporter (Adewoye and Worobec 2000) further support a general up-regulation of specific uptake mechanisms in metabolically very active cells located at the tip of swarming tendrils.

Two secretion-related genes, *secD* and *secF*, were up-regulated in tendril tips. In *E. coli*, SecD/SecF are required for the proton-motive force dependant translocation of proteins (Arkowitz & Wickner, 1994). Why only *secD* and *secF* and not other *sec* genes are differentially expressed is elusive at the moment. In *E. coli*, YidC associates with SecD and SecF in a preprotein translocase (Nouwen & Driessen, 2002). YidC depletion dissipated proton motive force, notably caused by defects in membrane assembly of both cytochromes and ATPases (Van der Laan *et al.*, 2003). The up-regulation of *secD*, *secF*, and *yidC* might thus be related to, and a consequence of, the induced cytochrome and ATPase components in swarm tip cells.

#### **3.2.4.4.4 - Genes negatively regulated in tendril tip cells**

Interestingly, the global picture of expression data shows that most dysregulated genes found in our study are actually down-regulated in cells located at tendril tips compared to the non-swarming control (Fig. 3.2.1A). Among them, we found the *coxBAC-coll* operon encoding for the *aa<sub>3</sub>* cytochrome *c* oxidase (Kawakami *et al.*, 2009). Expression of this operon is up-regulated at the stationary phase, especially strongly by nutrient-limiting conditions: carbon, nitrogen and iron starvation all induce transcription from the *cox* promoter (Kawakami *et al.*, 2009). Not surprisingly, the stationary-phase sigma factor RpoS is a positive regulator of the *cox* genes (Schuster *et al.*, 2004). It is thus perfectly coherent with the model that swarming tip bacteria are highly active cells growing under nutrient-replete conditions.

The entire *pqq* operon (*pqqDABCE*) coding for pyrroloquinoline quinone (PQQ) was down-regulated in tendril tips. PQQ is one of several quinone derivatives functioning as essential cofactors for a class of enzymes known as quinoproteins (Matsushita *et al.*, 2002; Rucker *et al.*, 2009). For instance, it is the co-factor of the glucose dehydrogenase which catalyses the conversion of glucose to gluconate (Matsushita *et al.*, 2002), the first step in the oxidative pathway of glucose utilisation. Interestingly, the *gcd* (PA2290) gene encoding for the membrane-bound glucose dehydrogenase is also down-regulated in tendril tips (Table 3.2.3).

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*

This would mean that swarming tip cells prefer to uptake and use glucose directly through the phosphorylative pathway to sustain the Entner-Doudoroff pathway. The phosphorylative pathway is thought to be preferred when oxygen is limiting (Hunt & Phibbs, 1983). Explanation to why *pqq* and *gcd* are down-regulated in tendrill tip bacteria remains speculative at the moment: maybe the high respiration rate and high energy consumption at the tip of tendrills can somehow be reflected in reduced O<sub>2</sub> availability and switching to the phosphorylative pathway of glucose utilisation.

Genes with chemotaxis-related functions were also found to be down-regulated. PA1930 codes for the soluble chemotaxis transducer McpS that was shown to be localized at cell poles (Bardy & Maddock, 2005). It was also reported that the N terminus of McpS carries two putative PAS domains. These domains are present in numerous MCPs involved in light, oxygen and redox sensing (Bardy & Maddock, 2005). The role of PA2788 and PA4915, two probable chemotaxis transducers is still unknown.

PA2165, coding for a probable glycogen synthase and *glgB*, encoding a glucan branching enzyme were also both down-regulated in tendrill migrating front. These enzymes are involved in building glucose polymeric stocks (*i.e.* glycogen). This suggests that tendrill tip bacteria are not building energy reserves but are instead consuming available carbon sources immediately.

An important observation is that many genes associated with virulence, especially secreted factors, were down-regulated in tendrill tips and swarm center vs. non-swarming conditions. The extensive damage caused by *P. aeruginosa* during infections is due to the production of several cell-associated and extracellular virulence factors (Lyczak *et al.*, 2000). Interestingly, the previously published genome-wide transcriptomic study reported that swarming cells of *P. aeruginosa* display enhanced expression of many virulence determinants (Overhage *et al.*, 2008). For instance, these authors found that genes associated with pyoverdine, pyochelin and phenazine biosynthesis were up-regulated in migrating swarm front compared to broth cultured cells (Overhage *et al.*, 2008). In contrast, our transcriptomic data indicates that under swarming motility (tendrill tip cells) there is a global shutdown of this category of genes.

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*

We did not expect *rhlAB* and *rhlC* to be down-regulated in swarm tendrils since rhamnolipid production is a key factor in *P. aeruginosa* swarming motility. However, close examination of the expression data actually reveals that *rhlAB* is more highly expressed in cells from the swarm center than from the tendrils, suggesting that rhamnolipids are primarily produced from cells at the center of a swarming colony.

Pyochelin (*pchl*, *pchH*, *pchG*, *pchF*, *pchE*, *pchD*, *pchC*, *pchB*, *pchA*) and pyoverdinin (*pvdI*, *pvdH*, *pvdLG*, PA2403-2410 operon, PA2411, PA2412) synthesis genes were also down-regulated in tendril tip cells. Pyochelin and pyoverdinin are the two major siderophores produced by *P. aeruginosa* to acquire iron (Cox & Graham, 1979; Cox & Adams, 1985; Poole *et al.*, 1996). They chelate iron in the extracellular medium and transport it into the cells via specific outer membrane transporters, FptA for pyochelin (Cobessi *et al.*, 2005) and FpvA for pyoverdinin (Schalk *et al.*, 2001). Besides iron, pyochelin also has affinity for other metals such as  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  (Braud *et al.*, 2009). As it is the case with *rhlAB* and *rhlC*, the *pch* and *pvd* genes were more highly expressed in swarm center compared to tendrils, possibly because the cellular density in the swarm center is higher and that iron availability is therefore depleted and restricted. Indeed swarming tendrils are moving towards uncolonized areas that are still rich in iron (and other metals and nutrients), thus possibly explaining the down-regulation of siderophore synthesis genes. This is consistent with the above noted up-regulation of the bacterioferritin coding gene *bfrB* at the tip of tendrils. In addition, we previously demonstrated that rhamnolipids/HAAs diffuse rapidly on a surface (Tremblay *et al.*, 2007; Tremblay & Deziel, 2008). These surfactant molecules are known to be potent antimicrobials and it is possible that one function of swarm center cells is to produce a quickly diffusing rhamnolipid-rich area protecting the tendril tip bacteria migrating in a hostile environment.

The expression of a number of protease-encoding genes is reduced at the tip of tendrils. Genes *lasA* and PA2939, which respectively encodes for the LasA protease, a 20-kDa staphylolytic enzyme (Goldberg & Ohman, 1987), and a secreted aminopeptidase (Cahan *et al.*, 2001) were down-regulated in tendril tip cells. Genes belonging to the alkaline protease synthesis and secretory cluster (*aprXaprDaprE*, *aprA*, *aprII*) were also down-regulated in tendril

### **3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa***

migrating front cells. The expression of these genes is up-regulated under iron-limiting conditions (Ochsner *et al.*, 2002).

The two genes *ptxS* and *toxA* were also down-regulated in tendrils. PtxS is a transcriptional regulator that controls the expression of *toxA* (Swanson *et al.*, 1999; Westfall *et al.*, 2004), whose product exotoxin A, like many other bacterial virulence factors, is negatively regulated by iron availability (Hamood *et al.*, 1996; Vasil & Ochsner, 1999; Ochsner *et al.*, 2002; Gaines *et al.*, 2007). Again, this is consistent with tendril tip cells migrating over an uncolonized area where iron resources have not been yet depleted.

The gene coding for the galactophilic lectin LecA was down-regulated at the tendril tips. The product of this gene is an adhesin which has the ability to bind cells together in a biofilm (Diggle *et al.*, 2006). The individual nature of fast moving swarming cells makes it logical for *lecA* to be down-regulated under these conditions, to allow cells to freely migrate.

Apart from PA5403 and PA5550 (*glmR/glpR*) (Table 3.2.2), nearly all genes belonging to the transcription factors class were down-regulated in tendril tip populations (Table 3.2.3), including a number of ECF sigma factors. GlmR is a regulatory gene involved in amino sugar metabolism. Its inactivation abolished swarming, swimming and twitching motilities of *P. aeruginosa* strain PA01 (Ramos-Aires *et al.*, 2004), but not of strain PA14 using our swarming conditions (data not shown). It was also reported that *glmR* (*glpR*) shows increased expression during twitching-mediated chemotaxis towards phosphatidylethanolamine (Miller *et al.*, 2008). The ECF sigma factor-putative anti-sigma factor couple PA2895-96 was identified to have a role in the secretion of exoproteases (Potvin *et al.*, 2003), and might be under iron regulation (Potvin *et al.*, 2008). ECF sigma factors encoded by PA1300, PA1912 and *fiuI*, the latter along with its related anti-sigma factor coding *fiuR* (Llamas *et al.*, 2006), are up-regulated by iron starvation (Ochsner *et al.*, 2002; Cornelis *et al.*, 2009). Again, the down-regulation of these genes in tip cells indicates they are under an iron-replete environment.

#### **3.2.4.4.5 - Genes up-regulated in the swarm center**

A substantial number of genes were highly up-regulated in swarm center (most with  $\log_2$ -fold > 3) compared to the non-swarming control. Among the three conditions tested in this

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

study, the comparison between swarm center and non-swarming displays the less expression differences, as shown by the low category % of differentially expressed genes (Fig. 3.2.1; blue bars). This suggests that these two conditions display a more similar biological status (*i.e.* as opposed to tendril tip vs. non-swarming and tendril tip vs. swarm center). However, as reported in table 3.2.4, the few swarm center genes considered in our analysis were on average much more highly differentially expressed (*i.e.* average  $\log_2$ -fold change > 3.5).

*P. aeruginosa* codes for three different catalases. KatA is the major catalase which is highly expressed in all phases of growth (Hassett *et al.*, 2000). KatB is detectable when induced by peroxide or paraquat (Ochsner *et al.*, 2000). The KatE (aka KatC) catalase is high-temperature inducible (Mossialos *et al.*, 2006). However its function is unclear as it does not contribute significantly to protection against oxidative stress and high osmolarity, or to virulence, under standard laboratory conditions (Lee *et al.*, 2005 375). Both *katA* and *katB* were strongly induced in the swarm center vs. non-swarming conditions (Table 3.2.4). In contrast, the catalase-encoding gene *katE* was down-regulated in swarming tendril tip cells (Table 3.2.3). Furthermore, alkyl hydroperoxide reductase AhpF, the thioredoxin reductase 2 (*trxB2*) and PA3237 were also up-regulated in swarm center. The latter codes for a predicted protein of about 8 kDa with an export signal. Along with *katA* and *katB*, these three genes are among the more strongly induced genes by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure (Salunkhe *et al.*, 2005), clearly suggesting the occurrence of such stress in the center of a swarming colony. Finally, the expression of PA3287 was also reported to be induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Palma *et al.*, 2004). This gene shares high similarity with ankyrin. Interestingly, AnkB, an ankyrin-like protein, is needed for optimal KatB activity (Howell *et al.*, 2000).

Many genes associated with the copper stress response (*mexP*, *cueA*, PA3519-20) (Teitzel *et al.*, 2006) were highly up-regulated in the swarm center population. These genes are part of a small subset of genes reported to be directly regulated by CueR, a transcriptional regulator central to copper resistance in *P. aeruginosa* (Thaden *et al.*, 2010). While copper is an important element in cellular metabolism, Cu<sup>2+</sup> was shown to accumulate in the EPS matrix of biofilms and to be particularly toxic to them (Harrison *et al.*, 2005), especially when applied in

## **3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa***

synergy with biocides (Harrison *et al.*, 2008). This could explain in part the observed Cu stress response observed in swarm center bacteria.

Both the gluconate permease and the glucose ABC transporter encoded by *gltKGF* (Adewoye & Worobec, 2000) were up-regulated in swarm center. We speculate that swarm center cells are living in a glucose-depleted environment and that these systems are needed for a more efficient carbon acquisition. Here, it is important to note that while *pqq* (PA1985-89) and *gcd* (PA2290) genes were down-regulated in tip cells, they were “normally” expressed both in swarm center and non-swarming conditions. Thus, the oxidative pathway of glucose utilisation is not down-regulated in the swarm center, presumably because enough oxygen is available to cells in this condition.

### **3.2.4.4.6 - Tendril tip and swarm center bacteria constitute two distinct populations**

Taken together, our results show that there is a global shutdown of transcripts associated with known virulence factors in swarming tendril tip bacteria (including *lecA*, *toxA*, *aprA*, *lasA*, *rhlAB*, *rhlC*, *pchFEDCBA*, *pvdH*, *pvdLG*). Swarm center and non-swarming control bacteria show a similar expression level for virulence-related genes (Table 3.2.3). Importantly, the up-regulating element common to all these factors is iron-restricted conditions, indicating that the iron-replete environment encountered by actively swarming cells explains, at least in part, their reduced expression of virulence determinants. At the same time, swarming tendril cells displayed high expression of genes associated with energy synthesis (*e.g.* *atpCDGAHFEBI*, and various cytochrome *c* oxidase subunits), and protein synthesis (ribosomal proteins, translation factors). Therefore, swarming cells at the tip of actively migrating tendrils are highly metabolically active cells that have reduced requirements for competition and nutrition acquisition factors.

A number of the down-regulated virulence factors in swarming tendril tip bacteria are also quorum sensing-controlled. Multicellular behaviour and cell-to-cell communication are often linked (Davies *et al.*, 1998; Kohler *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2004; Irie & Parsek, 2008). However, our results clearly show that nutritional factors, here especially iron, are key

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

elements in the regulation of swarming motility; in contrast, we do not see a clear correlation with cell density. This agrees very well with the emerging concept that quorum sensing regulation cannot be separated from environmental factors, especially availability of nutrients (Déziel *et al.*, 2003; Shrout *et al.*, 2006; Nadal Jimenez *et al.*).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is generated during aerobic metabolism and is capable of damaging critical biomolecules. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in bacteria usually mostly results from by-products of electron chain transport (Gonzalez-Flecha & Demple, 1995). Our data however shows that only one gene belonging to that category, PA4133 encoding for a cytochrome *c* subunit, was up-regulated in swarm center. At the moment, it is not completely clear why oxidative stress response genes were up-regulated in swarm center and not in tendril tips where there is apparently a higher respiration activity. One possible explanation is the preferred glucose uptake and utilisation route taken by swarm tendril tip cells. Indeed, our data indicate that these cells preferentially use the phosphorylative instead of the oxidative pathway. Possibly, the latter generates more reactive oxygen species (ROS) that are dissimilated by superoxide dismutase (SOD) to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, this explanation is only partial as it does not clarify why swarm center cells are different in this respect from cells of non-swarming colonies. We therefore advance another explanation integrating the observed oxidative and copper stress responses occurring in swarm center populations. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a normal byproduct of oxidative metabolism and naturally reacts with reduced metal ions such Cu<sup>2+</sup>/Cu<sup>+</sup> to produce OH<sup>•</sup>/OOH<sup>•</sup> via the Haber-Weiss (aka Fenton-type) reaction (Halliwell, 1982; Stohs & Bagchi, 1995), a strong oxidant well known to react with and damage biomolecules (Pomposiello & Demple, 2002). In our particular case, the input of Cu cations has to be coming from somewhere else than the impoverished medium on which swarm center bacteria lives. As reported in several studies, dead cells constitute an important component of a microbial biofilm (Webb *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2004; Mai-Prochnow *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009). More recently, Chang & Halverson (2009) reported a correlation between cell death and endogenous ROS accumulation in *P. putida* biofilms (Chang *et al.*, 2009). We propose that swarm center population comprises an important proportion of dead cells like it is the case in *P. aeruginosa* biofilms (see additional file 6 for data supporting this hypothesis). These dead bacteria constitute an important reservoir of nutrient and metal

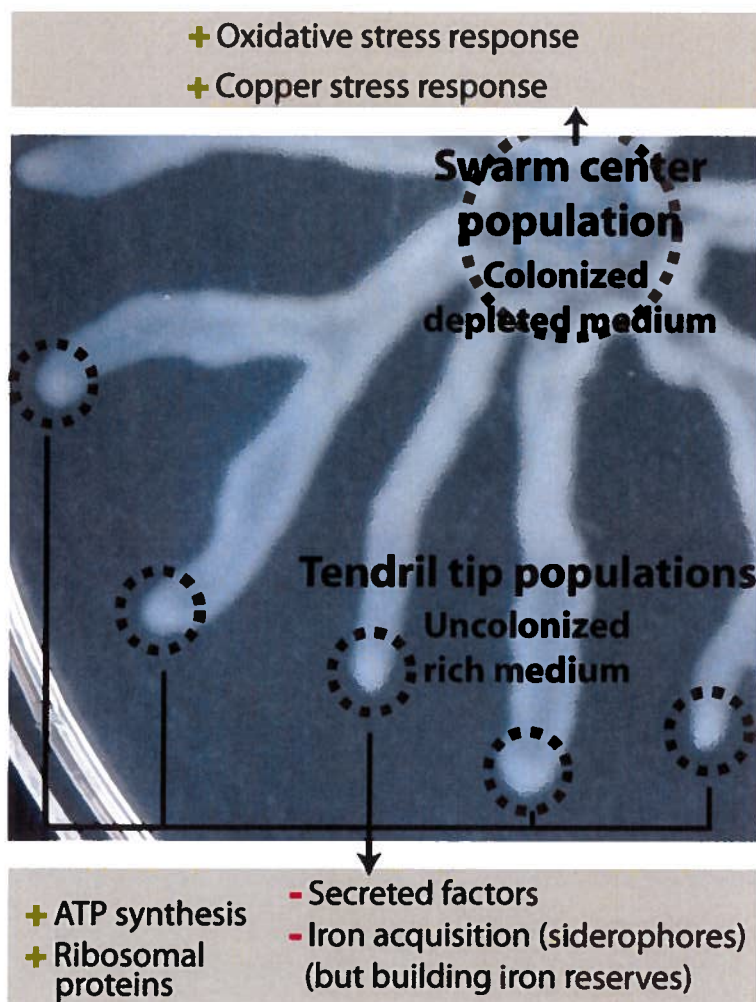
### **3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa***

species (such as Cu cations) diffusing into the live cells environment (reviewed in Harrison *et al.*, (2007) (Harrison *et al.*, 2007)) and reacting with surrounding  $H_2O_2$  to produce  $OH^\bullet/OOH^\bullet$  and therefore triggering an important oxidative stress. Catalase is also a heme containing redox enzyme and extreme iron limitation could prevent its normal function, thus possibly playing a role in the observed oxidative stress response.

There are important divergences between our transcriptomic data and the one presented by Overhage *et al.*, (2008). This is likely explained mostly by the difference in our respective experimental designs, as they chose to compare their swarm tip bacteria against broth cultured bacteria. In our microarray experiment, swarm center and swarm tip bacteria were compared to a control colony grown on the same media solidified for a slightly longer drying period, thus avoiding gene expression differences specific to the surface vs. broth lifestyles. In consequence, both of our studies are not readily comparable. One possible explanation for their report of up-regulation of virulence factors in swarming colonies may be related to our observation that absence of restriction to growth results in diminished expression of virulence and colonization factors, such as extracellular proteases and siderophores. Differences in respective swarm plate media (M9DCAA vs. BM2) could also account for some of the observed differences.

In figure 3.2.3, we introduce a model in which we illustrate a swarming colony dynamics model in light of our data. We propose that tendril tip cells are specialized in colonization of pristine areas. Since these areas are free of other bacteria, subpopulations of bacteria whose task is to actually colonize do not need to express virulence/competition determinants. In such a model, their main task would be to rapidly spread from their inoculating point to appropriate immediate surrounding areas as fast as possible, leaving the duty of permanent colonization to swarm center bacteria who are expressing virulence factors and survival determinants. This model underscores the labour division and bacterial multicellularity of a swarming colony. Different subpopulations in the very same bacterial colony are an efficient way for a bacterial species to consolidate its control over an area.





**Figure 3.2.3.** Proposed model of the transcriptional dynamics displayed in tendril tips and swarm center of a *P. aeruginosa* swarming colony.

Tendrils tip cells display an up-regulation of transcripts associated with energy production (ATP synthesis and cytochromes) and ribosomal proteins. At the same time, these cells down-regulate transcription associated with secreted factors (aka virulence factors) and iron acquisition. In contrast, swarm center cells live in a state in which oxidative and copper stress response transcripts are up-regulated.

#### 3.2.4.5 - Conclusions

Besides the fact that *P. aeruginosa* absolutely needs a functional flagella, a low surface-tension medium and the production of rhamnolipids, very little is known about the regulatory features of swarming motility. In the present study, we report genes that are specifically expressed in swarm center or tendril tip populations of swarming colonies. We found that cells migrating at the tip of swarming tendrils are vigorously active as shown by the up-regulation of

## **3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa***

many genes involved in the electron respiratory chain transport and ATP production. In contrast, cells remaining in the center of the swarming colony express striking oxidative and copper stress responses. Compared to tendril tips, they also produce high amounts of transcripts of many secreted factors associated with virulence and iron acquisition. Iron and, more generally, nutrient acquisition genes were actually revealed to be a central aspect in our transcriptomic analysis. We introduced a model in which labour division is an integral part of a swarming colony dynamics. This model reinforces the idea that swarming motility is essentially used by bacteria to colonize available nutrient-rich areas. We propose that *P. aeruginosa* swarming motility in itself is not a virulent behaviour, but rather an opportunity by a colony to rapidly spread and take control of a maximum of space thanks to swarm front's metabolically active (and fast moving) cells. Finally, our data suggest that the swarm center cells establish a more stable colony displaying a biofilm-like behaviour.

### **3.2.4.6 - Authors' contribution**

JT designed and performed the transcript profiling and qRT-PCR experiments and carried out downstream data analysis. ED participated in the conception and supervised the design of the study, and performed data analysis. JT and ED wrote the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

### **3.2.4.7 - Acknowledgements**

This study was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant No. 312478 to ED. JT was recipient of Ph.D. scholarships from the Fonds de la Recherche en Nature et Technologies (FQRNT) and from the Fondation Armand-Frappier.

## 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.2.4.8 - Tables

**Table 3.2.1.** Differentially expressed genes by pairwise comparison.

	<b>Tendrill tip vs. non-swarming</b>	<b>Tendrill tip vs. swarm center</b>	<b>Swarm center vs. non-swarming</b>
<b>Genes up-regulated</b>	75	20	45
<b>Genes down-regulated</b>	232	121	43
<b>Total</b>	307	141	88

These three pairwise comparisons represent a total of 378 non-redundant genes.

## 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

**Table 3.2.2.** Selected genes up-regulated in tendril tip cells.

Gene number	Gene name	Product name	Tip vs. non-swarming fold change (log <sub>2</sub> )
<b>Transcriptional regulators</b>			
PA0961 <sup>2</sup>		probable cold-shock protein	1.5
PA5403 <sup>1</sup>		probable transcriptional regulator	1.9
PA5550	<i>glmR</i>	GlmR transcriptional regulator	1.6
<b>Energy metabolism</b>			
PA1552	<i>ccoP1</i>	probable cytochrome c	1.9
PA1553	<i>ccoO1</i>	probable cytochrome c oxidase subunit	2.1
PA1554	<i>ccoN1</i>	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)	1.7
PA4133 <sup>2</sup>		cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)	2.9
PA4429	<i>petC</i>	probable cytochrome c1 precursor	2.0
PA4430	<i>petB</i>	probable cytochrome b	2.0
PA4431	<i>petA</i>	probable iron-sulfur protein	1.5
PA5553	<i>atpC</i>	ATP synthase epsilon chain	1.5
PA5554	<i>atpD</i>	ATP synthase beta chain	1.9
PA5555	<i>atpG</i>	ATP synthase gamma chain	1.7
PA5556*	<i>atpA</i>	ATP synthase alpha chain	1.4
PA5557*	<i>atpH</i>	ATP synthase delta chain	1.3
PA5558*	<i>atpF</i>	ATP synthase B chain	1.3
PA5559*	<i>atpE</i>	ATP synthase C chain	1.3
PA5560	<i>atpB</i>	ATP synthase A chain	1.8
PA5561*	<i>atpI</i>	ATP synthase protein I	1.3
<b>Protein secretion/export apparatus</b>			
PA3821	<i>secD</i>	secretion protein SecD	1.6
PA3820	<i>secF</i>	secretion protein SecF	1.6
PA5568	<i>yidC</i>	Preprotein translocase subunit YidC	1.7
<b>Transport of small molecules</b>			
PA3531 <sup>1</sup>	<i>bfrB</i>	bacterioferritin	2.7
PA4616 <sup>1</sup>		probable c4-dicarboxylate-binding protein	2.2
PA3187	<i>gltK</i>	probable ATP-binding component of ABC transporter	1.5
PA3188	<i>gltG</i>	probable permease of ABC sugar transporter	2.0
PA4628	<i>lysP</i>	lysine-specific permease	1.7
PA5479	<i>gltP</i>	proton-glutamate symporter	1.6
PA0782 <sup>3</sup>	<i>putA</i>	proline dehydrogenase	1.8
PA0783 <sup>1</sup>	<i>putP</i>	sodium/proline symporter PutP	1.6
PA4770 <sup>1</sup>	<i>lldP</i>	L-lactate permease	1.5
<b>Translation, post-translational modification, degradation</b>			
PA0579	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	1.5
PA2619	<i>infA</i>	initiation factor	1.8
PA2851	<i>efp</i>	translation elongation factor P	1.8
PA3655 <sup>1</sup>	<i>tsf</i>	elongation factor Ts	1.7
PA3742	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	1.8
PA4255	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	1.7
PA4432 <sup>1</sup>	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	1.8
PA4567	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	1.5

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*

---

PA4672		peptidyl-tRNA hydrolase	1.7
PA5049	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	1.6

---

<sup>1</sup>: Genes up-regulated in tendril tip vs. NS and up-regulated in tendril tip vs. center.

<sup>2</sup>: Genes up-regulated in tendril tip vs. NS and up-regulated in swarm center vs. NS.

<sup>3</sup>: *putA* was significantly up-regulated in tip cells vs. swarm center, but not tip cells vs. NS.

\*: Genes up-regulated in tendril tip vs. NS only and expressed more than 1.3 log<sub>2</sub>-fold). Genes kept in our analysis since they are part of an operon or in certain cases, a pertinent cluster.

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

**Table 3.2.3.** Selected genes down-regulated in tendril tip cells.

Gene number	Gene name	Product name	Tip vs. non-swarming fold change (log <sub>2</sub> )
<b>Adaptation, Protection</b>			
PA2147 <sup>1</sup>	<i>katE</i>	catalase HPII	-3.2
<b>Chemotaxis</b>			
PA1930 <sup>1</sup>	<i>mcpS</i>	probable chemotaxis transducer	-2.8
PA2788 <sup>2</sup>		probable chemotaxis transducer	-2.3
PA4915		probable chemotaxis transducer	-1.6
<b>Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers</b>			
PA1985	<i>pqqA</i>	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein A	-2.2
PA1986	<i>pqqB</i>	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein B	-1.9
PA1987	<i>pqqC</i>	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein C	-1.8
PA1988 <sup>2</sup>	<i>pqqD</i>	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein D	-2.2
PA1989	<i>pqqE</i>	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein E	-1.6
<b>Energy metabolism</b>			
PA0105 <sup>2</sup>	<i>coxB</i>	cytochrome c oxidase, subunit II	-2.9
PA0106 <sup>2</sup>	<i>coxA</i>	cytochrome c oxidase, subunit I	-2.7
PA0107 <sup>2</sup>		conserved hypothetical protein	-2.2
PA0108 <sup>2</sup>	<i>coIII</i>	cytochrome c oxidase, subunit III	-1.9
PA1175 <sup>2</sup>	<i>napD</i>	NapD protein of periplasmic nitrate reductase	-2.2
PA1177 <sup>2</sup>	<i>napE</i>	periplasmic nitrate reductase protein NapE	-2.3
PA1931		probable ferredoxin	-2.2
PA2153 <sup>2</sup>	<i>glgB</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme	-3.6
PA2165 <sup>2</sup>		probable glycogen synthase	-2.9
PA2290 <sup>2</sup>	<i>gcd</i>	glucose dehydrogenase	-1.6
PA3416		probable pyruvate dehydrogenase E1 component, beta chain	-1.9
PA3417		probable pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit	-1.6
PA5427	<i>adhA</i>	alcohol dehydrogenase	-2.2
<b>Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)</b>			
PA2570 <sup>2</sup>	<i>lecA</i>	LecA	-4.5
PA1148	<i>toxA</i>	exotoxin A precursor	-1.5
PA1245 <sup>2</sup>	<i>aprX</i>	Hypothetical protein	-2.5
PA1246 <sup>2</sup>	<i>aprD</i>	alkaline protease secretion protein AprD	-3.0
PA1247	<i>aprE</i>	alkaline protease secretion protein AprE	-1.6
PA1249	<i>aprA*</i>	alkaline metalloproteinase precursor	-1.4
PA1250 <sup>2</sup>	<i>aprI</i>	alkaline proteinase inhibitor AprI	-1.9
PA1871 <sup>2</sup>	<i>lasA</i>	LasA protease precursor	-3.2
PA2939 <sup>3</sup>	<i>pepB</i>	Aminopeptidase	-1.5
PA1130	<i>rhlC</i>	rhamnosyltransferase 2	-1.5
PA1131		probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	-1.6
PA3478	<i>rhlB</i>	rhamnosyltransferase 1	-2.3
PA3479 <sup>2</sup>	<i>rhlA</i>	HAA synthase	-2.0
PA2255 <sup>3</sup>	<i>pvcB</i>	paerucumarin biosynthesis protein PvcB	-1.7
PA2402	<i>pvdI</i>	non-ribosomal peptide synthase PvdI	-1.5
PA2406 <sup>3</sup>		hypothetical protein	-1.9

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

PA2408 <sup>3</sup>		probable ATP-binding component of ABC transporter	-1.7
PA2411 <sup>2</sup>		probable thioesterase	-1.7
PA2412 <sup>2</sup>		hypothetical protein	-1.6
PA2413 <sup>2</sup>	<i>pvdH</i>	L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase, PvdH	-2.0
PA2424 <sup>2</sup>	<i>pvdL</i>	Predicted non-ribosomal peptide synthetase PvdL	-2.3
PA2425	<i>pvdG</i>	Thioesterase PvdG	-1.8
PA4222	<i>pchl</i>	probable ATP-binding component of ABC transporter	-2.0
PA4223 <sup>2</sup>	<i>pchH</i>	probable ATP-binding component of ABC transporter	-2.0
PA4224 <sup>2</sup>	<i>pchG</i>	pyochelin biosynthesis protein PchG	-2.3
PA4225 <sup>2</sup>	<i>pchF</i>	pyochelin synthetase	-2.4
PA4226 <sup>2</sup>	<i>pchE</i>	dihydroaeruginic acid synthetase	-2.2
PA4228	<i>pchD</i>	pyochelin biosynthesis protein PchD	-1.7
PA4229 <sup>2</sup>	<i>pchC</i>	pyochelin biosynthetic protein PchC	-1.8
PA4230	<i>pchB</i>	salicylate biosynthesis protein PchB	-1.8
PA4231	<i>pchA</i>	salicylate biosynthesis isochorismate synthase	-1.8
<b>Transcription factors</b>			
PA2259	<i>ptxS</i>	transcriptional regulator PtxS	-2.0
PA0471	<i>fiuR</i>	Anti-sigma factor for Fiul	-1.9
PA0472	<i>fiul</i>	sigma-70 factor, ECF subfamily	-1.5
PA1300		sigma-70 factor, ECF subfamily	-1.9
PA2895		Anti-sigma factor for PA2896	-1.9
PA2896		sigma-70 factor, ECF subfamily	-1.8
PA1912		sigma-70 factor, ECF subfamily	-1.8
PA2312		probable transcriptional regulator	-1.7
PA5116		probable transcriptional regulator	-1.6
<b>Two-component regulatory systems</b>			
PA3346		probable two-component response regulator	-1.6
PA1243		probable sensor/response regulator hybrid	-2.2
PA2177		probable sensor/response regulator hybrid	-1.8

<sup>1</sup>: Genes down-regulated in tendrill tip vs. NS and down-regulated in swarm center vs. NS.

<sup>2</sup>: Genes down-regulated in tendrill tip vs. NS and down-regulated in tips vs. swarm center.

<sup>3</sup>: Genes down-regulated in tendrill tip vs. swarm center only.

\*:*aprA* was kept since it is part of a pertinent gene cluster found in our analysis.

### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

**Table 3.2.4.** Selected genes up-regulated in swarm center.

Gene number	Gene name	Product name	Swarm center vs. non-swarming fold change (log <sub>2</sub> )
<b>Adaptation, Protection</b>			
PA0140 <sup>1</sup>	<i>ahpF</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	4.5
PA0848 <sup>1</sup>		probable alkyl hydroperoxide reductase	5.4
PA0849 <sup>1</sup>	<i>trxB2</i>	thioredoxin reductase 2	3.7
PA3287 <sup>1</sup>		conserved hypothetical protein	4.7
PA4236 <sup>1</sup>	<i>katA</i>	catalase	3.4
PA4613 <sup>1</sup>	<i>katB</i>	catalase	4.4
<b>Energy metabolism</b>			
PA4133 <sup>2</sup>		cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)	1.6
<b>Hypothetical, unclassified, unknown</b>			
PA3237 <sup>1</sup>		hypothetical protein	5.4
PA3287 <sup>1</sup>		hypothetical protein	4.7
PA3519 <sup>1</sup>		hypothetical protein	3.6
PA3520 <sup>3</sup>		hypothetical protein	1.8
<b>Nucleotide biosynthesis and metabolism</b>			
PA5541 <sup>1</sup>	<i>pyrQ</i>	dihydroorotase	2.5
<b>Transcriptional regulators</b>			
PA4878 <sup>1</sup>		probable transcriptional regulator	3.7
<b>Transport of small molecules</b>			
PA2322	<i>gntT</i>	gluconate permease	2.0
PA3187 <sup>2</sup>	<i>gltK</i>	ATP-binding component of ABC transporter	2.6
PA3188 <sup>2</sup>	<i>gltG</i>	permease of ABC sugar transporter	3.1
PA3189	<i>gltF</i>	permease of ABC sugar transporter	2.5
PA3523 <sup>1</sup>	<i>mexP</i>	probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein precursor	4.2
PA3920 <sup>1</sup>	<i>cueA</i>	copper homeostasis P-type ATPase	2.6
PA5082		probable binding protein component of ABC transporter	1.5

<sup>1</sup>: Genes up-regulated in swarm center vs. NS and up-regulated in swarm center vs. tendril tip.

<sup>2</sup>: Genes up-regulated in swarm center vs. NS and up-regulated in tendril tip vs. NS (Table 3.2.1).

<sup>3</sup>: Gene up-regulated in swarm center vs. tendril tip only.



### 3.2 Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*

**Table 3.2.5.** Genes used for microarray validation with qRT-PCR.

Gene number	Gene name	Product name	MA fold change (log <sub>2</sub> )		qRT-PCR fold change (log <sub>2</sub> )	
			Center vs. non-swarming	Tip vs. non-swarming	Center vs. non-swarming	Tip vs. non-swarming
PA0140	<i>aphF</i>	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	<sup>A</sup> 4.5	<sup>B</sup> 1.0	<sup>A</sup> 4.7	<sup>B</sup> 0.7
PA1130	<i>rhlC</i>	rhamnosyltransferase 2	<sup>C</sup> -0.5	<sup>D</sup> -1.5	<sup>C</sup> -0.4	<sup>D</sup> -2.1
PA1553	<i>ccoO1</i>	probable cytochrome c oxidase subunit	<sup>E</sup> 0.7	<sup>F</sup> 2.1	<sup>E</sup> 0.7	<sup>F</sup> 1.9
PA2158		probable alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)	<sup>G</sup> -1.7	<sup>H</sup> -4.4	<sup>G</sup> -1.5	<sup>H</sup> -4.7
PA2570	<i>lecA</i>	LecA	<sup>I</sup> -2.0	<sup>J</sup> -4.5	<sup>I</sup> -1.5	<sup>J</sup> -4.3
PA3187		probable ATP-binding component of ABC transporter	<sup>K</sup> 2.6	<sup>L</sup> 1.5	<sup>K</sup> 2.9	<sup>L</sup> 1.8
PA3478	<i>rhlB</i>	rhamnosyltransferase chain B	<sup>M</sup> -0.9	<sup>N</sup> -2.3	<sup>M</sup> -1.4	<sup>N</sup> -2.9
PA5540		Hypothetical protein	<sup>O</sup> 2.0	<sup>P</sup> 0.5	<sup>O</sup> 2.9	<sup>P</sup> 1.0

Letters for each value refer to the corresponding points in figure 3.2.2.

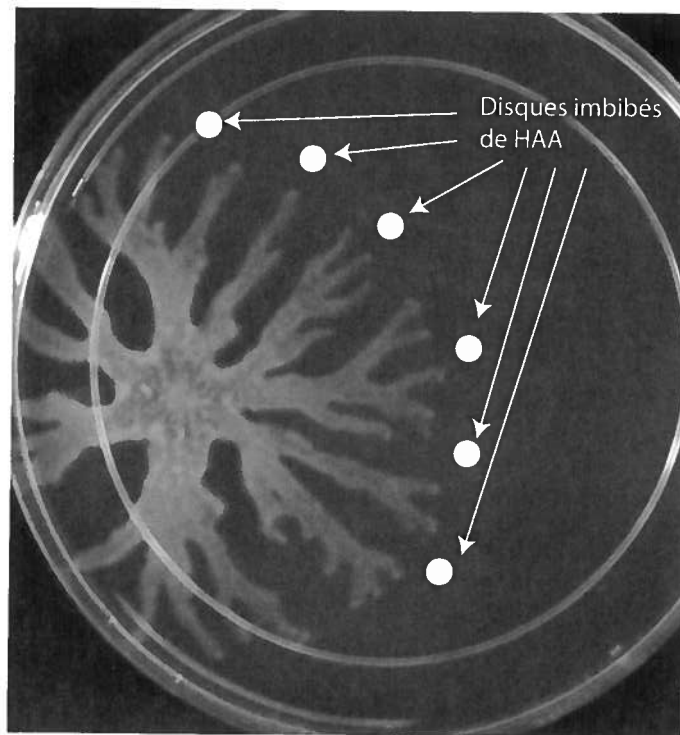
## 3.3 - Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming

### 3.3.1 - Condition HAA

En plus d'établir les profils transcriptomiques des conditions décrites dans l'article présenté à la section 3.2.4 (extrémité de dendrite, centre de *swarming* et non-*swarming*), une condition supplémentaire a été effectuée. Rappelons que nous avons précédemment démontré que les HAA repoussent des dendrites en *swarming* et inhibent ce type de motilité (voir section 1.4.8.2). Le mécanisme responsable de ce comportement reste indéterminé. Une expérience a donc été conçue pour déterminer quels gènes sont différentiellement exprimés chez des populations d'extrémité de dendrites exposés à des HAA exogènes.

Pour cette condition, le profil transcriptomique de populations de bactéries situées à l'extrémité de dendrites soumis à un ajout exogène de HAA pour une période de 15 minutes a été établi, tel que décrit dans (Tremblay & Deziel, 2010). Brièvement, des géloses *swarming* ont été préparées dans des boîtes de Petri de 150 mm de diamètre, inoculées avec 5  $\mu$ L de suspension bactérienne à  $DO_{600}=3.0$  et incubées à 30°C. Le lendemain, 25  $\mu$ L d'un extrait pur de HAA concentré à 6 mg/mL a été déposé sur disque de papier stérile de 6 mm de diamètre (BD). Trois de ces disques imbibés de HAA ont été par la suite été distribués sur une gélose *swarming* à environ 1 cm des extrémités de dendrites en migration (Fig. 3.3.1). Quinze minutes plus tard, les dendrites étaient récoltées avec du RNALater (Qiagen) tel que décrit (Tremblay & Deziel, 2010). Environ une dizaine de dendrites/gélose ont été récoltées en procédant ainsi (voir section 3.2.4.3).

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming



**Figure 3.3.1.** *Design* expérimental de la condition HAA.

Les gènes différenciellement exprimés dans cette condition vs la condition extrémité de dendrite sont décrits dans le tableau 3.3.1. Les quelques mutants disponibles dans ces gènes dans la banque de mutant PA14NR ont été testés pour le *swarming*, mais aucun d'entre eux ne présentait de différence phénotypique avec la souche sauvage. De plus, les dendrites *swarming* produites par ces mutants ont toutes conservé leur capacité à éviter un disque de papier imbibé de HAA sur gélose *swarming*.

Suite au peu d'information fournie par ce volet du projet d'établir le transcriptome d'une colonie en *swarming* de *P. aeruginosa*, aucune autre investigation n'a été effectuée. Le phénomène d'évitement de dendrite en *swarming* est discuté dans la section conclusion de cette thèse.

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en *swarming*

**Tableau 3.3.1.** Gènes différentiellement exprimés dans la condition HAA vs extrémité de dendrite.

#Gène	Nom du gène	Produit	Changement d'expression ( $\log_2$ )
PA1715	<i>pscB</i>	Protéine d'appareil d'exportation de type III	-1.9
PA2110*		Protéine hypothétique	-1.5
PA2111		Protéine hypothétique	-1.7
PA2112		Protéine hypothétique	-1.7
PA2166		Protéine hypothétique	1.5
PA2840*	<i>deaD</i>	Hélicase d'ARN dépendante de l'ATP probable	-1.6
PA2964	<i>pabC</i>	Lyase 4-amino-4-déoxychorismate	-1.6
PA3330		Déhydrogénase à courte chaîne probable	-1.5
PA3442	<i>ycbR, ssuB</i>	Parti probable d'un transporteur ABC responsable de la liaison de l'ATP	-1.4
PA3443*	<i>ycbM, ssuC</i>	Perméase probable de transporteur ABC	-1.7
PA3444*	<i>ssuD</i>	Protéine hypothétique	-1.8
PA3651	<i>cdsA</i>	Phosphatidate cytidyltransférase	-1.5
PA4889		Oxidoréductase probable	-1.5

\*Mutant dans le gène correspondant disponible dans la banque de mutant PA14NR.

#### 3.3.2 - Criblage *swarming*

Les gènes rapportés comme étant différentiellement exprimés dans une colonie *swarming* de *P. aeruginosa* vs une colonie non-*swarming* (section 3.2) ont été investigués par un criblage à l'aide de mutants ayant une insertion transpositionnelle dans ces gènes (Banque PA14NR). Au total, 347 gènes étaient rapportés comme étant différentiellement exprimés (Tableaux 3.2.1). Cependant, des mutants dans seulement 246 de ces gènes étaient disponibles de la banque PA14NR (Liberati *et al.*, 2006), ce qui donne une couverture de 71%. Les tableaux 3.3.2 et 3.3.3 identifient respectivement les mutants disponibles et non disponibles. Ceux disponibles ont tous été testés en triplicats pour la motilité *swarming* et quelques-uns d'entre eux seulement présentaient une différence phénotypique avec le *swarming* de la souche sauvage (identifiés en caractère gras dans le tableau 3.3.2). Le contexte génomique et la position de l'insertion transpositionnelle de chacun des mutants affectés dans le *swarming* sont illustrés à la figure 3.3.2.

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming

**Tableau 3.3.2.** Mutants dans les gènes différentiellement exprimés dans une colonie *swarming* disponibles dans la banque PA14NR.

#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène
PA0105	PA1070	PA1875	PA2416	PA3231	PA3819	PA4275	PA4928	PA5550
PA0106	PA1111	PA1876	PA2423	PA3235	PA3821	PA4311	PA5027	<b>PA5555</b> <sup>2</sup>
PA0107	PA1148	PA1888	PA2425	PA3273	PA3888	PA4312	PA5046	PA5558
PA0108	PA1168	PA1894	PA2427	PA3274	PA3889	PA4345	<b>PA5049</b> <sup>1</sup>	PA5560
PA0109	PA1177	PA1897	PA2443	PA3318	PA3890	PA4352	PA5061	<b>PA5561</b> <sup>1</sup>
PA0198	PA1190	PA1912	PA2445	<b>PA3346</b> <sup>3</sup>	PA3919	PA4394	PA5082	PA5568
PA0250	PA1192	PA1914	PA2485	<b>PA3347</b> <sup>2</sup>	PA3920	PA4429	PA5100	
PA0252	PA1242	PA1921	PA2486	PA3405	PA3922	PA4430	PA5116	
PA0293	PA1243	PA1930	PA2504	PA3406	PA3923	PA4438	PA5139	
PA0332	PA1245	PA1932	PA2570	PA3407	PA3967	PA4467	PA5150	
PA0355	PA1247	PA1986	PA2708	<b>PA3416</b> <sup>1</sup>	PA3979	PA4573	PA5171	
PA0390	PA1250	PA1987	PA2717	PA3417	PA3986	<b>PA4607</b> <sup>2</sup>	PA5172	
PA0446	PA1337	PA1989	PA2746	PA3418	PA4064	PA4611	PA5192	
PA0447	PA1338	PA2001	PA2773	PA3451	PA4065	PA4616	PA5286	
PA0459	PA1350	PA2024	PA2780	PA3459	PA4066	PA4628	PA5312	
PA0472	PA1408	PA2033	PA2788	PA3460	PA4131	PA4629	PA5313	
PA0579	PA1552	PA2062	PA2815	PA3461	PA4133	PA4657	<b>PA5359</b> <sup>1</sup>	
PA0654	PA1553	PA2083	PA2843	PA3478	PA4140	PA4673	PA5404	
PA0668	PA1554	PA2088	PA2895	PA3479	PA4171	<b>PA4748</b> <sup>1</sup>	PA5427	
PA0745	PA1597	PA2095	PA2896	PA3519	PA4172	PA4770	PA5460	
PA0746	PA1708	PA2244	PA2915	PA3523	PA4219	PA4782	PA5475	
PA0781	PA1728	PA2259	PA2927	PA3531	PA4220	PA4834	PA5479	
PA0782	PA1730	PA2290	PA2937	PA3569	PA4222	PA4837	PA5530	
PA0783	PA1731	PA2300	PA2971	PA3570	PA4223	PA4838	PA5535	
<b>PA0792</b> <sup>1</sup>	PA1732	PA2312	PA3023	PA3690	PA4225	PA4877	PA5536	
PA0793	PA1733	PA2322	PA3049	PA3734	PA4226	PA4878	PA5538	
PA0810	PA1746	PA2377	PA3123	PA3742	PA4228	PA4895	PA5539	
PA0848	PA1757	PA2413	PA3182	PA3743	PA4229	PA4915	PA5540	
PA0849	PA1784	PA2414	PA3188	PA3784	PA4230	<b>PA4916</b> <sup>1</sup>	PA5541	
PA0955	PA1871	PA2415	PA3189	PA3788	PA4231	PA4925	PA5546	

<sup>1</sup> : Mutants inhibés dans le *swarming*

<sup>2</sup> : Mutants diminués dans le *swarming*

<sup>3</sup> : *Hyperswarmer*

Pour certains mutants par insertion transpositionnelle de la banque PA14NR, le phénotype *swarming* n'est pas entièrement reproductible d'un essai à l'autre. Des investigations additionnelles devraient être effectuées avant de confirmer que ce mutant est bel et bien un *hyperswarmer*.

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en *swarming*

Tableau 3.3.3. Mutants dans les gènes différentiellement exprimés dans une colonie *swarming* non-disponibles dans la banque PA14NR.

#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène	#Gène
PA0200	PA1300	PA2030	PA2155	PA2249	PA2851	PA3741	PA4432	PA5554
PA0449	PA1344	PA2034	PA2158	PA2260	PA2868	PA3744	PA4479	PA5556
PA0471	PA1349	PA2134	PA2159	PA2375	PA2943	PA3745	PA4480	PA5557
PA0578	PA1404	PA2136	PA2161	PA2381	PA3041	PA3796	PA4567	PA5559
PA0743	PA1414	PA2139	PA2162	PA2412	PA3187	PA3820	PA4577	
PA0744	PA1874	PA2143	PA2169	PA2433	PA3263	PA3846	PA4672	
PA0961	PA1895	PA2145	PA2173	PA2446	PA3287	PA4134	PA4762	
PA0990	PA1931	PA2146	PA2175	PA2452	PA3520	PA4139	PA4786	
PA1130	PA1933	PA2148	PA2176	PA2566	PA3572	PA4218	PA5403	
PA1175	PA1985	PA2149	PA2180	PA2606	PA3600	PA4224	PA5409	
PA1246	PA1988	PA2151	PA2181	PA2619	PA3655	PA4255	PA5553	

Les mutants affectés dans ce type de motilité ont par la suite été testés pour les deux phénotypes connus pour être nécessaires au *swarming*, soit la production de rhamnolipides et la présence d'un flagelle fonctionnel. La production de rhamnolipides a été déterminée à l'aide des géloses bleues SW (Siegmund & Wagner, 1991). Dans ce test, 5  $\mu$ L d'une suspension de bactéries à  $OD_{600}=3,0$  ont été déposés à la surface d'une gélose contenant entre autre du CTAB et du bleu de méthylène. Les surfactants anioniques produits par les bactéries forment alors une paire ionique insoluble avec le surfactant cationique CTAB et le colorant, ce qui résulte en la formation d'un halo translucide autour des colonies bactériennes. La présence ou absence d'un halo signifie que des rhamnolipides sont respectivement produits ou absents. Les autres phénotypes rapportés (tableau 3.3.4 et figure 3.3.3) (motilité *swimming*, fixation du rouge Congo, mortalité de drosophiles, formation de biofilms et courbes de croissances) ont été investigués tel que rapporté à la partie méthodologie du chapitre 3.3 (section 3.4.3).

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming

**Tableau 3.3.4.** Phénotypes des mutants affectés dans le *swarming*.

#Gène inactivé*	Nom du gène	Opéron**	Diamètre de motilité <i>swimming</i> (%WT) <sup>1</sup>	Production de rhamnolipides <sup>2</sup>	Produit
PA0792	<i>prpD</i>	-	53 ± 4.0	+	Protéine catabolique du propionate PrpD Composante E1, chaîne chaîne β, d'une pyruvate déhydrogénase probable Régulateur de réponse à deux composants probable
PA3416 <sup>3</sup>		PA3417-15	105 ± 3.6	+	
PA3346 <sup>3</sup>		PA3347-45	105 ± 2.7	+	
PA3347 <sup>3</sup>	-	PA3347-45	101 ± 3.6	+	Protéine hypothétique
PA4607			47 ± 6.8	+	
PA4748	<i>tpiA</i>	PA4751-47	92 ± 2.7	-	isomerase triosephosphate
PA4916 <sup>3</sup>		PA4917-16	74 ± 4.7	+	
PA5049 <sup>3</sup>	<i>rpmE</i>	PA5049-47	74 ± 4.4	+	ADP-ribose pyrophosphatase putative Protéine ribosomale L31 de la sous-unité 50S
PA5359		-	37 ± 2.5	+	
PA5555	<i>atpG</i>	PA5561-53	39 ± 3.2	+	ATP synthase chaîne gamma
PA5561 <sup>3</sup>	<i>atpI</i>	PA5561-53	71 ± 3.1	+	ATP synthase, protéine I

<sup>1</sup>: Test de motilité *swimming* effectué avec du milieu LB solidifié avec 0.25% d'agar. Le milieu LB est favorisé pour les tests de *swimming*, car il prévient la formation de dendrites typiquement observés en milieu *swimming* M9DCAA.

<sup>2</sup>: Production de rhamnolipides déterminée à l'aide du test de Siegmund-Wagner (Siegmund & Wagner, 1991)

<sup>3</sup>: Mutants ayant conservé une capacité de motilité *swimming* supérieure à 70% et produisant des rhamnolipides. Tous les tests phénotypiques ont été effectués au moins en triplicata.

\* : Identification des mutants dans la banque PA14NR (No ID unique):

PA0792 → 29528

PA3416 → 14566

PA3346 → 31270

PA3347 → 39911

PA4607 → 28537

PA4748 → 56206

PA4916 → 45540

PA5049 → 32561

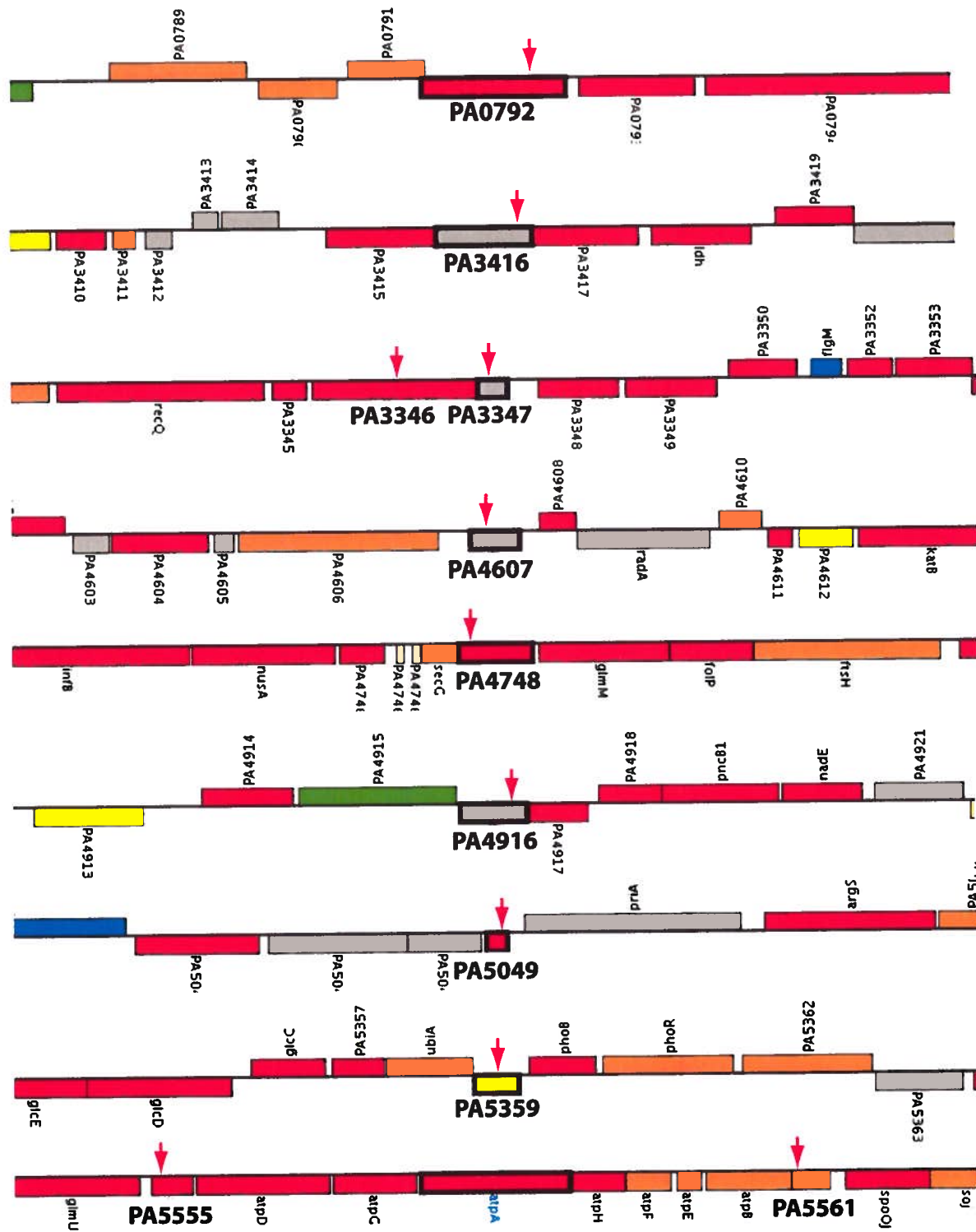
PA5359 → 39416

PA5555 → 32597

PA5561 → 45399

\*\* : Opérons prédits (Brouwer *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2009). L'opéron PA3347-45 a été démontré expérimentalement (Hsu *et al.*, 2008).

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming



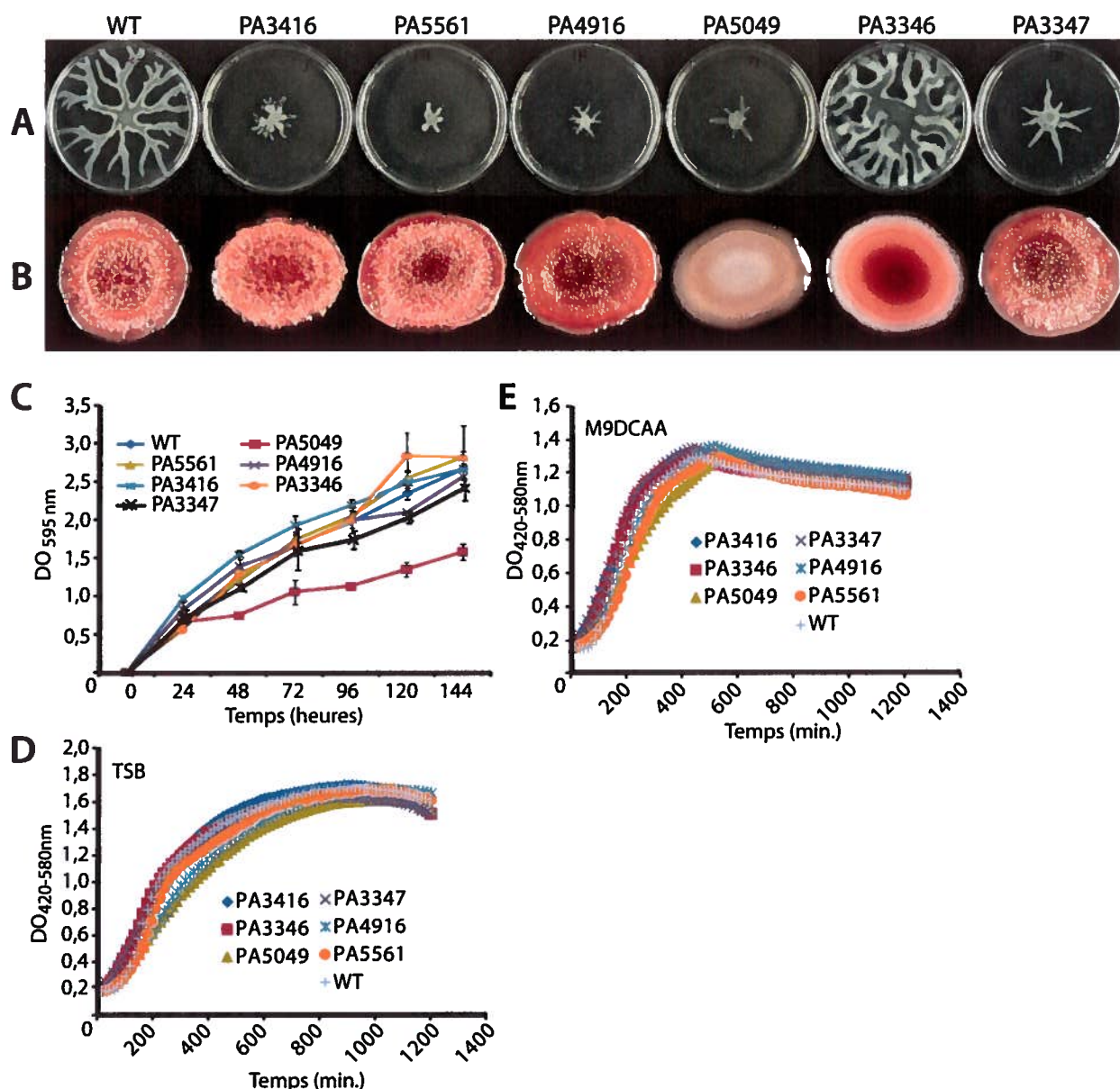
**Figure 3.3.2.** Contexte génomique des transposons rapportés au tableau 3.3.4. Une flèche rouge indique la position d'insertion du transposon. Les gènes dont la position est en dessous de l'axe horizontal sont dans le sens 3' → 5' et ceux vers par dessus dans le sens 5' → 3'.



### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en *swarming*

Le tableau 3.3.4 montre que mis à part le mutant PA3416<sup>-</sup> et PA3347<sup>-</sup>, toutes les souches déficientes dans le *swarming* sont aussi déficientes soit dans la synthèse de rhamnolipides ou soit dans la motilité de type *swimming*. Les mutants PA3416<sup>-</sup>, PA5049<sup>-</sup>, PA4916<sup>-</sup>, PA5561<sup>-</sup>, PA3346<sup>-</sup>, et PA3347<sup>-</sup> ont été sélectionnés pour de plus amples investigations à cause de leur capacité à synthétiser des rhamnolipides et à cause qu'ils conservaient un diamètre de motilité *swimming* supérieur au seuil arbitraire de 70%. Il est important de souligner ici qu'une diminution de 30% de la motilité *swimming* pourrait être symptomatique d'un flagelle qui n'est pas tout à fait opérationnel ou d'un défaut dans le chimiotactisme, ce qui pourrait expliquer pourquoi le *swarming* est déficient chez ces souches. L'investigation de plusieurs autres phénotypes est rapportée à la figure 3.3.3.

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming



**Figure 3.3.3.** Phénotypes de mutants affectés dans la motilité de type *swarming*. Phénotypes de A) *swarming*, B) fixation de rouge Congo, C) formation de biofilms en milieu statique, D-E) croissance en milieu TSB et M9DCAA respectivement. La méthodologie des tests phénotypique présentés dans cette figure est disponible à la section 3.4.3.

Les mutants PA3416<sup>-</sup>, PA5049<sup>-</sup>, PA4916<sup>-</sup> et PA5561<sup>-</sup> sont tous fortement diminués dans la motilité de type *swarming* (Fig. 3.3.3A), mais conservent tous la capacité de former des excroissances rappelant des dendrites en migration. PA3347<sup>-</sup> est dans une moindre mesure également diminué dans le *swarming*. Le mutant PA3346<sup>-</sup> affiche plutôt un phénotype *hyperswarming* aussi observé par d'autres (Hsu *et al.*, 2008). La fixation de rouge Congo et la

### **3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en *swarming***

formation d'une structure rugueuse par les bactéries sont associées à la sécrétion d'exopolysaccharides et donc à la formation de biofilms robustes, notamment à cause de l'expression des gènes *pelA-G* (Branda *et al.*, 2005). Ce phénotype, de même que la formation de biofilms en milieu statique (Fig.3.3.3C) a été investigué car plusieurs articles récents suggèrent une relation inverse entre la motilité *swarming* et la formation de biofilms (Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007; Yeung *et al.*, 2011). Les résultats de la figure 3.3.3B montrent que tous les mutants testés produisent des colonies rouges et rugueuses à l'exception du mutant PA5049<sup>-</sup>. La souche PA3346<sup>-</sup> quant à elle est capable de fixer le rouge Congo, mais présente un phénotype lisse. Au meilleur de nos connaissances, un tel phénotype n'a jamais été rapporté dans la littérature. La capacité d'adhésion de surface (Fig. 3.3.3C) montre que seul le mutant PA5049<sup>-</sup> est altéré dans ce phénotype. La figure 3.3.3D-E montre que le mutant PA5049<sup>-</sup> de même que PA4916<sup>-</sup> présentent une croissance légèrement inférieure à la souche sauvage en milieux TSB et M9DCAA durant la phase exponentielle. En général, aucune souche ne présente de défaut majeur dans la croissance.

#### **3.3.2.1 - Mutants inhibés dans le *swarming***

Plusieurs mutants dans les gènes du tableau 3.3.4 sont inhibés dans le *swarming*, mais aussi dans la motilité *swimming* (PA0792<sup>-</sup>, PA4607<sup>-</sup>, PA5555<sup>-</sup>, PA5359<sup>-</sup>) ou dans la synthèse de RL (PA4748<sup>-</sup>). Mis à part ces phénotypes, ces souches n'ont pas été investiguées davantage, notamment à cause de la probabilité que l'inhibition du *swarming* soit causée par un défaut dans un de ces deux phénotypes. Le rôle de ces gènes est discuté ci-dessous.

PA0792 (*prpD*) code pour une 2-méthylcitrate déshydratase, enzyme impliquée dans le catabolisme du propionate (Horswill & Escalante-Semerena, 2001). Chez *Salmonella*, le 2-méthylcitrate est un catabolite toxique (Horswill *et al.*, 2001) et inhibe la glucogénèse (Rocco & Escalante-Semerena, 2010). Il est possible que le phénotype non-*swarming* et non-*swimming* du mutant PA0792 soit causé par un défaut de croissance causé par l'effet toxique du 2-méthylcitrate.

PA4607 code pour une protéine hypothétique. PA4607<sup>-</sup> est inhibé dans le *swarming* et *swimming*, mais présente une production de RL normale. Ce gène est sous-exprimé dans

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming

l'extrémité de dendrite comparé aux conditions centre de *swarming* et non-*swarming* (tableau 3.2.7. Annexe 6.5). C'est un gène rapporté comme étant surexprimé en condition de biofilms comparé à des cellules planctoniques chez une souche clinique de *P. aeruginosa* (Manos *et al.*, 2008). Il est aussi surexprimé chez un mutant *psrA*<sup>-</sup>. Ce gène code pour un régulateur transcriptionnel d'enzymes impliqués dans la dégradation d'acides gras (Kang *et al.*, 2008) et est sous-exprimé suite à une exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Salunkhe *et al.*, 2005). Son expression est aussi contrôlée par le régulateur transcriptionnel AlgR (Lizewski *et al.*, 2004), impliqué dans la production d'alginate (Deretic *et al.*, 1987). La raison pourquoi ce gène est impliqué dans la motilité de type *swimming* reste à déterminer. Logiquement, la régulation à la baisse de ce gène à l'extrémité de dendrites laisse croire qu'il n'est pas nécessaire à la formation de dendrites, ce qui n'est visiblement pas le cas.

PA5359 code pour une protéine hypothétique contenant un motif Y-X4-D typiquement présent chez des lipoprotéines (Yeats *et al.*, 2003).

PA4748, un gène sous-exprimé au centre d'une colonie en *swarming*, code pour une triosephosphate isomérase (Mainfroid *et al.*, 1993; Garza-Ramos *et al.*, 1996). Cette enzyme joue un rôle dans le métabolisme des carbohydrates. PA4748 est régulé à la baisse suite à une exposition au pentachlorophénol (Muller *et al.*, 2007). Un mutant PA4748 est moins susceptible aux  $\beta$ -lactames (Alvarez-Ortega *et al.*, 2010). La cause de l'inhibition de synthèse de rhamnolipides chez ce mutant demeure obscure et pourrait être due à un défaut métabolique dans la voie de synthèse des rhamnolipides.

PA5555 code pour la sous-unité gamma du complexe de l'ATP synthase. Un mutant dans ce gène n'est pas affecté dans la synthèse de RL, mais est déficient dans le *swarming* et *swimming*. Cela peut être attribuable au fait qu'une mutation dans ce gène résulte en la synthèse d'un complexe ATP synthase non-fonctionnel et donc en un déficit énergétique pour les bactéries. PA5561<sup>-</sup> est aussi inhibé dans le *swarming*, mais produit un diamètre de motilité *swimming* plus élevé que PA5555<sup>-</sup>. Selon la figure 3.3.2, PA5555 est le dernier gène de l'opéron codant pour l'ATP synthase. Logiquement, selon le contexte génomique, un mutant PA5561<sup>-</sup> (au début de l'opéron) devrait résulter en l'inhibition complète de la production d'un complexe ATP synthase fonctionnel. Il est permis d'émettre l'hypothèse qu'un mutant PA5555<sup>-</sup> (dernier gène

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en *swarming*

de l'opéron) puisse produire une ATP synthase partiellement fonctionnelle, donc de produire tout de même une certaine quantité d'ATP. On peut aussi spéculer qu'un complexe ATP synthase chimérique (mutant PA5555<sup>-</sup>) puisse être néfaste pour la production d'énergie et donc à la propulsion du flagelle. Il est toutefois difficile d'interpréter le fait que les mutants PA5558<sup>-</sup>, PA5560<sup>-</sup> et PA5568<sup>-</sup> (même opéron) ne présentent pas de défaut dans le *swarming*.

Les gènes PA5049 et PA4916 sont inhibés dans le *swarming*, mais présentent un diamètre de motilité *swimming* supérieur au seuil arbitraire de 70%. PA5049 code pour la protéine ribosomale L31 de la sous-unité 50S. La surexpression de protéines ribosomales peut être associée à un taux élevé de synthèse protéique tel que discuté à la section 3.2.4.4.3. Plusieurs gènes codant pour des protéines ribosomales sont surexprimés dans les populations d'extrémité de dendrites (*i.e.* PA0579, PA3742, PA4255, PA4432, PA4567 et PA5049). Des mutants PA0579<sup>-</sup> et PA3742<sup>-</sup> étaient disponibles dans la banque de mutant PA14NR, mais ne présentaient pas de différence dans leur phénotype *swarming* comparé à la souche sauvage. La cause des défauts de *swarming* et de production de biofilms du mutant PA5049<sup>-</sup> pourrait être reliée au léger défaut de croissance observé chez cette souche (Fig. 3.3.2).

PA4916, un gène sous-exprimé à l'extrémité d'une dendrite, code pour une ADP-ribose pyrophosphatase putative et fait partie de l'opéron PA4917-16. Étant donné que la valeur de changement d'expression du gène PA4917 (premier gène de l'opéron; Fig. 3.3.2) était sous le seuil de 1,5 log<sub>2</sub>, il n'a pas été pris en considération pour cette étude transcriptomique. Cette enzyme fait partie d'une famille de protéine (Nudix) impliquée dans le « nettoyage » de métabolites toxiques (Bessman *et al.*, 1996) comprenant l'ADP-ribose, un produit potentiellement nocif provenant du catabolisme du NAD (Dunn *et al.*, 1999; Gabelli *et al.*, 2002; McLennan, 2006).

Considérant les résultats du tableau 3.3.4 et de la figure 3.3.3, seul le mutant PA3416<sup>-</sup> est diminué dans la motilité *swarming* sans être significativement affecté dans les autres phénotypes étudiés. Ce gène est prédit pour coder pour une chaîne β d'une pyruvate dehydrogenase E1 probable. Cette enzyme fait partie du complexe pyruvate déhydrogénase qui contribue à transformer le pyruvate en acétyl-CoA par un processus appelé décarboxylation du pyruvate. L'acétyl-CoA peut ensuite être utilisé dans le cycle de l'acide citrique pour la

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming

respiration cellulaire (Denniston *et al.*, 2007). La formation de dendrites de *swarming* est un processus qui semble nécessiter beaucoup d'énergie pour avoir lieu (Tremblay & Deziel, 2010). Considérant cela, il est logique qu'un mutant incapable de convertir le pyruvate en acétyl-CoA, donc théoriquement déficient dans la production d'énergie, soit incapable de former de véritables dendrites de *swarming*. Cependant des courbes de croissance en culture liquide ne montrent pas de défaut de croissance (Fig. 3.3.3D-E). PA3416 est le deuxième gène de l'opéron PA3417-15. Un mutant PA3417<sup>-</sup> ne montre pas de défaut dans le *swarming*. Étant donné que ce gène est le premier de l'opéron PA3417-15 (Fig. 3.3.2), il aurait été attendu qu'il présente un phénotype semblable à celui de PA3416<sup>-</sup>. Cet opéron est régulé à la baisse chez les bactéries d'extrémité de dendrites vs non-*swarming*. Notez que la valeur de changement d'expression de PA3415 était inférieure au seuil arbitraire de 1,5 log<sub>2</sub> et n'a pas été retenue dans l'article rapporté à la section 3.2. Logiquement, il aurait été attendu que des mutants dans des gènes régulés à la baisse aux extrémités de dendrites ne soient pas affectés dans la formation de dendrites. Les résultats suggèrent que même si ce gène n'est pas régulé à la hausse chez aux extrémités de dendrites, leur présence est en fait essentielle au développement normal d'une colonie *swarming*. La nature de la mutation de la souche PA3416<sup>-</sup> n'a toutefois pu être identifiée à cause de difficultés techniques.

PA3346 et PA3347 font partie d'une voie de signalisation impliquée dans la formation de biofilms et motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* (Hsu *et al.*, 2008; Bordi *et al.*, 2010). Il a été proposé que dans ce système, la protéine codée par PA3345 (HptB) soit phosphorylée suite à un stress environnemental, puis phosphoryle à son tour PA3346 qui lorsque dans cet état, agit en tant que phosphatase contrôlant l'expression de certains gènes (Hsu *et al.*, 2008). Ce groupe a aussi rapporté le phénotype *hyperswarmer* d'un mutant PA3346<sup>-</sup> et dans une moindre mesure de PA3347<sup>-</sup>. Ceci est contraire à nos résultats (Fig. 3.3.3A) qui montrent plutôt une diminution du *swarming* chez cette souche (PA3347<sup>-</sup>). Bordi et collègues (2009) ont aussi observé que HptB exerce un effet sur l'activité des protéines codées par PA3346-47 (Bordi *et al.*, 2010). Cette voie de signalisation est abordée plus en détail à la section 3.4. Ces deux gènes sont surexprimés aux extrémités de dendrites et les différents phénotypes

### 3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en *swarming*

*swarming* opposés (*hyperswarmer* pour PA3346 et *swarming* réduit pour PA3347) demeurent difficiles à expliquer.

Parmi les 35 mutants disponibles dans les gènes surexprimés en extrémité de dendrite, seulement quatre d'entre eux ont un défaut dans le *swarming*. Très peu de gènes sont donc essentiels au *swarming* parmi ceux régulés à la hausse et plus généralement parmi ceux différenciellement régulés dans ce type de motilité. De manière consistante, aucun des gènes différenciellement exprimés dans le transcriptome d'une colonie en *swarming* n'a été rapporté pour être essentiel à ce type de motilité chez plusieurs études (Potvin *et al.*, 2003; Overhage *et al.*, 2007; Tremblay, 2007). La seule publication où sont rapportés des mutants de *P. aeruginosa* dans des gènes présentés ici (transcriptome *swarming*) est celle de Yeung *et al.*, (2010). Ils ont en effet observé que des mutants dans les gènes PA0848, PA1070, PA1554, PA2413, PA2423, PA4223, PA4607, PA4616, PA4916, PA5536 font peu ou pas de *swarming*. Nos résultats divergent largement, car seuls les mutants PA4607<sup>-</sup> et PA4916<sup>-</sup> présentent un défaut de *swarming* selon notre criblage. Étant donné que les souches mutantes utilisées par nos deux groupes proviennent de la même source (Liberati *et al.*, 2006), la différence entre les milieux de culture utilisés (BM2 vs M9) et aussi la différence entre les protocoles de préparation de géloses *swarming* sont probablement en cause dans les différences observées. Dans l'étude de Yeung *et al.*, (2010), le criblage primaire s'effectuait dans des plaques de 96 puits remplies d'agar. Étant donné le caractère sensible des géloses *swarming* (Tremblay & Deziel, 2008), il est possible que le diamètre minuscule d'un puits d'une plaque de 96 puits puisse interférer avec la distinction efficace de mutants inhibés ou non dans le *swarming*.

Finalement, il est ardu de réconcilier le fait que l'immense majorité des mutants dans des gènes régulés à la hausse chez les populations des extrémités de dendrites ne présentent pas de défaut dans le *swarming*. Cela indique vraisemblablement que la surexpression de gènes dans une colonie en *swarming* ne signifie pas que ces gènes soient essentiels à ce phénomène. Un exemple pertinent de ce concept est que l'unique flagelle polaire de *P. aeruginosa* est essentiel au *swarming* sans toutefois être surexprimé dans ces conditions (Tremblay & Deziel, 2010). De plus, il est important de réaliser le fait qu'un gène régulé à la baisse à l'extrémité des dendrites par rapport au centre de *swarming* signifie aussi, selon un autre point de vue, que ce

### **3.3 Données complémentaires au transcriptome d'une colonie en swarming**

gène est en fait surexprimé chez cette population du centre (par exemple, PA4916). Conséquemment, il est probable qu'un tel gène soit essentiel au maintien de la dynamique de formation d'une colonie *swarming*; un mutant dans ce type de gène peut donc entraîner une perte de *swarming*.



## 3.4 - Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

### 3.4.1 - Résumé

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram(-) responsable d'infections nosocomiales et d'infections chroniques chez les individus atteints de la fibrose kystique. Ce microorganisme est capable d'un type de motilité appelé *swarming* qui consiste en un déplacement rapide et coordonné d'une population bactérienne sur une surface semi-solide. Mis à part un flagelle fonctionnel et la production d'un biosurfactant composé de HAA et de rhamnolipides, peu de facteurs spécifiques uniquement à ce type de motilité sont connus. La molécule intracellulaire di-GMP cyclique est aussi impliquée dans le *swarming* et de manière plus complexe, dans une relation inverse entre ce type de motilité et la formation de biofilms (Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2010; Merritt *et al.*, 2010). Les régulateurs transcriptionnels MetR et CbrA ont récemment été proposés comme étant spécifiques au *swarming*, des mutants dans ces gènes n'étant pas ou très peu affectés dans la synthèse de rhamnolipides et dans la motilité de type *swimming*. Notons cependant que deux récents articles suggèrent que des gènes codant pour des éléments d'un système à deux composantes (2CS) hybride impliquant HptB jouent un rôle dans la motilité *swarming* (Hsu *et al.*, 2008; Tremblay & Deziel, 2010). Dans le but de mieux comprendre le rôle de HptB sur le *swarming*, un profilage transcriptomique d'une souche  $\Delta hptB$  a été effectué par biopuces (Affymetrix). Les résultats montrent qu'une inactivation de *hptB* entraîne une surexpression de gènes associés au système de sécrétion de type VI (SST6) et rend les bactéries insensibles aux rhamnolipides.

### **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

---

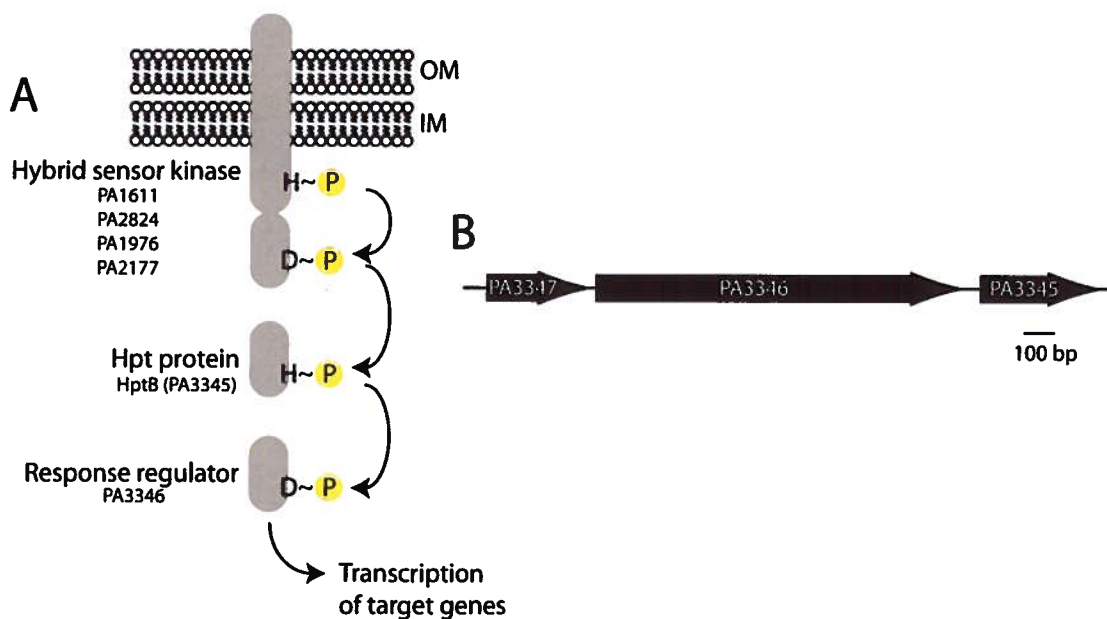
#### **3.4.2 - Introduction**

*Pseudomonas aeruginosa*, un bâtonnet à Gram(-), est une des espèces les plus étudiées dans le domaine de la multicellularité bactérienne. C'est un pathogène opportuniste répandu qui est l'une des premières causes d'infections nosocomiales. Plusieurs espèces dont *P. aeruginosa*, sont capables de motilité de type *swarming*, une forme de translocation rapide (2 à 10  $\mu\text{m}/\text{sec.}$ ) et coordonnée d'une population bactérienne sur une surface, qui résulte habituellement en la formation de colonies en motifs de fractals dendritiques complexes (Harshey, 1994; Kearns, 2010). Pour avoir lieu, le *swarming* chez *P. aeruginosa* requiert absolument deux éléments: soit un flagelle fonctionnel (Kearns, 2010) et la production d'un biosurfactant constitué principalement de rhamnolipides (Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). Le di-GMP cyclique est aussi impliqué dans la transition entre la phase motile (incluant le *swarming*) et sessile (*i.e.* biofilms) (Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007; Verstraeten *et al.*, 2008; Ueda & Wood, 2009; Yeung *et al.*, 2009; Kuchma *et al.*, 2010; Merritt *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2011). Mis à part ces facteurs, aucune autre protéine n'est connue pour affecter spécifiquement ce type de motilité.

La plupart des bactéries possèdent plusieurs ensembles de systèmes régulateurs à deux composantes (2CS), qui servent à répondre à des stimuli environnementaux (Bijlsma & Groisman, 2003). Les 2CS typiques possèdent des protéines composées de deux domaines : soit un domaine senseur et un domaine régulateur de réponse. Le senseur est habituellement une histidine kinase transmembranaire détectant un stimulus environnemental spécifique qui entraîne une autophosphorylation d'un résidu histidine conservé situé sur son domaine transmetteur. Ce groupement phosphorylé est ensuite transféré du résidu histidine vers un acide aspartique sur une protéine régulatrice qui à l'état actif active l'expression des gènes reliés à ce stimulus environnemental (Bijlsma & Groisman, 2003). Il existe aussi un groupe de senseurs sensiblement plus complexe connu sous le nom de senseurs hybrides (Bijlsma & Groisman, 2003). Ces senseurs de type hybride contiennent un domaine receveur de groupement phosphorylé et un domaine kinase sans toutefois posséder de domaine *Histidine phosphotransfer* Hpt. Ces systèmes requièrent une protéine additionnelle ayant un domaine Hpt pour la transmission de signal (Fig. 3.3.1). Des études chez *E. coli* suggèrent en effet que

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

des protéines cytoplasmiques équipées d'un domaine Hpt peuvent fonctionner en tant qu'intermédiaire dans les nombreuses étapes de réactions de relais de groupement phosphorylé (Matsubara & Mizuno, 2000; Takeda *et al.*, 2001; Bijlsma & Groisman, 2003). La capacité de *P. aeruginosa* à s'adapter à différents environnements peut s'expliquer en partie par la présence de plus de 60 ensembles de 2CS sur son génome (Rodrigue *et al.*, 2000). Un total de douze kinases de type hybride et 3 protéines avec des modules Hpt putatifs ont été annotés parmi ces protéines 2CS. Parmi ces douze kinases hybrides, celles codées par PA1611, PA2824, PA1976, PA2177 et PA2583 sont toutes capables de phosphoryler HptB (PA3345) (Lin *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2008) (Fig. 3.4.1A). Ce dernier est codé par le dernier gène d'un opéron composé de PA3347-PA3346-PA3345 (*hptB*) (Fig. 3.4.1B). Leurs résultats suggèrent aussi que HptB puisse phosphoryler PA3346 qui dans cet état agirait en tant que phosphatase spécifique à PA3347 (*i.e.* enlève le groupement phosphate lié à PA3347). Ils ont rapporté qu'une souche *hptB*<sup>-</sup> est déficiente dans le *swarming* (Hsu *et al.*, 2008).



**Figure 3.4.1.** Diagramme schématique inspiré de Bijlsma *et al.*, (2003) montrant le transfert de groupements phosphate dans un 2CS de type hybride.

A) Les protéines de *P. aeruginosa* ayant été démontrées comme étant impliquées dans la cascade de signalisation HptB selon Hsu *et al.*, (2008) sont illustrées. Schéma adapté de Bijlsma *et al.*, (2003) et Hsu *et al.*, (2008). B) Contexte génomique de PA3345.

### **3.4 Régulation de la motilité de type swarming par HptB chez *P. aeruginosa***

Le système de sécrétion de type VI (SST6) a été reconnu comme système de sécrétion protéique distinct en 2006 avec deux articles relatant cette découverte provenant du laboratoire de John Mekalanos de l'Université Harvard. La première étude ((Pukatzki *et al.*, 2006)) a montré que le SST6 est responsable entre autres de la synthèse de la protéine IcmF, requise pour la sécrétion des protéines Hcp et VgrG ainsi que pour une cytotoxicité efficace contre l'amibe *Dictyostelium discoideum*. La deuxième étude (Mougous *et al.*, 2006) rapporte des données structurales indiquant que les gènes du SST6 sont impliqués dans la formation d'un appareil de sécrétion et met aussi en évidence que cette machinerie est fonctionnelle lors d'infections chroniques pulmonaires à *P. aeruginosa*. Des gènes codant pour des produits sécrétés par le SST6 ont depuis ce temps été identifiés dans plus d'un quart des bactéries à Gram(-) séquencées (Bingle *et al.*, 2008; Persson *et al.*, 2009; Pukatzki *et al.*, 2009). Il a été démontré expérimentalement que le SST6 a un rôle à jouer dans la virulence chez plusieurs de ces organismes (voir revue par Jani & Cotter, (2010)). La majorité des études portant sur le sujet décrivent le SST6 dans un contexte de pathogénèse et dans la majorité des cas rapportés, il semble que la protéine Hcp soit centrale à la virulence (Jani & Cotter, 2010). Toutefois, plusieurs bactéries ayant des génomes équipés de gènes codant pour des SST6 putatifs ne sont pas connues pour être des pathogènes, ce qui suggère que le SST6 puisse aussi avoir d'autres fonctions, notamment dans les interactions bactéries-hôtes ou bactéries-bactéries (Jani & Cotter, 2010). Plusieurs articles soulignent la diversité potentielle de la fonction du SST6. Ce système de sécrétion a un rôle à jouer dans la formation des *fruiting bodies* chez *Myxococcus xanthus*, suggérant qu'il fonctionne également dans la coopération intercellulaire (Konovalova *et al.*). D'ailleurs, Hood et collègues (2010) ont récemment rapporté la découverte de trois protéines, sécrétées par le SST6 de *P. aeruginosa*, soit Tse1-3 (*type six effector*). Leurs données suggèrent que Tse2 a un rôle à jouer dans les interactions bactéries-bactéries (Hood *et al.*, 2010).

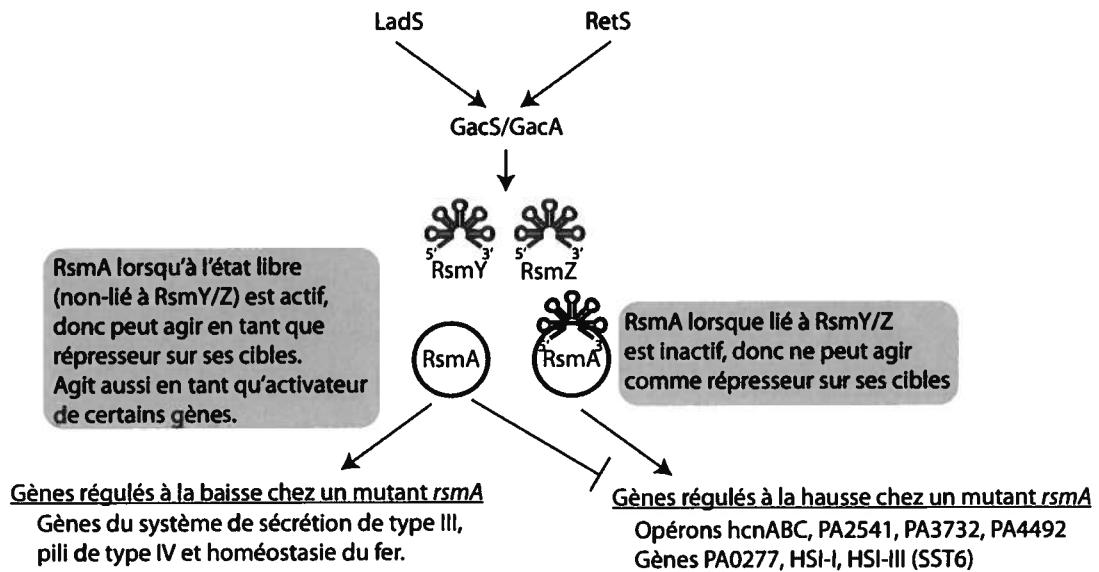
*P. aeruginosa* possède un système de SST6 codé par trois îlots génomiques distincts, communément appelés HSI-I, HSI-II et HSI-III. Ces systèmes ont un rôle à jouer dans le *quorum sensing*, et dans la virulence chez un modèle d'infection de souris (Lesic *et al.*, 2009). Des mutants dans les îlots HSI-II ou HSI-III n'affectent pas la mortalité des souris, mais un double

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

mutant HSI-II-III provoque une mortalité beaucoup moindre que la souche sauvage (Lesic *et al.*, 2009), suggérant l'existence d'un mécanisme compensatoire entre les trois îlots.

Des résultats récents suggèrent que la régulation du SST6 chez *P. aeruginosa* passe par la voie de signalisation RsmA/RsmY/RsmZ (Brencic & Lory, 2009; Brensic *et al.*, 2009) (Fig. 3.4.2). Ce système a reçu beaucoup d'attention au cours de la dernière décennie (revu dans Lapouge *et al.*, (2008) (Lapouge *et al.*, 2008)). Brièvement, il est reconnu que le système à deux composantes GacA/GacS lorsque stimulé, active la transcription des petits ARN RsmY et RsmZ. Ces ARN régulateurs se lient spécifiquement à la protéine RsmA. Cette protéine à l'état libre (non-liée à RsmY/Z) agit en tant qu'inhibiteur de la transcription de nombreux gènes cibles. Au contraire, lorsque RsmY/Z sont liés à RsmA, la transcription des ces gènes-cibles est de nouveau activée. Les phénotypes régulés par ce système comprennent la virulence, la motilité, la formation de biofilms, la production d'acyl homosérine-lactones, pyocyanine, lipases et élastase (Lapouge *et al.*, 2008). Jusqu'à récemment, les résultats rapportés dans la littérature suggèraient que RsmY et RsmZ agissent sur RsmA de manière redondante. Toutefois, de nouveaux résultats indiquent des activités divergentes pour ces deux petits ARN (Kay *et al.*, 2006; Brensic & Lory, 2009; Bordi *et al.*; Goodman, 2010; Petrova & Sauer, 2010). Chez *P. aeruginosa* souche PAK, les gènes codant pour les îlots HSI-I et HSI-III sont régulés à la baisse chez un mutant *gacA*<sup>-</sup> et un double mutant *rsmYrsmZ* alors que HSI-I est surexprimé chez une souche *rsmA*<sup>-</sup> (Brensic *et al.*, 2009). Le même groupe a aussi rapporté que chez la souche sauvage de *P. aeruginosa* PAK, RsmY est généralement plus exprimé que RsmZ en culture liquide en utilisant des fusions transcriptionnelles *lacZ* (Brensic & Lory, 2009). Finalement, chez un mutant *hptB*<sup>-</sup>, toujours dans la souche PAK, il y a plus de transcrits de RsmY comparé à RsmZ (Bordi *et al.*, 2010). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que RsmY et RsmZ ont des conséquences phénotypiques distinctes (Goodman, 2010).

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*



**Figure 3.4.2.** Voie de signalisation RsmA/RsmY/RsmZ.  
Schéma tiré de (Brencic & Lory, 2009).

Suite à un criblage *swarming* des gènes rapportés dans une étude transcriptomique pour ce type de motilité chez *P. aeruginosa* par notre groupe (section 3.2; tableau 3.3.4 (Tremblay & Deziel, 2010)), nous avons trouvé que l'inactivation des gènes PA3346 et PA3347 affecte le *swarming*. Ces deux gènes font en fait partie d'un opéron comprenant PA3345 (*hptB*). Un mutant dans ce gène est dramatiquement diminué dans sa capacité de *swarming* (Fig. 3.4.3A; Tableau 3.4.3). Tel que démontré ci-dessous, un mutant dans ce gène n'a aucun défaut dans la production de rhamnolipides et dans la fonctionnalité de son flagelle. Un gène présentant de telles caractéristiques est d'un grand intérêt pour la compréhension de la régulation de ce type de motilité. Afin de comprendre pourquoi un mutant dans ce gène est incapable de *swarming*, nous avons réalisé une étude transcriptomique (biopuces Affymerix®) chez ce mutant cultivé en condition de *swarming* en utilisant comme témoins des populations bactériennes prélevées aux extrémités de dendrites en migration, centre de *swarming* et condition non-*swarming*. Nos résultats montrent qu'en condition de *swarming*, l'absence de *hptB* induit une surexpression de transcrits du système de sécrétion de type VI et de production de Hcp1. Nous avons également observé que des mutants dans les îlots de sécrétion HSI I, II et III ne montrent pas de défaut dans le *swarming* mais que des doubles mutants HSI I-II, I-III et II-III sont fortement inhibés dans ce type de motilité. Nous rapportons aussi que les ARN

### **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

régulateurs RsmY et RsmZ sont différentiellement exprimés chez les différentes populations qui composent une colonie *swarming*. Nos résultats indiquent que la voie de signalisation dans laquelle est impliquée HptB est centrale à la motilité *swarming*.

#### **3.4.3 - Méthodologie**

##### **3.4.3.1 - Bactéries**

Les souches de *P. aeruginosa* utilisées pour cette étude sont dérivées de la souche parentale PA14 (Rahme *et al.*, 1995) (Tableau 3.4.1). Les bactéries provenant de stocks congelés étaient typiquement cultivées à 37°C dans du milieu *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Difco) dans un tambour rotatif. Pour les tests de motilité *swarming*, des cultures cultivées pour la nuit étaient lavées, puis diluées dans du tampon PBS à la DO<sub>600</sub> désirée.

##### **3.4.3.2 - Tests de motilité**

Les tests de motilité *swarming* ont été effectués exactement tel que décrit précédemment (Tremblay & Deziel, 2010). Brièvement, du milieu de culture M9DCAA [20 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,6 mM NaCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 11 mM dextrose; 0,5% casamino acids (Difco)] était solidifié avec 0,5% de Bacto-agar (Difco) et séché pour 60 min. sous flux laminaire. Toutes les géloses étaient inoculées avec 5 µL de suspension cellulaire (ajustée à DO<sub>600</sub> = 3,0 avec tampon PBS) et incubées à 30°C pour la nuit à moins d'indications contraires. Pour les tests d'interactions entre deux colonies *swarming*, 5 µL de suspension cellulaire étaient déposés dans un hémisphère de la gélose et dans l'autre hémisphère, les cellules étaient étalées à l'aide d'un écouvillon stérile (Fisher).

La motilité de type *swimming* a été testée en inoculant 3 µL de suspension bactérienne OD<sub>600</sub>=3.0 directement dans des géloses LB ou M9DCAA solidifiées avec 0,25% d'agar. Le diamètre formé par les bactéries nageant en s'éloignant du point d'inoculation était mesuré suite à une incubation à 30°C pendant 16h.

## **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

### **3.4.3.3 - Préparation des échantillons pour hybridation sur biopuces**

Les cellules du mutant  $\Delta hptB$  ont été récoltées en pipettant vigoureusement 1 mL de RNALater directement sur les colonies  $\Delta hptB$  incapables de *swarming*, puis transférées dans un minitube de 1,5 mL gardé sur glace sèche. Dix-huit colonies (6 colonies / gélose) du mutant  $\Delta hptB$  ont été utilisées pour chaque réplicats. L'extraction et contrôle de qualité de l'ARN ont été effectués exactement tel que décrit par Tremblay & Déziel (2010) (section 3.2.4.3.3) de même que la préparation des échantillons pour hybridation sur biopuce. Les résultats d'hybridation de  $\Delta hptB$  ont été comparés aux profils transcriptomiques précédemment rapportés.

### **3.4.3.4 - Hybridation des biopuces et analyse des données.**

L'hybridation a été effectuée par le Centre d'Innovation Génome Québec (Université McGill, Montréal, Canada). Les niveaux d'expression pour chaque triplicats ont été comparés en utilisant le logiciel FlexArray 1.3 (Université McGill, Montréal, Canada). Seuls les gènes ayant une valeur  $p < 0,05$  en utilisant l'algorithme Bayes empirique (Wright & Simon) ont été considérés pour notre analyse. Les données brutes ont été corrigées pour le bruit de fond puis normalisées par la méthode des quantiles. Comme l'algorithme RMA diminue le taux de faux positifs et compresse les valeurs d'expression, un seuil de  $1,4 \log_2$  a été utilisé pour déterminer quels gènes étaient significativement différentiellement exprimés. Dans de rares cas, quelques gènes ayant une valeur de changement d'expression supérieure à  $1,3 \log_2$  ont aussi été considérés.

### **3.4.3.5 - qRT-PCR**

Le PCR quantitatif en temps réel a été effectué en utilisant le kit *qScript<sup>TM</sup> One-Step SYBR Green* et un cycleur thermique RotorGene 6000 (Corbett). Les amorces ont été conçues pour obtenir des produits entre 80 et 150 pb (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Le gène *nadB* a été utilisé comme gène témoin. Chaque ronde de qRT-PCR était effectuée en triplicats. Le cycle seuil (Ct), était normalisé au Ct de *nadB* amplifié des échantillons correspondants. Le



### 3.4 Régulation de la motilité de type swarming par HptB chez *P. aeruginosa*

changement d'expression a été calculé en utilisant la méthode  $-2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

#### 3.4.3.6 - Techniques moléculaires

La délétion du domaine Hpt du gène *hptB* (PA3345/PA14\_20800) a été effectuée à l'aide d'une technique de PCR en boîtes. Deux fragments d'ADN ont été amplifiés en utilisant les paires d'amorces PA3345\_Left\_FWD et PA3345\_Left\_REV pour le fragment gauche PA3345\_Right\_FWD et PA3345\_Right\_REV pour le fragment de droite (tableau 3.4.2). Ces fragments ont été hybridés ensemble en utilisant des séquences pendantes spécialement conçues à être commune aux régions internes des amorces PA3345\_Left\_REV et PA3345\_Right\_FWD. Cet allèle *hptB* tronqué a ensuite été utilisé comme matrice pour amplifier un produit de 600 pb représentant le gène *hptB* amputé de son domaine Hpt ( $\Delta hptB$ ). Le produit de PCR a ensuite été cloné dans le site de clonage multiple du plasmide pEX18Tc en utilisant les sites de restriction *HindIII* et *SmaI*. Le plasmide résultant (pEX18Tc\_Δ*hptB*) a été transformé dans *E. coli* SM10 sur géloses TSB contenant 15 µg/mL de tétracycline (Tc). Une conjugaison à deux partenaires entre la souche sauvage PA14 ou le mutant *rhIA*<sup>-</sup> de PA14 et SM10(pEX18Tc\_Δ*hptB*) a ensuite été effectuée. Les simples recombinants ont été sélectionnés sur géloses TSB supplémentées avec Tc 125 µg/mL et repiqués dans du TSB liquide sans antibiotique pour la nuit. Les doubles recombinants ont ensuite été sélectionnés sur gélose LB sans NaCl supplémenté avec 8% sucrose. Les colonies positives ont été confirmées par PCR et séquençage. La séquence codante pour *hptB* est de 352 pb. Le domaine Hpt se situe entre les paires de bases aux positions 24 et 104 à partir du codon ATG de *hptB*. Une séquence de 86 pb se situant entre la 18<sup>ième</sup> et 105<sup>ième</sup> pb a été déletée de la séquence originale de *hptB*. Le gène muté correspond à une longueur de 76% du gène original.

L'expression constitutive de *hcp1* a été effectuée en amplifiant ce gène à partir du génome de la souche sauvage PA14 avec les amorces P<sub>tac</sub>*hcp1\_fwd* et *hcp1\_rev* (tableau 3.4.2). La première de ces deux amorces contient une séquence correspondante au promoteur P<sub>tac</sub> (inspiré de (Lagendijk *et al.*, 2009)). Le fragment obtenu a été cloné dans pGEM-T easy (Promega) pour donner pGEM-T easy\_*hcp1*. Ce plasmide ainsi que pME6031 ont été digérés

### **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

avec EcoRI pour cloner le fragment extrait de pGEMTe, P<sub>tac</sub>hcp1, dans pME6031 (Heeb *et al.*, 2000) donnant pME6031P<sub>tac</sub>hcp1. Les constructions positives ont été confirmées à l'aide de réactions PCR diagnostiques.

#### **3.4.3.7 - Formation de biofilms en milieu statique**

Un volume de 500 µL de suspension bactérienne à DO<sub>600</sub>=0,05 a été cultivé dans du milieu de culture M9DCAA dans un tube en polystyrène de 5 mL à 30°C. Lors de l'analyse, le tube était rincé vigoureusement avec de l'eau milliQ, incubé 10 min. avec 1 mL d'une solution de cristal violet 1% à température-pièce, puis rincé à nouveau avec de l'eau milliQ. Le cerne coloré formé à l'interface air-liquide-polystyrène était ensuite solubilisé avec 4 mL d'EtOH 95% et vortexé avec des billes de verres puis mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre ( $\lambda=595$  nm). Chaque mesure était prise en six réplicats (*i.e.* six échantillons différents pour chaque point).

#### **3.4.3.8 - Fixation de rouge Congo**

Des géloses Tryptone 1% supplémenté avec 80 µg/mL de rouge Congo et 20 µg/mL de bleu de Coomassie, solidifiées avec 0,5% d'agar Bacto (Difco) ont étéensemencées avec 5 µL de suspension bactérienne à DO<sub>600nm</sub>=0,05 puis incubées à température-pièce pendant 7 jours.

#### **3.4.3.9 - Quantification de Hcp1**

Les profils des protéines extracellulaires de la souche sauvage et  $\Delta hptB$ , ont été obtenus en inoculant la souche sauvage (1 inoculum/gélose) et le mutant  $\Delta hptB$  (6 inocula/gélose) sur 60 et 20 géloses *swarming* respectivement suivi d'une incubation à 30°C pendant 12 h. Pour chaque gélose, les bactéries ont été resuspendues dans 2 mL de PBS stérile et transférées dans des tubes Falcon® de 50 mL placé sur glace, suivi d'une centrifugation à 13,000 x *g* pendant 10 min. Au total, cela donnait trois tubes Falcon® pour la souche sauvage et un seul tube pour  $\Delta hptB$ . Les surnageants ont été délicatement transférés dans un nouveau tube Falcon qui a de nouveau été centrifugé à 13,000 x *g* 10 minutes. Ces surnageants ont ensuite été précipités au TCA (concentration finale de 10%) pendant 40 min. à 4°C puis centrifugés à 30,000 x *g* pendant 30 min.. Les culots ont été récupérés puis lavés trois fois dans 1 mL d'acétone froide, puis

### **3.4 Régulation de la motilité de type swarming par HptB chez *P. aeruginosa***

finalement séchés 10 minutes au SpeedVac. Les culots ont ensuite été resuspendus dans 6  $\mu$ L de NaOH 0,2M pendant 5 min puis resuspendus dans 25  $\mu$ L additionnel de tampon de conservation ( $K_2HPO_4$  50 mM; 1% Triton-x-100; 20% glycérol; pH 7,5). Les protéines ont été récoltées puis quantifiées par la méthode de Bradford (Biorad). Des quantités égales des protéines de  $\Delta hptB$  et de la souche sauvage ont été séparées selon leurs poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 18%. Les bandes ont été révélées à l'aide d'une coloration au nitrate d'argent tel que décrit (Shevchenko *et al.*, 1996). Les bandes semblant plus abondantes chez le mutant  $\Delta hptB$  comparées à la souche sauvage ont été découpées puis digérées avec de la trypsine. Les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse (Q-Trap LC/MS/MS – Applied Biosystems / MDS SCIEX) et identifiés avec le logiciel Mascot Server 2.0 (Matrix Science, London, UK). Le peptide VNVQDLSFTK de poids moléculaire (PM) de 1150 Da et apparaissant à une valeur de m/z de 576,2 a été identifié dans une bande apparaissant à environ 17 kDa et correspond à la protéine Hcp1.

L'abondance relative de ce peptide a été quantifiée en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) en utilisant la transition m/z 576 --> 937. Un standard interne de quantification (Glu-Fibrinopeptide B de PM de 1568,7 Da) a été ajouté à chaque échantillon et quantifié en MRM en utilisant la transition m/z 786>684. Les aires sous les courbes MRM des deux échantillons (mutant  $\Delta hptB$  vs souche sauvage) après normalisation avec l'aire du standard interne ont été comparées.

#### **3.4.3.10 - Test de mortalité de drosophiles**

Des drosophiles mâles âgées de 7 jours ont été déposées dans des vials contenant 5 mL de sucrose 5% solidifié avec 1,5% d'agar recouvert d'un papier Whatman no.1 sur lequel était déposé 100  $\mu$ L de sucrose 5% contenant des bactéries récupérées de 3 mL de culture bactérienne de  $DO_{600}=2,5$ . Les drosophiles étaient distribuées par groupe de 10 et ont été affamées pendant sept heures avant d'être mises en contact avec les bactéries. Le test de Mantel-Cox (*log rank test*) a été utilisé pour déterminer la signifiante statistique entre les différentes courbes de mortalité (Kaplan & Meier, 1958).

## **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

---

### **3.4.3.11 - Test de croissance**

Les courbes de croissance ont été établies à l'aide d'un instrument Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Chaque culture de 200  $\mu$ L a étéensemencée à une DO<sub>600</sub> initiale de 0,05. Chaque point représente un triplicat d'une mesure de turbidité prise à DO<sub>420-580</sub>. Les barres d'erreurs ne sont pas représentées, celles-ci étant négligeables.

### **3.4.3.12 - Quantification des biosurfactants**

Les rhamnolipides (HAA, mRL et dRL) ont été quantifiés tel que décrit (Déziel *et al.*, 2003). Brièvement, six ensemencements de 5  $\mu$ L du mutant  $\Delta$ *hptB* et un seul de la souche sauvage ont été inoculés par gélose. Quinze gélouses *swarming* par condition (cinq gélouses/réplicat) pour un total de 30 gélouses ont été inoculées. Après une incubation de 16 heures, l'agar des gélouses a été extrait des boîtes de Petri et transféré dans des flacons Erlenmeyer contenant 1:1 (vol/vol) de KHCO<sub>3</sub> (pH 9) (*i.e.* pour cinq gélouses de 20 mL, 100 mL de KHCO<sub>3</sub> a été ajouté). Le tout a été agité vigoureusement pendant 1 heure à température pièce, puis filtré sur papier Whatman no.1 recouvert d'un lit de sable fin (Fisher) afin d'éviter d'obstruer le papier filtre. Le filtrat a été acidifié à pH 4 avec du HCl concentré et extrait trois fois avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Les fractions organiques (phase supérieure) ont été évaporées et analysées par spectrométrie de masse, tel que décrit (Deziel *et al.*, 2000; Lépine *et al.*, 2002).

La biomasse totale produite sur chaque gélose a été quantifiée en resuspendant les bactéries avec deux fois 1 mL de tampon PBS, puis en transférant cette suspension dans des cupules d'aluminium pré-pesées. Les suspensions de bactéries/PBS ont été évaporées à 65°C pendant 2 heures et les cupules pesées à nouveau. La quantification de la biomasse a été effectuée avec un ensemble de gélouses distinctes préparé en parallèle dans des conditions identiques.

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

Tableau 3.4.1. Souches.

	Description ou sequence	Référence
<b>Souches</b>		
PA14 WT	Souche sauvage, #ED14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14- <i>hptB</i> <sup>-</sup>	PA14 <i>hptB</i> :: MAR2xT7, Gm <sup>R</sup> (ID: 27109), #ED1213	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14- $\Delta$ <i>hptB</i>	délétion partielle de $\Delta$ <i>hptB</i> , #ED1214	Cette étude
PA14-PA1611 <sup>-</sup>	PA14 PA1611:: MAR2xT7, Gm <sup>R</sup> (ID: 36736), #ED1215	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14- <i>rhlA</i> <sup>-</sup>	PA14 <i>rhlA</i> :: MAR2xT7, Gm <sup>R</sup> (ID : 23291), #ED1	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14- <i>rhlA</i> <sup>-</sup> $\Delta$ <i>hptB</i>	PA14 <i>rhlA</i> :: MAR2xT7, Gm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>hptB</i> , #ED1241	Cette étude
PA14- <i>fliC</i> <sup>-</sup>	PA14 <i>fliC</i> :: MAR2xT7, Gm <sup>R</sup> (ID : 36424), #ED13	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 $\Delta$ HSI I	PA14 ne contenant pas l'îlot HSI I (Tc <sup>R</sup> ), #ED1217	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 $\Delta$ HSI II	PA14 ne contenant pas l'îlot HSI II (Gm <sup>R</sup> ), #ED1218	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 $\Delta$ HSI III	PA14 ne contenant pas l'îlot HSI III (Gm <sup>R</sup> ), #ED1219	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 $\Delta$ HSI I-II	PA14 ne contenant pas les îlots HSI I et HSI II (Tc <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> ), #ED1220	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 $\Delta$ HSI I-III	PA14 ne contenant pas les îlots HSI I et HSI III (Tc <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> ), #ED1221	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
PA14 $\Delta$ HSI II-III	PA14 ne contenant pas les îlots HSI II et HSI III (Tc <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> ), #ED1222	(Lesic <i>et al.</i> , 2009)
<b>Plasmides</b>		
pEX18Tc	Vecteur suicide, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , #ED929	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pEX18Tc_ $\Delta$ <i>hptB</i>	pEX18Tc avec la construction <i>hptB</i> sans domaine Hpt, #ED1306	Cette étude
pGEM-T Easy_ P <sub>tac</sub> <i>hcp1</i>	pGEM-T Easy avec séquence <i>hcp1</i> précédée du promoteur P <sub>tac</sub> , Ap <sup>R</sup> , #ED1308	
pME6031	Vecteur se maintenant chez les bactéries à Gram(-) sans pression de sélection, Tc <sup>R</sup> , #ED1293	(Heeb <i>et al.</i> , 2000)
pME6031_ P <sub>tac</sub> <i>hcp1</i>	Dérivé de pMP6031 ayant le gène <i>hcp1</i> sous le contrôle du promoteur <i>tac</i> , #ED1307	Cette étude

ID : Correspond à l'identifiant unique dans la banque PA14NR.

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

**Tableau 3.4.2. Amorces.**

Nom	Description ou séquence
PA14_3345_L_fwd_HindIII <sup>3</sup>	ccc <b>agctt</b> gggTGCGGGTTCGAGGACAGCGG
PA14_3345_L_rev <sup>3</sup>	<i>ttctatcgttcgcta</i> GAGATGCGGCGGGACATTC
PA14_3345_R_fwd <sup>3</sup>	<i>tagcgaacgatagaa</i> CGCCTGCGCAGCCTGCAT
PA14_3345_R_rev_smaI <sup>3</sup>	tcc <b>ccggg</b> ggaTACGCCAGGGAGGCTCGA
P <sub>tac</sub> hcp1_fwd <sup>1</sup>	CGCGGATCCGGGGAATTCTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTG <b>TGAGCGGATAACAATTTT</b> CACACAGGAAACAGCTAAATGGCTGTTGATATGTTTCATC
hcp1_rev <sup>2</sup>	CGCGGATCCAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTCTCAGGCCTGCACGTTCTGGC
rsmZq_fwd	GAACACGCAACCCGAAG
rsmZq_rev	CCACTCTTCAGTCCCTCGTC
rsmYq_fwd	AGGAAGCGCCAAAGACAATA
rsmYq_rev	GGGTTTTGCAGACCTCTATCC
PA1668q_fwd	GTGGAAAACAGCCAGGTCAT
PA1668q_rev	CCGAAGGTCTCGTTATGGAA
PA0085q_fwd	ACCCTGAAGGAAGTCTGGT
PA0085q_rev	AGTTCAGGGTCACGTTCTCG
PA2027q_fwd	CTTTTCCTGGCCAAACACC
PA2027q_rev	GTATCTGCGCAGGAGGTTTC
PA2009q_fwd	CTGTACGCCGAAGTCTCTC
PA2009q_rev	GTGATGCGGTATAGCCAGGT
nadBq_fwd <sup>4</sup>	CTACCTGGACATCAGCCACA
nadBq_rev <sup>4</sup>	GGTAATGTCGATGCCGAAGT

<sup>1</sup> : La séquence en caractères gras correspond au promoteur P<sub>tac</sub>.

<sup>2</sup> : La portion de séquence en italique correspond à une séquence terminatrice de transcription.

<sup>3</sup> : Les portions de séquences en caractères minuscules rouges correspondent aux sites de restriction; les caractères en minuscules italiques correspondent à une séquence de surplomb compatibles entre elles. Les autres caractères en minuscules sont des nucléotides ajoutés à côté des sites de restriction pour augmenter l'efficacité de digestion (selon NEB).

<sup>4</sup> : (Tremblay & Deziel, 2010).

#### 3.4.4 - Résultats

##### 3.4.4.1 - Un mutant dans le gène *hptB* est inhibé dans le *swarming*

Des mutants dans les gènes PA3346 et PA3347 sont affectés dans le *swarming* (Fig. 3.4.3; tableau 3.4.4). Étant donné que PA3345 (*hptB*) est le dernier gène de l'opéron PA3347-45, un mutant dans ce gène (Liberati *et al.*, 2006) a également été testé pour le *swarming* (Fig. 3.4.3). De plus, HptB a récemment été décrit comme étant impliqué dans la transmission d'un signal spécifique au *swarming* et à la formation de biofilms (Hsu *et al.*, 2008; Bordi *et al.*, 2010). Le *swarming* de plusieurs mutants dans des gènes proposés comme étant impliqués dans cette

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

voie de signalisation (Lin *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2008) a été testé (Tableau 3.4.3). À la lumière de ces résultats, nous avons décidé d'étudier en détail le rôle de *hptB* dans ce type de motilité. Dans une moindre mesure, le rôle de PA1611 a aussi été investigué étant donné qu'un mutant dans ce gène est favorisé dans le *swarming*.

Puisque plusieurs études suggèrent un lien entre le *swarming* et la formation de biofilms (Verstraeten *et al.*, 2008), des phénotypes reliés à ces phénomènes ont donc été sondés. La formation de biofilms en milieu statique a été investiguée sur une période de cinq jours. Il ressort que seul le mutant PA1611<sup>-</sup> montre un défaut dans sa capacité d'adhérence (Fig. 3.4.3B). Les phénotypes de fixation de rouge Congo montrent aussi que le mutant PA1611<sup>-</sup> adopte un phénotype de colonie lisse et non rugueuse (Fig. 3.4.3A).

Afin de confirmer que l'inhibition de *swarming* de la souche  $\Delta hptB$  n'est pas causée par un défaut dans la biosynthèse de rhamnolipides, sa production de biosurfactants en condition de *swarming* a été comparée avec celle de la souche sauvage.  $\Delta hptB$  produit beaucoup plus de rhamnolipides et HAA que la souche sauvage (Fig. 3.4.3C). Cette différence de production de rhamnolipides entre les deux souches n'est pas observée en culture liquide (données non-montrées). Étant donné que PA1611<sup>-</sup> est capable de *swarming*, sa production de rhamnolipides n'a été confirmée que de manière qualitative par la méthode de la gélose bleue (Siegmund & Wagner, 1991). La motilité *swimming* n'est pas affectée chez ce mutant (Fig. 3.4.3D). La souche  $\Delta hptB$  ne montre pas de différence de virulence chez la drosophile lorsque comparée avec la souche sauvage (Fig. 3.4.3E). À l'opposé, un mutant PA1611<sup>-</sup> provoque moins de mortalité que la souche sauvage (Fig. 3.4.3E). Aucune différence de croissance en milieu liquide n'a été observée entre la souche sauvage, et les mutants PA1611<sup>-</sup> et  $\Delta hptB$  (Fig. 3.4.3F).

Étant donné que la synthèse de rhamnolipides et un flagelle fonctionnel sont deux aspects essentiels à ce type de motilité, un facteur encore inconnu est possiblement responsable de la perte du *swarming* chez le mutant *hptB*<sup>-</sup>. Afin de confirmer que l'abolition du *swarming* chez *hptB*<sup>-</sup> n'est pas causée par des éléments superflus ou par l'inhibition de la synthèse d'autres gènes par la localisation de l'insertion du transposon Mar2xT7, un mutant « propre »,  $\Delta hptB$ , a été construit tel que décrit dans la section méthodologie. Divers

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

phénotypes de  $\Delta hptB$  ont été testés et sont en tout point identiques à ceux du mutant *hptB*<sup>-</sup> provenant de la banque PA14NR (données non-présentées).

**Tableau 3.4.3.** Criblage pour la motilité *swarming* de mutants dans des gènes codant pour des senseurs à deux composantes hybrides ou impliqués dans la voie de signalisation HptB.

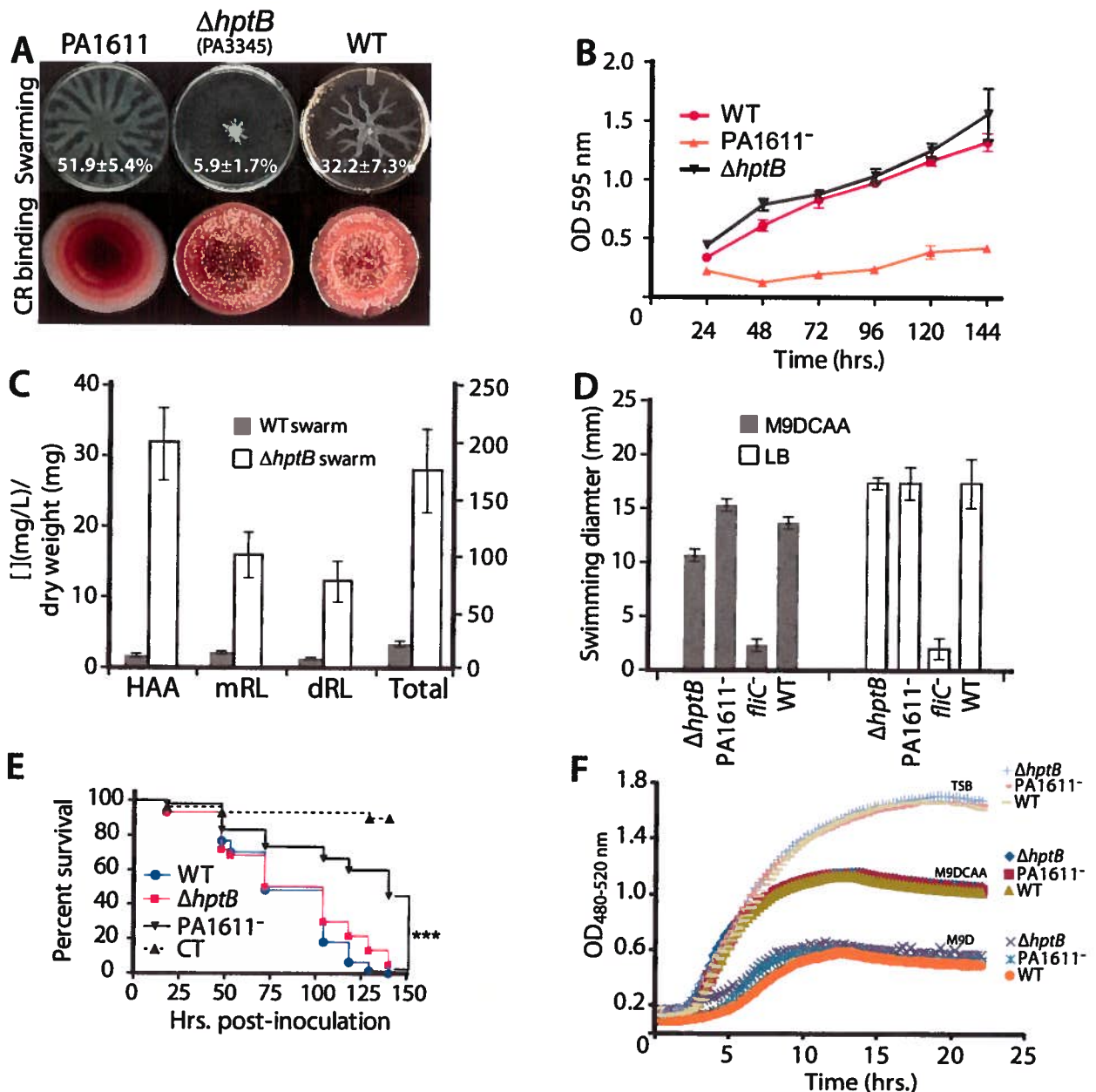
Gene number <sup>1</sup>	Gene name	Product name	Swarming <sup>2</sup>
PA0034		Régulateur de réponse à deux composantes probable	+
PA1396		Senseur à deux composantes probable	+
PA1611		Senseur/régulateur de réponse hybride probable	++
PA1976		Senseur à deux composantes probable	+
PA2583		Senseur/régulateur de réponse hybride probable	+
PA2798		Régulateur de réponse à deux composantes probable	+
PA2824		Senseur/régulateur de réponse hybride probable	+
PA3271		Senseur à deux composantes probable	+
PA3345	<i>hptB</i>	Protéine hypothétique	∅
PA3346		Protéine hypothétique	++
PA3347		Protéine hypothétique	-
PA3462		Senseur/régulateur de réponse hybride probable	+
PA3604		Régulateur de réponse à deux composantes probable	+
PA3714		Régulateur de réponse à deux composantes probable	+
PA4781		Régulateur de réponse à deux composantes probable	+
PA4843		Régulateur de réponse à deux composantes probable	+
PA4856	<i>retS</i>	RetS (Régulateur de sécrétion de type III et d'exopolysaccharides)	+
PA5364		Régulateur de réponse à deux composantes probable	+

<sup>1</sup>: Gènes rapportés par Hsu *et al.*, (2008) comme codant pour des produits potentiels de 2CS hybrides. Des mutants dans les gènes PA0033, PA0091, PA1397, PA1992 et PA3974 ne sont pas disponibles dans la banque PA14NR.

<sup>2</sup>:  
 + → Recouvrement de surface en *swarming* similaire à celui de la souche sauvage  
 - → Recouvrement de surface en *swarming* inférieur à celui de la souche sauvage  
 ++ → Recouvrement de surface en *swarming* supérieur à celui de la souche sauvage  
 ∅ → *Swarming* fortement diminué



### 3.4 Régulation de la motilité de type swarming par HptB chez *P. aeruginosa*



**Figure 3.4.3.** Phénotypes liés à la motilité *swarming* chez  $\Delta hptB$ .

Influence de l'inactivation de PA1611 et de *hptB* sur A) le *swarming* (les valeurs sont en % de recouvrement de surface, B) la formation de biofilms, C) production de rhamnolipides (axe de gauche → HAA; axe de droite → RL), D) la motilité de type *swimming*, E) la mortalité chez *D. melanogaster* (\*\*\*) :  $p < 0.001$ ) et F) courbes de croissances avec différents milieux de cultures.

#### 3.4.4.2 - Les gènes du système de sécrétion de type VI sont surexprimés chez un mutant $\Delta hptB$

Afin de comprendre pourquoi le mutant  $\Delta hptB$  présente un phénotype de motilité *swarming* fortement diminué, nous avons réalisé le profil transcriptomique (biopuces

### **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

Affymetrix®) d'un mutant  $\Delta hptB$  en utilisant comme conditions témoin des populations bactériennes de PA14 localisées au centre d'une colonie en *swarming*, à l'extrémité de dendrites et en condition non-*swarming*. Tel que présenté à la figure 3.4.4A, plusieurs gènes sont différentiellement exprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  comparé aux autres conditions. Afin de mettre l'accent spécifiquement sur les gènes différentiellement exprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  en condition *swarming*, tous les gènes que nous avons déjà trouvés impliqués dans le *swarming* (section 3.2) n'ont pas été pris en considération pour cette étude. Toutefois, les valeurs de changements d'expression de ces gènes sont disponibles en annexe (section 6.4).

Les résultats montrent que plusieurs gènes du SST6 sont surexprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  en condition *swarming* vs la souche sauvage cultivée en condition de *swarming* et non-*swarming* (Fig. 3.4.4; Tableau 3.4.4). La comparaison mutant  $\Delta hptB$  vs extrémité de dendrite donne principalement des gènes situés dans les îlots de sécrétion HSI-I et HSI-III. La comparaison mutant  $\Delta hptB$  vs centre de *swarming* donne trois gènes localisés dans l'îlot HSI-I. Finalement, la comparaison mutant  $\Delta hptB$  vs condition non-*swarming* est la comparaison qui donne le plus de gènes différemment transcrits; ceux-ci font principalement partie de HSI-II, mais quelques-uns se trouvent aussi dans HSI-I. De plus, il est à noter que les gènes PA0085-87 sont surexprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  comparé à toutes les autres conditions. Les résultats de transcriptome de  $\Delta hptB$  ont été confirmés par qRT-PCR (Tableau 3.4.4) et montrent une excellente corrélation avec les profils d'expression des biopuces.

Une précédente étude transcriptomique a rapporté qu'un mutant *retS*<sup>-</sup> induisait une surexpression du SST6 (Mougous *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que cette augmentation de transcrits était corrélée avec une surabondance des protéines Hcp et VgrG dans l'espace extracellulaire. Afin de déterminer si la surexpression du SST6 chez le mutant  $\Delta hptB$  se traduit aussi par une augmentation de la synthèse de protéines extracellulaires associées au SST6, possiblement VgrG et/ou Hcp, nous avons comparé les profils des protéines extracellulaires de la souche sauvage et du mutant  $\Delta hptB$  par SDS-PAGE (Fig. 3.4.5A). Les résultats montrent plusieurs bandes qui semblent plus intenses chez le mutant  $\Delta hptB$ . Ces bandes ont été découpées puis séquencées par spectrométrie de masse (Q-Trap LC/MS/MS). Une bande à environ 17 kDa a été identifiée comme contenant la protéine Hcp1. D'autres protéines ont été

### **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

identifiées lors de cette expérience et sont disponibles à l'annexe 6.4. À l'aide de la technique décrite dans la section matériel et méthodes (section 3.4.3.9), nous avons déterminé que l'environnement extracellulaire du mutant  $\Delta hptB$  sur gélose *swarming* contient environ trois fois plus de la protéine Hcp1 que la souche sauvage dans les mêmes conditions de croissance (Fig. 3.4.5B).

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

**Tableau 3.4.4.** Sélection de gènes différentiellement exprimés chez le mutant  $\Delta hptB$ .

Numéro	Nom	Opéron	Produit	Changement d'expression (log <sub>2</sub> )
<b>Régulés différentiellement entre <math>\Delta hptB</math> vs non-<i>swarming</i></b>				
PA1657 <sup>SST6</sup>	<i>hsiB2</i>	PA1656-59	Protéine de sécrétion de type VI	1,5
PA1658 <sup>SST6</sup>	<i>hsiC2</i>	PA1656-59	Protéine de sécrétion de type VI	1,5
PA1659 <sup>SST6</sup>	<i>hsiF2</i>	PA1656-59	Protéine de sécrétion de type VI relié au lysozyme	1,5
PA1664 <sup>SST6</sup>	<i>lip2.2</i>	PA1661-71	Protéine hypothétique	1,4
PA1665 <sup>SST6</sup>	<i>fha2</i>	PA1661-71	Protéine de sécrétion de type VI avec un domaine FHA	1,7
PA1666 <sup>SST6</sup>	<i>lip2.1</i>	PA1661-71	Lipoprotéine de sécrétion de type VI	1,6
PA1667 <sup>SST6</sup>	<i>hsiJ2</i>	PA1661-71	Protéine de sécrétion de type VI	1,7
PA1668 <sup>SST6</sup>	<i>dotU2</i>	PA1661-71	Protéine de sécrétion de type IV/VI DotU	1,8
PA1669 <sup>SST6</sup>	<i>icmF2</i>	PA1661-71	Protéine de sécrétion de type VI IcmF	1,5
PA0260 <sup>SST6</sup>		PA0262-60		1,6
PA0261 <sup>SST6</sup>		PA0262-60		1,9
PA0262 <sup>SST6</sup>	<i>vgrG</i>	PA0262-60	Protéine de sécrétion de type VI de la famille Vgr	1,7
<b>Régulés différentiellement entre <math>\Delta hptB</math> vs extrémité de dendrite</b>				
PA0049		∅	Protéine hypothétique	2,0
PA0050		∅	Protéine hypothétique	1,4
PA0076 <sup>SST6</sup>		PA0077-74	Protéine de la famille BMA_A0400 associée au système de sécrétion de type VI	1,5
PA0085 <sup>2; SST6</sup>	<i>hcp1</i>	∅	Effecteur du système de sécrétion de type VI	2,0
PA0086 <sup>2; SST6</sup>	<i>hsiE1</i>	PA0086-91	Protéine hypothétique – impliquée dans la sécrétion de type VI	1,6
PA0087 <sup>2; SST6</sup>		PA0086-91		1,4
PA1494		∅	Protéine hypothétique conservée	1,8
PA1911	<i>femR</i>	PA1912-11	Facteur régulateur sigma, FemR	1,5
PA2067		PA2069-66	Hydrolase de la famille β-phosphoglucomutase	1,6
PA2261	<i>kguK, kgk</i>	PA2259-63	Ribokinase	1,6
PA2263	<i>kguD, yiaE</i>	PA2259-63	2-hydroxyacide déhydrogénase probable	1,5
PA2365* <sup>SST6</sup>	<i>hsiC3</i>	PA2365-72	Protéine sécrétée par le système de secretion de type VI	1,3
PA2366 <sup>SST6</sup>	<i>hsiF3</i>	PA2365-72	Protéine de sécrétion de type VI, EvpB	1,6
PA2367 <sup>SST6</sup>	<i>hcp3</i>	PA2365-72	Effecteur du système de sécrétion de type VI de la famille Hcp1	1,4
PA0517	<i>nirC</i>	PA0519-09	Précurseur probable d'un cytochrome de type-c	1,4
PA0519	<i>nirS</i>	PA0519-09	Précurseur de nitrite réductase	1,5
<b>Régulés différentiellement entre <math>\Delta hptB</math> vs centre de <i>swarming</i></b>				
PA0083 <sup>SST6</sup>	<i>hsiB1</i>	PA0082-84	Protéine du système de sécrétion de type VI	1,5
PA0084 <sup>SST6</sup>	<i>hsiC1</i>	PA0082-84	Protéine du système de sécrétion de type VI	1,4
PA2027		∅	Protéine hypothétique	-1,6
PA2007	<i>maiA</i>	PA2009-07	Amaleyl-acéto-acétate isomerase MaiA	1,5
PA2008	<i>fahA</i>	PA2009-07	Fumaryl-acéto-acétase	2,0
PA2009	<i>hmgA</i>	PA2009-07	Homogentisate 1,2-dioxygénase HmgA	2,3

<sup>1</sup> : Les gènes sélectionnés comprennent ceux différentiellement exprimés dans les comparaisons  $\Delta hptB$  vs extrémité de dendrite;  $\Delta hptB$  vs centre de *swarming* et  $\Delta hptB$  vs non-*swarming* et absent des gènes identifiés dans le transcriptome d'une colonie en *swarming* rapportés à la section 3.2.

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

<sup>2</sup>: Gènes étant surexprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  comparé à l'extrémité de dendrite, centre de *swarming* et non-*swarming*.

\* : Gène conservé dans notre analyse parce qu'il fait partie d'un ensemble pertinent de gènes (*i.e.* SST6).

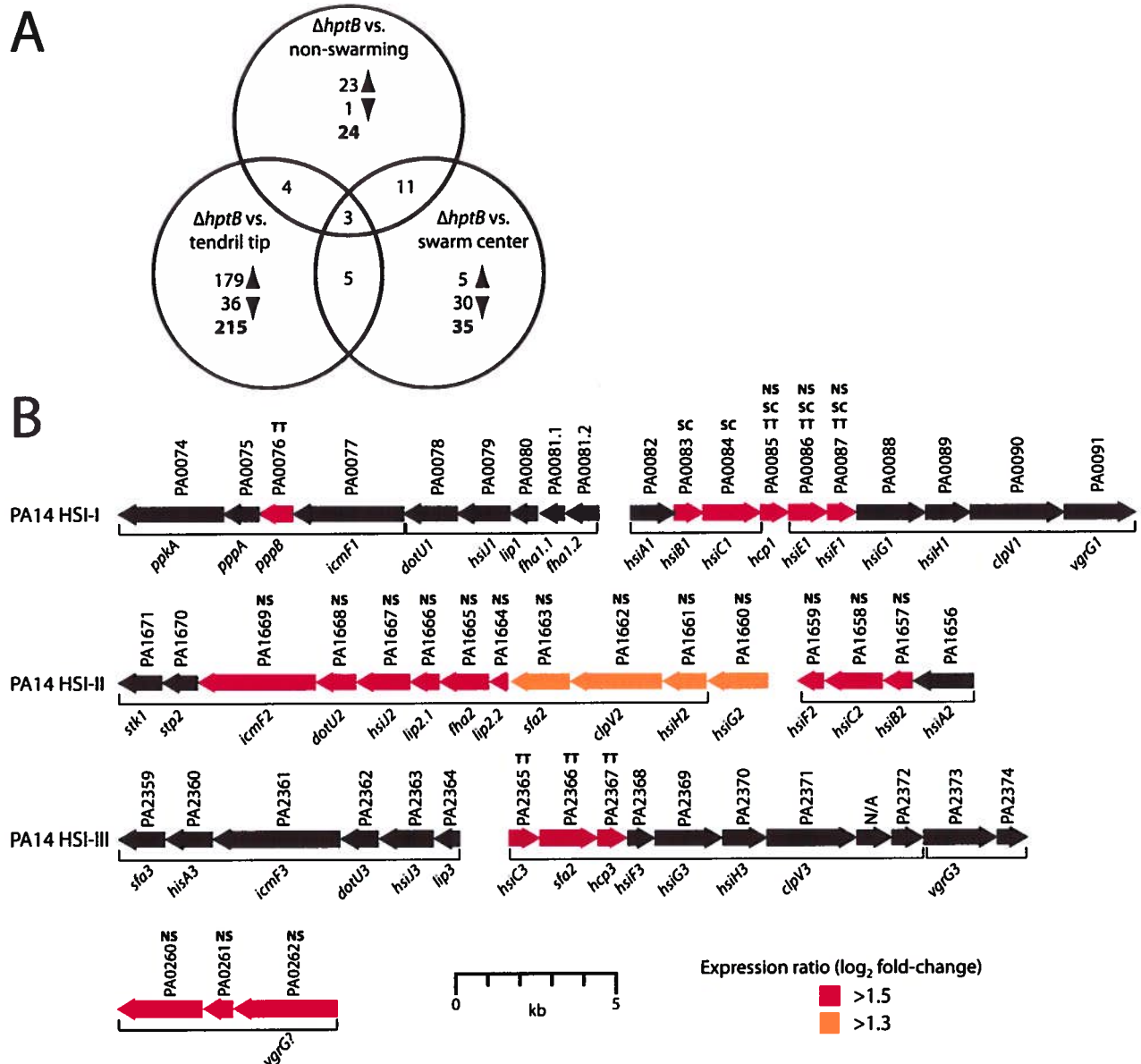
∅ : Gène n'étant pas connu ou prédit pour faire partie d'un opéron.

<sup>SST6</sup> : Gènes connus ou prédits (Mao *et al.*, 2009) pour faire partie du SST6.

**Tableau 3.4.5.** Validation des résultats de biopuces par qRT-PCR.

	Gène		Changement d'expression ( $\log_2$ )	
	PAO1	PA14	Biopuce	qRT-PCR
<b><i>ΔhptB</i> vs non-<i>swarming</i></b>	PA1658	PA14_43030	1,5	2,7
	PA1665	PA14_42950	1,7	1,5
	PA1668	PA14_42910	1,9	1,8
	PA2570	PA14_31290	-0,6	-0,1
<b><i>ΔhptB</i> vs extrémité de dendrite</b>	PA0085	PA14_01030	2,0	1,7
<b><i>ΔhptB</i> vs centre de <i>swarming</i></b>	PA2009	PA14_38510	2,3	1,8
	PA2027	PA14_38310	-1,6	-1,6

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*



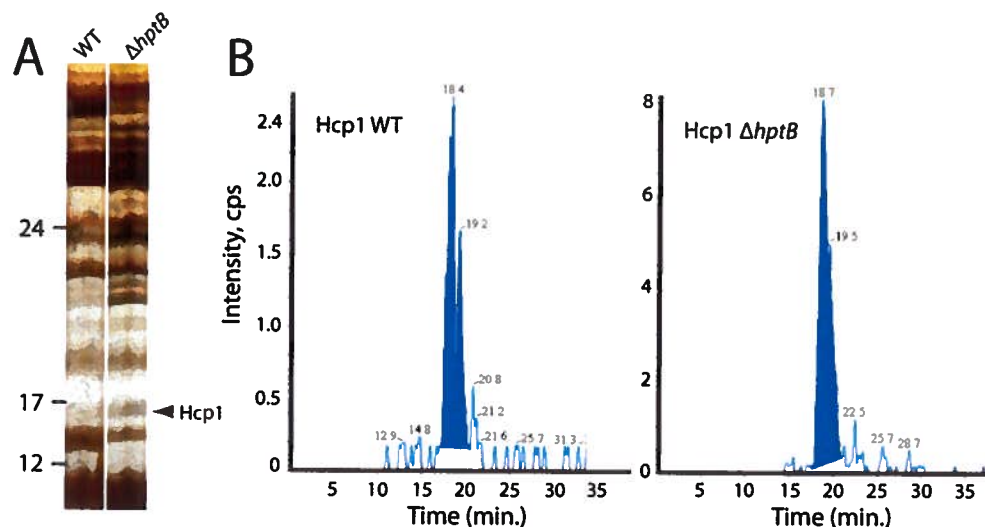
**Figure 3.4.4.** Expression des gènes ayant un seuil de changement d'expression supérieur à 1.3 à l'échelle  $\log_2$ .

A) Expression différentielle par comparaison par paire entre les différentes conditions testées.

B) Répartitions des gènes surexprimés chez  $\Delta hptB$  dans les différents HSI. TT : *tendril tip* (extrémité de dendrite), SC : *swarm center* (centre de *swarming*) et NS : non-*swarming*.

L'encadrement en dessous des gènes indique les opérons prédits (Brouwer *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2009).

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par Hcp1 chez *P. aeruginosa*



**Figure 3.4.5.** Hcp1 est hypersécrété chez  $\Delta hptB$  par rapport à la souche sauvage. A) SDS-PAGE d'extraits de protéines (10  $\mu$ g / puits) extracellulaire de  $\Delta hptB$  et de la souche sauvage coloré à l'argent. B) Profil MRM de Hcp1 typique du contenu de la bande contenant Hcp1 de la souche sauvage et  $\Delta hptB$ .

#### 3.4.4.3 – Un mutant $\Delta hptB$ est insensible aux rhamnolipides

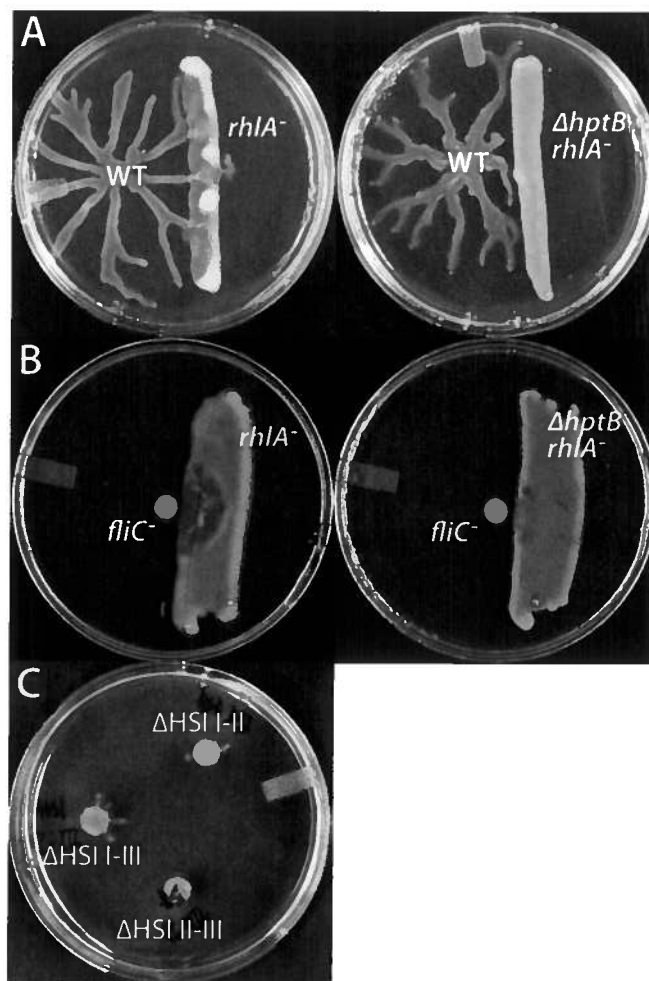
Le mutant  $\Delta hptB$  sur gélose *swarming* surexprime plusieurs gènes des SST6 et sécrète en abondance plusieurs protéines (Fig. 3.4.5A) dans l'espace extracellulaire, dont Hcp1. La figure 3.4.5A montre que des dendrites en *swarming* de la souche sauvage n'évitent pas une colonie *rhlA*<sup>-</sup> qui ne produit aucun des trois biosurfactants (HAA/mRL/dRL) de *P. aeruginosa*. Nous avons en effet précédemment trouvé que les HAA exercent un effet de répulsion sur des dendrites en *swarming* chez *P. aeruginosa* (Tremblay *et al.*, 2007). Afin de vérifier l'hypothèse que le mutant  $\Delta hptB$  sécrète un produit qui inhibe le *swarming*, un double mutant *rhlA*<sup>-</sup> $\Delta hptB$  a été construit. Ce double mutant permet d'investiguer l'effet de l'inactivation de *hptB* sur le *swarming* en éliminant l'effet des HAA/rhamnolipides. Les dendrites de la souche sauvage sont repoussées par une colonie *rhlA*<sup>-</sup> $\Delta hptB$  (Fig. 3.4.6A – panneau de droite) mettant en évidence que cette souche semble produire un facteur repoussant les dendrites *swarming* et que ce facteur n'est pas un produit de RhlAB. De manière intrigante, la figure 3.4.6A (panneau de gauche) montre que la colonie *rhlA*<sup>-</sup> est sensible à un facteur (probablement des HAA/rhamnolipides) produit par la souche sauvage. Les bactéries *rhlA*<sup>-</sup> semblent en effet se « sauver » de la souche sauvage, suggérant qu'elles entrent en *swarming* suite à la présence

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

des biosurfactants produits par la souche sauvage. De manière opposée, *rhIA*<sup>-</sup> $\Delta$ *hptB* est insensible à l'effet repoussant produit par la souche sauvage (Fig. 3.5.6A; panneau de droite). Ce phénomène est illustré de façon alternative par l'effet répulseur d'un mutant *fliC* (produisant des HAA/rhamnolipides, mais incapable de motilité) sur une colonie *rhIA*<sup>-</sup> (Fig. 3.4.6B – panneau de gauche), mais pas sur *rhIA*<sup>-</sup> $\Delta$ *hptB* (panneau de droite).

Afin de mieux comprendre le rôle des SST6 dans le *swarming*, des mutants chez lesquels les îlots HSI-I, -II, -III ont été délétés et des doubles mutants dans les îlots -I-II, -I-III et -II-III ont été testés pour ce type de motilité. Les simples mutants HSI-I, -II et -III ne sont pas affectés dans le *swarming*, mais les doubles mutants sont tous fortement diminués dans ce type de motilité (Fig. 3.4.6C). Récemment, Gibbs *et al.*, (2008) et Gibbs & Greenberg (2010) ont rapporté des protéines servant à l'identification du soi. (*i.e.* c'est-à-dire la reconnaissance d'autres souches avoisinantes chez des bactéries cultivées en surface) chez *P. mirabilis*. Une de ces protéines présente des similarités avec Hcp de *P. aeruginosa* (Gibbs *et al.*, 2008). Ces auteurs ont suggéré la possibilité que la protéine Hcp puisse être capable de se substituer à IdsA, un des produits impliqué dans la reconnaissance du soi (Gibbs & Greenberg, 2010). Le gène *hcp1* sous le contrôle du promoteur P<sub>tac</sub> a donc été cloné dans le vecteur pME6031 (pME6031P<sub>tac</sub>*Hcp1*) et transformé dans *P. aeruginosa rhIA*<sup>-</sup>. Toutefois, aucun comportement de repoussement de dendrite ou d'inhibition de réponse aux rhamnolipides n'a été observé entre la souche sauvage et *rhIA*<sup>-</sup>::pME6031P<sub>tac</sub>*hcp1* (résultat non-montré). Ce vecteur d'expression a été confirmé au niveau moléculaire, mais la surproduction de Hcp1 n'a toutefois pas été confirmée.





**Figure 3.4.6.** Un produit hypothétique sécrété via l'inactivation de *hptB* entraîne un effet d'évitement de dendrites en *swarming* et rend les bactéries insensibles aux biosurfactants produits par *P. aeruginosa*.

A) Souche sauvage, B) mutant *fliC*<sup>-</sup> inoculé en présence d'une colonie *rhIA*<sup>-</sup> (panneaux de gauche) ou *rhIA*<sup>-</sup> $\Delta hptB$  (panneau de droite) et C) mutants dans les îlots HSI.

#### 3.4.4.4 - Des bactéries cultivées en surface montrent une expression génique différente de cellules en bouillon.

Récemment, il a été rapporté que l'expression des petits ARN RsmY et RsmZ est affectée par HptB (Bordi, 2009) (Bordi *et al.*, 2010). Il semble toutefois que HptB agisse plus fortement sur l'augmentation de l'expression de *rsmY* que de *rsmZ*.

Le transcriptome d'un mutant *hptB*<sup>-</sup> a été obtenu chez la souche *P. aeruginosa* PAK (Bordi *et al.*, 2010). Contrairement à nous, ce groupe n'a pas observé de surexpression de gènes du SST6 chez un mutant *hptB*<sup>-</sup>. Dans leur étude, l'ARN total a été extrait de bactéries cultivées

### **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

en bouillon et non sur une surface. Des expériences de qRT-PCR ont donc été effectuées afin de déterminer s'il y a des différences de régulation entre des bactéries cultivées en surface et en liquide chez notre souche PA14 (Fig. 3.4.7). En plus de l'expression des gènes *dotU2* et *hcp1*, l'expression des petits ARN RsmY et RsmZ a été suivie étant donné qu'ils jouent un rôle important dans l'expression du SST6 via la séquestration de RsmA (Brencic & Lory, 2009) (Fig. 3.4.2). Notons aussi que ces deux petits ARN ne sont pas représentés sur la biopuce Affymetrix®. Nos résultats montrent que *dotU2* et *hcp1*, deux gènes surexprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  en condition de *swarming* (et faisant partie du SST6) ne sont pas différentiellement régulés comparativement à la souche sauvage en milieu liquide (Fig. 3.4.7A). La même observation est valable pour les deux petits ARN RsmY/Z. Chez le mutant  $\Delta hptB$ , ces mêmes gènes (à l'exception de *rsmZ*) sont régulés à la baisse en culture liquide vs condition de *swarming* (Fig. 3.4.7B). *rsmZ* est régulé à la hausse chez la souche sauvage cultivée en liquide comparativement à la souche sauvage en *swarming* (centre de *swarming* et extrémité de dendrite) et sous-exprimé lorsque comparé à une colonie non-*swarming* (Fig. 3.4.7C). *rsmY* est sous-exprimé en culture liquide comparé à des bactéries vivant en surface (*swarming* et non-*swarming*). En condition de *swarming*, *rsmY* et *rsmZ* sont surexprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  comparativement à la souche sauvage, avec *rsmY* est plus abondamment exprimé que *rsmZ* (Fig. 3.4.7D).

### 3.4 Régulation de la motilité de type swarming par HptB chez *P. aeruginosa*

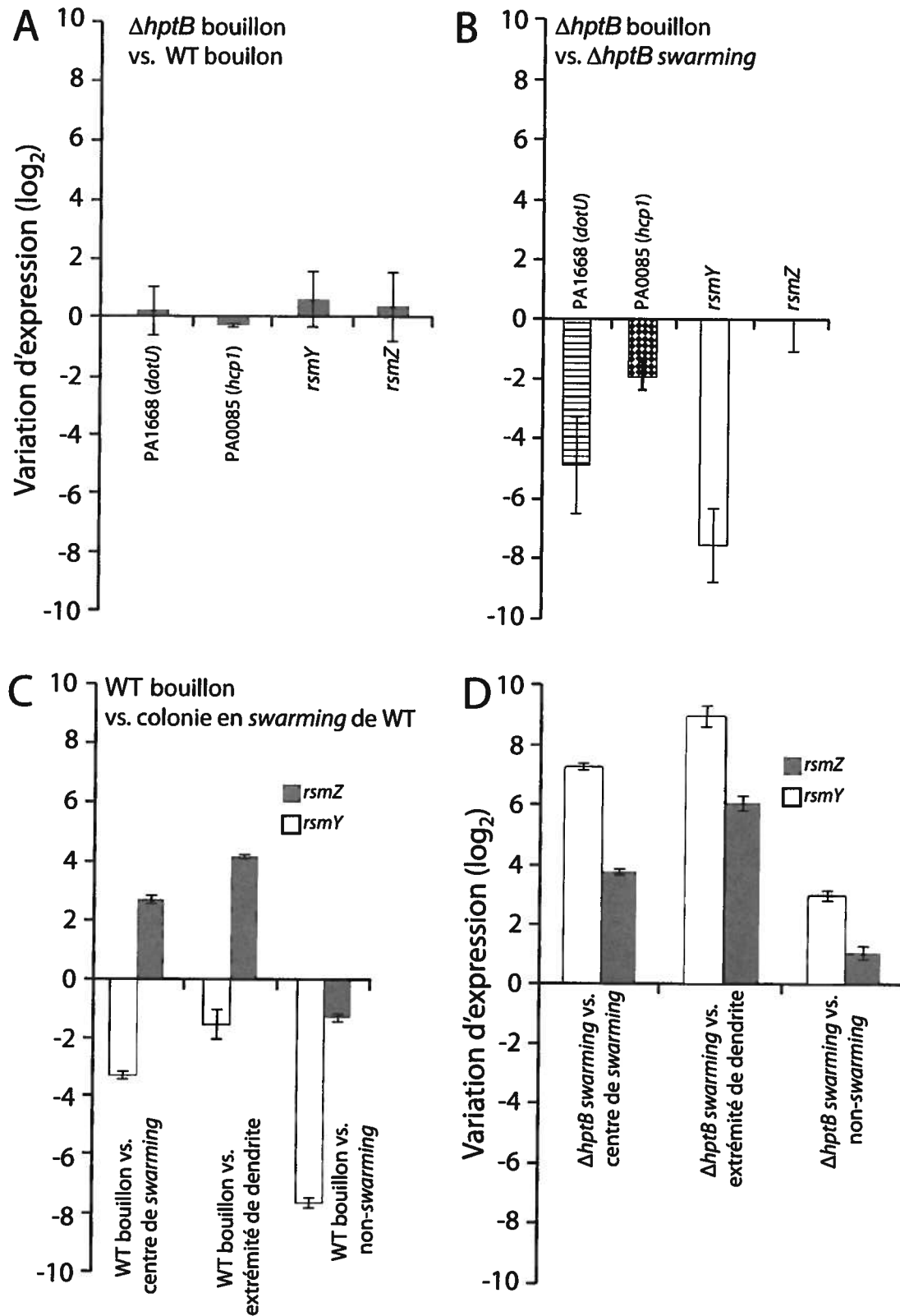


Figure 3.4.7. Expression de différents gènes chez le mutant  $\Delta hptB$  déterminé par qRT-PCR.

### **3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa***

---

#### **3.4.5 - Discussion**

La recherche sur la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* est un secteur d'activité relativement récent. Cette bactérie se démarque de la plupart des autres espèces chez lesquelles ce type de motilité a été étudié par l'absence de différenciation morphologique (*i.e.* élongation cellulaire et hyperflagellation) (Harshey, 1994; Kearns, 2010). Jusqu'à présent seuls deux facteurs sont connus comme essentiels au *swarming* chez *P. aeruginosa*, soit un flagelle fonctionnel et la synthèse de biosurfactants (rhamnolipides) (Kearns, 2010). Dans cette optique, l'étude du gène *hptB* est intéressante car un mutant dans ce gène est incapable de *swarming* mais n'est pas inhibé dans la synthèse de rhamnolipides ni dans la motilité *swimming* (un reflet de la fonction de l'appareil flagellaire). Un autre gène présentant des caractéristiques semblables, *cbrA* a été décrit dernièrement (Yeung *et al.*, 2011). Un mutant dans ce gène est aboli dans le *swarming* et favorisé dans la production de biofilms (Yeung *et al.*, 2011), contrairement à notre mutant  $\Delta hptB$  qui ne semble pas affecté dans ce phénotype (Fig. 3.4.3). Le transcriptome d'un mutant  $\Delta hptB$  cultivé en condition de *swarming* porte à émettre l'hypothèse que la surexpression du SST6 ait un rôle à jouer dans l'inhibition du *swarming*. La vaste majorité des autres gènes différenciellement exprimés selon nos données transcriptomiques ont déjà été rapportés dans un article précédant par notre groupe et reflète probablement des transcrits sur- ou sous-exprimés parce que les bactéries sont dans un état non-*swarming*. Un bon exemple de cela est que les gènes *rhlAB* sont surexprimés autant chez une colonie non-*swarming* (Tremblay & Déziel, 2010) que chez un mutant  $\Delta hptB$ , ce qui suggère que la surexpression de ces deux gènes soit en fait une conséquence de l'état de non-*swarming* de ces bactéries cultivées en conditions *swarming*. En soustrayant les gènes déjà rapportés par Tremblay & Déziel (2010), nous nous retrouvons avec 32 gènes différenciellement exprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  dont 23 déjà connus pour être reliés au SST6. L'établissement des profils des protéines extracellulaires chez le mutant  $\Delta hptB$  comparé à la souche sauvage ainsi que méthode de quantification par LC/MS, ont confirmé que les différences observées dans les transcriptomes de ces deux souches ( $\Delta hptB$  vs souche sauvage) se traduisent entre autres par une sécrétion accrue de la protéine Hcp1. Ceci est en accord avec les travaux de Mougous *et al.*, (2006) qui ont aussi rapporté que la surexpression du HSI-I chez *P. aeruginosa*

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

souche PAK se traduit par une abondance supérieure de protéines Hcp et VgrG dans l'espace extracellulaire (Mougous *et al.*, 2006). Une étude récente a aussi fait part d'une régulation à la hausse des trois îlots HSI connus du SST6 chez un variant de *P. aeruginosa* isolé de poumons d'un patient atteint de la fibrose kystique présentant un phénotype rugueux sur gélose rouge Congo (Starkey *et al.*, 2009). Le *swarming* n'a pas été documenté chez cette souche.

Parmi les neuf gènes qui n'appartiendraient pas au SST6, PA0519-17 sont surexprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  par rapport aux trois autres conditions. Ces gènes font partie d'un opéron impliqué dans le métabolisme anaérobie chez *P. aeruginosa* (Zumft, 1997). PA0519 est aussi surexprimé dans du sputum FK en anaérobiose (Palmer *et al.*, 2007). PA0049 et PA0050 sont surexprimés chez le mutant  $\Delta hptB$  comparé à des cellules non-*swarming*. L'expression de PA0049 est réprimée par PycR, un régulateur transcriptionnel essentiel pour maintenir *P. aeruginosa* dans les poumons de rat (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008). Ce gène est aussi induit dans des biofilms en développement (Waite *et al.*, 2006) et réprimé en croissance anaérobie (Filiatrault *et al.*, 2005).

Nos données d'expression suggèrent que la surexpression des gènes PA2009-07 est en fait spécifique à la condition non-*swarming*. De l'étude transcriptomique de la section 3.2, ces gènes n'ont pas été considérés comme étant surexprimés en condition non-*swarming* (comparé au centre de *swarming*) parce que leurs valeurs de changement d'expression sont légèrement inférieures au seuil de sélection arbitraire de 1,5 log<sub>2</sub>. C'est une situation analogue qui a lieu pour les gènes PA2261, PA2263 et PA1494 et PA1911. Leurs valeurs de changement d'expression d'extrémité de dendrite comparé à la condition non-*swarming* sont respectivement toutes légèrement inférieures à ce seuil de sélection. En conséquence, nous suggérons que l'inactivation de *hptB* ne soit pas responsable de ces différences d'expression.

Afin de mieux comprendre comment la surexpression du SST6 inhibe le *swarming*, nous avons construit un double mutant  $rhIA\Delta hptB$ . La construction de ce double mutant visait à comprendre pourquoi un mutant  $\Delta hptB$  produit un phénotype *swarming* fortement diminué. L'hypothèse proposée fut que la diminution du *swarming* chez ce mutant soit causée par la surexpression du SST6 qui se refléterait par une sécrétion abondante d'un produit lié à ce système de sécrétion. Pour vérifier ce postulat, nous avons observé comment des dendrites en

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

*swarming* d'une souche sauvage réagissent à proximité d'une colonie d'un mutant  $\Delta hptB$  surexprimant une molécule encore inconnue, mais possiblement un produit de sécrétion du SST6, le tout en éliminant l'effet répulseur/attracteur des HAA/rhamnolipides. Il en ressort deux observations importantes: l'inactivation de *hptB* chez un mutant *rhIA*<sup>-</sup> rend ce mutant : 1) capable de repousser des dendrites en *swarming* de la souche sauvage (Fig. 3.4.6A) et 2) insensible aux HAA/rhamnolipides (Fig. 3.4.6B). Afin de directement vérifier l'effet de chacun des trois HSI sur le *swarming*, des mutants dans les îlots HSI I, II, et III, ainsi que des doubles mutants HSII-II, I-III et II-III ont été testés pour ce type de motilité. Les simples mutants ne montrent pas de défaut de *swarming*, mais les trois doubles mutants sont fortement inhibés dans cette motilité (Fig. 3.4.6C). Ces résultats suggèrent un mécanisme compensatoire entre les trois HSI de *P. aeruginosa*, tel qu'observé précédemment par Lesic *et al.*, (2008) (Lesic *et al.*, 2009). Lorsqu'un îlot est désactivé (*e.g.* mutant HSI I, II ou III), les deux autres îlots restants peuvent prendre le relais et réussir à sécréter suffisamment de produits pour ne pas affecter la fonctionnalité du SST6. Inversement, des doubles mutants voient leur phénotype *swarming* presque totalement inhibé, possiblement à cause d'un débit de sécrétion fortement diminué. Un criblage pour le *swarming* a été effectué avec tous les mutants dans des gènes du SST6 disponibles dans la banque PA14NR (Liberati *et al.*, 2006). Aucune de ces souches n'a montré de défaut dans le *swarming*, (données non-montrées) ce qui est concordant avec un mécanisme compensatoire ou une redondance chez les îlots de sécrétion HSI.

Ces résultats suggèrent que prises individuellement, aucune des molécules (Hcp1-3 et VgrG1-3) connues pour être sécrétées par le SST6 ne soit impliquée dans le *swarming* et mettent en lumière la possibilité que le SST6 soit à la fois responsable de l'activation et de l'inhibition du *swarming* par un mécanisme de sécrétion finement régulé, expliquant pourquoi des doubles mutants HSI sont diminués dans le *swarming*. Il serait tentant de proposer que la surexpression du SST6 soit en fait une conséquence du défaut de *swarming* du mutant  $\Delta hptB$ . Toutefois, une telle hypothèse exige que des gènes du SST6 soient surexprimés chez une colonie non-*swarming* comparée à une colonie *swarming* (*i.e.* centre de *swarming* ou extrémité de dendrite), ce qui n'est pas le cas (Tremblay & Deziel, 2010). Trois nouvelles protéines ont récemment été rapportées comme étant sécrétées par le SST6. Il s'agit des protéines Tse1-3

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

(*type six effector*) (Hood *et al.*, 2010). Ces gènes n'apparaissent pas différenciellement régulés selon nos données transcriptomiques chez un mutant  $\Delta hptB$ . Des mutants dans ces gènes ont tous été testés pour le *swarming* et aucun n'était déficient dans le *swarming* (données non montrées).

Contrairement à ce qui a été rapporté par Bordi *et al.*, (2009), qui ont étudié un mutant *hptB* chez la souche *P. aeruginosa* PAK, nous avons observé une surexpression du SST6 et non une absence de régulation différentielle chez le mutant  $\Delta hptB$ . Soulignons d'emblée que nos résultats proviennent de bactéries cultivées en surface et non en bouillon tel que décrit par (Bordi *et al.*, 2010). Conformément à leurs observations, nos résultats montrent qu'en culture liquide, l'expression de gènes du SST6, *dotU* et *hcp1*, chez un mutant  $\Delta hptB$  comparé à la souche sauvage est semblable (Fig. 3.4.7A), alors que des différences sont observées lorsque cultivés en surface (Fig. 3.4.4B et 3.4.7B; tableau 3.4.4). Ceci suggère que la divergence entre nos résultats et ceux de ce groupe soit en partie due aux différences de conditions de culture (surface vs bouillon). Conformément à cette hypothèse, nous rapportons aussi que *rsmZ* est surexprimé et *rsmY* sous-exprimé chez des bactéries (souche sauvage) en culture liquide comparé à des cellules en surface (Fig. 3.4.7C). Ce phénomène (expression génique en surface vs liquide) a déjà été rapporté lors de la comparaison du transcriptome de population de front de *swarming* avec bactéries en culture liquide (Overhage *et al.*, 2008). Chez la souche PA14, *rsmY* et *rsmZ* sont aussi différenciellement régulés chez des bactéries en biofilms comparé à des cellules cultivées en bouillon (Petrova & Sauer, 2010). Soulignons par ailleurs que les effets toxiques de l'effecteur Tse2 sécrété par le SST6 sont observés sur milieu solide et non liquide (Hood *et al.*, 2010).

Malgré que la condition surface vs liquide puisse expliquer une partie des différences entre nos résultats et ceux de (Bordi *et al.*, 2010), nos données ne laissent voir aucune différence à ce qui a trait à la formation de biofilms entre la souche sauvage PA14 et le mutant  $\Delta hptB$  alors qu'une forte hausse d'adhérence chez  $PAK\Delta hptB$  a été observée (Bordi *et al.*, 2009). Les phénotypes de fixation du rouge Congo qu'ils ont rapporté montrent aussi que  $PAK\Delta hptB$  a un phénotype plus rugueux que celui de la souche sauvage. Encore une fois, aucune différence n'a été observée de notre côté pour ce phénotype. La souche utilisée par ce groupe (PAK) est

### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

fortement diminuée dans le *swarming* dans les conditions utilisées pour l'étude de PA14, tel que précédemment rapporté (Tremblay & Deziel, 2008). Il serait donc possible que d'autres phénotypes de surface tels que la formation de biofilms et la fixation de rouge Congo soient aussi affectés chez cette souche. Plus encore, les données transcriptomiques d'un mutant *rsmA* de la souche PA01 (Burrowes *et al.*, 2006) comportent de nombreuses différences avec celles de PAK $\Delta$ *rsmA* (Brencic & Lory, 2009). Il est donc probable que des différences semblables de régulation existent entre PAK et PA14, cette dernière étant génétiquement similaire à PA01.

Brencic *et al.*, (2009) ont rapporté qu'une inactivation de *rsmA* entraînait une augmentation de l'expression de HSI-I. Contrairement à ce qui avait été précédemment établi dans la littérature, ils ont démontré que RsmA agit directement sur ses gènes cibles réprimés, dans ce cas-ci, les gènes appartenant au HSI-I. Il est donc possible que l'inactivation de *rsmA* puisse avoir un effet équivalent à augmenter l'abondance de RsmY/Z disponible et donc à favoriser la liaison entre RsmY/Z avec RsmA, séquestrant celui-ci et le rendant non disponible pour effectuer la répression du HSI-I. Les données de la figure 3.4.7D montrent qu'en condition de *swarming*, la quantité de RsmY/Z disponible est beaucoup plus abondante chez le mutant  $\Delta$ *hptB* par rapport à la souche sauvage, ce qui pourrait résulter en l'augmentation de l'expression du SST6 via la séquestration de RsmA par rsmY/Z. Ceci est concordant avec le fait qu'un mutant *rsmA*<sup>-</sup> dans (PA01 et PA14) est incapable de *swarming* (données non montrées et (Heurlier *et al.*, 2004)). Finalement, nous avons testé des mutants *retS*, *ladS* et *gacA*<sup>-</sup> (provenant de la banque PA14NR) et aucun d'entre eux n'était affecté dans le *swarming*, suggérant que HptB n'entretient pas nécessairement de liens avec ces autres éléments connus pour réguler l'expression de RsmY/Z, du moins chez la souche PA14 en condition *swarming*.

Le gène PA1611 a aussi été investigué dans cette étude. Ce gène est intéressant, car il coderait pour une protéine transmembranaire capable de détecter un signal environnemental, puis de phosphoryler HptB, suite à la détection de ce stimulus (Fig. 3.4.1) (Hsu *et al.*, 2008). Parmi tous les récepteurs hybrides proposés par Hsu *et al.*, (2008), seul PA1611 est affecté dans le *swarming* (Tableau 3.4.1). Plusieurs phénotypes d'un mutant dans ce gène ont été explorés et il s'avère qu'il est un *hyperswarmer*, mais qu'il forme moins de biofilms et est moins virulent que la souche sauvage. Par rapport à la virulence, nous avons précédemment rapporté que des



### 3.4 Régulation de la motilité de type *swarming* par HptB chez *P. aeruginosa*

populations d'extrémité de dendrites présentent une baisse d'expression de plusieurs gènes codant pour des facteurs de virulence (Tremblay & Deziel, 2010) comparativement à une population non-*swarming*. Considérant cela, il est à tout le moins intéressant de constater qu'un mutant *hyperswarmer* soit moins virulent que le mutant  $\Delta hptB$  et la souche sauvage. Des expériences additionnelles seront nécessaires pour éclaircir le rôle de PA1611 dans sa relation avec HptB et plus globalement dans le *swarming*. Peut-être que cette protéine code pour un récepteur d'un signal spécifique au *swarming* ou plus généralement au mode de vie en surface.

#### **3.4.6 - Conclusion**

Dans cette étude nous rapportons que l'inactivation du gène *hptB* diminue fortement le *swarming* sans inhiber d'autres phénotypes liés à ce type de motilité (croissance, production de RL, adhésion, motilité *swimming*, virulence sur un modèle d'infection de drosophiles), repousse des dendrites en processus de migration et rend insensible les cellules aux HAA/Rhamnolipides. Certains résultats rapportés ici suggèrent qu'une partie de cet effet sur le *swarming* puisse passer par le SST6, mais des expériences complémentaires seront certainement nécessaires confirmer cette hypothèse, notamment vérifier l'effet de la surexpression d'effecteurs connus pour être sécrétés par ce système de sécrétion. Nos résultats montrent aussi qu'il y a des différences de régulation selon que les bactéries sont cultivées en milieu liquide ou solide, notamment l'expression des petits ARN RsmY/Z. Comme l'ont rapporté Petrova et Sauer (2010) (Goodman, 2010; Petrova & Sauer, 2010), nos résultats pointent aussi vers l'existence de cibles distinctes à RsmY et RsmZ. Au meilleur de nos connaissances, c'est la première fois qu'il est rapporté que le SST6 peut être d'une certaine manière impliqué dans le *swarming*. Ces résultats s'inscrivent dans la même direction que de récents travaux suggérant que le SST6 ait un rôle à jouer dans la reconnaissance bactéries-bactéries. Finalement, nous rapportons qu'un senseur 2CS de type hybride (PA1611) est impliqué dans la régulation du *swarming* et la formation de biofilms. Cette protéine est capable de phosphoryler HptB (Lin et al., 2006; Hsu et al., 2008) et par conséquent exerce possiblement un effet sur son activité.

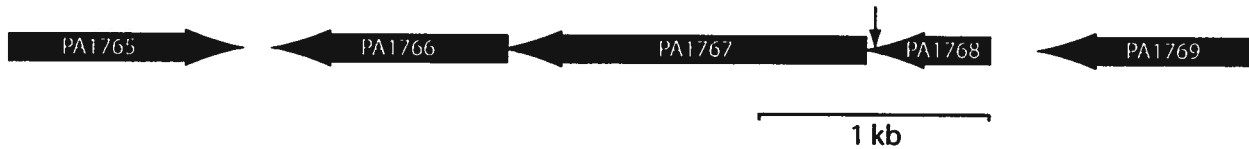
## 3.5 - Rôle du gène PA1768 dans le *swarming*

### 3.5.1 - Mise en contexte

Un criblage de transposants pendant mes travaux de maîtrise a permis de mettre en évidence qu'un mutant dans le gène PA14\_39250 (PA1953) est inhibé dans le *swarming* et aussi dans le *swimming*, suggérant un défaut dans la fonction du flagelle chez cette souche. Ce gène est prédit pour coder pour une peptidase de type C39 (motif peptidase\_C39) spécifique à des peptides ayant un motif double glycine (*i.e.* motif GG). Chez les bactéries à Gram(+), les protéines ayant ce motif font partie d'un système de sécrétion impliqué dans une variété de processus cellulaires (Kleerebezem *et al.*, 1997; Sturme *et al.*, 2002). Une étude *in silico* a permis d'identifier des gènes additionnels codant pour de tels motifs (*e.g.* motif GG : PA4139, PA4141, PA1768, PA1951 et motif peptidase\_C39 : PA4143, PA1762 et PA1953) (Dirix *et al.*, 2004). À l'aide de la banque de mutants PA14NR (Liberati *et al.*, 2006), des mutants dans ces gènes ont été testés pour le *swarming* et parmi eux, seul PA1768 est inhibé dans ce type de motilité. Cette section rapporte les travaux effectués dans le but de comprendre le rôle de ce gène dans le *swarming*. L'aspect qui rend ce gène intéressant, outre son implication dans le *swarming*, est que la protéine codée par ce gène contient un motif double glycine GG. Ces motifs sont généralement associés à des systèmes de communication intercellulaire chez les bactéries à Gram(+). La figure 3.5.1 illustre le contexte génomique de PA1768, un gène situé au début d'un opéron prédit de trois gènes. Il est à noter que la motilité *swarming* n'est nullement affectée chez des mutants dans les gènes PA1766 et PA1767. Ces gènes n'ont donc pas été investigués dans cette section. La position de l'insertion transpositionnelle a été confirmée par réaction *PCR* imbriquée en deux rondes tel que décrit (Jacobs *et al.*, 2003; Tremblay, 2007).

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le swarming

---

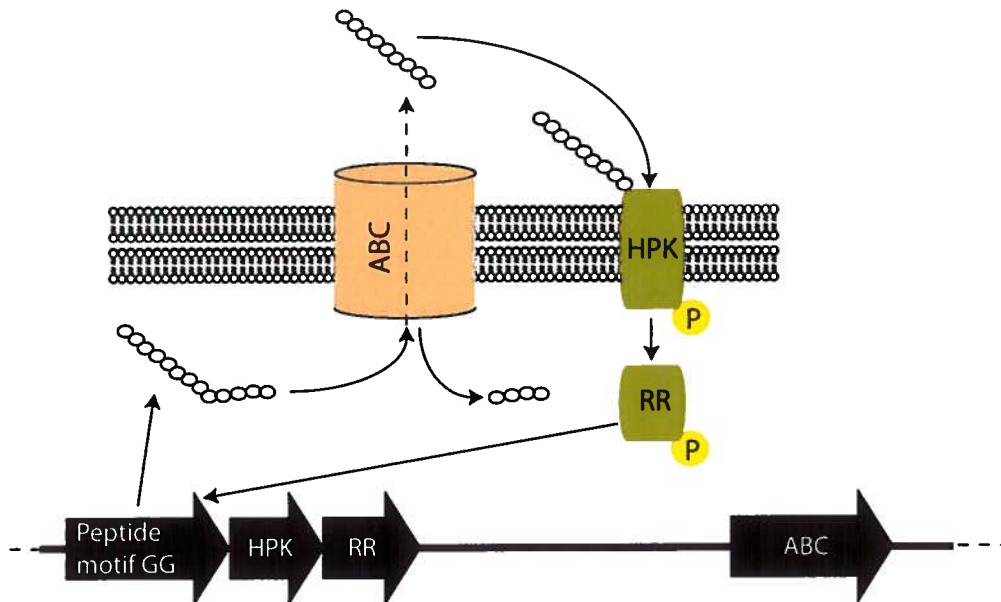


**Figure 3.5.1.** Contexte génomique du gène PA1768.

PA1768 est le premier gène d'un opéron prédit (*Database of prokaryotic operons* (Dam *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2009)) PA1768-66. PA1766 et PA1767 sont prédits pour coder pour des protéines hypothétiques (Winsor *et al.*, 2009). La flèche rouge indique le site d'insertion du transposon MAR2xT7 qui se trouve vers la région terminale de PA1768.

#### 3.5.1.1 - Quorum-sensing et peptides avec motifs GG

Chez les bactéries à Gram(+), les peptides à motif double-glycine jouent un rôle analogue aux molécules de QS chez les bactéries à Gram(-), notamment dans plusieurs systèmes de sécrétion, production de bactériocines, compétence et virulence (Kleerebezem *et al.*, 1997; Sturme *et al.*, 2002). Les peptides impliqués dans ces systèmes sont généralement synthétisés en tant que prépeptides inactifs contenant un motif GG dans la région N-terminale. Cette région N-terminale est typiquement reconnue et clivée au niveau du motif GG (Havarstein *et al.*, 1994; Pestova *et al.*, 1996) durant la sécrétion du prépeptide par un transporteur ABC spécifique, ce qui résulte en la sécrétion d'un peptide actif dans l'espace extracellulaire. Ces peptides actifs ont une longueur pouvant aller de 17 à 80 aa. Les motifs GG sont bien conservés et présentent le consensus suivant :  $LSX_2ELX_2IXGG$  (Havarstein *et al.*, 1994).



**Figure 3.5.2.** Modèle de système régulateur à base de peptide chez les bactéries à Gram(+). Schéma adapté de (Sturme *et al.*, 2002).

Les autoinducteurs sont continuellement produits à de faibles niveaux et sécrétés par un transporteur ABC. Lorsqu'une concentration critique d'autoinducteur est atteinte, une histidine kinase (HPK) liée à la membrane est autophosphorylée. Le groupement phosphorylé est ensuite transféré à un régulateur transcriptionnel cytoplasmique (RR) qui active la transcription des gènes appropriés dont le gène codant pour le peptide à motif GG, ce qui crée un cycle de rétroaction positif. Pendant la sécrétion, les peptides autoinducteurs deviennent actifs via le clivage de leur séquence signal en région N-terminale.

### 3.5.2 - Méthodologie

Tout comme la souche  $\Delta hptB^-$ , le mutant PA14\_41690<sup>-</sup> est incapable de *swarming*. La méthodologie décrite dans cette section est donc essentiellement la même que celle mentionnée à la section 3.4.3.

#### 3.5.2.1 – Bactéries et tests phénotypiques

Les bactéries ont été cultivées comme indiqué à la section 3.4.3.1 tandis que les tests de *swarming* et de *swimming* ont été effectués tel que décrit à la section 3.4.3.2. Les tests de formation de biofilms, de fixation au rouge Congo, de mortalité de drosophiles, de croissance et

### **3.5 Rôle du gène PA1768 dans le swarming**

---

de quantification de biosurfactants ont été accomplis tel qu'indiqué aux sections 3.4.3.7, 3.4.3.8, 3.4.3.10, 3.4.3.11 et 3.4.2.12 respectivement.

#### **3.5.2.2 – Hybridation sur biopuce et analyse de données**

La préparation de de l'ADNc à être hybridé sur biopuces s'est effectué exactement comme à la section 3.4.3.3 (mêmes procédures que pour le mutant  $\Delta hptB$ ). L'hybridation des échantillons sur biopuce a eu lieu tel que décrit à la section 3.4.3.4.

#### **3.5.2.3 - Profils de protéines extracellulaires**

Deux fois 500 mL de chaque culture bactérienne (souche sauvage et PA1768<sup>-</sup>) cultivées dans le milieu M9DCAA à DO<sub>600</sub>=2.0 ont été centrifugées à 13,000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant a été filtré sur 0,45 µm puis précipité au TCA ([TCA] finale = 10%) pendant 2 heures à 4°C, suivi d'une centrifugation à 20,000 x g à 4°C. Le culot a été resuspendu puis lavé 3 fois dans 1,5 mL d'acétone froid. Le culot résultant a été resuspendu dans un tampon de solubilisation (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM; 1% Triton-x-100; 20% glycérol; pH 7,5), puis conservé à -20°C. Les profils protéiques ont été réalisés par gels 2D en suivant la méthodologie tel que décrit (Groleau, 2006).

### **3.5.3 - Résultats**

#### **3.5.3.1 - Caractérisation d'un mutant PA1768<sup>-</sup>**

Afin de mieux comprendre pourquoi un mutant du gène PA1768<sup>-</sup> (#ID dans la banque PA14NR : 36272) est inhibé dans le *swarming* (Fig. 3.5.3A), des tests phénotypiques pertinents à ce type de motilité ont été effectués. La motilité *swimming* a été testée afin de déterminer si la fonctionnalité du flagelle de PA1768<sup>-</sup> est comparable à celle de la souche sauvage (Fig. 3.5.3A). La mesure du diamètre des colonies *swimming* circulaire indique que PA1768<sup>-</sup> effectue 76 ± 4,6% du *swimming* de la souche sauvage. Sur milieu rouge Congo, PA1768<sup>-</sup> présente un phénotype plus rugueux que celui de la souche sauvage (Fig. 3.5.3A). La cinétique de formation

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le swarming

de biofilm en milieu statique de PA1768<sup>-</sup> est semblable à celle de la souche sauvage à la différence des premières 48 heures où la phase initiale de formation de biofilms semble ralentie. La virulence de PA1768<sup>-</sup> contre le modèle de la drosophile est moindre que celle de la souche sauvage (Fig. 3.5.3C). Il n'y a pas de différence de croissance entre PA1768<sup>-</sup> et la souche sauvage dans les milieux TSB et M9DCAA (Fig. 3.5.3D). La production de HAA, mRL et dRL est relativement semblable chez les deux souches (Fig. 3.5.3E).

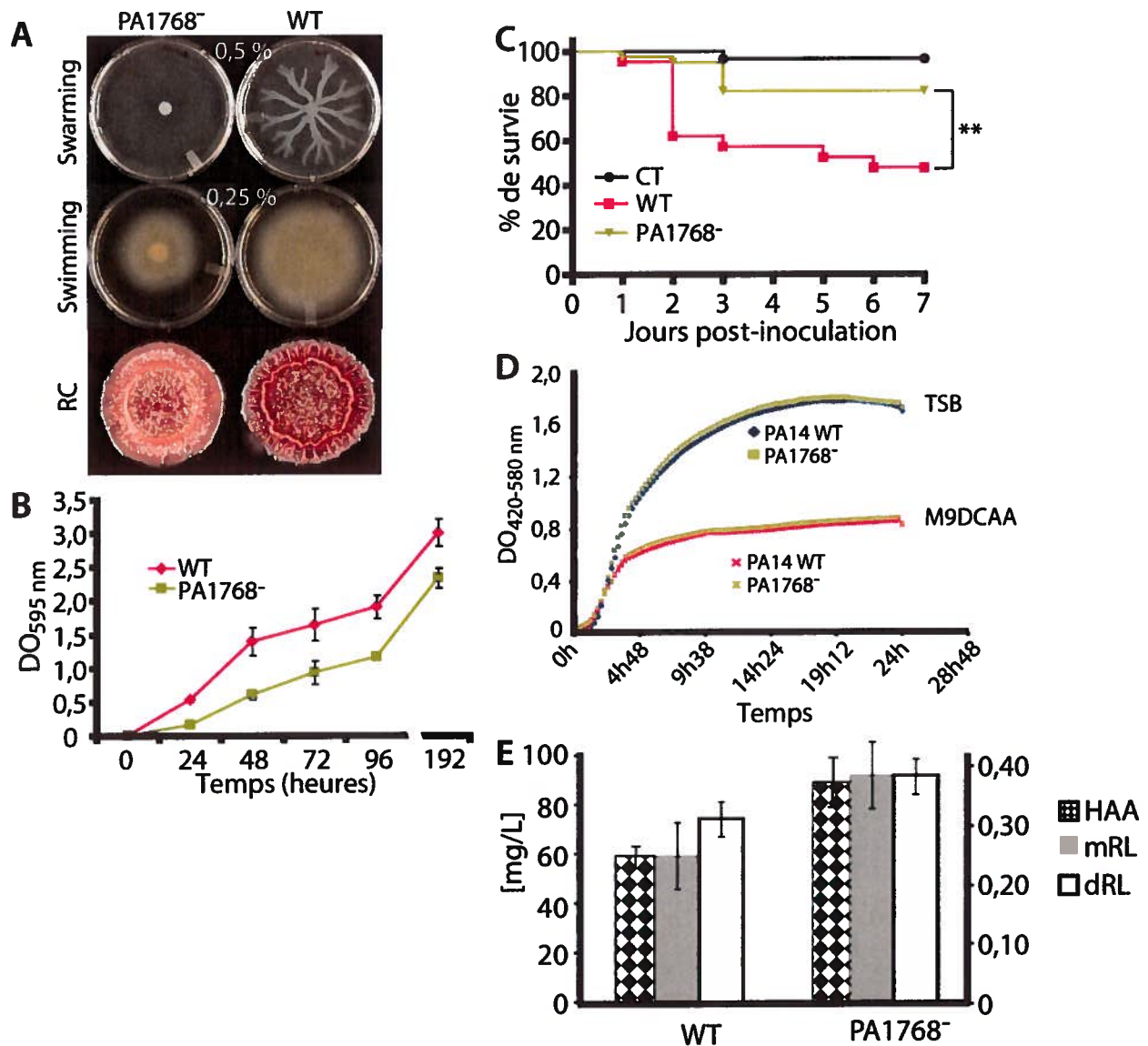


Figure 3.5.3. Différents phénotypes du mutant PA1768<sup>-</sup>.

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le *swarming*

---

Influence de l'inactivation de PA1768 sur A) le *swarming*, B) la formation de biofilms en milieu statique, C) cinétique de mortalité chez *D. melanogaster*, D) la croissance et E) la production de rhamnolipides (axe de gauche → mRL/dRL; axe de droite → HAA).

#### 3.5.3.2 - Profil d'expression d'un mutant PA1768<sup>-</sup> sur biopuces

Afin de déterminer quels sont les gènes affectés par l'inactivation de PA1768, un profil transcriptomique de PA1768<sup>-</sup> a été effectué en utilisant comme témoin les conditions précédemment décrites par notre groupe (*i.e.* centre de *swarming*, extrémité de dendrites et non-*swarming*) (voir section 3.2.4.3.3 et 3.2.4.3.4) (Tremblay & Deziel, 2010). Les gènes significativement différentiellement exprimés dans au moins une des comparaisons en utilisant un seuil de 1,5 log<sub>2</sub> sont rapportés au tableau 3.5.1. L'aspect le plus frappant dans cette liste de gène est de constater que le opérons *flgBCDE* et *flgFGHIJK* ainsi que la pompe à efflux codée par *mexXY* sont surexprimés chez PA1768<sup>-</sup>. Il est intéressant de noter que les gènes PA2365-67, associés au SST6 sont également régulés à la hausse chez ce mutant.

Parmi les autres gènes, on retrouve majoritairement des protéines hypothétiques. Il est aussi intrigant de constater que les gènes PA1766-67 sont régulés à la hausse chez PA1768<sup>-</sup>. À l'aide de la banque de mutants PA14NR, des mutants dans tous les gènes disponibles du tableau 3.5.1 ont été testés. Seuls les gènes PA2019, PA1911, PA2365, PA2367, PA2402, PA2637 et PA2753 n'avaient pas de mutants correspondants. Parmi tous les mutants testés, seules les souches inactivées dans les gènes *flgBCDE* et *flgFG* étaient inhibées dans le *swarming*.

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le swarming

Tableau 3.5.1. Gènes différentiellement exprimés chez le mutant PA1768<sup>-</sup>.

# Gène*	Opéron <sup>4</sup>	Nom gène	Produit	Changement d'expression (log <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>		
				PA1768 <sup>-</sup> vs Centre de swarming	PA1768 <sup>-</sup> vs Extrémité de	PA1768 <sup>-</sup> vs non-swarming
PA0052	∅		Protéine hypothétique contrôlée par le QS	0,7	1,5	0,3
PA0572	∅		Protéine hypothétique contrôlée par le QS	0,7	1,8	0,6
PA0817	∅		dioxygénase probable	1,6	1,3	0,1
PA1077 <sup>1</sup>	PA1077-80	<i>flgB</i>	Protéine de corps basale flagellaire FlgB	1,8	1,6	1,8
PA1078 <sup>1</sup>	PA1077-80	<i>flgC</i>	Protéine de corps basale flagellaire FlgC	1,6	1,7	1,9
PA1079 <sup>1</sup>	PA1077-80	<i>flgD</i>	Protéine de corps basale axial flagellaire FlgD	1,8	1,8	2,1
PA1080 <sup>1</sup>	PA1077-80	<i>flgE</i>	Crochet flagellaire FlgE	1,6	1,8	1,8
PA1081 <sup>1</sup>	PA1081-86	<i>flgF</i>	Protéine de corps basale flagellaire FlgF	1,4	1,4	1,8
PA1082 <sup>1</sup>	PA1081-86	<i>flgG</i>	Protéine de corps basale flagellaire FlgG	1,5	1,6	1,6
PA1083 <sup>3</sup>	PA1081-86	<i>flgH</i>	Protéine flagellaire d'anneau en L FlgH	1,0	1,2	1,1
PA1084 <sup>3</sup>	PA1081-86	<i>flgI</i>	Protéine flagellaire d'anneau en P FlgI	1,0	1,4	1,3
PA1085 <sup>3</sup>	PA1081-86	<i>flgJ</i>	Protéine flagellaire FlgJ	1,2	1,3	1,3
PA1086 <sup>3</sup>	PA1081-86	<i>flgK</i>	Protéine associée au crochet flagellaire FlgK	1,3	1,4	1,3
PA1441	∅		Protéine hypothétique	1,2	1,6	1,2
PA1546	∅	<i>hemN</i>	Oxidase de coproporphyrinogène III indépendante de l'oxygène	-0,8	-1,3	-2,2
PA1555	PA1557-55		Cytochrome c probable	-0,8	-1,4	-1,5
PA1556	PA1557-55		Sous-unité de cytochrome c probable	-0,8	-1,6	-1,7
PA1557 <sup>3</sup>	PA1557-55			-0,8	-1,0	-1,4
PA1673	∅		Protéine hypothétique	-0,4	-0,3	-1,7
PA1766	PA1768-66		Protéine hypothétique	2,2	1,9	2,5
PA1767	PA1768-66		Protéine hypothétique	2,4	1,9	2,9
PA1911	PA1912-11	<i>femR</i>	Facteur sigma régulateur, FemR	0,5	1,6	0,2
PA1967	∅		Protéine hypothétique	1,8	2,0	1,6
PA2018	PA2018-19	<i>mexY</i>	Pompe à efflux de type RND, MexY	2,2	2,2	2,1
PA2019	PA2018-19	<i>mexX</i>	Pompe à efflux de type RND, MexY	2,8	3,0	2,6
PA2365	PA2365-72	<i>hsiC3</i>	Protéine sécrétée par le système de sécrétion de type VI	1,2	1,5	0,3
PA2366	PA2365-72	<i>hsiF3</i>	Protéine de sécrétion de type VI, EvpB	0,9	1,7	0,4
PA2367	PA2365-72	<i>hcp3</i>	Effecteur du système de sécrétion de type VI de la famille Hcp1	0,4	1,5	0,4
PA2402	∅	<i>pvdI</i>	Peptide synthase non-ribosomal PvdI, synthèse de pyoverdine	0,6	1,8	0,3
PA2442	PA2442-46	<i>gcvT2</i>	Protéine de clivage de glycine T2	0,4	1,7	0,2
PA2451	PA2452-51		Protéine hypothétique	0,7	1,7	0,7
PA2531	∅		Aminotransférase probable	1,3	1,8	0,7
PA2637	PA2637-49	<i>nuoA</i>	Déshydrogénase de NADH I, chaîne A	-0,9	-1,6	-0,1
PA2753	∅		Protéine hypothétique	-0,4	-0,4	-1,8
PA3408	∅	<i>hasR</i>	Précurseur de récepteur hème membranaire, HasR	0,6	1,6	0,2
PA4142	PA4142-44		Protéine sécrétée probable régulée par le QS	0,4	1,6	0,2
PA4348	∅		Protéine hypothétique conservée	-0,6	-1,3	-1,6



### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le *swarming*

PA4587	∅	<i>ccpR</i>	Précuseur de peroxidase c551	-0,6	-0,8	-1,5
PA5181	PA5180-81		Oxidoréductase probable	0,0	-1,5	-0,5
tRNA Leu	∅		ARNt leucine	-0,3	-1,5	-0,4
tRNA Val	∅		ARNt valine	-0,8	-1,5	-0,2

\*: Des mutants dans les gènes PA2019, PA1911, PA2365, PA2367, PA2402, PA2637 et PA2753 ne sont pas disponibles dans la banque PA14NR. Il est donc impossible de conclure au sujet de leur effet sur la *swarming*.

<sup>1</sup> : des mutants dans ces gènes sont incapables de *swarming*.

<sup>2</sup> : Un nombre positif signifie que le gène est régulé à la hausse chez le mutant PA1768<sup>-</sup> alors qu'un nombre négatif signifie une régulation à la baisse.

<sup>3</sup> : Ces gènes n'ont pas été initialement sélectionnés pour le criblage de motilité *swarming* à cause qu'ils présentaient des valeurs inférieures au seuil de 1,5 log<sub>2</sub>.

<sup>4</sup> : Les opérons ont été prédits (Mao *et al.*, 2009) ou démontrés expérimentalement.

∅ : Pas d'opéron ou d'opéron prédits.

#### 3.5.3.3 - Autres gènes impliqués dans des voies de signalisation GG

Dirix *et al.*, (2004) ont effectué une analyse *in silico* visant à identifier des nouveaux gènes impliqués dans un hypothétique système de QS chez les bactéries à Gram(-). En plus de PA1768 (PA14\_41690), ils ont identifié les gènes suivants comme ayant un motif GG chez *P. aeruginosa* :

- PA4139 / PA14\_10380
- PA4141 / PA14\_10360
- PA1951 / PA14\_39270

Des mutants dans les gènes PA4141 et PA1951 ne sont pas affectés dans le *swarming*. Aucun mutant n'était disponible pour le gène PA4139. Dirix *et al.*, (2004) ont aussi identifié par analyses *in silico* des gènes codants pour des transporteurs ABC ayant un domaine peptidase C39. Ces domaines sont responsables du clivage des peptides autoinducteurs à motif GG. Ces gènes sont :

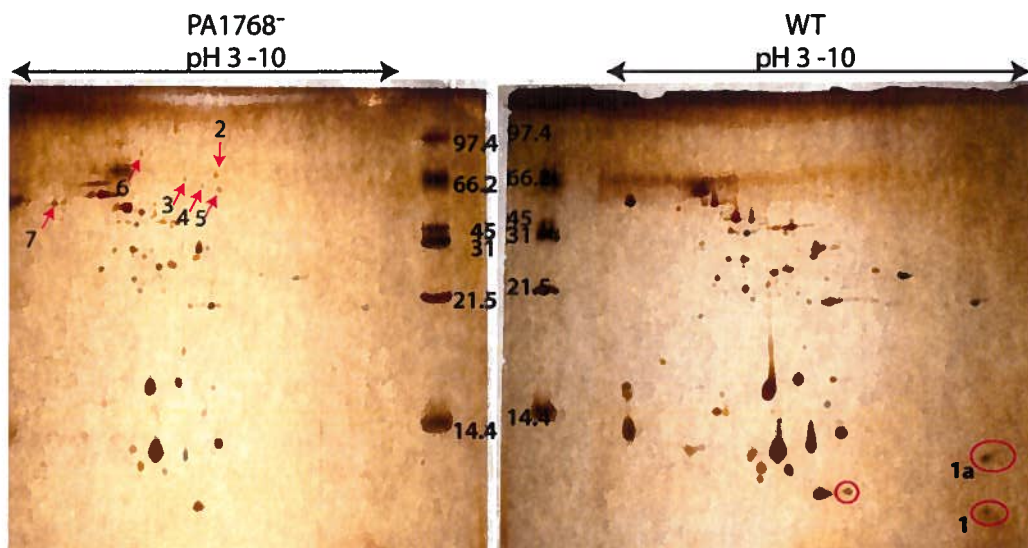
- PA4143 / PA14\_10340
- PA1762 / PA14\_41780
- PA2778 / PA14\_28150
- PA1953 / PA14\_39250

Encore une fois, aucun de ces mutants n'est affecté dans le *swarming* dans nos conditions.

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le swarming

#### 3.5.3.4 - Vérification que le peptide PA1768 est sécrété

Afin de vérifier que le peptide codé par PA1768 est bien sécrété dans l'espace extracellulaire, des profils de protéines extracellulaires de la souche sauvage et du mutant PA1768<sup>-</sup> ont été comparés par gels 2D (Fig. 3.5.4). L'hypothèse étant que le mutant PA1768<sup>-</sup> ne sécrète pas le peptide codé par PA1768 et que cette différence serait visible via la présence d'un « spot » correspondant à ce peptide sur le gel 2D. Les « spots » #1 et #1a illustrés à la figure 3.5.4 ont été découpés puis identifiés par spectrométrie de masse. Toutefois, aucun résultat concluant n'a pu être obtenu. Les « spots » identifiés par les chiffres 1 à 7 montrent des protéines surexprimées chez la souche sauvage. Ces protéines n'ont cependant pas été identifiées.



**Figure 3.5.4.** Profils des protéines extracellulaires du mutant PA1768<sup>-</sup> et de la souche sauvage. Chaque gel contient 100 µg de protéines extracellulaire précipité au TCA. Les échelles moléculaires situées dans la partie interne de chaque gel sont exprimées en kDa.

#### 3.5.4 - Discussion

Des résultats de criblage pour le *swarming* provenant de mes résultats de maîtrise ont mené à investiguer le gène PA1768. Un mutant dans ce gène est incapable de *swarming*, mais conserve tout de même la capacité à faire de la motilité de type *swimming* et n'est pas affecté dans la production de biosurfactants (Fig. 3.5.3). Il est frappant de constater une régulation à la

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le *swarming*

---

hausse de gènes codant pour des composantes de l'appareil flagellaire (*flgBCDE* et *flgFGHIJK*) chez PA1768<sup>r</sup>. Une surexpression de gènes flagellaires laisse instinctivement penser à une surexpression du *swarming* comme étant une conséquence logique. Cependant, il a été montré que la surexpression de *flgE* chez *Salmonella* entraîne la formation de structures appelées *polysuperhooks* (Muramoto *et al.*, 1999) qui correspondent à des flagelles possédant plusieurs crochets flagellaires. L'assemblage du flagelle est un processus hautement régulé et sensible (Aldridge & Hughes, 2002). Des mutants dans des gènes structuraux ou des gènes impliqués dans la régulation de l'assemblage du flagelle entraînent la formation de flagelles partiellement ou non fonctionnels. Par exemple, le rôle de FliK est de réguler la longueur du crochet flagellaire et un mutant dans le gène codant pour cette protéine synthétise un flagelle anormalement long avec plusieurs crochets flagellaires (*polyhook*) (Aldridge & Hughes, 2002). Un mutant *fliK* chez *Helicobacter pylori* est incapable de motilité *swimming* (Ryan *et al.*, 2005). Considérant cela, il serait possible que la surexpression des opérons *flgBCDE* et *flgFGHIJK* (comprenant diverses protéines de l'appareil flagellaire tel que des crochets flagellaire, protéine flagellaire d'axe basale et protéine flagellaire de modification d'axe basal) provoque la synthèse de flagelles chimériques et donc, inefficaces comparés à ceux produits par la souche sauvage. Des observations de cellules PA1768<sup>r</sup> au microscope électronique ont été effectuées, mais il était difficile de tirer des conclusions sur la morphologie du flagelle par cette méthode. Il est possible qu'un protocole complexe de purification de flagelles tel que ceux décrits (Kojima *et al.*, 1999; Aldridge & Hughes, 2002; Ryan *et al.*, 2005) soit nécessaire pour examiner de façon concluante les différences morphologiques de ces appendices cellulaires. La surexpression de ces protéines flagellaires pourrait aussi expliquer pourquoi le mutant PA1768<sup>r</sup> forme des colonies très rugueuses sur rouge Congo comparé au type sauvage (Fig. 3.5.3A). En effet, le phénotype de colonie rugueuse de *Salmonella enteritidis* est notamment associé à l'hyperflagellation (Guard-Petter *et al.*, 1996). En général, l'expression de l'opéron *pel* est associée à la formation de biofilms robustes (*e.g.* biofilms cultivés en milieu statique) et de colonies rugueuses sur milieu rouge Congo (Friedman & Kolter, 2004). Ces gènes codent pour des exopolysaccharides, un des composants principaux de la matrice extracellulaire servant à former les biofilms (Flemming & Wingender, 2010). Il serait improbable que le phénotype

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le swarming

---

intensément rugueux de PA1768<sup>-</sup> soit dû à l'augmentation de l'expression des gènes *pel* étant donné que ce mutant forme aussi des biofilms moins robustes que la souche sauvage (Fig. 3.5.3B). De plus ces gènes ne sont pas différentiellement exprimés dans le transcriptome (tableau 3.5.1.).

Les résultats rapportés dans cette section suggèrent que le peptide codé par PA1768 est impliqué d'une certaine manière dans la modulation de l'expression de *flgBCDE* et *flgFGHIJK* et donc de l'assemblage flagellaire. Il est très intéressant d'envisager la possibilité qu'un peptide à motif GG puisse réguler la synthèse/assemblage du flagelle et la motilité chez une bactérie à Gram(-). À l'aide d'analyses *in silico*, Dirix *et al.*, (2004) ont prédits plusieurs gènes ayant des motifs GG chez des bactéries à Gram(-) dont *P. aeruginosa*. Au meilleur de nos connaissances, aucune fonction d'un peptide à motif GG n'a été expérimentalement démontrée chez les bactéries à Gram(-). Tel que nos données d'expression l'indiquent, les gènes PA1767-66 semblent être dans le même opéron. En effet, le transposon MAR2xT7 possède un promoteur constitutif T7 à chacune de ses extrémités (Liberati *et al.*, 2006), ce qui provoque la production de transcrits chez les régions adjacentes au transposon. Chez le mutant PA1768<sup>-</sup> utilisé pour cette étude, l'insertion transpositionnelle se trouve à l'extrémité terminale du gène PA1768 (Fig. 3.5.1), ce qui expliquerait pourquoi PA1767-66 sont surexprimés. De plus, les gènes PA1768-66 sont fortement prédits pour être un opéron (Mao *et al.*, 2009). Cependant, T7 n'est pas un promoteur reconnu par *P. aeruginosa*. Il faut donc à tout le moins considérer l'existence d'un élément régulateur négatif (par exemple, un petit ARN) sur le brin chromosomique complémentaire dont l'expression est inhibée par le transposon.

*P. aeruginosa* possède plusieurs pompes à efflux de type RND, incluant MexXY-OprM (Poole & Srikumar, 2001; Schweizer, 2003; Poole, 2005). Ce complexe expulse les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (comprends notamment la gentamicine, kanamycine et tobramycine). Selon nos données, l'opéron *mexXY* (PA2019-18) est régulé à la hausse chez le mutant PA1768<sup>-</sup>. Des études suggèrent une co-régulation entre *mexXY* et certains gènes des opérons flagelline (*flgBCDE* et *flgFGHIJK*) sans toutefois dégager de consensus. Des cellules exposées à des doses sous-létales de gentamicine et tobramycine surexpriment *mexXY* (Linares *et al.*, 2006) et dans une moindre mesure, *flgE* et *flgK* (Marr *et al.*, 2007). Au contraire, *flgB* et

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le *swarming*

---

*flgF* sont régulés à la baisse dans des conditions similaires (Linares *et al.*, 2006). Chez *P. aeruginosa* et *B. subtilis*, une dose sous-létale de l'antibiotique muciprocine et plus généralement de macrolides, entraînent une régulation à la baisse de l'expression des flagelles (Kawamura-Sato *et al.*, 2000; Horii *et al.*, 2003). Un biofilm de *P. aeruginosa* exposé à de l'imipènème (famille des  $\beta$ -lactames) montre une régulation à la baisse des gènes *flgCDE* et *flgFI* (Bagge *et al.*, 2004). Un peptide antimicrobien humain cause aussi une diminution de l'expression de *flgB* et *flgK* chez *P. aeruginosa* (Overhage *et al.*, 2008). Une autre étude a toutefois montrée qu'à des doses létales, les opérons codant pour la flagelline sont régulés à la baisse alors que *mexXY* (mais pas les gènes des opérons flagelline) est surexprimé lorsque les bactéries sont exposées à une dose non-létale (Kindrachuk *et al.*, 2011).

Une concentration élevée de di-GMP cyclique est associée à la sous-expression des gènes *flgBCDE* et *flgFGHK* (Starkey *et al.*, 2009), ce qui est en accord avec le dogme voulant que la présence de cette molécule soit associée à la phase sessile (non-motile) (Hengge, 2009). Il est possible que la surexpression des gènes codants pour la flagelline chez PA1768<sup>-</sup> soit causée par une faible concentration de di-GMP cyclique. Une souche de *P. aeruginosa* rugueuse et formant des biofilms robustes isolée de poumons d'un patient atteint de la fibrose kystique montre une hausse d'expression de *flgD* et *flgF* (Starkey *et al.*, 2009). Aucun détail n'est cependant disponible sur le phénotype *swarming* de cette souche.

Il reste difficile d'expliquer pourquoi *mexXY* est surexprimé chez le mutant PA1768<sup>-</sup> alors qu'aucun antibiotique n'est présent dans le milieu de culture. Alors qu'il est clairement établi que la présence de certains antibiotiques active l'expression de *mexXY* (Poole, 2005), une relation moins bien comprise semble aussi exister entre la présence d'antibiotiques (ou agent anti-microbiens) à faible doses et l'expression des gènes codant pour la flagelline (Kawamura-Sato *et al.*, 2000; Horii *et al.*, 2003; Linares *et al.*, 2006; Marr *et al.*, 2007). Peut-être que le peptide hypothétique PA1768 est impliqué d'une quelconque manière dans la régulation de ces gènes (*mexXY*, *flgBCDE* et *flgFGHIJK*). Par rapport à cela, notons que des mutants dans les gènes PA1766 et PA1767 exhibent une résistance accrue à la ceftazidime et tobramycine (Schurek *et al.*, 2008; Wiegand *et al.*, 2008; Dotsch *et al.*, 2009).

### 3.5 Rôle du gène PA1768 dans le *swarming*

---

Le gène PA1911 est surexprimé chez le mutant PA1768<sup>-</sup> et aussi dans le mutant  $\Delta hptB$  par rapport à des bactéries d'extrémités de dendrites de la souche sauvage (section 3.4, tableau 3.4.3). Tel qu'expliqué précédemment à la section 3.4.5, nos données d'expression de biopuces suggèrent que ce gène est en fait régulé à la hausse pour la condition non-*swarming*. Sa valeur de changement d'expression étant toutefois légèrement en deçà du seuil arbitraire de 1,5 log<sub>2</sub>, il n'a pas été retenu dans l'analyse de la section 3.2.

Nos données montrent également une régulation à la baisse de PA1555-57. L'expression de cet opéron est réprimée lorsque les bactéries sont exposées au stress oxydatif (Salunkhe *et al.*, 2005). Le rôle des opérons *ccoNOQP-1* (PA1552-54) et *ccoNOQP-2* (PA1555-57) dans le *swarming* a été abordé à la section 3.2. Le premier de ces opérons est surexprimé chez les populations d'extrémité de dendrite (Tremblay & Deziel, 2010) et plus généralement lorsque la quantité d'O<sub>2</sub> est abondante (Comolli & Donohue, 2004; Kawakami *et al.*, 2009). *ccoNOQP-2* est sous-exprimé en conditions limitantes en oxygène (Comolli & Donohue, 2004). Cela suggère que les bactéries PA1768<sup>-</sup> sont limitées en O<sub>2</sub>, hypothétiquement à cause de la présence d'une imposante matrice extracellulaire tel qu'observé sur gélose rouge Congo (Fig. 3.5.3A.).

#### 3.5.5 - Perspectives

Les prochaines étapes à effectuer dans le cadre de ce projet seraient de surexprimer PA1768 sur un plasmide multicopie pour observer comment le *swarming* et la motilité en général seraient affectés. Il serait aussi bénéfique de créer un mutant « propre » (*i.e.* délétion en cadre de lecture du motif GG) du gène PA1768 pour s'assurer d'éliminer toute interférence pouvant être causée par les éléments superflus du transposon Mar2xT7. Par exemple, on observe une surexpression des gènes PA1766 et PA1767 dans le mutant PA1768<sup>-</sup>. Il est bien sûr possible que le peptide potentiellement sécrété par PA1766-PA1767 affecte la régulation de PA1768. Mais il est aussi possible que le promoteur T7 se trouvant aux deux extrémités du transposon MARr2xT7 induit la transcription de PA1767 et PA1766. De plus, l'insertion de MAR2xT7 dans PA1768 devrait logiquement résulter en une mutation polaire. Considérant cela, PA1767-66 ne devraient pas être exprimés, car ils sont en aval de PA1768 dans l'opéron. Un élément régulateur sur le brin chromosomique complémentaire pourrait aussi être

### **3.5 Rôle du gène PA1768 dans le *swarming***

---

responsable du niveau d'expression de PA1767-66. Des expériences de qRT-PCR pourraient ensuite être effectuées pour confirmer les données du tableau 3.5.1. Finalement, il serait impératif de parvenir à purifier le peptide codé par PA1768. Des profils de protéines par gels 2D ont été effectués entre la souche sauvage et PA1768<sup>-</sup>. De la figure 3.5.4, deux « spots » d'environ 9 kDa à pH 9 (point isoélectrique prédit du peptide PA1768 (ExpASy proteomics server) sont présents sur le gel de PA1768<sup>-</sup>. Leurs identifications n'ont pas été concluantes, possiblement à cause d'une quantité de matériel trop faible. Une alternative pourrait être de purifier ce peptide par chromatographie liquide à haute performance.

# 4

# Conclusion



# 4.1 - Vue d'ensemble

## 4.1.1 - Récapitulation

Le but de mon programme de recherche de doctorat était de caractériser la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*. Lorsque j'ai entrepris mes travaux de recherche sur ce sujet, les seuls facteurs connus comme étant nécessaires à ce type de motilité étaient principalement la biosynthèse d'un biosurfactant (constitué de RL et HAA) comme agent mouillant et la présence d'un flagelle polaire fonctionnel. Contrairement à de nombreux autres organismes chez lequel ce type de motilité est étudié, *P. aeruginosa* ne présente pas de différenciation morphologique en *swarming* (*i.e.* élongation cellulaire et synthèse de flagelles additionnels), donc absence de repères visuels facilement observables. Cela complique l'étude de ce phénomène chez cet organisme.

Un criblage d'environ 10 000 mutants par transposition aléatoire réalisé pendant mes travaux de maîtrise avait permis de mettre en évidence de nombreux gènes impliqués dans le *swarming* chez *P. aeruginosa*. Cependant, la totalité de ces mutants était déficient soit dans la synthèse de rhamnolipides ou la présence d'un flagelle fonctionnel, mais aucun mutant déficient dans le *swarming* seulement. Il est à noter que notre criblage couvrait environ 70% des cadres de lectures de *P. aeruginosa* et était donc incomplet. Toutefois, suite aux difficultés inhérentes aux manipulations occasionnées par ce type de criblage à grande échelle, cette approche a été laissée de côté.

Nous avons donc adopté une stratégie alternative, soit d'établir le profil transcriptomique de bactéries en *swarming*. En plus de fournir des renseignements sur la dynamique transcriptionnelle propre à ce phénomène de surface, ce projet a permis de mettre en évidence qu'une colonie *swarming* contient au moins deux populations bactériennes distinctes effectuant chacune des tâches spécifiques (population du centre de *swarming* vs bactéries des extrémités de dendrites).

Une analyse poussée des résultats de l'étude transcriptomique a attiré notre attention sur un gène en particulier régulé à la baisse chez les bactéries des extrémités de dendrites. Ce gène, PA3346 fait partie d'une cascade de signalisation impliquant des protéines prédites pour

## 4 Conclusion

---

être des senseurs à deux composantes (2CS). Un article récent de Hsu et collègues (2008) (Hsu *et al.*, 2008) a suggéré plusieurs gènes/protéines potentiellement impliqués dans cette voie de signalisation. Des mutants dans chacun de ces gènes ont été testés pour le *swarming* et cette fois, trois gènes ont été trouvés impliqués dans le *swarming*, mais pas dans la synthèse de rhamnolipides et la fonctionnalité du flagelle. Il s'agit des gènes *hptB* et PA1611. L'implication de ces gènes est abordée à la section 3.3 de ma thèse. L'importance de cette découverte réside dans le fait que ces gènes constituent des marqueurs spécifiques uniquement à la motilité *swarming* et à aucun autre phénotype. Au meilleur de nos connaissances, c'est la première fois que de tels gènes sont rapportés chez *P. aeruginosa*.

### 4.1.2 - Signification écologique du *swarming*

Globalement, la motilité de type *swarming* est encore mal comprise. Depuis le temps où j'ai commencé à travailler sur ce sujet en 2005 – (des travaux de maîtrise aussi au sein du laboratoire du Dr Éric Déziel ayant précédé le doctorat), une quantité appréciable d'articles scientifiques ont été publiés sur le sujet. L'importance du *swarming* réside dans le fait que cela représente un modèle de multicellularité bactérienne alternatif au modèle classique du biofilm. Plus encore, ce phénomène est soupçonné de jouer un rôle dans le développement de biofilms. La différence fondamentale entre ces deux phénomènes (*swarming* vs biofilms) est que la signification écologique des biofilms est beaucoup mieux comprise que celle du *swarming*, probablement parce que les biofilms sont observables dans la nature et en environnement clinique et qu'il est donc plus facile de leur associer un rôle. Observer le *swarming* ailleurs que sur une surface préparée en laboratoire s'avère un défi beaucoup plus difficile avec les connaissances actuelles. Au moment d'écrire ces lignes, le *swarming* n'a jamais été rapporté comme ayant été observé *in vivo* dans un environnement naturel. Cette motilité a toujours été étudiée dans un contexte de laboratoire dans des conditions contrôlées en utilisant des souches bactériennes pures. À cet effet, les tests de *swarming* en laboratoire ont toujours été notoirement connus pour leur faible reproductibilité. Notre article rapporté à la section 3.1 paru dans *Journal of Basic Microbiology* (2008) a permis de démystifier les nombreux protocoles « ésotériques » de préparations de géloses *swarming* parues dans divers articles au

## 4 Conclusion

---

cours des années et d'établir des bases rigoureuses dans la préparation de ce type de gélose. Dans cet article nous soulignons l'importance de la quantité d'eau présente à la surface des géloses. Le *swarming* aura un aspect désordonné avec dendrites larges et diffus sur des géloses dont l'eau n'a pas été évaporée à la surface. Inversement, une gélose plus sèche permettra un phénotype de *swarming* avec dendrites définis et étroits.

Question qui m'est à tout coup posée après avoir donné un séminaire sur le *swarming*: « C'est bien beau tout ça, mais à quoi ressemble le *swarming* dans la « vraie » vie? » Tel que mentionné précédemment, cette motilité n'a jamais été observée dans des conditions naturelles. Mon opinion est que le *swarming* existe bel et bien dans l'environnement, mais à très petite échelle et surtout, très différent de ce qui est observé en laboratoire. On peut imaginer un amas de bactéries de *P. aeruginosa* « décider » d'envoyer quelques cellules *swarming* au front pour agrandir le territoire de la colonie en plein environnement hostile peuplé d'une pléiade d'autres microorganismes avec comme seul atout, une zone protectrice de rhamnolipides sécrétés par les bactéries restées en arrière.

C'est en fait les conclusions auxquelles nous arrivons suite aux résultats de l'article paru dans *BMC Genomics* (section 3.2) qui suggèrent que le *swarming* est en fait un moyen pour une population bactérienne de maximiser la vitesse de colonisation d'une surface en donnant cette tâche à une sous-population de cellules spécialisées dans la migration. Ces cellules bougent rapidement, dépensent beaucoup d'énergie (elles respirent beaucoup), mais n'expriment pas de facteurs de virulence, possiblement pour conserver leur énergie. Nous suggérons que les bactéries situées au bout des dendrites en migration servent en effet à étendre la population bactérienne pour que la colonie puisse maximiser son expansion. Théoriquement, elles sont donc sujettes à être sacrifiées au profit des bactéries responsables de l'installation permanente de la colonie au complet. Cela constituerait un bel exemple d'altruisme bactérien. Bien que ces bactéries ne produisent apparemment pas de facteurs de virulence, elles ne sont pas laissées totalement sans protection, elles migrent dans une zone riche en rhamnolipides qui en plus de leur propriété surfactante sont aussi des agents antimicrobiens. En environnement naturel, le *swarming* devrait vraisemblablement avoir lieu à une échelle microscopique.

## 4 Conclusion

---

Le groupe du Dr Rashika Harshey (Université du Texas, Austin), actif sur le *swarming* chez *Salmonella*, ont d'ailleurs suggéré la possibilité d'une relation non pas altruiste, mais bien égoïste chez les bactéries en *swarming* de cette espèce. À l'intérieur même d'un front de migration, des zones seraient plus favorables que d'autres à la survie des cellules et celles-ci lutteraient pour demeurer dans ces zones (Butler *et al.*, 2010).

La découverte que le gène *hptB* est étroitement lié au *swarming* est extrêmement importante (section 3.4). En effet, rappelons qu'un mutant dans ce gène est fortement défectueux dans ce type de motilité, mais n'est pas diminué ni dans la motilité *swimming* (flagelle fonctionnel) et ni dans la synthèse de rhamnolipides. Ce gène constitue donc un excellent marqueur pour mener des expériences visant à démontrer le rôle du *swarming* en environnement naturel. On peut facilement imaginer des expériences de mortalité/virulence avec divers modèles d'infection en utilisant une souche *hptB*<sup>-</sup>. Cela permettrait d'offrir des pistes de réponses à savoir si le *swarming* est impliqué dans la virulence. On pourrait aussi démystifier le rôle du *swarming* dans la colonisation/symbiose de racines de plantes dans la rhizosphère. Des articles suggèrent que le *swarming* est impliqué dans ce phénomène (revu dans Daniels *et al.*, (2004)), la plupart du temps en utilisant des mutants aflagellés ou non-producteurs de biosurfactants, mais jamais une souche incapable de *swarming* uniquement.

La question reste de savoir quel est ce signal environnemental détecté par la voie de signalisation dont fait partie HptB. Rappelons que plusieurs protéines transmembranaires de type senseur à deux composantes hybrides (dont PA1611) ont été démontrées expérimentalement (*in vitro*) comme étant capable de phosphoryler HptB (Hsu *et al.*, 2008). La nature du signal activant ces protéines transmembranaires demeure inconnue. Chez ces protéines, seuls des domaines relatifs à la transmission d'un groupement phosphorylé sont identifiables (Pfam - (Bateman *et al.*, 2004)). Il est toutefois intéressant de noter que ces protéines contiennent typiquement deux domaines transmembranaires conservés (Phobius - (Kall *et al.*, 2004)). Des analyses bioinformatiques poussées sur la portion extracytoplasmique ou intermembranaire des séquences de ces protéines pourraient mener à l'identification de motifs conservés et fournir des informations utiles par rapport à leur fonction. Plusieurs hypothèses concernant la nature du signal détecté peuvent être mises de l'avant.

## 4 Conclusion

L'abaissement de tension de surface semble être un des facteurs les plus communs aux bactéries en *swarming* (même chez celles ne sécrétant pas de biosurfactants). Il est donc possible que la tension de surface soit d'une certaine manière détectée. Peut-être qu'une faible tension de surface pourrait modifier la conformation tridimensionnelle d'un récepteur et activer celui-ci? Le lien entre le *swarming* et la voie de signalisation dans laquelle serait impliquée HptB/PA1611 reste largement à être caractérisé. Toutefois, en intégrant nos résultats à ceux disponibles dans la littérature, il est possible de spéculer sur leur rôle dans une hypothétique voie de signalisation tel qu'illustré à la figure 4.1.1. Dans ce modèle, PA1611 coderait pour un récepteur sensible à un signal au *swarming*, transmettant ce signal à HptB qui modulerait l'expression de RsmY/Z, puis conséquemment affecterait l'activité de RsmA et du *swarming*. Plusieurs éléments restent à être élucidés, notamment, le rôle des deux petits ARN RsmY/Z et du SST6 dans le *swarming*.

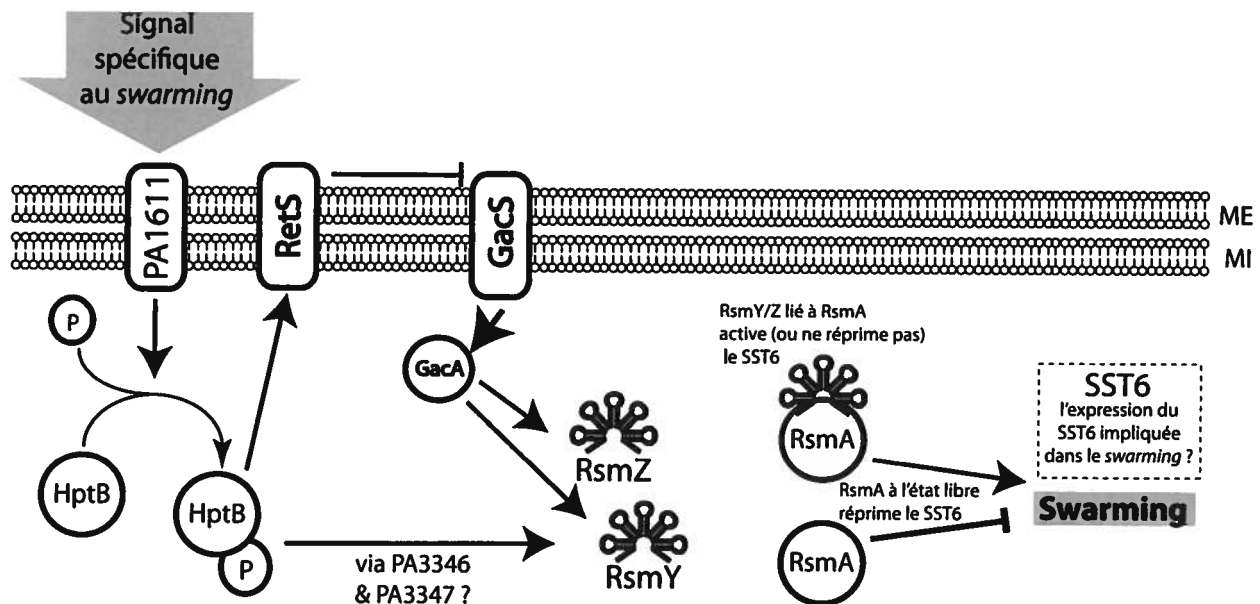


Figure 4.1.1. Voie de signalisation hypothétique dans laquelle HptB et PA1611 ont un rôle central. Schéma adapté de Bordi *et al.*, (2010) et Hsu *et al.*, (2008).

## 4 Conclusion

---

### 4.1.3 - Communication intercolonie

La signification de la surexpression du système de sécrétion de type VI chez le mutant  $\Delta hptB$  demeure nébuleuse et devra faire l'objet d'investigations additionnelles. Cependant, il est intéressant de constater que dernièrement, des découvertes ont montré que ce système de sécrétion serait impliqué dans la communication et/ou interactions interbactériennes (Konovalova *et al.*, 2009; Hood *et al.* 2010; Jani & Cotter, 2010). De plus, des produits codés par des gènes appelés *idABCDE* sont impliqués dans un système de reconnaissance de deux souches différentes de *B. subtilis* (Gibbs *et al.*, 2008; Gibbs & Greenberg, 2010). Deux de ces gènes présentent des similarités avec *vgrG* et *hcp* de *P. aeruginosa* (Gibbs *et al.*, 2008). Encore une fois, les interactions intercolonies de *P. aeruginosa* en *swarming* présentent un niveau de complexité supérieur à ce qui est observé chez d'autres bactéries, car deux colonies de la même souche de *P. aeruginosa* peuvent se détecter l'une par rapport l'autre en *swarming* alors que ce n'est pas le cas chez *B. subtilis*. Tel que rapporté dans la section 3.4, il semble qu'un mutant *hptB*<sup>-</sup> ne réponde pas aux rhamnolipides produits par une autre colonie. Le transcriptome montre que chez cette souche mutante, le système de sécrétion de type VI est surexprimé. Des expériences additionnelles seront nécessaires pour déterminer que la surexpression de ce système de sécrétion affecte le *swarming*. Il est toutefois évident que la perte de la voie de signalisation dont fait partie HptB provoque une coupure dans l'intégration d'une information provenant de l'extérieur de la cellule pour la régulation de fonctions liées au *swarming*. Il est tentant de proposer que cette information pourrait en fait être la présence de rhamnolipides ou HAA ou le niveau de tension de surface (modulé par ces biosurfactants). Purifier des rhamnolipides (dRL/mRL) et HAA permettrait de déterminer à laquelle (ou auxquelles) de ces molécules le mutant  $\Delta hptB$  n'est pas capable de réagir. Des mutants *rhIB*<sup>-</sup> et *rhIC*<sup>-</sup> seraient aussi utiles dans ce genre d'expérience.

En 2007, dans l'article publié par notre groupe (Tremblay *et al.*, 2007) , un modèle impliquant les HAA/RL a été avancé pour tenter d'expliquer comment deux colonies *swarming* sont capables de se « reconnaître » et s'éviter. Existe-t-il des récepteurs spécifiques aux HAA/RL? Peu après la publication de cet article, un autre groupe a rapporté que de manière générale, des acides gras à doubles embranchements ayant une structure analogue aux HAA

## 4 Conclusion

---

inhibent le *swarming* (Inoue *et al.*, 2008). Ceci suggère que la détection de ces molécules par *P. aeruginosa* ne passe pas nécessairement par des récepteurs, mais plutôt par le fait qu'elle module la tension de surface d'une manière qui n'est tout simplement pas adéquate à ce type de motilité. Des résultats non inclus dans cette thèse nous ont aussi montré que des dendrites en *swarming* sont fortement attirées par certains surfactants commerciaux et repoussés par d'autres comme le SDS. Peut-être que les propriétés physico-chimiques de ces molécules appliquées à une surface présentent des subtilités qui influenceraient le *swarming*.

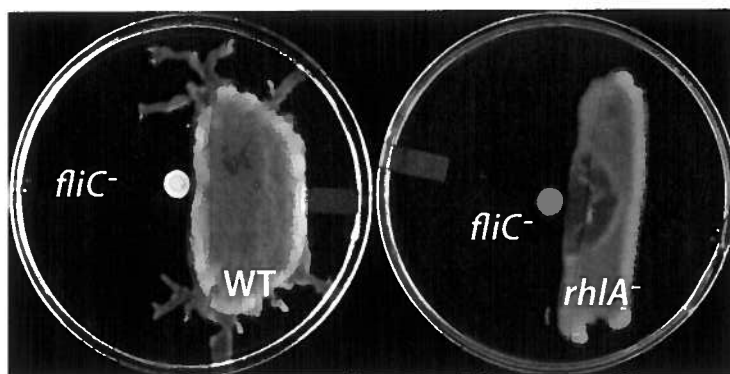
Il est possible d'imaginer que des protéines transmembranaires (PA1611 par exemple) soient capables de détecter les propriétés physico-chimiques présentes dans leur environnement direct. Est-ce que les protéines VgrG et autres rapportées dans l'article de Hood *et al.*, (2010) sécrétées par le SST6 pourraient être des ligands potentiels de ces protéines membranaires sensibles à ce signal de surface? Ceci pourrait expliquer pourquoi un mutant  $\Delta hptB$  se montre insensible à des RL/HAA exogènes et par conséquent incapable d'effectuer du *swarming*.

Un autre aspect particulièrement frappant de la communication intercolonie est que les populations d'extrémité de dendrites seulement semblent sensibles aux HAA/RL (Caiazza *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2007). Cependant, tel qu'illustré à la figure 4.1.2, les bactéries se situant plus en arrière (*i.e.* non différenciées en cellules *swarming*) ne semblent pas affectées par des HAA/RL exogènes. Cette figure illustre bien ce phénomène : des bactéries de souche sauvage non différenciées en dendrite ne réagissent pas aux HAA/rhamnolipides sécrétés par un mutant *fliC*. Au contraire, des bactéries *rhIA*<sup>-</sup> (non différenciées en dendrites *sic*) semblent se sauver, des HAA/rhamnolipides produits par le mutant *fliC* (Fig.4.1.2 – panneau de droite). Pour cette expérience, nous pouvons assumer que la réponse d'évitement est causée par des HAA/RL car lorsque deux mutants *rhIA*<sup>-</sup> sont inoculés l'un à côté de l'autre, il n'y a pas de réponse d'évitement (données non-montrées). Il est possible que les bactéries de souche sauvage soient insensibles aux HAA/rhamnolipides exogènes de *fliC* parce qu'elles sont en quelque sorte déjà sensibilisées aux surfactants qu'elles produisent elles-mêmes. Dans une colonie en *swarming*, les bactéries se trouvant dans la région centrale de la colonie ne sont possiblement plus différenciées après quelques heures d'incubation; seules les extrémités de dendrites en

## 4 Conclusion

---

migration (loin du centre) sont différenciées. Cela pourrait être causé entre autre par une saturation envers les RL/HAA chez les cellules du centre. Rappelons que ces biosurfactants semblent plus fortement produits au centre d'une colonie en *swarming* (Déziel *et al.*, 2003; Tremblay & Deziel, 2010). Ces résultats suggèrent aussi que les rhamnolipides soient nécessaires à la différenciation d'une colonie végétative en colonie *swarming*. Il serait possible que des bactéries d'un mutant *rhlA*<sup>-</sup> ne forment pas de cellules dendritiques spécialisées, car elles ne produisent pas de HAA/rhamnolipides nécessaires au déclenchement à la différenciation cellulaire. Tel que montré à la figure 4.1.2, un mutant *rhlA*<sup>-</sup> est toutefois prêt à détecter des RL/HAA exogènes. Cette différenciation est toutefois propre à des bactéries en *swarming* (ou vivant en surface) qui sont sensibles aux RL/HAA contrairement aux cellules en motilité de type *swimming* (Tremblay *et al.*, 2007).



**Figure 4.1.2.** Réponse de *P. aeruginosa* face à des rhamnolipides/HAA exogènes. Des biosurfactants exogènes n'affectent pas les cellules non-différenciées en dendrites chez la souche sauvage. Toutefois, un mutant *rhlA*<sup>-</sup> réagit fortement à des biosurfactants exogènes.

### 4.1.4 - Difficultés inhérentes à l'étude du *swarming*

Une thèse de doctorat sur le *swarming* ne saurait être complète sans parler des difficultés importantes rencontrées dans l'étude de ce comportement multicellulaire. La difficulté principale réside dans le fait que le *swarming* est un phénomène de surface et qu'historiquement, les bactéries, particulièrement *P. aeruginosa*, sont étudiées en culture liquide. Cela fait en sorte que la majorité des techniques de laboratoire mises au point au travers des années sont spécialement désignées pour des milieux liquides. En effet, les techniques d'extraction d'ADN/ARN et de protéines par exemple sont toujours optimisées pour



## 4 Conclusion

---

des bactéries cultivées en bouillons. Nous avons réussi à contourner cet obstacle concernant l'extraction d'ARN en récoltant des bactéries cultivées en surface pour les transférer ensuite dans un microtube. À partir de là, les protocoles standards d'extractions standards peuvent être suivis. Toutefois, nous n'avons trouvé aucune méthode satisfaisante concernant l'extraction de protéines extracellulaires à partir d'une surface gélosée, en effet comment extraire des protéines qui se trouvent littéralement dans l'agar d'une gélose? Et surtout, comment en extraire des quantités suffisantes pour d'éventuelles analyses? Le même problème existe pour la sécrétion de petites molécules par une population bactérienne cultivée en surface. Comment identifier et quantifier ces molécules directement sur la surface d'une gélose? Par exemple, dans l'article Tremblay et collègues (2007), nous démontrons que les HAA/rhamnolipides synthétisés par une colonie *swarming* diffusent selon un gradient en s'éloignant du centre de la colonie. Par des méthodes indirectes, nous sommes arrivés à cette conclusion, mais nous n'avons jamais réussi à prouver directement que c'est bien ce qui se produit *in vitro*. En effet, comment mesurer un gradient de molécules en faible concentration directement sur une surface gélosée? Bien comprendre ce type de motilité, mais aussi tout phénomène ayant lieu sur une surface nécessitera le développement de nouvelles méthodes adaptées à la vie en surface. La méthode d'extraction de protéines extracellulaires directement à partir d'une gélose décrite à la section 3.4.3.9 (projet HptB) fonctionne, mais elle demeure néanmoins fastidieuse à cause de la très grande quantité de gélose nécessaire et ne permet pas l'extraction de protéines s'étant faufilees à travers les mailles de l'agar.

## 4.2 - Perspectives

La piste la plus prometteuse du projet *swarming* passe, selon moi, par la caractérisation du système de signalisation dans lequel sont impliqués HptB, et PA1611 tel que décrit au chapitre 3. L'intérêt pour PA1611 est que cette protéine membranaire pourrait être impliquée dans la détection du fameux stimulus spécifique au *swarming* (l'équivalent du *saint-graal* de l'étude du *swarming*) d'un signal extracellulaire spécifique au *swarming*. Ce signal serait transmis à HptB qui servirait de relais dans une voie de signalisation propre à ce type de

## 4 Conclusion

---

motilité. Ces produits seraient possiblement impliqués. De plus, au moment d'écrire ces lignes, le SST6 est un sujet de recherche en pleine effervescence et il semble que ce système de sécrétion soit impliqué dans la communication interbactériennes voir interspèces (Gibbs *et al.*, 2008; Gibbs & Greenberg, 2010). Ainsi, il serait important de rapporter ces découvertes dans l'optique de la communication intercolonie qui existe entre deux colonies *swarming* distinctes. Quant à la souche *hptB*<sup>-</sup>, il est d'un grand intérêt de déterminer avec précision pourquoi elle semble insensible aux rhamnolipides.

Un article récent a rapporté l'utilisation d'un instrument d'imagerie biomoléculaire (Typhoon (GE Healthcare)) pour visualiser des marqueurs fluorescents *in vivo* au sein d'une colonie en *swarming* (Xavier *et al.*, 2010). Cette technique doit absolument être utilisée et intégrée davantage dans tout projet portant sur le *swarming*, car elle peut mener à des résultats extrêmement intéressants, notamment localiser où dans une colonie *swarming* sont exprimés des gènes d'intérêts.

En guise de conclusion, le but de cette thèse à l'origine était de faire le lien entre la formation de biofilms et la motilité de type *swarming*. Lors de l'élaboration de mon projet de thèse, la complexité du *swarming* a été sous-estimée et ce sujet a finalement occupé à lui seul mes travaux de doctorat. Initialement, mon hypothèse était que le *swarming* constitue une manière pour les bactéries de bouger à l'intérieur d'un biofilm. Cependant quelques résultats rapportés dans cette thèse laissent penser qu'il n'y a pas nécessairement de liens étroits entre ces deux phénomènes. Par exemple, le mutant *hptB*<sup>-</sup> est déficient dans le *swarming*, mais n'est affecté dans aucun autre phénotype incluant la formation de biofilms en milieu statique. Il sera intéressant de déterminer si l'architecture d'un biofilm d'un mutant *hptB*<sup>-</sup> est différente de celle de la souche sauvage. De plus, notre article rapportant le transcriptome d'une colonie *swarming* suggère que le *swarming* est en fait un moyen pour une population bactérienne de rapidement prendre possession d'une surface et n'est pas nécessairement un moyen de déplacement relié aux biofilms. Faire le lien entre les biofilms et le *swarming* nécessitera des études portant uniquement sur l'architecture des biofilms de mutants d'intérêts (*i.e.* *hptB*<sup>-</sup>, *PA1611*) en utilisant entre autres les chambres à flux continu couplées aux techniques d'imageries moléculaires d'usage (*i.e.* microscopie confocale à balayage laser). Ensuite, il sera

## 4 Conclusion

---

possible d'émettre des hypothèses plus précises sur les liens existant entre ces deux phénomènes. En d'autres mots, je crois que le *swarming* devrait être considéré comme étant un modèle unique de multicellularité propre à lui-même et non un simplement comme un modèle complémentaire à celui du traditionnel et largement documenté modèle de biofilm.

# 5

# Références

## 5 Références

---

- Abalos, A., A. Pinazo, M. R. Infante, M. Casals, F. Garcia et A. Manresa (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir* **17**(5): 1367-1371.
- Abdel-Mawgoud, A. M., R. Hausmann, F. Lépine, M. M. Muller et E. Déziel (2010). Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. *Biosurfactants: From Genes to Applications - 1st edition Microbiology Monographs, Vol. 20*(Springer): 219.
- Abdel-Mawgoud, A. M., F. Lepine et E. Deziel (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**(5): 1323-36.
- Adewoye, L. O. et E. A. Worobec (2000). Identification and characterization of the *gltK* gene encoding a membrane-associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **253**(2): 323-30.
- Al-Tahhan, R. A., T. R. Sandrin, A. A. Bodour et R. M. Maier (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol* **66**(8): 3262-8.
- Alavi, M. et R. Belas (2001). Surface sensing, swarmer cell differentiation, and biofilm development. *Methods Enzymol* **336**: 29-40.
- Alberti, L. et R. M. Harshey (1990). Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J Bacteriol* **172**(8): 4322-8.
- Aldridge, P. et K. T. Hughes (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**(2): 160-5.
- Allison, C., N. Coleman, P. L. Jones et C. Hughes (1992). Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect Immun* **60**(11): 4740-6.
- Allison, C., L. Emody, N. Coleman et C. Hughes (1994). The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *J Infect Dis* **169**(5): 1155-8.
- Allison, C., H. C. Lai, D. Gygi et C. Hughes (1993). Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemoattractant for swarming cells. *Mol Microbiol* **8**(1): 53-60.
- Alvarez-Ortega, C., I. Wiegand, J. Olivares, R. E. Hancock et J. L. Martinez (2010). Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(10): 4159-67.
- Ammendola, A., O. Geisenberger, J. B. Andersen, M. Givskov, K. H. Schleifer et L. Eberl (1998). *Serratia liquefaciens* swarm cells exhibit enhanced resistance to predation by *Tetrahymena* sp. *FEMS Microbiol Lett* **164**(1): 69-75.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson et F. Rodriguez-Quinones (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 215-37.
- Arima, K., A. Kakinuma et G. Tamura (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* **31**(3): 488-94.
- Arkowitz, R. A. et W. Wickner (1994). SecD and SecE are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. *EMBO J* **13**(4): 954-63.

## 5 Références

---

- Atkinson, S. et P. Williams (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 6(40): 959-78.
- Bagge, N., M. Schuster, M. Hentzer, O. Ciofu, M. Givskov, E. P. Greenberg et N. Hoiby (2004). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 48(4): 1175-87.
- Barak, J. D., L. Gorski, A. S. Liang et K. E. Narm (2009). Previously uncharacterized *Salmonella enterica* genes required for swarming play a role in seedling colonization. *Microbiology* 155(Pt 11): 3701-9.
- Bardy, S. L. et J. R. Maddock (2005). Polar localization of a soluble methyl-accepting protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187(22): 7840-4.
- Barker, A. P., A. I. Vasil, A. Filloux, G. Ball, P. J. Wilderman et M. L. Vasil (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* 53(4): 1089-98.
- Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E. L. Sonnhammer, D. J. Studholme, C. Yeats and S. R. Eddy (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32(Database issue): D138-41.
- Beal, R. et W. B. Betts (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* 89(1): 158-68.
- Bedard, M., C. D. McClure, N. L. Schiller, C. Francoeur, A. Cantin et M. Denis (1993). Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9(4): 455-62.
- Belas, R., M. Goldman et K. Ashliman (1995). Genetic analysis of *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell elongation. *J Bacteriol* 177(3): 823-8.
- Beloin, C., A. Roux et J. M. Ghigo (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 249-89.
- Ben-Jacob, E., O. Schochet, A. Tenenbaum, I. Cohen, A. Czirok et T. Vicsek (1994). Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature* 368(6466): 46-9.
- Benincasa, M., A. Abalos, I. Oliveira et A. Manresa (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85(1): 1-8.
- Bessman, M. J., D. N. Frick and S. F. O'Handley (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* 271(41): 25059-62.
- Bijlsma, J. J. et E. A. Groisman (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol* 11(8): 359-66.
- Bingle, L. E., C. M. Bailey et M. J. Pallen (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 11(1): 3-8.
- Blazejczyk, M., M. Miron et R. Nadon (2007). FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. (Genome Quebec, Montreal, Canada, URL <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>).
- Boles, B., M. Thoendel et P. Singh (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* 57(5): 1210-1223.

## 5 Références

---

- Boles, B. R. et L. L. McCarter (2002). *Vibrio parahaemolyticus* *scrABC*, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *J Bacteriol* **184**(21): 5946-54.
- Bordi, C., M. C. Lamy, I. Ventre, E. Termine, A. Hachani, S. Fillet, B. Roche, S. Bleves, V. Mejean, A. Lazdunski et A. Filloux (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol* **76**(6): 1427-43.
- Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman et R. Kolter (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**(1): 20-6.
- Braud, A., M. Hannauer, G. L. Mislin et I. J. Schalk (2009). The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J Bacteriol* **191**(11): 3517-25.
- Brencic, A. et S. Lory (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* **72**(3): 612-32.
- Brencic, A., K. A. McFarland, H. R. McManus, S. Castang, I. Mogno, S. L. Dove et S. Lory (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* **73**(3): 434-45.
- Britigan, B. E., M. B. Hayek, B. N. Doebbeling et R. B. Fick, Jr. (1993). Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **61**(12): 5049-55.
- Brouwer, R. W., O. P. Kuipers et S. A. van Hijum (2008). The relative value of operon predictions. *Brief Bioinform* **9**(5): 367-75.
- Burkart, M., A. Toguchi et R. M. Harshey (1998). The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2568-73.
- Burrowes, E., C. Baysse, C. Adams et F. O'Gara (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* **152**(Pt 2): 405-18.
- Butler, M. T., Q. Wang et R. M. Harshey (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3776-81.
- Cahan, R., I. Axelrad, M. Safrin, D. E. Ohman et E. Kessler (2001). A secreted aminopeptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. Identification, primary structure, and relationship to other aminopeptidases. *J Biol Chem* **276**(47): 43645-52.
- Caiazza, N. C., J. H. Merritt, K. M. Brothers et G. A. O'Toole (2007). Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**(9): 3603-12.
- Caiazza, N. C. et G. A. O'Toole (2004). SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **186**(14): 4476-85.
- Caiazza, N. C., R. M. Q. Shanks et G. A. O'Toole (2005). Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**(21): 7351-7361.
- Calvio, C., F. Celandroni, E. Ghelardi, G. Amati, S. Salvetti, F. Ceciliani, A. Galizzi et S. Senesi (2005). Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J Bacteriol* **187**(15): 5356-66.

## 5 Références

---

- Camilli, A. et B. L. Bassler (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**(5764): 1113-6.
- Champion, J. T., J. C. Gilkey, H. Lamparski, J. Retterer and R. M. Miller (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium, and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science* **170**: 569-574.
- Chang, A. C. et S. N. Cohen (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**(3): 1141-56.
- Chang, W. S., X. Li et L. J. Halverson (2009). Influence of water limitation on endogenous oxidative stress and cell death within unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* **11**(6): 1482-92.
- Chasteen, N. D. (1998). Ferritin. Uptake, storage, and release of iron. *Met Ions Biol Syst* **35**: 479-514.
- Chen, B. G., L. Turner et H. C. Berg (2007). The wetting agent required for swarming in *Salmonella enterica* serovar typhimurium is not a surfactant. *J Bacteriol*.
- Choi, K. H., J. B. Gaynor, K. G. White, C. Lopez, C. M. Bosio, R. R. Karkhoff-Schweizer and H. P. Schweizer (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* **2**(6): 443-8.
- Choi, K. H., A. Kumar et H. P. Schweizer (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**(3): 391-7.
- Christen, M., B. Christen, M. Folcher, A. Schauerte et U. Jenal (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**(35): 30829-37.
- Christen, M., H. D. Kulasekara, B. Christen, B. R. Kulasekara, L. R. Hoffman et S. I. Miller (2010). Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* **328**(5983): 1295-7.
- Clemmer, K. M. et P. N. Rather (2008). The Lon protease regulates swarming motility and virulence gene expression in *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol* **57**(Pt 8): 931-7.
- Cobessi, D., H. Celia et F. Pattus (2005). Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **352**(4): 893-904.
- Comolli, J. C. et T. J. Donohue (2004). Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb<sub>3</sub> cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**(4): 1193-203.
- Connelly, M. B., G. M. Young et A. Sloma (2004). Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**(13): 4159-67.
- Cornelis, P., S. Matthijs et L. Van Oeffelen (2009). Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **22**(1): 15-22.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber et H. M. Lappin-Scott (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-45.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart et E. P. Greenberg (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**(5418): 1318-22.
- Cotter, P. A. et S. Stibitz (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**(1): 17-23.



## 5 Références

---

- Cox, C. D. et P. Adams (1985). Siderophore activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **48**(1): 130-8.
- Cox, C. D. et R. Graham (1979). Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **137**(1): 357-64.
- D'Argenio, D. A., M. W. Calfee, P. B. Rainey et E. C. Pesci (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184**(23): 6481-9.
- Dam, P., V. Olman, K. Harris, Z. Su et Y. Xu (2007). Operon prediction using both genome-specific and general genomic information. *Nucleic Acids Res* **35**(1): 288-98.
- Daniels, R., J. Vanderleyden et J. Michiels (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 261-289.
- Darnton, N. C., L. Turner, S. Rojevsky et H. C. Berg (2010). Dynamics of bacterial swarming. *Biophys J* **98**(10): 2082-90.
- Davey, M. E., N. C. Caiazza et G. A. O'Toole (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**(3): 1027-36.
- Davey, M. E. et A. O'Toole G (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 847-67.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton et E. P. Greenberg (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**(5361): 295-8.
- Denniston, K., J. Topping et R. Caret (2007). General, Organic, and Biochemistry. Sixth Edition.: 821 pages.
- Deretic, V., J. F. Gill et A. M. Chakrabarty (1987). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the *algD* gene. *Nucleic Acids Res* **15**(11): 4567-81.
- Déziel, E., Y. Comeau et R. Villemur (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **183**(4): 1195-204.
- Déziel, E., F. Lépine, D. Dennie, D. Boismenu, O. A. Mamer et R. Villemur (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, E., F. Lépine, S. Milot et R. Villemur (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim Biophys Acta* **1485**(2-3): 145-52.
- Déziel, É., F. Lépine, S. Milot et R. Villemur (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.
- Diggle, S. P., R. E. Stacey, C. Dodd, M. Camara, P. Williams et K. Winzer (2006). The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **8**(6): 1095-104.
- Dirix, G., P. Monsieurs, B. Dombrecht, R. Daniels, K. Marchal, J. Vanderleyden et J. Michiels (2004). Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-

## 5 Références

---

- wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides* **25**(9): 1425-40.
- Dixit, M., C. S. Murudkar et K. K. Rao (2002). Epr is transcribed from a final sigma(D) promoter and is involved in swarming of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**(2): 596-9.
- Dotsch, A., T. Becker, C. Pommerenke, Z. Magnowska, L. Jansch et S. Haussler (2009). Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(6): 2522-31.
- Dow, J. M., Y. Fouhy, J. F. Lucey et R. P. Ryan (2006). The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol Plant Microbe Interact* **19**(12): 1378-84.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* **6**(4): 324-38.
- Duerig, A., S. Abel, M. Folcher, M. Nicollier, T. Schwede, N. Amiot, B. Giese et U. Jenal (2009). Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23**(1): 93-104.
- Dunn, C. A., S. F. O'Handley, D. N. Frick et M. J. Bessman (1999). Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the nudix hydrolases and tentative identification of *trgB*, a gene associated with tellurite resistance. *J Biol Chem* **274**(45): 32318-24.
- Eberl, L., G. Christiansen, S. Molin et M. Givskov (1996). Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *J Bacteriol* **178**(2): 554-9.
- Eberl, L., S. Molin et M. Givskov (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **181**(6): 1703-12.
- Eberl, L., M. K. Winson, C. Sternberg, G. S. Stewart, G. Christiansen, S. R. Chhabra, B. Bycroft, P. Williams, S. Molin et M. Givskov (1996). Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**(1): 127-36.
- Enos-Berlage, J. L. et L. L. McCarter (2000). Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **182**(19): 5513-20.
- Ferrandez, A., A. C. Hawkins, D. T. Summerfield et C. S. Harwood (2002). Cluster II che genes from *Pseudomonas aeruginosa* are required for an optimal chemotactic response. *J Bacteriol* **184**(16): 4374-83.
- Ferreira, R. B., L. C. Antunes, E. P. Greenberg et L. L. McCarter (2008). *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J Bacteriol* **190**(3): 851-60.
- Filiatrault, M. J., V. E. Wagner, D. Bushnell, C. G. Haidaris, B. H. Iglewski et L. Passador (2005). Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **73**(6): 3764-3772.
- Fineran, P. C., N. R. Williamson, K. S. Lilley et G. P. Salmond (2007). Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *J Bacteriol* **189**(21): 7653-62.
- Flemming, H. C. et J. Wingender (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**(9): 623-33.
- Francez-Charlot, A., B. Laugel, A. Van Gemert, N. Dubarry, F. Wiorowski, M. P. Castanie-Cornet, C. Gutierrez and K. Cam (2003). RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**(3): 823-32.

## 5 Références

---

- Fraser, G. M., L. Claret, R. Furness, S. Gupta et C. Hughes (2002). Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* *hpmBA* haemolysin operon. *Microbiology* **148**(Pt 7): 2191-201.
- Fraser, G. M. et C. Hughes (1999). Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**(6): 630-5.
- Friedberg EC, W. G., Siede W, Wood RD, Schultz RA and T. Ellenberger (2005). DNA Repair and Mutagenesis. 2nd edition. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.
- Friedman, L. et R. Kolter (2004). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* **51**(3): 675-90.
- Fuqua, C., M. R. Parsek et E. P. Greenberg (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**: 439-68.
- Furness, R. B., G. M. Fraser, N. A. Hay et C. Hughes (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**(17): 5585-8.
- Gabelli, S. B., M. A. Bianchet, Y. Ohnishi, Y. Ichikawa, M. J. Bessman et L. M. Amzel (2002). Mechanism of the *Escherichia coli* ADP-ribose pyrophosphatase, a Nudix hydrolase. *Biochemistry* **41**(30): 9279-85.
- Gaines, J. M., N. L. Carty, F. Tiburzi, M. Davinic, P. Visca, J. A. Colmer-Hamood et A. N. Hamood (2007). Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor PvdS under reduced levels of oxygen. *Microbiology* **153**(Pt 12): 4219-33.
- Garza-Ramos, G., R. Perez-Montfort, A. Rojo-Dominguez, M. T. de Gomez-Puyou et A. Gomez-Puyou (1996). Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *Eur J Biochem* **241**(1): 114-20.
- Gibbs, K. A. et E. P. Greenberg (2010). Territoriality in *Proteus*: Advertisement and Aggression. *Chem Rev*.
- Gibbs, K. A., M. L. Urbanowski et E. P. Greenberg (2008). Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science* **321**(5886): 256-9.
- Glick, R., C. Gilmour, J. Tremblay, S. Satanower, O. Avidan, E. Deziel, E. P. Greenberg, K. Poole et E. Banin (2010). Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**(12): 2973-80.
- Goldberg, J. B. et D. E. Ohman (1987). Activation of an elastase precursor by the *lasA* gene product of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **169**(10): 4532-9.
- Gomez-Gomez, J. M., C. Manfredi, J. C. Alonso et J. Blazquez (2007). A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biol* **5**: 14.
- Gonzalez-Flecha, B. et B. Demple (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**(23): 13681-7.
- Goodman, A. L. (2010). Sit and stay a while: how BfiSR controls irreversible attachment in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **192**(20): 5273-4.
- Groleau, M.-C. (2006). Protéines chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines sécrétées par le système TAT chez *Streptomyces lividans*. *Mémoire de maîtrise - INRS - Institut Armand-Frappier*: 137.

## 5 Références

---

- Guard-Petter, J., L. H. Keller, M. M. Rahman, R. W. Carlson et S. Silvers (1996).** A novel relationship between O-antigen variation, matrix formation, and invasiveness of *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol Infect* **117**(2): 219-31.
- Gunn, J. S., S. S. Ryan, J. C. Van Velkinburgh, R. K. Ernst et S. I. Miller (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**(11): 6139-46.
- Guvener, Z. T. et C. S. Harwood (2007).** Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol Microbiol* **66**(6): 1459-73.
- Gygi, D., M. J. Bailey, C. Allison et C. Hughes (1995).** Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **15**(4): 761-9.
- Gygi, D., M. M. Rahman, H. C. Lai, R. Carlson, J. Guard-Petter et C. Hughes (1995).** A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* **17**(6): 1167-75.
- Haba, E., A. Pinazo, O. Jauregui, M. J. Espuny, M. R. Infante et A. Manresa (2003).** Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044. *Biotechnol Bioeng* **81**(3): 316-22.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton et P. Stoodley (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**(2): 95-108.
- Halliwell, B. (1982).** Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxy radicals in vivo. *Biochem J* **205**(2): 461-3.
- Hamood, A. N., J. A. Griswold et C. M. Duhan (1996).** Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. *J Surg Res* **61**(2): 425-32.
- Harmsen, M., L. Yang, S. J. Pamp et T. Tolker-Nielsen (2010).** An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**(3): 253-68.
- Harrison, J. J., H. Ceri et R. J. Turner (2007).** Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**(12): 928-38.
- Harrison, J. J., R. J. Turner et H. Ceri (2005).** Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **7**(7): 981-94.
- Harrison, J. J., R. J. Turner, D. A. Joo, M. A. Stan, C. S. Chan, N. D. Allan, H. A. Vronis, M. E. Olson et H. Ceri (2008).** Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(8): 2870-81.
- Harshey, R. M. (1994).** Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**(3): 389-94.
- Harshey, R. M. (2003).** Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-73.

## 5 Références

---

- Harshey, R. M. et T. Matsuyama (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8631-5.
- Hassett, D. J., E. Alsabbagh, K. Parvatiyar, M. L. Howell, R. W. Wilmott et U. A. Ochsner (2000). A protease-resistant catalase, KatA, released upon cell lysis during stationary phase is essential for aerobic survival of a *Pseudomonas aeruginosa oxyR* mutant at low cell densities. *J Bacteriol* **182**(16): 4557-63.
- Hatt, J. K. et P. N. Rather (2008). Characterization of a novel gene, *wosA*, regulating FlhDC expression in *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* **190**(6): 1946-55.
- Havarstein, L. S., H. Holo et I. F. Nes (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* **140** ( Pt 9): 2383-9.
- Heeb, S., Y. Itoh, T. Nishijyo, U. Schnider, C. Keel, J. Wade, U. Walsh, F. O'Gara et D. Haas (2000). Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **13**(2): 232-7.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**(4): 263-73.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**(4): 478-503.
- Heurlier, K., F. Williams, S. Heeb, C. Dormond, G. Pessi, D. Singer, M. Camara, P. Williams et D. Haas (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **186**(10): 2936–2945.
- Heydorn, A., B. Ersboll, J. Kato, M. Hentzer, M. R. Parsek, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov et S. Molin (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* **68**(4): 2008-17.
- Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersboll et S. Molin (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146** ( Pt 10): 2395-407.
- Hickman, J. W., D. F. Tifrea et C. S. Harwood (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14422-7.
- Hingley, S. T., A. T. Hastie, F. Kueppers, M. L. Higgins, G. Weinbaum et T. Shryock (1986). Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infect Immun* **51**(1): 254-62.
- Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma et H. P. Schweizer (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**(1): 77-86.
- Hogan, D. et R. Kolter (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Curr Opin Microbiol* **5**(5): 472-7.
- Hood, R. D., P. Singh, F. Hsu, T. Guvener, M. A. Carl, R. R. Trinidad, J. M. Silverman, B. B. Ohlson, K. G. Hicks, R. L. Plemel, M. Li, S. Schwarz, W. Y. Wang, A. J. Merz, D. R.

## 5 Références

---

- Goodlett et J. D. Mougous (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7(1): 25-37.
- Horii, T., M. Morita, H. Muramatsu, Y. Muranaka, T. Kanno et M. Maekawa (2003). Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on flagella formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother* 51(5): 1175-9.
- Horswill, A. R., A. R. Dudding et J. C. Escalante-Semerena (2001). Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J Biol Chem* 276(22): 19094-101.
- Horswill, A. R. et J. C. Escalante-Semerena (2001). In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase Enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. *Biochemistry* 40(15): 4703-13.
- Howell, M. L., E. Alsabbagh, J. F. Ma, U. A. Ochsner, M. G. Klotz, T. J. Beveridge, K. M. Blumenthal, E. C. Niederhoffer, R. E. Morris, D. Needham, G. E. Dean, M. A. Wani et D. J. Hassett (2000). AnkB, a periplasmic ankyrin-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*, is required for optimal catalase B (KatB) activity and resistance to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 182(16): 4545-56.
- Hsu, J. L., H. C. Chen, H. L. Peng et H. Y. Chang (2008). Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem* 283(15): 9933-44.
- Hunt, J. C. et P. V. Phibbs, Jr. (1983). Regulation of alternate peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic et anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 154(2): 793-802.
- Inoue, T., R. Shingaki et K. Fukui (2008). Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett* 281(1): 81-6.
- Inoue, T., R. Shingaki, S. Hirose, K. Waki, H. Mori et K. Fukui (2007). Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 189(3): 950-7.
- Irie, Y. et M. R. Parsek (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 67-84.
- Irizarry, R. A., B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs et T. P. Speed (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31(4): e15.
- Itoh, S., H. Honda, F. Tomita et T. Suzuki (1971). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C 12 , C 13 and C 14 fractions). *J Antibiot (Tokyo)* 24(12): 855-9.
- Jacobs, M. A., A. Alwood, I. Thaipisuttikul, D. Spencer, E. Haugen, S. Ernst, O. Will, R. Kaul, C. Raymond, R. Levy, L. Chun-Rong, D. Guenther, D. Bovee, M. V. Olson et C. Manoil (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4): 14339-14344.
- James, B. L., J. Kret, J. E. Patrick, D. B. Kearns et R. Fall (2009). Growing *Bacillus subtilis* tendrils sense and avoid each other. *FEMS Microbiol Lett* 298(1): 12-9.
- Jani, A. J. et P. A. Cotter (2010). Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* 8(1): 2-6.

## 5 Références

---

- Jansen, A. M., C. V. Lockatell, D. E. Johnson et H. L. Mobley (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**(6): 3607-13.
- Jaques, S. et L. L. McCarter (2006). Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **188**(7): 2625-35.
- Jones, B. V., R. Young, E. Mahenthiralingam et D. J. Stickler (2004). Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infect Immun* **72**(7): 3941-50.
- Jones, K. M., H. Kobayashi, B. W. Davies, M. E. Taga et G. C. Walker (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**(8): 619-33.
- Julkowska, D., M. Obuchowski, B. Holland et S. J. S ror (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.
- Kall, L., A. Krogh et E. L. Sonnhammer (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* **338**(5): 1027-36.
- Kang, Y., D. T. Nguyen, M. S. Son et T. T. Hoang (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* beta-oxidation operon. *Microbiology* **154**(Pt 6): 1584-98.
- Kaplan, E. et P. N. Meier (1958). Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc* **53**: 457–481.
- Kawakami, T., M. Kuroki, M. Ishii, Y. Igarashi et H. Arai (2009). Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*.
- Kawamura-Sato, K., Y. Inuma, T. Hasegawa, T. Horii, T. Yamashino et M. Ohta (2000). Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(10): 2869-72.
- Kay, E., B. Humair, V. Denervaud, K. Riedel, S. Spahr, L. Eberl, C. Valverde et D. Haas (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**(16): 6026-33.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**(9): 634-44.
- Kearns, D. B., F. Chu, R. Rudner et R. Losick (2004). Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol Microbiol* **52**(2): 357-69.
- Kearns, D. B. et R. Losick (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**(3): 581–590.
- Kearns, D. B., J. Robinson et L. J. Shimkets (2001). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits directed twitching motility up phosphatidylethanolamine gradients. *J Bacteriol* **183**(2): 763-7.
- Kearns, D. B. et L. J. Shimkets (1998). Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11957-62.
- Kearns, D. B. et L. J. Shimkets (2001). Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol* **9**(3): 126-9.

## 5 Références

---

- Kharazmi, A., Z. Bibi, H. Nielsen, N. Hoiby et G. Doring (1989). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil and monocyte function. *APMIS* **97**(12): 1068-72.
- Kim, W., T. Killam, V. Sood et M. G. Surette (2003). Swarm-Cell Differentiation in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J Bacteriol* **185**(10): 3111–3117.
- Kim, W. et M. G. Surette (2003). Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biol. Proced. Online* **5**(1): 189-196.
- Kim, Y. K. et L. L. McCarter (2007). ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **189**(11): 4094-107.
- Kindrachuk, K. N., L. Fernandez, M. Bains et R. E. Hancock (2011). Involvement of an ATP-dependent protease (PA0779/AsrA) in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Kirov, S. M., B. C. Tassell, A. B. Semmler, L. A. O'Donovan, A. A. Rabaan et J. G. Shaw (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J Bacteriol* **184**(2): 547-55.
- Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jorgensen, S. Molin et T. Tolker-Nielsen (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**(6): 1511-24.
- Kleerebezem, M., L. E. Quadri, O. P. Kuipers et W. M. de Vos (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**(5): 895-904.
- Koch, A. K., O. Kappeli, A. Fiechter et J. Reiser (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol* **173**(13): 4212-9.
- Kohler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. van Delden et J. C. Pechere (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**(21): 5990-6.
- Kojima, S., K. Yamamoto, I. Kwagishi et M. Homma (1999). The polar flagellar motor of vibrio cholerae is driven by an Na<sup>+</sup> motive force. *J Bacteriol* **181**(6): 1927–1930.
- Konovalova, A., T. Petters et L. Sogaard-Andersen (2009). Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev* **34**(2): 89-106.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd et K. M. Peterson (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**(1): 175-6.
- Kownatzki, R., B. Tummeler et G. Doring (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* **1**(8540): 1026-7.
- Kuchma, S. L., A. E. Ballok, J. H. Merritt, J. H. Hammond, W. Lu, J. D. Rabinowitz et G. A. O'Toole (2010). Cyclic-di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*: the *pilY1* gene and its impact on surface-associated behaviors. *J Bacteriol* **192**(12): 2950-64.
- Kuchma, S. L., K. M. Brothers, J. H. Merritt, N. T. Liberati, F. M. Ausubel et G. A. O'Toole (2007). BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**(22): 8165-78.



## 5 Références

---

- Kukavica-Ibrulj, I., F. Sanschagrin, A. Peterson, M. Whiteley, B. Boyle, J. Mackay et R. C. Levesque (2008). Functional genomics of PycR, a LysR family transcriptional regulator essential for maintenance of *Pseudomonas aeruginosa* in the rat lung. *Microbiology* **154**(Pt 7): 2106-18.
- Kumagai, Y., J. Matsuo, Y. Hayakawa et Y. Rikihisa (2010). Cyclic di-GMP signaling regulates invasion by *Ehrlichia chaffeensis* of human monocytes. *J Bacteriol* **192**(16): 4122-33.
- Kurioka, S. et P. V. Liu (1967). Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase c activity. *J Bacteriol* **93**(2): 670-4.
- Legendijk, E. L., S. Validov, G. E. Lamers, S. de Weert et G. V. Bloemberg (2009). Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with *mCherry* for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett* **305**(1): 81-90.
- Lai, S., J. Tremblay et E. Deziel (2009). Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environ Microbiol* **11**(1): 126-36.
- Lang, S., E. Katsiwela et F. Wagner (1989). Antimicrobial Effects of Biosurfactants. *Lipid / Fett* **91**(9): 363-366.
- Lapouge, K., M. Schubert, F. H. Allain et D. Haas (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**(2): 241-53.
- Lazazzera, B. A., J. M. Solomon et A. D. Grossman (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. *Cell* **89**(6): 917-25.
- Lee, H. S., F. Gu, S. M. Ching, Y. Lam and K. L. Chua (2010). CdpA is a *Burkholderia pseudomallei* cyclic di-GMP phosphodiesterase involved in autoaggregation, flagellum synthesis, motility, biofilm formation, cell invasion, and cytotoxicity. *Infect Immun* **78**(5): 1832-40.
- Lee, J. S., Y. J. Heo, J. K. Lee et Y. H. Cho (2005). KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infect Immun* **73**(7): 4399-403.
- Lépine, F., É. Déziel, S. Milot et R. Villemur (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. et E. P. Greenberg (2005). Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**(1): 37-44.
- Lesic, B., M. Starkey, J. He, R. Hazan et L. G. Rahme (2009). Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I et homologous loci II et III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* **155**(Pt 9): 2845-55.
- Liberati, N. T., J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei et F. M. Ausubel (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2833-8.
- Lin, C. S., J. T. Horng, C. H. Yang, Y. H. Tsai, L. H. Su, C. F. Wei, C. C. Chen, S. C. Hsieh, C. C. Lu et H. C. Lai (2010). RssAB-FlhDC-ShlBA as a Major Pathogenesis Pathway in *Serratia marcescens*. *Infect Immun*.
- Lin, C. T., Y. J. Huang, P. H. Chu, J. L. Hsu, C. H. Huang et H. L. Peng (2006). Identification of an HptB-mediated multi-step phosphorelay in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res Microbiol* **157**(2): 169-75.

## 5 Références

---

- Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero et J. L. Martinez (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(51): 19484-9.
- Lindhout, T., P. C. Lau, D. Brewer et J. S. Lam (2009). Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology* **155**(Pt 10): 3449-60.
- Lindum, P. W., U. Anthoni, C. Christophersen, L. Eberl, S. Molin et M. Givskov (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**(23): 6384-8.
- Livak, K. J. et T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lizewski, S. E., J. R. Schurr, D. W. Jackson, A. Frisk, A. J. Carterson et M. J. Schurr (2004). Identification of AlgR-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by use of microarray analysis. *J Bacteriol* **186**(17): 5672-84.
- Llamas, M. A., M. Sparrius, R. Kloet, C. R. Jimenez, C. Vandenbroucke-Grauls et W. Bitter (2006). The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**(5): 1882-91.
- Lopez, D., H. Vlamakis et R. Kolter (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(7): a000398.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon et G. B. Pier (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**(9): 1051-60.
- Ma, L., M. Conover, H. Lu, M. R. Parsek, K. Bayles et D. J. Wozniak (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* **5**(3): e1000354.
- Macnab, R. M. (1987). Motility et chemotaxis. Umbarger ed. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.): 732-759. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, et H. E.
- Mai-Prochnow, A., P. Lucas-Elio, S. Egan, T. Thomas, J. S. Webb, A. Sanchez-Amat et S. Kjelleberg (2008). Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **190**(15): 5493-501.
- Mainfroid, V., K. Goraj, F. Rentier-Delrue, A. Houbrechts, A. Loiseau, A. C. Gohimont, M. E. Noble, T. V. Borchert, R. K. Wierenga et J. A. Martial (1993). Replacing the (beta alpha)-unit 8 of *Escherichia coli* TIM with its chicken homologue leads to a stable and active hybrid enzyme. *Protein Eng* **6**(8): 893-900.
- Manos, J., J. Arthur, B. Rose, P. Tingpej, C. Fung, M. Curtis, J. S. Webb, H. Hu, S. Kjelleberg, M. D. Gorrell, P. Bye et C. Harbour (2008). Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* **57**(Pt 12): 1454-65.
- Mao, F., P. Dam, J. Chou, V. Olman et Y. Xu (2009). DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D459-63.
- Mariconda, S., Q. Wang et R. M. Harshey (2006). A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility. *Mol Microbiol* **60**(6): 1590-602.

## 5 Références

---

- Marr, A. K., J. Overhage, M. Bains et R. E. Hancock (2007). The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology* **153**(Pt 2): 474-82.
- Matsubara, M. et T. Mizuno (2000). The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **470**(2): 118-24.
- Matsushita, K., H. Toyama, M. Yamada et O. Adachi (2002). Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**(1): 13-22.
- Matsuyama, T., A. Bhasin et R. M. Harshey (1995). Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J Bacteriol* **177**(4): 987-91.
- Matsuyama, T., K. Kaneda, Y. Nakagawa, K. Isa, H. Hara-Hotta et I. Yano (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **174**(6): 1769-76.
- Matsuyama, T., M. Sogawa et Y. Nakagawa (1989). Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids. *FEMS Microbiol Lett* **61**(3): 243-6.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili et twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289-314.
- Mauriello, E. M., T. Mignot, Z. Yang et D. R. Zusman (2010). Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella? *Microbiol Mol Biol Rev* **74**(2): 229-49.
- McBride, M. J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* **55**: 49-75.
- McCarter, L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**(1): 51-7.
- McCarter, L. et M. Silverman (1990). Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* **4**(7): 1057-62.
- McCarter, L. L. (1998). OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **180**(12): 3166-73.
- McCarter, L. L. (2004). Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**(1-2): 18-29.
- McLennan, A. G. (2006). The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci* **63**(2): 123-43.
- McPhee J.B., Lewenza S. et R.E.W. Hancock (2003). Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**(1):205-17.
- Meile, L. et T. Leisinger (1982). Purification and properties of the bifunctional proline dehydrogenase/1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem* **129**(1): 67-75.
- Mendelson, N. H. et B. Salhi (1996). Patterns of reporter gene expression in the phase diagram of *Bacillus subtilis* colony forms. *J Bacteriol* **178**(7): 1980-9.
- Merritt, J. H., K. M. Brothers, S. L. Kuchma et G. A. O'Toole (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J Bacteriol* **189**(22): 8154-64.
- Merritt, J. H., D. G. Ha, K. N. Cowles, W. Lu, D. K. Morales, J. Rabinowitz, Z. Gitai et G. A. O'Toole (2010). Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *MBio* **1**(4).

## 5 Références

---

- Merritt, P. M., T. Danhorn et C. Fuqua (2007). Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**(22): 8005-14.
- Miller, R. M., A. P. Tomaras, A. P. Barker, D. R. Voelker, E. D. Chan, A. I. Vasil et M. L. Vasil (2008). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility-mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: specificity and metabolic requirements. *J Bacteriol* **190**(11): 4038-49.
- Morgenstein, R. M., K. M. Clemmer et P. N. Rather (2010). Loss of the *waal* O-antigen ligase prevents surface activation of the flagellar gene cascade in *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* **192**(12): 3213-21.
- Mossialos, D., G. R. Tavankar, J. E. Zlosnik et H. D. Williams (2006). Defects in a quinol oxidase lead to loss of KatC catalase activity in *Pseudomonas aeruginosa*: KatC activity is temperature dependent and it requires an intact disulphide bond formation system. *Biochem Biophys Res Commun* **341**(3): 697-702.
- Mougous, J. D., M. E. Cuff, S. Raunser, A. Shen, M. Zhou, C. A. Gifford, A. L. Goodman, G. Joachimiak, C. L. Ordonez, S. Lory, T. Walz, A. Joachimiak et J. J. Mekalanos (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**(5779): 1526-30.
- Muller, J. F., A. M. Stevens, J. Craig et N. G. Love (2007). Transcriptome analysis reveals that multidrug efflux genes are upregulated to protect *Pseudomonas aeruginosa* from pentachlorophenol stress. *Appl Environ Microbiol* **73**(14): 4550-8.
- Muramoto, K., S. Makishima, S. Aizawa et R. M. Macnab (1999). Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*. *J Bacteriol* **181**(18): 5808-13.
- Murray, T. S. et B. I. Kazmierczak (2006). FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**(19): 6995-7004.
- Murray, T. S. et B. I. Kazmierczak (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol* **190**(8): 2700-8.
- Murray, T. S., M. Ledizet et B. I. Kazmierczak (2010). Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Med Microbiol* **59**(Pt 5): 511-20.
- Nadal Jimenez, P., G. Koch, E. Papaioannou, M. Wahjudi, J. Krzeslak, T. Coenye, R. H. Cool et W. J. Quax (2009). Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology* **156**(Pt 1): 49-59.
- Netotea, S., I. Bertani, L. Steindler, A. Kerényi, V. Venturi et S. Pongor (2009). A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an "activation zone". *Biol Direct* **4**: 6.
- Ng, W. L. et B. L. Bassler (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**: 197-222.
- Nielubowicz, G. R., S. N. Smith et H. L. Mobley (2010). Zinc uptake contributes to motility and provides a competitive advantage to *Proteus mirabilis* during experimental urinary tract infection. *Infect Immun* **78**(6): 2823-33.
- Nogales, J., A. Dominguez-Ferreras, C. V. Amaya-Gomez, P. van Dillewijn, V. Cuellar, J. Sanjuan, J. Olivares et M. J. Soto (2010). Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium*

## 5 Références

---

- meliloti fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* **11**: 157.
- Noordman, W. H. et D. B. Janssen (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **68**(9): 4502-8.
- Noordman, W. H., J. H. Wachter, G. J. de Boer et D. B. Janssen (2002). The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *J Biotechnol* **94**(2): 195-212.
- Nouwen, N. et A. J. Driessen (2002). SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol* **44**(5): 1397-405.
- O'Toole, G., H. B. Kaplan et R. Kolter (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.
- Ochsner, U. A., A. Fiechter et J. Reiser (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* **269**(31): 19787-95.
- Ochsner, U. A., M. L. Vasil, E. Alsabbagh, K. Parvatiyar et D. J. Hassett (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. *J Bacteriol* **182**(16): 4533-44.
- Ochsner, U. A., P. J. Wilderman, A. I. Vasil et M. L. Vasil (2002). GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **45**(5): 1277-87.
- Okujo, N., T. Akiyama, S. Miyoshi, S. Shinoda et S. Yamamoto (1996). Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrin-bound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Immunol* **40**(8): 595-8.
- Osera, C., G. Amati, C. Calvio et A. Galizzi (2009). SwrAA activates poly-gamma-glutamate synthesis in addition to swarming in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **155**(Pt 7): 2282-7.
- Overhage, J., M. Bains, M. D. Brazas et R. E. Hancock (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**(8): 2671-9.
- Overhage, J., A. Campisano, M. Bains, E. C. Torfs, B. H. Rehm et R. E. Hancock (2008). Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun* **76**(9): 4176-82.
- Overhage, J., S. Lewenza, A. K. Marr et R. E. Hancock (2007). Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J Bacteriol* **189**(5): 2164-9.
- Palma, M., D. DeLuca, S. Worgall et L. E. Quadri (2004). Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **186**(1): 248-52.
- Palma, M., S. Worgall et L. E. Quadri (2003). Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron. *Arch Microbiol* **180**(5): 374-9.
- Palmer, K. L., S. A. Brown et M. Whiteley (2007). Membrane-bound nitrate reductase is required for anaerobic growth in cystic fibrosis sputum. *J Bacteriol* **189**(12): 4449-55.
- Pamp, S. J. et T. Tolker-Nielsen (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**(6): 2531-9.

## 5 Références

---

- Park, R. Y., H. Y. Sun, M. H. Choi, Y. H. Bai, Y. Y. Chung et S. H. Shin (2006). Proteases of a *Bacillus subtilis* clinical isolate facilitate swarming and siderophore-mediated iron uptake via proteolytic cleavage of transferrin. *Biol Pharm Bull* **29**(4): 850-3.
- Patrick, J. E. et D. B. Kearns (2009). Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *J Bacteriol* **191**(22): 7129-33.
- Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese et U. Jenal (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**(6): 715-27.
- Pearson, M. M., D. A. Rasko, S. N. Smith et H. L. Mobley (2010). Transcriptome of swarming *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* **78**(6): 2834-45.
- Persson, O. P., J. Pinhassi, L. Riemann, B. I. Marklund, M. Rhen, S. Normark, J. M. Gonzalez and A. Hagstrom (2009). High abundance of virulence gene homologues in marine bacteria. *Environ Microbiol* **11**(6): 1348-57.
- Pestova, E. V., L. S. Havarstein et D. A. Morrison (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**(4): 853-62.
- Petrova, O. E. et K. Sauer (2010). The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA *rsmZ* through CafA. *J Bacteriol* **192**(20): 5275-88.
- Pitcher, R. S. et N. J. Watmough (2004). The bacterial cytochrome Cbb<sub>3</sub> oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1655**(1-3): 388-99.
- Pomposiello, P. J. et B. Demple (2002). Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol* **46**: 319-41.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**(1): 20-51.
- Poole, K. et R. Srikumar (2001). Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* **1**(1): 59-71.
- Poole, K. C., D. Dean, S. Heinrichs, K. Neshat, L. Krebs, Young et L. Kilburn (1996). Siderophore-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular biology of Pseudomonas*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. : p. 371-383. In T. Nakazawa (ed.).
- Potvin, E., D. E. Lehoux, I. Kukavica-Ibrulj, K. L. Richard, F. Sanschagrin, G. W. Lau et R. C. Levesque (2003). In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors et antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**(12): 1294-308.
- Potvin, E., F. Sanschagrin et R. C. Levesque (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**(1): 38-55.
- Pratt, L. A. et R. Kolter (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**(2): 285-93.
- Pukatzi, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg et J. J. Mekalanos (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1528-33.

## 5 Références

---

- Pukatzki, S., S. B. McAuley et S. T. Miyata (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* 12(1): 11-7.
- Rahim, R., U. A. Ochsner, C. Olvera, M. Graninger, P. Messner, J. S. Lam et G. Soberon-Chavez (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnolipin transferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40(3): 708-18.
- Rahman, M. M., J. Guard-Petter, K. Asokan, C. Hughes et R. W. Carlson (1999). The structure of the colony migration factor from pathogenic *Proteus mirabilis*. A capsular polysaccharide that facilitates swarming. *J Biol Chem* 274(33): 22993-8.
- Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins et F. M. Ausubel (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219): 1899-902.
- Ramos-Aires, J., P. Plesiat, L. Kocjancic-Curty et T. Kohler (2004). Selection of an antibiotic-hypersusceptible mutant of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the GlmR transcriptional regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 48(3): 843-51.
- Rashid, M. H. et A. Kornberg (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4885-90.
- Rather, P. N. (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol* 7(8): 1065-73.
- Rauprich, O., M. Matsushita, C. J. Weijer, F. Siegert, S. E. Esipov et J. A. Shapiro (1996). Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J Bacteriol* 178(22): 6525-38.
- Read, R. C., P. Roberts, N. Munro, A. Rutman, A. Hastie, T. Shryock, R. Hall, W. McDonald-Gibson, V. Lund, G. Taylor et al., (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* 72(6): 2271-7.
- Reisner, A., J. A. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner et S. Molin (2003). Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* 48(4): 933-46.
- Rocco, C. J. et J. C. Escalante-Semerefana (2010). In *Salmonella enterica*, 2-methylcitrate blocks gluconeogenesis. *J Bacteriol* 192(3): 771-8.
- Rodrigue, A., Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean et M. Foglino (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8(11): 498-504.
- Rucker, R., W. Chohanadisai et M. Nakano (2009). Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone. *Altern Med Rev* 14(3): 268-77.
- Ryan, K. A., N. Karim, M. Worku, C. W. Penn et P. W. O'Toole (2005). *Helicobacter pylori* flagellar hook-filament transition is controlled by a FliK functional homolog encoded by the gene HP0906. *J Bacteriol* 187(16): 5742-50.
- Ryan, R. P., Y. Fouhy, J. F. Lucey, B. L. Jiang, Y. Q. He, J. X. Feng, J. L. Tang et J. M. Dow (2007). Cyclic di-GMP signalling in the virulence et environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 63(2): 429-42.
- Ryan, R. P., J. Lucey, K. O'Donovan, Y. McCarthy, L. Yang, T. Tolker-Nielsen et J. M. Dow (2009). HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 11(5): 1126-36.

## 5 Références

---

- Ryan, R. P., Y. McCarthy, M. Andrade, C. S. Farah, J. P. Armitage et J. M. Dow (2010). Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(13): 5989-94.
- Salunkhe, P., T. Topfer, J. Buer et B. Tummeler (2005). Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **187**(8): 2565-72.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton et D. G. Davies (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**(4): 1140-54.
- Schalk, I. J., C. Hennard, C. Dugave, K. Poole, M. A. Abdallah et F. Pattus (2001). Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol Microbiol* **39**(2): 351-60.
- Schooling, S. R., U. K. Charaf, D. G. Allison et P. Gilbert (2004). A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* **1**: 91-99.
- Schurek, K. N., A. K. Marr, P. K. Taylor, I. Wiegand, L. Semenc, B. K. Khaira et R. E. Hancock (2008). Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(12): 4213-9.
- Schuster, M., A. C. Hawkins, C. S. Harwood et E. P. Greenberg (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**(4): 973-85.
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**(1): 48-62.
- Semrad, K., R. Green et R. Schroeder (2004). RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*. *RNA* **10**(12): 1855-60.
- Shaner, N. C., M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson et R. Y. Tsien (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* **5**(6): 545-51.
- Shapleigh, J. P., J. J. Hill, J. O. Alben et R. B. Gennis (1992). Spectroscopic and genetic evidence for two heme-Cu-containing oxidases in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **174**(7): 2338-43.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm et M. Mann (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**(5): 850-8.
- Shigematsu, T., J. Fukushima, M. Oyama, M. Tsuda, S. Kawamoto et K. Okuda (2001). Iron-mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* **45**(8): 579-90.
- Shreve, G. S., S. Inguva et S. Gunnam (1995). Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **4**(4): 331-7.
- Shrout, J. D., D. L. Chopp, C. L. Just, M. Hentzer, M. Givskov et M. R. Parsek (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**(5): 1264-77.



## 5 Références

---

- Sibley, C. D., K. Duan, C. Fischer, M. D. Parkins, D. G. Storey, H. R. Rabin et M. G. Surette (2008). Discerning the complexity of community interactions using a *Drosophila* model of polymicrobial infections. *PLoS Pathog* 4(10): e1000184.
- Siegmund, I. et F. Wagner (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas aeruginosa* species during growth on mineral agar. *biotechnol. Tech.* 5: 265-268.
- Simm, R., A. Lusch, A. Kader, M. Andersson et U. Romling (2007). Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J Bacteriol* 189(9): 3613-23.
- Snyder, L. et W. Champness (1997). Molecular genetics of bacteria. 504.
- Solomon, J. M., B. A. Lazazzera et A. D. Grossman (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 10(16): 2014-24.
- Solomon, J. M., R. Magnuson, A. Srivastava et A. D. Grossman (1995). Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 9(5): 547-58.
- Soto, M. J., M. Fernandez-Pascual, J. Sanjuan et J. Olivares (2002). A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Mol Microbiol* 43(2): 371-82.
- Stahl, S. J., K. R. Stewart et F. D. Williams (1983). Extracellular slime associated with *Proteus mirabilis* during swarming. *J Bacteriol* 154(2): 930-7.
- Starkey, M., J. H. Hickman, L. Ma, N. Zhang, S. De Long, A. Hinz, S. Palacios, C. Manoil, M. J. Kirisits, T. D. Starner, D. J. Wozniak, C. S. Harwood et M. R. Parsek (2009). *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* 191(11): 3492-503.
- Stohs, S. J. et D. Bagchi (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18(2): 321-36.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies et J. W. Costerton (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.
- Sturgill, G. et P. N. Rather (2004). Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* 51(2): 437-46.
- Sturme, M. H., M. Kleerebezem, J. Nakayama, A. D. Akkermans, E. E. Vaughn et W. M. de Vos (2002). Cell to cell communication by autoinducing peptides in Gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4): 233-43.
- Sultan, S. Z., J. E. Pitzer, M. R. Miller et M. A. Motaleb (2010). Analysis of a *Borrelia burgdorferi* phosphodiesterase demonstrates a role for cyclic-di-guanosine monophosphate in motility and virulence. *Mol Microbiol* 77(1): 128-42.
- Swanson, B. L., J. A. Colmer et A. N. Hamood (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A regulatory gene, *ptxS*: evidence for negative autoregulation. *J Bacteriol* 181(16): 4890-5.
- Takahashi, C., T. Nozawa, T. Tanikawa, Y. Nakagawa, J. Wakita, M. Matsushita et T. Matsuyama (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. *FEMS Microbiol Lett* 280(2): 169-75.

## 5 Références

---

- Takeda, S., Y. Fujisawa, M. Matsubara, H. Aiba et T. Mizuno (2001). A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol* **40**(2): 440-50.
- Tamayo, R., S. Schild, J. T. Pratt et A. Camilli (2008). Role of cyclic Di-GMP during el tor biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the in vivo-induced cyclic Di-GMP phosphodiesterase CdpA. *Infect Immun* **76**(4): 1617-27.
- Tamayo, R., A. D. Tischler et A. Camilli (2005). The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem* **280**(39): 33324-30.
- Teitzel, G. M., A. Geddie, S. K. De Long, M. J. Kirisits, M. Whiteley et M. R. Parsek (2006). Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**(20): 7242-56.
- Thaden, J. T., S. Lory et T. S. Gardner (2010). Quorum-sensing regulation of a copper toxicity system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*.
- Toguchi, A., M. Siano, M. Burkart et R. M. Harshey (2000). Genetics of Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*: Critical Role for Lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **182**(22): 6308-6321.
- Toutain, C. M., M. E. Zegans et G. A. O'Toole (2005). Evidence for Two Flagellar Stators and Their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**(2): 771-777.
- Tremblay, J. (2007). Mémoire de maîtrise - Caractérisation de la motilité de type "swarming" chez *Pseudomonas aeruginosa*. Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier.
- Tremblay, J. et E. Deziel (2008). Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol* **48**(6): 509-15.
- Tremblay, J. et E. Deziel (2010). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* **11**(1): 587.
- Tremblay, J., A.-P. Richardson, F. Lépine et É. Déziel (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* **9**(10): 2622-2630.
- Tremoulet, F., O. Duche, A. Namane, B. Martinie et J. C. Labadie (2002). A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiol Lett* **215**(1): 7-14.
- Trent, M. S., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter et C. R. Raetz (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**(46): 43122-31.
- Tsai, J. W. et M. R. Alley (2001). Proteolysis of the *Caulobacter* McpA chemoreceptor is cell cycle regulated by a ClpX-dependent pathway. *J Bacteriol* **183**(17): 5001-7.
- Turnbull, A. L. et M. G. Surette (2008). L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Microbiology* **154**(Pt 11): 3410-9.
- Turnbull, A. L. et M. G. Surette (2010). Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* **161**(8): 643-50.

## 5 Références

---

- Turner, L., R. Zhang, N. C. Darnton et H. C. Berg (2010). Visualization of flagella during bacterial swarming. *J Bacteriol* **192**(13): 3259-67.
- Ueda, A. et T. K. Wood (2009). Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog* **5**(6): e1000483.
- Van der Laan, M., M. L. Urbanus, C. M. Ten Hagen-Jongman, N. Nouwen, B. Oudega, N. Harms, A. J. Driessen et J. Luirink (2003). A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5801-6.
- Van Gennip, M., L. D. Christensen, M. Alhede, R. Phipps, P. O. Jensen, L. Christophersen, S. J. Pamp, C. Moser, P. J. Mikkelsen, A. Y. Koh, T. Tolker-Nielsen, G. B. Pier, N. Hoiby, M. Givskov et T. Bjarnsholt (2009). Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* **117**(7): 537-46.
- Vasil, M. L. et U. A. Ochsner (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**(3): 399-413.
- Velicer, G. J. et Y. T. Yu (2003). Evolution of novel cooperative swarming in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* **425**(6953): 75-8.
- Venturi, V., I. Bertani, A. Kerenyi, S. Netotea et S. Pongor (2010). Co-swarming and local collapse: quorum sensing conveys resilience to bacterial communities by localizing cheater mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **5**(4): e9998.
- Verstraeten, N., K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant et J. Michiels (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* **16**(10): 496-506.
- Waite, R. D., A. Paccanaro, A. Papakonstantinou, J. M. Hurst, M. Saqi, E. Littler et M. A. Curtis (2006). Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC Genomics* **7**: 162.
- Walker, K. E., S. Moghaddame-Jafari, L. C. Virginia, D. Johnson et R. Belas (1999). ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol* **32**(4): 825-836.
- Wang, Q., J. G. Frye, M. McClelland et R. M. Harshey (2006). Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol Microbiol* **52**(1): 169-197.
- Waters, C. M. et B. L. Bassler (2005). Quorum Sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**: 319-346.
- Webb, J. S., L. S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov et S. Kjelleberg (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**(15): 4585-92.
- Werner, E., F. Roe, A. Bugnicourt, M. J. Franklin, A. Heydorn, S. Molin, B. Pitts et P. S. Stewart (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**(10): 6188-96.
- Westfall, L. W., A. M. Luna, M. San Francisco, S. P. Diggle, K. E. Worrall, P. Williams, M. Camara et A. N. Hamood (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator MvaT

## 5 Références

---

- specifically binds to the *ptxS* upstream region and enhances *ptxS* expression. *Microbiology* **150**(Pt 11): 3797-806.
- Wiegand, I., A. K. Marr, E. B. Breidenstein, K. N. Schurek, P. Taylor et R. E. Hancock (2008).** Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(10): 3810-3.
- Wilderman, P. J., N. A. Sowa, D. J. FitzGerald, P. C. FitzGerald, S. Gottesman, U. A. Ochsner et M. L. Vasil (2004).** Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9792-7.
- Williams, H. D., J. E. Zlosnik et B. Ryall (2007).** Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol* **52**: 1-71.
- Winfield M.D. et E.A Groisman (2004).** Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(49): 17162-7.
- Winsor, G. L., T. Van Rossum, R. Lo, B. Khaira, M. D. Whiteside, R. E. Hancock et F. S. Brinkman (2009).** *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D483-8.
- Wolfe, A. J. et K. L. Visick (2008).** Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190**(2): 463-75.
- Wood, J. M. (1988).** Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J Membr Biol* **106**(3): 183-202.
- Wood, T. K., A. F. Gonzalez Barrios, M. Herzberg et J. Lee (2006).** Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**(2): 361-7.
- Wosten, M. M. et E. A. Groisman (1999).** Molecular characterization of the PmrA regulon. *J Biol Chem* **274**(38): 27185-90.
- Xavier, J. B., W. Kim et K. R. Foster (2010).** A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **79**(1): 166-79.
- Yeats, C., S. Bentley et A. Bateman (2003).** New knowledge from old: in silico discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiol* **3**: 3.
- Yeung, A. T., M. Bains et R. E. Hancock (2011).** The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**(4): 918-31.
- Yeung, A. T., E. C. Torfs, F. Jamshidi, M. Bains, I. Wiegand, R. E. Hancock et J. Overhage (2009).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol* **191**(18): 5592-602.
- Young, G. M., M. J. Smith, S. A. Minnich et V. L. Miller (1999).** The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *fhxDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J Bacteriol* **181**(9): 2823-2833.
- Zhang, Y. et R. M. Miller (1995).** Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl Environ Microbiol* **61**(6): 2247-2251.
- Zhou, Z., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter, S. I. Miller et C. R. Raetz (2001).** Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem* **276**(46): 43111-21.

## 5 Références

---

- Zhu, K. et C. O. Rock (2008).** RhIA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**(9): 3147-54.
- Zulianello, L., C. Canard, T. Kohler, D. Caille, J. S. Lacroix et P. Meda (2006).** Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**(6): 3134-47.
- Zumft, W. G. (1997).** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(4): 533-616.

**6**

**Annexe**



*aeruginosa*. Congrès de la "American Society for Microbiology – 4<sup>th</sup> ASM conference on Biofilms". Québec (Qc), Canada

## 6.3 - Autre communication

**Julien Tremblay, Julie Ménard, Eric Déziel.** 2010. CloneSuite: A software for automated 16S rDNA contig assembly. URL: <http://clonesuite.com>



## 6.4 - Données supplémentaires à la section 3.4

### 6.4.1 - Transcriptome du mutant $\Delta hptB$

## 6 Annexe

**Tableau 6.4.1. Gènes exclusivement différentiellement chez  $\Delta hptB$  vs extrémité de dendrite.**

A	log <sub>2</sub> (Fold change)	PA1242_at	1.61	PA2095_at	1.89	PA2259_ptxS_a	1.66	PA2895_at	1.69
up-regulated	179	PA1243_at	1.71	PA2134_at	2.49	PA2260_at	2.31	PA2896_at	1.83
down-	36	PA1245_at	2.14	PA2140_at	1.47	PA2261_at	1.57	PA2946_at	1.36
Total	215	PA1246_aprD_a	2.21	PA2143_at	2.45	PA2263_at	1.53	PA3023_at	1.89
$\Delta hptB$ vs. T		PA1249_aprA_a	1.31	PA2144_glgP_a	2.37	PA2290_gcd_at	1.74	PA3049_rmf_at	2.29
Probeset name	change)	PA1300_at	1.53	PA2146_i_at	2.48	PA2300_chic_a	2.35	PA3123_at	1.96
PA0052_at	1.47	PA1344_at	1.36	PA2147_katE_a	2.43	PA2358_at	1.37	PA3231_at	2.90
PA0076_at	1.54	PA1404_at	1.96	PA2148_at	2.25	PA2365_at	1.30	PA3273_at	2.26
PA0105_coxB_	2.10	PA1408_at	1.65	PA2149_at	2.32	PA2366_at	1.63	PA3274_at	2.39
PA0106_coxA_	2.11	PA1414_at	1.48	PA2151_at	2.75	PA2367_at	1.43	PA3405_hasE_at	1.51
PA0107_at	1.88	PA1494_at	1.81	PA2152_at	2.68	PA2375_i_at	1.92	PA3407_hasAp_at	2.64
PA0108_collI_a	1.64	PA1553_at	-1.35	PA2153_glgB_a	2.85	PA2377_at	1.74	PA3418_ldh_at	2.43
PA0109_at	1.33	PA1728_at	1.90	PA2155_at	1.41	PA2406_at	1.42	PA3459_at	1.82
PA0122_at	1.45	PA1730_at	1.60	PA2156_at	2.20	PA2411_at	1.45	PA3460_at	2.61
PA0252_at	-1.37	PA1731_at	1.85	PA2157_at	1.38	PA2412_at	1.40	PA3461_at	1.89
PA0293_at	-1.85	PA1732_at	2.24	PA2158_at	3.58	PA2413_at	1.89	PA3478_rhlB_at	1.79
PA0390_metX_	-1.32	PA1733_at	1.88	PA2159_at	3.28	PA2414_at	2.43	PA3479_rhlA_at	1.56
PA0433_at	1.34	PA1746_at	1.42	PA2160_at	2.75	PA2415_at	2.27	PA3531_bfrB_at	-2.01
PA0446_at	1.37	PA1757_thrH_a	-1.67	PA2161_at	3.45	PA2416_treA_a	2.16	PA3570_mmsA_at	1.90
PA0459_at	1.52	PA1784_at	1.87	PA2162_at	2.82	PA2424_at	2.14	PA3621_fdxA_at	-1.35
PA0471_at	1.46	PA1871_lasA_a	2.94	PA2163_at	2.77	PA2425_at	1.48	PA3724_lasB_at	1.42
PA0517_mirC_a	1.41	PA1874_at	2.73	PA2164_at	2.33	PA2427_at	1.72	PA3743_trmD_at	-1.62
PA0586_at	1.30	PA1875_at	1.93	PA2165_at	2.46	PA2433_at	1.91	PA3784_at	1.87
PA0654_speD_	-1.50	PA1876_at	2.01	PA2169_at	2.79	PA2443_sdaA_a	1.43	PA3785_at	1.33
PA0668_tyrZ_a	-1.37	PA1911_at	1.52	PA2171_at	2.53	PA2452_at	2.32	PA3820_secf_at	-1.31
PA0744_at	1.32	PA1930_at	2.33	PA2172_at	2.60	PA2486_at	1.45	PA3846_at	2.38
PA0745_at	2.10	PA1931_at	1.38	PA2173_at	2.75	PA2606_at	1.59	PA3919_at	1.64
PA0746_at	1.91	PA1932_at	1.31	PA2175_at	1.57	PA2629_purB_a	-1.64	PA3986_at	2.08
PA0810_at	1.39	PA1933_at	1.62	PA2176_at	1.92	PA2638_nuoB_	-1.39	PA4139_at	1.97
PA0852_cpbD_	1.39	PA1988_pqqD_	1.53	PA2177_at	1.36	PA2717_cpo_at	2.22	PA4142_at	1.49
PA1131_at	1.48	PA2001_atoB_a	1.80	PA2178_at	1.57	PA2746_at	2.38	PA4171_at	1.91
PA1168_at	1.80	PA2033_at	2.26	PA2179_at	2.64	PA2780_at	1.73	PA4172_at	1.67
PA1175_napD_	2.05	PA2034_at	2.26	PA2180_at	2.70	PA2786_at	1.32	PA4307_pctC_at	-1.36
PA1177_napE_	1.66	PA2067_at	1.55	PA2189_at	1.80	PA2788_at	1.83	PA4311_at	1.83
PA1190_at	2.38	PA2068_at	1.45	PA2244_at	1.48	PA2815_at	2.06	PA4312_at	1.69

## 6 Annexe

Tableau 6.4.1. Gènes exclusivement différentiellement chez  $\Delta hptB$  vs extrémité de dendrite. (suite...)

A (suite)			
up-regulated	179	PA5024_at	-1.36
down-	36	PA5027_at	1.31
Total	215	PA5049_rpmE	-1.58
$\Delta hptB$ vs. T		PA5061_at	1.49
Probeset name	log <sub>2</sub> (Fold change)	PA5100_hutU	1.52
		PA5139_at	-1.38
PA4345_at	1.52	PA5171_arcA	1.55
PA4352_at	1.65	PA5172_arcB_	1.54
PA4432_rpsI_a	-1.33	PA5181_at	-1.33
PA4438_at	-1.49	PA5192_pckA	-1.35
PA4467_at	1.76	PA5313_at	1.83
PA4482_gatC_a	-1.35	PA5359_at	1.57
PA4563_rpsT_a	-1.31	PA5403_at	-1.51
PA4573_at	1.45	PA5427_adhA	1.82
PA4574_at	-1.57	Pae_L37109cd	-1.51
PA4577_at	1.42	Pae_trNA_As	-1.55
PA4607_at	1.73	Pae_trNA_GI	-1.33
PA4611_at	1.41	Pae_trNA_GI	-1.91
PA4616_at	-1.63	Pae_trNA_Ty	-2.53
PA4628_lysP_a	-1.36		
PA4629_at	-2.29		
PA4648_at	1.37		
PA4657_at	1.42		
PA4673_at	-1.44		
PA4703_at	1.79		
PA4770_lidP_a	-1.88		
PA4782_at	1.44		
PA4786_at	2.03		
PA4877_at	1.84		
PA4915_at	1.55		
PA4925_at	1.79		
PA4928_at	-1.32		

## 6 Annexe

**Tableau 6.4.2. Gènes exclusivement différentiellement chez  $\Delta hptB$  vs centre de swarming.**

B	PA4837_at	-1.45	
Up-reg	PA4878_at	-3.60	
Down-reg	PA4881_at	-1.70	5
Total	PA5083_at	-1.65	30
$\Delta hptB$ vs. C	PA5535_at	-1.89	35
Probeset name	PA5538_amiA_at	-1.59	Log <sub>2</sub> (Fold -change)
PA0083_at	PA5540_at	-1.76	1.50
PA0084_at	PA5541_at	-2.07	1.41
PA0140_ahpF_at			-4.23
PA0250_at			-1.93
PA0449_at			-1.66
PA0781_at			-1.43
PA0848_at			-5.63
PA0849_trxB2_at			-3.60
PA1546_hemN_a			1.44
PA2009_hmgA_at			2.33
PA2027_at			-1.57
PA2843_at			-1.48
PA2868_i_at			-2.95
PA3120_leuD_at			-1.70
PA3189_at			-1.93
PA3237_at			-5.63
PA3287_at			-4.65
PA3519_at			-3.42
PA3523_at			-4.41
PA3710_at			-1.53
PA3920_at			-2.95
PA4236_katA_at			-3.22
PA4348_at			1.41
PA4613_katB_at			-4.46
PA4834_at			-1.77
PA4835_at			-1.59
PA4836_at			-1.60

## 6 Annexe

**Tableau 6.4.3.** Gènes exclusivement différentiellement exprimés chez  $\Delta hptB$  vs non-swarming (C),  $\Delta hptB$  vs. extrémité de dendrite et  $\Delta hptB$  vs centre de swarming (D) et  $\Delta hptB$  vs extrémité de dendrite et  $\Delta hptB$  vs non-swarming (E).

C			D			E		
up-regulated	23		up-regulated			up-regulated		
down-regulated	1		down-regulated			down-regulated		
Total	24		Total	7		Total	4	
$\Delta hptB$ vs. NS			$\Delta hptB$ vs. C			$\Delta hptB$ vs. T		$\Delta hptB$ vs. NS
Probeset name	$\log_2(\text{Fold change})$		Probeset name	$\Delta hptB$ vs. T	$\log_2(\text{Fold change})$	Probeset name	$\Delta hptB$ vs. T	$\log_2(\text{Fold change})$
PA0050_r_at	1.42		PA2570_pa1L_at	4.03	1.56	PA1914_at	2.73	1.43
PA0087_at	1.35		PA3318_at	2.99	1.34	PA2142_at	2.46	-1.41
PA0260_at	1.56		PA3569_mimsB_a	1.99	-1.61	PA0049_at	1.97	1.35
PA1658_at	1.54		PA2008_fahA_at	1.73	1.96	PA2141_at	1.67	-1.37
PA1661_at	1.34		PA2007_maiA_i	1.63	1.55			
PA1664_at	1.44		PA0519_nirS_at	1.54	1.54			
PA1667_at	1.65		PA5460_at	1.35	1.66			
PA1670_stp1_at	1.40							
PA1894_at	1.44							
PA2937_at	-1.31							
PA3292_at	1.46							
PA3293_at	1.47							
PA3329_at	1.41							
PA3330_at	1.43							
PA3332_at	1.44							
PA3333_fabH2_at	1.50							
PA3487_at	1.48							
PA3488_at	1.49							
PA3907_at	1.38							
PA3908_at	1.66							
PA4133_at	2.02							
PA4134_i_at	1.88							
PA4625_at	1.33							
PA5089_at	1.37							

## 6 Annexe

**Tableau 6.4.4.** Gènes exclusivement différentiellement exprimés chez  $\Delta hptB$  vs centre de swarming et  $\Delta hptB$  vs non-swarming (F),  $\Delta hptB$  vs extrémité de dendrite,  $\Delta hptB$  vs centre de swarming et  $\Delta hptB$  vs non-swarming (G).

F			G		
up-regulated	down-regulated	Total	up-regulated	down-regulated	Total
		11			3
Log <sub>2</sub> (Fold change)			Log <sub>2</sub> (Fold change)		
Probeset name	$\Delta hptB$ vs. C	$\Delta hptB$ vs. NS	Probeset name	$\Delta hptB$ vs. T	$\Delta hptB$ vs. NS
PA0261_at	1.59	1.89	PA2139_r_at	2.33	1.31
PA0262_at	1.37	1.65	PA0085_at	2.00	1.56
PA1657_at	1.39	1.51	PA0086_at	1.57	1.33
PA1659_at	1.32	1.46			
PA1665_at	1.32	1.66			
PA1666_at	1.33	1.55			
PA1668_at	1.36	1.75			
PA1669_at	1.36	1.52			
PA3187_at	-1.45	1.31			
PA3188_at	-1.71	1.37			
PA3291_at	1.60	1.62			

6.4.2- Protéines extracellulaires identifiées par spectrométrie de masse semblant plus abondantes chez un mutant  $\Delta hptB$  comparé à la souche sauvage.

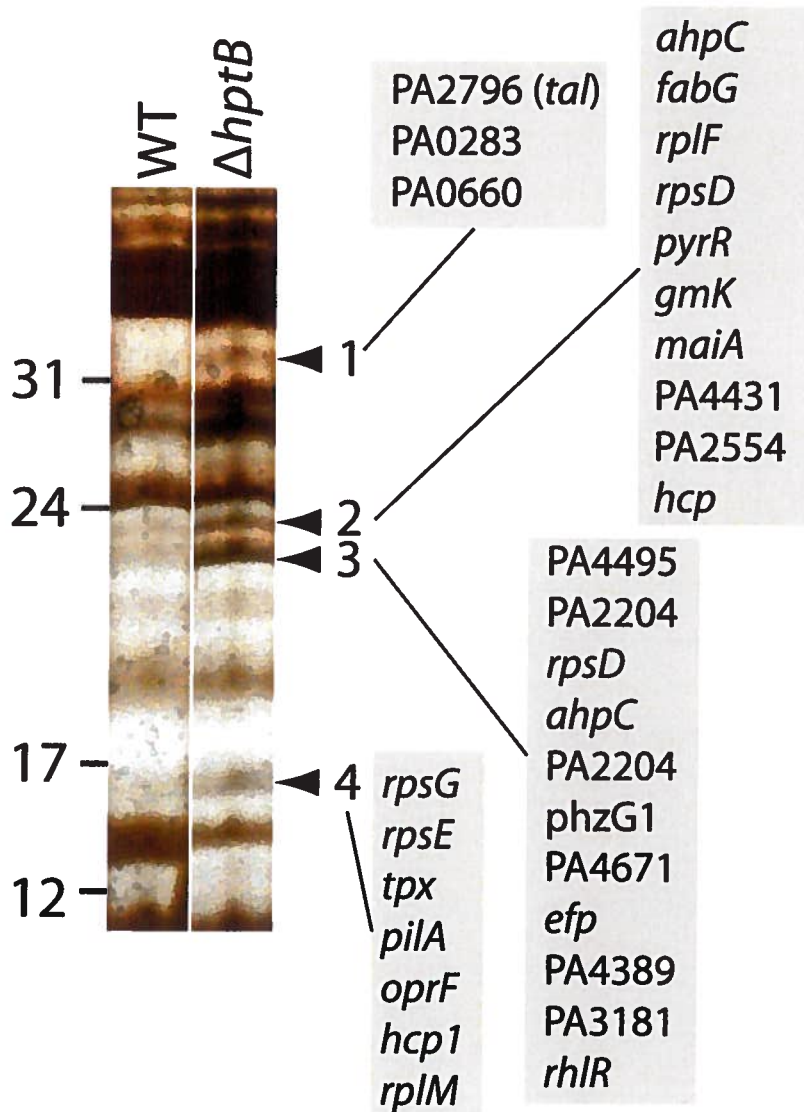


Figure 6.4.1. Résumé des résultats de séquençage de peptides par spectrométrie de masse se rapportant à la section 3.4.

## **6.5 - Données supplémentaires de la section 3.2 - Transcriptome de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa***

### **6.5.1 - Additional file 1**

Swarming motility video clip. Movie clip of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 swarming motility on M9DCAA medium solidified with 0.5% agar. The plate was incubated at 30°C. Video clip was constructed by assembling images taken every 3 minutes over a period of 21 hrs. and 45 min. with a Canon 10D camera equipped with a Canon Ultrasonic 28-80 mm lens.

<http://www.biomedcentral.com/content/download/supplementary/1471-2164-11-587-s1.avi>



### 6.5.2 - Additional file 2

Differentially expressed genes of tendril tip, swarm center and non-swarming bacterial populations. The complete list of genes differentially regulated in  $\log_2$  fold-change with a  $p$ -value of 0.05 or lower.

## 6 Annexe

**Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations.**

Probe ID	Expression value				fold-change				p-value	
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	tip	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA0105_coxB_at	8.0	5.8	8.8		-2.9	-0.8	-2.1	4.24E-07	0.000442	1.67E-05
PA0106_coxA_at	8.6	6.0	8.6		-2.6	0.0	-2.6	1.05E-07	0.824677	2.01E-07
PA0107_at	8.1	5.9	8.1		-2.2	0.0	-2.2	8.30E-06	0.899849	1.94E-05
PA0108_coiII_at	8.9	6.9	8.8		-1.9	0.1	-2.0	4.59E-07	0.513623	1.87E-06
PA0109_at	9.0	7.9	9.7		-1.8	-0.7	-1.1	2.02E-05	4.72E-05	0.000908
PA0140_ahpF_at	12.1	8.6	7.6		1.0	4.5	-3.4	8.19E-05	5.87E-10	1.47E-07
PA0198_exbB1_at	7.0	7.5	8.9		-1.4	-1.9	0.6	0.000698	0.001635	0.244151
PA0200_i_at	7.5	7.3	9.2		-1.9	-1.7	-0.2	0.001664	0.000288	0.71875
PA0250_at	10.3	7.9	8.5		-0.6	1.8	-2.4	0.064838	3.36E-05	0.000277
PA0252_at	8.4	9.2	7.5		1.7	0.9	0.8	2.77E-06	1.01E-05	0.000594
PA0293_at	5.7	7.5	5.8		1.7	-0.1	1.8	3.49E-06	0.390362	1.73E-06
PA0332_at	9.1	8.1	9.6		-1.5	-0.5	-1.0	1.08E-05	0.000915	0.000561
PA0355_pfpI_at	9.9	9.1	10.8		-1.6	-0.9	-0.7	0.000314	0.003188	0.043745
PA0390_metX_at	7.6	9.2	7.4		1.8	0.2	1.5	6.78E-06	0.054465	6.69E-05
PA0446_at	9.6	7.8	9.5		-1.7	0.1	-1.8	5.63E-05	0.354091	0.000107
PA0447_gcdH_at	11.4	9.5	11.3		-1.7	0.1	-1.8	1.74E-06	0.373107	3.38E-06
PA0449_at	10.9	9.3	9.5		-0.2	1.4	-1.6	0.257328	1.25E-05	0.000132
PA0459_at	9.8	8.3	10.0		-1.7	-0.2	-1.4	9.68E-07	0.015259	1.06E-05
PA0471_at	9.7	8.7	10.6		-1.9	-0.8	-1.0	0.000212	0.000164	0.009831
PA0472_at	9.4	8.9	10.4		-1.5	-1.0	-0.5	1.58E-07	0.000823	0.049662
PA0578_at	9.4	10.2	8.5		1.7	0.9	0.8	1.96E-06	0.000826	0.001738
PA0579_rpsU_at	11.9	12.8	11.4		1.5	0.5	1.0	5.35E-07	6.08E-05	2.64E-05
PA0654_speD_at	8.7	10.6	8.6		2.0	0.1	1.8	6.13E-07	0.312301	1.72E-05
PA0668_tyrZ_at	8.8	10.1	8.6		1.5	0.2	1.3	1.89E-06	0.10731	6.32E-05
PA0743_at	8.1	6.9	8.7		-1.8	-0.5	-1.3	1.03E-06	0.000102	2.37E-05
PA0744_at	12.0	10.1	11.6		-1.5	0.3	-1.8	0.005473	0.018073	0.003043
PA0745_at	12.2	9.5	11.9		-2.4	0.3	-2.7	0.001979	0.052338	0.001628
PA0746_at	10.6	8.3	10.2		-1.8	0.4	-2.3	0.003811	0.02411	0.002276
PA0781_at	11.5	9.9	9.6		0.3	2.0	-1.7	0.436884	0.000108	0.005248
PA0782_putA_at	9.8	11.6	10.8		0.8	-0.9	1.7	0.041155	0.117399	0.026842

## 6 Annexe

**Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendril tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)**

Probe ID	Expression value			fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendril tip (T)	Non-swarming (NS)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA0783_putP_at	8.3	9.8	8.3	1.6	0.0	1.5	0.000455	0.973879	0.010541
PA0792_prpD_at	11.9	10.0	11.1	-1.1	0.8	-1.9	0.035923	4.85E-06	0.003896
PA0793_at	9.6	8.7	8.1	0.6	1.5	-0.9	0.061439	9.61E-05	0.027579
PA0810_at	8.9	7.8	9.6	-1.9	-0.8	-1.1	0.000187	0.00067	0.008217
PA0848_at	12.6	8.4	7.2	1.2	5.4	-4.2	0.001221	1.45E-08	2.36E-06
PA0849_trxB2_at	10.9	8.0	7.2	0.8	3.7	-2.9	0.000518	2.49E-08	1.08E-06
PA0955_at	8.3	9.1	7.5	1.6	0.7	0.8	6.45E-05	7.54E-06	0.003734
PA0961_at	9.5	9.5	8.0	1.5	1.5	0.1	5.76E-06	2.31E-06	0.55509
PA0990_at	7.4	7.7	9.1	-1.4	-1.7	0.3	0.003687	5.42E-05	0.416987
PA1070_braG_at	7.4	6.6	5.8	0.8	1.6	-0.8	0.00011	0.00039	0.025308
PA1111_at	7.5	6.6	8.6	-1.9	-1.1	-0.8	7.27E-06	0.001073	0.005367
PA1130_at	6.6	5.6	7.2	-1.5	-0.5	-1.0	1.07E-05	0.000102	0.000283
PA1131_at	8.6	7.6	9.2	-1.6	-0.6	-1.1	5.20E-05	2.19E-05	0.00107
PA1148_foxA_at	10.3	9.4	11.0	-1.5	-0.6	-0.9	0.020422	0.030641	0.16002
PA1168_at	10.8	8.3	9.0	-0.7	1.8	-2.5	0.000395	5.68E-05	1.08E-05
PA1175_mapD_at	9.3	7.5	9.7	-2.2	-0.4	-1.8	1.55E-06	0.025114	3.87E-05
PA1177_mapE_at	6.9	5.4	7.7	-2.3	-0.8	-1.5	1.31E-05	0.008107	9.59E-06
PA1190_at	7.8	6.1	9.8	-3.7	-2.0	-1.7	1.38E-08	0.002399	0.007392
PA1192_at	8.7	9.5	8.0	1.5	0.8	0.8	2.37E-05	3.51E-05	0.002505
PA1242_at	8.5	7.3	9.4	-2.2	-1.0	-1.2	9.08E-06	0.010124	0.006716
PA1243_at	8.2	7.1	9.3	-2.2	-1.1	-1.1	6.44E-06	0.002102	0.003973
PA1245_at	13.1	11.4	13.9	-2.5	-0.8	-1.7	0.000524	0.002441	0.007158
PA1246_aprD_at	10.7	8.7	11.7	-3.0	-1.0	-2.0	0.000438	0.002613	0.008409
PA1247_aprE_at	11.2	10.3	11.9	-1.6	-0.7	-0.9	4.69E-06	0.006715	0.0067
PA1250_aprI_at	10.1	8.6	10.5	-1.9	-0.3	-1.5	0.004807	0.137045	0.020716
PA1300_at	10.0	8.9	10.7	-1.9	-0.8	-1.1	1.89E-05	9.03E-05	0.001224
PA1337_ansB_at	10.9	9.5	9.2	0.3	1.7	-1.3	0.006528	0.000161	0.001051
PA1338_ggt_at	7.9	7.2	6.2	0.9	1.6	-0.7	0.000197	0.000438	0.040844
PA1344_at	9.6	8.2	9.9	-1.7	-0.3	-1.4	0.000247	0.013708	0.001408
PA1349_at	8.5	7.4	9.5	-2.1	-0.9	-1.2	1.34E-06	4.41E-05	0.000133
PA1350_at	8.0	6.8	8.6	-1.8	-0.6	-1.2	8.41E-07	1.90E-05	3.00E-05

**6 Annexe**

**Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)**

Probe ID	Expression value			Fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA1404_at	10.9	9.7	11.8	-2.1	-0.9	-1.2	0.000121	0.011181	0.019123
PA1408_at	8.6	7.5	9.3	-1.8	-0.7	-1.0	5.60E-06	0.014209	0.003427
PA1414_at	11.0	9.8	11.5	-1.7	-0.5	-1.1	0.000101	0.002517	0.001816
PA1552_at	8.3	9.2	7.4	1.9	0.9	1.0	7.55E-06	0.004363	0.003779
PA1553_at	10.0	11.4	9.3	2.1	0.7	1.4	2.43E-07	0.022524	0.001536
PA1554_at	10.1	11.1	9.4	1.7	0.7	1.0	1.03E-07	0.000298	7.38E-05
PA1597_at	7.8	7.2	8.8	-1.6	-1.0	-0.6	2.18E-05	0.000225	0.020276
PA1708_popB_at	9.2	8.4	10.0	-1.5	-0.8	-0.8	0.001866	0.024152	0.105065
PA1728_at	8.7	7.1	9.7	-2.5	-1.0	-1.6	1.91E-07	4.84E-05	1.69E-05
PA1730_at	9.0	8.1	10.3	-2.2	-1.3	-0.9	1.48E-07	0.000183	0.001879
PA1731_at	8.9	7.9	10.2	-2.4	-1.4	-1.0	2.11E-07	0.000268	0.00239
PA1732_at	9.2	7.6	10.5	-2.8	-1.3	-1.6	2.57E-07	5.62E-05	4.38E-05
PA1733_at	9.1	7.7	10.1	-2.4	-0.9	-1.4	5.52E-07	0.000113	9.54E-05
PA1746_at	7.7	6.9	8.8	-1.9	-1.1	-0.8	0.000128	0.058054	0.196289
PA1757_thrH_at	8.2	9.9	8.0	1.8	0.1	1.7	1.20E-05	0.138024	4.83E-05
PA1784_at	10.1	8.9	11.1	-2.2	-1.0	-1.2	1.28E-06	0.001087	0.00091
PA1871_lasA_at	11.6	9.2	12.4	-3.2	-0.8	-2.4	1.67E-06	1.07E-05	2.61E-05
PA1874_at	10.8	8.5	10.1	-1.6	0.8	-2.3	0.017452	0.030053	0.006376
PA1875_at	8.8	7.0	7.9	-1.0	0.8	-1.8	0.011322	0.034082	0.004757
PA1876_at	8.6	6.9	7.7	-0.9	0.9	-1.7	0.018588	0.02283	0.004954
PA1888_at	6.8	6.1	7.8	-1.7	-1.1	-0.6	1.09E-05	5.25E-06	0.005128
PA1894_at	8.6	7.0	6.4	0.6	2.2	-1.6	0.017287	0.006178	0.038898
PA1895_at	8.7	7.6	7.0	0.6	1.7	-1.1	0.001233	0.013079	0.0706
PA1897_at	8.9	7.6	7.0	0.6	1.8	-1.2	0.001433	0.014559	0.074447
PA1912_at	9.4	8.6	10.4	-1.8	-1.0	-0.7	3.68E-05	0.005164	0.055111
PA1914_at	11.1	9.0	10.2	-1.2	0.8	-2.1	6.47E-05	0.066472	0.001857
PA1921_at	7.8	6.7	8.7	-2.0	-0.9	-1.0	6.42E-05	0.028688	0.034044
PA1930_at	8.3	7.1	9.9	-2.8	-1.6	-1.2	7.83E-07	1.23E-05	0.000726
PA1931_at	8.6	7.8	10.0	-2.2	-1.4	-0.8	3.43E-06	0.001963	0.03323
PA1932_at	8.6	7.6	9.5	-1.9	-0.9	-1.0	3.02E-05	0.008384	0.010145
PA1933_at	8.4	7.3	9.2	-1.9	-0.8	-1.1	3.57E-06	0.005545	0.002927

6 Annexe

Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)

Probe ID	Expression value			fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA1985_pqqA_at	9.5	8.5	10.7	-2.2	-1.2	-1.0	1.11E-05	0.0012	0.015361
PA1986_pqqB_at	9.0	8.2	10.1	-1.9	-1.1	-0.8	3.87E-06	5.32E-05	0.00186
PA1987_pqqC_at	8.8	7.9	9.6	-1.7	-0.8	-0.9	1.26E-05	0.000253	0.001119
PA1988_pqqD_at	9.4	7.8	10.0	-2.2	-0.6	-1.6	1.19E-05	0.001615	0.000146
PA1989_pqqE_at	8.6	7.5	9.1	-1.6	-0.5	-1.1	0.000201	0.009035	0.004012
PA2001_atoB_at	9.6	8.3	9.9	-1.6	-0.3	-1.2	0.01533	0.305511	0.080239
PA2024_at	6.8	5.5	7.6	-2.1	-0.8	-1.3	6.12E-08	5.37E-05	4.76E-06
PA2030_at	8.2	7.1	8.6	-1.5	-0.5	-1.0	1.53E-06	0.003279	0.000191
PA2033_at	10.9	8.8	11.3	-2.6	-0.4	-2.1	0.002977	0.012847	0.010236
PA2034_at	10.0	7.6	10.4	-2.8	-0.4	-2.4	0.002955	0.01156	0.009148
PA2062_at	9.4	9.0	10.7	-1.7	-1.3	-0.4	3.05E-06	4.96E-05	0.008834
PA2068_at	9.2	7.4	8.8	-1.4	0.4	-1.8	0.063136	0.00593	0.031843
PA2083_at	8.3	8.4	9.9	-1.5	-1.6	0.2	4.62E-05	9.75E-05	0.510774
PA2088_at	7.3	6.4	7.9	-1.6	-0.6	-1.0	0.000304	0.013092	0.008592
PA2095_at	6.4	5.4	8.3	-2.9	-1.9	-1.0	1.20E-06	1.20E-05	0.005324
PA2134_at	11.3	9.9	13.2	-3.3	-1.9	-1.4	9.57E-06	1.88E-05	0.004876
PA2135_at	7.4	6.7	8.5	-1.8	-1.1	-0.8	2.92E-07	0.001884	0.010967
PA2136_at	5.8	5.6	7.5	-1.9	-1.7	-0.2	4.91E-07	2.27E-06	0.208871
PA2139_r_at	7.2	6.4	9.9	-3.4	-2.7	-0.8	1.54E-07	7.81E-07	0.000454
PA2140_at	6.1	5.5	8.2	-2.6	-2.1	-0.6	4.95E-08	7.88E-06	0.01006
PA2141_at	6.5	5.9	8.8	-2.9	-2.3	-0.6	3.10E-07	2.75E-06	0.000424
PA2142_at	7.9	6.6	10.5	-3.8	-2.6	-1.2	4.74E-08	8.21E-06	0.000859
PA2143_at	10.8	9.5	12.5	-3.0	-1.7	-1.2	1.42E-05	0.000995	0.018221
PA2144_glgP_at	9.1	7.8	10.8	-3.0	-1.7	-1.3	5.45E-06	0.000255	0.005197
PA2145_at	8.1	8.0	9.7	-1.7	-1.6	-0.1	5.68E-06	4.06E-05	0.724115
PA2146_i_at	13.0	10.1	14.2	-4.0	-1.1	-2.9	6.17E-05	0.007255	0.008448
PA2147_katE_at	8.6	7.3	10.5	-3.2	-1.9	-1.3	6.64E-06	0.000224	0.009207
PA2148_at	9.0	7.9	11.2	-3.3	-2.2	-1.1	2.73E-06	0.000226	0.026026
PA2149_at	9.0	7.6	10.8	-3.1	-1.7	-1.4	2.99E-06	0.000395	0.004359
PA2150_at	6.6	6.1	7.9	-1.8	-1.3	-0.4	8.32E-06	2.72E-05	0.019878
PA2151_at	9.7	8.0	11.4	-3.3	-1.6	-1.7	1.47E-05	0.000227	0.002804

## 6 Annexe

**Table 3.2.6.** Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (*continued...*)

Probe ID	Expression value			fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA2152_at	10.3	8.4	11.7	-3.4	-1.4	-1.9	1.01E-06	0.00052	0.000113
PA2153_glgB_at	11.0	8.8	12.4	-3.6	-1.4	-2.2	7.52E-06	0.002922	0.001361
PA2155_at	7.2	6.4	8.4	-1.9	-1.1	-0.8	9.32E-06	0.000412	0.00585
PA2156_at	7.3	5.7	9.0	-3.3	-1.7	-1.6	4.54E-07	0.000812	0.001596
PA2157_at	7.9	7.1	9.2	-2.1	-1.3	-0.8	9.85E-08	0.000407	0.009845
PA2158_at	9.9	7.2	11.6	-4.4	-1.7	-2.7	4.94E-07	0.000254	8.51E-05
PA2159_at	9.6	6.9	11.1	-4.2	-1.4	-2.7	3.02E-06	0.002027	0.000209
PA2160_at	10.4	8.6	11.9	-3.3	-1.5	-1.8	1.94E-05	0.010771	0.010938
PA2161_at	10.4	7.8	12.3	-4.5	-1.9	-2.6	5.62E-05	0.002715	0.005995
PA2162_at	9.9	7.9	11.2	-3.3	-1.3	-2.0	2.91E-05	0.00386	0.003571
PA2163_at	9.9	7.8	11.0	-3.2	-1.1	-2.1	7.25E-05	0.003638	0.002046
PA2164_at	9.9	8.1	10.8	-2.8	-0.9	-1.8	2.73E-05	0.002471	0.000764
PA2165_at	10.0	8.4	11.3	-2.9	-1.4	-1.6	1.70E-06	0.00058	0.00021
PA2167_at	7.2	6.5	8.6	-2.2	-1.5	-0.7	1.33E-06	0.00046	0.019817
PA2169_at	10.2	8.4	11.8	-3.4	-1.6	-1.8	1.11E-06	1.54E-05	0.000178
PA2171_at	9.0	7.5	10.7	-3.3	-1.8	-1.5	1.78E-07	1.31E-05	0.000103
PA2172_at	8.3	6.6	10.1	-3.5	-1.8	-1.7	1.61E-06	0.000154	0.001203
PA2173_at	9.8	7.8	11.5	-3.7	-1.7	-2.0	1.23E-05	0.000354	0.002843
PA2175_at	8.3	7.3	9.5	-2.2	-1.1	-1.1	1.07E-05	0.002845	0.008814
PA2176_at	9.1	7.8	10.6	-2.8	-1.5	-1.4	5.80E-07	0.000697	0.002369
PA2177_at	8.9	8.1	9.9	-1.8	-1.0	-0.9	1.98E-05	0.002524	0.013091
PA2178_at	7.5	7.0	9.7	-2.7	-2.1	-0.6	2.13E-06	7.96E-06	0.055023
PA2179_at	8.3	6.5	9.9	-3.3	-1.6	-1.7	5.08E-06	0.001567	0.003081
PA2180_at	9.4	7.6	11.2	-3.6	-1.8	-1.8	2.08E-06	0.000138	0.000698
PA2181_at	6.6	6.3	8.1	-1.8	-1.5	-0.3	1.03E-07	5.53E-05	0.140473
PA2189_at	7.2	6.7	9.4	-2.6	-2.1	-0.5	6.44E-06	1.38E-05	0.040015
PA2244_at	7.4	6.5	8.5	-2.0	-1.1	-0.9	8.42E-05	0.008431	0.022518
PA2249_bkdB_at	10.1	8.5	9.5	-1.0	0.5	-1.5	0.089219	0.020873	0.027823
PA2255_pvcB_at	8.1	6.4	6.9	-0.5	1.1	-1.7	0.085385	0.058352	0.02425
PA2259_ptxS_at	8.6	7.3	9.3	-2.0	-0.7	-1.3	3.67E-08	0.011094	0.000548
PA2260_at	8.7	6.9	9.4	-2.5	-0.7	-1.8	3.55E-09	0.023444	0.000377

6 Annexe

Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)

Probe ID	Expression value			Fold-change			p-value
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C	
PA2290_gcd_at	10.2	8.7	10.4	-1.7	-0.2	-1.6	0.004992
PA2300_chiC_at	10.8	9.0	11.5	-2.5	-0.7	-1.8	0.00058
PA2312_at	8.3	8.0	9.7	-1.7	-1.4	-0.3	1.40E-06
PA2322_at	9.9	8.6	7.9	0.6	2.0	-1.4	0.114955
PA2375_i_at	9.4	7.9	9.9	-2.0	-0.6	-1.5	4.85E-06
PA2377_at	11.5	10.4	12.8	-2.4	-1.3	-1.0	3.12E-06
PA2381_at	10.4	9.9	11.4	-1.6	-1.0	-0.5	0.001156
PA2406_at	9.4	7.5	8.9	-1.4	0.5	-1.9	0.009276
PA2411_at	10.8	9.0	10.7	-1.7	0.1	-1.8	0.016283
PA2412_at	12.3	10.8	12.4	-1.6	-0.1	-1.5	0.005192
PA2413_at	12.0	10.5	12.5	-2.0	-0.5	-1.5	0.025482
PA2414_at	10.4	8.4	11.6	-3.2	-1.3	-2.0	3.13E-08
PA2415_at	9.9	8.1	11.6	-3.4	-1.7	-1.8	2.18E-07
PA2416_treA_at	9.5	8.2	11.1	-2.9	-1.6	-1.3	1.73E-07
PA2423_at	10.6	9.6	11.3	-1.7	-0.7	-1.0	3.39E-07
PA2424_at	11.4	9.5	11.8	-2.3	-0.4	-1.9	0.013923
PA2425_at	10.9	10.0	11.8	-1.8	-0.8	-0.9	0.002106
PA2427_at	10.5	9.3	11.4	-2.1	-0.9	-1.2	6.38E-07
PA2433_at	12.6	11.4	13.5	-2.1	-0.9	-1.2	2.78E-05
PA2443_sdaA_at	9.0	7.5	9.3	-1.9	-0.3	-1.5	0.002249
PA2445_gcvP2_at	9.2	8.8	10.7	-1.8	-1.4	-0.4	0.000682
PA2446_gcvH2_at	9.6	9.4	11.3	-1.8	-1.6	-0.2	0.000487
PA2452_at	10.4	8.9	10.7	-1.8	-0.3	-1.5	0.041708
PA2485_at	10.6	10.2	11.8	-1.5	-1.2	-0.4	0.001937
PA2486_at	10.0	9.2	10.8	-1.6	-0.8	-0.8	0.002542
PA2504_at	8.0	7.4	9.1	-1.6	-1.0	-0.6	1.89E-07
PA2566_at	7.3	6.8	8.6	-1.8	-1.3	-0.5	1.24E-05
PA2570_pa1L_at	9.2	6.7	11.2	-4.5	-2.0	-2.5	7.36E-08
PA2606_at	9.6	8.1	9.5	-1.4	0.1	-1.5	0.01875
PA2619_infA_at	9.7	10.8	9.1	1.8	0.6	1.1	6.77E-05
PA2708_at	7.9	7.2	8.9	-1.7	-1.0	-0.6	0.000175
							0.000175
							0.00101
							0.056934

6 Annexe

Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)

Probe ID	Expression value			Fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	fold-change (T vs. NS)	fold-change (C vs. NS)	fold-change (T vs. C)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA2717_cpo_at	8.6	7.0	9.4	-2.4	-0.8	-1.6	1.33E-06	0.000222	1.30E-05
PA2746_at	8.7	6.5	10.2	-3.6	-1.4	-2.2	1.55E-08	6.60E-05	1.81E-05
PA2773_at	7.4	6.9	8.9	-2.0	-1.5	-0.4	3.56E-07	6.15E-05	0.064511
PA2780_at	9.3	7.3	8.6	-1.3	0.8	-2.0	2.70E-05	0.01676	0.00019
PA2786_at	8.0	7.7	9.7	-1.9	-1.6	-0.3	1.17E-06	4.18E-06	0.073973
PA2788_at	9.5	7.6	9.9	-2.3	-0.4	-1.9	7.77E-05	0.048861	0.00099
PA2815_at	10.2	8.6	10.8	-2.2	-0.6	-1.6	0.00021	0.015077	0.001136
PA2843_at	10.6	9.6	9.0	0.6	1.6	-1.0	0.000371	1.14E-06	5.26E-05
PA2851_efp_at	10.8	12.0	10.3	1.8	0.5	1.2	8.14E-06	0.000144	0.00016
PA2868_i_at	10.0	6.6	7.2	-0.6	2.8	-3.4	0.002566	1.77E-07	2.91E-07
PA2895_at	7.6	6.5	8.3	-1.9	-0.7	-1.1	1.45E-06	0.012598	0.002613
PA2896_at	8.9	7.9	9.7	-1.8	-0.8	-1.0	1.53E-05	0.005487	0.004106
PA2915_at	8.8	7.8	9.8	-2.0	-0.9	-1.0	2.50E-07	4.47E-05	5.46E-05
PA2927_at	7.9	7.1	8.7	-1.6	-0.8	-0.8	1.32E-05	2.82E-05	0.001056
PA2937_at	6.9	6.4	8.5	-2.1	-1.6	-0.5	7.08E-06	3.53E-06	0.036715
PA2943_at	9.2	7.5	8.7	-1.2	0.5	-1.7	0.017951	0.063746	0.006579
PA2971_at	10.6	11.4	9.9	1.5	0.7	0.8	7.98E-07	3.75E-05	8.89E-05
PA3023_at	8.0	6.7	9.0	-2.2	-1.0	-1.3	7.56E-05	0.004195	0.006427
PA3041_at	11.9	10.9	12.4	-1.5	-0.5	-1.0	0.00158	0.080772	0.013315
PA3049_rmf_at	13.4	11.8	14.0	-2.2	-0.6	-1.6	4.12E-06	0.000891	0.000124
PA3123_at	10.0	8.4	10.3	-2.0	-0.3	-1.7	2.03E-07	0.000913	1.69E-06
PA3182_at	11.4	9.5	10.0	-0.4	1.5	-1.9	0.227011	0.000562	0.002725
PA3187_at	10.3	9.1	7.7	1.5	2.6	-1.2	1.11E-05	0.000246	0.021428
PA3188_at	9.4	8.3	6.3	2.0	3.1	-1.1	7.54E-07	8.12E-05	0.024354
PA3189_at	8.0	6.6	5.5	1.1	2.5	-1.4	0.00055	0.000726	0.021078
PA3231_at	8.1	6.2	9.9	-3.6	-1.7	-1.9	1.49E-06	0.00209	0.000755
PA3235_at	7.7	6.8	8.3	-1.5	-0.6	-0.9	4.34E-05	0.000308	0.001961
PA3237_at	10.6	5.3	5.2	0.1	5.4	-5.3	0.729516	1.12E-07	5.23E-07
PA3263_at	8.5	9.3	7.6	1.7	0.9	0.8	1.03E-06	5.28E-06	0.000258
PA3273_at	8.0	6.6	10.1	-3.5	-2.1	-1.4	2.60E-09	0.000467	0.005707
PA3274_at	9.7	8.4	11.5	-3.1	-1.8	-1.3	8.44E-05	0.00038	0.027276



## 6 Annexe

**Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)**

Probe ID	Expression value			Fold-change			p-value
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	fold-change (T vs. NS)	fold-change (C vs. NS)	fold-change (T vs. C)	
PA3287_at	11.3	6.5	6.6	-0.1	4.7	-4.8	0.634636
PA3318_at	10.0	8.4	10.1	-1.8	-0.1	-1.7	6.49E-08
PA3346_at	8.6	7.4	8.9	-1.5	-0.3	-1.3	5.13E-07
PA3347_at	10.0	9.2	10.7	-1.5	-0.6	-0.9	0.000189
PA3405_hasE_at	8.4	6.8	8.4	-1.6	0.0	-1.6	0.005726
PA3406_hasD_at	9.3	7.8	9.2	-1.4	0.1	-1.5	0.00123
PA3407_hasAp_at	11.9	9.2	12.1	-2.9	-0.2	-2.7	0.00028
PA3416_at	7.3	6.5	8.4	-1.9	-1.1	-0.8	1.54E-06
PA3417_at	7.8	7.1	8.7	-1.6	-1.0	-0.7	2.26E-07
PA3418_ldh_at	9.6	7.5	10.6	-3.1	-1.0	-2.0	1.53E-07
PA3451_at	6.6	5.5	7.6	-2.0	-1.0	-1.1	2.67E-05
PA3459_at	11.3	9.9	12.2	-2.3	-0.8	-1.5	6.51E-06
PA3460_at	11.2	8.7	11.9	-3.3	-0.8	-2.5	0.000846
PA3461_at	9.7	7.9	10.6	-2.7	-0.9	-1.8	1.34E-05
PA3478_rhIB_at	12.5	11.1	13.4	-2.3	-0.9	-1.4	1.78E-06
PA3479_rhIA_at	13.1	11.6	13.6	-2.0	-0.6	-1.5	1.21E-07
PA3519_at	8.2	4.7	4.6	0.2	3.6	-3.4	0.17604
PA3520_at	12.8	11.0	12.6	-1.6	0.2	-1.8	1.73E-06
PA3523_at	10.5	6.6	6.2	0.3	4.2	-3.9	0.017132
PA3531_bfrB_at	7.3	9.5	6.7	2.7	0.5	2.2	1.95E-06
PA3569_mmsB_at	9.8	6.2	8.6	-2.4	1.2	-3.6	3.59E-05
PA3570_mmsA_at	11.0	8.4	10.5	-2.1	0.6	-2.7	2.16E-06
PA3572_at	8.6	7.9	9.9	-2.0	-1.3	-0.7	3.98E-05
PA3600_at	12.9	10.8	11.6	-0.7	1.3	-2.1	0.301509
PA3655_tsf_at	10.7	12.2	10.6	1.7	0.2	1.5	3.30E-06
PA3690_at	8.9	7.3	8.2	-0.9	0.7	-1.6	0.00034
PA3734_at	7.8	7.4	9.0	-1.6	-1.3	-0.3	1.29E-05
PA3741_at	6.7	7.8	6.1	1.6	0.6	1.1	5.21E-05
PA3742_rplS_at	10.0	11.2	9.5	1.8	0.5	1.2	3.74E-07
PA3743_trmD_at	10.4	11.6	9.9	1.8	0.5	1.3	7.37E-08
PA3744_rimM_at	11.0	11.9	10.5	1.4	0.6	0.9	1.93E-06
							0.000973
							4.26E-06
							5.26E-07
							5.69E-06
							0.004973
							0.009009
							0.001856
							0.000914
							0.002751
							0.000894
							4.00E-06
							0.002632
							0.00093
							0.004805
							0.00265
							0.000121
							2.74E-05
							1.19E-06
							1.82E-06
							1.55E-07
							1.49E-05
							8.46E-05
							3.99E-05
							0.036321
							0.023411
							1.92E-05
							4.36E-05
							0.085752
							0.000895
							4.09E-05
							4.73E-05
							0.000973

6 Annexe

Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)

Probe ID	Expression value			Fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	fold-change (T vs. NS)	fold-change (C vs. NS)	fold-change (T vs. C)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA3745_rpsP_at	11.5	12.3	10.8	1.5	0.7	0.8	3.16E-07	9.04E-05	8.33E-05
PA3784_at	8.9	7.3	8.7	-1.4	0.2	-1.7	0.000408	0.53675	0.006718
PA3788_at	7.8	7.0	8.8	-1.8	-1.0	-0.8	3.49E-06	0.024598	0.049822
PA3796_at	8.7	7.1	8.9	-1.8	-0.2	-1.5	0.002636	0.091998	0.008147
PA3819_at	10.8	10.1	11.8	-1.8	-1.1	-0.7	0.000177	7.56E-05	0.025753
PA3820_secF_at	9.0	9.8	8.2	1.6	0.7	0.8	6.73E-07	6.12E-05	5.35E-05
PA3821_secD_at	9.2	10.1	8.5	1.6	0.7	0.9	3.24E-07	1.76E-05	2.20E-05
PA3846_at	9.6	7.5	10.1	-2.6	-0.5	-2.1	2.87E-05	0.000253	0.000199
PA3888_at	10.3	9.4	10.9	-1.5	-0.6	-0.9	0.001645	0.03869	0.034441
PA3890_at	9.9	8.9	10.5	-1.5	-0.6	-0.9	0.000492	0.070329	0.029913
PA3919_at	9.8	8.7	10.4	-1.7	-0.5	-1.1	3.08E-07	0.001233	5.72E-05
PA3920_at	8.8	5.8	6.2	-0.4	2.6	-3.1	0.014917	1.50E-05	1.59E-05
PA3922_at	10.6	8.6	9.4	-0.8	1.2	-2.0	6.23E-05	0.000266	2.56E-05
PA3923_at	8.8	7.2	8.1	-1.0	0.6	-1.6	4.80E-06	0.001179	8.61E-06
PA3967_at	8.2	8.6	7.1	1.5	1.1	0.4	4.11E-06	2.36E-05	0.029519
PA3979_at	6.5	7.6	6.0	1.6	0.5	1.1	4.04E-05	0.00058	0.001156
PA3986_at	8.8	7.2	9.4	-2.2	-0.6	-1.6	1.54E-06	9.40E-05	2.24E-05
PA4064_at	10.2	8.1	8.9	-0.7	1.4	-2.1	0.010271	1.95E-05	9.64E-05
PA4065_at	10.3	8.2	8.7	-0.6	1.6	-2.2	0.026679	1.86E-05	9.19E-05
PA4066_at	9.5	8.2	8.0	0.2	1.5	-1.3	0.464279	4.06E-05	0.005133
PA4131_at	9.1	9.9	8.2	1.7	0.9	0.8	3.34E-06	0.05115	0.113005
PA4133_at	10.0	11.2	8.3	2.9	1.6	1.2	1.93E-08	0.034999	0.092106
PA4134_i_at	9.0	9.8	7.3	2.6	1.7	0.8	2.55E-08	0.051711	0.314666
PA4139_at	13.5	11.3	12.0	-0.7	1.5	-2.2	0.000732	6.29E-05	1.97E-05
PA4140_at	10.0	8.1	8.4	-0.3	1.6	-2.0	0.003698	0.002909	0.001302
PA4171_at	11.4	10.2	12.8	-2.6	-1.4	-1.2	3.60E-05	0.000229	0.009752
PA4172_at	8.4	7.4	9.7	-2.2	-1.3	-0.9	2.21E-05	0.000114	0.00387
PA4218_at	11.3	10.0	11.6	-1.7	-0.3	-1.4	0.038142	0.087004	0.090014
PA4219_at	9.7	8.4	10.3	-1.9	-0.6	-1.3	0.035061	0.031062	0.143425
PA4220_i_at	11.8	10.7	12.6	-1.9	-0.7	-1.1	0.028255	0.006085	0.160921
PA4222_at	11.2	9.9	12.0	-2.0	-0.7	-1.3	0.028229	0.000137	0.128621

6 Annexe

Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)

Probe ID	Expression value			Fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	fold-change (T vs. NS)	fold-change (C vs. NS)	fold-change (T vs. C)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA4223_at	11.5	10.0	12.0	-2.0	-0.5	-1.5	0.030841	0.001248	0.096166
PA4224_at	11.7	10.0	12.3	-2.3	-0.6	-1.8	0.029833	0.007096	0.089236
PA4225_pchF_at	9.9	8.3	10.6	-2.4	-0.7	-1.6	0.040419	0.001323	0.143095
PA4226_pchE_at	10.9	9.3	11.6	-2.2	-0.6	-1.6	0.037417	0.002615	0.124363
PA4228_pchD_at	12.6	11.3	13.0	-1.7	-0.4	-1.3	0.031307	0.008561	0.094523
PA4229_pchC_at	12.8	11.2	13.0	-1.8	-0.3	-1.5	0.032732	0.010825	0.067134
PA4230_pchB_at	13.0	11.7	13.5	-1.8	-0.5	-1.3	0.014867	0.000846	0.061193
PA4231_pchA_at	10.7	9.4	11.1	-1.8	-0.5	-1.3	0.018966	0.000935	0.069183
PA4236_katA_at	12.4	9.2	9.0	0.3	3.4	-3.2	0.256001	1.20E-08	7.05E-06
PA4255_rpmC_at	10.2	11.6	9.9	1.7	0.4	1.3	8.37E-08	0.017	3.15E-05
PA4275_nusG_at	10.5	11.3	9.6	1.7	0.8	0.9	5.93E-07	2.06E-05	0.000124
PA4311_at	10.1	9.0	11.3	-2.3	-1.1	-1.1	1.62E-06	0.001172	0.001238
PA4312_at	9.5	8.2	10.1	-1.9	-0.7	-1.3	6.01E-06	0.018641	0.001229
PA4345_at	8.9	7.5	10.1	-2.6	-1.1	-1.4	3.02E-06	0.003737	0.001479
PA4352_at	8.8	7.8	10.0	-2.2	-1.2	-0.9	1.33E-06	0.066573	0.148117
PA4394_at	11.0	10.4	12.0	-1.6	-1.0	-0.7	6.63E-05	0.002093	0.035268
PA4429_at	9.0	10.2	8.0	2.2	0.9	1.2	4.08E-07	0.003684	0.00166
PA4430_at	8.9	10.0	8.0	2.0	0.9	1.1	1.61E-07	0.00335	0.002753
PA4432_rpsI_at	9.9	11.4	9.6	1.8	0.3	1.5	1.18E-06	0.028672	7.92E-06
PA4438_at	7.9	9.4	7.8	1.6	0.1	1.5	2.26E-06	0.166523	4.96E-06
PA4467_at	11.1	9.0	10.9	-1.8	0.3	-2.1	0.007076	0.037681	0.004856
PA4479_rmrD_at	9.3	10.0	8.4	1.6	0.9	0.7	6.36E-07	9.20E-05	0.000695
PA4480_rmrC_at	9.2	9.9	8.4	1.4	0.7	0.7	3.94E-06	0.000322	0.000346
PA4567_rpmA_at	11.5	12.5	11.0	1.5	0.6	0.9	9.35E-07	2.63E-05	5.17E-05
PA4573_at	8.1	7.0	9.1	-2.0	-1.0	-1.1	5.09E-08	2.52E-06	7.46E-06
PA4577_at	7.9	7.4	9.0	-1.6	-1.1	-0.4	1.88E-05	0.002787	0.16147
PA4607_at	12.1	10.6	11.5	-1.0	0.6	-1.5	4.32E-06	0.004235	2.42E-05
PA4611_at	10.6	9.6	11.5	-1.9	-0.8	-1.0	3.41E-05	1.38E-05	0.00189
PA4613_katB_at	10.6	7.1	6.2	1.0	4.4	-3.4	0.001115	5.67E-08	4.06E-06
PA4616_at	8.5	10.1	7.9	2.2	0.6	1.6	9.37E-07	0.002111	8.67E-05
PA4628_lysP_at	5.7	6.7	5.1	1.7	0.7	1.0	1.43E-06	0.000301	2.16E-05

## 6 Annexe

**Table 3.2.6.** Differentially expressed genes of tendril tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (*continued...*)

Probe ID	Expression value			Fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendril tip (T)	Non-swarming (NS)	fold-change (T vs. NS)	fold-change (C vs. NS)	fold-change (T vs. C)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA4629_at	5.9	7.5	5.5	2.0	0.4	1.6	5.84E-08	0.004104	2.60E-06
PA4657_at	9.3	8.3	9.8	-1.5	-0.5	-1.1	3.79E-06	0.001241	0.000115
PA4672_at	9.6	11.0	9.3	1.7	0.4	1.4	1.76E-07	0.002023	7.12E-06
PA4673_at	9.7	11.2	9.5	1.7	0.2	1.5	5.16E-06	0.016368	1.85E-05
PA4748_tpiA_at	10.1	10.9	9.3	1.6	0.8	0.8	4.29E-07	0.000271	0.000496
PA4762_grpE_at	10.5	12.1	11.4	0.7	-0.9	1.6	0.001287	1.19E-05	1.45E-05
PA4770_ildP_at	5.3	6.9	5.3	1.5	0.0	1.5	0.000119	0.960744	0.000409
PA4782_at	11.2	9.9	11.7	-1.8	-0.5	-1.3	1.30E-06	0.001623	7.81E-05
PA4786_at	9.4	7.6	10.0	-2.4	-0.6	-1.8	0.001107	0.078159	0.012335
PA4834_at	9.9	7.8	7.5	0.3	2.4	-2.1	0.530662	0.000141	0.007058
PA4835_at	9.2	6.4	7.1	-0.7	2.1	-2.8	0.041369	0.00079	0.000678
PA4836_at	10.9	8.4	8.9	-0.5	2.0	-2.5	0.378574	9.23E-05	0.003493
PA4837_at	11.7	10.1	10.0	0.2	1.7	-1.5	0.77847	0.000232	0.070734
PA4838_at	8.8	7.3	7.4	-0.2	1.4	-1.5	0.408287	0.001358	0.00182
PA4877_at	9.2	8.2	10.4	-2.3	-1.2	-1.0	2.51E-05	2.74E-05	0.004994
PA4878_at	11.2	7.9	7.5	0.3	3.6	-3.3	0.010581	4.62E-08	3.56E-07
PA4895_at	8.5	7.4	9.0	-1.6	-0.5	-1.1	0.00459	0.029606	0.038128
PA4915_at	9.5	8.2	9.8	-1.6	-0.3	-1.3	8.29E-06	0.051	0.000178
PA4916_at	8.0	6.4	7.9	-1.5	0.1	-1.6	0.005702	0.407136	0.006029
PA4925_at	8.3	7.1	9.0	-1.9	-0.7	-1.2	3.76E-07	1.75E-05	1.22E-05
PA4928_at	7.7	9.0	7.4	1.7	0.4	1.3	8.26E-06	0.005875	0.000106
PA5027_at	6.5	6.4	8.0	-1.5	-1.5	0.0	2.08E-05	0.001907	0.922506
PA5046_at	10.3	11.5	10.0	1.6	0.3	1.2	5.41E-07	0.013685	6.72E-06
PA5049_rpmE_at	9.5	10.9	9.3	1.6	0.2	1.3	4.44E-05	0.004459	0.00021
PA5061_at	11.4	10.5	12.0	-1.5	-0.6	-1.0	2.24E-05	0.001385	0.001729
PA5082_at	8.6	7.2	7.1	0.1	1.5	-1.4	0.515119	0.045857	0.065933
PA5100_hutU_at	10.2	9.4	11.2	-1.8	-0.9	-0.9	0.00268	0.069268	0.179834
PA5116_at	7.4	6.3	7.8	-1.6	-0.5	-1.1	3.61E-05	0.044605	0.002932
PA5139_at	7.0	8.3	6.5	1.8	0.4	1.4	1.04E-05	0.022816	0.00046
PA5150_at	8.4	7.7	9.4	-1.8	-1.0	-0.7	8.73E-07	0.000798	0.005416
PA5171_arcA_at	11.7	10.9	12.7	-1.8	-1.0	-0.8	1.28E-05	0.001765	0.008125

6 Annexe

Table 3.2.6. Differentially expressed genes of tendril tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)

Probe ID	Expression value			Fold-change				p-value	
	Swarm center (C)	Tendril tip (T)	Non-swarming (NS)	fold-change (T vs. NS)	fold-change (C vs. NS)	fold-change (T vs. C)	T vs. NS		C vs. NS
PA5172_arcB_at	11.5	10.3	12.1	-1.8	-0.5	-1.2	3.22E-06	0.058987	0.001332
PA5192_pckA_at	10.0	11.2	9.7	1.5	0.3	1.2	1.32E-05	0.004456	0.000184
PA5286_at	8.8	10.4	9.4	0.9	-0.6	1.5	2.96E-05	2.70E-05	3.75E-06
PA5312_at	10.2	9.3	10.9	-1.7	-0.8	-0.9	1.60E-07	0.007399	0.005489
PA5313_at	8.9	7.7	10.2	-2.5	-1.4	-1.2	5.41E-08	0.005549	0.013775
PA5359_at	8.8	7.2	9.2	-2.0	-0.4	-1.6	2.75E-08	0.007694	4.60E-06
PA5403_at	6.3	8.0	6.1	1.9	0.2	1.7	1.68E-05	0.114103	7.32E-05
PA5404_at	6.4	7.7	5.9	1.8	0.5	1.3	9.44E-06	0.000749	0.000131
PA5409_at	7.0	6.0	7.5	-1.5	-0.5	-1.1	0.000544	0.003329	0.005976
PA5427_adhA_at	7.5	6.6	8.8	-2.2	-1.2	-1.0	3.01E-06	0.02821	0.070577
PA5460_at	8.4	8.8	11.0	-2.2	-2.6	0.4	3.71E-06	0.000105	0.325784
PA5475_at	7.3	7.0	9.4	-2.4	-2.1	-0.3	4.65E-06	0.001377	0.497783
PA5479_gltP_at	6.9	8.1	6.6	1.6	0.3	1.2	6.05E-06	0.104136	0.000605
PA5530_at	5.8	7.8	6.4	1.4	-0.6	2.0	8.05E-05	0.005845	3.75E-05
PA5535_at	9.2	7.7	7.3	0.4	1.9	-1.5	0.327798	0.002001	0.035215
PA5536_at	10.7	9.5	8.8	0.7	1.9	-1.2	0.365989	0.001528	0.215085
PA5538_amiA_at	7.3	5.8	5.8	0.0	1.5	-1.5	0.993692	0.011122	0.015182
PA5539_at	8.5	7.7	7.0	0.7	1.5	-0.8	0.019484	0.004379	0.119658
PA5540_at	10.0	8.6	8.0	0.5	2.0	-1.5	0.203619	0.002766	0.043991
PA5541_at	9.9	7.9	7.4	0.5	2.5	-2.0	0.315463	0.000786	0.019089
PA5546_at	10.0	8.7	10.4	-1.8	-0.4	-1.3	1.75E-05	0.014649	0.000372
PA5550_at	7.4	8.7	7.1	1.6	0.3	1.3	3.26E-06	0.012032	2.26E-05
PA5553_atpC_at	9.3	10.0	8.5	1.5	0.7	0.8	2.63E-07	0.000457	0.000757
PA5554_atpD_at	10.2	11.2	9.4	1.9	0.8	1.0	2.81E-08	6.42E-05	5.67E-05
PA5555_atpG_at	12.2	12.9	11.3	1.7	1.0	0.7	5.22E-07	0.000121	0.002498
PA5556_atpA_at	11.7	12.5	11.1	1.4	0.6	0.8	3.45E-06	0.001353	0.001052
PA5557_atpH_at	12.5	13.1	11.8	1.3	0.7	0.7	3.06E-07	3.08E-05	0.000141
PA5558_atpF_at	13.2	13.8	12.5	1.3	0.7	0.6	7.30E-07	2.00E-05	0.000294
PA5559_atpE_at	13.0	13.5	12.2	1.3	0.8	0.5	1.12E-06	4.87E-06	0.000728
PA5560_atpB_at	10.9	11.9	10.2	1.8	0.7	1.1	2.57E-07	3.74E-05	1.80E-05
PA5561_atpI_at	8.6	9.6	8.3	1.3	0.3	1.0	2.32E-06	0.020275	9.22E-05

## 6 Annexe

**Table 3.2.6.** Differentially expressed genes of tendrill tip, swarm center and non-swarming bacterial populations (continued...)

Probe ID	Gene expression			Fold-change			p-value		
	Swarm center (C)	Tendrill tip (T)	Non-swarming (NS)	fold-change (T vs. NS)	fold-change (C vs. NS)	fold-change (T vs. C)	T vs. NS	C vs. NS	T vs. C
PA5568_at	11.4	12.3	10.7	1.7	0.7	0.9	2.92E-07	3.31E-05	2.53E-05
Pae_tRNA_Asn_s_at	9.8	11.3	9.7	1.6	0.1	1.5	2.13E-06	0.194492	2.96E-06
Pae_tRNA_Gly_s_at	9.1	10.7	8.4	2.4	0.7	1.7	7.74E-08	0.000158	1.61E-06
Pae_tRNA_Met_s_at	6.0	7.0	5.4	1.6	0.6	1.0	4.12E-06	4.41E-05	0.000138
Pae_tRNA_Phe_f_at	7.6	8.9	7.2	1.6	0.4	1.3	6.91E-05	0.014743	0.000726
Pae_tRNA_Ser_f_at	7.6	9.9	7.8	2.2	-0.2	2.4	3.07E-06	0.159176	8.22E-06
Pae_tRNA_Tyr_s_at	8.4	10.4	7.9	2.5	0.5	2.0	1.78E-08	0.012241	4.33E-06

## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS.**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
ig_2240302_2239267_at		-2.1	N/A	N/A
ig_3649704_3648915_at		-2.0	N/A	N/A
ig_517462_518083_at		-1.8	N/A	N/A
PA0105	<i>coxB</i>	-2.9	cytochrome c oxidase, subunit II	Energy metabolism
PA0106	<i>coxA</i>	-2.6	cytochrome c oxidase, subunit I	Energy metabolism
PA0107		-2.2	conserved hypothetical protein	Energy metabolism
PA0108	<i>collI</i>	-1.9	cytochrome c oxidase, subunit III	Energy metabolism
PA0109		-1.8	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA0200		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0332		-1.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0355	<i>pfpI</i>	-1.6	protease PfpI	Translation, post-translational modification, degradation
PA0446		-1.7	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0447	<i>gcdH</i>	-1.7	glutaryl-CoA dehydrogenase	Fatty acid and phospholipid metabolism ; Amino acid biosynthesis and metabolism ; Carbon compound catabolism
PA0459		-1.7	probable ClpA/B protease ATP binding subunit	Translation, post-translational modification, degradation
PA0471		-1.9	probable transmembrane sensor	Two-component regulatory systems ; Membrane proteins ; Transcriptional regulators
PA0472		-1.5	probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators
PA0743		-1.8	probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Carbon compound catabolism
PA0744		-1.5	probable hydratase/isomerase	Putative enzymes
PA0745		-2.4	probable hydratase/isomerase	Putative enzymes
PA0746		-1.8	probable dehydrogenase	Putative enzymes
PA0810		-1.9	probable haloacid dehalogenase	Carbon compound catabolism
PA1111		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1130	<i>rhlC</i>	-1.5	rhamnosyltransferase 2	Cell wall / LPS / capsule ; Adaptation, Protection
PA1131		-1.6	probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	Membrane proteins ; Antibiotic resistance and susceptibility ; Transport of small molecules



## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA1148	<i>toxA</i>	-1.5	exotoxin A precursor	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA1175	<i>napD</i>	-2.2	NapD protein of periplasmic nitrate reductase	Energy metabolism
PA1177	<i>napE</i>	-2.3	periplasmic nitrate reductase protein NapE	Energy metabolism
PA1190		-3.7	conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA1242		-2.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1243		-2.2	probable sensor/response regulator hybrid	Two-component regulatory systems
PA1245		-2.5	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA1246	<i>aprD</i>	-3.0	alkaline protease secretion protein AprD	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Protein secretion/export apparatus
PA1247	<i>aprE</i>	-1.6	alkaline protease secretion protein AprE	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Protein secretion/export apparatus
PA1250	<i>aprI</i>	-1.9	alkaline proteinase inhibitor AprI	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA1300		-1.9	probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators
PA1344		-1.7	probable short-chain dehydrogenase	Putative enzymes
PA1349		-2.1	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1350		-1.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1404		-2.1	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1408		-1.8	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA1414		-1.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1597		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1708	<i>popB</i>	-1.5	translocator protein PopB	Protein secretion/export apparatus
PA1728		-2.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1730		-2.2	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1731		-2.4	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1732		-2.8	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown



## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA1733		-2.4	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1746		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1784		-2.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1871	<i>lasA</i>	-3.2	LasA protease precursor	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Translation, post-translational modification, degradation
PA1874		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ; Antibiotic resistance and susceptibility
PA1888		-1.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1912		-1.8	probable sigma-70 factor, subfamily	Transcriptional regulators
PA1921		-2.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1930		-2.8	probable chemotaxis transducer	Adaptation, Protection ; Chemotaxis
PA1931		-2.2	probable ferredoxin	Energy metabolism ; Carbon compound catabolism
PA1932		-1.9	probable molybdopterin-containing subunit	Carbon compound catabolism
PA1933		-1.9	probable hydroxylase large subunit	Carbon compound catabolism
PA1985	<i>pqqA</i>	-2.2	pyrroloquinoline biosynthesis protein A	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA1986	<i>pqqB</i>	-1.9	pyrroloquinoline biosynthesis protein B	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA1987	<i>pqqC</i>	-1.7	pyrroloquinoline biosynthesis protein C	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA1988	<i>pqqD</i>	-2.2	pyrroloquinoline biosynthesis protein D	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA1989	<i>pqqE</i>	-1.6	pyrroloquinoline biosynthesis protein E	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers
PA2001	<i>atoB</i>	-1.6	acetyl-CoA acetyltransferase	Central intermediary metabolism ; Fatty acid and phospholipid metabolism

## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA2024		-2.1	probable ring-cleaving dioxygenase	Putative enzymes
PA2030		-1.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2033		-2.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2034		-2.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2062		-1.7	probable pyridoxal-phosphate dependent enzyme	Putative enzymes
PA2088		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2095		-2.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2134		-3.3	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2135		-1.8	probable transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules
PA2136		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2139		-3.4	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2140		-2.6	probable metallothionein	Central intermediary metabolism
PA2141		-2.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2142		-3.8	probable short-chain dehydrogenase	Putative enzymes
PA2143		-3.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2144	<i>glgP</i>	-3.0	glycogen phosphorylase	Cell wall / LPS / capsule
PA2145		-1.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2146		-4.0	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2147	<i>katE</i>	-3.2	catalase HPII	Adaptation, Protection
PA2148		-3.3	conserved hypothetical protein	Membrane proteins
PA2149		-3.1	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2150		-1.8	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2151		-3.3	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2152		-3.4	probable trehalose synthase	Putative enzymes
PA2153	<i>glgB</i>	-3.6	1,4-alpha-glucan branching enzyme	Energy metabolism

## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendrils vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PAZ155		-1.9	probable phospholipase	Putative enzymes
PAZ156		-3.3	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ157		-2.1	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ158		-4.4	probable alcohol dehydrogenase (Zn-dependent)	Putative enzymes
PAZ159		-4.2	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ160		-3.3	probable glycosyl hydrolase	Putative enzymes
PAZ161		-4.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ162		-3.3	probable glycosyl hydrolase	Putative enzymes
PAZ163		-3.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ164		-2.8	probable glycosyl hydrolase	Putative enzymes
PAZ165		-2.9	probable glycogen synthase	Energy metabolism
PAZ167		-2.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ169		-3.4	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ171		-3.3	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ172		-3.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ173		-3.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ175		-2.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ176		-2.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ177		-1.8	probable sensor/response regulator hybrid	Two-component regulatory systems
PAZ178		-2.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ179		-3.3	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ180		-3.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ181		-1.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ189		-2.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ244	<i>pslN</i>	-2.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PAZ259	<i>ptxS</i>	-2.0	transcriptional regulator PtxS	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transcriptional regulators
PAZ260		-2.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown ; Carbon compound catabolism
PAZ290	<i>gcd</i>	-1.7	glucose dehydrogenase	Carbon compound catabolism ; Energy metabolism
PAZ300	<i>chiC</i>	-2.5	chitinase	Carbon compound catabolism

## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA2312		-1.7	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators
PA2375		-2.0	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA2377		-2.4	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2381		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2411		-1.7	probable thioesterase	Adaptation, Protection ; Putative enzymes
PA2412		-1.6	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2413	<i>pvdH</i>	-2.0	L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase, PvdH	Adaptation, Protection
PA2414		-3.2	L-sorbose dehydrogenase	Carbon compound catabolism
PA2415		-3.4	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA2416	<i>treA</i>	-2.9	periplasmic trehalase precursor	Carbon compound catabolism
PA2423		-1.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2424	<i>pvdL</i>	-2.3	PvdL	Adaptation, Protection
PA2425	<i>pvdG</i>	-1.8	PvdG	Adaptation, Protection
PA2427		-2.1	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2433		-2.1	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2443	<i>sdaA</i>	-1.9	L-serine dehydratase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2445	<i>gcvP2</i>	-1.8	glycine cleavage system protein P2	Central intermediary metabolism ; Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2446		-1.8	glycine cleavage system protein H2	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2452	<i>gcvH2</i>	-1.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2485		-1.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2486		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2504		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2566		-1.8	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2570	<i>lecA</i>	-4.5	LecA	Adaptation, Protection ; Motility & Attachment ; Cell wall / LPS / capsule
PA2708		-1.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown

## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA2717	<i>cpo</i>	-2.4	chloroperoxidase precursor	Central intermediary metabolism
PA2746		-3.6	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA2773		-2.0	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA2786		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2788		-2.3	probable chemotaxis transducer	Adaptation, Protection ; Chemotaxis
PA2815		-2.2	probable acyl-CoA dehydrogenase	Putative enzymes
PA2895		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2896		-1.8	probable sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcriptional regulators
PA2915		-2.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2927		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA2937		-2.1	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3023		-2.2	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3041		-1.5	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA3049	<i>rmf</i>	-2.2	ribosome modulation factor	Translation, post-translational modification, degradation
PA3123		-2.0	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3231		-3.6	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA3235		-1.5	conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA3273		-3.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3274		-3.1	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3318		-1.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3346		-1.5	probable two-component response regulator	Transcriptional regulators ; Two-component regulatory systems
PA3347		-1.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3405	<i>hasE</i>	-1.6	metalloprotease secretion protein	Protein secretion/export apparatus
PA3406	<i>hasD</i>	-1.4	transport protein HasD	Protein secretion/export apparatus ; Transport of small molecules
PA3407	<i>hasAp</i>	-2.9	heme acquisition protein HasAp	Transport of small molecules
PA3416		-1.9	probable pyruvate dehydrogenase E1 component, beta chain	Energy metabolism

## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA3417		-1.6	probable dehydrogenase E1 component, alpha subunit	Energy metabolism
PA3418	<i>ldh</i>	-3.1	leucine dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA3451		-2.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3459		-2.3	probable amidotransferase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA3460		-3.3	probable acetyltransferase	Putative enzymes
PA3461		-2.7	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3478	<i>rhIB</i>	-2.3	ramnosyltransferase chain B	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA3479	<i>rhIA</i>	-2.0	ramnosyltransferase chain A	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)
PA3520		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3569	<i>mmsB</i>	-2.4	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Carbon compound catabolism
PA3570	<i>mmsA</i>	-2.1	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Carbon compound catabolism
PA3572		-2.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3734		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3788		-1.8	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA3796		-1.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3819		-1.8	conserved hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA3846		-2.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3888		-1.5	probable permease of transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules
PA3890		-1.5	probable permease of transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules
PA3919		-1.7	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3986		-2.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4171		-2.6	probable protease	Putative enzymes
PA4172		-2.2	probable nuclease	DNA replication, recombination, modification and repair
PA4218		-1.7	probable transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules
PA4219		-1.9	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown

## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendrils vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA4220		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4222		-2.0	probable ATP-binding component of ABC transporter	Transport of small molecules
PA4223		-2.0	probable ATP-binding component of ABC transporter	Membrane proteins ; Transport of small molecules
PA4224	<i>pchG</i>	-2.3	pyochelin biosynthetic protein	Transport of small molecules ; Membrane proteins
PA4225	<i>pchF</i>	-2.4	PchG pyochelin synthetase	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transport of small molecules
PA4226	<i>pchE</i>	-2.2	dihydroaeruginosic acid synthetase	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transport of small molecules
PA4228	<i>pchD</i>	-1.7	pyochelin biosynthesis protein	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transport of small molecules
PA4229	<i>pchC</i>	-1.8	PchD pyochelin biosynthetic protein	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transport of small molecules
PA4230	<i>pchB</i>	-1.8	PchC salicylate biosynthesis protein	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transport of small molecules
PA4231	<i>pchA</i>	-1.8	PchB salicylate biosynthesis protein	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transport of small molecules
PA4311		-2.3	isochorismate synthase	Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate) ; Transport of small molecules
PA4312		-1.9	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4345		-2.6	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4352		-2.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4394		-1.6	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4467		-1.8	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4573		-2.0	hypothetical protein	Membrane proteins ; Hypothetical, unclassified, unknown
PA4577		-1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4611		-1.9	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4657		-1.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4782		-1.8	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4786		-2.4	probable short-chain dehydrogenase	Putative enzymes
PA4877		-2.3	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown



## 6 Annexe

**Table 3.2.7. Product and function for genes down-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA4895		-1.6	probable transmembrane sensor	Membrane proteins ; Transcriptional regulators
PA4915		-1.6	probable chemotaxis transducer	Adaptation, Protection ; Chemotaxis
PA4925		-1.9	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5027		-1.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5061		-1.5	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5100	<i>hutU</i>	-1.8	urocanase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA5116		-1.6	probable transcriptional regulator	Transcriptional regulators
PA5150		-1.8	probable short-chain dehydrogenase	Putative enzymes
PA5171	<i>arcA</i>	-1.8	arginine deiminase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA5172	<i>arcB</i>	-1.8	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA5312		-1.7	probable aldehyde dehydrogenase	Putative enzymes
PA5313		-2.5	probable pyridoxal-dependent aminotransferase	Putative enzymes
PA5359		-2.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5409		-1.5	hypothetical protein	Membrane proteins
PA5427	<i>adhA</i>	-2.2	alcohol dehydrogenase	Energy metabolism ; Carbon compound catabolism
PA5460		-2.2	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5475		-2.4	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5546		-1.8	conserved hypothetical protein	Putative enzymes

232 genes are down-regulated in tendril vs. NS.



## 6 Annexe

**Table 3.2.8. Product and function for genes up-regulated in tendril vs. NS.**

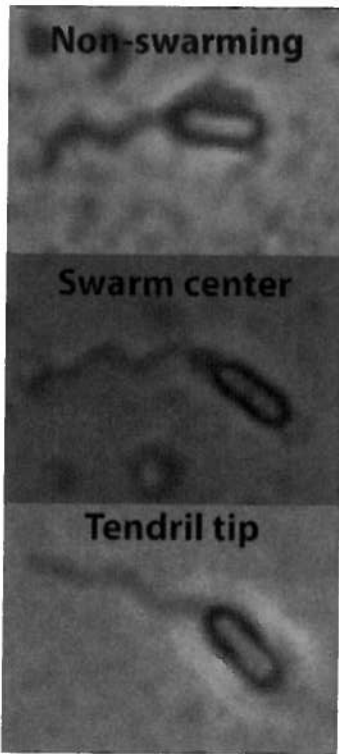
Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA0252		1.7	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0293	<i>aguB</i>	1.7	N-carbamoylputrescine amidohydrolase	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Putative enzymes
PA0390	<i>metX</i>	1.8	homoserine O-acetyltransferase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA0578		1.7	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0579	<i>rpsU</i>	1.5	30S ribosomal protein S21	Translation, post-translational modification, degradation
			S-adenosylmethionine	
PA0654	<i>speD</i>	2.0	decarboxylase proenzyme	Central intermediary metabolism
PA0668	<i>tyrZ</i>	1.5	tyrosyl-tRNA synthetase 2	Amino acid biosynthesis and metabolism ; Translation, post-translational modification, degradation
PA0783	<i>putP</i>	1.6	sodium/proline symporter PutP	Membrane proteins ; Transport of small molecules
PA0955		1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA0961		1.5	probable cold-shock protein	Transcriptional regulators
PA1192		1.5	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA1552		1.9	probable cytochrome c	Energy metabolism
			probable cytochrome c oxidase subunit	
PA1553		2.1	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)	Energy metabolism
PA1554		1.7	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)	Energy metabolism
PA1757	<i>thrH</i>	1.8	homoserine kinase	Amino acid biosynthesis and metabolism
PA2619	<i>infA</i>	1.8	initiation factor	Translation, post-translational modification, degradation
PA2851	<i>efp</i>	1.8	translation elongation factor P	Translation, post-translational modification, degradation
PA2971		1.5	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
			probable permease of ABC sugar transporter	
PA3188		2.0	sugar transporter	Transport of small molecules
PA3263		1.7	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3531	<i>bfrB</i>	2.7	bacterioferritin	Transport of small molecules ; Adaptation, Protection
PA3655	<i>tsf</i>	1.7	elongation factor Ts	Translation, post-translational modification, degradation
PA3741		1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3742	<i>rplS</i>	1.8	50S ribosomal protein L19	Translation, post-translational modification, degradation
			tRNA (guanine-N1)-methyltransferase	
PA3743	<i>trmD</i>	1.8	methyltransferase	Transcription, RNA processing and degradation
PA3744	<i>rimM</i>	1.4	16S rRNA processing protein	Transcription, RNA processing and degradation

## 6 Annexe

**Table 3.2.8. Product and function for genes up-regulated in tendril vs. NS. (continued...)**

Gene # or Probeset	Gene name	Fold change (log <sub>2</sub> )	Product name	PseudoCAP function
PA3745	<i>rpsP</i>	1.5	30S ribosomal protein S16	DNA replication, recombination, modification and repair ; Translation, post-translational modification, degradation
PA3820	<i>secF</i>	1.6	secretion protein SecF	Protein secretion/export apparatus
PA3821	<i>secD</i>	1.6	secretion protein SecD	Membrane proteins ; Protein secretion/export apparatus
PA3967		1.5	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA3979		1.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4131		1.7	probable iron-sulfur protein	Putative enzymes
PA4133		2.9	cytochrome c oxidase subunit (cbb3-type)	Energy metabolism
PA4134		2.6	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4255	<i>rpmC</i>	1.7	50S ribosomal protein L29	Translation, post-translational modification, degradation
PA4275	<i>nusG</i>	1.7	transcription antitermination protein NusG	Transcription, RNA processing and degradation
PA4429		2.2	probable cytochrome c1 precursor	Energy metabolism
PA4430		2.0	probable cytochrome b	Energy metabolism
PA4432	<i>rpsI</i>	1.8	30S ribosomal protein S9	Translation, post-translational modification, degradation
PA4438		1.6	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4479	<i>mreD</i>	1.6	rod shape-determining protein MreD	Cell wall / LPS / capsule ; Cell division
PA4480	<i>mreC</i>	1.4	rod shape-determining protein MreC	Cell wall / LPS / capsule ; Cell division
PA4567	<i>rpmA</i>	1.5	50S ribosomal protein L27	Translation, post-translational modification, degradation
PA4616		2.2	probable c4-dicarboxylate-binding protein	Transport of small molecules
PA4628	<i>lysP</i>	1.7	lysine-specific permease	Membrane proteins ; Transport of small molecules
PA4629		2.0	hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4672		1.7	peptidyl-tRNA hydrolase	Translation, post-translational modification, degradation
PA4673		1.7	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA4748	<i>tpiA</i>	1.6	triosephosphate isomerase	Central intermediary metabolism ; Energy metabolism
PA4770	<i>lldP</i>	1.5	L-lactate permease	Transport of small molecules
PA4928		1.7	conserved hypothetical protein	Hypothetical, unclassified, unknown
PA5046		1.6	malic enzyme	Central intermediary metabolism

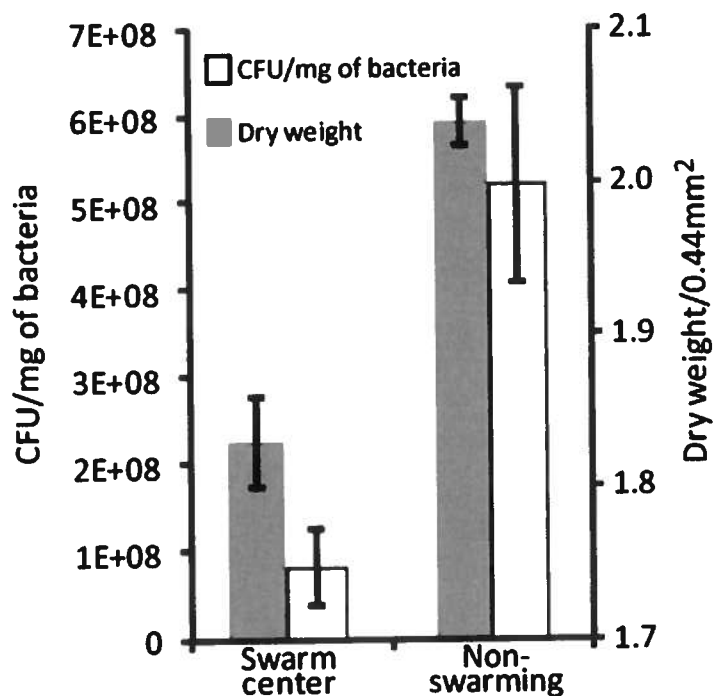
6.5.5 - Additional file 5



**Figure 3.2.5.** Flagella observations.

Typical images of bacterial cells isolated from tendril tip, swarm center and non-swarming conditions. The flagella staining procedure was performed as described by Merritt and coworkers (Merritt *et al.*, 2007).

## 6.5.6 - Additional file 6



**Figure 3.2.6.** Swarm center population contains more dead cells than non-swarming bacteria. Swarming and non-swarming colonies were grown as described in material and methods. For each conditions (swarm center and non-swarming), ten circular agar plugs containing swarm center and non-swarming bacteria of 0.75 mm diameter were extracted from plates and vigorously resuspended in sterile 2 mL of PBS buffer and serially diluted. For CFU count, 100  $\mu$ L of each serial dilution was plated on TSB agar plates and incubated O/N at 37°C. To determine the dry weight, the remaining bacterial suspensions were placed in pre-weighed aluminum cups and incubated at 65°C for 4 hrs to allow water evaporation. Cups were weighed again to determine total dry weight. All experiments were performed in triplicates.