Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier

Mécanismes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* en motilité de type *swarming* et sa fonction écologique

Par

Laure Cockenpot

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Examinateur externe

Nicolas Doucet INRS- Institut Armand-Frappier

Pascale Beauregard Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Déziel, Éric INRS Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Cockenpot, Laure 2014

RÉSUMÉ

Le *swarming* est un type de motilité très bien décrit au sein de diverses espèces bactériennes, mais plus particulièrement chez la bactérie modèle *Pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs facteurs permettant d'activer ce comportement sont connus, entre autres, la nécessité pour la bactérie de posséder un ou des flagelles fonctionnels et sa capacité à produire un agent mouillant, typiquement un surfactant. Toutefois, la fonction du *swarming* reste à ce jour indéterminée. De plus, lorsque ces bactéries adoptent la motilité de type *swarming*, elles acquièrent une résistance augmentée, mais transitoire envers plusieurs classes d'antibiotiques.

En regard à ces deux phénomènes, le rôle du *swarming* chez *P. aeruginosa* dans un contexte environnemental doit être clarifié, ainsi que le mécanisme menant à l'augmentation de la résistance envers différentes classes d'antibiotiques.

Puisque plusieurs espèces bactériennes ont la capacité de se déplacer sur les hyphes de mycètes pour atteindre des nutriments, nous avons émis l'hypothèse que le *swarming* pourrait être le type de motilité permettant ce déplacement. Différents mycètes ont été testés afin de déterminer sur quels types d'hyphes *P. aeruginosa* avait le plus de facilité à se déplacer. Par ailleurs, différentes motilités de *P. aeruginosa*, telles que le *twitching* et le *swimming*, ont été testées afin de déterminer si l'une d'entre-elles favorise la translocation sur les hyphes de mycète. Les résultats obtenus lors des différentes expérimentations vont à l'encontre de l'hypothèse de travail. Par ailleurs, il en ressort que les structures cellulaires permettant le déplacement bactérien sur les surfaces, comme les *pili* de type IV et les flagelles, ne sont pas impliqués dans la translocation de *P. aeruginosa* sur les hyphes de mycètes.

Pour élucider les raisons de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* en motilité *swarming*, un criblage sélectif a été entreprit sur 267 mutants ainsi que des analyses protéomiques permettant de cibler des protéines qui sont exprimées différemment lorsque les colonies en *swarming* de *P. aeruginosa* sont exposées à un antibiotique, la tobramycine. Le criblage sélectif n'a pas permis d'identifier un mutant faisant du *swarming* montrant une sensibilité à la tobramycine. Toutefois, les résultats des analyses protéomiques indiquent que certaines protéines de la membrane externe sont surexprimées lorsque *P. aeruginosa* adopte la motilité de type *swarming* en présence d'antibiotique.

Étudiante

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier sincèrement le Dr. Éric Déziel de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de sa formidable équipe, de son support, de ses encouragements face à mes résultats et mes idées. Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire, et particulièrement Fabrice Jean-Pierre pour son aide indispensable et ses plaisanteries matinales.

Merci du fond du cœur à mes parents et mes frères d'avoir toujours été présents, surtout dans les moments difficiles. Merci à mes parents de m'avoir obligé à me coucher quand rien n'allait plus! Sans eux, sans leur éducation et leur soutien à toute épreuve, tout ceci n'aurait jamais eu lieu. Merci à Carl St-vincent de m'avoir apporté de la chance, de m'encourager et surtout, de me faire rire.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières
Liste des figures
Chapitre 1 : Revue de littérature11
1.1 Motilité bactérienne11
1.1.1 Différentes motilités; sociales vs non-sociales12
1.1.1.1 Swimming12
1.1.1.2 <i>Twitching</i>
1.1.1.3 <i>Swarming</i> 13
1.1.1.4 Swarming de P.aeruginosa15
1.2 Résistance aux antibiotiques17
1.2.1 Modes d'action des antibiotiques selon la famille18
1.2.1.1 Aminoglycosides
1.2.1.2 β-lactamines19
1.2.1.3 Macrolides
1.2.1.4 Peptides antimicrobiens21
1.2.1.5 Quinolones
1.2.2 Systèmes de résistance
1.2.2.1 Membrane externe25
1.2.2.2 Systèmes d'efflux27
1.2.2.3 Réponse au stress
1.2.2.4 Sulfure d'hydrogène

1.2.2.5 États physiologiques	
1.2.2.5.1 Résistance du swarming aux antibiotiques	
1.3 Interactions mycètes/bactéries dans le sol	
1.3.1 Rôles écologiques	
1.3.2 Déplacement bactérien sur les mycètes	
Chapitre 2 : Déplacement de <i>P. aeruginosa</i> sur les hyphes de mycètes	
2.1 Mise en contexte	
2.2 Méthodologie	
2.2.1 Cultures de mycètes	
2.2.1.1 Mycètes	
2.2.1.2 Milieu de culture	
2.2.1.3 Cultures	
2.2.2 Cultures bactériennes	40
2.2.2.1 Bactéries	40
2.2.2.2 Milieu de culture	41
2.2.2.3 Tampon de lavage	41
2.2.2.4 Précultures	41
2.2.2.5 Nettoyage des cellules	
2.2.3 Montage de la construction servant à tester le déplacement	
2.2.3.1 Préparation des disques gélosés	
2.2.3.2 Préparation des disques de mycète	
2.2.3.3 Montage	
2.2.3.4 Inoculation des bactéries	
2.2.4 Sélection du mycète pour les tests de quantification	

2.2.4.1 Milieu de culture	43
2.2.4.2 Test de translocation de <i>P.aeruginosa</i> sur les mycètes	43
2.2.5 Quantification du déplacement des bactéries sur les hyphes	44
2.2.5.1 Milieu de culture	44
2.2.5.2 Tampon de lavage	44
2.2.5.3 Test de translocation	44
2.2.5.4 Nettoyage des disques	44
2.2.5.5 Décompte cellulaire	45
2.3 Résultats	45
2.3.1 Sélection du mycète	45
2.3.2 Quantification du déplacement	46
2.4 Discussion	53
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez P. aeruginosa en motilité swa	rming
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i>	<i>rming</i> 57
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte.	urming 57 57
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte 3.2 Méthodologie	erming 57 57 58
 Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte. 3.2 Méthodologie	urming 57 57 58 58
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte 3.2 Méthodologie 3.2.1 Bactéries 3.2.1.1 Précultures	urming 57 57 58 58 59
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte 3.2 Méthodologie 3.2.1 Bactéries 3.2.1.1 Précultures 3.2.2 Milieux de culture	urming 57 57 58 58 59 59
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte	urming 57 57 58 58 59 59 59
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte 3.2 Méthodologie 3.2.1 Bactéries 3.2.1 Précultures 3.2.2 Milieux de culture 3.2.3 Préparation des cellules 3.2.4 Antibiotique	urming 57 57 58 58 59 59 59 59 59
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte	urming 57 57 58 58 59 59 59 59 60 60
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> en motilité <i>swa</i> 3.1 Mise en contexte 3.2 Méthodologie 3.2.1 Bactéries 3.2.1 Bactéries 3.2.2 Milieux de culture 3.2.3 Préparation des cellules 3.2.4 Antibiotique 3.2.4.1 Tests de susceptibilité 3.2.4.2 Concentration sous-inhibitrice optimale et courbe de croissance	urming 57 57 58 58 59 59 59 59 60 60

	3.2.5 Récolte des cellules exposées à la tobramycine	61
	3.2.6 Tests de susceptibilité	61
	3.2.7 Gels d'électrophorèse bidimensionnels (Gels 2-DE)	61
	3.2.7.1 Tampons et solutions	62
	3.2.7.2 Solutions de coloration au nitrate d'argent	63
	3.2.7.3 Extraction des protéines de la membrane externe et périplasmiques	63
	3.2.7.4 Dosage protéique Bradford	64
	3.2.7.5 Préparation des gels d'acrylamide	64
	3.2.7.6 Première dimension	65
	3.2.7.7 Équilibration	66
	3.2.7.8 Deuxième dimension	66
	3.2.7.10 Analyse des gels	67
	3.2.8 RT-PCR quantitative (qRT-PCR)	68
	3.2.8.1 Amorces	68
	3.2.8.2 Gradient de température	68
	3.2.8.3 Extraction des ARN	68
	3.2.8.4 Traitement à la DNase et inactivation	68
	3.2.8.5 qRT-PCR	69
3	.3 Résultats	69
	3.3.1 Tests de susceptibilité	69
	3.3.2 Gels d'électrophorèse bidimensionnels <i>swarming</i>	70
	3.3.3 RT-PCR quantitative	77
	3.3.4 Concentration sous-inhibitrice optimale et courbe de croissance	79
	3.3.5 Gels d'électrophorèse bidimensionnel swimming	80

3.4 Discussion	
4. Conclusion générale	92
Annexe 1	94
Annexe 2	111
Bibliographie	

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Description des mycètes utilisés pour les tests de translocation	
Tableau 2.2 : Phénotypes de mutants utilisés pour les tests de déplacement	41
Tableau 2.3 : Pourcentage de déplacement des mutants et de la souche sauvage	

Chapitre 3

Tableau 3.1 : Résultats des mutants soumis au test de susceptibilité	72
Tableau 3.2 : Liste de protéines après le séquençage des gels 2-DE swarming	75
Tableau 3.3 : Liste de protéines après le séquençage des gels 2-DE swimming	85

Annexes

Tableau A.1 : Liste des mutants pour les tests de susceptibilité	97
Tableau A.2 : Programme de migration des bandelettes pH 1	14
Tableau A.3 : Séquences des amorces utilisées pour le qRT-PCR 1	15
Tableau A.4 : Mélange réactionnel pour une réaction de PCR (ADN)1	16
Tableau A.5 : Programme de la réaction de PCR pour le gradient de température1	16
Tableau A.6 : Mélange réactionnel pour une réaction de PCR (ARN)	17
Tableau A.7 : Programme de la réaction de PCR1	17

Tableau A.8 : Mélange réactionnel pour une réaction de qRT-PCR	118
Tableau A.9 : Programme de la réaction de qRT-PCR	118

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1 : Aspect des colonies <i>swarming</i> selon l'espèce	15
Figure 1.2 : Schéma du quorum sensing	16
Figure 1.3 : Schéma de la synthèse des rhamnolipides et des HAA	17
Figure 1.4 : Structure de la pénicilline et de la D-alanyl-D-alanine	20
Figure 1.5 : Structure des polymyxines	21
Figure 1.6 : Schéma du mode d'action des peptides antimicrobiens	22
Figure 1.7 : Structure de l'acide nalidixique	23
Figure 1.8 : Paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif et à Gram positif	26
Figure 1.9 : Transporteurs membranaires	
Figure 1.10 : Exemple de colonie de <i>P. aeruginosa</i> en <i>swarming</i> en présence d'antibiotique	
Figure 1.11 : Présence d'un film liquide sur les hyphes de <i>P. ultimum</i>	
Chapitre 2	
Figure 2.1 : Schéma du montage des constructions	43
Figure 2.2 : Cinétiques de <i>P. aeruginosa</i> inoculé sur <i>P. ultimum</i>	47
Figure 2.3 : Compte de bactéries sur les disques de départ et d'arrivée après quatre heures	48
Figure 2.4 : Cinétique de <i>fliC</i> , <i>pilA</i> ⁻ et <i>cheA</i> ⁻	51

Figure 2.5 : Comparaison de cinétique de <i>P. aeruginosa</i> pour trois disques	53
Figure 2.6 : Cinétique de <i>P. aeruginosa</i>	54
Chapitre 3	
Figure 3.1 : Gels 2-DE <i>swarming</i>	74
Figure 3.2 : Expression relative de huit gènes	80
Figure 3.3 : Concentration sous-inhibitrice optimale de tobramycine	81
Figure 3.4 : Courbes de croissance	82
Figure 3.5 : Gels 2-DE swimming	85

Introduction

Les bactéries sont des organismes unicellulaires qui sont étroitement liés à leur environnement. Dépendamment du type de motilité que les bactéries peuvent adopter, celui-ci leur procure un net avantage parmi les autres microorganismes qui sont dépourvu de motilité ou ceux n'ayant pas les structures cellulaires adaptées au milieu. Par exemple, une bactérie possédant un ou plusieurs flagelles est avantagée dans un environnement riche en eau, où celle-ci aura la capacité de se mouvoir vers une source nutritive plus efficacement qu'une bactérie exempte de cette organelle. Certaines bactéries peuvent posséder plusieurs types de structures permettant le déplacement, tandis que d'autres n'en possèdent aucune. Ces dernières sont généralement retrouvées dans un environnement spécifique où il y a très peu de variation.

Plusieurs recherches dans le domaine de la biorestauration des sols contaminés ont mis en lumière que les bactéries ont la capacité d'utiliser les hyphes de mycètes pour se déplacer afin d'atteindre plus efficacement les nutriments et les polluants présents dans le sol. Cependant le moyen utilisé par les bactéries pour se mouvoir sur les hyphes n'est pas clairement décrit.

Un type de motilité qui est encore peu compris est le *swarming*, qui peut être défini brièvement comme un comportement social coordonné au sein d'une colonie de bactéries. Cette motilité peut être observée chez plusieurs espèces bactériennes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant toutes les observations faites jusqu'à ce jour l'ont été dans un contexte expérimental artificiel, normalement sur géloses. Il est notable que les bactéries adoptant ce type de motilité acquièrent en même temps une résistance transitoire considérablement augmentée à divers antibiotiques.

Ce mémoire de maîtrise est divisé en quatre volets. La première partie permet la compréhension des concepts qui seront abordés tout au long du mémoire. La seconde partie rapporte l'étude du déplacement de *P. aeruginosa* sur les hyphes de mycètes. La troisième section aborde les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en motilité de type *swarming*. Chacune de ces deux sections de résultats est conclue avec sa discussion propre. Finalement, un quatrième chapitre présente une discussion et conclusion générale.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif décrit pour la première fois par Carle Gessard (1850-1925) en 1882. Cette bactérie a été isolée à partir de plaies contenant du pus bleu, une caractéristique de *P. aeruginosa* qui produit un pigment, la pyocyanine, ayant cette couleur Briand (2009). Cette bactérie ubiquitaire et versatile est retrouvée dans plusieurs environnements, allant des sources d'eau aux sols. Son génome contient une large gamme de gènes l'aidant à s'adapter à des conditions environnementales diverses lui permettant, entre autres, d'utiliser trois types de motilité, le *swimming*, le *twitching* et le *swarming*, et de pouvoir former des biofilms. La combinaison de son haut pouvoir d'adaptation et l'expression d'une multitude de gènes de virulence en fait d'elle un pathogène opportuniste qui infecte les organismes ayant un système de défense immunitaire affaibli (Stover *et al.*, 2000, Briand, 2009). De plus, cet agent infectieux possède plusieurs gènes de résistance aux antimicrobiens, innés et acquis, qui nuisent aux traitements contre ce pathogène (Harshey, 2003, Briand, 2009).

1.1 Motilité bactérienne

En observant les différents types de motilité chez plus de 40 espèces bactériennes provenant de 18 genres différents, Jörgen Henrichsen a pu mettre à jour six différents types de motilités : le *swimming*, le *swarming*, le *swinting*, le *sliding* et le *darting*. (Henrichsen, 1972). Plusieurs de ces motilités peuvent être présentes chez une même espèce, tandis que d'autres n'ont été vues que chez certaines (Harshey, 2003).

Les motilités les plus étudiées sont le *swimming*, le *swarming* et le *twitching*. Pour les deux premiers mouvements, la présence d'un ou plusieurs flagelles fonctionnels est nécessaire. Tandis que pour le dernier type de déplacement, des *pili*, ou *fimbriæ*, sont de rigueur. Brièvement, les flagelles sont des structures longitudinales d'environ 5 à 10 µm qui fonctionnent à la manière d'une hélice nécessitant un moteur qui utilise la force proton-motrice (Harshey, 2003). La force de rotation des flagelles permet aux cellules de se propulser dans le milieu à des vitesses atteignant jusqu'à 40 µm/s. Les *pili*, tant qu'à eux, sont des filaments plus courts que les flagelles, et qui servent à adhérer à différentes surfaces (Harshey, 2003).

1.1.1 Différentes motilités; sociales vs non-sociales

Les bactéries sont couramment vues à tort comme des organismes solitaires qui interagissent entre eux de façon occasionnelle. Bien souvent, les bactéries s'organisent en groupe et quelques fois en communauté pour augmenter les bénéfices encourus (Harshey, 2003). Par exemple, la formation de corps de fructification, un agrégat de cellules, permet aux myxobactéries de survivre dans des conditions environnementales hostiles jusqu'à ce qu'elles redeviennent favorables. Les trois principaux avantages liés à la formation d'une communauté sont : l'optimisation de la croissance et de la survie grâce à la spécialisation de certaines cellules, l'augmentation à l'accès aux nutriments et l'amélioration des mécanismes de défenses contre la dessiccation ou des antagonistes (Harshey, 2003). Ces avantages peuvent être transposés à la migration cellulaire quand celle-ci s'effectue en groupe, par exemple lors du *twitching* et du *swarming*. À l'opposé, les cellules qui s'engagent dans un déplacement individuel, comme le *swimming*, ne profitent pas des bénéfices liés aux interactions sociales (Harshey, 2003).

1.1.1.1 Swimming

La nage libre ou plus communément connue sous l'anglicisme *swimming* est un mouvement bactérien qui se fait dans un milieu liquide ou à faible concentration d'agar (< 0,3 %) et qui nécessite l'action d'un ou plusieurs flagelles fonctionnels (Harshey, 2003). Ce mode de propulsion individuel est largement étudié chez *Escherichia coli* permet à celle-ci de se déplacer à environ 30 µm/s en utilisant la rotation flagellaire (Harshey, 2003, Darnton *et al.*, 2010, Kearns, 2010, Partridge & Harshey, 2012). Selon le sens de la rotation du, ou des, flagelle(s), les bactéries peuvent, soit se diriger linéairement, lorsque le moteur flagellaire tourne dans le sens antihoraire, ou changer de direction quand le moteur tourne dans le sens horaire, ce qui produit le culbutage de la bactérie (Darnton *et al.*, 2010, Partridge & Harshey, 2012). Lorsque la bactérie rencontre un agent qui est considéré comme répulsif, le moteur flagellaire fera culbuter la bactérie afin de permettre l'éloignement de la source, tandis que si l'agent est considéré comme attractif, le moteur tournera dans le sens antihoraire afin de diriger la bactérie vers le composé attractif. On nomme ce phénomène chimiotactisme. Le *swimming* est donc un type de motilité qui permet aux bactéries de se diriger correctement dans un milieu liquide ou à faible concentration d'agar en fonction d'un gradient de molécules attractives ou répulsives (Partridge & Harshey, 2012).

1.1.1.2 Twitching

Le *twitching* est, contrairement au *swimming*, un déplacement bactérien social. Ce phénomène est impliqué dans la formation de biofilm et de corps de fructification (Harshey, 2003).

Cette motilité nécessite l'action de *fimbriæ* fonctionnels, particulièrement des *pili* de type IV. Le mécanisme de déplacement consiste à projeter un *pilus* sur la surface, une fois que celui-ci y a adhéré, la cellule se fait tirer lors de la rétractation du *fimbria*, à la manière d'un treuil, le *fimbria* peut par la suite se détacher et le processus recommence. Cette adhérence n'est pas spécifique à une surface, les bactéries peuvent s'attacher à des surfaces abiotiques, comme le verre, le plastique ou le métal, mais aussi sur des surfaces organiques, comme les cellules épithéliales ou des gels d'agar (Harshey, 2003). De plus, les *fimbriæ* d'une même bactérie semblent se rétracter et s'allonger de façon indépendante, ce qui permet à *P. aeruginosa* de se déplacer à une vitesse d'environ 0,5 μ m/s avec une force approximative de 10 piconewton (Harshey, 2003).

Les bactéries en *twitching* s'organisent en formant des radeaux cellulaires où les cellules sont alignées de façon très étroite et se déplacent en formant un réseau rappelant des mailles. Les cellules derrière les premières rangées sont disposées afin de toucher les pôles des cellules devant elles. Ce contact est nécessaire, lorsqu'une cellule le perd et retourne à l'état individuel, son *twitching* est fortement diminué (Harshey, 2003).

1.1.1.3 Swarming

L'essaimage ou *swarming* est un mouvement, comme le nom l'indique, de groupe. À l'image des essaims d'abeilles, les bactéries ont la possibilité de se déplacer de la même manière, en un mouvement collectif concerté vers une destination commune. Les bactéries en *swarming* peuvent être classées en deux groupes, les *swarmers* robustes et le *swarmers* modérés. Les espèces comme *Azospirillum, Rhodospirullum, Proteus* et *Vibrio*, représentant le premier groupe, peuvent se déplacer sur des surfaces solidifiées avec 1,5 % d'agar et plus, tandis que les *swarmers* modérés, représenté par *E. coli* et les genres *Bacillus, Pseudomonas, Salmonella* et *Serratia*, ne peuvent que se mouvoir sur des surfaces semi-solides contenant entre 0,5 à 0,8 % d'agar. Généralement, les bactéries du groupe des *swarmers* robustes possèdent beaucoup plus de flagelles que les *swarmers* modérés. De plus, les *swarmers* robustes, lorsqu'ils sont dans un milieu

favorisant le *swarming*, augmentent leur longueur cellulaire, qui peut être de plus de 30 μm, ce qui peut aussi être le cas chez les *swarmers* modérés, quoique ceux-ci montrent un allongement plus modeste (Partridge & Harshey, 2012).

Bien qu'il y ait quelques différences entre les groupes de swarmers, les bactéries qui affichent une motilité swarming ont des caractéristiques communes et doivent affronter les mêmes obstacles pour réussir à se déplacer. Sur un milieu semi-solide ou solide, dans le cas des swarmers robustes, la surface n'est pas adaptée pour un déplacement optimal. Celle-ci doit être conditionnée pour que le déplacement se fasse adéquatement et trois principaux obstacles doivent être surmontés : (1) la tension de surface et (2) la force de friction doivent être réduites et (3) suffisamment d'eau doit pouvoir être attirée pour mouiller suffisamment la surface (Partridge & Harshey, 2012). Deux mécanismes sont mis en place afin d'y parvenir, et sont indissociables. Le premier moyen est l'action de flagelles fonctionnels, soit en augmentant leur nombre, comme pour les swarmers robustes, ou en augmentant leur efficacité comme chez les swarmers modérés. Deuxièmement, les bactéries produisent un agent tensioactif permettant de réduire la tension de surface. Le surfactant peut être soit sécrété dans le milieu, comme des rhamnolipides ou des lipopeptides produits respectivement chez Pseudomonas aeruginosa et Serratia sp., ou attachés à la surface bactérienne, comme les lipopolysaccharides (LPS) (Partridge & Harshey, 2012). Les surfactants sont des molécules amphiphiles qui ont la propriété de pouvoir interagir aussi bien avec les liquides qu'avec les surfaces, ce qui permet de réduire la tension de surface (Kearns, 2010, Partridge & Harshey, 2012). Grâce à l'action combinée des flagelles et de l'agent mouillant, le *swarming* est le mouvement cellulaire de surface le plus rapide, atteignant des vitesses de 2 à 10 µm/s (Harshey, 2003). Une autre caractéristique commune chez les bactéries en swarming est leur organisation où les cellules au front de migration forment des radeaux, qui sont une agglomération de bactéries positionnées côte à côte sur leur axe longitudinal. Par ailleurs, les cellules se déplacent toutes vers une direction commune (Kearns, 2010).

Toutefois, pour que le *swarming* s'enclenche, la colonie a besoin d'atteindre une densité cellulaire déterminée afin de se mettre en mouvement- si cette densité n'est pas atteinte, le *swarming* ne s'amorce pas (Kearns, 2010, Partridge & Harshey, 2012).

Même si plusieurs critères sont similaires chez les bactéries en *swarming*, l'aspect des colonies est très différent d'une espèce à une autre. Par exemple, les colonies de *Proteus mirabilis* forment de cercles concentriques où le centre est le point d'inoculation, tandis que les colonies de

P. aeruginosa forment une figure où des branches, les dendrites, sont projetées du centre vers l'extérieur sans se toucher (Fig 1.1) (Kearns, 2010).



Figure 1.1 Aspect de colonies *swarming* selon les espèces A) *Proteus mirabilis* PM7002 (Kearns, 2010) B) *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Laboratoire Éric Déziel).

1.1.1.4 Swarming de P.aeruginosa

Proteus sp. fût une des première bactérie à révéler sa motilité *swarming* il y a plus de 400 ans. Depuis l'observation initiale, d'autres bactéries ont été vues affichant ce type de motilité, incluant, *P. aeruginosa* (Harshey, 2003).

Pour observer le *swarming* de *P. aeruginosa* au niveau macroscopique, plusieurs conditions doivent être réunies. Le milieu semi-solide nécessite une faible concentration d'agar (typiquement 0,5 %) et un temps de séchage spécifique afin de permettre à la surface de ne pas être trop mouillée, ce qui favoriserait le *swimming*; ni trop sèche, ce qui inhiberait le *swarming* (Tremblay & Déziel, 2008). Lorsque les bonnes conditions sont présentes, la forme coloniale de *P. aeruginosa* aborde un aspect caractéristique. Cette apparence est, entre autres, le résultat de trois molécules qu'elle sécrète, soit les di-rhamnolipides, les mono-rhamnolipides et l'acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alcanoïque (HAA).

La biosynthèse de ces molécules est régulée par la densité cellulaire présente dans la colonie. Tel que mentionné précédemment, une certaine concentration de cellules doit être atteinte pour que le *swarming* ait lieu. Or, les bactéries possèdent justement un système de régulation transcriptionnelle connu sous le nom *quorum sensing* (Bassler & Losick, 2006). Le *quorum sensing* est un processus qui régule l'expression coordonnée de certains gènes au sein d'une

colonie bactérienne, par un mécanisme qui permet d'évaluer la densité spécifique de la population grâce à la production de molécules de signalisation (Fig 1.2) (Kamatkar & Shrout, 2011).



Transcription des gènes cibles

Figure 1.2 Schéma du *quorum sensing*. À faible densité cellulaire, les gènes cibles ne sont pas transcrits en raison d'une faible concentration de molécule de signalisation. À mesure que la densité cellulaire augmente, la concentration de molécules de signalisation augmente permettant la liaison aux récepteurs favorisant ainsi la transcription de gènes cibles. Adapté de (Geske *et al.*, 2007).

Lorsque le système Rhl, un des trois systèmes de *quorum sensing* que *P. aeruginosa* possède, est activé en condition *swarming*, il induit l'expression de l'opéron *rhlAB* nécessaire pour la synthèse des rhamnolipides, l'agent mouillant produit par *P. aeruginosa*. La rhamnosyltransférase, RhlA, permet la production de l'acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alcanoïque (HAA) (surtout le dimère de $3-OH-C_{10}$) à partir d'acides gras R-hydroxy, tandis que RhlB permet la synthèse de mono-rhamnolipides à partir des HAA. Un autre gène impliqué, *rhlC*, code pour la deuxième rhamnosyltransférase permettant la synthèse de di-rhamnolipides à partir de mono-rhamnolipides (Fig. 1.3) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Ces trois molécules extracellulaires n'ont pas juste un rôle tensio-actif, elles permettent aux dendrites d'une colonie *swarming* de diffuser vers l'extérieur sans jamais se rencontrer. Les mono-rhamnolipides sont le surfactant permettant aux radeaux cellulaires de glisser sur la surface, les HAA agissent comme un répulsif tandis que les di-rhamnolipides sont des agents attractifs. Puisque les HAA diffusent plus lentement et sont produits en plus faible concentration que les di-rhamnolipides, le ratio occasionné permet aux cellules de rester confinées à une dendrite de la colonie sans toutefois envahir les autres prolongements (Tremblay *et al.*, 2007).



Figure 1.3 Schéma de la synthèse des rhamnolipides et de HAA. Adapté de (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014).

Un autre aspect important de *P. aeruginosa* en motilité *swarming* est, qu'au sein de la colonie, les cellules sont différenciées selon l'endroit où elles se trouvent (Tremblay & Déziel, 2010). Les cellules au front de migration sont les plus actives et montrent, entre autres, une expression augmentée des gènes impliqués dans le métabolisme de l'énergie contrairement aux cellules qui sont au centre, qui ont l'aspect de cellules végétatives, ce qui suggère que les bactéries au bout d'une dendrites servent d'éclaireur pour explorer de nouveaux milieux (Harshey, 2003, Tremblay & Déziel, 2010).

La motilité de type *swarming* pourrait être un avantage chez les bactéries qui adoptent ce déplacement pour coloniser rapidement de nouvelles niches écologiques (Verstraeten *et al.*, 2008). De plus, ce comportement collectif aurait aussi pour but de favoriser les transports d'oxygène, de molécules de signalisation impliquées dans le *quorum sensing* et la circulation de nutriments à travers la colonie (Partridge & Harshey, 2012).

1.2 Résistance aux antibiotiques

Les bactéries sont des microorganismes hautement adaptables aux changements survenant dans leur environnement. Ces perturbations peuvent être, par exemple, une limitation nutritive ou un stress environnemental, mais aussi la présence d'agents antimicrobiens qui pourraient affecter leur croissance (Skiada *et al.*, 2011). Depuis l'introduction à la fin des années 30 du premier antibiotique efficace et jusqu'à leur utilisation excessive, les bactéries ont réussi à contourner l'action de ces agents en utilisant différents mécanismes de résistance tout aussi élaborés les uns que les autres au gré des nouveaux antibiotiques synthétisés (Davies & Davies, 2010). Ces systèmes de résistance occasionnent un problème qui prend des proportions alarmantes dû au fait qu'un nombre restreint de classe d'antibiotique limite l'utilisation lors de différents traitements et que certains bactéries pathogènes sont désormais tellement résistantes qu'aucun traitement n'est envisageable (Poole, 2003 b).

1.2.1 Modes d'action des antibiotiques selon la famille

Le mot « antibiotique » a été proposé la première fois par Sleman Waksman, un pionnier du criblage des sols et découvreur de la streptomycine (Davies & Davies, 2010). Sa définition se basait sur l'application d'un composé chimique, par exemple, son utilité ou un effet de laboratoire. Toutefois, les fonctions ou la classe du composé n'étaient pas prises en compte. Depuis ce temps, le terme « antibiotique » a été interprété de multiples façons, cependant la définition la mieux acceptée est un composé d'origine biologique qui a le pouvoir d'inhiber ou de tuer des microorganismes en interagissant spécifiquement avec leur cible, sans égard pour la classe ou l'origine du composé (Davies & Davies, 2010). Lorsqu'un antibiotique a la capacité d'induire la mort cellulaire, celui-ci est décrit comme étant bactéricide. D'autre part, un antibiotique qui peut seulement inhiber la croissance cellulaire est considéré comme bactériostatique (Kohanski et al., 2007). Afin d'induire l'un ou l'autre de ces effets, les antibiotiques agissent sur des cibles cellulaires spécifiques. Les cibles bactériennes les plus communes sont la synthèse protéique, l'ADN et la paroi ou les membranes cellulaires (Kohanski et al., 2007). Néanmoins, un modèle d'étude en émergence dicte que l'action bactéricide de certains antibiotiques est causée par leur capacité à stimuler la production de radiaux hydroxyles, ce qui cause un stress oxydatif entraînant des dommages cellulaires aux bactéries, et ultimement leur mort (Kohanski et al., 2007). Il reste que chez plusieurs classes d'antibiotiques, le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé (Kohanski et al., 2010).

1.2.1.1 Aminoglycosides

Le premier aminoglycoside à être découvert fût la streptomycine, un métabolite produit par une bactérie du sol, *Streptopmyces griseus*, qui a été le premier antibiotique à contrôler la tuberculose, maladie pulmonaire causée par *Mycobacterium tuberculosis* (Jana & Deb, 2006, Hermann, 2007). Depuis cette découverte faite par l'équipe de Waksman dans les années 1940, plusieurs autres aminoglycosides ont été isolés à partir de différentes bactéries colonisant les sols comme des espèces appartenant aux actinomycètes ou au genre *Micromonospora* (Jana & Deb, 2006, Hermann, 2007, Becker & Cooper, 2013).

Les aminoglycosides sont les antibiotiques les plus communément utilisés comme traitement d'infections bactériennes, car ils ont un large spectre d'activité, sont efficaces contre plusieurs bactéries à Gram négatif, Gram positif et quelques streptocoques, ainsi que contre certaines mycobactéries. De plus, ils ont une action bactéricide rapide (Jana & Deb, 2006, Hermann, 2007). Cependant, les aminoglycosides ont un faible index thérapeutique, ce qui signifie que la dose toxique est très proche de la dose thérapeutique, avec des effets indésirables de types neurotoxique et ototoxique (dommages aux cellules de l'oreille interne) (Jana & Deb, 2006, Hermann, 2007).

Les aminoglycosides peuvent être groupés en différentes classes selon leur biosynthèse et leur structure chimique, toutefois leur mode d'action est sensiblement le même, où l'une des variations réside dans le nombre d'acides aminés qu'ils lient sur le ribosome (Davis, 1987, Becker & Cooper, 2013).

Pour atteindre leur cible cellulaire, trois étapes ont été proposées, dont deux énergie-dépendantes. La première étape est une interaction électrostatique entre des molécules chargées négativement présentes sur la membrane externe des bactéries et les groupements amines, qui sont des molécules à charge positive. L'antibiotique diffuse donc passivement à travers la membrane. Une fois dans le périplasme, les aminoglycosides traversent vers le cytoplasme par un processus énergétique impliquant l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) et le transport d'électrons. La dernière étape s'effectue dans le cytoplasme et implique la liaison des aminoglycosides à l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, un constituant de la petite sous-unité 30S des ribosomes, ce qui perturbe la traduction protéique en favorisant la mauvaise incorporation d'acides aminés lors de l'élongation peptidique (Jana & Deb, 2006, Kohanski *et al.*, 2010, Becker & Cooper, 2013).

Ces antibiotiques, bien qu'agissant au niveau de la traduction, sont bactéricides. Une des raisons est que les protéines membranaires mal assemblées s'accumulent au niveau des membranes, les fragilisant, ce qui permet une augmentation de l'entrée des aminoglycosides et mènera finalement à la mort cellulaire (Kohanski *et al.*, 2010).

1.2.1.2 β-lactamines

Les β -lactamines sont une famille d'antibiotique particulièrement connue grâce à un de ces représentants, la pénicilline, découvert par Alexander Fleming en 1928 et produit par un mycète, *Penicillium notatum* (Fernandes *et al.*, 2013). Depuis, plusieurs autres antibiotiques de cette famille ont été isolés de divers microorganismes, comme la thiénamycine, un des agents antibactériens naturels les plus efficaces trouvés à ce jour, produit par *Streptomyces catteleya* et découvert par Kahan en 1976 (Demain & Elander, 1999). Ces antibiotiques portent ce nom, car ils contiennent tous un noyau β -lactame, une amide cyclique contenant deux carbones en plus d'un groupement carbonyle (Fig 1.4) (Fernandes *et al.*, 2013).

La cible des β -lactamines est la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, ils ne sont donc qu'efficaces contre des bactéries en croissance et sont, de surcroît, bactéricides (Bethel, 1987, Jana & Deb,

2006, Kohanski *et al.*, 2010). La paroi cellulaire des bactéries est une enveloppe qui entoure le cytoplasme, permettant de résister à des stress environnementaux comme les chocs osmotiques. Celle-ci est composée de peptidoglycane ayant une structure relativement semblable chez les bactéries à Gram négatif et Gram positif (Greenwood & Whiteley, 2002, Jana & Deb, 2006).

Le peptidoglycane est composé d'une longue chaine linéaire de polysaccharide (glycane) qui est traversée par des chaines peptidiques. Le brin de polysaccharide est constitué de N-acétylglucosamide (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAMA) positionnés en alternance. Sur chaque NAMA, le peptide retrouvé est un pentapeptide qui possède comme avant-dernier et dernier acide aminé des D-alanines. La dernière D-alanine se lie au troisième acide aminé du pentapeptide qui est soit une L-lysine chez la plupart des bactéries à Gram-positif ou un acide *meso*-diaminopimélique chez les bactéries à Gram-négatif (Greenwood & Whiteley, 2002). L'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par les β -lactamines réside dans le fait que le noyau β -lactame a une forte ressemblance avec le substrat des protéines liant le peptidoglycane (PBP), la D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) (Fig 1.4), ce qui déstabilise la formation de la paroi bactérienne en la liant de manière covalente (Bethel, 1987, Greenwood & Whiteley, 2002, Kohanski *et al.*, 2010). Cette liaison affaiblit la paroi et la lyse cellulaire s'ensuit.



Pénicilline

D-alanyl-D-alanine

Figure 1.4 Structures de la pénicilline, une β -lactamine et du substrat d'une protéine liant le peptidoglycane (D-Ala-D-Ala). La structure de la pénicilline a une forte ressemblance avec celle de la D-Ala-D-Ala, agissant comme un analogue de substrat. Le noyau β -lactame (en rouge) est composé d'une amide cyclique et de trois carbones. Adapté de (Zeng & Lin, 2013).

1.2.1.3 Macrolides

Les macrolides sont des molécules antimicrobiennes qui tiennent leur nom à leur structure chimique. Ce sont des composés qui possèdent un macrocycle de 14, 15 ou 16 atomes associés à un ou plusieurs sucres (Gaynor & Mankin, 2003). Ces antibiotiques ont un mode d'action qui est relativement similaire à celui des aminoglycosides par le fait qu'ils inhibent la synthèse protéique en se liant au ribosome. Toutefois, contrairement à ces derniers, ils ont un effet bactériostatique (Gaynor & Mankin, 2003, Kohanski *et al.*, 2010).

Peu d'information est connue à propos du fonctionnement des macrolides, ceux-ci se liant à l'ARNr 23S de la grande sous-unité ribosomale 50S. Leur site de liaison est situé dans le tunnel de sortie du peptide nouvellement synthétisé, près du centre peptidyl transférase, ce qui bloque de façon réversible la synthèse protéique (Gaynor & Mankin, 2003, Kohanski *et al.*, 2010). Bien qu'ils soient plus fréquemment utilisés pour le contrôle des infections par des bactéries à Gram positif, des concentrations sous-inhibitrices de macrolides peuvent empêcher la formation de biofilm et la synthèse flagellaire chez *P. aeruginosa* et *P. mirabillis*, deux espèces bactériennes à Gram négatif (Yim *et al.*, 2006).

1.2.1.4 Peptides antimicrobiens

Dans les années 1960, un type de peptide cationique, des lipopeptides cycliques, a été introduit dans les traitements cliniques. Toutefois, dix ans plus tard, ces composés ont été remplacés par des antibiotiques moins dommageables, car lorsqu'administrés en trop fortes doses, les lipopeptides cycliques provoquent l'apparition d'effets neurotoxiques et néphrotoxiques irréversibles (Schneider *et al.*, 2013). Ces peptides cationiques possèdent une queue hydrophobe composée d'acides gras et d'un court oligopeptide qui forme un cycle hydrophile,. Ces composés sont donc considérés comme étant amphiphiles (Schneider *et al.*, 2013).

Chez les lipopeptides cycliques, deux représentants sont très bien connus, soit la polymyxine B (un mélange de B_1 et B_2) et la polymyxine E, un mélange de polymyxines E_1 et E_2 ou aussi connu sous les noms de colistine A et colistine B, respectivement (Mogi & Kita, 2009). Ces molécules ont dix acides aminés dont sept qui forment un cycle peptidique, lié à une chaine lipidique (queue hydrophobe) d'acide 6-méthyl-octanoïque pour les polymyxines B_1 et E_1 ou d'acide 6-méthyl-heptanoïque dans le cas des polymyxines B_2 et E_2 (Fig. 1.5) (Mogi & Kita, 2009, Schneider *et al.*, 2013). Ces deux polymyxines (B et E) proviennent de microorganismes apparentant au genre *Bacillus*. La polymyxine B provient de *B*. *polymyxa* tandis que la colistine est produite par *B. colistinus* (Schneider *et al.*, 2013).



Figure 1.5 Structure **A**) des polymyxines B et **B**) des polymyxines E. Le groupement R est différent selon si la polymyxine est de type 1 ou 2. La colistine contient une leucine (D-Leu) au lieu d'une phénylalanine (D-Phe) dans le cycle peptidique. Adapté de (Mogi & Kita, 2009).

Bien que ces deux peptides antimicrobiens aient une faible activité contre les bactéries à Gram positif, elles sont bactéricides contre les bactéries à Gram négatif incluant quelques espèces cliniques de pseudomonades, d'entérobactéries et *Acinetobacter*. Ce potentiel antibiotique s'explique par leur mode d'action qui agit spécifiquement sur les LPS, retrouvé seulement chez les bactéries à Gram négatif. En liant le lipide A des LPS, les polymyxines déstabilisent les ponts calcium (Ca²⁺) et magnésium (Mg²⁺) qui lient le feuillet externe de la membrane externe. Une fois la membrane externe fragilisée, les polymyxines s'accumulent dans la membrane cytoplasmique en liant des domaines hydrophobes, ce qui créera des pores dans cette dernière, et mènera ultimement à la mort de la cellule (Fig 1.6) (Tsubery *et al.*, 2000, Mogi & Kita, 2009, Schneider *et al.*, 2013).



Figure 1.6 Mode d'action des peptides cationiques. Déstabilisation de la membrane externe et accumulation au niveau de la membrane cytoplasmique. Adapté de (Mogi & Kita, 2009)

Malgré la toxicité des polymyxines, celles-ci sont tout de même utilisées en traitement de dernière ligne dans le cas d'infections causées par des bactéries à Gram négatif multirésistantes comme *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumanii* (Schneider *et al.*, 2013). Cependant, des congénères de polymyxine peuvent être synthétisés afin d'augmenter leur innocuité tout en gardant leur activité. Par exemple un dérivé de la polymyxine B (NAB739) a été développé par Northern Antibiotic Ltd en remplaçant la chaine latérale par un acide aminé et en enlevant les charges positives des acides aminés du cycle, ce qui a permis d'avoir un antibiotique ayant une néphrotoxicité réduite tout en gardant son potentiel bactéricide (Schneider *et al.*, 2013).

1.2.1.5 Quinolones

La structure chimique des quinolones est conservée au sein de cette famille, puisqu'elle dérive de la structure de l'acide nalidixique, le premier quinolone découvert (Fabrega *et al.*, 2009). Ce sont des molécules possédant deux noyaux cycliques différents liés l'un à l'autre. Un des cycles contient un groupement acide carboxylique et un groupement carbonyle, respectivement en position 3 et 4, qui jouent un rôle majeur dans l'activité des quinolones (Fig. 1.7) (Fabrega *et al.*, 2009).



Figure 1.7 Structure de l'acide nalidixique, un quinolone. Numérotation des carbones ou azotes des deux noyaux de l'acide nalidixique. Les carbones en position 3 et 4 forment respectivement un groupement acide carboxylique et un groupement carbonyle, qui ont une fonction majeure dans l'activité des quinolones. Adapté de (Fabrega *et al.*, 2009).

Lorsque les deux brins d'ADN se séparent pour se faire répliquer, les double hélices ont tendance à se condenser. Si cette torsion perdure, la réplication s'arrête, car les brins seront trop compacts. Un moyen qu'a la cellule pour contrer ce problème est l'utilisation d'enzymes qui ont la capacité de défaire les supertours dans l'ADN en le coupant et le refermant. Ces enzymes sont les ADN topoisomérases, qui sont la cible des quinolones (Fabrega *et al.*, 2009). Les deux topoisomérases ciblées par les quinolones appartiennent au groupe des topoisomérases de type II : la topoisomérase II ou ADN gyrase et la topoisomérase IV. La susceptibilité aux quinolones varie selon le type de bactérie. Chez les bactéries à Gram positif, les topoisomérases IV sont plus sensibles, tandis que chez les bactéries à Gram négatif les topoisomérases II sont les principales cibles des quinolones (Kohanski *et al.*, 2010).

Ces agents antimicrobiens ont un mode d'action qui est similaire pour les deux topoisomérases. Un complexe stable se forme entre la topoisomérase et l'ADN clivé, ce qui bloque la réplication du chromosome, empêchant la division cellulaire. De plus, cette association inhibe la synthèse de l'ADN, menant à un effet bactéricide (Fabrega *et al.*, 2009, Kohanski *et al.*, 2010).

1.2.2 Systèmes de résistance

La découverte et l'utilisation des premiers antibiotiques ont été des révolutions dans le domaine de la médecine. Les organisations de la santé voyaient déjà la fin des problèmes d'infection bactérienne, mais elles sous-estimaient la forte adaptabilité des bactéries. Toutefois, les mécanismes de résistance des bactéries ne sont pas apparus suite à l'utilisation des antibiotiques, ils existaient bien avant afin de permettre à celles-ci de survivre en présence d'antimicrobiens environnementaux. Cependant leur introduction a favorisé une pression sélective pour certaines résistances (Wax *et al.*, 2008, Davies & Davies, 2010).

Les systèmes de résistance aux antibiotiques des bactéries peuvent être d'origine intrinsèque, comme une membrane perméable, un état physiologique particulier, ou provenant d'éléments mobiles, comme les transposons, intégrons et plasmides. Ils fonctionnent généralement selon un des quatre modes d'actions qui inclut : (1) l'altération ou la modification de la cible, (2) l'inactivation de la molécule antibiotique, (3) la réduction de son entrée dans la cellule et (4) son expulsion vers le milieu externe (Poole, 2003 a, Poole, 2003 b, Kumar & Schweizer, 2005, Poole, 2005).

La cible d'un antibiotique peut être altérée suite à une seule modification génétique. Par exemple, lorsqu'une mutation ponctuelle survient sur un seul acide aminé de l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV, la cible des quinolones est altérée (Wax *et al.*, 2008).

Un mécanisme de dégradation d'antibiotique amplement connu est la fonction catalytique des β lactamases. Ces enzymes ont la particularité de pouvoir hydrolyser les cycles β -lactamess ce qui inactive l'antibiotique. Généralement, les gènes codant pour ces enzymes se retrouvent sur des éléments transposables et font partie des mécanismes de résistance aux β -lactamines des bactéries à Gram négatif les plus importants (Poole, 2003 b, Wax *et al.*, 2008).

Parmi les systèmes de résistance intrinsèques, la faible perméabilité de la membrane externe des bactéries peut leur conférer une certaine tolérance aux antibiotiques, ce qui réduit l'entrée de molécules indésirables dans le cytoplasme. Un moyen supplémentaire de diminuer la concentration d'antibiotique dans le milieu intracellulaire est de le pomper vers l'extérieur grâce à des systèmes d'efflux efficaces et peu sélectifs (Poole, 2002, Poole, 2003 a, Poole, 2003 b, Wax *et al.*, 2008).

D'autres mécanismes intrinsèques permettant d'augmenter la tolérance ou la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries peuvent être la présence ou la production de composés stimulant une résistance ou une modification de leur état physiologique (Poole, 2002).

Bien que présentés individuellement, les bactéries bénéficient habituellement de plus d'un système de résistance possédant différents mécanismes d'action qui agissent en synergie les uns avec les autres, ce qui en font des organismes hautement adaptés à la présence de différents agents antimicrobiens (Poole, 2002).

1.2.2.1 Membrane externe

Les bactéries à Gram négatif se distinguent des bactéries à Gram positif par la présence d'une membrane externe (Kumar & Schweizer, 2005).

Pour comprendre la résistance spécifique de certaines bactéries à des antibiotiques particuliers, une compréhension de l'enveloppe cellulaire s'impose.

La membrane cytoplasmique entoure le cytoplasme, sous laquelle, la paroi cellulaire est présente. Cette paroi diffère chez les bactéries Gram négatif des bactéries à Gram positif par le fait que ces dernières possèdent une couche de peptidoglycane plus épaisse qui forme une paroi cellulaire plus rigide (Fig 1.8) (Kumar & Schweizer, 2005). Par contre, les bactéries à Gram négatif possèdent, au lieu d'une épaisse paroi cellulaire, une membrane externe qui est composée de phopholipides et d'une couche de LPS qui agissent comme barrière sélective dû à des glycopeptides anioniques qui sont partiellement neutralisés par des cations divalents, Mg²⁺ et Ca²⁺ (Wax *et al.*, 2008). L'espace formé entre la mince paroi cellulaire et la membrane externe est l'espace périplasmique, où certains processus cellulaires sont présents, tel que des étapes de synthèse protéique (Wax *et al.*, 2008). Une autre caractéristique des bactéries à Gram négatif est la présence de porines dans le membrane externe qui permettent de faire circuler des molécules hydrophiles de tailles limitées vers l'espace périplasmique, et qui empêchent les antibiotiques lipophiles d'entrer dans la cellule. En plus de posséder des pores qui empêchent l'entrée de certains composés, les bactéries à Gram négatif ont des systèmes qui permettent de faire sortir des éléments, comme des déchets métaboliques, mais aussi des antibiotiques qui auraient des caractéristiques similaires à leurs substrats. Toutes ces propriétés de la membrane externe sont autant d'atouts contre l'action des antibiotiques (Wax *et al.*, 2008, Fernandez & Hancock, 2012).



Gram positif

Gram négatif

Figure 1.8 Schéma des parois bactériennes des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif. Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane supplémentaire, tandis que les bactéries à Gram positif ont un peptidoglycane plus épais. Adapté de (Pronovost, 2014).

Une bactérie largement étudiée pour sa résistance naturelle aux antibiotiques est la bactérie *P. aeruginosa*. Celle-ci est intrinsèquement résistante à plusieurs antibiotiques, entre autres, grâce à la faible perméabilité de sa membrane externe (Breidenstein *et al.*, 2011). En comparaison avec *E. coli*, la membrane de *P. aeruginosa* est 12 à 100 fois moins perméable (Breidenstein *et al.*, 2011).

Le net avantage que procure la membrane externe de bactéries à Gram négatif permet la sélection d'agents potentiellement toxiques, qui doivent impérativement franchir cette barrière soit par la diffusion à travers les porines, la diffusion à travers la membrane ou par un processus d'auto-absorption, comme dans le cas des aminoglycosides et des peptides cationiques (Kumar & Schweizer, 2005).

1.2.2.2 Systèmes d'efflux

Les bactéries, durant leurs processus cellulaires, génèrent des métabolites secondaires qui peuvent leurs être toxiques s'ils ne sont pas expulsés dans le milieu extracellulaire. Pour ce faire, elles préviennent cette accumulation par la présence de pompes énergie-dépendantes qui n'altèrent, ni ne modifient les composés extrudés (Fernandez & Hancock, 2012).

Chez les bactéries à Gram négatif, les pompes à efflux sont généralement organisée en trois parties constituées : des composants (1) de la membrane externe (OMP) et (2) de la membrane interne et (3) d'une protéine de fusion de membrane qui se situe dans le périplasme (MFP) (Poole, 2003 a, Wax *et al.*, 2008, Mima *et al.*, 2009, Fernandez & Hancock, 2012). Ces pompes énergie-dépendantes peuvent être divisées en deux groupes distincts selon le type d'énergie qui les alimente, soit les transporteurs utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie et les pompes utilisant la force proton-motrice pour le transport (Kumar & Schweizer, 2005, Fernandez & Hancock, 2012).

Les transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC) sont les seuls représentants du premier groupe. Ils ont la capacité de faire entrer et sortir une vaste gamme de composé, incluant les sucres, les acides aminés, les ions, les composés médicaux, les polysaccharides et les protéines. Cependant très peu de membres de cette famille ont été identifiés comme étant impliqués dans une résistance aux antibiotiques chez un large éventail de bactéries (Kumar & Schweizer, 2005, Fernandez & Hancock, 2012).

Les transporteurs utilisant la force proton-motrice sont les transporteurs de multirésistances secondaires. Ces systèmes d'efflux sont les plus communément rencontrés dans la résistance aux antibiotiques dans le milieu médical et peuvent être sous-divisés en quatre superfamilles basées sur l'homologie de leurs structures secondaire et primaire (Fernandez & Hancock, 2012). Il s'agit de la superfamille des *major facilitator superfamily* (MFS), la famille des *small multidrug resistance* (SMR), la famille des *multidrug and toxic compounds extrusion* (MATE) et la superfamille des *resistance-nodulation-cell division* (RND) (Poole, 2003 a, Kumar & Schweizer, 2005, Fernandez & Hancock, 2012). *P. aeruginosa* contient 20 pompes MFS, deux pompes SMR, une pompe MATE et 12 pompes RND démontrées ou prédites (Mima *et al.*, 2009, Olivares *et al.*, 2013).

La superfamille MFS peut fonctionner de trois manières différentes, soit comme uniporteur, qui implique le transport passif d'un substrat, soit comme symporteur, qui implique le transport d'un substrat couplé à un mouvement ionique dirigé dans le même sens ou comme antiporteur, qui implique le transport d'un substrat couplé à un mouvement ionique dirigé dans des sens opposés. Ce dernier type de transport est présent chez toutes les pompes MFS impliquées dans la résistance aux antibiotiques (Fig 1.9) (Mima *et al.*, 2009).



Figure 1.9 Trois modes de fonctionnement des transporteurs de la superfamille MFS. Transport uniport où une molécule diffuse à travers un canal sans mouvement ionique. Transport symport où le mouvement ionique est du même sens que la molécule transportée. Transport antiport où le mouvement ionique est inverse au transport de la molécule. Adapté de (Gilbert, 2011).

Comme leur nom l'indique, les membres de la famille des SMR sont des petites protéines contenant entre 107 à 110 résidus. Les SMR n'ont été retrouvés impliqués dans la résistance aux antimicrobiens seulement chez trois bactéries, *A. baumanii, Mycobacterium smegmatis* et *Serratia marcescens*, qui impliquent respectivement les pompes AbeS, Mmr et SsmE (Mima *et al.*, 2009).

Les pompes de la famille MATE auraient pu se retrouver dans celle des MFS dû à leur haute ressemblance topologique. Toutefois, ce groupe en constitue un unique dû à leur faible homologie aux séquences d'acides aminés. La famille des MATE extrude des composés toxiques, tel que les fluoroquinolones, les aminoglycosides et les colorants cationiques grâce à un gradient sodium (Mima *et al.*, 2009).

La dernière famille, la mieux caractérisée chez les bactéries à Gram négatif, est les pompes à efflux RND qui jouent un rôle majeur dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques (Mima *et al.*, 2009, Olivares *et al.*, 2013). Celles-ci possèdent une grande variété de substrats, allant des biocides et antibiotiques à des hydrocarbones aromatiques, en plus d'acides gras toxiques, de sels biliaires, d'inhibiteurs de la biosynthèse d'acides gras, de détergents, de colorants et d'acyl homosérines lactones (Mima *et al.*, 2009). Les pompes RND de *P. aeruginosa* ont une organisation relativement similaire, possédant un système d'efflux spécifique composé d'une MFP et une protéine de la membrane interne, lesquelles sont généralement appelée Mex, liées à l'une des 18 protéines de la membrane externe, habituellement nommées Opm ou Opr (Schweizer, 2003, Kumar & Schweizer, 2005). Des 12 pompes RND décrites chez *P. aeruginosa*, une seule possède une deuxième protéine de fusion de membrane, le

pompe TriABC-OpmH, une autre possède un deuxième composant de la membrane interne, la pompe MuxABC-OpmB, tandis qu'une troisième pompe, MexGHI-OpmD possède une petite protéine supplémentaire sans fonction connue, MexG. D'autre part, les pompes à efflux ont des spécificités de substrat et ne sont pas toutes constitutivement exprimées (Kumar & Schweizer, 2005, Mima *et al.*, 2007, Mima *et al.*, 2009).

1.2.2.3 Réponse au stress

Dans leur environnement naturel, les bactéries subissent plusieurs types d'agressions qu'elles doivent être en mesure de surmonter pour survivre. Les types de stress auxquels elles sont exposées peuvent être de l'ordre du manque ou de la limitation de nutriments, des dommages à la membrane, l'exposition à des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS) ou des stress thermiques. Bien que les bactéries soient en mesure de survivre à certaines perturbations grâce à des réponses adaptatives, ces stress peuvent induire une résistance à d'autres agents que celui provoqué initialement par l'agression (Poole, 2012).

Lorsque certains nutriments tendent à manquer, comme des acides aminés, une réponse cellulaire est mise en place afin de détourner les éléments nécessaires à la croissance et à la division vers l'expression de gènes de survie, permettant l'économie et la synthèse d'acides aminés manquants jusqu'à ce que la situation nutritive se rétablisse. Cette réponse est communément appelée réponse stringente et implique une alarmone, la guanosine pentophosphate [(p)ppGpp] (Poole, 2012). Durant la réponse stringente, la (p)ppGpp s'accumule pour former, suite à l'intervention de plusieurs protéines, la guanosine tétraphosphate (ppGpp) qui agit en diminuant les fonctions cellulaires consommatrices tel que la transcription et la traduction. Chez l'organisme-modèle *E. coli*, la réponse stringente augmente la résistance à plusieurs antibiotiques, entre autres les β -lactamines et les aminoglycosides (Greenway & England, 2008). De surcroît, chez *P. aeruginosa*, des mutants incapables de produire la ppGpp exposés aux antibiotiques étaient beaucoup plus susceptibles que la souche sauvage, autant chez les cellules planctoniques que dans un biofilm (Nguyen *et al.*, 2011).

Un facteur de stress lié autant au stress nutritif qu'au stress de l'enveloppe est la limitation des cations divalents dans l'environnement, comme le Mg^{2+} . Chez les Gram négatif, la membrane externe composée de LPS est stabilisée par des cations divalents tels que le Mg^{2+} et le Ca²⁺. Lorsque des conditions restrictives en Mg^{2+} sont rencontrées, les protéines codées par l'opéron *arnBCADTEF-ugd*, contrôlé par les systèmes à deux composants PhoPQ et PmrAB, régulent les niveaux de ce cation chez les cellules planctoniques de *P. aeruginosa* (McPhee *et al.*, 2003, McPhee *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2012).

Cet opéron est aussi connu pour avoir un rôle dans la résistance aux antibiotiques (Fernandez *et al.*, 2010, Johnson *et al.*, 2012, Poole, 2012).

Deux autres gènes sont exprimés chez *P. aeruginosa* lorsque le Mg^{2+} est limitant, *speE* et *speD*. Leur expression permet de produire la spermidine, une polyamine nécessaire à la stabilisation et la protection de la membrane externe contre des dommages oxydatifs et de certains antibiotiques cationiques (El-Halfawy & Valvano, 2012, Johnson *et al.*, 2012).

Les bactéries aérobies sont constamment exposées au stress oxydatif dû au fait que la respiration aérobie génère des ROS, comme le peroxyde et l'ion superoxyde, des sous-produits inévitables. Chez *P. aeruginosa*, l'exposition aux ROS et aux NOS stimule l'expression des systèmes d'efflux de type Mex, des pompes ayant plusieurs types d'antibiotiques comme substrat (Poole, 2012).

Le stress thermique peut aussi avoir la conséquence d'augmenter la résistance aux antibiotiques. Chez *E. coli, A. baumanii* et *P. aeruginosa*, l'augmentation de température induit une résistance aux aminoglycosides. Cette perte de sensibilité serait liée directement à la réponse aux stress thermiques, qui permet d'éliminer efficacement les protéines mal repliées de la cellule (Cardoso *et al.*, 2010, Kindrachuk *et al.*, 2011, Tran *et al.*, 2011). Ainsi, puisque le mode d'action des aminoglycosides est la perturbation de la synthèse protéique, les cellules ayant subi un choc thermique seraient prédisposées à résister à l'action de cette classe d'antibiotiques (Poole, 2012).

1.2.2.4 Sulfure d'hydrogène

Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est considéré comme un gaz hautement toxique. Outre sa toxicité, il a une fonction importante de gasotransmetteur chez les mammifères.

Un gasotransmetteur est une petite molécule de gaz endogène qui a une fonction physiologique importante. Deux autres de ces gaz sont le monoxyde de carbone (CO) et le monoxyde d'azote (NO). La production de ce gaz dans différentes cellules mammifères se fait de façon enzymatique grâce à trois protéines ; la cystathionine β -synthétase (CBS), la cystathionine γ -lyase (CSE) et la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase (3MST) (Shatalin *et al.*, 2011).

Bien que les cellules mammifères soient capables de produire du H_2S , plusieurs procaryotes possèdent aussi la capacité de le générer dans leur environnement naturel. La production de H_2S chez les microorganismes est considérée comme un sous-produit du métabolisme du soufre, pourtant certaines bactéries non-sulfureuses peuvent tout de même le produire (Shatalin *et al.*, 2011).

La comparaison des génomes montre l'existence d'orthologues des CBS, CSE et 3MST mammifères chez plusieurs bactéries, sinon toutes, ce qui suggère que ces enzymes ont été préservées durant l'évolution et possèdent une fonction importante. La fonction la plus probable du H₂S chez les bactéries mésophiles serait la protection contre les dommages oxydatifs causés par certains antibiotiques, comme la gentamicine, l'ampicilline et l'acide nalidixique (Shatalin *et al.*, 2011). Lorsque les gènes de production du H₂S sont mutés chez *Bacillus anthracis, E. coli, P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, ces dernières deviennent plus sensibles aux antibiotiques que leurs homologues sauvages (Gusarov *et al.*, 2009). Par ailleurs, quand le gaz est rajouté de façon exogène, cette sensibilité est atténuée et les bactéries retrouvent leur résistance sauvage (Gusarov *et al.*, 2009). L'effet cytoprotecteur du H₂S serait attribué à sa capacité d'augmenter les activités de la catalase et de la superoxyde dismutase, entraînant une augmentation de la résistance aux antibiotiques (Shatalin *et al.*, 2011).

1.2.2.5 États physiologiques

L'action des antibiotiques peut être affectée par des moyens propres à chaque cellule composant une population ou par des processus coopératifs qui bénéficient à l'entièreté de la colonie, comme dans le cas des biofilms (Stewart, 2002). Lorsque les cellules adoptent une résistance, celle-ci peut persister après le retrait de l'antibiotique. Pourtant, certaines résistances ne sont présentes que lorsqu'un état physiologique particulier est présent et s'estompent quand ce dernier est interrompu ou à la disparition de l'agent antimicrobien (résistance transitoire) (Stewart, 2002, Olivares *et al.*, 2013).

Les bactéries peuvent acquérir des résistances aux antibiotiques avant même d'y être exposés ; les conditions d'anaérobies sont un bon moyen d'illustrer ce concept. Certains antibiotiques cationiques ont besoin que la membrane externe des bactéries soit chargée et que le transport d'électrons soit présent pour atteindre le cytoplasme. Quand une bactérie est dans un milieu anaérobique, l'absence d'oxygène nuit au transport d'électrons et donc, à l'entrée de l'antibiotique dans la cellule (Hermann, 2007, Becker & Cooper, 2013). Chez plusieurs isolats cliniques de *P. aeruginosa*, les conditions d'hypoxie permettent l'augmentation de l'expression de la pompe à efflux RND, MexEF-OprN, ce qui favorise une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines (Schaible *et al.*, 2012). Les conditions d'anaérobie et d'hypoxie, bien qu'indépendantes de la présence des antibiotiques, permettent donc aux bactéries d'avoir un moyen supplémentaire de contourner l'action des antimicrobiens.

Un processus coopératif très bien décrit à travers plusieurs espèces bactériennes, entre autres *P. aeruginosa*, est la formation de biofilms. Brièvement, un biofilm est composé d'une population bactérienne structurée qui est enchâssée dans une matrice composée d'ADN extracellulaire,

d'exopolysaccharides et de protéines (Stewart, 2002, Olivares *et al.*, 2013). La formation d'un biofilm permet aux cellules le formant d'être protégées contre plusieurs stress environnementaux tel que la dessiccation (Stewart, 2002). Cependant, les biofilms ont un rôle supplémentaire dans des environnements où l'utilisation abusive des antimicrobiens nuit à la bonne croissance des bactéries. Les cellules présentes dans un biofilm sont prémunies contre l'action de certains antibiotiques, la protection est telle qu'elles sont parfois jusqu'à 1 000 fois plus résistantes à des composés antimicrobiens que leur homologues planctoniques (Gupta *et al.*, 2013). Ces agents sont moins efficaces contre les bactéries croissant sous forme de biofilm pour plusieurs raisons. Premièrement, la présence d'une matrice extracellulaire permet de limiter la diffusion de l'agent jusqu'aux bactéries. Ensuite, selon la profondeur du biofilm, les cellules ont des états métaboliques différents à cause d'un gradient nutritif et d'oxygène (Olivares *et al.*, 2013).

Les bactéries en biofilms ont des profils d'expression génétique distincts de leurs consœurs libres (Zhang & Mah, 2008, Beaudoin *et al.*, 2012, Gupta *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013). Parmi ces gènes, l'inactivation de *ndvB* ou de *sagS* dans les biofilms de *P. aeruginosa* augmente la susceptibilité de cette dernière à divers antibiotiques, entre autres la tobramycine (Mah *et al.*, 2003, Gupta *et al.*, 2013). Toujours chez *P. aeruginosa*, des gènes prédits pour coder une pompe à efflux sont surexprimés dans les bactéries présentes dans un biofilm en comparaison aux cellules planctoniques, leur délétion affecte plus particulièrement les cellules sessiles (Zhang & Mah, 2008, Zhang *et al.*, 2013). Ces exemples et d'autres retrouvés à profusion dans la littérature montrent que les biofilms représentent un environnement particulier abritant des cellules ayant un profil génétique contrastant avec leurs homologues planctoniques. Néanmoins, la résistance acquise dans les biofilms est perdue lorsque les cellules retournent à l'état libre (Gupta *et al.*, 2013).

1.2.2.5.1 Résistance du swarming aux antibiotiques

Le *swarming* est un autre comportement social conférant une résistance augmentée à différentes classes d'antibiotiques (Lai *et al.*, 2009, Olivares *et al.*, 2013). Dans le cas de *P. aeruginosa*, lorsque celleci est en motilité *swarming*, une augmentation de sa résistance envers différentes classes d'antibiotiques telles que les aminoglycosides, les β -lactamines, les macrolides et les quinolones est observée. Toutefois, selon certains auteurs, elles restent sensibles à la présence de peptides antimicrobiens cationiques (Overhage *et al.*, 2008, Lai *et al.*, 2009). Lorsque *P. aeruginosa* aborde la motilité *swarming* en présence d'antibiotique, les dendrites de celle-ci touche l'antibiotique sans l'éviter (Fig 1.10). La motilité *swarming* peut être comparée aux biofilms d'après plusieurs critères. En premier lieu, tout comme les cellules dans les biofilms, lorsque les cellules en *swarming* sont isolées pour être remises en suspension, celles-ci retrouvent leur susceptibilité sauvage (résistance transitoire) (Lai *et al.*, 2009). Une autre caractéristique est que d'après l'analyse comparative des gènes exprimés dans les cellules en *swarming* et des cellules planctoniques, les gènes associés à la virulence sont surexprimés dans la première condition. Aussi l'expression des gènes n'est pas la même selon l'endroit où les cellules se retrouvent dans la colonie *swarming*, de la même manière qu'un biofilm est composé de bactéries ayant différents stades métaboliques selon leur position dans celui-ci (Tremblay & Déziel, 2010). Néanmoins, les cellules dans un biofilm bénéficient d'une protection physique apportée par la matrice extracellulaire, ce qui ne serait pas le cas pour les cellules en *swarming*. Par ailleurs, en comparant la perméabilité de la membrane externe des cellules planctoniques à celle de leurs homologues en *swarming*, Lai, *et al.*, (2009) ont noté une diminution d'environ 3,6 fois de la perméabilité membranaire dans la dernière condition, ce qui constituait une première étude du mécanisme conférant cette résistance au cellules en *swarming* (Lai *et al.*, 2009). Toutefois, après un criblage et des tests ciblant spécifiquement des gènes connus qui confèrent une résistance (*mexA*, *mexC*, *mexE* et *ndvB*), aucun ne semblait jouer un rôle dans la résistance spécifique de *P. aeruginosa* en motilité *swarming* (Lai, 2007, Lai *et al.*, 2009).



Figure 1.10 Exemple de colonie *swarming* de la souche sauvage de *P. aeruginosa* en présence d'un disque imbibé de (A) tobramycine (aminoglycoside) ou de (B) polymyxine B (peptide cationique) (Lai, 2007).

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries adoptant le *swarming* est encore très peu étudié et les mécanismes permettant cette tolérance ne sont pas encore vraiment connus. En comparant les modes d'action de ces cinq classes d'antibiotiques au mode d'action des peptides
antimicrobiens, il en ressort que seuls les antibiotiques devant franchir la membrane externe perdent leur efficacité face aux colonies *swarming*. De plus, la membrane externe des cellules en *swarming* est moins perméable que celle de leur homologue en cultures liquides. En combinant ces observations, le mécanisme de résistance impliqué dans la perte de la sensibilité aux antibiotiques chez les cellules en *swarming* pourrait être lié à une modification des protéines de la membrane externe.

1.3 Interactions mycètes/bactéries dans le sol

Le sol contient une grande diversité biologique composée d'organismes tel que des insectes, des nématodes, et des protozoaires, mais surtout des microorganismes comme les bactéries, suivies par les mycètes (Nazir *et al.*, 2010). Ces deux types de microorganismes occupent souvent des niches écologiques très rapprochées, les bactéries pouvant coloniser les hyphes ou les spores des mycètes, mais pouvant aussi s'y retrouver à l'intérieur (Nazir *et al.*, 2010). Les interactions entre bactéries et mycètes sont très diverses. Celles-ci peuvent être du type de la coopération, incluant la symbiose et le mutualisme, où les deux organismes profitent de la présence de l'autre sans lui nuire. Par exemple les bactéries fourniront des métabolites nécessaires au mycète, tandis que ce dernier pourrait produire un antibiotique qui permettra de diminuer la compétition avec d'autres espèces bactériennes. Un autre type d'interaction peut être le commensalisme, où un des deux organismes profite de la présence de l'autre sans qu'il ne soit nuisible ou bénéfique. Les autres relations biologiques existent aussi au sein du duo bactéries/mycètes, incluant le parasitisme et la compétition (Nazir *et al.*, 2010).

1.3.1 Rôles écologiques

Le sol est généralement un milieu insaturé en eau, ce qui nuit au déplacement des bactéries. Contrairement aux bactéries, les mycètes ne dépendent pas d'un milieu fortement hydraté pour pouvoir coloniser les sols (Furuno *et al.*, 2010, Furuno *et al.*, 2012).

En absence de vecteur dans le sol, par exemple des vers, des racines en croissance ou des courants d'eau, la dispersion des bactéries est négligeable. Les facteurs physiques, comme la discontinuité des réseaux hydriques, les surfaces d'attachement et la texture du sol sont tout autant d'éléments qui limitent les déplacements des bactéries, même chez celles qui sont flagellées. D'autre part, la dispersion des bactéries dans le sol n'a été observée qu'en présence de mycètes ou lorsque celui-ci est fortement hydraté (Wick *et al.*, 2007, Furuno *et al.*, 2010). Ces observations, en plus d'autres, ont mis en évidence que les hyphes des mycètes servent des routes continues aux bactéries afin de les aider à coloniser d'autres milieux (Kohlmeier *et al.*, 2005). Lorsque de la fibre de verre est utilisée pour mimer des hyphes, les

bactéries flagellées ont la capacité de se déplacer sur ce type de support, ce qui suggère que les mycètes pourraient être utilisés comme des « autoroutes », sur lesquelles se déplacent les bactéries, et non comme des « trains », où elles seraient poussées lors de la croissance des hyphes (Kohlmeier *et al.*, 2005, Pion *et al.*, 2013).

Une autre fonction écologique des interactions bactéries/mycètes semble être la dégradation de polluants dans les sols. Par exemple, plusieurs bactéries cultivables pouvant dégrader le naphtalène, un hydrocarbure aromatique polycyclique (PAH), ont la capacité de se déplacer sur les hyphes. Ces bactéries font partie des genres *Xanthomonas, Rhodococcus* et *Pseudomonas* (Furuno *et al.*, 2012). Les réseaux fongiques permettent aux bactéries impliquées dans la biorestauration des sols d'atteindre l'agent polluant en plus d'en améliorer leur disponibilité (Wick *et al.*, 2007, Banitz *et al.*, 2011).

1.3.2 Déplacement bactérien sur les mycètes

Plusieurs facteurs peuvent néanmoins influence le déplacement bactérien sur les hyphes, tel que, les interactions antagonistes, la motilité des bactéries, les mouvements chimiotactiques le long des hyphes et les propriétés physicochimiques des surfaces mycéliennes (Furuno *et al.*, 2012).

Les interactions antagonistes pouvant compromettre le déplacement incluent les métabolites qu'un des deux organismes pourrait produire afin de freiner la croissance de l'autre ou l'utilisation d'un substrat par l'un des partenaires qui est nécessaire au développement de l'autre.

Pour pouvoir se mouvoir le long des hyphes, la motilité intrinsèque, c'est-à-dire le fait de posséder des structures permettant le déplacement, est indispensable, ce qui suggère que la présence de flagelles chez les bactéries colonisant le sol n'est pas à leur désavantage, même si cette structure nécessite de l'énergie pour la maintenir (Nazir *et al.*, 2010, Pion *et al.*, 2013). Toutefois, certaines bactéries flagellées ne peuvent se déplacer sans la présence d'une deuxième espèce. Les bactéries pouvant se mouvoir sans être secondées possèderaient un système de sécrétion de type III (T3SS) fonctionnel. Ce système serait impliqué dans l'attachement actif des bactéries à la paroi cellulaire des hyphes (Warmink & van Elsas, 2009, Warmink *et al.*, 2011). Toutefois, certains genres comme *Rhodococcus*, qui sont dépourvus de motilité intrinsèque, arrivent tout de même à se déplacer vers une source de polluant en utilisant les hyphes (Furuno *et al.*, 2012).

Un autre facteur limitant la translocation des bactéries est leur réponse à un agent attractif. Les bactéries qui possèdent un système de chimiotactisme fonctionnel ont la capacité de se déplacer sur les hyphes de façon beaucoup plus efficace et rapide que leurs homologues qui en sont dépourvus (Furuno *et*

al., 2010). Lorsqu'une souche non-chimiotactique de *Pseudomonas putida* est inoculée sur *Pythium ultimum*, celle-ci est incapable d'atteindre l'agent attractif (Furuno *et al.*, 2010). De plus, lorsque cet agent n'est pas présent, la souche chimiotactique n'arrive pas à se déplacer de façon efficace (Furuno *et al.*, 2010). En plus d'avoir le rôle d'autoroute, les hyphes auraient la capacité de mobiliser les bactéries vers la source de polluant à dégrader en la faisant migrer, un peu à la façon d'un pipeline (Banitz *et al.*, 2013).

Une des propriétés physicochimiques des hyphes est leur hydrophobicité, c'est-à-dire la capacité à pouvoir repousser l'eau à leur surface. Pour déterminer l'hydrophobicité des mycètes filamenteux, une ancienne technique était basée sur la rapidité d'absorption d'une gouttelette d'eau, les mycètes ayant une absorption rapide étaient considérés comme étant hydrophiles, tandis qu'une absorption lente est une caractéristique des mycètes hydrophobes. Une méthode plus récente, celle-ci quantitative, a été mise au point permettant de déterminer l'hydrophobicité des mycètes en mesurant l'angle de contact formé par une goutte d'eau. Il en ressort que les mycètes appartenant à la classe des deutéromycètes, comme Fusarium sp., sont hydrophiles alors que ceux appartenant aux classes des ascomycètes et des basidiomycètes sont hydrophobes (Smits et al., 2003). En fait, le déplacement bactérien a été observé seulement sur des surfaces hydrophiles, notamment sur les hyphes de Fusarium oxysporum et des fibres de verres (Kohlmeier et al., 2005, Banitz et al., 2013). À l'exception du basidiomycète Lyophyllum sp., qui permet la translocation bactérienne sur ses hyphes (Warmink & van Elsas, 2009). Cette méthode a aussi permis de mettre en lumière les interactions hydrophiles entre l'oomycète Pythim ultimum et la bactérie P. putida, où la présence d'un film liquide entourant les hyphes semble permettre le déplacement bactérien (Kohlmeier et al., 2005, Warmink & van Elsas, 2009, Nazir et al., 2010). Parmi les motilités pouvant être impliquées dans la translocation, le *swarming* est fortement soupconné dû à la présence d'un film liquide le long des hyphes lors du déplacement de P. putida sur P. ultimum (Fig 1.11) (Furuno et al., 2010). Ce film liquide pourrait être favorisé par un surfactant, comme les rhamnolipides, produit par les bactéries.



Figure 1.11 Photos de microscopie confocale à balayage laser (A) des hyphes de *P. ultimum* (vert) entourées d'un film liquide, les flèches indiquent l'épaisseur du film liquide (3 à 4 μm) lorsque
(B) *Pseudomonas putida* (vert) est inoculé sur le mycète. Tiré de (Furuno *et al.*, 2010).

Au vu de ces constatations, plusieurs critères généraux sont nécessaires pour permettre le déplacement bactérien sur les hyphes. Néanmoins quelques exceptions existent, laissant penser que la translocation bactérienne sur les mycètes est un phénomène complexe qui n'est pas restreint à quelques facteurs bien définis.

CHAPITRE 2 : DÉPLACEMENT DE *P. AERUGINOSA* SUR LES HYPHES DE MYCÈTES

2.1 Mise en contexte

Tel que présenté au chapitre 1, la fonction écologique de la motilité de type *swarming* reste mal comprise. Nous avons émis l'hypothèse que le *swarming* serait utilisé par les bactéries pour se mouvoir sur la surface des hyphes de mycètes. Afin de mieux comprendre le mouvement bactérien le long des hyphes, la première étape a été de déterminer sur quel type d'hyphe la bactérie modèle *Pseudomonas aeruginasa* avait la capacité de se déplacer. Quatre mycètes appartenant à différentes classes ont été testés : *Fusarium oxysporum* (deutéromycète), *Rhizoctonia solani* (basidiomycète), *Pythium ultimum* (oomycète) et *Alternaria alternata* (ascomycète). Une fois le mycète sélectionné, plusieurs types de motilité ont été testées. Pour vérifier cette hypothèse, divers mutants de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ont été soumis à un test de translocation sur le mycète sélectionné et le déplacement a été quantifié.

2.2 Méthodologie

2.2.1 Cultures de mycètes

2.2.1.1 Mycètes

Les mycètes utilisés sont *Pythium ultimum, Fuarium oxysporum, Rhizoctonia solani* et *Alternaria alternata*. Les mycètes appartiennent à des classes différentes et possèdent un hydrophobicité différente (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Appartenance des différents mycètes soumis au test de translocation bactérienne et description l'hydrophobicité de leurs hyphes selon la méthode de la mesure de l'angle de contact (Smits *et al.*, 2003).

Mycètes	Classe	Hyphes
Alternaria alternata	Ascomycète	Hydrophobes
Fusarium oxysporum	Deutéromycète	Hydrophiles
Pythium ultimum	Oomycète	Hydrophiles
Rhizoctonia solani	Basidiomycète	Hydrophobes

2.2.1.2 Milieu de culture

Le milieu de culture gélosé pour cultiver les quatre espèces de mycètes est le « Potato Dextrose Agar » (PDA) (DifcoTM BD). Il a été préparé selon les recommandations du fabriquant (39 g/L) et stérilisé à 121°C pour une période de 20 minutes. Avant que le milieu ne solidifie, 20 mL ont été coulés dans des boîtes de Pétri. Les géloses étaient conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

2.2.1.3 Cultures

Les mycètes ont été cultivés sur des géloses PDA. Pour les quatre espèces de mycètes, un coupon de tapis mycélien était prélevé à l'aide de l'extrémité large d'un embout de micropipette P1000 et déposé sur une gélose PDA solidifiée. Les mycètes étaient incubés à 27°C jusqu'à ce que le tapis mycélien recouvre toute la surface de la gélose. Le temps est variable pour les quatre espèces. Pour *P. ultimum* cela prend trois jours, pour *F. oxysporum* dix jours, *R. solani* a besoin de cinq jours et *A. alternata* recouvre aussi la gélose en dix jours. Une fois que les mycètes avaient recouvert les géloses, celles-ci étaient utilisées pour construire les modèles expérimentaux

2.2.2 Cultures bactériennes

2.2.2.1 Bactéries

Les bactéries utilisées pour la réalisation de ces travaux sont la souche sauvage Pseudomonas aeruginosa PA14 et des mutants provenant de la banque de mutants non redondants PA14 nommée « PA14 Non-Redundant Transposon Insertion Mutant Set » (PA14NR Set) (Liberati et al., 2006, Liberati et al., 2013). Les mutants de la banque NR utilisés étaient cheA⁻, fliC, pilA⁻ et rhlA⁻, et ils possèdent tous une résistance à la gentamicine. De plus, un mutant hptB sans marqueur de résistance a été utilisé, précédemment généré dans le laboratoire (Tremblay, 2011). Les quatre différents mutants choisit ont des caractéristiques particulières liées à leur motilité. Le premier mutant, fliC, est incapable de faire du swimming et du swarming dû une perte de la synthèse flagellaire (Köhler et al., 2000). Le second, pilA, ne peut pas faire de twitching suite à l'abolition de la synthèse des pili de type IV (Köhler et al., 2000). Un autre mutant, *rhlA*, ne produit pas de rhamnolipides, l'handicapant dans la motilité de type *swarming* (Déziel, 2003). Le dernier mutant testé, *hptB*⁻, est incapable de faire du *swarming* mais possède un flagelle fonctionnel et produit des rhamnolipides. Ce dernier a été isolé suite à un criblage visant à sélectionner des mutants ayant un défaut dans la motilité swarming (Tremblay, 2011). Un cinquième mutant s'est rajouté aux quatre autres suite à des résultats non concluants, il s'agit de cheA⁻. Ce gène est fortement impliqué dans le chimiotactisme et la motilité flagellaire chez E. coli et P. aeruginosa (Tableau 2.2) (Guvener et al., 2006, Barrionuevo & Vullo, 2012).

 Tableau 2.2 Phénotypes des cinq mutants de P. aeruginosa PA14 utilisés pour les tests de déplacement sur les hyphes de mycètes.

Mutants	Fonction du produit	Phénotype	
cheA ⁻	Système de régulation à deux composantes	Perte dans le chimiotactisme et motilité flagellaire	
fliC ⁻	Synthèse flagellaire	Absence de swimming et de swarming	
pilA ⁻	Synthèse pili de type IV	Absence de <i>twitching</i>	
hptB ⁻	Mécanisme de transduction du signal	Absence de swarming	
rhlA	Synthèse des rhamnolipides	Absence de swarming	

2.2.2.2 Milieu de culture

Le milieu de culture liquide pour cultiver les bactéries est du « Tryptic Soy Broth » (TSB) (BD BactoTM). Il a été préparé selon les recommandations du fabriquant (30 g/L) et stérilisé à l'autoclave à 121° C pendant 20 minutes.

2.2.2.3 Tampon de lavage

La solution servant à nettoyer les disques était du « *Phosphate Buffer Saline »* (PBS) préparé selon la recette suivante :

Pour une solution de PBS 10X, 80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na₂HPO₄•7H₂O et 2,4 g KH₂PO₄ sont ajoutés à 800 mL d'eau. Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH. Le volume est complété à 1 L d'eau. La solution est finalement stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Pour obtenir du PBS 1X, une part de PBS 10X était diluée dans neuf parts d'eau stérile.

2.2.2.4 Précultures

Les bactéries étaient conservées dans le glycérol dans des tubes cryogéniques de 2 mL à - 80°C. La veille des expériences, les cultures étaient ensemencées dans un tube en borosilicate contenant 3 mL de milieu de culture liquide TSB et mises à incuber entre 16 et 18 heures à 37°C sur un agitateur à tambour rotatif, TC-7 (New Brunwick, Canada).

2.2.2.5 Nettoyage des cellules

Les précultures faites la veille étaient diluées dans 3 mL de milieu TSB frais afin d'atteindre une densité optique (DO₆₀₀) de 1,00 et remises à incuber à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 3,00 \pm 0,05 mesurée à l'aide d'un NanoDrop ND-1000. Une fois que les cultures avaient atteint la DO₆₀₀ voulue, 500 µL étaient transférés dans des micro-tubes et ceux-ci étaient centrifugés 2 minutes à 6 000 rpm (8 000 \times *g*). Le surnageant était décanté et le culot était resuspendu avec 500 µL de PBS 1X. La DO₆₀₀ était finalement ajustée à 2,00, en ajoutant le volume correspondant de la culture à un volume de PBS déterminé, selon l'équation suivante.

2.2.3 Montage de la construction servant à tester le déplacement

2.2.3.1 Préparation des disques gélosés

Les disques de gélose stérile étaient découpés à l'aide d'un tube de verre stérile de 15 mm de diamètre dans une gélose de PDA préparée de la même manière que les géloses PDA servant à la culture des mycètes (voir section 2.2.1.2).

2.2.3.2 Préparation des disques de mycète

Les disques de mycète étaient découpés à l'aide d'un tube de verre stérile de 15 mm de diamètre.

2.2.3.3 Montage

Le montage est fortement inspiré de celui que Furuno et collègues ont rapporté (Furuno *et al.*, 2012).

Un disque de mycète était déposé au centre d'un Pétri de polystyrène, un disque de gélose PDA stérile était ensuite déposé à proximité du disque de mycète, un espace de 1 mm séparait les deux disques

(Fig 2.1). Une fois les constructions réalisées, celles-ci étaient incubées à 27 °C pendant cinq jours dans un sac de plastique (pour éviter l'assèchement). Les hyphes des mycètes avaient le temps de migrer et recouvrir le disque adjacent indépendamment de l'espèce de mycètes. Un seul couple disque de mycète/disque PDA était déposé par vase de Pétri.



Figure 2.1 Schéma du montage des constructions faites avec un mycète. Le disque de mycète est déposé au centre d'un vase de Pétri, à proximité de celui-ci un disque de gélose PDA stérile est déposé et espacé de 1 mm.

2.2.3.4 Inoculation des bactéries

Une fois la DO_{600} ajustée (voir 2.2.2.5), 50 µL de cultures étaient déposées sur le disque de mycètes des montages obtenus après cinq jours d'incubation. Les vases de Pétri étaient ensuite incubés à 30°C pour différentes périodes de temps dans un sac de plastique fermé contenant un autre vase de Pétri avec une éponge imbibée d'eau servant à maintenir l'humidité.

2.2.4 Sélection du mycète pour les tests de quantification

2.2.4.1 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé était du TSB solidifié avec 1,5 % d'agar (DifcoTM Agar, Granulated BD). Lorsque le milieu était encore liquide et refroidit, 20 mL ont été coulés dans des boîtes de Pétri. Les géloses étaient conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.4.2 Test de translocation de P. aeruginosa sur les mycètes

La souche sauvage de *P. aeruginosa* a été inoculée sur le disque contenant une des quatre espèces de mycètes qui ont préalablement recouvert le disque de gélose PDA (voir 2.2.3.3). Les montages inoculés ont été incubés durant 24 heures à 30°C. Une fois l'incubation terminée, un écouvillon stérile était frotté

sur le dessus de chacun des deux disques présents sur les montages. Une gélose TSB était inoculée avec l'écouvillon pour chaque disque de chaque construction. Les géloses étaient ensuite incubées à 37°C pendant 16 heures. La croissance bactérienne observée, permettant de déterminer qualitativement s'il y avait eu ou non déplacement bactérien d'un disque à l'autre, et ce, pour chaque espèce de mycète.

2.2.5 Quantification du déplacement des bactéries sur les hyphes

2.2.5.1 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour réaliser les essais était du TSB solidifié avec 1,5 % d'agar. Avant que le milieu ne solidifie, 25 mL étaient coulés dans des boîtes de Pétri carrées de dimension 9 cm \times 9 cm. Les géloses étaient conservées à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

2.2.5.2 Tampon de lavage

La solution servant à nettoyer les disques était du PBS 1X préparé de la même manière que le tampon de lavage des cellules (voir section 2.2.2.3).

2.2.5.3 Test de translocation

Une fois que le choix du mycète à utiliser pour la suite des travaux avait été effectué, les tests de translocation étaient réalisés avec les cinq différents mutants de *P. aeruginosa* décrit à la section 2.2.2.1. Lorsque le mycète avait envahi le disque de PDA adjacent initialement stérile, une des souches bactériennes était inoculée sur le disque central. Les montages étaient incubés à 30°C pour différentes périodes de temps selon le type d'expérience voulue. Une fois l'incubation terminée, le déplacement était quantifié.

2.2.5.4 Nettoyage des disques

La première étape avant de procéder à la quantification du déplacement était de nettoyer les disques pour récupérer toutes les bactéries. Chacun des disques des montages étaient déposés dans un tube en verre stérile différent contenant 1 mL de PBS 1X afin que le disque se retrouve immergé dans le tampon. Les tubes étaient vortexés 30 secondes et ensuite soumis deux fois 30 secondes à l'ultrasonication (60 Hz) pour récupérer le maximum de bactéries adhérentes. Le tampon était ensuite transféré dans un nouveau micro-tube de 1,5 mL stérile.

2.2.5.5 Décompte cellulaire

Les décomptes cellulaires ont été faits selon la méthode par micro-dilution. À partir du surnageant récupéré lors du nettoyage des disques, des dilutions décimales ont été effectuées dans une plaque 96 puits à l'aide d'une pipette multicanaux. Les embouts de pipettes étaient changés entre chaque dilution. Les dilutions allaient de 10^{-1} jusqu'à 10^{-8} . Une fois les dilutions effectuées, 5 µL de chaque puits ont été déposés sur des géloses TSB solidifiées avec 1,5 % d'agar. Les géloses contenant les gouttes étaient ensuite séchées sous une hotte à flux laminaire durant 45 minutes. Les géloses étaient incubées à 37° C pendant 16 heures afin d'avoir des colonies isolées. Les gouttes contenant entre 10 à 30 colonies étaient comptées. Le nombre d'unités formatrices une colonie (UFC) était calculé selon l'équation ci-dessous. Cette méthode permet de dénombrer au minimum 2×10^4 cellules jusqu'à 2×10^{11} cellules.

$UFC = \frac{Nombre \ de \ colonies}{Volume \times Facteur \ de \ dilution}$

2.3 Résultats

2.3.1 Sélection du mycète

Afin de déterminer sur quel type d'hyphe *P. aeruginosa* était capable de se déplacer, différents mycètes appartenant à différentes classes ont été soumis à un test de translocation, tel que décrit au tableau 2.2. Le déplacement de *P. aeruginosa* a pu être observé en tout temps sur les hyphes de *P. ultimum*. Pour les constructions faites avec *F. oxysporum* et *A. alternata*, le déplacement n'a été observé que quelques fois seulement. Bien que les bactéries étaient présentes sur les disques centraux, il n'y a jamais eu de bactéries sur le disque adjacent pour les constructions impliquant *R. solani*. Les essais ont été répétés plus de trois fois indépendamment (journées différentes) et les temps d'incubation ont été prolongés au-delà de 48 heures.

Au vu de ces résultats, le mycète choisit pour les tests de quantification du déplacement a été *P. ultimum*, un oomycète formant des hyphes hydrophiles. En plus d'avoir toujours pu constater le déplacement de *P. aeruginosa* sur les hyphes de ce mycète, celui-ci colonise rapidement et efficacement le milieu de culture et est utilisé dans la littérature comme organisme favorisant la translocation bactérienne.

2.3.2 Quantification du déplacement

La première étape a consisté à déterminer combien de temps cela prenait aux bactéries pour atteindre le disque adjacent après l'inoculation. Pour ce faire, une cinétique de 24 heures a été réalisée sur la souche sauvage *P. aeruginosa* PA14, les UFC ont été comptés toutes les quatre heures (Fig 2.2 A). Puisque les premiers comptes ont pu être réalisés seulement après quatre heures, une cinétique plus restrictive a été effectuée, soit toutes les heures pendant quatre heures (Fig 2.2 B). Suite aux résultats obtenus, le déplacement de la souche sauvage sur les hyphes de *P. ultimum* est un mouvement rapide, en seulement quatre heures les bactéries ont la capacité de traverser d'un disque à l'autre.



Figure 2.2 Cinétique de déplacement de *P. aeruginosa* PA14 inoculé sur *P. ultimum* pour différents temps, **A**) toutes les quatre heures pendant 24 heures ou **B**) toutes les heures durant quatre heures. Barres d'erreur : Écart type des moyennes des UFC de trois disques.

Une fois le temps de déplacement connu, les tests suivants consistaient à la comparaison du déplacement des différents mutants bactériens sur les hyphes de *P. ultimum* avec la souche sauvage. Pour une facilité de compréhension, les trois réplicas des cinq souches ont été regroupés dans le même graphique, toutefois, les expérimentations ont été faites au même moment pour les quatre mutants et la souche sauvage, et ce, trois fois de façon indépendante. Dans un premier temps, les inoculums ont été déposés sur le disque central, puis après quatre heures de migration, les disques étaient récupérés et un décompte de UFC était fait sur les deux disques (Fig 2.3).



Figure 2.3 Compte de bactéries sur les disques de départ et d'arrivée de **A**) *P. aeruginosa* PA14, du **B**) mutant *fliC*, du **C**) mutant *hptB*, du **D**) mutant *pilA* et du **E**) mutant *rhlA* sur les disques de départ et d'arrivée, obtenus quatre heures après l'inoculation sur *P. ultimum*, pour trois réplicas. Barre d'erreur : Écart type des moyennes de UFC pour chaque réplica.

Par la suite, le pourcentage de déplacement était déterminé en utilisant l'équation ci-dessous. Ce calcul permettait de mieux comparer les déplacements des différents mutants et de la souche sauvage (Tableau 2.3).

% de déplacement =
$$\frac{UFC \text{ disque d'arrivée}}{UFC \text{ totaux (des deux disques)}} \times 100$$

En confrontant les pourcentages de déplacement entre la souche sauvage et les différents mutants, on observe que le déplacement est plus efficace chez les mutants qui ont un défaut de motilité (*fliC*, *hptB*^r, *pilA*^r) que pour la souche sauvage. De plus, le mutant *rhlA*^r qui ne peut pas faire de *swarming* dû à son incapacité à produire des rhamnolipides a une meilleur habileté à se mouvoir sur les hyphes que *P*. *aeruginosa* PA14. Cependant, lorsque les réplicas sont examinés entre eux, les pourcentages de déplacement ne sont pas constants d'une fois à l'autre.

	Pourcentage de déplacement (%)			
Souches	Réplicas			
	1	2	3	
PA14	9	1	>1	
fliC	64	50	14	
hptB ⁻	75	84	>1	
pilA ⁻	53	38	17	
rhlA ⁻	46	40	>1	

Tableau 2.3 Pourcentage de déplacement des différents mutants et de la souche sauvage pour trois réplicas.

D'après les précédents résultats, deux causes pourraient être à l'origine de la faible reproductibilité de ceux-ci. La première explication pourrait être due au fait que le déplacement se fasse

d'une façon continue dans le temps, mais que la période de latence avant le début du déplacement soit variable. La seconde explication retenue était que l'augmentation des UFC sur le disque d'arrivée est dû à une combinaison de croissance bactérienne et de déplacement.

Pour vérifier la première hypothèse, l'essai effectué a été de faire un décompte cellulaire des disques d'arrivée toutes les 30 minutes, à partir de 90 minutes après l'inoculation pendant six heures, pour plusieurs montages. De cette manière, un nuage de points pourra être produit permettant de créer une droite de régression linéaire et de déterminer un coefficient de corrélation (r^2), ce qui renseignera sur une relation entre le temps et l'augmentation de la quantité de bactéries sur les disques aux extrémités. Pour différents temps, les UFC de plusieurs disques d'arrivée ont été mesurés pour les mutants *fliC*⁻ (Fig 2.4 A) et *pilA*⁻ (Fig 2.4 B) en les comparant à *P. aeruginosa* PA14. Les coefficients de corrélation aléatoire des points, signifiant une énorme variabilité. Cette variabilité pourrait expliquer le manque de corrélation perceptible. Puisque les systèmes de motilité intrinsèques connus ne semblent pas impliqués dans le déplacement de *P. aeruginosa* sur les mycélium, le système de chimiotactisme a aussi été étudié. Basé sur ce postulat, le mutant déficient dans un des systèmes de chimiotactisme, *cheA*⁻, a été testé (Fig 2.4 C). Tout comme les deux autres mutants, aucune corrélation claire n'a été observée (Fig 2.4 C).



Figure 2.4 Cinétique du déplacement des deux mutants ayant un défaut de motilité **A**) *fliC* et **B**) *pilA*⁻ et un mutant ayant un défaut de **C**) chimiotactisme, *cheA*⁻, 90 minutes après l'inoculation sur *P. ultimum*

Le prochain test était de déterminer si l'augmentation des UFC sur le disque d'arrivée était dû à la combinaison du déplacement et de la croissance bactérienne. Pour vérifier cette hypothèse, les constructions étaient inoculées selon le protocole habituel décrit à la section 2.2.5. Cependant, l'essai a été fait en utilisant une paire de montage, pour une des paires, le disque de départ était enlevé quatre heures après l'inoculation afin d'éviter un apport de bactéries de la part de celui-ci et la croissance seule pourra être mesurée (Fig 2.5). Pour le montage ayant eu le disque de départ enlevé, le disque d'arrivée était désigné comme le « disque seul ». Pour le premier réplica (Fig 2.5 A), il n'y a pas eu de croissance après quatre heures, probablement dû à un problème qui se serait produit durant la procédure pour compter les UFC. Outre cette valeur manquante, les disques de départ des trois réplicas montrent un dénombrement



bactérien relativement stable, par contre pour les disques d'arrivée et séparés, les UFC ne sont pas constants d'une fois à l'autre.

Figure 2.5 Compte de *P. aeruginosa* PA14 quatre heures après l'inoculation sur *P. ultimum* toutes les deux heures pendant 12 heures, pour trois réplicas, obtenu sur les disques de départ, d'arrivée et seul. Barre d'erreur : Écart type des moyennes de UFC pour chaque réplica.

Le manque de reproductibilité des derniers tests pourrait être dû à un nombre insuffisant de réplica pour une même expérience. Une manière de pouvoir percevoir une tendance générale du déplacement est de réaliser une expérience en ayant une grande quantité de réplicas. Le prochain test a été fait en réalisant des décomptes cellulaires sur les deux disques d'un même montage à différents moments, et ce, en le faisant sur six montages différentes pour chacun des temps (Fig 2.6). Pour les six réplicas, il y a peu de variation de UFC pour les disques inoculés, toutefois pour les disques à l'arrivée aucune tendance ne semble apparaître.



Figure 2.6 Cinétique de déplacement de *P. aeruginosa* PA14 deux heures après l'inoculation sur *P. ultimum* et toutes les deux heures pendant 10 heures pour six réplicas. Barre d'erreur : Écart type des moyenne de UFC pour chaque réplica.

2.4 Discussion

Le déplacement bactérien sur les hyphes de mycètes est un phénomène multifactoriel qui implique plusieurs facteurs connus, dont certains ne sont pas encore élucidés. En général, la littérature indique que la translocation bactérienne se produit sur des hyphes hydrophiles par des bactéries motiles grâce à l'action de leur flagelle (Smits *et al.*, 2003, Nazir *et al.*, 2010, Pion *et al.*, 2013).

Comme il a été observé par plusieurs équipes, les mycètes hydrophobes, appartenant aux classes des ascomycètes et basidiomycètes, ne permettent habituellement pas le déplacement bactériens sur leurs hyphes, contrairement aux mycètes hydrophiles (Kohlmeier *et al.*, 2005, Banitz *et al.*, 2013). Quelques exceptions quant au déplacement bactérien sur les mycètes existent. Par exemple, certaines bactéries flagellées ne sont pas capables de se déplacer sans la présence d'une autre espèce bactérienne, tandis que certains hyphes hydrophobes permettent la translocation (Warmink & van Elsas, 2009, Warmink *et al.*, 2011). De plus, plusieurs modèles de translocation utilisent comme organismes modèles *P. putida*, une bactérie isolée de la rhizosphère, et l'oomycète *P. ultimum* (Kohlmeier *et al.*, 2005, Furuno *et al.*, 2012). Cependant, le déplacement de *P. aeruginosa* sur des hyphes a été très peu étudié (Pion *et al.*, 2013)

Il était donc intéressant de savoir quels types d'hyphes permettaient le déplacement de P. aeruginosa, une bactérie retrouvée dans divers environnements. Pour ce faire, des représentants des différentes classes mycéliennes ont été soumis à des essais de translocation. Le déplacement de P. aeruginosa PA14 a pu être constaté sur les hyphes hydrophobes de l'ascomycète A. alternata et n'était pas toujours présent sur les hyphes hydrophiles du deutéromycète F. oxysporum. Toutefois, il a toujours été observé sur les hyphes hydrophiles de l'oomycète P. ultimum et jamais sur les hyphes hydrophobes du basidiomycète R. solani. Ces résultats concordent avec les observations précédemment faites par d'autres équipes de recherche qui mentionnent que les mycètes hydrophobes ne permettent pas le mouvement bactérien le long de leurs hyphes (Kohlmeier et al., 2005, Banitz et al., 2013). Cependant, le déplacement de P. aeruginosa NEU1023, un isolat du sol, a été remarqué sur les hyphes de Morchella crassipes, un ascomycète (Pion et al., 2013). L'hydrophobicité des hyphes est dû, entre autres, à la présence d'hydrophobine, de petites protéines hydrophobes sécrétées par les basidiomycètes et les ascomycètes lors de leur croissance et de leur développement. Néanmoins, le milieu de culture, l'état physiologique du mycète et la présence d'eau sont d'autres facteurs qui peuvent modifier l'hydrophobicité des mycètes (Smits et al., 2003). Pour ces raisons, il est fortement probable d'avoir du déplacement sur certains types de mycètes qui seraient considérés à première vue comme défavorables à la translocation. Par ailleurs, d'autres espèces fongiques semblent correspondre au modèle qui leur a été imputé, comme dans le cas de *P. ultimum* et *R. solani*, qui sont prédits pour respectivement permettre et non le déplacement bactérien selon leurs hyphes. En revanche, la translocation ne dépend pas seulement du mycète mais aussi de l'espèce bactérienne qui migre sur les hyphes (Furuno *et al.*, 2010, Nazir *et al.*, 2010, Warmink *et al.*, 2011, Pion *et al.*, 2013).

Une fois qu'il fut possible de déterminer sur quel type de mycète *P. aeruginosa* pouvait se déplacer efficacement, le temps qu'il faut pour détecter les premiers mouvements bactériens a été établi. Ce temps correspond au moment où il y a assez de bactéries qui ont migré d'un disque à l'autre pour pouvoir être dénombrées. Selon les premiers résultats apparaissant à la figure 2.3, les bactéries sont détectables sur le disque d'arrivée du montage quatre heures après l'inoculation sur le disque de départ. Ceci permet de mettre en évidence que la translocation de *P. aeruginosa* sur les hyphes de *P. ultimum* est un phénomène rapide qui se fait en l'espace de quelques heures seulement

Pour vérifier si la motilité, en particulier le *swarming*, est bel et bien impliquée dans la translocation bactérienne sur les hyphes, différents mutants déficients dans une ou plusieurs types de motilités ont été comparés à la souche sauvage. En examinant chaque condition entre elle pour un même réplica, la souche sauvage montre un déplacement sur les hyphes beaucoup moins efficace que les mutants qui ont un défaut de motilité. Toutefois, lorsque pour une même condition les réplicas sont comparés entre eux, le pourcentage de déplacement est très variable d'une fois à l'autre, bien que l'inoculum sur le disque central soit relativement similaire.

Cette grande variation dans les pourcentages de déplacement pourrait être la manifestation d'un déplacement progressif, mais débutant à des moments variables des bactéries au lieu d'un mouvement de masse à un moment précis. Lorsque le déplacement des mutants fliC, hptB et pilA a été observé dans le temps et comparé à la souche sauvage, aucun lien ne pu être établit entre le temps de déplacement et la quantité de bactérie retrouvée sur les disques aux extrémités. Ces mêmes constatations sont remarquées chez un mutant déficient pour le chimiotactisme.

Puisque la translocation bactérienne n'est pas liée au temps, il se pourrait que le déplacement se confonde à la croissance bactérienne. Quand la croissance bactérienne est quantifiée sur un disque isolé et comparé à un disque où le déplacement peut encore avoir lieu, il y a manifestement aucun parallèle qui puisse être établit entre le déplacement et la croissance bactérienne dû au trop grand écart entre chacun des échantillons.

La faible quantité d'échantillon pourrait être la raison du manque de reproductibilité des expériences précédentes. En augmentant le nombre de réplica à chaque temps, une tendance générale du

déplacement pourrait être perçue et ainsi permettre de comprendre la dynamique de la translocation bactérienne sur les hyphes. Malheureusement, aucune tendance du déplacement n'a pu être déduite de cette manière.

En analysant les précédents résultats d'une façon générale, il en ressort que le déplacement bactérien sur les hyphes de mycète n'est pas un phénomène dépendant du *swimming*, du *swarming*, du *twitching*, ni du chimiotactisme. Un autre point intéressant à soulever est qu'environ 10⁴ bactéries pouvaient être quantifiables quatre heures après l'inoculation lors des premiers essais (Fig 2.2). Cependant, plus tard (Fig 2.4), le déplacement pouvait être quantifié à environ 10⁷ bactéries aux premiers échantillonnages, soit 90 minutes après l'inoculation, ce qui implique que la translocation bactérienne sur les hyphes de mycètes est un phénomène encore plus rapide que constaté précédemment. Toutefois, le nombre de bactéries déposées sur les disques centraux est resté constant.

Quoiqu'une variabilité causée par la méthode de comptage des UFC pourrait être naturellement considérée, en comparant la quantification des disques inoculés à travers toutes les expériences, il appert que la technique de la quantification bactérienne est adéquate, car il n'y a pas de grande variation et les UFC dénombrés provenant de l'inoculum (disque de départ) varient constamment autour de 10⁸.

Ces observations pourraient être la manifestation d'un type de déplacement ou d'une motilité qui n'est pas encore caractérisé chez *P. aeruginosa*, par exemple le *gliding*. Ce type de déplacement n'a été observé que chez trois grands groupes bactériens : les myxobactéries, les cyanobactéries et le groupe des *Cytophaga-Flavobacterium*. Les bactéries en *gliding*, contrairement à d'autres motilités sociales, ne nécessitent pas de *pili* ni de flagelles pour se déplacer, mais les mouvements de la membrane externe ou encore le transport de macromolécules pourraient être impliqués dans la propulsion. Les bactéries pouvant faire du *gliding* peuvent atteindre des vitesses allant jusqu'à 10 μ m/s, une vitesse avoisinant celle observée pour le *swarming*. Toutefois, le *gliding* reste un phénomène très peu connu (Harshey, 2003).

Le déplacement bactérien sur les hyphes a été largement étudié dans un contexte de biorestauration des sols pollués (Banitz *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs augmentent la biodisponibilité des polluants aux bactéries, entre autres les vecteurs de translocation des polluants et la dispersion bactérienne. Un vecteur de translocation serait les hyphes où le polluant est acheminé jusqu'aux bactéries, tandis que la dispersion bactérienne serait la possibilité d'une bactérie à se mouvoir vers le polluant. Selon les conditions environnementales, ces deux critères peuvent varier jusqu'à être totalement négligeables (Banitz *et al.*, 2013). Qui plus est, les interactions bactéries/mycètes sont des phénomènes complexes qui n'ont pas été complètement élucidés et plusieurs paramètres physico-chimiques favorisent ou non le déplacement, comme la température, l'humidité, le milieu de culture, etc. (Smits *et al.*, 2003). Une

manière alternative pour comprendre le déplacement serait que les bactéries s'accrochent aux hyphes et se font transporter d'un endroit à un autre lors de leur croissance, un peu à la manière d'un train. La combinaison du déplacement bactérien et de la croissance des hyphes pourraient aussi expliquer certains des résultats.

Des expériences supplémentaires pourraient être envisagées afin de mieux comprendre le mécanisme de translocation de *P. aeruginosa* sur les hyphes. Par exemple, le déplacement pourrait être suivi à l'aide de la microscopie en marquant les bactéries avec un rapporteur fluorescent. Une autre technique serait d'employer la vidéomicroscopie à haute résolution en contraste de phase (*high-resolution, phase contrast time-lapse microscopy*) combinée à un algorithme pour suivre et analyser le mouvement individuel des bactéries et de les dénombrer (Gloag *et al.*, 2013). Enfin, utiliser de la fibre de verre permettrait de mimer les hyphes tout en minimisant les interactions biotiques. L'absence d'interactions biotiques aiderait à visualiser seulement le déplacement de *P. aeruginosa* sur la fibre de verre sans avoir à se soucier de la croissance des hyphes.

En conclusion pour cette section, la capacité de *P. aeruginosa* à se déplacer sur des hyphes a été démontrée. Il semble que les structures classiques de motilité, tels que flagelles et *pili* de type IV, ne soient pas impliqués dans ce phénomène.

CHAPITRE 3 : MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ *P. AERUGINOSA* EN MOTILITÉ *SWARMING*

3.1 Mise en contexte

La motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* lui confère une résistance supplémentaire à plusieurs antibiotiques (Lai *et al.*, 2009). Une des avenues proposées pour expliquer ce phénomène est une diminution de la perméabilité de la membrane externe des bactéries en *swarming* versus leurs homologues planctoniques (Lai, 2007, Lai *et al.*, 2009). En comparant les différents modes d'action des divers antibiotiques sur la réponse d'une colonie *swarming*, ceux devant traverser la membrane externe pour agir ne sont pas efficaces, par exemple les aminoglycosides, les β -lactamines, les macrolides et les quinolones, tandis que les peptides antimicrobiens, agissant directement sur la membrane externe, continuent d'avoir l'effet attendu (Lai *et al.*, 2009). On doit aussi noter que Lai *et al* 2009 ont démontré que les pompes à efflux de type Mex ne semblent pas impliquées dans le phénomène de résistance. En combinant ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'une modification des protéines de la membrane externe pourrait être un mécanisme de résistance impliqué dans la perte de sensibilité aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en motilité de type *swarming*. Parmi les autres mécanismes connus pour influencer la réponse aux antibiotiques, on pourrait également considérer la réponse au stress oxydatif engendré par les antibiotiques (Kohanski *et al.*, 2007).

Pour vérifier ces hypothèses, la tobramycine, un aminoglycoside, a été utilisé durant les essais. Cet antibiotique a été choisi pour plusieurs raisons, entre autres car il est fréquemment utilisé pour tester les résistances de *P. aeruginosa*, donc les résultats obtenus avec cet antimicrobien facilitent la comparaison à la littérature. Ensuite, la tobramycine est un agent qui est souvent utilisé dans le milieu hospitalier pour traiter les infections causées par *P. aeruginosa* (Hermann, 2007). Par ailleurs, lorsque *P. aeruginosa* aborde la motilité *swarming*, celle-ci montre une résistance 85 fois plus importante à cet antibiotique que lorsqu'elle est en *swimming* (Lai *et al.*, 2009).

Dans un premier temps, des mutants proviennent d'une sélection de gènes liés à la membrane externe, comme des gènes de transporteurs de type ABC, de pompes à efflux de systèmes RND et des gènes *mex* ont été mis en présence de tobramycine, afin de trouver ceux associés à la résistance en *swarming*. Des gènes qui pourraient être impliqués dans des résistances liées à des états physiologiques

comme un stress ou la production de H_2S ont également été testés, ainsi que d'autres qui ont été mentionnés dans la littérature ayant une implication dans la résistance dans certaines conditions (Schweizer, 2003, Tavankar *et al.*, 2003, Shatalin *et al.*, 2011, Williamson *et al.*, 2012, Gupta *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013).

Dans un deuxième temps, une approche protéomique a été employée afin de déterminer quelle protéine pourrait être impliquée dans la résistance accrue de *P. aeruginosa* en motilité *swarming*. Des profils ont été réalisés en extrayant les protéines de la membrane externe de bactéries en motilité *swarming* ou en motilité *swimming* ayant ou non rencontrées la tobramycine. La comparaison des gels 2-DE *swimming* permettaient de discriminer les protéines qui sont spécifiquement liées à la résistance aux antibiotiques en motilité *swarming*. Finalement, une expérience de RT-PCR quantitative (qRT-PCR) a été réalisée sur quelques gènes codant des protéines retrouvées dans des *spots* des gels-2-DE *swarming* afin d'avoir un aperçu des gènes qui sont surexprimés chez les cellules en *swarming* exposée à un antibiotique.

3.2 Méthodologie

3.2.1 Bactéries

Les bactéries utilisées pour la réalisation de ces travaux sont la souche sauvage *Pseudomonas aeruginosa* PA14 et des mutants provenant de la banque de mutants PA14NR (Liberati *et al.*, 2006, Liberati *et al.*, 2013). Ces derniers ont été sélectionnés selon l'hypothèse que la résistance de *P. aeruginosa* à certains types d'antibiotiques lorsqu'elle est en motilité *swarming* est due à l'expression de nouveaux systèmes de résistance. Les mutants testés sont identifiés dans le tableau A.1. en annexe. La façon de sélectionner les gènes mutés a été faite à partir de la base de données génomique de *Pseudomonas*, www.pseudomonas.com. Les mots-clefs étaient écrits dans le moteur de recherche pour la souche *P. aeruginosa* PA14. Les mots-clefs comprenaient «*ABC transporter* », «*mex* », «*pumps* », « OMP », « RND », « *efflux* » et « *shock* » (Winsor *et al.*, 2011). Le tri était ensuite fait comme suit : lorsque plusieurs gènes étaient présents pour un même opéron, seulement un de ceux-ci était conservé (Winsor *et al.*, 2011). De plus, certains gènes ont été sélectionnés à partir de la littérature. Par exemple *sagS*, des gènes codant des protéines de la famille OprM, des gènes impliqués dans la production de H₂S, ainsi que d'autres impliqués dans la résistance aux antibiotiques dans certaines conditions (Schweizer, 2003, Shatalin *et al.*, 2011, Gupta *et al.*, 2013).

3.2.1.1 Précultures

Les précultures ont été préparées comme mentionné à la section 2.2.2.4.

3.2.2 Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour les précultures est un milieu commercial de TSB, préparé selon les directives du fabriquant et passé à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C.

Le milieu de culture pour permettre le *swarming* est le milieu semi-solide M9DCAA, préparé comme suit (Lai, 2007):

Dans une bouteille, 20 mM NH₄Cl, 12 mM Na₂HPO₄•7H₂O, 22 mM K₂HPO₄, 8,6 mM NaCl, 0,5 % « Casamino acids» [BD, Bacto TM casamino acids, technical (Acid-hydrolyzed casein)] et 0,5 % Bactoagar (BD, Bacto TM agar) sont mélangés avec le volume d'eau Milli-Q correspondant. Le milieu est autoclavé durant 20 minutes à 121°C. Une fois le milieu un peu refroidit, 11 mM dextrose, 1 mM MgSO₄ et 1 mM CaCl₂ en solution ont été ajoutés. Vingt mL de ce milieu sont ensuite coulés dans des boites de Pétri de dimension 100 mm diam. × 15 mm ou 50 mL pour les grandes boîtes de Pétri rondes de dimension 150 mm diam.× 15 mm. Les géloses *swarming* sont séchées ensuite pendant 75 minutes sous l'enceinte de sécurité biologique. Toutes les géloses sont préparées la journée de leur utilisation.

3.2.3 Préparation des cellules

Après l'incubation des précultures, les DO_{600} de celles-ci sont mesurées à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000) et ajustées selon le calcul mentionné précédemment à la section 2.2.2.5. Pour préparer les cultures servant à inoculer les milieux M9DCAA, les précultures avec la DO_{600} ajustées dans 3 mL de TSB sont remises à incuber à 37°C jusqu'à l'atteinte d'une DO_{600} de 3,00 ± 0,05. Pour les cultures planctoniques, le milieu de culture utilisé est le milieu M9DCAA sans agar. La DO_{600} est ajustée à 0,1 et la culture est remise à incuber à 37°C jusqu'à l'atteinte d'une DO_{600} de 2,50 ± 0,50.

3.2.4 Antibiotique

3.2.4.1 Tests de susceptibilité

L'antibiotique qui a été utilisé pour tester la susceptibilité est la tobramycine. Cet antibiotique a déjà montré son efficacité contre la *P. aeruginosa* PA14 lorsqu'elle est en motilité de type *swimming* et son inefficacité lorsque cette dernière est en motilité de type *swarming*.

Pour les tests de susceptibilité, 25 μ L de tobramycine à une concentration de 3 mg/mL sont déposés sur un disque de papier stérile (OxoidTM Blank Antimicrobial Susceptibility Discs), à raison de 75 μ g par disque. Les disques sont ensuite complètement séchés sous la hotte à flux laminaire avant d'être utilisés.

3.2.4.2 Concentration sous-inhibitrice optimale et courbe de croissance

Afin de trouver la concentration de tobramycine ayant un effet antibiotique inhibiteur sans avoir un effet létal sur les bactéries planctoniques, une cinétique a été réalisée sur des cultures de *P. aeruginosa* PA14 (DO₆₀₀ initiale de 0,05) exposées à des concentrations de tobramycine allant de 1, 5, 10, 15 ou 20 μ g/mL. Les courbes de croissance ont été obtenue à 37°C pendant 24 heures en utilisant un Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd) mesurant la DO₄₀₀₋₅₂₀ toutes les 15 minutes. Lorsque la concentration sousinhibitrice optimale a pu être établie, une cinétique de huit heures aux 30 minutes a été faite afin d'obtenir une courbe de croissance permettant de déterminer les phases de croissance.

3.2.4.3 Extractions des protéines de la membrane externe et périplasmiques

Pour les extractions des protéines de la membrane externe et périplasmiques de cellules planctoniques, celles-ci ont été exposées à 10 μ g/mL de tobramycine, la concentration d'antibiotique qui a été choisie comme la concentration sous-inhibitrice optimale. Pour les extractions des protéines de la membrane externe et périplasmiques de cellules en *swarming*, 50 μ L de tobramycine à une concentration de 1.5 mg/mL ont été déposés sur une bande de papier stérile de dimension 0,5 cm × 6 cm (Whatman grade 5, 90 cm), permettant d'avoir 75 μ g par bande. Les bandes ont ensuite été complètement séchées sous la hotte à flux laminaire avant d'être utilisées.

3.2.5 Récolte des cellules exposées à la tobramycine

Pour récupérer les cellules d'une colonie *swarming*, 10 μ L de culture de la souche sauvage à DO₆₀₀ 3,00 ± 0,05 étaient inoculés au centre d'une gélose 150 mm diamètre. À une distance de 4 cm du site d'ensemencement, cinq bandes de papiers avec ou sans antibiotique étaient disposées autour du point d'inoculation en formant un pentagone. Les boîtes de Pétri étaient ensuite incubées à 37°C pendant 10 heures afin que les dendrites des colonies en *swarming* puissent toucher aux bandes de papier. Une fois l'incubation terminée, les bandes de papiers étaient immergées soit dans 15 mL de PBS 1X pour l'expérience des gels 2-DE ou dans 5 mL de RNAlater (RNA*later*TM RNA Stabilization Reagent, Qiagen) pour l'expérience de la qRT-PCR. Les bandes étaient finalement vortexées environ une quinzaine de secondes, permettant de récupérer les cellules

3.2.6 Tests de susceptibilité

Sur les milieux *swarming* semi-solides M9DCAA, 5 μ L de culture de mutants sélectionnés et de la souche sauvage à DO₆₀₀ 3,00 ± 0,05 ont été inoculés en présence d'un disque de papier préalablement conditionné avec l'antibiotique à une distances de 4,5 cm. Les mutants et la souche sauvage sont testés en duplicata. Les géloses inoculées sont incubées à 34°C pendant 16 heures afin que les dendrites de la colonie en *swarming* puissent recouvrir la surface. Si un mutant montre une résistance à la tobramycine, les dendrites de celui-ci toucheront le disque d'antibiotique. Cependant, lorsque le mutant y est sensible, la colonie contournera le disque. Lorsque les dendrites des deux réplicas touchaient au disque de tobramycine, le mutant était considéré comme résistant. Si pour au moins un des deux réplica les dendrites ne touchaient pas au disque, le mutant était testé à nouveau.

3.2.7 Gels d'électrophorèse bidimensionnels (Gels 2-DE)

Le protocole des gels 2-DE provient du laboratoire du Pr Éric Déziel, il a été adapté et optimisé par Marie-Christine Groleau.

Le protocole de la coloration à l'argent provient de Shevchenko et al. (Shevchenko et al., 1996).

Le protocole d'extraction de protéines de la membrane externe et périplasmiques est adapté de Quan *et al.* (Quan *et al.*, 2013).

3.2.7.1 Tampons et solutions

La solution servant à laver les bandes de papiers pour récupérer les bactéries était du PBS préparé selon la même procédure de la section 2.2.2.3.

La solution servant à l'extraction des protéines membranaires était du « Tris-sucrose EDTA » (TSE). Dans une bouteille, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM sucrose et 1 mM EDTA sont ajoutés au volume d'eau osmose inversé et autoclavés pendant 20 minutes à 121°C. Au moment de l'utilisation, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) est ajouté au TSE.

Le tampon de réhydratation servant à suspendre les protéines est composé de 8 M urée, 2 M Thiourée, 4 % CHAPS, 40 mM DTT, 20 mM Tris base et complété avec le volume adéquat d'eau Milli-Q. La solution est divisée en aliquote de 500 μ L et conservées à - 20°C

Les solutions d'équilibration pour les bandelettes pH sont préparées un peu avant la fin de la migration. Pour environ 12 mL de solution de base, les éléments sont déposés, dans l'ordre, dans un tube de 50 mL : 4,5 mL glycérol, 1,5 mL Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 2,4 mL d'eau et 5,4 g urée, le tout est vortexé jusqu'à ce que l'urée soit dissout.

Dans deux autres longs tubes en verres visés, 1,5 mL SDS 10 % est ajouté à chaque tube ainsi que 0,075 g de DTT pour préparer la solution de réduction ou 0,1875 g d'iodoacétamide pour faire la solution d'alkylation. La solution de base est répartie dans chacun des deux tubes en verres, à raison de 6 mL. Les solutions réductrice et alkylante se font dissoudre doucement à l'aide d'une plaque pivotante pour éviter de créer de la mousse.

Pour pouvoir visualiser un front de migration lors de la deuxième dimension, une solution d'agarose-bleu de bromophénol est préparée, celle-ci peut être conservée à 4°C. Dans un flacon Erlenmeyer, 5mL Tris-HCl, 1,5 M pH 8,8, 0,5 mL SDS 10 %, 4,52 mL glycérol 99 %, 0,5 g agarose, 200 μ L bleu de bromophénol 5 % sont ajoutés et le volume est complété jusqu'à 50 mL avec de l'eau osmose inverse. La solution est chauffée au four à micro-ondes jusqu'à ce que l'agarose ait fondu complètement.

La migration de la deuxième dimension se fait dans une cuve à DGGE, dans 6 L de tampon Tris-Glycine (SDS-PAGE). Le tampon Tris-Glycine 10X peut être fait d'avance et conservé à 4°C, toutefois le tampon 1X doit être préparé frais. Pour préparer le tampon 1X, neuf parts d'eau Milli-Q sont ajoutées à une part de tampon 10X, préparé comme suit : pour 1 L de tampon Tris-Glycine 10X, 30 g Tris Base, 144 g glycine, 10 g SDS (ou 100 mL SDS 10 %) sont dissous dans de l'eau Milli-Q, et le volume est complété jusqu'à 1 L.

3.2.7.2 Solutions de coloration au nitrate d'argent

Pour révéler les protéines dans les gels, six solutions sont nécessaires. Pour traiter deux grands gels, 500 mL de chaque solution sont préparés. L'eau Milli-Q est utilisée pour toutes les solutions.

La 1^{ère} solution est la solution de fixation composée de 50 % d'éthanol 95 %, de 5 % d'acide acétique et complétée avec de l'eau, soit 250 mL d'éthanol 95 %, 25 mL d'acide acétique 100 % et 225 mL d'eau.

La 2^e solution est une solution de thiosulfate 0,02 % composée de 2 mL de thiosulfate 5 % avec 498 mL d'eau.

La 3^e solution est la solution de nitrate d'argent 0,1 %, qui est sensible à la lumière. Pour un volume final de 500 mL, 20 mL de nitrate d'argent 2,5 % est ajouté à 480 mL d'eau.

La solution de développement (4^e) est composée de 2 % de carbonate de sodium et de 0,04 % formaldéhyde. Cette solution peut être faite d'avance, et quelque fois plus de 500 mL sont nécessaires pour développer les gels. Pour 1 L de solution, 20 g carbonate de sodium est dissout dans 1 mL de formaldéhyde 37 %, complété avec de l'eau.

La solution pour arrêter le développement (5°) est de l'eau supplémentée avec 100 % d'acide acétique pour une concentration finale de 5 %.

La dernière solution (6^e) est la solution d'entreposage préparée avec 150 mL éthanol 95 %, 20 mL glycérol 99 % et 330 mL d'eau, pour un ratio final de 30 % d'éthanol et 4 % de glycérol.

3.2.7.3 Extraction des protéines de la membrane externe et périplasmiques

Pour obtenir les protéines de la membrane externe et périplasmiques, les suspensions cellulaires obtenues après le nettoyage de bandes ou des cultures planctoniques sont centrifugées à 3 000 × g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré complètement, jusqu'à la dernière goutte et resuspendu dans 5 mL de tampon TSE additionné de 1 mM de PMSF. Les culots sont mis en suspension à l'aide d'un fil bouclé d'un manche de Koch stérile, la pipette n'est pas utilisée afin de ne pas lyser les cellules. Les culots resuspendus sont incubés sur la glace pendant 75 minutes. Lorsque l'incubation à froid est terminée, les tubes sont centrifugés à la vitesse maximale (11 000 g) pendant une heure à 4°C. Les surnageants contenant les extraits d'enveloppe sont transférés dans de nouveaux tubes, les culots contiennent les sphéroplastes.

Dans les tubes contenant les protéines d'enveloppe, de l'acide tricholoacétique (TCA) à une concentration de 100% est ajouté jusqu'à ce que la concentration finale du mélange soit de 25 %, les tubes sont brièvement vortexés et mis à - 20°C durant toute la nuit.

Les tubes sont ensuite décongelés à la température de la pièce. Après avoir rapidement vortexé les tubes, ils sont centrifugés à 11 000 g pendant 30 minutes à 4°C, puis les surnageants sont éliminés doucement en prenant soin de ne pas recueillir le culot. Les culots sont ensuite suspendus dans de l'acétone 80 % froid et gardés sur glace pendant 5 minutes. Par la suite, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 15 000 rpm. Le surnageant est éliminé et les étapes de lavage à l'acétone et de centrifugation sont répétées deux autres fois. Après le troisième lavage, le surnageant est éliminé et les tubes restent ouverts de quelques minutes à quelques heures afin que les culots sèchent. Les culots sont suspendus dans 200 μ L de tampon de réhydratation, les échantillons sont conservés à - 20°C jusqu'à leur utilisation. La concentration en protéines des échantillons est dosée à l'aide de la technique Bradford.

3.2.7.4 Dosage protéique Bradford

Pour déterminer la concentration en protéine des échantillons, un dosage protéique par la méthode de Bradford a été nécessaire. La courbe standard a été faite avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) à une concentration de 10 μ g/mL en suspension dans du NaOH 0,1 N.

Pour faire la courbe standard, six quantités connues et finales de BSA servaient à faire la courbe standard, soit 0; 1,2; 2,5; 5; 7,5 et 10 μ g pour un volume final de 1000 μ L. Dans une cuvette à spectrophotométrie, 800 μ L de chaque concentration de BSA étaient déposés avec 200 μ L de réactif de Bradford (Protein assay reagent, Bio-Rad). Le tout était mélangé trois fois par inversion et les DO₅₉₅ étaient mesurées après 5 minutes, à l'aide d'un spectrophotomètre (Milton Roy Spectronic 1001 plus).

Les échantillons ont été dilués dans du NaOH 0,1 N selon un facteur 1:100 ou 1:1000. Pour déterminer leur concentration protéique, 800 μ L des échantillons dilués ont été déposés dans une cuvette en présence de 200 μ L de réactif de Bradford, 5 minutes après les trois inversions, les DO₅₉₅ ont été mesurées.

À partir de la courbe standard, la concentration protéique des échantillons pouvait être déterminée.

3.2.7.5 Préparation des gels d'acrylamide

Deux gels d'acrylamide sont préparés la journée de la réhydratation des bandes pH et conservés à 4°C dans un sac de plastique pour qu'ils ne s'assèchent pas. Le montage pour mouler les gels est fait avec

des plaques de verres de dimension 200 mm \times 200 mm pour la petite vitre et 220 mm \times 200 mm pour la grande vitre. Une fois le montage en place, son étanchéité est testée avec de l'eau Milli-Q avant de verser le gel.

Pour un volume total de 120 mL, les éléments suivant sont mis dans l'ordre dans un cylindre gradué : 52,2 mL d'eau de qualité osmose inverse, 30 mL Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 36 mL acrylamide/Bis 40 %, 1,2 mL SDS 10 %, 600 μ L APS 10 % et 60 μ L TEMED, le tout est mélangé par inversion délicatement. À l'aide d'une pipette, un peu moins de 55 mL de gel d'acrylamide non-polymérisé est versé entre les plaques de verres qui composent le montage. De l'alcool isopropylique est déposé sur la surface du gel liquide afin de le niveler et d'éliminer les bulles d'air. Une fois le gel polymérisé, il est entreposé comme mentionné plus haut.

3.2.7.6 Première dimension

La première dimension du gel 2-DE permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique. Pour ce faire, deux bandelettes de 13 cm, avec une gamme de pH entre 4 à 7 (Immobiline DryStrip gels pH 4-7, 13 cm, GE Healthcare) ont été utilisées.

Dans le tampon de réhydratation, du tampon IPG au pH des bandelettes sélectionnées (pH 4-7 IPG Buffer) est ajouté afin d'atteindre une concentration finale de 2 %, soit 10 μ L pour 490 μ l de tampon de réhydratation. À partir des échantillons de protéines, 130 μ g sont déposés dans un microtube complété avec du tampon de réhydratation additionné de 2 % d'IPG Buffer pour un volume final de 250 μ L. De plus, 5 μ L de solution de bleu de bromophénol 5 % est ajouté. Les numéros d'identification des bandelettes sont pris en note, permettant de les reconnaître par la suite. Après avoir bien mélangé, 250 μ L d'échantillon sont déposés dans un puits en évitant de créer des bulles. Le film plastique recouvrant les bandelettes est enlevé et ces dernières sont déposées tranquillement dans les puits contenant les échantillons, le gel face à l'échantillon, toujours en évitant de créer des bulles. Les puits sont ensuite complètement recouverts d'huile minérale. Les bandelettes se font réhydrater toute la nuit à la température pièce, à l'abri de la lumière.

Lorsque l'incubation des bandelettes est terminée, celles-ci sont rincées à l'eau Milli-Q et déposées sur du papier absorbant pour enlever l'excès d'huile. Entre temps, des papiers « Whatman » préalablement découpés aux dimensions 2 cm \times 1,5 cm sont hydratés avec de l'eau osmose inverse et épongés légèrement. Chaque bandelette est ensuite déposée dans un sarcophage en positionnant le côté positif vers la borne positive. Les papiers humidifiés sont placés à chaque extrémité des bandelettes et les électrodes sont déposées par-dessus. Les sarcophages sont placés dans l'appareil à gradient isoélectrique

(Ettan IGphor 3 Isoelectric Focusing Unit) et un test de courant est réalisé. Lorsque le test de courant est concluant, les bandelettes sont recouvertes d'huile minérale et le programme désiré est sélectionné. Dans le cas des bandelettes 13 cm pH 4-7, le patron de migration utilisé est celui recommandé par le fabriquant (GE Healthcare) détaillé en annexe, avec un courant de 50 µA par bandelettes (Tableau A.2).

Durant les trois premières heures, les paramètres sont vérifiés plusieurs fois, afin de s'assurer que la migration se déroule correctement.

Une fois la migration terminée, les bandelettes sont rincées à l'eau Milli-Q et déposées sur du papier absorbant pour éponger l'excès d'huile.

3.2.7.7 Équilibration

Pour équilibrer les bandelettes, les solutions de réduction et d'alkylation sont faites fraîches tel que décrit. Après avoir bien rincé et épongé les bandelettes, celles-ci sont déposées dans la solution de réduction pendant 20 minutes. Elles sont ensuite rincées et brièvement épongées pour être déposées dans la solution d'alkylation pendant 20 minutes. Elles sont à nouveau rincées et épongées.

3.2.7.8 Deuxième dimension

Durant l'équilibration, le montage de gels d'acrylamide est sorti du réfrigérateur pour qu'il soit à la température ambiante. Tout le matériel utilisé est nettoyé préalablement à l'éthanol, de plus les bandelettes sont manipulées à l'aide de pinces. Les extrémités de plastique des bandelettes sont coupées avec une paire de ciseaux et sont ensuite déposées à l'aide d'une règle, sur le gel d'acrylamide. Le côté plastique doit être collé sur la grande vitre afin de faire glisser la bandelette correctement jusqu'à la surface du gel d'acrylamide. La solution d'agarose-bleu de bromophénol fondu et refroidie est versée sur les bandelettes pour les recouvrir totalement. Les peignes pour creuser les puits, qui contiendront l'échelle de poids moléculaire, sont placés à côté des bandelettes.

Une fois que le bleu-agarose s'est solidifié, le montage de la deuxième dimension est assemblé dans une cuve à DGGE. Les gels sont immergés dans 6 L de tampon Tris-Glycine et 15 μ L d'échelle de poids moléculaire (Precision Plus ProteinTM Unstainded Standards, Bio-Rad) sont déposés dans le puits creusé à cet effet. La migration se fait pendant 16 heures à 70 V à la température ambiante.

À la fin de la migration, les gels sont démoulés en prenant soin de marquer les limites de la bandelette et sont prêts à se faire révéler.

3.2.7.9 Coloration des gels

Pour révéler les gels, ceux-ci seront plongés à tour de rôle dans six différentes solutions et rincés à l'eau Milli-Q entre chaque étape. Un agitateur à bascule est utilisé pour permettre aux solutions d'agir uniformément sur les gels.

• La première étape consiste à mettre les gels dans la solution de fixation pendant une trentaine de minutes. Pendant ce temps, les cinq autres solutions sont préparées.

• Les gels sont ensuite rincés trois fois pendant 5 minutes à l'eau.

• Puis, ils sont plongés durant 5 minutes dans la solution de thiosulfate 0,02 % et rincés deux fois pendant 5 minutes à l'eau.

• L'étape suivante est l'immersion des gels durant 20 minutes dans la solution de nitrate d'argent 0,1 % à l'abri de la lumière.

• Une fois l'incubation terminée, les gels sont rincés brièvement durant une minute dans l'eau.

• La prochaine étape est le moment de révéler les gels. Une fraction de la solution de développement est versée sur les gels. Quand la solution commence à devenir jaunâtre, elle est remplacée par de la fraîche, ce qui prend quelques secondes. Il faut répéter jusqu'à ce que les taches et l'échelle de poids moléculaire apparaissent correctement, sans pour autant sur-développer le gel.

Lorsque les gels sont convenablement développés, ils sont rincés rapidement à l'eau et on arrête la réaction avec l'avant-dernière solution pendant 5 minutes. Les gels peuvent être gardés dans la solution d'entreposage à 4°C et numérisés en les plaçant entre deux acétates.

3.2.7.10 Analyse des gels

Une fois les gels numérisés, les photographies sont comparées à l'aide du logiciel Microsoft® Office PowerPoint 2007, en les superposant. Les *spots* qui apparaissent sur les gels des échantillons des bactéries en motilité *swarming* qui ont été en contact avec la tobramycine et qui ne sont pas présents sur le gel témoin sont notés. Ils sont ensuite découpés avec un scalpel stérile, un différent pour chaque *spot*, et déposés dans des microtubes, conservés à - 20°C jusqu'à ce que l'analyse protéomique se fasse par LC-MS (Service de protéomique de l'INRS-Institut Armand-Frappier).

3.2.8 RT-PCR quantitative (qRT-PCR)

3.2.8.1 Amorces

À partir des protéines obtenues après l'analyse des protéines des gels 2-DE, huit amorces ciblant les ADN des gènes ont été dessinées à l'aide de l'outil bioinformatique Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). La description des amorces est présente en annexe (Tableau A.3). Les gènes ciblés sont *frr*, *ndk*, *nusG*, *rplE*, *rplI*, *rpsE*, PA14_51830 et PA14_51930. Le gène de ménage utilisé comme contrôle pour les réactions était *rpoD*, un facteur sigma de l'ARN polymérase (Winsor *et al.*, 2011).

3.2.8.2 Gradient de température

Afin de s'assurer de cibler la température où toutes les amorces peuvent s'hybrider, un gradient de température a été exécuté sur 12 températures différentes. Pour ce faire, le mélange réactionnel a été fait avec de l'ADN génomique de *P. aeruginosa* PA14. Les détails du mélange réactionnel et de la programmation de la réaction PCR sont en annexe (Tableaux A.4 et A.5).

3.2.8.3 Extraction des ARN

La DO₆₀₀ de la suspension de bactéries récupérées des cinq bandes rincées au RNAlater variait entre 3 et 4 (Voir section 3.2.5). À partir des échantillons, 250 µL de suspension étaient centrifugées à 5 000 g pendant deux minutes. Le surnageant était enlevé tranquillement et les culots étaient traités au PureZOL (PureZOLTM RNA Isolation Reageant, Bio-Rad) selon les recommandations du fabriquant. Les ARN extraits étaient resuspendus avec 50 µL d'eau *RNase-free* (DEPC-treated water, Ambion®). Les échantillons ont ensuite été analysés sur un gel d'agarose 1 % (migration à 160 V pendant 15 minutes) afin de confirmer l'intégrité des ARN.

3.2.8.4 Traitement à la DNase et inactivation

Une fois les ARN obtenus, un traitement à la DNase est exécuté. Dans chaque échantillon, 1 μ L de DNase (TURBOTM DNase 2 U/ μ L, Ambion®), 1 μ L d'eau *RNase-free* et 5 μ L de tampon sont ajoutés. Après une incubation à 37 °C pendant 30 minutes, 1 μ L de DNase est ajouté. Une autre incubation est faite à 37 °C pendant 30 minutes.

Suite au traitement à la DNase, celle-ci est inactivée en appliquant le protocole de l'inactivateur de DNase (RiboPureTM-Bacteria Kit, Ambion®) selon les recommandations du fabriquant.

Après le traitement à la DNase et son inactivation, La confirmation d'intégrité des ARN est reconfirmée sur gel. De plus, une réaction PCR de 40 cycles est réalisée en utilisant une paire d'amorce pour le gène de référence (*rpoD*) afin de vérifier qu'il n'y a plus d'ADN présent dans les échantillons d'ARN. Les détails du mélange réactionnel et de la programmation de la réaction PCR sont en annexe (Tableaux A.6 et A.7). Une fois la réaction PCR terminée, les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose 2 % et séparés à 115 V pendant environ une heure.

3.2.8.5 qRT-PCR

Après avoir confirmé l'intégrité de l'ARN et l'absence d'ADN dans les échantillons, une réaction de qRT-PCR a été effectuée sur les échantillons en utilisant les huit paires d'amorces et la paire d'amorce *rpoD*, un gène connu pour ne pas avoir de variation d'expression dans différents contextes expérimentaux (Savli, 2003). Le thermocycleur Rotor-Gene 600 (Corbett) a été utilisé pour réaliser l'expérience de qRT-PCR. Les détails des amorces, du mélange réactionnel et de la programmation de la réaction qRT-PCR sont en annexe (Tableaux A.3, A.8 et A.9).

3.3 Résultats

3.3.1 Tests de susceptibilité

Les tests de susceptibilité ont permis de faire un criblage ciblé afin de trouver un gène impliqué dans la résistance aux antibiotiques des colonies en *swarming*. Les mutants sélectionnés pour réaliser les tests ont été sélectionnés selon les hypothèses que la résistance augmentée aux antibiotiques chez *P*. *aeruginosa* lorsqu'elle adopte la motilité *swarming* serait due à une perte ou une diminution de la perméabilité de la membrane externe, à des systèmes d'efflux surexprimés ou à une réponse à un stress. Après avoir dressé une liste regroupant les gènes à tester disponibles dans la banque de mutant PA14NR *Set*, les mutants ont été soumis au test de susceptibilité.

Comme décrit au tableau 3.1, sur les 272 mutants soumis au test de susceptibilité aucun n'a montré une sensibilité à la tobramycine. Cependant, 21 n'ont pu être testés car ils étaient incapables de faire du *swarming*. La liste des mutants sélectionnées est présente en annexe (Tableau A.1).
Catégorie de mutants	Mutants testés	Mutants résistants	Absence de <i>swarming</i>
Transporteurs de type ABC	109	99	10
mex	13	13	0
Pompes	5	5	0
Protéines de la membrane externe	89	83	6
RND	4	3	1
Efflux	27	25	2
Réponse aux stress	10	9	1
Production de H ₂ S	3	2	1
Famille des protéines de la membrane externe	7	7	0
Littérature	5	5	0

Tableau 3.1 Catégories de mutants soumis au test de susceptibilité étant résistant à la tobramycine ou ne pouvant pas faire de *swarming*.

3.3.2 Gels d'électrophorèse bidimensionnels swarming

Suite à l'examen de 272 mutants qui auraient pu avoir un rôle dans la résistance augmentée aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en motilité *swarming*, aucun mutant offrant une piste intéressante n'a été obtenu.

Une approche protéomique a donc été explorée afin de comparer les profils protéiques du périplasme et de la membrane externe de *P. aeruginosa* en motilité *swarming* lorsqu'elle est en contact ou non avec la tobramycine. Les extractions protéiques ainsi que les gels 2-DE ont été effectués trois fois de façon indépendante. Les protéines périplasmiques et de la membrane externe ont été extraites à partir de colonies *swarming* de la souche sauvage de *P. aeruginosa* qui ont été ou non en contact avec la tobramycine. Suite à la comparaison des gels 2-DE entre eux, il a été observé qu'il y a certains nouveaux

spots qui apparaissaient seulement dans la condition où les bactéries étaient en contact avec l'antibiotique (Fig. 3.1), ce qui indique qu'il y a une surexpression de certaines protéines lorsque *P. aeruginosa* en motilité *swarming* est exposée à la tobramycine. Parmi les dix *spots* retrouvés, un était clairement exprimé dans deux réplicas (Fig 3.1 B et D).



Figure 3.1 Gels d'électrophorèse bidimensionnels en triplicata indépendant de protéines de la membrane externe et périplasmiques de colonies de *P. aeruginosa* ayant été en contact avec la tobramycine (B, D et F) ou non (A, C et E). Isolement de neuf *spots* exprimés seulement dans la condition où les bactéries étaient en contact avec l'antibiotique (cercles numérotés).

Les neuf *spots* différents ont été découpés des gels 2-DE et ont été séquencés par spectrométrie de masse. Après l'analyse des séquences peptidiques à l'aide de l'outil bioinformatique Mascot, 28 protéines ont été retrouvées parmi les neuf *spots* (Tableau 3.2). Sans surprise, plusieurs protéines se retrouvent dans un même *spot*, cependant quelques protéines similaires ont été retrouvées dans différents *spots*. Les protéines qui ont été prises en considération sont celles ayant un score d'homologie de plus de 65. Ce score est le niveau de confiance dans l'identification des protéines selon le nombre de peptides récupérés et identifiés parmi les protéines répertoriées dans la base de données NCBI. Puisque les séquences peptidiques obtenues sont comparées avec une base de données, certains des peptides identifiés peuvent correspondre à différentes protéines sans savoir laquelle est réellement présente dans le *spot*. Par exemple pour le *spot* 4, cinq protéines de biosynthèse de phénazine sont présentes, toutefois la séquence peptidique ne permet pas de discriminer laquelle des cinq est réellement exprimée.

Tableau 3.2 Liste des protéines de *P. aeruginosa* identifiées dans neuf *spots* surexprimés isolés des gels 2-DE où les colonies *swarming* étaient en contact avec la tobramycine. Prédiction de la localisation subcellulaire des protéines avec le niveau de confiance (1 : localisation subcellulaire démontrée expérimentalement, 3 : localisation subcellulaire prédite informatiquement par PSORTb V3.0), selon <u>http://www.pseudomonas.com</u> (Winsor *et al.*, 2011).

* : Mutant soumis au test de susceptibilité.

Description (gène)	Numéro PA14	Numéro PAO1	Localisation subcellulaire (Niveau de confiance)
	<i>Spot</i> #1		
Protéine hypothétique	PA14_62690*	PA4739	Périplasmique (3)
	<i>Spot</i> #2		
Azurine (azu)	PA14_65000*	PA4922	Périplasmique (3)
Isomerase putative	PA14_20960*	PA3332	Cytoplasmique (3)
Nucléoside diphosphate kinase (ndk)	PA14_14820	PA3807	Extracellulaire (3)
Sous-unité L9 de la protéine ribosomale 50S (<i>rpl1</i>)	PA14_65150	PA4932	Cytoplasmique (3)
	<i>Spot</i> #3		-
Inhibiteur de l'initiation de la traduction putatif	PA14_70480*	PA5339	Cytoplasmique (3)
	Spot #4		
Facteur d'élongation de la transcription (<i>greB</i>)	PA14_27130	PA2859	Cytoplasmique (3)
Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase B (<i>ppiB</i>)	PA14_41390*	PA1793	Cytoplasmique (3)
Protéine de biosynthèse de phénazine	PA14_09420 (<i>phzF1</i>) PA14_09470*(<i>phzB1</i>)	PA4215 PA4211	Cytoplasmique (3)

	PA14_09480 (phzA1)	PA4210	
	PA14_39890 (phzF2)	PA1904	
	PA14_39960 (<i>phzB2</i>)	PA1900	
Protéine de chimiotactisme liant les	PA14_02230*	PA0177	
purines probable (<i>cheW</i>)	PA14_45500	PA1464	Cytoplasmique (3)
Protéine hypothétique	PA14_41690	PA1768	Cytoplasmique (3)
Protéine hypothétique	PA14_64470*	PA4875	Cytoplasmique (3)
Sous-unité de la préprotéine			Cytoplasmique (3)
translocase (<i>secB</i>)	PA14_67720*	PA5128	Vésicules de la membrane externe (1)
Sous unité I 5 de la protéine			Cytoplasmique (3)
ribosomale 50S (<i>rplE</i>)	PA14_08970	PA4251	Vésicules de la membrane externe (1)
Sous unité 55 de la protéine			Cytoplasmique (3)
ribosomale 30S (<i>rpsE</i>)	PA14_09020	PA4246	Vésicules de la membrane externe (1)
	Spot #5		
Deoxycytidine triphosphate	PA14_19090 (dcd)	PA3480	Cytoplasmique (3)
désaminase probable	PA14_60100*(<i>dtd</i>)	-	Inconnu (3)
Facteur de recyclage des ribosomes (frr)	PA14_17100	PA3653	Cytoplasmique (3)
			Extracellulaire (1)
Protéase (pasP)	PA14_05510*	PA0423	Vésicules de la membrane externe (1)
Protéine d'antiterminaison de la transcription NusG	PA14_08710*	PA4275	Cytoplasmique (3)
Protéine Hcp sécrétée par sécrétion	PA14_03240 (hcpC)	PA0263	Extracallylaire (2)
de type VI	PA14_43070*(<i>hcpD</i>)	PA5267	Extracentiane (5)

PA14_	_44890	(hcpA)
-------	--------	--------

PA14_69560 (*hcpB*)

	Spot #6		
Nucléoside diphosphate kinase (ndk)	PA14_14820	PA3807	Extracellulaire (3)
	<i>Spot</i> #7		
Inhibiteur de l'initiation de la	PA14_09920	PA4173	Inconnu (3)
traduction putatif	PA14_23720*	PA3123	Cytoplasmique (3)
			Membrane externe (1)
Lipid A 3-O-deacylase (pagL)	PA14_61650*	PA4661	Vésicules de la membrane externe (1)
Protéine de stress liant l'ADN (dps)	PA14_51830*	PA0962	Cytoplasmique (3)
Protéine hypothétique	PA14_49400	PA1160	Inconnu (3)
Protéine hypothétique (rahU)	PA14_01490	PA0122	Extracellulaire (3)
	PA14_11340	PA4061	Cytoplasmique (3)
Thiorédoxine probable (trx2 ou	PA14_29280*	PA2694	Cytoplamisque (3)
trxA)	PA14_51930	PA0953	Périplasmisque (3)
	PA14_69200	PA5240	Cytoplasmique (3)
	<i>Spot</i> #8		
Nucléoside diphosphate kinase (ndk)	PA14_14820	PA3807	Extracellulaire (3)
Protéine hypothétique	PA14_27570*	PA2822	Inconnu (3)
Protéine hypothétique (rahU)	PA14_01490	PA0122	Extracellulaire (3)
	PA14_11340	PA4061	Cytoplasmique (3)
Thiorédoxine probable (<i>trx2</i> ou	PA14_29280*	PA2694	Cytoplamisque (3)
trxA)	PA14_51930	PA0953	Périplasmisque (3)
	PA14_69200	PA5240	Cytoplasmique (3)
	<i>Spot</i> #9		

Des tille and the second second second			Membrane externe (3)
(oprG)	PA14_11270	PA4067	Vésicules de la membrane externe (1)

Les protéines ayant une fonction dans la traduction ont été les plus fréquemment retrouvées en plus de protéines ayant une fonction inconnue. À elles-seules, ces deux catégories de protéines regroupent la moitié des protéines retrouvées lors de l'analyse.

Après une recherche dans la banque de mutant PA14NR *Set*, il s'est avéré que sur les 28 gènes, 19 mutants étaient disponibles, ceux-ci ont été soumis au test de susceptibilité de la même manière que pour le criblage sélectif (Tableau 3.2). Seul le mutant dans le gène codant la protéine de la membrane externe OprG n'a pas testé puisqu'il l'avait été lors du criblage.

Tous les mutants testés ont le même phénotype de résistance à la tobramycine que la souche sauvage.

3.3.3 RT-PCR quantitative

Puisque dans un même *spot* il y a plus d'une protéine présente, qui peuvent être exprimées en proportion différente, il est essentiel de déterminer lesquelles sont surexprimées en *swarming* + tobramycine par rapport aux autres. Pour ce faire, une RT-PCR quantitative (qRT-PCR) a été effectuée sur gènes codants des protéines qui se retrouvent dans certains *spot*. Les amorces utilisées pour la qRT-PCR ciblent les gènes *frr, ndk, nusG, rpsE, rplE, rplI,* PA14_51830 (*dps*) et PA14_51930. Les gènes choisis sont ceux dont les protéines ont été retrouvées dans un *spot* avec le plus haut score d'homologie et dans lequel plus d'une des protéines sélectionnées s'y retrouvent. De plus, parmi les huit gènes choisis, deux ont une localisation dans les vésicules de la membrane externe (OMV). La Figure 3.2 montre les résultats de transcription des gènes sélectionnés dans la population de bactéries en swarming associées aux bandes de papiers, en absence ou présence de tobramycine.



Figure 3.2 Expression relative des gènes **A**) *frr*, **B**) *ndk*, **C**) *nusG*, **D**) *rplE*, **E**) *rplI*, **F**) *rpsE*, **G**) PA14_51830 et **H**) PA14_51930 de *P. aeruginosa* en motilité *swarming* en présence ou non de tobramycine en utilisant le gène de ménage *rpoD*.

Les gènes *frr*, *nusG* et *rplI* sont beaucoup moins exprimés dans la condition où les colonies étaient en contact avec la tobramycine contrairement aux gènes *ndk*, *rpsE* et PA14_51830. Le gène PA14_51930 ne semble pas être exprimé différemment selon les conditions tout comme *rplE*.

3.3.4 Concentration sous-inhibitrice optimale et courbe de croissance

Pour pouvoir discriminer quelles protéines sont spécifiquement liées à la résistance à la tobramycine chez *P. aeruginosa* adoptant le motilité *swarming*, les profils protéiques de cultures bactériennes en nage libre en présence ou non de l'antibiotique ont été comparés.

La tobramycine a une activité bactéricide contre *P. aeruginosa*. Pour pouvoir comparer les profils protéiques de bactéries en nage libre qui ont été un contact avec l'antibiotique, il faut pouvoir établir la concentration optimale qui permettra d'affecter les cellules sans qu'il y ait une trop grande mort cellulaire. Des concentrations allant de 1 à 20 μ g/mL en croissant par saut de 5 μ g/mL ont été utilisée pour trouver la concentration sous-inhibitrice optimale (Fig 3.3).



Figure 3.3 Profils de croissance de *P. aeruginosa* en présence de concentrations croissantes de tobramycine. $DO_{440-520}$ de *P. aeruginosa* en culture liquide dans un milieu M9DCAA en présence de 0 à 20 µg/mL de tobramycine en fonction du temps, toutes les 15 minutes pendant 24 heures. Expérience effectuée dans un BioScreen C. Barres d'erreur : Écart type de $DO_{440-520}$ de triplicata.

La concentration sous-inhibitrice optimale a été établie à $10 \ \mu g/mL$, au-delà de cette concentration la mort cellulaire est beaucoup trop grande tandis qu'en dessous de cette valeur, les bactéries ne sont aucunement affectées.

La courbe de croissance a été effectuée en tubes pour déterminer la fin de la phase logarithmique et le début de la phase stationnaire pour les milieux contenant ou non de la tobramycine à la concentration sous-inhibitrice optimale. La DO₆₀₀ a été mesurée toutes les 30 minutes pendant huit heures (Fig 3.4).



Figure 3.4 Courbe de croissance de *P. aeruginosa* en culture liquide dans un milieu M9DCAA sans tobramycine ou avec $10 \mu g/mL$ pendant huit heures.

Sept heures après l'incubation, les bactéries débutent la phase stationnaire pour les deux types de milieux. La DO_{600} n'atteint pas plus de 2,50 pour les cultures inoculées dans le milieu liquide M9DCAA avec 10 µg/mL de tobramycine, tandis que la DO_{600} des cultures inoculées dans le milieu liquide M9DCAA atteint au maximum 3.80.

3.3.5 Gels d'électrophorèse bidimensionnel swimming

Une fois la concentration sous-inhibitrice optimale et la courbe de croissance connues, les protéines périplasmiques et de la membrane externe de *P. aeruginosa* en nage libre ont été extraites en présence ou non de la tobramycine.

De la même manière que pour les gels 2-DE de *P. aeruginosa* en *swarming*, ceux-ci ont été comparés entre eux afin de trouver des *spots* qui apparaissent seulement dans la condition où les bactéries

ont été en contact avec l'antibiotique (Fig 3.5). Sur deux des trois réplicas, deux *spots* sont exprimés sur les deux gels 2-DE (Fig 3.5 B et D).



Figure 3.5 Gels d'électrophorèse bidimensionnels en triplicata indépendants de protéines de la membrane externe et périplasmiques de *P. aeruginosa* en nage libre ayant étaient en contact avec la tobramycine (B, D et F) ou non (A, C et E). Isolement de quatre *spots* exprimés seulement dans la condition où les bactéries étaient en contact avec l'antibiotique (cercles numérotés).

Les *spots* 1 et 2 de chacun des gels ont été combinés pour l'analyse. Au total, quatre *spots* ont été séquencés par spectrométrie de masse. Les séquences peptidiques ont été analysées en utilisant l'outil bioinformatique Mascot (Matrix Science, London, UK). Sept protéines codées par *P. aeruginosa* ont été retrouvées parmi les quatre *spots* (Tableau 3.3). Tout comme pour l'analyse protéique précédente, seules les protéines ayant un score de plus de 65 sont considérées comme ayant une forte homologie de séquence.

Tableau 3.3 Tableaux des protéines de *P. aeruginosa* suite au séquençage des quatre *spots* isolés des gels 2-DE où les bactéries planctoniques étaient en contact avec une concentration sous-inhibitrice optimale de tobramycine. Prédiction de la localisation subcellulaire des protéines avec le niveau de confiance (3 : localisation subcellulaire prédite informatiquement par PSORTb V3.0), selon <u>http://www.pseudomonas.com</u> (Winsor *et al.*, 2011)

Description (gène)	Numéro PA14	Numéro PAO1	Localisation subcellulaire (Niveau de confiance)
	<i>Spot</i> #1		
Protéine de choc thermique GrpE	PA14_62990	PA4762	Cytoplasmique (3)
Protéine ribosomale 30S sous-unité S4 (<i>rpsD</i>)	PA14_09100	PA4239	Cytoplasmique (3)
	Spot #2		
Protéine hypothétique	PA14_25220	PA3003	Inconnu (3)

	Spot #3		
Azurine (azu)	PA14_65000	PA4922	Périplasmique (3)
Sous-unité catalytique phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (<i>purE</i>)	PA14_71620	PA5226	Cytoplasmique (3)
	Spot #4		
Protéine ribosomale 30S sous-unité S17 (<i>rpsQ</i>)	PA14_08940	PA4254	Cytoplasmique (3)
Protéine ribosomale 50S sous-unité L7/L12 (<i>rplL</i>)	PA14_08750	PA4271	Cytoplasmique (3)

Sur les sept protéines retrouvées, trois ont une fonction dans la traduction. Parmi toutes les protéines trouvées, seulement PA14_65000 (*azu*) était aussi trouvé dans le tableau 3.2. ce qui suggère des différences avec le protéome *swarming*.

3.4 Discussion

Le *swarming* est un comportement social qui permet aux bactéries de se déplacer vers une destination commune (Partridge & Harshey, 2012). Cette organisation sociale apporte des bénéfices aux bactéries de la colonie, entre autres une augmentation de la tolérance à divers antibiotiques (Lai *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa*, cette résistance est seulement présente envers les familles d'antibiotiques devant franchir la membrane externe pour atteindre leur cible cellulaire. De plus, lorsque *P. aeruginosa* aborde la motilité de type *swarming*, la perméabilité de sa membrane externe semble diminuée en comparaison à la même espèce en motilité individuelle (Lai *et al.*, 2009). Ceci suggère que la modification de la membrane externe de *P. aeruginosa* puisse jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques. Parmi ces modifications, des pompes à efflux ou des transporteurs de type ABC pourraient être surexprimés. Par ailleurs, certains antibiotiques bactéricides vont générer la production de composés stimulant la réponse au stress oxydatif, ce qui favoriserait la résistance à certains antibiotiques (Kohanski *et al.*, 2007, Poole, 2012).

En premier lieu, un criblage sélectif a été effectué afin de trouver un mutant qui montrerait une sensibilité à la tobramycine lors du *swarming*. Ces mutants ont été sélectionnés à partir de l'hypothèse que la résistance augmentée aux antibiotiques lorsque P. aeruginosa est en motilité swarming serait due à une unique mutation dans des gènes codant des protéines de la membrane externe, dans des systèmes permettant d'extruder des composés hors de la cellule, à une réponse au stress ou à un état physiologique permettant de contourner l'effet de l'antibiotique. En plus de choisir des mutants directement liés aux hypothèses de base, d'autres ont été sélectionnés selon la littérature qui mentionnait des gènes spécifiquement reliés à des phénotypes de résistances dans certaines conditions (Schweizer, 2003, Tavankar et al., 2003, Shatalin et al., 2011, Williamson et al., 2012, Gupta et al., 2013, Zhang et al., 2013). Au total, 272 mutants ont testés. Ils ont été inoculés à proximité d'un disque de tobramycine afin de détecter la présence d'une sensibilité à l'antibiotique (Tableau 3.1). Sur les 109 mutants dans des gènes liés aux transporteurs de type ABC, 99 ont montré une résistance à la tobramycine tandis que dix étaient incapables de faire du swarming. Les gènes mex sélectionnés étaient tous résistants, tout comme les gènes liés aux pompes, à la famille des protéines de la membrane externe et les gènes intéressants retrouvés dans la littérature. Parmi les 89 mutants dans les gènes codant des protéines de la membrane externe, 83 continuaient à avoir la même résistance que la souche sauvage envers la tobramycine. Toutefois, six d'entre eux ne pouvaient faire de *swarming*, ce qui pourrait être dû à l'absence de flagelles fonctionnels ou d'un défaut dans la production de rhamnolipides. Un seul mutant RND, deux mutants dans les gènes de système d'efflux, un mutant impliqué dans les réponses aux chocs thermiques et un mutant dans un gène de production de H₂S étaient déficients dans le *swarming*. Cependant, tous les autres mutants de ces catégories continuaient à être résistants à la tobramycine. Excepté pour le mutant PA14_50180 qui a été décrit comme ayant un défaut dans la motilité flagellaire, le défaut de swarming n'a été caractérisé pour aucun des 20 autres mutants (Gooderham & Hancock, 2009). Des essais plus poussés pourraient être envisagés afin de déterminer la raison du défaut de *swarming* de ces 20 mutants. Par exemple, pour tester un défaut flagellaire, les mutants pourraient être inoculés dans un milieu liquide où la motilité de type swimming pourrait être observée, tandis qui pour se rendre compte d'un défaut dans la production de rhamnolipides, les mutants pourraient être inoculés sur un milieu swarming semi-solide M9DCAA, où les rhamnolipides pourraient être dosés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS) (Tremblay & Déziel, 2008).

Puisqu'aucun des mutants testés n'a montré une sensibilité à la tobramycine, la technique des gels d'électrophorèse bidimensionnelle a été choisie pour comparer les protéomes de *P. aeruginosa* lorsqu'elle est en motilité *swarming* en présence ou non de tobramycine. En se basant sur l'hypothèse qu'une modification de la membrane externe serait la cause de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*

en motilité *swarming*, les protéines ciblées dans cette analyse protéomique sont les protéines périplasmiques et de la membrane externe. Lorsque les gels 2-DE des conditions où les bactéries ont été en contact ou non avec l'antibiotique ont été comparés entre eux, une apparition de nouveaux *spots* a pu être observée seulement dans la condition expérimentale et aucune disparition de *spot* n'a pu être détectée, ce qui suggère que de nouvelles protéines sont exprimées chez les bactéries en *swarming* lorsqu'elles sont en présence de tobramycine (Fig 3.2). Dans les neuf *spots* qui ont été isolés des gels 2-DE, 28 protéines codées par *P. aeruginosa* ont pu être identifiées. Le quart des protéines retrouvées ont une fonction dans la traduction protéique, ce qui correspond au mode d'action de l'antibiotique utilisé. Lorsque *Neisseria gonorrhoeae* subit un traitement avec des concentrations sous-inhibitrices de streptomycine, un aminoglycoside, la protéine ribosomale 50S L7/L12 est surexprimée jusqu'à 3,5 fois, tandis que lorsque *E. coli* est exposée à la gentamicine, les protéines ribosomales 30S S1 et S2 ainsi que les protéines ribosomales 50S L1, L9 et L10 sont surexprimées (Al-Majdoub *et al.*, 2013, Nabu *et al.*, 2014). Ceci suggérerait que l'augmentation de protéines ribosomales soit une réponse générale à la présence d'aminoglycoside.

Alternativement, la présence d'une grande quantité de protéines ribosomales peut laisser perplexe du fait que ce sont des protéines cytoplasmiques. Il se pourrait que la présence de protéines ribosomales soit due à un mécanisme de résistance encore inconnu où les bactéries exportent certaines sous-unités ribosomales à la surface de leur membrane externe afin de détourner l'antibiotique de sa cible intracellulaire en l'hameconnant avec des protéines similaires à l'extérieur de la cellule. Cette technique d'hameçonnage a déjà été rapportée dans la littérature. En situation de stress, les bactéries sécrètent des vésicules de la membrane externe contenant des protéines mal repliées, permettant de détourner la cible de l'antibiotique (Kulp & Kuehn, 2010, Manning & Kuehn, 2011, MacDonald & Kuehn, 2013). D'autre part, la présence de protéines ribosomales pourrait aussi être due à la conséquence d'un comportement observé jusqu'ici chez Bacillus subtilis. Lorsque celle-ci adopte le swarming en présence d'antibiotique, les bactéries le plus près de l'antibiotique meurent et lysent, ce qui permet de faire un « coussin » de protection pour les bactéries qui sont par-dessus. Par ailleurs, les déchets cellulaires des cellules lysées servent de sources nutritives pour les bactéries vivantes, ce comportement s'apparenterait à du cannibalisme (Butler et al., 2010). Ce « sacrifice » bactérien permettrait aussi le relâchement de protéines ribosomales dans le milieu extracellulaire, qui pourront ensuite hameçonner l'antibiotique pour éviter que celui-ci accède à sa cible intracellulaire chez les cellules vivantes.

Certains antibiotiques bactéricides comme les aminoglycosides dont fait partie la tobramycine induisent une réponse au stress oxydatif en générant des radicaux hydroxyles (Jana & Deb, 2006, Kohanski *et al.*, 2007). Ainsi, un autre quart des protéines identifiées sont impliquées dans les réponses au

stress oxydatif. Celles-ci sont Ndk, la protéine de stress liant l'ADN, la thiorédoxine, l'azurine et les protéines hypothétiques PA14_20960 (PA3332), PA14_62690 (PA4739) et PA14_05510 (PA0423) (Vijgenboom *et al.*, 1997, Zeller & Klug, 2006, Vinckx *et al.*, 2011, Winsor *et al.*, 2011). Ndk a été retrouvée dans deux *spots* différents présents sur le même gel 2-DE, ce qui est dû à deux formes de Ndk présentes au moment de l'extraction protéiques (Fig 3.2 D). Ceci a été observé chez un l'isolat clinique de *P. aeruginosa* 8830. Lorsque la souche est dans une phase de croissance exponentielle, la protéine Ndk a un poids moléculaire de 16 kDa et est présente dans le cytoplasme. Toutefois, lorsque l'isolat entre dans la phase stationnaire, Ndk est présente dans la membrane externe et avait un poids de 12 kDa (Chakrabarty, 1998). Puisque la protéine perd 4 kDa, la migration change (masse et pI différents).

Parmi les 28 protéines qui ont été séquencées à partir des *spots* isolés des gels 2-DE, 19 mutants existent dans la banque PA14NR *Set*. Ils ont donc été soumis au test de susceptibilité afin de déterminer si une unique mutation dans un de ces gènes aurait un effet sur la résistance à la tobramycine. La perte d'un gène n'a eu aucune répercussion sur la résistance à l'antibiotique, ce qui s'explique par le fait que les protéines ont été isolées de *spots* qui s'exprimaient seulement dans la condition expérimentale. Donc, ce serait la surexpression de la protéine qui favoriserait la résistance et sa perte n'impliquerait pas nécessairement une sensibilité. De plus, des mécanismes compensatoires pourraient prendre le relai dans la résistance lorsqu'une protéine est absente. La combinaison de ces deux phénomènes serait aussi probable.

L'intensité des *spots* ne renseigne pas sur quelle protéine est surexprimée parmi les 28 qui ont été identifiées. Puisque les extractions protéiques ont été faites pour récupérer les protéines périplasmiques et de la membrane externe, les protéines prédites pour être localisées à ces endroits sont les plus susceptibles d'être les protéines qui provoquent l'intensité du *spot*. De plus, les protéines qui sont sécrétées ou prédites pour avoir un peptide signal, peuvent, elles aussi, être des candidates. Dans le premier *spot*, une seule protéine a pu être identifiée (PA14_62690), celle-ci est prédite pour être une protéine cytoplasmique. Dans le *spot* 2, l'azurine et Ndk sont prédites pour être localisées au périplasme, tandis que la protéine ribosomale 50S L9 et l'isomérase putative sont cytoplasmiques. Seulement une protéine cytoplasmique est identifiée dans le *spot* 3 (inhibiteur de l'initiation de la traduction putatif). Neufs protéines cytoplasmiques sont présentes dans le *spot* 4, parmi celles-ci, SecB pourrait être en plus localisée dans les vésicules de la membrane externe lorsqu'un peptide signal est prédit pour PA14_41690. Dans le cinquième *spot*, deux protéines extracellulaires sont présentes (Hcp et Frr) parmi les cinq identifiées. De plus, Frr pourrait être présente dans des vésicules de la membrane externe. Dans les *spots* 6 et 9, seulement une protéine est identifiée pour chacun d'eux, respectivement Ndk (extracellulaire) et OprG prédite comme étant situé dans la membrane externe et démontrée comme étant dans les vésicules de la membrane externe. Dans le

spot 7, six protéines sont identifiées dont la moitié n'est pas cytoplasmique ; RahU : extracellulaire, PagL : membranaire et vésicules de la membrane externe et thiorédoxine : périplasmique. Dans le *spot* 8, la thioredoxine, Ndk et RahU sont à nouveau identifiées, en plus d'une quatrième protéine sans localisation subcellulaire connue ou prédite.

Comme mentionné, plusieurs protéines sont présentes dans un même spot et toutes ne sont pas exprimées aux mêmes proportions. La quantification de leur expression est évaluée à l'aide de la qRT-PCR, permettant de déterminer laquelle est surexprimée. Cette méthode permet de mesurer la transcription de gènes ciblés. Les gènes sélectionnés pour cette technique sont frr, ndk, nusG, rplI, rpsE, PA14 51830 et PA14_51930. Ils ont été choisis pour plusieurs raisons. Premièrement, certaines des protéines pour lesquelles ces gènes codent sont liées à la réponse au stress oxydatif (ndk, PA14_51830 PA14_51930) tandis que les autres sont associées à des processus de traduction (frr, rpll et rplE) et de transcription (nusG). Ensuite, Ndk et la thiorédoxine, sont des protéines prédites pour être respectivement extracellulaire et périplasmique. Enfin, dans certains spots plusieurs protéines ont été retrouvées et d'autres ont été identifiées à différents endroits dans les gels ; Frr et est une protéine qui est présente dans le spot 5, tout comme NusG. RpsE et RplE ont été isolées du spot 4. Dans le spot 7 ont été trouvées PA14_51830 et PA14_51930, qui sont aussi présentes aussi dans le spot 8 avec Ndk (Tableau 3.2). Quand les bactéries en swarming sont en contact avec la tobramycine, les gènes qui sont le plus fortement exprimés sont ndk, rpsE et PA14_51830 (Fig 3.2 B, F et G). nusG et frr sont sous-exprimés en présence de tobramycine, à noter que ces deux protéines sont tous les deux présentes dans le spot 5 (Fig 3.3 C et A). Parmi les huit gènes testés, seulement PA14 51930 ne montre aucune différence d'expression entre la condition contrôle et la condition expérimentale (Fig 3.2 H). Le gène rplE semble être sous-exprimé, toutefois le résultat obtenu n'est pas très concluant (Fig 3.2 D). La qRT-PCR a permis de confirmer que trois protéines, dont deux liées à une réponse au stress oxydatif, sont surexprimées quand P. aeruginosa est en motilité swarming en présence de tobramycine. Par contre, cette méthode permet de quantifier l'expression de l'ARN messager (ARNm). Toutefois, le ratio ARNm: protéine n'équivaut pas toujours à un. Un ARNm peut se faire traduire plus d'une fois, il y aura donc plusieurs copies de la protéine pour le même ARNm (Qin & Fredrick, 2013). Un moyen de contourner ce problème sera de cibler directement l'expression des protéines en utilisant la technique de Western Blot.

Les résultats précédents montrent qu'il y a des protéines qui sont plus abondantes lorsque les colonies *swarming* de *P. aeruginosa* sont en contact avec la tobramycine. Toutefois, ces protéines pourraient être seulement liées à la présence de l'antibiotique et non à un mécanisme de résistance spécifique au *swarming* chez *P. aeruginosa*. Le moyen de confirmer quelles protéines sont exclusivement impliquées dans la résistance aux antibiotiques en motilité *swarming* est de comparer les proféis protéiques

de bactéries en motilité individuelle, c'est-à-dire planctonique, lorsque celles-ci sont en contact avec un antibiotique ou non. Les protéines qui seront exprimées à la fois chez les colonies *swarming* et les bactéries planctoniques en contact avec la tobramycine seront considérées comme des protéines qui ont un lien avec l'antibiotique plutôt qu'avec le type de motilité.

En premier lieu, la concentration sous-inhibitrice optimale de tobramycine devait être établie. Cette concentration est celle où l'antibiotique continuera d'avoir un effet sur les cellules sans qu'il y ait une trop grande mort cellulaire, celle-ci a été fixée à 10 μ g/mL (Fig 3.3). En-dessous de cette concentration, les bactéries ne sont aucunement affectées et continuent leur croissance de la même manière que le contrôle sans antibiotique. Au-dessus de cette concentration, les bactéries ont de la difficulté à croître correctement.

La courbe de croissance devait aussi être connue pour pouvoir récupérer les cellules lorsqu'elles terminent leur phase de croissance exponentielle et entrent dans la phase stationnaire afin de pouvoir comparer le plus fidèlement les profils protéiques entre les conditions où les bactéries sont en nage libre ou en *swarming*.

Grâce à ces deux informations, l'analyse protéomique des bactéries planctoniques croissant ou non avec de la tobramycine a pu être réalisée. La comparaison des gels 2-DE a permis d'identifier des nouveaux spots apparaissant seulement dans la condition expérimentale (Fig 3.5). Quatre d'entre eux ont été séquencés, où sept protéines différentes de P. aeruginosa ont été retrouvées. À l'exception de l'azurine, aucune protéine n'a été retrouvée à la fois dans les gels 2-DE swarming et les gels 2-DE swimming. La présence de cette protéine pourrait s'expliquer par le fait qu'elle est fortement exprimée quand P. aeruginosa entre en phase stationnaire et est liée à une réponse au stress oxydatif, deux conditions rencontrées au niveau de la méthodologie expérimentale (Vijgenboom et al., 1997). Toutefois, le niveau d'expression de cette protéine n'est pas connu dans chacun des deux types de gel 2-DE. Celle-ci pourrait être plus fortement exprimée en condition *swarming* en présence d'antibiotique. Le moyen pour connaitre son niveau d'expression serait de faire un essai qRT-PCR afin de quantifier le nombre de transcrit ou un Western blot pour quantifier directement les protéines qui auront été transcrites. La majorité des protéines séquencées dans les gels swimming ont une fonction dans la traduction, un résultat similaire aux gels 2-DE swarming. Comme mentionné, l'augmentation de la production de protéines ribosomales semble être un mécanisme de réponse aux aminoglycosides utilisés par plusieurs espèces bactériennes (Al-Majdoub et al., 2013, Nabu et al., 2014). Cette surproduction pourrait permettre la perte de protéines ribosomales qui sont ciblées par l'antibiotique, mais ne serait pas directement associée à la survie des bactéries, lorsque celles-ci sont en situation de motilité individuelle. Par ailleurs, deux protéines

impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez d'autres espèces bactériennes ont été trouvées, soit la protéine hypothétique codée par PA14_25200 (PA3003), qui est en opéron avec PA14_25230 (PA3002, *mfd*) (Winsor *et al.*, 2011). Mfd est connue pour être une protéine qui répare les dommages à l'ADN et est impliquée dans les processus de recombinaison d'ADN. Chez Campylobacter jejuni et Helicobacter pylori, lorsque Mfd est surexprimée, les bactéries ont une résistance augmentée à divers antibiotiques (Han et al., 2008, Lee et al., 2009). La deuxième protéine est GrpE, une protéine de stress thermique impliquée dans la réponse au stress oxydatif et dans la résistance à la lyse cellulaire par les β -lactamines (Powell & Young, 1991). Qui plus est, GrpE est 1,6 fois plus exprimée dans les cellules présentes aux dendrites d'une colonie *swarming* en comparaison avec celles du centre, ce qui indiquerait que les cellules au bout d'une colonie swarming ne sont pas soumises aux mêmes conditions que les cellules au centre (Tremblay, 2011). Cette observation soulève la question suivante : si GrpE est plus exprimée dans les cellules aux dendrites et aide à la résistance aux antibiotiques, pourquoi cette protéine n'a pas été retrouvée dans l'analyse des gels 2-DE *swarming*? La réponse pourrait se trouver à deux niveaux, soit au point de vu de la méthodologie, où ce n'était que les cellules des dendrites qui ont été récupérées. GrpE aurait pu être différemment exprimé dans les deux conditions. Cependant ce n'était que les nouveaux spots qui apparaissaient qui étaient récupérés et non des spots qui étaient plus fortement exprimés d'une condition à l'autre, donc le spot aurait pu passer inaperçu. La deuxième explication, qui peut se combiner à la première, est que GrpE pourrait être exprimée de la même manière dans les deux conditions mais n'est pas impliquée dans la résistance spécifique aux antibiotiques de P. aeruginosa en swarming. Elle serait plutôt impliquée dans la survie de *P. aeruginosa* en nage libre en présence d'une concentration sousinhibitrice de tobramycine.

Plusieurs protéines liées à la réponse au stress oxydatif ont été retrouvées dans les deux analyses protéomiques, ce qui indiquerait que la tobramycine génère des réactifs qui induisent ce type de réponse chez *P. aeruginosa*. Toutefois, ce ne sont pas les mêmes qui sont exprimées, ce qui met en lumière que les protéines exprimées sont différentes quand les cellules adoptent une motilité sociale ou une motilité individuelle. Un moyen de vérifier si la tobramycine induit la formation de radiaux hydroxyles serait d'exposer les bactéries à l'antibiotique et d'utiliser le colorant hydroxylphényl fluorescéine (HPF), qui se fait oxyder par des radicaux hydroxyles. Lorsque le HPF se fait oxyder, sa fluorescence augmente (Kohanski *et al.*, 2007). Par ailleurs, il se pourrait que certaines des protéines soient associées à d'autres types de stress, par exemple la réponse stringente.

Pour raffiner les résultats obtenus, les expériences précédemment mentionnées pourraient être répétées en utilisant d'autres classes d'antibiotiques. Cela permettrait de déterminer si les protéines exprimées sont spécifiques à l'agent employé lorsque *P. aeruginosa* est en motilité *swarming* en présence

d'un antibiotique en particulier. De plus, l'intensité des *spots* pourraient être comparés entre chacune des conditions afin de déterminer s'il y a une différence d'expression entre chacun des *spots*.

Puisque les protéines GrpE et Mfd ont un rôle dans la résistance à certains antibiotiques chez différents genres bactériens, des essais pourraient être réalisés afin de confirmer la fonction de ces protéines dans la résistance à la tobramycine chez *P. aeruginosa* (Powell & Young, 1991, Han *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2009). La délétion et la surexpression des gènes codant ces protéines pourraient être effectuées et les mutants soumis à différentes concentrations de tobramycine. De la même manière, pour clarifier le rôle dans la résistance des protéines trouvées dans les gels 2-DE, celles trouvées lors des analyses protéomiques pourraient être surexprimées. Les mutants pourront ensuite être inoculés dans un milieu liquide en présence de tobramycine à des concentrations supérieures à 10 µg/mL. En supposant que le mutant ait la capacité de croître dans un tel milieu, ce test aura pour but de renforcer la fonction de la protéine dans la résistance aux antibiotiques. Finalement, les mutants pourraient être soumis à des classes d'antibiotiques différentes afin de comparer les profils de sensibilité aux modes d'actions. Ces travaux préliminaires proposent donc plusieurs avenues prometteuses dans l'élucidation du phénomène de la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en *swarming*.

Une autre explication des résultats obtenus pourrait résider dans les vésicules de la membrane externe. Ces vésicules dérivent de la membrane externe et, lors de leur formation, emportent du matériel extracellulaire (Schooling & Beveridge, 2006). De plus, il a été vu que, lors de situations où un stress est présent, les bactéries ont tendance à produire plus de vésicules (Maredia *et al.*, 2012). Il se pourrait que lorsque *P. aeruginosa* est en contact avec la tobramycine en motilité *swarming*, le stress que cela induit favorise la production de vésicules de la membrane externe. De plus, les vésicules pourraient contenir de hautes quantités de protéines ribosomales, permettant de détourner l'antibiotique de sa cible intracellulaire. Afin de déterminer si les bactéries en *swarming* forment plus de vésicules en présence de tobramycine, celle-ci pourraient être quantifiées. Les vésicules de la membrane externe de *P. aeruginosa* ont été décrites comme mesurant environ 150 nm. Il y a donc possibilité de les isoler en filtrant les cultures qui ont subi ou non un traitement antibiotique (Choi *et al.*, 2011, MacDonald & Kuehn, 2013). Les vésicules pourrait être ensuite quantifiées en utilisant un colorant lipophile fluorescent (MacDonald & Kuehn, 2013). Par ailleurs, le profil protéique des vésicules pourrait être déterminé en utilisant la technique des gels d'électrophorèse bidimensionnels et le comparer à celui fait sur des colonies en *swarming* en présence d'antibiotique.

4. CONCLUSION GÉNÉRALE

Bien que ce phénomène soit activement étudié chez plusieurs espèces bactériennes, plusieurs aspect du *swarming* restent nébuleux, notamment son rôle écologique et l'augmentation de la résistance à une large gamme d'antibiotiques.

La première partie du projet avait pour hypothèse que le *swarming* chez *P. aeruginosa* servait à se déplacer sur les hyphes de mycètes afin de coloniser de nouvelles niches écologiques (Kohlmeier *et al.*, 2005, Verstraeten *et al.*, 2008). Après différentes tentatives pour étayer cette hypothèse, aucune conclusion définitive n'a pu être établie. Le *swarming* pourrait ne pas être nécessaire pour le déplacement sur les hyphes de mycètes, mais il pourrait permettre le déplacement bactérien sur d'autres surfaces écologiques comme des rochers ou des racines de plantes. Une motilité encore inconnue chez *P. aeruginosa* permettrait aussi potentiellement le déplacement de celle-ci sur les hyphes.

La seconde partie du projet avait pour objectif d'identifier un ou des mécanismes de résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* lorsqu'elle adopte la motilité *swarming*. Les hypothèses émises sont que la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* en motilité *swarming* est la cause d'une modification de l'expression des protéines de la membrane externe, comme des transporteurs ou des systèmes d'efflux, ou que cette augmentation de la résistance est due à une réponse à un stress engendré par les antibiotiques. Suite à un criblage sélectif de plus de deux cents mutants, aucun de ceux-ci n'a montré une sensibilité à l'antibiotique choisit. Une approche protéomique a ensuite été envisagée afin de comparer les profils protéiques de colonies *swarming* qui ont été en contact ou non avec la tobramycine. Cette analyse a permis de révéler plus d'une vingtaine de protéines qui pourraient avoir un rôle dans la résistance aux antibiotiques. De plus, le quart des protéines retrouvées sont liées à une réponse au stress oxydatif, ce qui correspond à une des hypothèses énoncée. Par ailleurs, l'autre quart des protéines séquencées ont un lien direct avec le mode d'action de la tobramycine, soit des fonctions dans la traduction. Certains des gènes codant pour les protéines séquencées ont été vus comme étant surexprimés en condition où les colonies sont en contact avec l'antibiotique. Parmi ces protéines, deux ont des fonctions dans la réponse au stress et une est liée à la traduction.

Bien que plusieurs protéines aient été vues comme étant surexprimées lorsque que *P. aeruginosa* est en motilité *swarming* en présence de tobramycine, cela ne signifie pas qu'elles soient exprimées seulement quand la bactérie adopte cette motilité sociale. La comparaison de profils protéiques de *P. aeruginosa* en nage libre qui a subi un traitement antibiotique a été le moyen utilisé pour répondre à ce questionnement. À l'exception de l'azurine, aucune protéine n'a été trouvée à la fois dans les analyses protéiques *swarming* et *swimming*, ce qui suggère que les protéines isolées lors de la première analyse sont

propres à la résistance aux antibiotiques en motilité *swarming* chez *P. aeruginosa*, supportant l'hypothèse que l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* en motilité *swarming* est due à une surexpression de protéines qui est spécifique à cette motilité.

En combinant ces observations, plusieurs mécanismes de résistance jusqu'alors insoupçonnés peuvent être imaginés et d'autres peuvent être vérifiés à l'aide d'expériences supplémentaires.

ANNEXE 1

Tableau A.1 : Description des mutants utilisés lors des tests de susceptibilité. Classification selon le mot utilisé dans le moteur de recherche de la base de données. Résistance non déterminée : mutant incapable de faire du *swarming*.

Transporteur de type ABC				
Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité	
PA14_01690	PA0138	ABC transporter permease	Résistant	
PA14_01800	PA0146	Protéine hypothétique	Résistant	
PA14_02330	PA0184	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant	
PA14_02360	PA0186	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant	
PA14_03650	PA0280	Sulfate transport protein CysA	Résistant	
PA14_03670	PA0281	Sulfate transport protein CysW	Non déterminé	
PA14_03680	PA0282	Sulfate transport protein CysT	Résistant	
PA14_03930	PA0301	Polyamine transport protein	Résistant	
PA14_03950	PA0303	Polyamine transport protein PotH	Non déterminé	
PA14_03960	PA0304	Polyamine transport protein PotI	Résistant	
PA14_04080	PA0313	ABC transporter permease	Résistant	
PA14_04090	PA0314	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant	
PA14_04220	PA0323	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant	
PA14_04230	PA0324	ABC transporter permease	Résistant	

PA14_04250	PA0326	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_07850	PA0602	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_07860	PA0603	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_07870	PA0604	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_07890	PA0605	ABC transporter permease	Résistant
PA14_07900	PA0606	ABC transporter permease	Résistant
PA14_10340	PA4143	Toxin transporter	Résistant
PA14_11310	PA4064	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_11600	PA4039	ABC transporter	Résistant
PA14_11610	PA4038	ABC transporter permease	Résistant
PA14_11620	PA4037	ABC transporter	Résistant
PA14_12940	PA3937	Taurine ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_13590	PA3890	ABC transporter permease	Résistant
PA14_13610	PA3888	ABC transporter permease	Résistant
PA14_13990	PA3865	Amino acid ABC transporter	Résistant
PA14_14100	PA3858	Amino acid-binding protein	Résistant
PA14_14380	PA3837	ABC transporter permease	Résistant
PA14_16880	PA3671	ABC transporter permease	Résistant
PA14_16890	PA3670	Auxiliary component of ABC transporter	Résistant
PA14_17610	PA3610	Polyamine ABC transporter	Résistant

PA14_17740	PA3597	Amino acid ABC transporter permease	Résistant
PA14_18600	PA3538	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_19520	PA3447	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_19570	PA3443	ABC transporter permease	Résistant
PA14_20190	PA3393	Copper ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	Résistant
PA14_20320	PA3383	Phosphonate ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_20420	PA3375	Phosphonate ABC transporter ATPase	Résistant
PA14_21150	PA3315	ABC transporter permease	Résistant
PA14_21160	PA3314	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_21930	PA3252	ABC transporter permease	Résistant
PA14_22440	PA3228	ABC transporter ATP-binding protein/permease	Résistant
PA14_22650	PA3214	ABC transporter	Résistant
PA14_22980	PA3190	Sugar ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_25020	PA3019	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_26220	PA2925	Histidine ABC transporter, inner membrane permease	Résistant
PA14_26360	PA2914	ABC transporter permease	Résistant
PA14_27150	PA2857	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_27780	PA2811	ABC transporter permease	Résistant
PA14_30570	PA2592	Periplasmic spermidine/putrescine-binding protein	Résistant

_

PA14_33760	PA2390	ABC transporter ATP-binding protein/permease	Résistant
PA14_34270	PA2350	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_34420	PA2338	Maltose/mannitol ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_34770	PA2309	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_35230	PA2269	Hypothetical protein	Résistant
PA14_37870	PA2059	Peptide ABC transporter permease	Résistant
PA14_37880	PA2058	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_39130	PA1964	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_39350	PA1946	Ribose ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_40240 (Zhang & Mah, 2008)	PA1876	ABC transporter ATP-binding protein/permease	Résistant
PA14_41130	PA1810	ABC transporter substrate-binding protein	Non déterminé
PA14_41150	PA1808	ABC transporter permease	Non déterminé
PA14_41160	PA1807	ABC transporter ATP-binding protein	Non déterminé
PA14_45110	PA1493	Sulfate-binding protein of ABC transporter	Résistant
PA14_46010	PA1425	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_46910	PA1342	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_46920	PA1341	ABC transporter permease	Résistant
PA14_47920	PA1260	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_47940	PA1258	ABC transporter permease	Résistant

PA14_48460	-	Polyamine ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_49970	PA1113	ABC transporter ATP-binding protein/permease	Résistant
PA14_53150	PA0860	ABC transporter ATP-binding protein/permease	Résistant
PA14_54970	-	ABC transporter	Non déterminé
PA14_55020	-	ABC transporter permease	Résistant
PA14_55030	-	ABC transporter permease	Résistant
PA14_57870	PA4455	ABC transporter permease	Résistant
PA14_58360	PA4497	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_58420	PA4502	Dipeptide ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_58450	PA4504	ABC transporter permease	Résistant
PA14_58470	PA4505	ABC transporter ATP-binding protein	Non déterminé
PA14_60780	PA4593	ABC transporter permease	Résistant
PA14_60800	PA4595	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_62010	PA4688	Iron ABC transporter, permease	Résistant
PA14_62280	PA4706	Hemin importer ATP-binding subunit	Résistant
PA14_62300	PA4708	Hypothetical protein	Résistant
PA14_64290	PA4860	ABC transporter permease	Résistant
PA14_64310	PA4862	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_64870	PA4910	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_64890	PA4912	Branched chain amino acid ABC transporter permease	Résistant

PA14_64900	PA4913	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_65850	PA4981	Amino acid ABC transporter permease	Non déterminé
PA14_67040	PA5075	ABC transporter permease	Résistant
PA14_67050	PA5076	ABC transporter substrate-binding protein	Non déterminé
PA14_67130	PA5082	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_67270	PA5094	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_67300	PA5096	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_67400	PA5103	ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_68060	PA5152	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_68090	PA5155	ABC transporter permease	Résistant
PA14_68890	-	Iron ABC transporter, permease	Résistant
PA14_68900	PA5217	Iron ABC transporter substrate-binding protein	Résistant
PA14_69070	PA5231	ABC transporter ATP-binding protein/permease	Résistant
PA14_69340	PA5252	ABC transporter ATP-binding protein	Résistant
PA14_70830	PA5367	Phosphate ABC transporter permease	Résistant
PA14_71000	PA5376	Lycine betaine/L-proline ABC transporter, ATP- binding subunit	Non déterminé
PA14_72630	PA5504	ABC transporter permease	Résistant

mex				
Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité	
PA14_05530	PA0425	RND multidrug efflux membrane fusion protein MexA	Résistant	
PA14_05540	PA0426	RND multidrug efflux transporter MexB	Résistant	
PA14_09520	PA4207	RND efflux transporter	Résistant	
PA14_09530	PA4206	RND efflux membrane fusion protein	Résistant	
PA14_09540	PA4205	Hypothetical protein	Résistant	
PA14_18760	PA3523	RND efflux membrane fusion protein	Résistant	
PA14_18780	PA3522	RND efflux transporter	Résistant	
PA14_32390	PA2494	RND multidrug efflux transporter MexF	Résistant	
PA14_32400	PA2493	RND multidrug efflux membrane fusion protein MexE	Résistant	
PA14_32410	PA2492	Transcriptional regulator MexT	Résistant	
PA14_38410	PA2018	Multidrug efflux protein	Résistant	
PA14_60830	PA4598	Multidrug efflux RND transporter MexD	Résistant	
PA14_60850	PA4599	Multidrug efflux RND membrane fusion protein	Résistant	

Pompes			
Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité
PA14_27420	PA2836	Secretion protein	Résistant
PA14_27440	PA2834	Transcriptional regulator	Résistant
PA14_35110	PA2278	Arsenite-antimonite efflux pump ArsB	Résistant
PA14_48240	PA1238	Outer membrane component of multidrug efflux pump	Résistant
PA14_48280	PA1237	Multidrug resistance efflux pump	Résistant

Protéines de la membrane externe

Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité
PA14_00430	PA0034	Two-component response regulator	Résistant
PA14_02250	PA0178	Two-component sensor	Résistant
PA14_05200	PA0397	Cation efflux system protein	Résistant
PA14_05880	PA0451	Membrane-bound protease	Résistant
PA14_07840	PA0601	Two-component response regulator	Résistant
PA14_09690	PA4196	Two-component response regulator	Résistant
PA14_10330	PA4144	Outer membrane protein	Non déterminé
PA14_11270	PA4067	Outer membrane protein OprG precursor	Résistant
PA14_11630	PA4036	Two-component sensor	Résistant

PA14_11680	PA4032	Two-component regulator	Résistant
PA14_12780	PA3948	Two-component response regulator	Résistant
PA14_12810	PA3947	Two-component response regulator	Résistant
PA14_12820	PA3946	Two-component sensor	Résistant
PA14_13740	PA3878	Two-component sensor NarX	Résistant
PA14_14370	PA3838	ABC-transporter ATP-binding component	Résistant
PA14_16350	PA3714	Two-component response regulator	Résistant
PA14_16500	PA3702	Two-component response regulator	Résistant
PA14_16630	PA3692	Outer membrane protein, OmpA	Résistant
PA14_17170	PA3647	Hypothetical protein	Résistant
PA14_18720	PA3526	OmpA family membrane protein	Non déterminé
PA14_18720 PA14_18910	PA3526 PA3492	<i>OmpA family membrane protein</i> Protéine hypothétique	Non déterminé Résistant
PA14_18720 PA14_18910 PA14_20780	PA3526 PA3492 PA3346	OmpA family membrane protein Protéine hypothétique Two-component response regulator	Non déterminé Résistant Résistant
PA14_18720 PA14_18910 PA14_20780 PA14_20820	PA3526 PA3492 PA3346 PA3343	OmpA family membrane protein Protéine hypothétique Two-component response regulator Two-component response regulator	Non déterminé Résistant Résistant Résistant
PA14_18720 PA14_18910 PA14_20780 PA14_20820 PA14_21700	PA3526 PA3492 PA3346 PA3343 PA3271	OmpA family membrane protein Protéine hypothétique Two-component response regulator Two-component response regulator Two-component sensor	Non déterminé Résistant Résistant Résistant Résistant
PA14_18720 PA14_18910 PA14_20780 PA14_20820 PA14_21700 PA14_22730	PA3526 PA3492 PA3346 PA3343 PA3271 PA3206	OmpA family membrane protein Protéine hypothétique Two-component response regulator Two-component response regulator Two-component sensor Two-component sensor	Non déterminé Résistant Résistant Résistant Résistant Résistant
PA14_18720 PA14_18910 PA14_20780 PA14_20820 PA14_21700 PA14_22730 PA14_22960	PA3526 PA3492 PA3346 PA3343 PA3271 PA3206 PA3191	OmpA family membrane proteinProtéine hypothétiqueTwo-component response regulatorTwo-component response regulatorTwo-component sensorTwo-component sensorTwo-component sensorTwo-component sensor	Non déterminé Résistant Résistant Résistant Résistant Résistant
PA14_18720 PA14_18910 PA14_20780 PA14_20820 PA14_21700 PA14_22730 PA14_22960 PA14_24070	PA3526 PA3492 PA3346 PA3343 PA3271 PA3206 PA3191 PA3097	OmpA family membrane proteinProtéine hypothétiqueTwo-component response regulatorTwo-component response regulatorTwo-component sensorTwo-component sensorTwo-component sensorGeneral secretion pathway protein K	Non déterminé Résistant Résistant Résistant Résistant Résistant Résistant
PA14_18720 PA14_18910 PA14_20780 PA14_20820 PA14_21700 PA14_22730 PA14_22960 PA14_24070 PA14_24340	PA3526 PA3492 PA3346 PA3343 PA3271 PA3206 PA3191 PA3097 PA3078	OmpA family membrane proteinProtéine hypothétiqueTwo-component response regulatorTwo-component response regulatorTwo-component sensorTwo-component sensorTwo-component sensorGeneral secretion pathway protein KTwo-component sensor	Non déterminé Résistant Résistant Résistant Résistant Résistant Résistant Résistant

PA14_25080	PA3014	Multifunctional fatty acid oxidation complex subunit α	Non déterminé
PA14_25480	PA2984	Competence protein	Résistant
PA14_26810	PA2882	Two-component sensor	Résistant
PA14_27800	PA2810	Two-component sensor	Résistant
PA14_27940	PA2798	Two-component response regulator	Résistant
PA14_29360	PA2687	Two-component sensor PfeS	Résistant
PA14_29740	PA2656	Two-component sensor	Résistant
PA14_30830	PA2572	Two-component response regulator	Résistant
PA14_31950	PA2524	Two-component sensor	Résistant
PA14_32110	PA2516	Toluate 1,2-dioxygenase electron transfer component	Résistant
PA14_32380	PA2495	Multidrug efflux outer membrane protein OprN	Résistant
PA14_32580	PA2479	Two-component response regulator	Résistant
PA14_36420	PA2177	Sensor/response regulator hybrid	Résistant
PA14_38900	PA1980	Two-component response regulator	Résistant
PA14_38970	PA1976	Two-component sensor	Résistant
PA14_39320	PA1948	Membrane protein component of ABC ribose transporter	Résistant
PA14_40170	PA1882	Transporter	Résistant
PA14_41260	PA1799	Two-component response regulator	Résistant
PA14_41270	PA1798	Two-component sensor	Résistant

PA14_43350	PA1636	Two-component sensor KdpD	Résistant
PA14_45590	PA1458	Two-component sensor	Résistant
PA14_45880	PA1437	Two-component response regulator	Résistant
PA14_46980	PA1336	Two-component sensor	Résistant
PA14_47390	PA1301	Transmembrane sensor	Résistant
PA14_47540	PA1288	Outer membrane protein	Résistant
PA14_49170	PA1180	Two-component sensor PhoQ	Résistant
PA14_49420	PA1158	Two-component sensor	Résistant
PA14_49440	PA1157	Two-component response regulator	Résistant
PA14_50180	PA1099	Two-component response regulator	Non déterminé
PA14_52240	PA0930	Two-component sensor	Résistant
PA14_54510 (Zhang et al., 2013)	PA0756	Two-component response regulator	Résistant
PA14_55780	PA4293	Two-component sensor	Résistant
PA14_55810	PA4296	Two-component response regulator	Résistant
PA14_56940	PA4380	Two-component sensor	Résistant
PA14_57140	PA4396	Two-component response regulator	Résistant
PA14_57170	PA4398	Two-component sensor	Résistant
PA14_58300	PA4493	Two-component response regulator	Résistant
PA14_59770	-	Two component response regulator	Non déterminé
PA14_60230	PA4545	Competence protein ComL	Résistant

PA14_60250	PA4546	Two-component sensor PilS	Résistant
PA14_62530	PA4725	Two-component sensor CbrA	Résistant
PA14_62540	PA4726	Two-component response regulator CbrB	Résistant
PA14_63160	PA4777	PmrB: two-component regulator system signal sensor kinase PmrB	Résistant
PA14_63210	PA4781	Two-component response regulator	Résistant
PA14_64050	PA4843	Two-component response regulator	Résistant
PA14_65750	PA4974	Outer membrane efflux protein	Résistant
PA14_65860	PA4982	Two-component sensor	Résistant
PA14_67680	PA5125	Two-component response regulator NtrC	Résistant
PA14_67850	PA5138	ABC-type amino acid transport protein, periplasmic component	Résistant
PA14_68250	PA5166	Two-component response regulator	Résistant
PA14_68680	PA5199	Two-component sensor EnvZ	Résistant
PA14_70750	PA5360	Two-component response regulator PhoB	Résistant
PA14_70760	PA5361	Two-component sensor PhoR	Résistant
PA14_70790	PA5364	Two-component response regulator	Résistant
PA14_70850	PA5368	Membrane protein component of ABC phosphate transporter	Non déterminé
PA14_71020	PA5377	BC-type proline/glycine betaine transport system, permease component	Résistant
PA14_71960	PA5451	Membrane subunit of A-band LPS efflux transporter	Résistant
PA14_72380	PA5483	Two-component response regulator AlgB	Résistant
------------	--------	---	-----------
PA14_72740	PA5512	Two-component sensor	Résistant
PA14_73410	PA5568	Inner membrane protein translocase component YidC	Résistant

RND

Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité
PA14_01940	PA0156	RND efflux membrane fusion protein	Résistant
PA14_01960	PA0157	RND efflux membrane fusion protein	Non déterminé
PA14_31870	PA2528	RND efflux membrane fusion protein	Résistant
PA14_45890	PA1436	RND efflux transporter	Résistant

Efflux			
Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité
PA14_05550	PA0427	Major intrinsic multiple antibiotic resistance efflux outer membrane protein OprM precursor	Résistant
PA14_10750	PA4113	Sugar efflux transporter	Résistant
PA14_16820	PA3676	Efflux transmembrane protein	Résistant
PA14_18790	PA3521	Outer membrane efflux protein	Résistant
PA14_21770	PA3265	DMT family permease	Résistant

PA14_26110	PA2933	MFS transporter	Résistant
PA14_27410	PA2837	Outer membrane protein	Résistant
PA14_27430	PA2835	Multidrug efflux MFS transporter	Résistant
PA14_31010	PA2520	Cation efflux system protein	Résistant
PA14_31030	-	Cation efflux system protein	Résistant
PA14_31040	-	Cation efflux system protein	Résistant
PA14_31900	PA2526	Efflux transporter	Résistant
PA14_34800	PA2306	Amino acid transporter LysE	Résistant
PA14_44520	PA1541	Drug efflux transporter	Résistant
PA14_46590	PA0158	AcrB/AcrD/AcrF family protein	Résistant
PA14_48280	PA1267	Multidrug resistance efflux pump	Non déterminé
PA14_48700	PA1207	Glutathione-regulated potassium-efflux system protein KefB	Résistant
PA14_56890	PA4375	Multidrug efflux protein	Résistant
PA14_65990	PA4990	SMR multidrug efflux transporter	Non déterminé
PA14_66400	PA5022	Potassium efflux protein KefA	Résistant
PA14_68120	PA5158	Outer membrane protein	Résistant
PA14_68130	PA5159	Multidrug resistance protein	Résistant
PA14_68140	PA5160	Drug efflux transporter	Résistant
PA14_69310	PA5249	LysE family efflux protein	Résistant

PA14_69890	PA5294	Multidrug efflux protein NorA	Résistant
PA14_71940	PA5450	ABC subunit of A-band LPS efflux transporter	Résistant
PA14_72800	PA5518	Potassium efflux transporter	Résistant

Спос				
Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité	
PA14_05960	PA0456	Cold-shock protein	Non déterminé	
PA14_21760	PA3266	Cold acclimation protein B	Résistant	
PA14_22050	PA3252	Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	Résistant	
PA14_23680	PA3126	Heat-shock protein IbpA	Résistant	
PA14_27480	PA2830	Heat shock protein HtpX	Résistant	
PA14_30200	PA2622	Cold-shock protein CspD	Résistant	
PA14_43850	PA1596	Heat shock protein 90	Résistant	
PA14_51840	PA0961	Cold-shock protein	Résistant	
PA14_64450	PA4873	Cold-shock protein	Résistant	
PA14_66790	PA5054	ATP-dependent protease ATP-binding subunit HslU	Résistant	

Choc

Production H ₂ S (Shatalin et al., 2011)					
Numéro PA14	NuméroProduit1PA14PAO1				
PA14_05220	PA0399	Cystathionine β -synthase	Non déterminé		
PA14_05230	PA0400	Cystathionine <i>γ</i> -lyase	Résistant		
PA14_47500	PA1292	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Résistant		
	Famille des protéines de la membrane externe OprM (Schweizer, 2003)				
Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité		
PA14_13520	PA3894	Outer membrane protein	Résistant		
PA14_20050	PA3404	Outer membrane protein	Résistant		
PA14_31920	PA2525	Outer membrane protein	Résistant		
PA14_33750	PA2891	Outer membrane protein	Résistant		
PA14_48090	PA1248	Alkaline protease secretion outer membrane protein AprF precursor	Résistant		
PA14_60770	PA4562	Outer membrane protein	Résistant		
PA14_60820	PA4597	Outer membrane protein OprJ	Résistant		

Littérature			
Numéro PA14	Numéro PAO1	Produit ¹	Sensibilité
PA14_13040 (Tavankar <i>et al.</i> , 2003)	PA3929	CioB, cyanide insensitive terminal oxidase	Résistant
PA14_27550 (Gupta <i>et al.</i> , 2013)	PA2824	Sensor/response regulator hybrid	Résistant
PA14_37730 (Zhang <i>et al.</i> , 2013)	PA2070	TonB dependent receptor	Résistant
PA14_57950 (Williamson <i>et al.</i> , 2012)	PA4463	Protéine hypothétique	Résistant
PA14_66540 (Zhang et al., 2013)	PA5033	Protéine hypothétique	Résistant

¹: Selon <u>http://www.pseudomonas.com</u> (Winsor *et al.*, 2011)

ANNEXE 2

Tableau A.2 : Programme du patron de migration pour une bandelette 13 cm pH 4-7 selon les recommandation du fabriquant (GE Healthcare).

Étapes	Voltage (V)	Temps (h:min)	kVh
1 « Step and hold »	500	1:00	0,5
2 Gradient	1000	1:00	0,8
3 Gradient	8000	2:30	11,3
4 « Step and hold »	8000	0:55	7,4
Total	-	5:25	20,0

Amorces	% GC	Séquences	Amplicon (pb)
frr sens	55,00	AGAAGGCCATCATGACCTCC	195
frr antisens	55,00	TCTGCAGGTCCTTCAACTGG	195
ndk sens	55,00	GTGATCGGCGAAATCCTGAC	176
ndk antisens	55,00	AGAACCTGGACTACAACCGG	176
nusG sens	50,00	ACGTTGTGCATGCATACTCG	172
nugG antisens	55,00	CCAGGGAAGAATTTGCGCTC	172
<i>rplE</i> sens	55,00	CGCGTTACCAAAATCACCCT	150
<i>rlpE</i> antisens	55,00	GATCTTGAAGCCTGCGATGG	150
<i>rplI</i> sens	55,00	CAAGGTGAACATCAAGGGCG	220
rpll antisens	57,89	GAACAGCTTGCCTTCGTCG	220
<i>rpsE</i> sens	55,00	CCGTATCTTCGCTTTCACCG	153
rpsE antisens	55,00	GTGCCGTTCAGATCGACTTG	153
PA14_51830 sens	50,00	CCGATGTTCAATACGTGCA	161
PA14_51830 antisens	50,00	ACGCCTTCCTCTTCCTTGAT	161
PA14_51930 sens	50,00	TGGTGGTCAATTACTGGGCT	156
PA14_51930 antisens	55,00	CATCGGCCGACTTCTTCAAC	156

Tableau A.3 Amorces ciblant les gènes utilisés pour les réactions de qRT-PCR

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
10X Taq Buffer	2,5
10 mM dNTP	0,5
Amorce sens 10 pmol/µL	1,0
Amorce antisens 10 pmol/µL	1,0
ADN génomique PA14 101.2 ng/mL	0,5
DMSO	1,25
Eau stérile	18,125
Taq DNA polymérase	0,125
Volume / réaction	25

Tableau A.4 Mélange réactionnel pour une réaction de PCR pour réaliser un gradient de température sur les paires d'amorces.

Tableau A.5 Programme de la réaction de PCR pour réaliser un gradient de température sur les paires d'amorces.

Étape	Température (°C)	Temps
1 Dénaturation	95	2 min
2 Dénaturation	95	20 s
3 Hybridation	50 à 67	40 s
4 Élongation	72	30 s
5 Élongation	72	5 min

Les étapes 2 à 4 ont été répétées 30 fois au total.

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
10X Taq Buffer	2,5
10 mM dNTP	0,5
Amorce sens 10 pmol/µL	1,0
Amorce antisens 10 pmol/µL	1,0
ARN extraits	0,5
DMSO	1,25
Eau stérile	18,125
Taq DNA polymérase	0,125
Volume / réaction	25

Tableau A.6 Mélange réactionnel pour une réaction de PCR pour contrôler l'absence d'ADN après l'extraction d'ARN.

Tableau A.7 Programme de la réaction PCR pour contrôler l'absence d'ADN après l'extraction d'ARN.

Étape	Température (°C)	Temps
1 Dénaturation	95	2 min
2 Dénaturation	95	20 s
3 Hybridation	60	40 s
4 Élongation	72	30 s
5 Élongation	72	5 min

Les étapes 2 à 4 ont été répétées 40 fois au total.

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
Eau RNA-free	5,5
Amorce sens 10 pmol/µL	0,75
Amorce antisens 10 pmol/µL	0,75
ARN extraits 10 ng/µL	5
SYBR Green	12,5
Transcriptase inverse	0,5
Volume / réaction	25

 Tableau A.8 Mélange réactionnel pour une réaction de qRT-PCR

Tableau A.9 Programme du qRT- PCR

Étape	Température (°C)	Temps
1 Hold	50	10 min
2 Hold	95	5 min
3 Cycle	95	10 s
	60	20 s
	72	20 s
4 Fusion	72 - 95	5 s entre chaque étape

Acquisition dans le vert, le cycle est répété 40 fois

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1323-1336.

Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2014) A Stereospecific Pathway Diverts beta-Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants. *Chemistry & Biology* **21**: 156-164.

Al-Majdoub ZM, Owoseni A, Gaskell SJ & Barber J (2013) Effects of gentamicin on the proteomes of aerobic and oxygen-limited Escherichia coli. *J Med Chem* **56**: 2904-2910.

Banitz T, Fetzer I, Johst K, Wick LY, Harms H & Frank K (2011) Assessing biodegradation benefits from dispersal networks. *Ecol Model* **222**: 2552-2560.

Banitz T, Johst K, Wick LY, Schamfuss S, Harms H & Frank K (2013) Highways versus pipelines: contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation. *Environ Microbiol Rep* **5**: 211-218.

Barrionuevo MR & Vullo DL (2012) Bacterial swimming, swarming and chemotactic response to heavy metal presence: which could be the influence on wastewater biotreatment efficiency? *World J Microbiol Biotechnol* **28**: 2813-2825.

Bassler BL & Losick R (2006) Bacterially speaking. Cell 125: 237-246.

Beaudoin T, Zhang L, Hinz AJ, Parr CJ & Mah TF (2012) The biofilm-specific antibiotic resistance gene ndvB is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **194**: 3128-3136.

Becker B & Cooper MA (2013) Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol* 8: 105-115.

Bethel D (1987) Advances in physical organic chemistry. Academic press inc, London, England.

Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C & Hancock RE (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* **19**: 419-426.

Briand YM (2009) *Une histoire de la résistance aux antibiotiques; à propos de six bactéries*. L'Harmattan, Paris, France.

Butler MT, Wang Q & Harshey RM (2010) Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 3776-3781.

Cardoso K, Gandra RF, Wisniewski ES, Osaku CA, Kadowaki MK, Felipach-Neto V, Haus LF & Simão RdC (2010) DnaK and GroEL are induced in response to antibiotic and heat shock in *Acinetobacter baumannii*. *J Medical Mycology* **2010**: 1061-1068.

Chakrabarty AM (1998) Nucleoside diphosphate kinase: Role in bacterial growth, virulence, cell signaling and polysaccharide synthesis. *Mol Microbiol* **28**: 875-882.

Choi DS, Kim DK, Choi SJ, Lee J, Choi JP, Rho S, Park SH, Kim YK, Hwang D & Gho YS (2011) Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from Pseudomonas aeruginosa. *Proteomics* **11**: 3424-3429.

Darnton NC, Turner L, Rojevsky S & Berg HC (2010) Dynamics of bacterial swarming. *Biophys J* 98: 2082-2090.

Davies J & Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417-433.

Davis BD (1987) Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev 51: 341-350.

Demain AL & Elander RP (1999) The β -lactam antibiotics- past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**: 5-19.

Déziel E (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in Pseudomonas aeruginosa: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005-2013.

El-Halfawy O & Valvano MA (2012) Non-genetic mechanisms communicating antibiotic resistance: Rethinking stategies for antimicrobial drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery* **7**: 923-933.

Fabrega A, Madurga S, Giralt E & Vila J (2009) Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* **2**: 40-61.

Fernandes R, Amador P & Prudêncio C (2013) β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol* **24**: 7-17.

Fernandez L & Hancock RE (2012) Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **25**: 661-681.

Fernandez L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I & Hancock RE (2010) Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in Pseudomonas aeruginosa is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 3372-3382.

Furuno S, Remer R, Chatzinotas A, Harms H & Wick LY (2012) Use of mycelia as paths for the isolation of contaminant-degrading bacteria from soil. *Microb Biotechnol* **5**: 142-148.

Furuno S, Pazolt K, Rabe C, Neu TR, Harms H & Wick LY (2010) Fungal mycelia allow chemotactic dispersal of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria in water-unsaturated systems. *Environ Microbiol* **12**: 1391-1398.

Furuno S, Foss S, Wild E, Jones KC, Semple KT, Harms H & Wick LY (2012) Mycelia promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Technol* **46**: 5463-5470.

Gaynor M & Mankin AS (2003) Macrolide antibiotics- binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem* **3**: 949-961.

Geske GD, O'Neill JC, Miller DM, Mattmann ME & Blackwell HE (2007) Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J Am Chem Soc* **129**: 13613-13625.

Gilbert M (2011) Facbio. p.^pp.

Gloag ES, Turnbull L, Huang A, *et al.* (2013) Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11541-11546.

Gooderham WJ & Hancock RE (2009) Regulation of virulence and antibiotic resistance by twocomponent regulatory systems in Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 279-294.

Greenway DL & England RR (2008) The intrinsic resistance of *Escherichia coli* to various antimicrobial agents requires ppGpp and sigma S factor. *Lett Appl Microbiol* **1999**: 323-326.

Greenwood D & Whiteley R (2002) Mode of action.

Gupta K, Marques CN, Petrova OE & Sauer K (2013) Antimicrobial tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid SagS. *J Bacteriol* **195**: 4975-4987.

Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M & Nudler E (2009) Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**: 1380-1384.

Guvener ZT, Tifrea DF & Harwood CS (2006) Two different Pseudomonas aeruginosa chemosensory signal transduction complexes localize to cell poles and form and remould in stationary phase. *Mol Microbiol* **61**: 106-118.

Han J, Sahin O, Barton YW & Zhang Q (2008) Key role of Mfd in the development of fluoroquinolone resistance in Campylobacter jejuni. *PLoS Pathog* **4**: e1000083.

Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-273.

Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriology Review* **39**: 478-503.

Hermann T (2007) Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1841-1852.

Jana S & Deb JK (2006) The molecular basis for the mode of action of β -lactam antibiotics and mechanisms of resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 140-150.

Jana S & Deb JK (2006) Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 140-150.

Johnson L, Mulcahy H, Kanevets U, Shi Y & Lewenza S (2012) Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *J Bacteriol* **194**: 813-826.

Kamatkar NG & Shrout JD (2011) Surface hardness impairment of quorum sensing and swarming for *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **6**: 1-9.

Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol 8: 634-644.

Kindrachuk KN, Fernández L, Bains M & Hancock RE (2011) Involvement of an ATP-dependent protease, PA0779/AsrA, in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**: 1874-1882.

Kohanski MA, Dwyer DJ & Collins JJ (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* **8**: 423-435.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA & Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**: 797-810.

Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C & Pechère J-C (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**: 5990-5996.

Kohlmeier S, Smits THM, Ford RM, Keel C, Harms H & Wick LY (2005) Taking the fungal highway: Mobilization of polluant-degrading bacteria by fungi. *Environ Sci Technol* **39**: 4640-4646.

Kulp A & Kuehn MJ (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**: 163-184.

Kumar A & Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* **57**: 1486-1513.

Lai S (2007) La résistance aux agents antimicrobiens des bactéries engagées dans la motilité de type swarming. Mémoire de maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada.

Lai S, Tremblay J & Deziel E (2009) Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environ Microbiol* **11**: 126-136.

Lee GH, Jeong JY, Chung JW, Nam WH, Lee SM, Pak JH, Choi KD, Song HJ, Jung HY & Kim JH (2009) The Helicobacter pylori Mfd protein is important for antibiotic resistance and DNA repair. *Diagn Microbiol Infect Dis* **65**: 454-456.

Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva JM, Wei T & Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2833-2838.

Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee D, Drenkard E, Wu G, Wei T, Villanueva JM & Ausubel FM (2013) PA14 Transposon Insertion Mutant Library. p.^pp. <u>http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi</u>. Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02114.

MacDonald IA & Kuehn MJ (2013) Stress-Induced Outer Membrane Vesicule Production by *Pseudomonas* aeruginosa. *J Bacteriol* **195**: 2971-2981.

Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS & O'Toole GA (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **2003**: 306-310.

Manning AJ & Kuehn MJ (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* **11**: 258.

Maredia R, Devineni N, Lentz P, Dallo SF, Yu J, Guentzel N, Chambers J, Arulanandam B, Haskins WE & Weitao T (2012) Vesiculation from Pseudomonas aeruginosa under SOS. *ScientificWorldJournal* **2012**: 402919.

McPhee JB, Lewenza S & Hancock RE (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regultes resistance of polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **2003**: 205-217.

McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS & Hancock RE (2006) Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg2+-induced gene regulation in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **188**: 3995-4006.

Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M & Schweizer HP (2007) Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins.pdf. *J Bacteriol* **189**: 7600-7609.

Mima T, Kohira N, Li Y, Sekiya H, Ogawa W, Kuroda T & Tsuchiya T (2009) Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **155**: 3509-3517.

Mogi T & Kita K (2009) Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci* **66**: 3821-3826.

Nabu S, Lawung R, Isarankura-Na-Ayudhya P, Roytrakul S & Prachayasittikul V (2014) Reference map and comparative proteomic analysis of Neisseria gonorrhoeae displaying high resistance against spectinomycin. *J Med Microbiol* **63**: 371-385.

Nazir R, Warmink JA, Boersma H & van Elsas JD (2010) Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbiol Ecol* **71**: 169-185.

Nguyen D, Joshi-Datar A, Lépine F, *et al.* (2011) Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **2011**: 982-986.

Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, Sanchez MB & Martinez JL (2013) The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* **4**: 1-15.

Overhage J, Bains M, Brazas MD & Hancock RE (2008) Swarming of Pseudomonas aeruginosa is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**: 2671-2679.

Partridge JD & Harshey RM (2012) Swarming: flexible roaming plans. J Bacteriol 195: 909-918.

Pion M, Bshary R, Bindschedler S, Filippidou S, Wick LY, Job D & Junier P (2013) Gains of bacterial flagellar motility in a fungal world. *Appl Environ Microbiol* **79**: 6862-6867.

Poole K (2002) Outer membranes and efflux -The path to multidrug resistance in gram negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* **3**: 77-98.

Poole K (2003 a) Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**: 12-26.

Poole K (2003 b) Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Current Opinion in Investigation Drugs* **4**: 128-139.

Poole K (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 56: 20-51.

Poole K (2012) Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **67**: 2069-2089.

Powell JK & Young KD (1991) Lysis of *Escherichia coli* by β -lactams Which Bind Penicillin-binding Protein 1a and 1b: Inhibition by Heat Shock Proteins. *J Bacteriol* **173**.

Pronovost M (2014) Site de Michel Pronovost > Cours de biologie NP1 > Cellules. Vol. 2014 p.^pp. Michel Pronovost, Collège Jean-de-Brébeuf.

Qin D & Fredrick K (2013) Analysis of polysomes from bacteria. *Methods Enzymology* 530: 159-172.

Quan S, Hiniker A, Collet JF & Bardwell JC (2013) Isolation of bacteria envelope proteins. *Methods Mol Biol* **966**: 359-366.

Savli H (2003) Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of Pseudomonas aeruginosa by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol* **52**: 403-408.

Schaible B, Taylor CT & Schaffer K (2012) Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2114-2118.

Schneider T, Muller A, Miess H & Gross H (2013) Cyclic lipopeptides as antibacterial agents - Potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. *Int J Med Microbiol* **304**: 37-43.

Schooling SR & Beveridge TJ (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**: 5945-5957.

Schweizer HP (2003) Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria-unanswered questions. *Gen Mol Res* **2**: 48-62.

Shatalin K, Shatalina E, Mironov A & Nudler E (2011) H_2S : a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* **334**: 986-990.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O & Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silverstained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**.

Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D & Daikos GL (2011) Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **37**: 187-193.

Smits THM, Wick LY, Harms H & Keel C (2003) Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. *Environ Microbiol* **5**: 85-91.

Stewart PS (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**: 107-113.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**.

Tavankar GR, Mossialos D & Williams HD (2003) Mutation or overexpression of a terminal oxidase leads to a cell division defect and multiple antibiotic sensitivity in Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* **278**: 4524-4530.

Tran TD, Kwon HY, Kim EH, Kim KW, Briles DE, Pyo S & Rhee DK (2011) Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**: 2714-2728.

Tremblay J (2011) Caractérisation de la motilité de type *swarming* chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thesis, Institut national de la recherche scientifique, INRS- IAF.

Tremblay J & Déziel E (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol* **48**: 509-515.

Tremblay J & Déziel E (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* **11**: 587.

Tremblay J, Richardson AP, Lépine F & Déziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol* **9**: 2622-2630.

Tsubery H, Ofek I, Cohen I & Fridkin M (2000) Structure-function studies of polymyxin B nanopeptides-Implication to sensitization of gram-negative bacteria. *J Med Chem* **43**: 3085-3092.

Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J & Michiels J (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* **16**: 496-506.

Vijgenboom E, Bush JE & Canters GW (1997) *In vivo* studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that azu expression in under control of RpoS and ANR. *Microbiology* **143**: 2853-2863.

Vinckx T, Wei Q, Matthijs S, Noben JP, Daniels R & Cornelis P (2011) A proteome analysis of the response of a Pseudomonas aeruginosa oxyR mutant to iron limitation. *Biometals* **24**: 523-532.

Warmink JA & van Elsas JD (2009) Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain Karsten in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2820-2830.

Warmink JA, Nazir R, Corten B & van Elsas JD (2011) Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biol Biochem* **43**: 760-765.

Wax RG, Lewis K, Salyers A & Taber H (2008) *Bacterial resistance to antimicrobials, 2nd edition*. CRC press, Floride, USA.

Wick LY, Remer R, Würz B, Reichenbach J, Braun S, Schäfer F & Harms H (2007) Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. *Environ Sci Technol* **41**: 500-505.

Williamson KS, Richards LA, Perez-Osorio AC, Pitts B, McInnerney K, Stewart PS & Franklin MJ (2012) Heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J Bacteriol* **194**: 2062-2073.

Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE & Brinkman FS (2011) Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes. *Nucleic Acids Res* **39**: D596-600.

Yim G, Wang HH & Davies J (2006) The truth about antibiotics. Int J Med Microbiol 296: 163-170.

Zeller T & Klug G (2006) Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* **93**: 259-266.

Zeng X & Lin J (2013) Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol* **4**: 128.

Zhang L & Mah TF (2008) Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* **190**: 4447-4452.

Zhang L, Fritsch M, Hammond L, Landreville R, Statculescu C, Colavita A & Mah TF (2013) Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS One* **8**.