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

Caractérisation de la régulation de la motilité bactérienne de type swarming et des différences génétiques associées aux modes de croissance en surface ou en bouillon chez *Pseudomonas* aeruginosa

Par Fabrice Jean-Pierre

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et Examinateur interne

Examinateur externe

Examinateur externe

Dr. Éric Massé

Université de Sherbrooke

INRS – Institut Armand-Frappier

Dr. Salim Timo Islam

Dr. Dao Nguyen Université McGill

Directeur de thèse

Dr. Éric Déziel INRS – Institut Armand-Frappier

©Droits réservés Fabrice Jean-Pierre, 2017

'Je ne dors pas longtemps, mais je dors vite.'

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse et mentor, Éric Déziel, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au cours des cinq dernières années. Sa vivacité d'esprit et son sens critique ont poussé ma curiosité scientifique à un degré plus avancé, chose dont je ne savais pas que j'étais capable. Ces années de formation sous ta supervision m'ont forcées à me surpasser afin que je sois prêt à continuer sur de nouvelles voies en recherche. Merci pour tes encouragements, ta bonne humeur et d'avoir cru en mes capacités.

Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Christine Groleau, ma compatriote de laboratoire qui m'a donné espoir malgré les nombreux clonages qui ne fonctionnaient jamais et m'aider à comprendre les résultats mystérieux qui ont parsemé mon doctorat. Marie, tu es une personne extraordinaire que quiconque gagne à connaître. Ces années avec toi m'ont permises d'acquérir une amitié qui durera pendant longtemps.

Je voudrais aussi remercier les professeurs Dao Nguyen, Jonathan Perreault, Claude Guertin et Philippe Constant. Au cours de ces années d'études graduées, vous m'avez aidé chacun à votre façon à garder le cap pendant mon doctorat.

Je veux remercier tous mes amis et collègues de l'IAF : Audrey-Anne pour ta joie contagieuse, Ahmad pour nos discussions enrichissantes, Arvin pour nos compétitions de *swarming* entre Burkho et Pseudo, Sarah, Florian, Cécile, Gabriel, Narin, Carlos, Servane, Snizhana, Elyna, Anissa, Justine, Soumaya, Koyomi, Ghizlane, Fadi et tous les autres que je ne nomme pas mais dont je garde de beaux souvenirs. Mes remerciements à tous mes amis proches : Julie et Minh-Tam vous m'avez aidé à votre façon à passer au travers cette longue étape de ma vie.

Je tiens à remercier celle que j'aime, Sophie. Tu m'as toujours supporté et cru en moi durant mon doctorat. Tu me donnes l'envie de toujours être au meilleur de moi-même. Merci à mes sœurs, ainsi que mes neveux et toute ma famille de votre présence, support et affection.

Ultimement et non les moindres, je remercie mes parents. Depuis tout petit, vous avez fait d'énormes sacrifices pour moi et cru en moi. Vous avez fait de moi la personne que je suis aujourd'hui et pour cela, je vous en serai éternellement reconnaissant. Je ne cesserai jamais d'apprendre de vous et vous êtes mes modèles.

Merci d'avoir tous contribué à façonner la personne que je suis aujourd'hui.

PRÉAMBULE

Cette thèse est composée de deux articles publiés durant mon doctorat ainsi que trois chapitres de résultats liés à la thématique globale d'une motilité bactérienne de groupe nommé le *swarming*, un comportement de surface et de la régulation génétique associée à cette dernière.

Les deux articles portent premièrement sur l'étude de l'auto-régulation négative non-orthodoxe d'un régulateur post-transcriptionnel nommé RsmA et deuxièmement de la caractérisation des différences de régulation des petits ARN RsmY et RsmZ chez des cellules cultivées en bouillon *versus* surface en utilisant la motilité de type *swarming* comme modèle d'étude.

Les trois chapitres subséquents consistent dans un premier lieu en une suite logique du 2^{ème} article, en des nouvelles perspectives sur le système de régulation GacS/A, ainsi que sur le rôle de la motilité de type *swarming* lors de co-cultures bactériennes.

Finalement en annexe, les résultats supplémentaires associés aux articles et chapitres présentés dans cette thèse sont exposés.

RÉSUMÉ

Les bactéries possèdent des caractéristiques qui leur permettent de survivre dans des conditions diverses. Afin de pouvoir subsister, elles ont développé des stratégies leur permettant de s'adapter efficacement et rapidement. Une bactérie qui illustre bien une telle capacité d'adaptation environnementale est Pseudomonas aeruginosa une bactérie à Gram négatif qui possède des membranes interne et externe séparées par une zone périplasmique. Cette dernière est largement répandue dans la nature et peut prospérer dans diverses conditions grâce à son large génome qui code une soixantaine de systèmes à deux composantes (S2C) nécessaires à la détection et à la réponse aux changements environnementaux. En plus de pouvoir provoquer des infections aigües, bactérie possède la capacité d'infecter chroniquement des cette individus immunocompétents ayant un système de défense anormal ou un système immunitaire affaibli. Or, ces types d'infections sont généralement associés à un mode de vie bactérien planctonique (motile) et sessile (biofilm), respectivement. Les stratégies par lesquelles cette bactérie pouvait balancer entre ces deux styles de vie sont longtemps restées incomprises. Toutefois en 2004, l'équipe de Stephen Lory (Harvard) a mis en évidence les premiers éléments d'un système de régulation permettant à P. aeruginosa d'orchestrer l'expression de gènes associés à des infections aigües et la répression de ceux liés à des infections chroniques. Cette découverte déterminante a été la première à démontrer que des S2C, notamment GacS/A, sont impliqués dans la transition entre le mode d'infection aigüe et le mode d'infection chronique.

Il a ensuite été rapporté que la protéine RsmA (un répresseur post-transcriptionnel liant l'ARN messager), sous le contrôle post-traductionnel des petits ARN (pARN) RsmY et RsmZ, serait l'élément central par lequel plusieurs S2C, responsables de la transition aigüe/chronique, convergent. Toutefois, peu d'information était disponible sur les mécanismes de contrôle génétique associés à *rsmA*, malgré son rôle prépondérant dans l'adaptation bactérienne. Ultimement, plusieurs indices suggèrent que les différences entre des conditions de vie bactérienne planctonique et à sessile, associées à une croissance en bouillon et en surface respectivement, joueraient un rôle primordial dans

cette régulation. Cependant, les différences dans l'expression génique associées à des bactéries se répliquant dans ces conditions vraisemblablement distinctes sont encore mal comprises.

Un phénomène bactérien multicellulaire nommé *swarming*, motilité sur une surface semi-solide, a été proposé comme étant un intermédiaire entre les modes de vie planctonique et sessile. Plusieurs études ont suggéré que ce type de motilité serait contrôlé de manière opposée à la formation de biofilm (mode de vie sessile) par *P. aeruginosa* et passerait par la voie de régulation Gac/Rsm pour ensuite affecter l'expression de *rsmY* et *rsmZ*.

De plus, des travaux de recherche préalables effectués au sein du laboratoire Déziel ont revélée que le gène *hptB* coderait pour une protéine impliquée dans la voie de signalisation Gac/Rsm. Ces résultats indiquent également que chez un mutant $\Delta hptB$, *P. aeruginosa* est incapable d'effectuer la motilité de type *swarming*, mais conserve sa capacité à produire un agent mouillant et possède un flagelle fonctionnel, les deux éléments connus essentiels à ce type de motilité. Aussi, des résultats préliminaires suggèrent que la régulation des pARN *rsmY* et *rsmZ* dépend des conditions expérimentales utilisées (cellules cultivées en bouillon ou sur une surface) dans la voie de signalisation impliquant la protéine HptB. Afin de mieux caractériser ce système de contrôle et les différences de régulation génétique liquide/surface, j'ai étudié l'expression de *rsmY* et *rsmZ* en comparant des cellules cultivées en condition planctonique (bouillon) entre elles-mêmes et pareillement en condition de surface (*swarming*).

Dans cette thèse, j'ai décrit un mécanisme de régulation non-orthodoxe de la protéine RsmA sur sa propre traduction. Additionnellement, par opposition à des observations qui ont été obtenues chez des bactéries cultivées en liquide, j'ai identifié que la régulation de *rsmZ* par GacA chez des cellules adoptant la motilité de type *swarming* nécessite la présence de régulateurs additionnels qui ne sont pas requis chez des cellules cultivées en bouillon. De plus, j'ai mis en évidence que la modulation de l'expression des pARN peut avoir un impact sur le phénotype *swarming*. À partir de ces résultats, j'ai pu redéfinir le mécanisme de régulation du système HptB/Gac/Rsm chez

des cellules cultivées en liquide ou en surface et comprendre leur implication dans la régulation de la motilité de type *swarming*.

TABLE DES MATIERES

| Table des matièresIX | | |
|--|----|--|
| 1 Revue de littérature | 1 | |
| 1.1 L'adaptation environnementale | 1 | |
| 1.1.1 Les systèmes à deux composantes | 1 | |
| 1.1.2 La régulation post-transcriptionnelle | 4 | |
| 1.1.2.1 Les protéines liant l'ARN | 5 | |
| 1.1.2.2 Les petits ARN | 5 | |
| 1.1.3 Les facteurs sigma | 6 | |
| 1.1.3.1 La famille σ^{70} | 6 | |
| 1.1.3.2 La famille σ ⁵⁴ | 7 | |
| 1.2 La multicellularité bactérienne | 7 | |
| 1.2.1 Le quorum sensing | 7 | |
| 1.2.2 Les biofilms | 8 | |
| 1.3 La motilité bactérienne | 9 | |
| 1.3.1 La motilité de type <i>swimming</i> | 10 | |
| 1.3.2 La motilité de type <i>twitching</i> | 11 | |
| 1.3.3 La motilité de type <i>swarming</i> | 12 | |
| 1.4 La vie en liquide <i>versus</i> surface chez les bactéries | 14 | |
| 1.5 La régulation génique de la motilité de type <i>swarming</i> | 15 | |
| 1.5.1 Serratia marcescens | 15 | |
| 1.5.1.1 Généralités | 15 | |
| 1.5.1.2 Régulation génétique | 15 | |
| 1.5.2 Proteus mirabilis | 16 | |
| 1.5.2.1 Généralités | 16 | |
| 1.5.2.2 Régulation génétique | 17 | |
| 1.5.3 Bacillus subtilis | 18 | |

| | 1. | .5.3.′ | 1 Généralités | 18 |
|-----|------------------|----------------------|--|------------|
| | 1. | .5.3.2 | 2 Régulation génétique | 18 |
| | 1.5 | .4 | Pseudomonas aeruginosa | 19 |
| | 1. | .5.4.′ | 1 Généralités | 19 |
| | 1. | .5.4.2 | 2 Régulation génétique | 21 |
| | 1. | .5.4.3 | 3 Différences bouillon <i>versus</i> surface | 24 |
| | | 1.5.4 | .4.3.1 Le système RetS/GacS/GacA/RsmYZA | 24 |
| | | 1.5.4 | .4.3.2 Différences bouillon versus surface dans l'étude du swarming | 27 |
| 2 | Pro | blém | natique | 32 |
| 3 | Нуβ | oothè | èses et objectifs | 34 |
| 3 | .1 | Нур | oothèse | 34 |
| 3 | .2 | Obje | ectif général | 34 |
| 3 | .3 | Obje | ectifs spécifiques | 35 |
| | 3.3 | .1 | Caractériser la régulation génétique de <i>rsmA</i> | 35 |
| | 3.3 bac Ga | .2 ctérie cS/A | Redéfinir la régulation des pARN RsmY et RsmZ selon les modes de v ens en bouillon ou en surface ainsi que le(s) nouveau(x) rôle(s) du syste \35 | ′ie ème |
| | 3.3 | .3 | Déterminer le rôle du <i>swarming</i> dans la vie bactérienne | 35 |
| 4 | Pu | olicat | tion #1 – Complex auto-regulation of the post-transcriptional regulator | |
| Rsi | mA ir | n Pse | eudomonas aeruginosa | 36 |
| | 4.1 | .1 | Résumé en français | 37 |
| | 4.1 | .2 | Abstract | 37 |
| | 4.1 | .3 | Introduction | 37 |
| | 4.1 | .4 | Methods | 39 |
| | 4. | .1.4.′ | 1 Strains, plasmids, and growth conditions | 39 |
| | 4 | .1.4.2 | 2 β-galactosidase assays | 41 |
| | 4. | .1.4.3 | 3 Purification of hexahistidine-tagged RsmA | 41 |

| | 4.1.4. | .4 | RNA electrophoretic mobility shift assay | . 41 |
|------|---------------------------|---------------------|--|--------------------|
| | 4.1.4. | .5 | Translational <i>rsmA'-'lacZ</i> fusion constructions | . 42 |
| | 4.1.5 4.1.5. | Res .1 | sults RsmA represses its own expression | . 43 . 43 |
| | 4.1.5. | .2 | RsmA binds to its own coding sequence | . 45 |
| | 4.1.5. | .3 | In vivo rsmA self-regulation is driven by multiple binding sites | . 49 |
| 5 | 4.1.6 4.1.7 Publica | Dis Ack ation | cussion knowledgements #2 – Broth versus surface-grown cells: Differential regulation of Rsm | . 51 . 54 YZ |
| 3110 | | | | . 55 |
| | 5.1.1 5.1.2 5.1.3 | Abs Intr | sume en trançais stract oduction | . 50 57 58 |
| | 5.1.4 | Ma | terials and methods | 60 |
| | 5.1.4. | .1 | Strains, plasmids, and growth conditions | . 60 |
| | 5.1.4. | .2 | Construction of the $\Delta h p t B$ knock-out mutant | . 62 |
| | 5.1.4. | .3 | Motility assays | . 62 |
| | 5.1.4. | .4 | RNA preparation | . 63 |
| | 5.1.4. | .5 | Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) | . 63 |
| | 5.1.4. | .6 | LC/MS rhamnolipids quantification | . 63 |
| | 5.1.5 | Re | sults | . 64 |
| | 5.1.5. | .1 | HptB-mediated swarming regulation does not implicate flagellar | |
| | malfu | Inctio | on nor a default in rhamnolipids production | . 64 |
| | 5.1.5. | .2 | Swarming motility is linked to sRNAs expression | . 66 |
| | 5.1.5. plank | .3 tonio | Regulation of <i>rsmZ</i> differs in surface-grown cells compared to their counterpart | 69 |
| | 5.1.6 | Dis | cussion | 70 |

| 5.1.7 Acknowledgments | 77 |
|---|---------|
| 5.2 Données complémentaires à l'article sur la régulation de la motilité de | type |
| <i>swarming</i> par HptB | 78 |
| 5.2.1 Mise en contexte | |
| 5.2.1.1 Méthodologie | 78 |
| 5.2.1.1.1 Souches et plasmides utilisés dans cette étude | 78 |
| 5.2.1.1.2 Synthèse des petits ARN RsmY et RsmZ et clonage dans ve pUCP26 78 | ecteur |
| 5.2.1.1.3 Tests de surexpression des petits ARN en condition de motil | ité de |
| type <i>swarming</i> | 79 |
| 5.2.1.2 Résultats | |
| 5.2.1.2.1 La surexpression des petits ARN RsmY et RsmZ affecte | |
| négativement la motilité de type <i>swarming</i> | |
| 5.2.1.3 Discussion | |
| 6 Identification de nouveaux régulateurs du petit ARN RsmZ actifs en condit | ion de |
| surface | |
| 6.1.1 Mise en contexte | |
| 6.1.2 Méthodologie | |
| 6.1.2.1 Souches bactériennes | |
| 6.1.2.2 Transcriptome en condition de motilité de type <i>swarming</i> et en liquide 88 | culture |
| 6.1.2.2.1 Extractions d'ARN et séquençage | |
| 6.1.2.3 Analyse des données | |
| 6.1.2.3.1 Assemblage des séquences brutes | |
| 6.1.2.3.2 Alignement des séquences sur le génome | |
| 6.1.2.3.3 Annotation des séquences sur le génome | |
| 6.1.2.3.4 Analyses statistiques | |

| | 6.1.2.3 | .5 Tests de motilité de type swimming et swarming | |
|----|--------------------|---|-------------|
| | 6.1.2.3 | .6 Dosage de l'activité de la β-galactosidase | |
| | 6.1.2.3 | .7 Tests de formation de biofilms | |
| | 6.1.3 Ré | sultats | |
| | 6.1.3.1 | Les gènes PA14_16280 et PA14_03110 affectent positivem | ent |
| | l'express | ion de <i>rsmZ</i> en condition de surface spécifiquement | |
| | 6.1.3.2 | Une mutation dans les gènes PA14_16280 et PA14_03110 | affecte la |
| | formatior | n de biofilms | |
| | 6.1.4 Dis | scussion | |
| 7 | Nouvelles | perspectives et fonctions du système GacS/A | 102 |
| | 7.1.1 Mis | se en contexte | 102 |
| | 7.1.2 Mé | ethodologie | |
| | 7.1.2.1 | Souches bactériennes et plasmides | 103 |
| | 7.1.2.2 | Tests de motilité | |
| | 7.1.2.3 | Tests de complémentation | |
| | 7.1.2.4 | Dosage de l'activité de la β-galactosidase | |
| | 7.1.2.5 | Construction du double mutant Δ <i>gacAgacS</i> | |
| | 7.1.3 Ré | sultats | |
| | 7.1.3.1 | Un mutant gacA ⁻ ne présente pas le même phénotype de mo | otilité de |
| | type <i>swa</i> | <i>rming</i> qu'un mutant <i>gacS</i> | |
| | 7.1.3.2 | GacS et GacA sont responsables du contrôle de l'expression | ו de RsmY |
| | et RsmZ | en condition <i>swarming</i> | 106 |
| | 7.1.3.3 | Le senseur GacS peut activer une autre cible que GacA | |
| | 7.1.4 Dis | scussion | 109 |
| 8 | Interaction | entre différentes souches dans des co-cultures en condition o | le motilité |
| de | type <i>swarmi</i> | ing | |
| | 8.1.1 Mis | se en contexte | 113 |

| 8.1.2 Mé | thodologie | 113 |
|---------------------|---|--------|
| 8.1.2.1 | Souches bactériennes et plasmides | 113 |
| 8.1.2.2 | Construction des souches fluorescentes | 114 |
| 8.1.2.3 | Tests de co-culture en condition de motilité de type swarming | 115 |
| 8.1.2.4 | Décomptes bactériens | 115 |
| 8.1.2.5 | Observation de la fluorescence | 116 |
| 8.1.3 Ré | sultats | 116 |
| 8.1.3.1 | Le défaut de motilité s <i>warming</i> du mutant Δ <i>hptB</i> ne peut être | |
| complém | enté | 116 |
| 8.1.4 Dis | scussion | 121 |
| 9 Vue d'ense | emble | 125 |
| 9.1 Conclu | sion | 125 |
| 9.2 Difficul | tés inhérentes à cette étude et perspectives | 131 |
| 10 Bibliograph | nie | 139 |
| 11 Annexe | | 156 |
| 11.1 ANNE> | XE A: Matériel supplémentaire de l'article #1 – Complex auto-regu | lation |
| of the post-tra | anscriptional regulator RsmA in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 156 |
| 11.1.1 Su | pplemental tables | 156 |
| 11.1.2 Su | pplemental figures | 158 |
| 11.2 ANNE> | XE B: Matériel supplémentaire de l'article #2 – Broth versus surfac | e- |
| grown cells: [| Differential regulation of RsmYZ small RNAs in Pseudomonas | |
| <i>aeruginosa</i> b | y the Gac/HptB system | 161 |
| 11.2.1 Su | pporting experimental procedures | 161 |
| 11.2.1.1 | Congo Red assay | 161 |
| 11.2.1.2 | eta-galactosidase assays | 161 |
| 11.2.1.3 | Static biofilm formation | 162 |
| 11.2.1.4 | Creation of a <i>∆hptBgacA</i> mutant by lambda-red recombinase | 162 |

| 11.2.2 Supporting tables163 |
|--|
| 11.2.3 Supporting figures165 |
| 11.3 ANNEXE C : Données complémentaires à l'article sur la régulation de la |
| motilité de type <i>swarming</i> par HptB172 |
| 11.4 ANNEXE D : Matériel supplémentaire du Chapitre 6 - Identification de |
| nouveaux régulateurs du petit ARN RsmZ actifs en condition de surface 173 |
| 11.4.1 Phénotypes swarming de différents mutants du système HptB/GacSA 173 |
| 11.4.2 Résultats motilité de type <i>swarming</i> , activité flagellaire et transcriptionnelle <i>rsmY/Z-lacZ</i> des souches testées |
| 11.4.3 Analyses transcriptomiques178 |
| 11.5 ANNEXE E : Matériel supplémentaire du Chapitre 7 - Nouvelles perspectives et |
| fonctions du système GacS/A |
| 11.6 ANNEXE F : Matériel supplémentaire du Chapitre 8 - Interaction entre |
| différentes souches dans des co-cultures en condition de motilité de type <i>swarming</i> 220 |
| 11.7 ANNEXE G : Communications scientifiques |
| 11.7.1 Communications orales |
| 11.7.2 Communications par affiches221 |

LISTE DES FIGURES

| Figure 1.1 mecanisme de ionclionnement des 520 chez les bacteries. | 2 |
|---|--|
| Figure 1.2 Organisation des domaines senseurs des systèmes à deux composantes. | 3 |
| Figure 1.3 Relation entre le nombre de S2C et la taille des génomes bactérien | 4 |
| Figure 1.4 Schématisation de différents types de motilités bactériennes | . 10 |
| Figure 1.5 La motilité de type swimming chez Pseudomonas aeruginosa | . 11 |
| Figure 1.6 Motilité de type twitching de la bactérie Pseudomonas aeruginosa | . 12 |
| Figure 1.7 La motilité de type <i>swarming</i> chez différentes espèces bactériennes | . 13 |
| Figure 1.8 Voie de synthèse des rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i> | . 21 |
| Figure 1.9 Le système de régulation GacS/GacA/RsmYZA. | . 27 |
| Figure 1.10 Modèle de la dynamique transcriptomique d'une colonie de <i>P. aeruginos</i> adoptant une motilité de type <i>swarming</i> | a . 28 |
| Figure 1.11 Régulation de l'expression de $rsmY$ et $rsmZ$ du mutant $\Delta hptB$ versus WT | .31 |
| Figure 2.1 Modèle proposé de la régulation de la motilité de type <i>swarming</i> chez <i>P. aeruginosa</i> . | |
| • | . 33 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA'-'lacZ</i> reporter in different backgrounds | . 33 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA'-'lacZ</i> reporter in different backgrounds Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA | . 33 . 44 . 46 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA'-'lacZ</i> reporter in different backgrounds Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.3 -40 to +38 <i>rsmA</i> transcript secondary RNA structure | . 33 . 44 . 46 . 47 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA'-'lacZ</i> reporter in different backgrounds Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.3 -40 to +38 <i>rsmA</i> transcript secondary RNA structure Figure 4.4 RNA mobility shift assay with purified RsmA | . 33 . 44 . 46 . 47 . 48 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA'-'lacZ</i> reporter in different backgrounds Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.3 -40 to +38 <i>rsmA</i> transcript secondary RNA structure Figure 4.4 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.5 Time-course expression of <i>rsmA</i> determined by using a translational <i>rsmA</i> '<i>lacZ</i> reporter | . 33 . 44 . 46 . 47 . 48 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA</i>'-'<i>lacZ</i> reporter in different backgrounds Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.3 -40 to +38 <i>rsmA</i> transcript secondary RNA structure Figure 4.4 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.5 Time-course expression of <i>rsmA</i> determined by using a translational <i>rsmA</i> '<i>lacZ</i> reporter Figure 5.1 A mutation in the <i>hptB</i> gene affects swarming motility. | . 33 . 44 . 46 . 47 . 48 . 48 . 50 . 66 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA</i>'-'<i>lacZ</i> reporter in different backgrounds Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.3 -40 to +38 <i>rsmA</i> transcript secondary RNA structure Figure 4.4 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.5 Time-course expression of <i>rsmA</i> determined by using a translational <i>rsmA</i> '<i>lacZ</i> reporter Figure 5.1 A mutation in the <i>hptB</i> gene affects swarming motility. Figure 5.2 Swarming motility is linked to sRNA expression. | . 33 . 44 . 46 . 47 . 48 . 47 . 50 . 66 |
| Figure 4.1 Expression of <i>rsmA</i> '-' <i>lacZ</i> reporter in different backgrounds Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.3 -40 to +38 <i>rsmA</i> transcript secondary RNA structure Figure 4.4 RNA mobility shift assay with purified RsmA Figure 4.5 Time-course expression of <i>rsmA</i> determined by using a translational <i>rsmA</i> ' <i>lacZ</i> reporter Figure 5.1 A mutation in the <i>hptB</i> gene affects swarming motility Figure 5.2 Swarming motility is linked to sRNA expression Figure 5.3 Swarming deficiency of the $\Delta hptB$ mutant is due to sRNA overexpression. | . 33 . 44 . 46 . 47 . 48 . 47 . 50 . 66 . 68 . 69 |

| Figure 5.5 Model for broth-surface differential sRNA regulation7 | 77 |
|---|----|
| Figure 5.6 Surexpression des pARN RsmY et RsmZ en condition de motilité de type <i>swarming</i> | 31 |
| Figure 6.1 Activité transcriptionnelle relative <i>rsmY-lacZ</i> et <i>rsmZ-lacZ</i> des souches d'intérêt cultivées en condition de motilité de type <i>swarming</i> | 94 |
| Figure 6.2 Activité transcriptionnelle <i>rsmY-lacZ</i> et <i>rsmZ-lacZ</i> des souches d'intérêt cultivées en condition de bouillon | 94 |
| Figure 6.3 Cinétique de formation de biofilms sur 48 heures. | 95 |
| Figure 6.4 Cinétique de formation de biofilms du mutant PA14_16280 ⁻ sur 96 heures. S | 96 |
| Figure 7.1 Tests phénotypiques et génotypiques associés au mutant <i>gacS</i> 10 |)7 |
| Figure 7.2 Tests et analyses de la motilité de type <i>swarming</i> d'un double mutant <i>gacAgacS</i> 10 | 28 |
| Figure 8.1 Tests de co-cultures de différentes souches en fluorescence11 | 18 |
| Figure 8.2 Tests de co-cultures entre différentes souches11 | 19 |
| Figure 8.3 Décompte en UFC de cultures bactériennes en condition <i>swarming</i> 12 | 20 |
| Figure 9.1 Régulation globale du système HptB/Gac/Rsm chez <i>P. aeruginosa</i> cultivée en bouillon ou en surface | 29 |
| Figure 11.1 Construction of translation <i>rsmA'-'lacZ</i> reporters with various points mutations in regions implicated in RsmA- <i>rsmA</i> interaction | 58 |
| Figure 11.2 Determination of RsmA-RNA complex affinity for M4 and M5 rsmA fragments | 58 |
| Figure 11.3 RNA mobility shift assay with purified RsmA15 | 59 |
| Figure 11.4 Time-course of <i>rsmA'-'lacZ</i> translation with a GGA \rightarrow GAA mutation in the Shine-Dalgarno in a $\Delta rsmA$ background | 30 |
| Figure 11.5 Growth curve of the PA14 and $\Delta hptB$ strain in M9DCAA at 34°C | 35 |

| Figure 11.6 Endpoint pictures of the $\Delta rsmY/Z$ mutants time-lapse analysis at different |
|---|
| time points |
| Figure 11.7 Exopolysaccharide fixation determined by Congo Red assay |
| Figure 11.8 Biofilm formation assay of the PA14 and $\Delta hptB$ strains |
| Figure 11.9 Various swarming phenotypes |
| Figure 11.10 Swarming phenotypes of the PA14, <i>mvaT</i> - and <i>mvaU</i> - strains |
| Figure 11.11 Time-course of <i>rsmY-lacZ</i> and <i>rsmZ-lacZ</i> in various genetic backgrounds grown in M9DCAA broth over 8 hours |
| Figure 11.12 Time-course of <i>rsmY-lacZ</i> and <i>rsmZ-lacZ</i> in various genetic backgrounds grown as swarming colonies on M9DCAA |
| Figure 11.13 qRT-PCR on the Δ <i>bswR</i> mutant grown in M9DCAA broth and swarming conditions |
| Figure 11.14 Test de production de pyocyanine dans le milieu King A 172 |
| Figure 11.15 Phénotypes de différents mutants du système HptB/GacSA 174 |
| Figure 11.16 Analyses de recouvrement de surface des souches d'intérêt en condition de motilité de type <i>swarming</i> |
| Figure 11.17 Activité flagellaire des souches d'intérêt175 |
| Figure 11.18 Activité transcriptionnelle relative <i>rsmY-lacZ</i> et <i>rsmZ-lacZ</i> des mutants d'intérêt en condition de motilité de type <i>swarming</i> 176 |
| Figure 11.19 Effet de l'abolition du pARN PhrS sur la motilité de type <i>swarming</i> 177 |
| Figure 11.20 Courbe de croissance de différents mutants d'intérêt dans le milieu M9DCAA |
| Figure 11.21 Phénotypes bactériens en condition de mono et co-culture en condition <i>swarming</i> 220 |

LISTE DES TABLEAUX

| Table 4.1 Strains/Plasmids used in this study | 40 |
|---|---------|
| Table 5.1 Strains/Plasmids used in this study 6 | 61 |
| Table 5.2 Souches/Plasmides utilisés dans cette étude | 79 |
| Table 5.3 Amorces utilisées dans cette étude | 79 |
| Table 6.1 Souches utilisées dans cette étude 8 | 87 |
| Table 6.2 Transcription des gènes étant affectés spécifiquement en condition de surface chez le double mutant $\Delta hptBgacA$ comparativement à la souche sauvage | 92 |
| Table 7.1 Souches et plasmides utilisés dans cette étude. 10 | 03 |
| Table 7.2 Amorces utilisées pour cette étude. 10 | 05 |
| Table 8.1 Souches et plasmides utilisés dans cette étude. 1 ² | 14 |
| Table 11.1 Primers used in this study1 | 56 |
| Table 11.2 Primers used in this study | 63 |
| Table 11.3 Strains used in this study 16 | 64 |
| Table 11.4 Gènes affectés spécifiquement en surface chez le double mutant hptBgacAVS WT | 4 78 |
| Table 11.5 Gènes affectés en bouillon seulement chez le double mutant hptBgacA VS WT | 05 |
| Table 11.6 Gènes affectés en surface et bouillon chez le double mutant hptBgacA VS WT2 ² | 13 |

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

| AHL | Acyl Homosérine Lactone |
|--------------------|---|
| ANOVA | Analysis of variance |
| ARNas | ARN antisens |
| ARNnc | ARN non-codant |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BS1 | Binding site #1 |
| BS2 | Binding site #2 |
| Cb | Carbénicilline |
| Cmf | Colony migration factor |
| Ct | Threshold cycle |
| DO | Densité optique |
| ECF | Facteur sigma à fonction extracytoplasmique |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay |
| EPS | Extracellular Polymeric Substances |
| GFP | Green fluorescent protein |
| Gm | Gentamicine |
| HAA | Acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoique |
| HHQ-d ₄ | 3-hydroxy-2-heptylquinoline-tétradeutéré |
| HPLC | High-performance liquid chromatography |
| IPTG | Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside |
| Km | Kanamycine |
| LB | Lysis broth |
| mKO1 | Monomeric Kusabira-Orange 1 |
| ns | Non-significatif |
| OD | Optical density |
| ONPG | o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside |
| pARN | Petit ARN |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| QS | Quorum sensing |

| RBS | Ribosome Binding Site |
|----------|---|
| RL | Rhamnolipides |
| RNAseq | RNA sequencing |
| S2C | Système à deux composantes |
| SCM | Site de clonage multiple |
| SCV | Small Colony Variant |
| SDS-PAGE | Sodium docecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis |
| sRNA | Small RNA |
| SST3 | Système de Sécrétion de Type 3 |
| SST6 | Système de Sécrétion de Type 6 |
| TBE | Tris Borate EDTA |
| Тс | Tétracycline |
| TCS | Two-component system |
| TSB | Tryptic Soy Broth |
| Umo | Upregulation of the master flagellar operon flhDC |
| UTR | Untranslated region |
| WT | Wild type |
| σ | Facteur sigma |

1 REVUE DE LITTERATURE

1.1 L'adaptation environnementale

1.1.1 Les systèmes à deux composantes

Afin de survivre, les bactéries doivent détecter rapidement les changements environnementaux et réagir face à ceux-ci. Par conséquent, elles ont développé des outils leur permettant de s'adapter efficacement. Cette adaptation repose en grande partie sur la présence de systèmes à deux composantes (S2C) qui, lorsqu'ils sont activés par un signal environnemental, induisent une réponse spécifique à ce dernier. Les S2C sont importants pour l'expression d'une multitude de réponses, allant de la régulation du métabolisme du carbone ou de l'azote, à des comportements bactériens plus complexes tels que la formation de spores et biofilms (Stock *et al.*, 2000).

Les S2C sont généralement constitués d'un senseur histidine kinase et d'un régulateur de réponse (Figure 1.1). Ils sont retrouvés dans les trois domaines de la vie, mais en plus grande abondance chez les procaryotes et plus spécifiquement chez les bactéries à Gram négatif dont le périplasme est délimité par une membrane externe, une mince couche de peptidoglycan et une membrane interne, tandis que les bactéries à Gram positif ne possèdent pas de membrane externe, mais ont plutôt une épaisse paroi cellulaire de peptidoglycan. Typiquement, l'activation de S2C nécessite la présence d'un facteur environnemental (source de carbone, présence d'éléments particuliers) qui, lorsqu'il se retrouve lié à son récepteur membranaire associé, provoque des changements structuraux de ce dernier résultant en son autophosphorylation. Suite à cela, le transfert du groupement phosphate vers un régulateur de réponse associé, permet son activation (Valverde et al., 2008, Wuichet et al., 2010). Cela a l'effet de déclencher une cascade de régulation intracellulaire entraînant des variations dans le niveau d'expression de certains gènes qui vont permettre à la bactérie de mieux s'adapter à la présence de ce signal. De plus, le ratio de l'activité kinase:phosphatase du senseur est responsable de la modulation de la réponse au signal (Capra et al., 2012).

1



Figure 1.1 Mécanisme de fonctionnement des S2C chez les bactéries.

Lorsqu'en présence d'un signal environnemental, différents types de senseurs membranaires peuvent détecter la présence de ce dernier et déclencher une cascade de phosphotransfert qui implique l'autophosphorylation du domaine DHp (*dimerization and histidine phosphotransferase*) du senseur par l'utilisation d'ATP et le transfert du groupement phosphate vers son domaine catalytique (CA, *catalytic and ATPase*). Les senseurs de type hybride nécessitent la présence d'un domaine supplémentaire (RD, *receiver domain*) et d'un module de transfert nommé *histidine phosphotransfert* (Hpt) qui permet le relais entre le RD du senseur au RD du régulateur de réponse (*response regulator*). Figure tirée de (Capra *et al.*, 2012).

Il existe trois types de senseurs histidine kinase : (i) senseur classique, (ii) nonorthodoxe et (iii) hybride (H. Mikkelsen *et al.*, 2011b). Les deux derniers nécessitent la présence d'un domaine receveur additionnel qui est fusionné à la portion C-terminale (cytoplasmique) du domaine transmetteur. Afin d'assurer le transfert du groupement phosphate au régulateur de réponse, un module intermédiaire nommé *histidine phosphotransfer* (*hpt*) est requis. Chez les senseurs de type non-orthodoxe, ce module fait partie intégrante de la protéine, tandis que pour les senseurs hybrides une protéine supplémentaire Hpt est nécessaire pour relayer le signal au régulateur de réponse (Gao *et al.*, 2009, H. Mikkelsen *et al.*, 2011b). Les senseurs hybrides et non-orthodoxes permettraient donc, contrairement aux senseurs classiques, d'ajouter un niveau supplémentaire de régulation cellulaire (Rodrigue *et al.*, 2000). De plus, près de 25% des senseurs histidine kinases font partie de la classe des senseurs hybrides, ce qui suggère que le phénomène de phosphorelais est un évènement commun chez les bactéries (Cock *et al.*, 2007).



Figure 1.2 Organisation des domaines senseurs des systèmes à deux composantes.

Trois catégories de S2C sont ici schématisées : Classique (*classical*), Hybride (*hybrid*) et non-orthodoxe (*unorthodox*). H = Résidu Histidine conservé. D = Résidu aspartate conservé. P = Groupement phosphate. Schéma tiré de (H. Mikkelsen *et al.*, 2011b).

Les S2C forment une famille de gènes parmi les plus communes chez les bactéries. Leur présence suit généralement une corrélation correspondant approximativement à la racine carrée de la taille du génome bactérien (Figure 1.2) (Galperin, 2005). Soulignons que le nombre de gènes associés aux S2C semble être corrélé avec la capacité des bactéries à vivre dans certaines niches écologiques, c'està-dire, plus il y a de ces systèmes, plus la bactérie peut coloniser divers environnements et inversement (Capra *et al.*, 2012, Galperin, 2005).



Figure 1.3 Relation entre le nombre de S2C et la taille des génomes bactérien. La comparaison de plus de 500 génomes bactériens a révélé que la présence des S2C varie en fonction de la taille des chromosomes. Figure tirée de (Capra *et al.*, 2012).

1.1.2 La régulation post-transcriptionnelle

Outre les S2C, la régulation post-transcriptionnelle joue aussi un rôle important dans la coordination de l'expression des gènes ainsi que dans l'adaptation de la bactérie à différents stimuli environnementaux. Il existe deux moyens principaux par lesquels les bactéries peuvent effectuer un tel type de régulation: (i) l'utilisation de protéines capables de lier un ARNm-cible ou (ii) l'utilisation d'ARN non-codants (ARNnc) (plus spécifiquement les pARN) capables de s'hybrider à des ARN messagers (ARNm) ou moduler l'activité de certaines protéines (Gottesman *et al.*, 2011). En effet, la régulation post-transcriptionnelle permet aux bactéries de ne pas seulement réguler l'abondance d'une protéine par la transcription mais favorise aussi une meilleure capacité à rapidement moduler de l'expression de certains gènes leur conférant ainsi un avantage dans certaines conditions environnementales, tels que dans le cas d'un stress nutritionnel par exemple (Van Assche *et al.*, 2015).

Revue de littérature

1.1.2.1 Les protéines liant l'ARN

Les protéines liant l'ARN sont impliquées dans de nombreux évènements de régulation post-transcriptionnels chez les bactéries et peuvent être classées selon quatre modes d'action soit : (i) en protégeant ou facilitant des ARNm et des pARN de la dégradation par des RNAses en bloquant/exposant les sites de reconnaissance de ces dernières ou en altérant leur structure secondaire (Barria et al., 2013, Moll et al., 2003), (ii) en modulant l'accessibilité au site d'attachement du ribosome (RBS) par un changement conformationel de la structure secondaire de l'ARNm ou en compétitionnant avec le ribosome pour le RBS (C. S. Baker et al., 2007, Dubey et al., 2005), (iii) en recrutant soit une protéine ou un pARN au niveau de l'ARNm, ce qui affecte l'efficacité de la traduction ou la stabilité de la molécule d'ARN (De Lay et al., 2013) et (iv) en alterant la formation de structures de terminaison (rho-dépendante et indépendante)/antiterminaison de la transcription (Santangelo et al., 2011). Ainsi, les protéines liant l'ARN peuvent avoir un impact global sur la régulation génétique des bactéries au niveau post-transcriptionnel (Van Assche et al., 2015).

1.1.2.2 Les petits ARN

Les pARN font partie de la famille des ARNnc et permettent la régulation de l'expression génique de manière rapide et efficace chez les bactéries (Storz *et al.*, 2011). Les pARN sont divisés en deux catégories : *cis*-pARN (ARNas) et *trans*-pARN (Gottesman *et al.*, 2011). Ils ont une longueur variant généralement de 50 à 500 nucléotides et jouent un rôle majeur dans la régulation post-transcriptionnelle (Gottesman, 2005, Huttenhofer *et al.*, 2006, Livny *et al.*, 2006, Majdalani *et al.*, 2005). Les *cis*-pARN sont transcrits à partir du brin opposé à leur ARN-cible avec lequel ils partagent une grande zone de complémentarité et peuvent ainsi affecter leur expression (Waters *et al.*, 2009). Contrairement aux *cis*-pARN, les *trans*-pARN sont exprimés à partir d'une région distale de leur cible et s'hybrident de manière partielle à ces derniers (Waters *et al.*, 2009). Ici, nous discuterons exclusivement des *trans*-pARN. Ces pARN peuvent exercer leur mécanisme de régulation de plusieurs manières dont majoritairement en : (i) en s'hybridant à un ARNm ce qui va moduler la capacité du ribosome à se lier à son site d'attachement et affecter la traduction, (ii) en altérant la stabilité de l'ARNm-cible par le

changement de structures présentes en 5'UTR et (iii) en modulant l'activité régulatrice de certaines protéines par titration ou modification de leur activité enzymatique (Storz *et al.*, 2011, Valverde *et al.*, 2008, Waters *et al.*, 2009). Le mécanisme d'action des pARN implique (de manière importante, mais non-exclusive), la présence de la protéine liant l'ARN : Hfq (De Lay *et al.*, 2013). Cette protéine est impliquée dans divers processus cellulaires dont le contrôle de la stabilité des pARN et elle facilite l'hybridation de ces derniers à leur cible (De Lay *et al.*, 2013). Contrairement à la régulation génique basée sur la présence de protéines régulatrices, les pARN ont l'avantage de permettre un contrôle rapide de l'utilisation des ressources génétiques présentes chez les bactéries ainsi que de leur conférer une meilleure capacité d'adaptation environnementale (Storz *et al.*, 2011).

1.1.3 Les facteurs sigma

Les facteurs sigma constituent une sous-unité dissociable de l'ARN polymérase des procaryotes et favorisent l'initiation de la transcription par la reconnaissance de séquences promotrices spécifiques ainsi que la séparation des brins d'ADN complémentaires (Borukhov *et al.*, 2003). Ces molécules ont été identifiées comme étant essentielles à l'expression des gènes bactériens et sont subdivisées en deux familles : σ^{70} et σ^{54} (Zhang *et al.*, 2015).

1.1.3.1 La famille σ^{70}

La famille σ^{70} est la plus courante et est subdivisée en quatre groupes (Feklistov *et al.*, 2014, Paget, 2015). Le Groupe 1 représente la catégorie de facteurs sigma dit «de maintenance» (ou *housekeeping*) possédant un rôle général dans la transcription globale d'une grande proportion de gènes bactériens durant la phase de croissance active (Paget, 2015). Le Groupe 2 inclut les facteurs sigma non-essentiels et impliqués dans l'adaptation à différents stress, tels que la limitation en nutriments, et dans la modulation de l'expression des gènes associés à l'entrée en phase stationnaire de croissance bactérienne (Paget, 2015). Les facteurs sigma du Groupe 3 sont nécessaires dans la régulation des gènes associés à la synthèse flagellaire, la sporulation et stress généraux tels que le choc osmotique ou le manque d'ATP cellulaire (Paget, 2015, Paget *et al.*,

2003). Finalement, le groupe 4 est le plus abondant et diversifié de la famille σ^{70} et a été nommé : facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF)(Feklistov *et al.*, 2014). Ces facteurs sont généralement responsables de la détection et réponse à des signaux provenant de l'extérieur de la cellule, tel que le transport du fer. Les gènes codant pour les ECF sont souvent retrouvés proche des gènes qu'ils régulent sur le génome (Paget, 2015). Les facteurs sigma faisant parti des groupes 2 à 4 possèdent des propriétés biochimiques et biophysiques différentes des facteurs sigma du Groupe 1 ce qui confère ainsi une grande capacité aux bactéries à activer des gènes dans des conditions spécifiques (Feklistov *et al.*, 2014).

1.1.3.2 La famille σ^{54}

Contrairement aux facteurs σ^{70} , la famille σ^{54} (ou σ^{N}) reconnait des séquences promotrices d'ADN différentes et peut avoir recours à des protéines d'activation qui se lient en amont de la séquence promotrice du gène à être transcrit (Zhang *et al.*, 2015). Ce processus implique aussi l'utilisation d'énergie ATP-dépendante afin de pouvoir créer un complexe d'initiation de la transcription entre le facteur σ^{54} et l'ARN polymérase (Zhang *et al.*, 2015). Les gènes sous le contrôle de σ^{54} sont régulés de manière très spécifique dans certaines conditions de stress ou lorsqu'une source de carbone ou d'azote spécifique est présente dans l'environnement de la bactérie (Bush *et al.*, 2012). De plus, chez certaines bactéries, σ^{54} est connu comme étant impliqué dans la virulence de ces dernières (Kazmierczak *et al.*, 2005).

1.2 La multicellularité bactérienne

1.2.1 Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS), est un mécanisme d'acquisition d'information sur la densité cellulaire permettant aux bactéries de coordonner et moduler l'expression de certains gènes afin de maximiser des comportements bénéfiques au groupe (Fuqua *et al.*, 1994, Rutherford *et al.*, 2012). Le QS a initialement été défini chez la bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri* (Ruby, 1996). Chez cette dernière, la communication intercellulaire est responsable de la production de lumière et de nombreux autres phénotypes (Antunes *et al.*, 2007, Nealson *et al.*, 1970). Le QS repose sur la production

Revue de littérature

par une synthase de molécules de signalisation qui diffusent dans l'environnement et quand elles se retrouvent liées à leur récepteur associé, elles agissent comme des médiateurs de la communication entre bactéries. Ces molécules extracellulaires sont produites à de faibles niveaux et leur concentration dans l'environnement augmente avec la densité cellulaire. Lorsque la concentration du message chimique atteint un niveau critique (quorum), ce dernier peut lier et activer certains régulateurs transcriptionnels et provoquer des altérations dans l'expression génique de la bactérie en activant ou réprimant la transcription de certains gènes (Antunes *et al.*, 2010, Fuqua *et al.*, 1994). Pour les bactéries à Gram positif, la molécule servant de messager chimique est généralement un oligopeptide sous le contrôle de S2C (Dunny *et al.*, 1997). Toutefois, chez les bactéries à Gram négatif, la communication intercellulaire repose souvent sur la présence d'un système de type LuxI/LuxR permettant la production de *N*-acylhomosérine lactones (AHL) (Antunes *et al.*, 2010).

Le QS est un mécanisme régulant plusieurs comportements bactériens tels que la sporulation, la production de facteurs de virulence, la formation de biofilms et la motilité (Rutherford *et al.*, 2012). Il est en effet remarquable de mettre en évidence que le QS contrôle plusieurs comportements bactériens de groupe ce qui a grandement modifié le dogme initial décrivant les bactéries comme des microorganismes agissant de manière individuelle.

1.2.2 Les biofilms

Un biofilm est un mode de vie multicellulaire où une communauté de bactéries adhère à une surface (biotique ou abiotique) et y persiste tout en possédant une capacité accrue à résister à des stress environnementaux (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Il s'agit du mode de vie bactérien le plus répandu (Rutherford *et al.*, 2012). Un biofilm est organisé de façon structurée et consiste en un regroupement de cellules bactériennes sessiles (non-motiles) entourées d'une matrice d'exopolysaccharides, produite par ces dernières, de protéines et d'ADN extracellulaire (Costerton *et al.*, 1999, Flemming *et al.*, 2010). La formation de biofilms joue un rôle important dans plusieurs types d'infections qui demeurent difficilement traitables (Donlan *et al.*, 2002, Parsek *et al.*, 2003). Ce mode de vie sessile, contrairement à des cellules planctoniques (vivant dans un milieu liquide)

8

retrouvées dans un contexte d'infection aigüe, permet une meilleure adaptation à des situations de stress nutritif, aux biocides et de persistence à la réaction immunitaire (Chambers *et al.*, 2013).

1.3 La motilité bactérienne

Les bactéries sont capables de se déplacer et de coloniser de nouveaux environnements afin de survivre. Étant donné leur incroyable capacité à s'adapter à de nouvelles niches écologiques, les bactéries peuvent ainsi conquérir une vaste gamme d'environnements abiotiques ou biotiques en utilisant différents modes de déplacements. Henrichsen en 1972 a caractérisé ces différents modes de motilité existant chez les bactéries en étudiant une panoplie de ces dernières (Henrichsen, 1972). Parmi les types de motilités qu'il a identifiés, il a défini les suivants : *swimming, twitching, swarming, gliding, sliding* et le *darting*. Ici, nous décrirons sommairement les types de motilités étant nécessaires à la compréhension de notre étude (Figure 1.4).



Figure 1.4 Schématisation de différents types de motilités bactériennes.

(A) La motilité de type *swarming* consiste en un déplacement de groupe sur une surface. La présence d'un appareil locomoteur nommé le flagelle est nécessaire pour la propulsion cellulaire. (B) La motilité de type *swimming* est un comportement individuel dans un environnement aqueux qui implique l'utilisation du flagelle. (C) La motilité de type *twitching* consiste en un déplacement de surface dont le mode de fonctionnement implique l'extension de pili ainsi que de la rétraction de ce dernier afin de pouvoir coloniser un environnement. Image tirée de (Kearns, 2010).

1.3.1 La motilité de type swimming

La motilité de type *swimming* est un mode de déplacement désorganisé de cellules bactériennes individuelles dans un environnement liquide (bouillon) ou de faible viscosité (jusqu'à 0,3% d'agar) (Harshey, 2003, Henrichsen, 1972) (Figure 1.5). Ce comportement bactérien nécessite la présence d'un appendice locomoteur nommé flagelle composé d'un filament, d'un crochet et d'un corps basal (moteur et stator), le tout ancré à la cellule (Thormann *et al.*, 2010). Grâce à l'énergie proton-motrice, le moteur situé à la base du flagelle peut générer une force de propulsion permettant à la cellule de se déplacer (Harshey, 2003). La direction du mouvement *swimming* est contrôlée par le

Revue de littérature

chimiotactisme qui fait en sorte que les cellules bactériennes peuvent réguler le sens de la rotation de leur flagelle afin de se diriger vers une source attractive ou s'éloigner d'une source répulsive (Partridge *et al.*, 2013). Lors de la motilité de type *swimming*, les cellules peuvent adopter deux phases de déplacement distincts soient (i) un mouvement de « run » pendant lequel les flagelles s'assemblent et tournent de manière organisée ce qui génère un déplacement ordonné ou (ii) un mouvement de type « tumble » où les flagelles changent leur sens de rotation favorisant ainsi un déplacement désordonné (Kearns, 2010)



Figure 1.5 La motilité de type swimming chez Pseudomonas aeruginosa.

À gauche, exemple de déplacement de la souche sauvage *P. aeruginosa* inoculée dans un environnement aqueux comparativement à un mutant dans la synthèse flagellaire (à droite). Images par Fabrice Jean-Pierre du Laboratoire Déziel.

1.3.2 La motilité de type twitching

La motilité de type *twitching* est un comportement de groupe de surface qui nécessite la présence de pili de type IV (Harshey, 2003). Le déplacement par ce type de motilité implique l'extension et rétraction active des pili de type IV situés de part et d'autre des pôles de la cellule bactérienne. L'implication des pili de type IV a été rapportée pour plusieurs phénomènes tels que la formation de biofilms et la formation de corps fructifères (*fruiting bodies*) chez *Myxococcus xanthus* (Harshey, 2003). La motilité de type *twitching* implique généralement une étroite interaction cellule-cellule qui génère la formation de

«radeaux» cellulaires permettant ainsi un déplacement radial vers l'extérieur du centre de la colonie (Figure 1.6) (Mattick, 2002).



Figure 1.6 Motilité de type *twitching* de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* Distribution uniforme de cellules de la souche sauvage de *P. aeruginosa* se déplacement sur une surface (Burrows, 2012).

1.3.3 La motilité de type swarming

Le *swarming* est un type de motilité présent chez plusieurs espèces bactériennes. Il consiste en un déplacement rapide (de 2 à 10 µm/seconde) et coordonné d'une population bactérienne sur une surface (Kearns, 2010) (Figure 1.7). Ce type de motilité diffère du *swimming* qui est un déplacement individuel des bactéries vers une source de nutriments dans un milieu liquide. Le *swarming* est un type de motilité qui n'a pas été aussi bien étudié que le *swimming* pour la simple raison que le *swarming* est généralement inhibé dans les conditions de laboratoire standard (Ghelardi *et al.*, 2007, Kearns *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2005, Patrick *et al.*, 2009). De plus, les bactéries adoptant le mode de déplacement de type *swarming* nécessitent la présence de nutriments spécifiques tels que certaines sources de carbone (Harshey *et al.*, 1994, Julkowska *et al.*, 2005, Young *et al.*, 1999). À ce jour, deux éléments ont été identifiés comme étant essentiels pour le *swarming* : (i) La présence d'un/plusieurs flagelle(s) fonctionnel(s) et (ii) la production d'un agent surfactif permettant la réduction de la tension de surface du milieu sur lequel se retrouve les bactéries (effet «mouillant») (Kearns, 2010). Les cellules

Revue de littérature

en *swarming* subissent en général une différentiation cellulaire qui consiste en : (i) une augmentation dans la synthèse du nombre de flagelles et (ii) une élongation cellulaire. Cette différentiation cellulaire serait généralement déclenchée par l'obstruction de la rotation du flagelle et par le QS (Atkinson *et al.*, 2009, Ng *et al.*, 2009, Sturgill *et al.*, 2004). La fonction biologique du *swarming* reste incertaine. Ce type de motilité n'a jamais été rapporté dans la nature et n'est reconnu pour se produire que dans des conditions spécifiques (Harshey *et al.*, 2015).



Figure 1.7 La motilité de type swarming chez différentes espèces bactériennes.

(A) *Pseudomonas aeruginosa* (Photo : Fabrice Jean-Pierre), (B) *Bacillus subtilis* (Hamze et al., 2011), (C) *Proteus mirabilis* (Y. Y. Lee et al., 2015).

Revue de littérature

1.4 La vie en liquide versus surface chez les bactéries

Une quantité appréciable de données scientifiques montrent qu'il existe des différences fondamentales chez des bactéries vivant dans un environnement liquide comparativement à une surface (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). En effet, au-dela du contact à une surface en soi, des bactéries cultivées dans ces deux conditions sont soumises à différents facteurs tels que la disponibilité de l'eau, des nutriments, la pression osmotique et le taux de diffusion des gaz (Pirt, 1975).

Des bactéries vivant dans un environnement liquide adoptent un mode de vie bactérien dit «planctonique». Comme il a été stipulé par Collins (Collins, 1957), la racine du mot planctonique vient du mot « plancton » qui veut dire : « Animaux et plantes flottant dans les eaux, mers, rivières, étangs et lacs, qui sont distincts des animaux étant attachés à une surface; plus particulièrement des microorganismes possédant un faible pouvoir locomoteur ». Ainsi, des bactéries planctoniques consistent en des cellules individuelles se retrouvant dans un environnement liquide et qui adoptent une motilité de type *swimming* (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Contrairement au mode de vie liquide, la vie en surface favorise majoritairement un mode de vie bactérien multicellulaire et la sessilité. Ce dernier est défini dans un contexte écologique comme étant un organisme stationnaire attaché à une surface (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Le mode de vie sessile est le plus souvent caractérisé par la formation d'une communauté bactérienne non-motile nommée biofilm. Toutefois, vivre en surface n'est pas limité à un mode de vie sessile. Des bactéries se retrouvant sur une surface peuvent être hautement motiles et coloniser cette dernière; par exemple, la motilité de type *swarming* (Kearns, 2010). Ainsi, dépendamment du mode de culture utilisé, la régulation génétique au sein de la même bactérie peut grandement varier afin qu'elle puisse mieux s'adapter à son environnement et coloniser cette dernière (Garrett *et al.*, 2008, Hall-Stoodley *et al.*, 2004, Marshall, 2006).

De ce fait, étudier des bactéries en culture liquide comparativement à celles se retrouvant sur une surface représente un défi de taille. En effet, il est difficile de discerner au niveau génétique quels sont les mécanismes d'adaptation spécifiques au passage

14

liquide-surface étant donné que ces deux états physiques engendrent un grand nombre de changements métaboliques (Gode-Potratz *et al.*, 2011).

1.5 La régulation génique de la motilité de type swarming

Dans cette section, nous décrirons les mécanismes impliqués dans la régulation de la motilité de type *swarming* chez certaines bactéries. Ces dernières ont été choisies en considérant les éléments d'informations ayant été présentés jusqu'à présent afin d'obtenir une meilleure vue d'ensemble sur la régulation génétique de ce mode de déplacement bactérien de surface.

1.5.1 Serratia marcescens

1.5.1.1 Généralités

La motilité de type *swarming* optimale chez les *Serratia* se produit généralement sur des géloses contenant 0,5 à 0,7% d'agar (Harshey, 2003). Ce phénomène implique le passage de courtes cellules motiles végétatives à des cellules péritriches multinuclées allant de 40 à 80 fois la longueur des cellules initiales (Ang *et al.*, 2001). la motilité de type *swarming* est affectée par la présence de certains nutriments dont un mélange des 20 acides aminés naturels, mais aucun d'entre eux individuellement ne peut déclencher ce mouvement de surface (Eberl *et al.*, 1996). De plus *Serratia marcescens* affiche une motilité de type *swarming* à une température de 30 °C, mais ce phénotype est inhibé lorsque les cellules sont cultivées à 37 °C (Soo *et al.*, 2008)

1.5.1.2 Régulation génétique

Il a initialement été démontré chez la bactérie *Serratia liquefasciens* MG1 que la régulation génétique de ce type de motilité est contrôlée par trois facteurs soient : i) l'opéron de régulation flagellaire *flhDC* (ii) le système de QS *swrR/l* et (iii) le S2C RssAB (Eberl *et al.*, 1996, Eberl *et al.*, 1999, Tsai *et al.*, 2011). Toutefois, il s'est plus tard avéré par analyse de l'ARN ribosomal 16S que la souche MG1 avait mal été identifiée et qu'il s'agissait plutôt d'une souche non-pigmentée de *Serratia marcescens* (Rice *et al.*, 2005).

L'opéron *flhDC* est responsable de la transition de cellules végétatives en cellules adoptant un état *swarming*. Cet opéron est responsable de la synthèse flagellaire et une

15
Revue de littérature

mutation dans ce dernier empêche les motilités de type *swimming* et *swarming* étant donné que le flagelle ne peut plus être synthétisé (Eberl *et al.*, 1996).

Le système de QS *swrR/l* repose sur la production de molécules de signalisation du type AHL et affecte la motilité de type *swarming* en affectant positivement l'expression d'un gène de son régulon nommé *swrA* (Lindum *et al.*, 1998). L'expression du gène *swrA* favorise la production d'un agent mouillant nommé serrawettin W2 qui est sécrété par la cellule et abaisse la tension de surface permettant ainsi donc à *S. marcescens* d'adopter une motilité de surface (Lindum *et al.*, 1998).

Le S2C RssAB est impliqué dans la régulation de la motilité de type *swarming* chez *S. marcescens* en inhibant la synthèse flagellaire. Ce système agit en réprimant le promoteur de l'opéron régulateur *flhDC* lorsque les cellules sont exposées à une température de 37 °C (Soo *et al.*, 2008).

1.5.2 Proteus mirabilis

1.5.2.1 Généralités

Proteus mirabilis est une bactérie di-morphique à Gram négatif capable de causer une large gamme d'infections chez les humains et dont la plus récurrente est l'établissement d'infections urinaires (Mobley *et al.*, 1995).

La motilité de type *swarming* chez *P. mirabilis* est considérée particulière étant donné qu'elle affiche un déplacement de surface plus vigoureux que chez les autres bactéries (Armbruster *et al.*, 2012). En effet, *P. mirabilis* peut se déplacer sur des géloses contenant un pourcentage d'agar allant jusqu'à 2% et démontre un phénotype caractérisé par la formation de cercles concentriques (Figure 1.7C) (Rather, 2005). Cette capacité à se mouvoir sur des surfaces solides est due à la différenciation de cellules végétatives (cellules courtes) en cellules hyperallongées multi-nucléées qui montrent la présence de milliers de flagelles (Armbruster *et al.*, 2012). Une des particularités du phénotype de motilité de type *swarming* est l'alternance entre ces deux morphotypes cellulaire où les cellules en *swarming* cessent de se déplacer, redeviennent courtes et se multiplient; cette phase est nommée la consolidation (Armbruster *et al.*, 2012). Notons que la transition entre ces deux morphologies cellulaires semble favorisée par le contact à la surface qui

entraîne l'obstruction de la rotation du flagelle et active la différentiation en cellule *swarmer* (Belas *et al.*, 2005).

La motilité de type *swarming* de *P. mirabilis* est influencée par plusieurs facteurs environnementaux qui peuvent moduler ce phénotype de surface (Armbruster *et al.*, 2013). Par exemple, ce mode de déplacement bactérien peut se produire en présence de certains acides aminés individuellement ou en mélange tandis que d'autres ne peuvent pas déclencher cette motilité bactérienne (Jones *et al.*, 1967).

1.5.2.2 Régulation génétique

La régulation de la motilité de type *swarming* chez *P. mirabilis* est complexe et la majorité des gènes impliqués dans ce phénotype ont été identifiés *via* des mutagénèses aléatoires (Rather, 2005). La capacité de *P. mirabilis* est, entre autres, facilitée par la production d'une « vase » (*slime*) qui encapsule les cellules en *swarming* (Stahl *et al.*, 1983). La présence d'un exopolysaccharide sécrété nommé Cmf (*Colony migration factor*) a été mise en évidence dans cette vase. Cet exopolysaccharide n'est pas requis pour la différenciation cellulaire observée lors de la motilité de type *swarming* alors qu'il est nécessaire pour le déplacement optimal de *P. mirabilis* sur une surface (Morgenstein *et al.*, 2010, Rather, 2005).

Au niveau génétique, plusieurs indices suggèrent que la différentiation cellulaire est déclenchée par les protéines du complexe Umo (*upregulator of the master flagellar operon flhDC*) qui sont potentiellement impliquées dans la détection de surface chez P. mirabilis et prédites d'être localisées dans l'enveloppe cellulaire (Dufour *et al.*, 1998, Harshey *et al.*, 2015). La modulation de l'activité du S2C RcsCDB, par les protéines du complexe Umo serait responsable du contrôle de l'expression de l'opéron *fhlDC* responsable de la synthèse flagellaire chez P. mirabilis (Harshey *et al.*, 2015, Morgenstein *et al.*, 2010). Toutefois, le mécanisme de régulation des protéines Umo sur l'opéron *flhDC* reste indéterminé (Y. Y. Lee *et al.*, 2015). Il existe aussi d'autres S2C et protéines qui sont impliqués dans la régulation de l'opéron *flhDC* et donc de la motilité de type *swarming* (Morgenstein *et al.*, 2010). L'implication du QS chez *P. mirabilis* dans la motilité de type *swarming* reste à être caractérisée. En effet, le signal extracellulaire AI-2 synthétisé par cette bactérie n'a pas d'effet sur ce mouvement de surface (Schneider *et al.*, 2002). Parmi les autres signaux extracellulaires produits par *P. mirabilis*, seul la putrescine semble être impliquée dans la motilité de type *swarming*, mais son rôle n'est pas encore identifié (Armbruster *et al.*, 2013, Sturgill *et al.*, 2004).

1.5.3 Bacillus subtilis

1.5.3.1 Généralités

Bacillus subtilis est une bactérie à Gram positif sporulente qui possède une motilité de type *swarming* plutôt robuste sur des géloses allant jusqu'à 1% d'agar, mais réalisant un déplacement optimal à 0,7% d'agar. La différentiation cellulaire de *B. subtilis* se limite à une légère augmentation de la largeur de la cellule ainsi qu'à l'augmentation significative du nombre de flagelles (Kearns *et al.*, 2003). Cette bactérie peut se déplacer sur des milieux nutritifs complexes tels que le LB ainsi que sur des milieux définis (Kearns, 2010). Certaines souches de *B. subtilis* ayant été manipulées en contexte de laboratoire au courant des années ont été « domestiquées » et ont ainsi perdu leur capacité à se déplacer sur une surface semi-solide (Patrick *et al.*, 2009).

1.5.3.2 Régulation génétique

La régulation génique de la motilité de type *swarming* chez *B. subtilis* implique la présence de plusieurs facteurs. Premièrement, la production d'un agent mouillant nommé surfactine, sous le contrôle du QS est nécessaire à ce déplacement de surface (Kearns *et al.*, 2003, Nakano *et al.*, 1992, Oslizlo *et al.*, 2014). De plus, le gène *swrA* agirait en tant que médiateur central contrôlant la motilité de type *swarming* (Kearns *et al.*, 2004). La protéine SwrA est impliquée dans la synthèse du corps basal de l'appareil flagellaire en augmentant son expression (Kearns *et al.*, 2005). De plus, lorsque mis en contact avec une surface, *B. subtilis* augmente le niveau de SwrA par un mécanisme qui implique le ralentissement de sa dégradation par la protéase LonA (Mukherjee *et al.*, 2015). Ceci favorise donc le déclenchement de la motilité de type *swarming*.

Revue de littérature

Le gène *swrA* est sous le contrôle de deux promoteurs qui sont activés par deux facteurs sigma distincts dont l'un est aussi responsable de contrôler l'expression de gènes associés à la synthèse flagellaire (Calvio *et al.*, 2008). De plus, le régulateur de réponse global DegU, important pour le contrôle de plusieurs phénotypes de *B. subtilis* (sporulation, formation de biofilm), serait impliqué dans la régulation du *swarming* de manière positive conjointement avec SwrA (Calvio *et al.*, 2008, Ogura *et al.*, 2012). Toutefois, la régulation de cette motilité de surface par DegU serait dépendante de son niveau de phosphorylation (Patrick *et al.*, 2012). Finalement, SwrA peut interagir avec le domaine N-terminal de DegU afin de stabiliser ce dernier et favoriser l'expression de opéron *fla/che* associé à la biogénèse flagellaire (Ogura *et al.*, 2012).

L'étude de la motilité de type *swarming* en utilisant différentes souches de laboratoire a causé de nombreuses incertitudes dans la compréhension des facteurs génétiques nécessaires à cette motilité de surface. En effet, la manipulation de *B. subtilis* en laboratoire a entraîné sa domestication et favorisé la perte de sa capacité à se mouvoir sur une surface semi-solide (Kearns *et al.*, 2003, Patrick *et al.*, 2009). Contrairement à une souche considérée comme étant non-domestiquée, les souches de laboratoire ont acquis des mutations dans les gènes nécessaires à la production de surfactine ainsi que dans le gène *swrA* qui sont obligatoires pour ce type de motilité (Patrick *et al.*, 2009). Malgré la parution de plusieurs articles portant sur le rôle essentiel du gène *swrA* sur la régulation de la motilité de type *swarming*, il existe encore certaines études qui indiquent le contraire; ces différences sont largement attribuées aux conditions expérimentales différentes entre les laboratoires (Hamze *et al.*, 2011, Patrick *et al.*, 2009).

1.5.4 Pseudomonas aeruginosa

1.5.4.1 Généralités

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif qui est capable de coloniser une large gamme d'environnements (Stover *et al.*, 2000). C'est aussi un pathogène opportuniste des humains. Cette capacité d'adaptation est due à son génome qui code pour plus d'une soixantaine de S2C (Rodrigue *et al.*, 2000).

Contrairement à plusieurs espèces où le *swarming* nécessite une différentiation cellulaire comme mentionné ci-dessus, plusieurs études menées sur *P*. aeruginosa suggèrent que cette dernière ne semble pas subir de changements phénotypiques tels que l'augmentation du nombre de flagelles et l'élongation cellulaire (Rashid *et al.*, 2000, Tremblay, 2011). Bien au contraire, les cellules en *swarming* semblent n'afficher aucune différence par rapport à des cellules cultivées sur une surface solide ou dans un milieu liquide (Takahashi *et al.*, 2008, Toutain *et al.*, 2005). Une étude transcriptomique effectuée dans le laboratoire Déziel portant sur l'analyse de cellules situées au front de migration de colonies de *P. aeruginosa* en *swarming* (voir extremités des dendrites à la Figure 1.10) a ainsi révélé que la synthèse de flagelles n'est pas augmentée, mais plutôt que ce type de motilité est associée à l'activation de la machinerie nécessaire à la production d'énergie (ATP) (Tremblay *et al.*, 2010).

Chez P. aeruginosa, un agent surfactif mouillant la surface composé d'acide 3-(3hydroxyalkanoyloxy)alkanoique (HAA) et de rhamnolipides (mono et di-rhamnolipides) favorise ce type de motilité (Figure 1.8) (Caiazza et al., 2005, Déziel et al., 2003). Les rhamnolipides sont des glycolipides amphiphiles tensioactifs aux multiples fonctions. Ces molécules sont aussi considérées comme des facteurs de virulence pouvant moduler l'activité chimiotactique des neutrophiles ainsi qu'en étant toxiques pour différents types de cellules immunitaires (Abdel-Mawgoud et al., 2010). De plus, ces glycolipides ont la capacité d'induire des réactions inflammatoires du système immunitaire et de potentiellement contribuer à la destruction de tissus pulmonaires observé chez les patients souffrant de maladies pulmonaires dégénératives telles que la fibrose kystique par exemple (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Les enzymes nécessaires pour la synthèse de ces molécules sont codées par les gènes rhIA, rhIB et rhIC qui sont sous le contrôle du QS (Abdel-Mawgoud et al., 2010). De plus, les différentes molécules synthétisés par les gènes rhIA (HAA), rhIB (mono-rhamnolipides) et rhIC (di-rhamnolipides) possèdent toutes des propriétés tensio-actives et peuvent altérer le phénotype swarming de P. aeruginosa (Caiazza et al., 2005, Tremblay et al., 2007). Afin d'adopter un tel déplacement de surface, la présence minimale du gène rhlA est requise (Déziel et al., 2003).

Au niveau nutritionnel, cette motilité de surface chez *P. aeruginosa* est facilitée dans des conditions environnementales où la source d'azote est limitante ou moins favorable (Déziel *et al.*, 2003) et en présence de certains acides aminés qui peuvent agir en tant que source d'azote (Kohler *et al.*, 2000). La motilité de type *swarming* peut être affectée par la source de carbone présente dans le milieu utilisé (Kohler *et al.*, 2000).



Figure 1.8 Voie de synthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* La synthèse des agents tensio-actifs, acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoique (HAA), mono-rhamnolipides (Mono-RL) et di-rhamnolipides (Di-RL) est catalysée par les enzymes RhIA, RhIB et RhIC respectivement à partir du précurseur *R*-3-hydroxydecanoyl-CoA. Figure adaptée de (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014).

1.5.4.2 Régulation génétique

Le *swarming* nécessite la présence d'un flagelle fonctionnel et la production d'un surfactant. Toutefois, la caractérisation au niveau génique de ce comportement de surface reste mal comprise. Chez *P. aeruginosa*, plusieurs études se sont penchées sur cette question et à la lumière de ces recherches, il a été observé que la motilité de type *swarming* est un comportement bactérien complexe.

Afin d'approcher cette problématique, Overhage et collègues en 2008 ont effectué une étude transcriptomique sur le comportement génétique de bactéries situées au front de migration d'une colonie en *swarming versus* un témoin dans lequel les bactéries étaient cultivées en bouillon, où la motilité de type *swimming* est prédominante. Les résultats de cette analyse montrent chez des cellules de *P. aeruginosa* en *swarming* une augmentation des gènes associés à la virulence (sécrétion de protéines par le SST3,

Revue de littérature

gènes associés à l'acquisition de fer). De plus, il a été conclu que la motilité de type *swarming* est un comportement bactérien énergétiquement demandant. Toutefois, cette étude comparait deux styles de vie distincts (vie en liquide *versus* en surface).

Dans ce même laboratoire (REW Hancock, UBC), un criblage a été réalisé et un total de 233 mutants ont été identifiés ayant un défaut dans la motilité de type swarming (Yeung et al., 2009). Parmi les mutations mises en évidence, 35 gènes semblent impliqués dans la régulation de ce mouvement de surface sans affecter l'activité flagellaire; critère essentiel à ce type de motilité. De façon intéressante, une variété de S2C, de régulateurs de réponse et transcriptionnels ont été identifiés suggérant l'importance de mécanismes de détection pour le contrôle de ce comportement de surface. Une étude par l'utilisation d'une méthode de mutagénèse aléatoire menée dans le laboratoire Déziel afin d'obtenir une meilleure compréhension de la motilité de type swarming a permis d'identifier 76 transposants affectés dans ce déplacement de surface (Tremblay, 2007). Une analyse approfondie du comportement de ces candidats a révélé que des mutants inhibés dans la motilité de type swarming sont presque toujours incapables de synthétiser des rhamnolipides ou présentent des défauts dans leur activité flagellaire (21 mutants). Toutefois, les transposants affectés de manière positive ou négative dans leur phénotype swarming possèdent des insertions dans des gènes codants pour des protéines de la membrane externe, pompes à efflux, protéines métaboliques et hypothétiques (55 mutants). À la lumière de ces travaux, les études menées dans le laboratoire Déziel ont une fois de plus démontré que la régulation de la motilité de type swarming est multifactorielle et qu'elle ne peut être simplement étudiée par une approche de criblage par transposon.

Outre les composantes nécéssitant l'action directe de régulateurs et la présence S2C, le di-GMP cyclique est une molécule chimique secondaire qui retient de plus en plus l'attention au courant des dernières années pour son implication dans le contrôle de la transition entre les modes de vie bactérien planctonique et sessile (Pesavento *et al.*, 2009). Ces molécules sont synthétisées à l'aide de diguanylate cyclases qui sont des enzymes possédant un domaine conservé GGDEF tandis qu'elles sont dégradées grâce à des phosphodiestérases ayant des domaines EAL ou HD-GYP (Schirmer *et al.*, 2009).

Revue de littérature

En général, des concentrations élevées de ce messager secondaire intracellulaire favorise un mode de vie bactérien sessile tandis que de faibles niveaux de di-GMP cyclique induisent un mode de vie planctonique (Simm *et al.*, 2004).

Chez *P. aeruginosa*, une mutation dans le gène *bifA*, qui code pour une protéine ayant une activité phosphodiestérase pour le di-GMP cyclique, entraîne l'abolition totale de la motilité de type *swarming* en plus d'activer un phénotype hyperbiofilm (Kuchma *et al.*, 2007). Contrairement à *bifA*, le gène *sadC* possède une activité de diguanylate cyclase et une mutation dans ce gène a pour conséquence un phénotype *hyperswarming* de *P. aeruginosa* tout en affectant négativement la formation de biofilm (Merritt *et al.*, 2007). Basé sur ces observations, ces études ont suggéré une relation inverse entre ces deux comportements de surface de groupe.

Plus récemment, (Moscoso *et al.*, 2014) ont inclut le gène *sadC* dans le régulon de RsmA, un régulateur post-transcriptionnel affectant négativement la traduction de plusieurs ARNm cibles. Ce régulateur post-transcriptionnel est sous le contrôle de deux pARN, RsmY et RsmZ qui agissent en tant qu'appâts pour cette protéine liant l'ARN. De plus, ces pARN sont régulés par un S2C nommé GacS/GacA jouant un rôle central dans le contrôle entre les modes de vie planctoniques et sessiles de *P. aeruginosa* (Brencic *et al.*, 2009a, Brencic *et al.*, 2009b, Heurlier *et al.*, 2004). Ce système sera décrit plus en détails à la section suivante.

La présence d'une quarantaine de protéines associées au cycle du di-GMP cyclique doit encore être étudiée plus en profondeur afin de mieux comprendre le rôle de ce messager secondaire au sein du contrôle de la transition entre les modes de vies planctoniques et sessiles chez *P. aeruginosa* (Ha *et al.*, 2014). Toutefois, le dogme voulant qu'un haut niveau de di-GMP cyclique favorise un mode de vie sessile tel que la formation de biofilm, n'est pas toujours confirmé. En effet, il existe des situations où un niveau élevé ou faible de cette molécule secondaire, n'affecte pas directement la motilité de type *swarming* ou la formation de biofilm (A. E. Baker *et al.*, 2016, Merritt *et al.*, 2010). Ceci remet donc en question l'existence d'une relation inverse obligatoire entre les biofilms et cette motilité de surface. Outre son rôle dans le contrôle des comportements de surface et planctonique, le di-GMP cyclique a aussi été caractérisé comme ayant un

impact sur l'expression des gènes associés au SST6 et au SST3 ce qui suggère que ce messager secondaire peut avoir des effets pléïotropiques chez *P. aeruginosa* (Moscoso *et al.*, 2011).

1.5.4.3 Différences bouillon versus surface

1.5.4.3.1 Le système RetS/GacS/GacA/RsmYZA

Un des S2C les mieux étudiés chez *P. aeruginosa* est le système GacS/GacA. Des homologues de ce système sont retrouvés sous une forme conservée chez plusieurs *y*-protéobactéries (Lapouge *et al.*, 2008). Quand le récepteur membranaire histidine kinase non-orthodoxe GacS est activé par un signal environnemental (qui reste encore inconnu), il phosphoryle le régulateur de réponse GacA (Figure 1.9). Une fois phosphorylé, ce dernier est en mesure de se lier aux séquences consensus conservées nommées « boîtes GacA » qui sont situées dans la région promotrice des gènes-cible. GacS et GacA ont été initialement identifiées séparément chez *Pseudomonas syringae pv. syringae* et *Pseudomonas fluorescens* respectivement avant qu'il ait été mis en évidence par des études génétiques qu'il s'agissait d'un même système (Hrabak *et al.*, 1992, Laville *et al.*, 1992, Rich *et al.*, 1994). Chez les pseudomonades et autres bactéries apparentées, le système GacS/GacA est responsable d'activer la transcription de pARN régulateurs (Sonnleitner *et al.*, 2011b). Cette production de pARN permet l'augmentation de la production de protéines étant sous leur contrôle en modulant l'activité de régulateurs post-transcriptionnels de la famille CsrA/RsmA (Sonnleitner *et al.*, 2011b).

RsmA est l'homologue de CsrA (d'*Escherichia coli*) chez *P. aeruginosa* (Pessi *et al.*, 2001). Cette protéine agit en tant que régulateur post-transcriptionnel pléïotropique ayant un effet sur la production de facteurs sécrétés par *P. aeruginosa* en plus d'affecter plusieurs cibles du QS (Kay *et al.*, 2006, Pessi *et al.*, 2001). Des études approfondies par transcriptomique de certaines souches de *P. aeruginosa* ont permis d'établir que l'expression d'environ 500 gènes est affectée (directement et indirectement) par RsmA (Brencic *et al.*, 2009a, Burrowes *et al.*, 2006). En particulier, RsmA module négativement l'expression de gènes impliqués dans les infections chroniques (gènes *pel, psl, hcn,* système de sécrétion de type 6 (SST6), etc.) et positivement, mais de manière indirecte, des gènes liés à des infections aigües (SST3, lipases, exotoxine A, rhamnolipides, etc.)

(Brencic *et al.*, 2009a). L'activité de la protéine RsmA est modulée par deux pARN : *rsmY* et *rsmZ*, dont la transcription est sous le contrôle du S2C GacS/GacA (Brencic *et al.*, 2009b). Ces deux pARN possèdent un nombre élevé de motifs reconnus par le répresseur post-transcriptionnel RsmA et agissent en tant qu'appâts afin de titrer la concentration disponible de ce dernier (Heurlier *et al.*, 2004, Valverde *et al.*, 2003). De plus, d'autres senseurs membranaires de type hybride tels que RetS et LadS ont été identifiés comme agissant sur le système dont RsmA fait partie en modifiant l'activité du senseur membranaire GacS (Chambonnier *et al.*, 2016, Goodman *et al.*, 2009, Ventre *et al.*, 2006). Cette protéine joue donc un rôle central dans la transition de l'expression des gènes impliqués dans l'établissement d'infections aigües et chroniques associés à des modes de vie bactériens en liquide et en surface respectivement (Brencic *et al.*, 2009a).

Le senseur membranaire RetS (*Regulator of Exopolysaccharide and Type III Secretion*) a été répertorié comme ayant un effet antagoniste sur le système à deux composantes GacS/GacA en affectant négativement l'expression des pARN *rsmY* et *rsmZ* (Goodman *et al.*, 2004).

Le gène *retS* code une protéine de 946 acides aminés qui partage des similitudes aux niveaux de la séquence et de l'organisation des domaines généralement associés aux senseurs kinase/régulateurs de réponse (Goodman *et al.*, 2004). Plus particulièrement, ce senseur possède les caractéristiques d'un senseur kinase hybride. Goodman *et al* (2004) ont aussi rapporté que l'inactivation du gène *retS* résulte en une augmentation de l'expression de gènes liés à des infections chroniques et avait l'effet contraire sur des gènes associés à la production de facteurs liés à des infections aigües. De plus, cette régulation passe par le système de régulation GacS/GacA. Le mécanisme d'action de RetS a élégamment été mis en évidence par (Goodman *et al.*, 2009) : RetS inhibe l'activité de GacS en s'hétérodimérisant avec ce dernier et en bloquant son activité d'autophosphorylation. Notons que RetS n'est pas en mesure de s'autophosphoryler (Goodman *et al.*, 2009, Hsu *et al.*, 2008).

La découverte de RetS a donc permis de mettre en évidence que *P. aeruginosa* est en mesure de détecter dans quel type d'environnement elle se retrouve, et qu'il existe des senseurs pouvant agir de façon opposée (ultimement sur le système GacS/GacA),

afin de « sélectionner » quel type de vie bactérienne lui est bénéfique : planctonique ou en surface. Toutefois, malgré que nous connaissions l'existence d'un tel récepteur, le(s) signal(aux) environnemental(aux) qui déclenche(nt) l'activation de ce senseur reste(nt) encore inconnu(s).

Plus récemment, un lien entre la production du messager secondaire, le di-GMP cyclique et le système RetS/GacS/GacA/RsmYZA a été démontré. En effet, il a initialement été observé qu'une mutation dans le gène *retS* favorise la formation d'un hyperbiofilm et que ce phénotype est favorisé par la surproduction de di-GMP cyclique chez *P. aeruginosa* (Goodman *et al.*, 2004, Moscoso *et al.*, 2011). Initialement, la recherche d'un mutant « suppresseur » du caractère hyperbiofilm du mutant $\Delta retS$ a permise d'identifier le gène *sadC* (Goodman *et al.*, 2004). En effet, le senseur membranaire SadC a été caractérisé comme une protéine ayant une activité diguanylate cyclase (Merritt *et al.*, 2007). De plus, il a été déterminé que SadC est régulée de manière négative par le régulateur post-transcriptionnel RsmA (Moscoso *et al.*, 2014).

Malgré de nombreuses études menées sur RsmA chez *P. aeruginosa*, très peu d'informations portant sur la caractérisation du gène *rsmA* au niveau transcriptionnel et traductionnel sont disponibles (Schuster *et al.*, 2004). Toutefois, des études menées dans le laboratoire Déziel ont permis de mettre en évidence que cette régulation est complexe et sensible aux conditions environnementales (Séguin, 2012). Afin d'identifier le(s) régulateur(s) direct(s) de *rsmA*, un criblage par mutagénèse aléatoire a été effectué sur gélose. Plusieurs gènes affectant l'expression de *rsmA* ont été identifiés. Toutefois, lorsque l'effet sur l'expression de *rsmA* a été testé en culture liquide, aucune différence significative entre le mutant testé et la souche sauvage n'était percevable pour la majorité de ces gènes. De plus, des résultats préliminaires indiquaient que RsmA puisse s'autoréguler de manière négative chez *P. aeruginosa* comme il a été vu chez *E. coli* (Séguin, 2012, Yakhnin *et al.*, 2011b).



Figure 1.9 Le système de régulation GacS/GacA/RsmYZA.

Le senseur RetS membranaire RetS module l'activité de GacS dépendemment des stimuli environnementaux. L'activation de GacS résulte en l'activation de son régulateur de réponse associé GacA qui contrôle exclusivement l'expression des pARN RsmY et RsmZ. Ces deux pARN titrent la concentration globale de la protéine RsmA. Lorsque RsmA est libre « ON », l'expression des gènes associés à des infections chroniques sont inhibés directement (ligne pleine). Les gènes liés à des infections aigües sont activés de manière indirecte (ligne hachurée). Le contraire s'effectue lorsque la concentration de RsmA est titrée « OFF ».

1.5.4.3.2 Différences bouillon versus surface dans l'étude du swarming

Étant donné que la motilité de type *swarming* est un phénomène de surface et que des cellules planctoniques représentent un mode de vie bactérien distinct, Tremblay & Déziel.,(2010) ont effectués une analyse transcriptomique sur ce type de déplacement en utilisant un témoin plus approprié que des bactéries adoptant un mode de vie motile: des cellules de *P. aeruginosa* inoculées sur une gélose *swarming* ayant été séchée plus longuement, ce qui permet l'inhibition du *swarming* (Tremblay *et al.*, 2008). De plus, en comparant les cellules du centre de la colonie en *swarming* avec celles situées aux extrémités des dendrites, il a été vu que ces deux sous-populations affichent des profils d'expression génétique différents, confirmant un certain niveau de différentiation spatio-temporelle à l'intérieur d'une colonie en *swarming*. Les cellules au centre de la zone *swarming* affichent un profil génique où elles sont soumises à plusieurs types de stress

(oxydatif et cuivre) tandis que les cellules au front de migration de la colonie en *swarming* préfèrent diriger leurs ressources à l'expression de gènes associés à la production d'énergie (Figure 1.10). Contrairement aux résultats trouvés par Overhage et collègues (2008), Tremblay et Déziel (2010) ont observé une diminution de l'expression de gènes nécessaires à la production de facteurs de virulence. Vraisemblablement, les divergences observées entre ces deux études reposent principalement sur l'organisation expérimentale : l'une utilise comme témoins des cellules planctoniques (Overhage *et al.*, 2008), tandis que l'autre utilise des cellules en surface (gélose non-*swarming*) (Tremblay *et al.*, 2010). Puisque le *swarming* est un phénomène se produisant sur un milieu semisolide, des tests en surface sont considérés plus appropriés pour identifier des facteurs caractérisant ce mouvement de surface. De manière opposée à cela, une comparaison de *P. aeruginosa* adoptant un tel type de motilité avec des cellules cultivées en liquide révéle des différences sessile *versus* planctonique.



Figure 1.10 Modèle de la dynamique transcriptomique d'une colonie de *P. aeruginosa* adoptant une motilité de type *swarming*.

Il a été établi qu'une colonie en *swarming* regroupe deux sous-populations distinctes : la population au centre est soumise à plusieurs stress environnementaux et l'activation de gènes nécessaires à la résistance au stress oxydatif et au cuivre sont activés. Les cellules présentes au front de migration représentent une autre population où des gènes associés à la production d'énergie et aux protéines ribosomales sont exprimés. De plus, il y a une diminution dans l'expression des gènes reliés à la sécrétion de facteurs de virulence et à l'acquisition de fer. Image tirée de Tremblay & Déziel (2010).

La comparaison entre des cellules en *swarming versus* non-*swarming* par Tremblay et Déziel (2010) a révélé 347 gènes exprimés de façon différente. Parmi eux, 246 ont été testés pour le type de motilité *swarming* et ceux jugés intéressants (phénotype *swarming* différent de la souche sauvage) ont ensuite été analysés pour vérifier si la production de rhamnolipides ou la fonctionnalité du flagelle était responsable du phénotype observé. Le but était d'identifier des fonctions nouvelles impliquées dans le *swarming*. Ultimement, seulement six candidats dont la capacité de synthétiser des rhamnolipides et affichant une activité flagellaire supérieure à 70%, mais démontrant un phénotype *hyper* ou *hyposwarmer* ont été retenus (Tremblay, 2011). Parmi ceux-ci, *PA3346* et *PA3347* ont particulierement retenu l'attention de notre groupe de recherche étant donné qu'il a été rapporté que le gène *PA3346* fait partie d'une voie de signalisation faisant partie de la famille des S2C (Hsu *et al.*, 2008).

Comme mentionné précédemment (Section 1.1.1), les bactéries sont dotées de senseurs histidine kinase qui peuvent être séparés en trois groupes. Dans des articles publiés par Lin et al., (2006) et Hsu et al., (2008) certains senseurs hybrides ont été identifiés comme étant capable de phosphoryler une des trois protéines Hpt présentes chez P. aeruginosa : la protéine HptB. De plus, la structure organisationnelle génomique a initialement suggéré que le gène codant cette protéine (PA3345) forme un opéron avec les gènes PA3346 et PA3347. Aussi, un mécanisme de régulation par lequel la protéine HptB phosphoryle PA3346, qui permettrait à cette dernière d'agir en tant que phosphatase sur la protéine PA3347 (un anti-anti facteur sigma potentiel), a été proposé (Bhuwan et al., 2012). Un mutant hptB est défectueux dans la motilité de type swarming sans avoir de défaut dans la production de rhamnolipides ou la fonctionnalité de son flagelle (Tremblay, 2011). Cette protéine a donc été identifiée comme étant centrale à la régulation et compréhension de la motilité de type swarming puisque aucune autre protéine n'a été associée exclusivement à ce type de motilité chez P. aeruginosa. Toutefois, plusieurs études ont identifiées des protéines affectant cette motilité de surface ainsi que la formation de biofilms (McGuffie et al., 2016, Xu et al., 2016). Parmi tous les senseurs hybrides proposés par Hsu et collègues (2008) capables de phosphoryler HptB (PA1976, PA2824, PA1611, RetS), seul le récepteur membranaire PA1611 présente un phénotype de swarming affecté selon Tremblay (2011).

Dans une étude réalisée par le groupe Filloux (Bordi et al., 2010), la protéine HptB de la souche PAK a été impliquée dans le contrôle de l'expression du pARN RsmY, sans toutefois affecter RsmZ. Aussi, il a été vu par analyse transcriptomique que tout comme RetS, HptB affecte positivement l'expression des gènes associés au SST3. Il a donc été proposé que cette régulation passe par le système GacS/GacA. Contrairement à Bordi et al. (2010), Tremblay (2011) a observé par PCR quantitative en temps-réel (qRT-PCR) que l'expression de rsmY et rsmZ est affectée positivement en condition swarming chez un mutant $\Delta hptB$ ($\Delta hptB$ versus dendrites et centre de la souche WT) comparativement à une culture planctonique ($\Delta hptB vs$ WT en liquide) (Figure 1.11). Les disparités entre les résultats observés par ces deux groupes suggèrent que les différences dans les conditions de culture (surface versus surface comparativement à bouillon vs bouillon) soient au centre de cette divergence. De plus, chez la souche PA14, les régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de RsmY et RsmZ sont différentes chez des cellules cultivées en bouillon comparativement en biofilm (Petrova et al., 2010), suggérant des rôles différentiels de ces pARNs dépendamment du style de vie planctonique ou sessile.



Figure 1.11 Régulation de l'expression de rsmY et rsmZ du mutant $\Delta hptB$ versus WT.

(A) L'expression des pARN rsmY et rsmZ est augmentée chez le mutant $\Delta hptB$ comparativement à la souche sauvage chez des cellules de *P. aeruginosa* cultivées en conditon *swarming*. (B) Les mêmes souches cultivées en condition planctoniques (bouillon) n'exhibent aucune différence de régulation des pARN rsmY et rsmZ. Figure adaptée et modifiée de (Tremblay, 2011).

Problématique

2 PROBLÉMATIQUE

La compréhension de l'adaptation du passage d'un environnement liquide à une surface (et vice-versa) chez les bactéries suscite un vif intérêt. En effet, des cellules bactériennes peuvent adopter un mode de vie planctonique ou sessile dépendamment de ces conditions en altérant leur régulation génique. Toutefois, la vie en surface ne se limite pas à la sessilité tel que la formation de biofilms. Par exemple, des bactéries peuvent adopter un comportement actif de surface nommé motilité de type *swarming*. Or, chez plusieurs bactéries, il a été rapporté que des S2C interviennent dans le contrôle de ce type de motilité (voir Section 1.5).

La découverte dans le laboratoire Déziel d'un gène intimement associé au *swarming (hptB)* chez *P. aeruginosa*, et qui affiche un défaut majeur de motilité de surface malgré que son appareil locomoteur soit fonctionnel et que sa capacité à produire un agent mouillant soit intacte, suscite un grand intérêt pour la compréhension de ce comportement bactérien au niveau génétique. Chez plusieurs bactéries, la régulation de cette motilité de surface implique généralement des facteurs de transcription affectant l'expression des gènes associés à la synthèse flagellaire ainsi que la capacité de formation de biofilms (voir Section 1.5).

Des résultats préliminaires par Tremblay (2011) ont en effet posé un diagnostic préliminaire liant le système GacS/GacA/RsmYZA ainsi que la protéine HptB dans le contrôle spécifique de la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* (Figure 2.1). De plus, diverses publications stipulent que les signaux perçus par le système GacS/GacA convergent vers le régulateur post-transcriptionnel RsmA qui agit à titre d'interrupteur central du contrôle inverse des gènes associés au mode de vie bactérien planctonique et sessile (Brencic *et al.*, 2009b, Heurlier *et al.*, 2004, Kay *et al.*, 2006). Toutefois, au niveau de la régulation du gène *rsmA*, très peu d'information est disponible malgré son rôle important dans le contrôle génique chez *P. aeruginosa*.

Problématique



Figure 2.1 Modèle proposé de la régulation de la motilité de type swarming chez P. aeruginosa.

Le senseur hybride PA1611 a été proposé comme étant le récepteur responsable du contrôle de la motilité de type *swarming*. Il a été suggéré que ce senseur détecte les changements dans la tension de surface et agirait en passant par la voie de régulation HptB/RetS/Gac/RsmA. La voie de régulation incluant la protéine HptB n'a toujours pas été déterminée à savoir si elle passe exclusivement par le système Gac et si elle implique les protéines hypothétiques PA3346 et PA3347. Schéma adapté de Tremblay (2011).

3 HYPOTHESES ET OBJECTIFS

3.1 Hypothèse

Notre hypothèse de travail est que la régulation génique globale des cellules cultivées en liquide est différente de celles cultivées en surface. En effet, afin d'assurer un contrôle strict de leurs ressources, des microorganismes soumis à des conditions environnementales changeantes utilisent des systèmes de régulation globaux qui permettent la transition entre des styles de vie bactériens distincts (planctonique ou sessile). Chez *P. aeruginosa*, plusieurs indices suggèrent que certains des signaux environnementaux détectés par cette bactérie passent par le système HptB/Gac/Rsm qui est impliqué dans la transition planctonique-surface. Afin d'étudier un tel phénomène, nous proposons que la motilité de type *swarming*, un comportement bactérien social, représente un modèle idéal pour investiguer la régulation globale entre les modes de vie bactérien se passant en liquide ou en surface.

3.2 Objectif général

Étant donné l'importance des systèmes de régulation globaux dans l'adaptation et la transition entre différents modes de vie bactériens, ce projet vise à mieux caractériser le système HptB/Gac/Rsm de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Au courant des dernières années, le régulateur post-transcriptionnel RsmA a été identifié comme joueur central dans le contrôle des gènes impliqués dans la transition entre les modes de vie plantonique et sessile chez cette bactérie. Toutefois, peu d'information est disponible sur la régulation de RsmA. De plus, des études subséquentes menées dans notre laboratoire ont levé le voile sur l'existence de variation de l'expression des pARN RsmY et RsmZ chez le mutant $\Delta hptB$ (comparativement à la souche sauvage) dépendamment des conditions de culture utilisées (liquide ou *swarming*) comme modèle d'étude. Ce projet vise à obtenir une vue globale de l'existence de systèmes de contrôle sensibles aux conditions de culture et de redéfinir certains dogmes de régulation du système GacS/GacA/Rsm.

3.3 Objectifs spécifiques

- 3.3.1 Caractériser la régulation génétique de rsmA
- 3.3.2 Redéfinir la régulation des pARN RsmY et RsmZ selon les modes de vie bactériens en bouillon ou en surface ainsi que le(s) nouveau(x) rôle(s) du système GacS/A
- 3.3.3 Déterminer le rôle du swarming dans la vie bactérienne

4 PUBLICATION #1 – COMPLEX AUTO-REGULATION OF THE POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATOR RSMA IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Fabrice Jean-Pierre, Jonathan Perreault and Eric Déziel

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7,

Canada

Journal : Microbiology

Soumission : 21 mai 2015

Acceptation: 9 juillet 2015

Publication : Septembre 2015

DOI : 10.1099/mic.0.000140

Recherche publiée dans le cadre de la 1ère partie de mon doctorat

Contribution des auteurs

Fabrice Jean-Pierre : Mise en place et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

Jonathan Perreault : Mise en place des expériences, analyse et discussion des résultats, commentaires et révision du manuscrit.

Eric Déziel : Planification du *design* expérimental, analyse et discussion des résultats, commentaires et révision du manuscrit.

4.1.1 Résumé en français

RsmA est une protéine liant l'ARN agissant au niveau post-transcriptionnel étant capable d'agir en tant que régulateur global pléïotropique chez le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Lorsqu'elle s'attache à sa cible, RsmA bloque la traduction de la molécule d'ARN par le ribosome. Le régulon de RsmA a été évalué à environ 500 gènes dont plusieurs parmi eux sont important pour la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Ceci dit, étant donné que la fonction régulatrice de RsmA a bien été caractérisée, la régulation génétique de *rsmA* elle-même aux niveaux transcriptionnel et traductionnel demeure encore mal comprise. Ici, nous démontons que RsmA est capable de s'autoréguler au niveau traductionnel en utilisant un mécansme non-orthodoxe. Cette régulation d'effectue via une interaction directe de la protéine avec un site de liaison de RsmA situé dans la portion antérieure de sa séquence codante. Au meilleur de nos connaissances, ceci est le premier cas rapporté avec un tel mécanisme de régulation chez les pseudomonades.

4.1.2 Abstract

RsmA is a post-transcriptional RNA-binding protein that acts as a pleiotropic global regulator of messenger RNAs in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Upon binding to its target, RsmA impedes the translation of the mRNA by the ribosome. The RsmA regulon affects approximately ~500 genes, many of which are identified as important for the pathogenicity of *P. aeruginosa*. While the RsmA regulatory function is relatively well characterized, the genetic regulation of *rsmA* itself at the transcriptional and translational levels remains poorly understood. Here, we show that RsmA is capable of self-regulation through an unorthodox mechanism. This regulation occurs via direct interaction of the protein with an RsmA-binding site located in the early portion of its mRNA coding sequence. To our knowledge this is the first report of such an unusual regulatory mechanism in pseudomonads.

4.1.3 Introduction

Rapid adaptation of bacteria requires the detection of and response to diverse environmental cues. Post-transcriptional regulation is used by bacteria to quickly adapt

to changing conditions. The well-characterized CsrA/RsmA family of post-transcriptional regulators is widespread among Gram negative bacteria and can globally affect gene expression (Romeo *et al.*, 2013). This family consists of small dimeric RNA-binding proteins that have the capacity to recognize a GGA trinucleotide present in the loop portion of a stem-loop located in the 5' untranslated region (5'UTR) of a mRNA (Lapouge *et al.*, 2008). The GGA motif can be present in multiple copies in the 5'UTR of a target mRNA. However, one GGA trinucleotide is almost always positioned close to the Shine-Dalgarno (SD) region, thus hindering the attachment to the ribosome and blocking the translation of the target mRNA (C. S. Baker *et al.*, 2007, C. S. Baker *et al.*, 2002, Dubey *et al.*, 2005). Accordingly, CsrA/RsmA proteins typically act as negative regulators of mRNA translation. However, in some cases their RNA-binding capacity can serve to regulate translation by stabilizing the mRNA (Romeo *et al.*, 2013).

In the Gram negative opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, RsmA is a pleiotropic post-transcriptional regulator that modulates the expression of over 500 genes (Brencic et al., 2009a, Burrowes et al., 2006). RsmA indirectly activates the expression of genes associated with the establishment of acute infections while repressing the ones implicated in the development of chronic infections (Brencic et al., 2009a). This post-transcriptional regulator is under the control of the GacS/GacA twocomponent system (TCS), which is exclusively responsible for the transcription of the small RNAs (sRNAs) RsmY and RsmZ (Brencic et al., 2009b). These sRNAs possess numerous RsmA binding sites and thus act as "baits" titrating free RsmA proteins in the cell (Sonnleitner et al., 2011b). Furthermore, many other systems can affect the activity of the Gac system, thus modulating the levels of these RsmA-repressing sRNAs (Goodman et al., 2004, Goodman et al., 2009, Ventre et al., 2006). The importance of post-transcriptional regulation in *P. aeruginosa* is more complex than initially thought, as a new post-transcriptional regulator (RsmN), which shares little structural homology with RsmA but possesses a similar mechanism of action, was recently reported (Marden et *al.*, 2013, Morris *et al.*, 2013).

While the RsmA regulatory function is relatively well characterized, the genetic regulation of *rsmA* itself at the transcriptional and translational levels remains poorly

understood. The genetic regulation of *csrA*, coding for the RsmA homolog in *Escherichia coli*, is complex and dependent on the presence of multiple promoters that are activated at different stages during cell growth. Interestingly, CsrA negatively controls its translation by directly binding its own mRNA (Yakhnin *et al.*, 2011b).

In the present study, we demonstrate that RsmA is capable of binding its own mRNA, promoting a negative feedback regulatory loop. Two RNA attachment sites are implicated in this RsmA-*rsmA* interaction. We identified an RsmA-binding motif in the 5' portion of its coding sequence, revealing an important difference from the conventional CsrA/RsmA regulation mechanism.

4.1.4 Methods

4.1.4.1 Strains, plasmids, and growth conditions

The bacterial strains used in this study are listed in Table 4.1. *P. aeruginosa* and *E. coli* strains were cultivated in Tryptic Soy Broth (TSB) medium at 37 °C with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick) or on TSB agar plates. Antibiotics used for selection were 125 μ g tetracycline ml⁻¹ ,25 μ g triclosan ml⁻¹ and 50 μ g carbenicillin ml⁻¹.

| Strains/Plasmids | ED # | Phenotype/Genotype | Reference |
|------------------------|------|---|------------------------------------|
| E. coli | | | |
| SM10 (λpir) | 222 | <i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu Km <i>λpir</i> | (Simon <i>et al.</i> , 1983) |
| BL21(DE3) | 778 | F-, ompT gal dcm lon hsdSB(rB-, mB-)λ(DE3 [lacl lacUV5-T7 gene1 ind1sam7 nin5]) | (Studier <i>et al.</i> , 1986) |
| DH5a | 78 | fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 | (Woodcock <i>et al.</i> , 1989) |
| P. aeruginosa | | | |
| UCBPP-PA14 | 14 | wild-type strain | (Rahme <i>et al.</i> , 1995) |
| PA14 rsmA- Plasmids | 282 | MaR2xT7 transposon mutant | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| mini-CTX <i>lacZ</i> | | Self-proficient integration vector with <i>lacZ</i> reporter | (Hoang <i>et al.</i> , 2000) |
| pET29a(+) RsmA- H6 | | Hexahistidine-tagged RsmA expression vector | (Brencic <i>et al.</i> , 2009a) |
| pGEM-T Easy | | Linearized vector with 3' T-overhangs | Promega |
| pFJP1 | | <i>rsmA</i> wild-type pGEM integration Cb ^R | |
| pFJP2 | | <i>rsmA</i> wild-type -40 5'UTR pGEM integration Cb ^R | This study |
| pFJP3 | | <i>rsmA</i> with 5'-UTR GGA → GAA inserted in pGEM Cb^{R} | This study |
| pFJP4 | | <i>rsmA</i> with coding sequence GGA \rightarrow GAA inserted in pGEM integration Cb ^R | This study |
| pFJP5 | | <i>rsmA</i> with double GGA \rightarrow GAA inserted in pGEM integration Cb ^R | This study |
| pFJP6 | | <i>rsmA</i> with hairpin structure disruption inserted in pGEM Cb ^R | This study |
| pFJP7 | | \textit{rsmA} with compensatory hairpin inserted in pGEM \mbox{Cb}^{R} | This study |
| pFJP8 | | <i>rsmA</i> Shine-Dalgarno point mutation inserted in pGEM Cb ^R | This study |
| pFJP9 | | rsmA mini-CTX lacZ wild-type reporter | This study |
| pFJP10 | | rsmA mini-CTX lacZ -40 5'UTR wild-type reporter | This study |
| pFJP11 | | <i>rsmA</i> mini-CTX <i>lacZ</i> BS1 GGA → GAA reporter | This study |
| pFJP12 | | <i>rsmA</i> mini-CTX <i>lacZ</i> BS2 GGA → GAA reporter | This study |
| pFJP13 | | <i>rsmA</i> mini-CTX <i>lacZ</i> BS1/2 GGA → GAA reporter | This study |
| pFJP14 | | rsmA mini-CTX lacZ BS2 no hairpin reporter | This study |
| pFJP15 | | <i>rsmA</i> mini-CTX <i>lacZ</i> BS2 hairpin compensatory mutation reporter | This study |
| pFJP16 | | <i>rsmA</i> mini-CTX <i>lacZ</i> Shine-Dalgarno GGA → GAA reporter | This study |

Table 4.1 Strains/Plasmids used in this study

4.1.4.2 β-galactosidase assays

Activity of *lacZ* fusion reporters was tested for β -galactosidase activity with *o*nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG, Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) as substrate (Jeffrey H. Miller, 1972). Each experiment was performed in triplicate, at least twice. Overnight TSB cultures were diluted at a starting OD₆₀₀ of 0.05 in TSB and incubated as above. Results were obtained for five sampling points during bacterial growth over 8 hours.

4.1.4.3 Purification of hexahistidine-tagged RsmA

E.coli BL21(DE3) cells containing the pET29a(+)-RsmA-H6 plasmid were grown overnight in TSB with 30 µg kanamycin ml⁻¹. In the morning, the culture was diluted 1:100 in 100 ml of pre-warmed LB. Cells were grown to mid-log phase (OD₆₀₀ = 0.7) and isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture at a final concentration of 1 mM for protein expression induction. Cells were harvested after 4 hours. Cell pellets were resuspended in 20 ml of 0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, Tris-HCl, pH 7.65 and ruptured by sonication. Lysed cells were sedimented by centrifugation at 15,000 x g for 45 min at 4 °C. Prior to purification, the supernatant was filtered on a 0.22 µM nitrocellulose filter. RsmA-Hisx6 was purified by using a HisTrap[™] FF crude 5 ml column (GE Healthcare) with an Ätka FPLC system (GE Healthcare) following the manufacturer's recommendations. The protein-containing fractions were concentrated using a 10 kDa Amicon (Millipore) and the protein stored in a Tris-HCI (pH 7.63), 33% glycerol conservation buffer. Purity and identity of the protein was assessed by SDS-PAGE followed by triple quadrupole (Quattro Premier XE) mass spectrometry analysis. Concentration was estimated using a Bradford assay (Bio-Rad) with bovine serum albumin as standard. The concentrated protein was stored at -20°C until use.

4.1.4.4 RNA electrophoretic mobility shift assay

Fragments of *rsmA* mRNA were synthesized from PCR products using a T7 RNA polymerase. The primer sequences used are listed in Table 11.1. The T7 RNA polymerase promoter sequence was added to the 5' portion of the primers. The obtained PCR fragments were purified using a BioBasic (Canada) purification kit following the

manufacturer's recommendations. In vitro transcription was carried out in 20 µl reactions containing 20 pmol of purified PCR fragment, 2 mM of rNTPs, 10 µg pyrophosphatase ml⁻ ¹ (Roche), 80 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 24 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 2.5 mM spermidine, 1 unit of T7 polymerase, 1 mg competitor tRNA ml⁻¹ and completed with RNase-free dH₂O and incubated at 37 °C for a total of 3 hr. Once the transcription was completed, remaining DNA fragments were removed using 1 unit of RNase-free DNase I (Promega). RNA fragments were gel-purified on a 12% 8M urea denaturing PAGE and dephosphorylated using 2.5 pmol of RNA, 2 µl of 10X Antarctic phosphatase buffer, 1 unit per µl of Antarctic phosphatase enzyme and completing to 20 µl with RNase-free dH₂O. The 5' ends of the RNA fragments were radiolabelled by phosphorylation using 1 unit per µl of T4 PNK kinase and 1.85x10⁵ Bq [y³²P]-ATP. Labelled RNA fragments were gel-purified as described, resuspended in RNase-free dH₂O and stored at -20°C until use. The RNAbinding reaction consisted of the recombinant RsmA-His₆ dimer at various concentrations, radiolabelled RNA transcript (0.6 pM), 10 mM Tris-HCI (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM DTT and the final mixture adjusted to 20 µl with RNase-free dH₂O. The RNA-binding reaction was incubated at room temperature for 30 min, mixed with 3 µl of loading dye (40% sucrose, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue) and loaded on a 10% (29:1) native polyacrylamide gel using Tris-Borate EDTA (TBE) as the running buffer. A Typhoon PhosphorImager FLA9500 (GE Healthcare) and ImageQuant software were used for gel scanning and analysis.

4.1.4.5 Translational rsmA'-'lacZ fusion constructions

Specific point mutations in the *rsmA* upstream intergenic region and/or coding sequence, the entire upstream intergenic region of *rsmA* and its first 36 nucleotides of the ORF were synthesized by GenScript. The resulting plasmids were used to transform *E. coli* DH5α. Plasmid extractions were carried out using a miniprep kit (BioBasic, Canada) and purity was assessed by gel electrophoresis. The various mutated *rsmA* alleles and the *lacZ* genes were synthesized by PCR directly from plasmids using a different set of primers (Table 11.1). A fusion PCR between the synthesized *rsmA* transcripts and the first 668 bp of the *lacZ* gene was performed and the resulting fragment purified from a 1% agarose gel. The restriction-digested *rsmA*'-*'lacZ* fragments were ligated in pGEM-T Easy

(Promega), the plasmids were used to transform chemically-competent *E. coli* DH5 α via heat-shock and clones were selected on TSB agar plates supplemented with 100 µg carbenicillin ml⁻¹ after overnight incubation at 37 °C. Positive clones were identified by digesting miniprep products with *Eco*RI for the presence of the insert. Overnight double digestion at 37 °C of the pGEM-T Easy plasmids containing the inserts and the destination vector mini-CTX-*lacZ* was performed using *Pst*I (Fermentas) and *Aat*II (NEB) restriction enzymes. The released inserts were gel purified before ligation in the destination vector. Overnight ligation between the digested inserts and vector was performed using the Feldan T4 ligase following the manufacturer's guidelines. Selection of the clones was done on TSB agar containing 15 µg tetracycline ml⁻¹. Positive clones were identified by double digestion of miniprep products. The mini-CTX-*lacZ* plasmids containing the different constructions were conjugated into wild-type *P. aeruginosa* PA14 strain for integration in the unique *attB* site (Hoang *et al.*, 1998), giving stable, chromosomal translational reporters.

4.1.5 Results

4.1.5.1 RsmA represses its own expression

Several recent reports (and unpublished data from our laboratory) have shown that the major *rsmA* transcriptional start site during planktonic cell growth starts at position -40 before the ATG codon (Dötsch *et al.*, 2012, Marden *et al.*, 2013, Wurtzel *et al.*, 2012). Analysis of the primary sequence of the *rsmA* 5'UTR shows that many GGA trinucleotides are present in that region (Figure 4.1a). Knowing that proteins of the CsrA/RsmA family associate with a GGA trinucleotide exposed in the loop portion of a stem-loop generally located close to the ribosomal binding site on their target mRNAs and blocks their translation (Dubey *et al.*, 2005), we hypothesized that a possible auto-regulation of RsmA on its own messenger RNA is possible in *P. aeruginosa*. Thus, to investigate if such a regulation either at the transcriptional or translational level exists, we monitored the expression of *rsmA* in various backgrounds using a chromosomal *rsmA'-'lacZ* reporter containing the whole *rsmA* intergenic region and the first 12 codons of its coding sequence (Figure 4.2b). As shown in Figure 4.1c, the expression of *rsmA* is increased in a *ΔrsmA* mutant background when compared to the wild-type, suggesting that RsmA is, in some way, responsible for negatively affecting its own expression either at the transcriptional or translational level.







(a) Primary sequence analysis of *rsmA*. Underlined: GGA trinucleotides. Nucleotide in bold: -40 transcriptional start site. Boxed, Shine-Dalgarno sequence. ATG codon in bold = Translational start site (b) Fusion of the entire *rsmA* intergenic region and the first twelve codons of its coding sequence with the 5' end of the *lacZ* gene. RBS = Ribosomal binding site. ATG = +1 (c) Expression of *rsmA* during early growth-stage using a wild-type reporter in various genetic backgrounds. Reporter gene activity is shown as a ratio of Miller units on OD₆₀₀. Data represent the average of triplicate cultures. Error bars represent the standard deviation of triplicates.

4.1.5.2 RsmA binds to its own coding sequence

To further clarify how RsmA negatively affects its own expression, RNA mobility shift assays were carried out to determine whether or not RsmA can directly bind its own mRNA, thus promoting negative regulation specifically of its own translation. Upon testing the RNA fragments including the presence of possible RsmA binding sites, we found that all the tested RNA molecules were bound by RsmA, thus blocking its own translation (Figure 4.2). Unexpectedly, we observed that the coding sequence of *rsmA* was by itself sufficient for a protein-RNA interaction (lane ATG). Regulation of target mRNAs by proteins of the CsrA/RsmA family is usually exerted on the 5' UTR of a transcript. To understand this result, we used in silico RNA folding of the full rsmA coding sequence to identify if a probable RsmA binding site in the ORF is present, which might be responsible for the observed effect. Indeed, upon analysis, a putative RsmA binding site at position +25 after the translation start codon was identified (Figure 4.3). Given that the major rsmA transcriptional start site is located at position -40 before the AUG codon, we investigated a portion of the rsmA transcript spanning from -40 to +38 around the start codon, allowing for the formation of two possible RsmA binding sites (BS1 & BS2), to test whether or not the observed in vitro interaction was due to these two predicted RsmA binding sites (Figure 4.3). Interestingly, the GGA trinucleotide present in the Shine-Dalgarno sequence was never found to be exposed in a loop portion of a stem-loop during in silico analyses. Thus, we decided not to focus on that portion of the mRNA. Indeed, upon testing by RNA mobility shift assays, we observed that RsmA binds the wild-type -40 to +38 transcript (Figure 4.4a, WT). Next, to decipher which of BS1 or BS2 is responsible for this RsmA*rsmA* interaction promoting negative translational regulation, we inserted point mutations only affecting the primary nucleotide sequence at various positions in the wild-type -40 to +38 transcript. The presence of RsmA binding sites was confirmed by the abolition of protein-RNA interaction when GGA trinucleotides were mutated into GAA in BS1, BS2 or both (Figure 4.3), when compared to the wild-type transcript (Figure 4.4a). Looking at the effect of an alteration in the secondary RNA structure on RsmA-rsmA regulation, we disrupted the formation of the predicted hairpin structure of BS2 in the early coding sequence of rsmA (Figure 4.3, GG \rightarrow CC). The introduction of such a mutation induced a loss of interaction between rsmA and RsmA (Figure 4.4b, M4). Confirming BS2, the

further introduction of a compensatory mutation that reinstated in M4 the formation of the hairpin structure to a wild-type conformation (Figure 4.3, CC \rightarrow GG) restored the affinity for RsmA towards its own transcript (Figure 4.4b, M5). These results demonstrate that not only the primary nucleotide sequence is important for protein-RNA interaction, but also the presence of secondary RNA structures is essential for RsmA-*rsmA* interaction.



Figure 4.2 RNA mobility shift assay with purified RsmA

Determination of RsmA-*rsmA* interaction using radiolabelled RNA fragments and purified RsmA. Odd lanes, RNA with protein. Even lanes, RNA fragment only. The -92, -85, -40,-20 and ATG sites represent the 5' end of the RNA molecule relative to the ATG codon. The 3' end of each fragment is the TGA (stop) codon of *rsmA*. RsmY sRNA was used as positive control in the experiment. B: Bound RNA. F: Free RNA





RNA folding prediction of the *rsmA* -40 to +38 sequence using M-Fold. Boxed: Putative RsmA-binding sites. BS1: Binding site 1. BS2: Binding site 2. Curved lines: GGA trinucleotides. RBS: Ribosomal binding site. Arrows = Inserted nucleotide polymorphisms. * AUG (start) codon of *rsmA*





(a) Effect of GGA → GAA trinucleotide mutations on the -40 to +38 radiolabelled RNA fragments for RsmA binding. WT = wild-type -40 to +38 rsmA fragment. M1 = GGA \rightarrow GAA in BS1. M2 = GGA \rightarrow GAA in BS2. M3 = GGA \rightarrow GAA in BS1 and BS2. (b) Effect of destabilizing hairpin mutation on RsmA binding. M4 = rsmA fragment with no hairpin in BS2 $(GG \rightarrow CC)$. M5 = rsmA fragment with compensatory hairpin mutation in BS2 (CC \rightarrow GG). Odd lanes, RNA with protein. Even lanes, RNA fragment only. WT rsmA fragment was used as positive control in the experiment.

M4

M5

RNA:

4.1.5.3 In vivo rsmA self-regulation is driven by multiple binding sites

To investigate the relevance of each identified RsmA binding sites (BS1 and BS2). the same point mutations used in our *in vitro* gel shift assays were introduced in an *in vivo* setting by constructing various translational *rsmA'-'lacZ* reporters (Figure 11.1). Compared to the wild-type (Figure 4.5a), the substitution of a GGA to a GAA trinucleotide located in BS1 does not affect the capacity of RsmA to bind to its own transcript since the translational expression of rsmA'-'lacZ was still upregulated in a $\Delta rsmA$ background (Figure 4.5b). However, the introduction of the same mutation within BS2 located in the coding sequence resulted in a complete loss of translational regulation by RsmA on itself (Figure 4.5c). Surprisingly, the abolishment of both potential binding sites in BS1 and BS2 restored a wild-type expression pattern of rsmA'-'lacZ where inhibition of rsmA was observed (Figure 4.5d). Since the RsmA-binding site located within BS2 seems to be more important for RsmA-rsmA interaction in an *in vivo* setting, we tested the effect of a destabilizing hairpin mutation on the translation of *rsmA*. We observed that the deletion of the stem-loop structure abolished the capacity of RsmA to repress its own translation since there was no significant difference in *rsmA* translation between a $\Delta rsmA$ strain and wild-type (Figure 4.5e). Conversely, the introduction of a compensatory mutation that restored the hairpin structure allowed for the capacity of RsmA to interact with its transcript and inhibit the translation (Figure 4.5f).



Figure 4.5 Time-course expression of *rsmA* determined by using a translational *rsmA'-lacZ* reporter (a) Expression of wild-type -40 *rsmA'-lacZ* reporter (b) Expression of *rsmA* containing a GGA \rightarrow GAA in BS1. (c) Expression of *rsmA* with a GGA \rightarrow GAA in BS2. (d) Expression of *rsmA* with GGA \rightarrow GAA in BS1 and BS2. (e) Expression of *rsmA* with a destabilized hairpin (GG \rightarrow CC) in BS2. (f) Expression of *rsmA* with a compensatory hairpin mutation (CC \rightarrow GG) in BS2. Reporter gene activity is shown as a ratio of Miller units on OD₆₀₀. Data represent the average of triplicate cultures. Error bars represent the standard deviation of each triplicate.

4.1.6 Discussion

Translational regulation of target genes by the CsrA/RsmA protein family generally occurs by binding of the protein to a GGA motif exposed in a loop of a stem-loop located in the Shine-Dalgarno region of the 5' UTR of a mRNA, thus hindering the ribosome formation (Dubey *et al.*, 2005). In our study, the identification of several GGA trinucleotides in the primary sequence of the 5'UTR of *rsmA* initially suggested that an autoregulation of RsmA was possible, maybe similar to what has been observed for CsrA in *E. coli* (Yakhnin *et al.*, 2011b). Using a translational *rsmA'-'lacZ* reporter, we indeed observed that *rsmA* translation was de-repressed in a $\Delta rsmA$ background. However, we could not decipher at this point if the observed effect was due to direct regulation implicating RsmA or *via* another regulator at the transcriptional or translational level.

To understand how RsmA affects its own expression, we used both in vitro and in vivo approaches to unravel the mechanisms implicated in this regulation. Our initial shift assays unexpectedly indicated that the coding sequence of rsmA alone was sufficient for protein-RNA interaction, which is atypical for regulators of the CsrA/RsmA family. RNA folding predictions of the full-length rsmA ORF revealed the presence of a potential RsmA binding site at position +25 after the start codon. Using the *rsmA* major transcriptional start site (position -40) that was identified in three independent studies (Dötsch et al., 2012, Marden et al., 2013, Wurtzel et al., 2012) and corroborated in our laboratory (data not shown), we performed shift assays with a shorter rsmA RNA molecule spanning positions -40 to +38 relative to the AUG codon, including our structure of interest. We observed that RsmA was indeed capable of binding its own mRNA, thus directly negatively-regulating its own translation. However, a second possible, more conventional, binding site located in the 5' UTR of the same RNA molecule that could be implicated in protein-RNA interaction was also identified. To investigate these BS1 and BS2 binding sites, we introduced point mutations, potentially affecting the capacity of RsmA to bind to the mRNA, in strategically located positions in the transcript by (i) modifying the GGA trinucleotide exposed in the loop portion of a stem-loop, and (ii) destabilizing the predicted hairpin structure, both elements known to be important for RsmA binding activity, or (iii) restoring the formation of the latter. As expected, disrupting elements required for RsmA
binding activity abolished the capacity of RsmA to bind its own mRNA. Furthermore, the insertion of a compensatory stem-loop mutation restored a wild-type interaction. supporting the importance of the presence of a stem-loop structure for RsmA-rsmA interaction in vitro (Figure 11.2). To confirm our results in vivo, we constructed various translational rsmA'-'lacZ reporters containing the same point mutations used in our RNA shift assays (Figure 11.1) and containing both BS1 and BS2 identified to be important for RsmA-rsmA interaction. The determination of the rsmA'-'lacZ activity using a construct containing a GGA \rightarrow GAA mutation in BS1 resulted in no difference in translational regulation when compared to the wild-type rsmA'-'lacZ reporter. This suggested that BS1 is not a critical regulatory binding site for RsmA self-regulation, leaving BS2 as the major RsmA target site. Indeed, when we inserted a similar mutation within the GGA trinucleotide exposed in BS2, we completely abolished the capacity of RsmA to repress its own translation, suggesting that this binding site is the major element responsible of RsmA-mediated auto-regulation. However, the introduction of a GGA \rightarrow GAA mutation in both BS1 and BS2 resulted in wild-type rsmA regulation., If BS2 is indeed the dominant regulatory switch, the absence of these two binding sites should be somewhat similar to what was observed for rsmA'-'lacZ activity for the mutation in BS2. Still, the importance of BS2 in vivo was further supported by the loss of regulation by RsmA on itself when a destabilizing mutation of the hairpin structure was inserted. Indeed, during early cellular growth, a negative translational regulation was noticeable but was lost during the other growth stages. Furthermore, the introduction of a compensatory mutation allowing the formation of the hairpin structure re-established a wild-type regulation of RsmA on itself.

Overall, our results indicate that RsmA is a major regulatory factor affecting *rsmA* at the translational level, but that another, still unidentified, regulatory element is likely involved. RsmN, a novel RNA-binding protein different from the CsrA/RsmA protein family, could have been the mediator in such translational control. However, it has already been established that RsmN cannot directly affect RsmA translation (Marden *et al.*, 2013). To exclude the possibility of RsmA blocking its own translation through a GGA located in the Shine-Dalgarno sequence typically important for CsrA/RsmA-mediated regulation of mRNAs, we introduced a GGA to GAA nucleotide substitution in that region (Figure 11.1). The insertion of such a mutation did not affect the capacity of RsmA to bind to its own

transcript *in vitro* nor did it have an effect on *rsmA* translation (Figure 11.3 and Figure 11.4). Therefore, in *P. aeruginosa* and conversely to what has previously been reported for proteins of the CsrA/RsmA family, the presence of an RsmA binding site in the early portion of its coding region supersedes the need for the presence of a GGA in the region of the Shine-Dalgarno for *rsmA* self-regulation itself. A recent study characterizing RsmN also noticed that RsmA can bind its own mRNA *in vitro* (Marden *et al.*, 2013) but did not investigate the RsmA binding site.

Our data strongly indicates that RsmA self-regulation in *P. aeruginosa* diverges from the conventional protein-RNA regulation by proteins of the CsrA/RsmA family since the main binding site is located in the *rsmA* coding sequence. Furthermore, this regulation is more complex than initially thought and might implicate additional unknown regulatory elements acting at the translational level. This strengthens the importance of the control over *rsmA* through complex multiple alternative regulatory mechanisms since it is a global regulator. To our knowledge, this is the first report of such a phenomenon in pseudomonads. The presence of a similar unorthodox regulation mechanism has been reported in a study investigating the regulation of CsrA on the sdiA mRNA in E. coli (Yakhnin et al., 2011a). These authors demonstrated that CsrA could directly bind to two sites in the early coding sequence of that target gene, thus preventing translation by the ribosome. Thus such an unusual regulatory mechanism exists in proteobacteria but has yet to be further elucidated. Regulatory RNA elements are typically not sought in coding sequences since they are considered to be mostly limited to UTR regions. However, our results indicate otherwise and suggest that unexplained results previously reported in studies investigating the targets of RsmA (Brencic et al., 2009a) could be explained by other instances of the new mechanism identified here. Indeed, the RsmA protein was found to be capable of pulling-down mRNA transcripts in their coding sequences in a study performed by(Brencic et al., 2009a).

Lastly, sequence alignment of multiple *rsmA* coding sequences from other *P*. *aeruginosa* strains (PAO1, PA7) shows that the RsmA binding site identified in this study is also present, indicating that this new mechanism is likely a feature of this species. In contrast, the RsmA binding site in the early coding sequence is absent from other

Pseudomonas species (*P. stutzeri*, *P. fluorescens* and *P. entomophila*), suggesting different mechanisms for environmental adaptation to different ecological niches since RsmA is a pleiotropic gene regulator.

4.1.7 Acknowledgements

We thank Dr. Steve Lory for providing the pET29(+)-RsmH₆ expression plasmid, Marie-Christine Groleau for helpful discussions and Balasubramanian Sellamuthu for technical help. This study was supported by Canadian Institutes of Health Research operating grant MOP-97888. ED holds a Canada Research Chair in Sociomicrobiology

5 PUBLICATION #2 – BROTH VERSUS SURFACE-GROWN CELLS: DIFFERENTIAL REGULATION OF RSMYZ SMALL RNAS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BY THE GAC/HPTB SYSTEM

Fabrice Jean-Pierre¹, Julien Tremblay^{1,2} and Eric Déziel¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7,

Canada

²National Research Council Canada, Montréal, Canada

Journal: Frontiers in Microbiology

Soumission: 5 juillet 2016

Acceptation : 23 décembre 2016

Publication : 10 janvier 2017

DOI : 10.3389/fmicb.2016.02168

Recherche publiée dans le cadre de la 2ème partie de mon doctorat

Contribution des auteurs

Fabrice Jean-Pierre : Mise en place et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

Julien Tremblay : Mise en place des expériences

Eric Déziel : Planification du *design* expérimental, analyse et discussion des résultats, commentaires et révision du manuscrit.

5.1.1 Résumé en français

Les bactéries ont la capacité de s'adapter rapidement à des situations changeantes par, entre autres, l'utilisation de S2C responsables d'affecter la régulation génétique bactérienne globale. Chez le pathogène opportuniste de l'Homme Pseudomonas aeruginosa, les pARN RsmY et RsmZ sont sous le contrôle du S2C GacS/GacA. Ces pARN sont des éléments-clés dans le contrôle des comportements bactériens planctoniques et de surface. De plus, ils jouent un rôle dans la régulation génique globale en titrant la disponibilité du régulateur post-transcriptionnel RsmA, qui affecte l'expression de plus de 500 gènes. En utilisant la motilité de type swarming comme modèle, nous avons démontré que ces pARN sont différemment régulés dépendamment des conditions de croissance sélectionnées (c'est-à-dire cellules planctoniques versus en surface). Aussi, nous avons identifié que contrairement à des cellules cultivées en bouillon, la régulation de RsmZ n'implique pas la présence du régulateur-clé GacA chez des cellules adoptant une motilité de type swarming. Finalement, nous avons établi que l'expression de RsmY et RsmZ influence cette motilité de surface via la protéine HptB qui agit en tant que régulateur négatif de ces pARN et que ces derniers ne convergent pas strictement vers le régulateur RsmA comme précédemment rapporté.

Résultats – Article #2

5.1.2 Abstract

Two-component systems are capable of profoundly affecting genetic regulation in bacteria by detecting environmental stimuli and allowing them to quickly adapt. In *Pseudomonas aeruginosa*, the small RNAs (sRNAs) RsmY and RsmZ are under the control of the GacS/A system. They have been described as one of the major key players in the control of planktonic and surface-associated behaviors. Genetic regulation by these sRNAs is achieved by the titration of the negative post-transcriptional regulator RsmA which affects the expression of over 500 genes. There is increasing evidence pinpointing the importance of RsmY and RsmZ in the planktonic-sessile *P. aeruginosa* lifestyles switch control. Using swarming motility as a model process, we show here that these sRNA are differentially regulated depending on the selected growth conditions (*i.e.* planktonic *versus* surface grown-cells). Also, we report that contrary to planktonically-grown cells, *rsmZ* regulation does not implicate the response regulator GacA in swarming cells. Furthermore, we present data indicating that RsmY/Z expression influences swarming motility *via* the protein HptB which acts as a negative regulator of these sRNAs and that they do not strictly converge at RsmA as previously reported.

5.1.3 Introduction

Bacterial survival in the environment relies on their capacity to quickly adapt to changing conditions by either inducing or repressing specific sets of genes (Boor, 2006). Some bacteria have the ability to colonize a broad range of hosts using virulence functions (Furukawa *et al.*, 2006). One such adaptation mechanism consists of two-component systems (TCS) (Hoch *et al.*, 2001), membrane-bound sensors coupled to cytoplasmic response regulators that permit the integration of external stimuli and induce global gene expression shifts (Beier *et al.*, 2006). The heterotrophic opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* exemplifies such a remarkable capacity to adapt to changing environments by encoding more than 60 TCS on its genome (Rodrigue *et al.*, 2000). The GacS/GacA two-component system has been extensively described over the years and is central in regulating the expression of the two small RNAs (sRNAs), RsmY and RsmZ. Mainly controlled by the response regulator that modulates the expression of functions implicated in the transition between surface-associated and planktonic *P. aeruginosa* lifestyles (Brencic *et al.*, 2009a, Brencic *et al.*, 2009b, Hoch *et al.*, 2001).

Swarming motility is a surface-associated type of bacterial motility characterized by a rapid and coordinated movement of a bacterial population on a viscous surface (Kearns, 2010). In *P. aeruginosa*, this type of bacterial movement necessitates the presence of functional flagella and the production of rhamnolipids (and other RhIABC products) responsible for both the modulation of surface behavior and lowering of surface tension (Déziel *et al.*, 2003, Tremblay *et al.*, 2007). Over the years, swarming motility has been linked to many phenotypes, such as increased antibiotic resistance, and to be inversely regulated to another surface bacterial behavior, biofilm formation, (Caiazza *et al.*, 2007, Lai *et al.*, 2009). Given that swarming motility represents a distinct bacterial lifestyle from planktonic and sessile cells, many studies have been aimed at understanding how this surface behavior is regulated. Over the years, the secondary messenger molecule, c-di-GMP has been shown to have a profound impact over the motile-sessile behavior in the bacteria. In *P. aeruginosa*, its implication in swarming motility is still not clear and is a matter of active research as contradictions such as the

non-correlation between surface behavior and c-di-GMP production have been reported (A. E. Baker et al., 2016, Caiazza et al., 2007, Kuchma et al., 2007, Merritt et al., 2007). Excluding the impact of secondary messengers, this surface behavior is still poorly understood at the expression level. To better characterize swarming motility, Overhage et al., (2008), defined how this surface behavior was affected and observed that many virulence genes were upregulated in swarming cells compared to their planktonic (freeswimming) counterparts (Overhage et al., 2008). To further dissect and understand the complexity of swarming motility, our group previously (Tremblay et al., 2010) conducted a transcriptomic analysis of swarming cells compared to bacteria that were grown on the same agar-solidifed medium, but just dried longer to prevent swarming motility (moist surface vs. dry surface). In contrast with Overhage et al., (2008) we found that cells at the migrating tip of a swarming colony downregulated virulence factor expression but upregulated genes associated with energy metabolism. The apparent discrepancies between the two studies were explained by differences in experimental design. Indeed, Overhage et al., compared cells at the swarm tip against planktonic cells (surface vs broth) whereas Tremblay & Déziel (2010) compared moist surface vs dry surface. The observation of such different results between these two studies also raised the possibility of the existence of unknown regulation pathways specific to surface-grown cells within the context of swarming motility.

The study of swarming motility at the regulatory level is complex given that two critical factors, namely flagellar function and biosurfactant production, are imperative for this surface behavior. Thus, to better understand the regulation of swarming motility, it is helpful to identify mutants incapable of such a social type of displacement while still possessing a functional flagellum and with no defect in production of rhamnolipids. Interestingly, a mutation in the *hptB* gene, encoding one of the three histidine phosphotransfer proteins implicated in signal transduction in *P. aeruginosa*, was reported to negatively affect swarming motility (Hsu *et al.*, 2008). A microarray analysis of a $\Delta hptB$ mutant has shown that many flagellar-related genes are affected, but surprisingly no defect in swimming motility was observed (Bhuwan *et al.*, 2012). Also, the production of rhamnolipids was never addressed in these studies, thus not covering all the possibilities as to why such a mutant is deficient in swarming motility. Furthermore, HptB was reported

to interact with hybrid sensor kinases, one of which is (RetS) implicated in the control of the GacS/GacA system to affect global gene expression (Bordi *et al.*, 2010, Brencic *et al.*, 2009b, Goodman *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2006). Interestingly, Bordi et al, (2010) determined that HptB mediates its effect through the modulation of the sRNA RsmY exclusively.

In the present study, we demonstrate how HptB affects swarming motility *via* modulation of sRNA expression for both RsmY and RsmZ and that the swarming default of an $\Delta hptB$ mutant is not associated with flagellar malfunction nor insufficient biosurfactant production. Comparing $\Delta hptB$ mutant cells cultivated in planktonic *versus* surface conditions, we show that both *rsmY* and *rsmZ* are negatively regulated by HptB. Furthermore, HptB-mediated *rsmZ* expression control is stronger in swarming cells and, unexpectedly, not under the absolute control of the GacA response regulator.

5.1.4 Materials and methods

5.1.4.1 Strains, plasmids, and growth conditions

Bacteria used in this study are all derived from the parental strain PA14 (Daniel G. Lee *et al.*, 2006, Rahme *et al.*, 1995) and are listed in Table 5.1. Bacteria were cultivated at 37 °C in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco) with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick) or on TSB plates solidified with 1.5% agar. For swarming motility assays, overnight cultures were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and diluted to the desired OD₆₀₀ (final 3.0). For transcriptomic analyses, the bacteria were cultivated in M9 minimal medium supplemented with 11 mM dextrose and 0.5% casamino acids (Difco) (M9DCAA) broth at 34 °C (Tremblay *et al.*, 2008). OD₆₀₀ was measured with a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) and pathlength correction was applied by multiplying the given value by a factor of 10.

| Strains/Plasmids | ED # | Phenotype/Genotype | Reference |
|---------------------|------|---|------------------------------------|
| E. coli | | | |
| DH5α | 78 | fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 | (Woodcock <i>et al.</i> , 1989) |
| SM10 (λpir) | 222 | thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2- Tc::Mu Km ^R λpir | (Simon <i>et al</i> ., 1983) |
| P. aeruginosa | | | |
| PA14 | 14 | UCBPP-PA14 wild-type strain | (Rahme <i>et al.</i> , 1995) |
| ∆hptB | 1214 | Markerless deletion of <i>hptB</i> in PA14 | This study |
| ΔrsmY | 1971 | Markerless deletion of <i>rsmY</i> in PA14 | Laboratory collection |
| ∆rsmZ | 1976 | Markerless deletion of <i>rsmZ</i> in PA14 | Laboratory collection |
| ΔrsmYZ | 1998 | Markerless deletion of <i>rsmY</i> and <i>rsmZ</i> in PA14 | Laboratory collection |
| gacA ⁻ | 1800 | <i>MrT7</i> transposon mutant ID 34781 Gm ^R | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| ∆hptBgacA | 2654 | Markerless <i>hptB</i> deletion in PA14, <i>gacA::MrT7</i> transposon mutant ID 34781 Gm ^R | This study |
| ∆hptBrsmY | 2831 | Markerless deletion of <i>hptB</i> and <i>rsmY</i> in PA14 | This study |
| ∆hptBrsmZ | 2832 | Markerless deletion of <i>hptB</i> and <i>rsmZ</i> in PA14 | This study |
| Δ hptBrsmYZ | 2833 | Markerless deletion of <i>hptB, rsmY</i> and <i>rsmZ</i> in PA14 | This study |
| Plasmids | | | |
| pEX18Tc | | Suicide vector in <i>P. aeruginosa SacB</i> , Tc ^R | (Hoang <i>et al.</i> , 1998) |
| pJT39 | 1306 | Suicide vector containing the <i>hptB</i> gene with a deleted histidine phosphotransfer domain | This study |
| pEXG2-∆ <i>rsmY</i> | | Suicide vector for $\Delta rsmY$ mutation construction | (Brencic <i>et al.</i> , 2009b) |
| pEXG2-∆ <i>rsmZ</i> | | Suicide vector for $\Delta rsmZ$ mutation construction | (Brencic <i>et al.</i> , 2009b) |

Table 5.1 Strains/Plasmids used in this study

5.1.4.2 Construction of the $\Delta hptB$ knock-out mutant

Deletion of the Hpt domain of the *hptB* gene (PA3345 in PAO1 and PA14_20800 in PA14) was performed as follows. Two fragments of DNA were amplified from PA14 genomic DNA using pairs of primers PA3345_Left_FWD and PA3345_Left_REV for the left fragment and PA3345_Right_FWD and PA3345_Right_REV for the right fragment. These fragments were ligated together using a complementary engineered overhang sequences of 15 nucleotides common to PA3345_Left_REV and PA3345_Right_FWD. The DNA fragment was then cloned in the MCS of pEX18Tc using restriction enzymes HindIII and Smal. The resulting plasmid (pEX18Tc_ $\Delta hptB$) was used to transform *E. coli* SM10 on TSB plates containing 15 µg ml⁻¹ of tetracycline (Tc). A two partner conjugation between PA14 and SM10-pEX18Tc_ $\Delta hptB$ was then performed. Tetracycline resistant simple recombinants were selected on tetracycline 125 µg ml⁻¹ TSB plates and streaked onto TSB without antibiotic overnight. Double recombinants were selected by plating these overnight grown cells on LB (without NaCl) supplemented with 8% sucrose. Positive clones were confirmed by PCR and sequencing.

5.1.4.3 Motility assays

Swarming motility assays were performed using the same medium as for swimming motility tests but with 0.5% agar. Once autoclaved, the semi-solid agar was dried in a laminar biological safety cabinet for 75 minutes. Swarming plates were inoculated with 5 µl of a bacterial subculture grown in TSB to early stationary phase and adjusted to an OD₆₀₀ of 3.0 in sterile 1X PBS. Plates were then incubated overnight at 34 °C (Tremblay *et al.*, 2008). Time-lapse image analysis was done using Photoshop CS3 Extended (Adobe).

Swimming motility plates were generated by inoculating 3 μ l of bacterial suspension at an OD₆₀₀ of 3.0 directly inside LB or M9DCAA plates solidified with 0.25% agar. The swimming diameter was measured after overnight incubation at 34 °C. Experiments for testing swimming and swarming motility were performed with a minimum of three to five technical replicates on two separate days. Statistical analysis was done using Prism version 6.0 (GraphPad).

5.1.4.4 RNA preparation

Total RNA was extracted from liquid bacterial cultures grown in triplicate in M9DCAA cultivated to late exponential phase ($OD_{600} = 1.3$) at 34 °C. The cells were then centrifuged for 5 minutes at 12,000 x *g* and the supernatant was discarded. Cells were resuspended in PureZOL (BioRad) and RNA extraction was performed following the manufacturer's recommendations. For surface-grown bacteria, RNA was collected from the cells located at the migrating tip of a swarming colony grown for 12 hours at 34 °C using 8 µl of RNAlater (Qiagen) that was put directly on each tendril tip, as previously described (Tremblay *et al.*, 2010). Cells were resuspended by pipetting and transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube kept on ice. An average of 8 migrating tendril tips were harvested per plate with three plates for each biological replicate for a total of 9 plates. RNA extraction was performed using PureZOL.

5.1.4.5 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR was done with the *qScript*TM *One-Step SYBR Green* kit and a RotorGene 6000 (Corbett) thermocycler. Primers were designed in order to obtain amplicons of 80 to 150 bp (<u>http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</u>). The *nadB* gene was used as control. Each cycle of qRT-PCR was done in triplicate. The threshold cycle (*C*t) was normalized to *nadB C*t amplified in each corresponding samples. Variation in expression was calculated using the $-2^{\Delta\Delta Ct}$ method (Livak *et al.*, 2001). Assessment of variation in expression was performed using biological triplicates on two different days. Statistical analysis was done using Prism version 6.0 (GraphPad). Gene expression variation is shown as Relative expression variation (log₂) to the wild-type PA14 strain.

5.1.4.6 LC/MS rhamnolipids quantification

Concentrations of rhamnolipids were determined by liquid chromatography(LC)/mass spectrometry (MS) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014). A 400 μ l sample of a liquid overnight culture was collected and the OD₆₀₀ was measured. Then the samples were centrifuged at 16,000 x *g* for 10 min. to remove bacterial cells. To 300 μ l of supernatant, 300 μ l acetonitrile containing 20 mg/L 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) as the internal standard were added. Samples were analyzed

by high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters 2795, Mississauga, ON, Canada) equipped with a C8 reverse-phase column (Kinetex, Phenomenex) using a water/acetonitrile gradient with a constant 2 mmol I-1 concentration of ammonium acetate. The detector was a mass spectrometer (Quattro Premier XE, Waters). Analyses were carried out in the negative electrospray ionization (ESI-) mode.

Surface biosurfactant production was measured by inoculating swarming plates with the $\Delta hptB$ mutant and the wild-type strain. After overnight incubation at 34 °C, all the agar was recovered from the Petri dishes and transferred to an Erlenmeyer flask containing 1:1 (v/v) KHCO₃ (pH 9.0) (*i.e.* for five 20 ml swarm plates, 100 ml of KHCO₃ was added). The collected agar was vigorously mixed for 1 h at room temperature then filtered through Whatman no. 1 covered with silica sand (Fisher). The filtrate was acidified at pH 4.0 with concentrated HCl then extracted three times with 50 ml ethyl acetate. The organic phases were pooled, evaporated and the residue analyzed as described above. Total biomass was quantified by resuspending bacteria on the swarm plates twice with 1 ml PBS then transferred to pre-weighed aluminum boats, dried at 65 °C for two hours and then weighed again. Biomass was measured by preparing a parallel swarm set in identical conditions for rhamnolipid quantification. Rhamnolipid quantification was done using Prism version 6.0 (GraphPad)

5.1.5 Results

5.1.5.1 HptB-mediated swarming regulation does not implicate flagellar malfunction nor a default in rhamnolipids production

There is increasing evidence for the implication of the HptB phosphotransfer protein in the modulation of several *P. aeruginosa* behaviors (Bordi *et al.*, 2010, Hsu *et al.*, 2008, Kong *et al.*, 2013). Recently, swarming motility has been identified as being under the control of the HptB regulon, which was determined to include flagella-related genes (Bhuwan *et al.*, 2012); however, surprisingly, no effect was seen on flagellar functionality. To further characterize the role of HptB in the regulation of the swarming surface-associated behavior, we engineered a markerless $\Delta hptB$ mutant by deleting the entire histidine phosphotransfer domain (Hsu *et al.*, 2008). As previously noted by Hsu et al.,

for strain PAO1, inactivation of the *hptB* gene in strain PA14 results in the loss of swarming motility (Figure 5.1A). A functional flagellum and the production of RhIABC products (mostly rhamnolipids) are elements required for swarming motility (Caiazza *et al.*, 2005, Déziel *et al.*, 2003, Kohler *et al.*, 2000, Tremblay *et al.*, 2007). Thus, we verified whether or not flagellar functionality is responsible for the $\Delta hptB$ mutant swarming phenotype by performing swimming motility assays. As shown in Figure 5.1B, the $\Delta hptB$ mutant still has a functional flagellum in both tested conditions. The production of rhamnolipids was also verified both in planktonic cultures and directly on swarm plates. The $\Delta hptB$ mutant produces an equivalent amount of biosurfactant compared to the wild-type strain when incubated in M9DCAA broth (Figure 5.1C). When looking at production of rhamnolipids by swarming cells directly from plates the $\Delta hptB$ mutant is not impaired but rather displays increased biosurfactant production (Figure 5.1D). Absence of a growth defect by the $\Delta hptB$ mutant (Figure 11.5) excludes known factors for the observed deficient swarming phenotype. We conclude that HptB positive control on swarming motility does not go through the known required factors.



Figure 5.1 A mutation in the *hptB* gene affects swarming motility.

(A) Swarming motility phenotypes of the wild-type PA14 strain and the $\Delta hptB$ mutant. (B) Swimming motility assay in various media containing 0.25% agar. (C) Rhamnolipids quantification in planktonic cultures. (D) Rhamnolipids quantification on swarming plates. Error bars represent the standard error of the mean for experiments carried out at least twice with a minimum of three replicates per experiment. Student's *t*-test analysis was applied on two independent experiments with *, p < 0.05; **, p < 0.01; ns = not significant.

5.1.5.2 Swarming motility is linked to sRNAs expression

There are indications that expression of the swarming phenotype is positively regulated by RsmA and antagonized by the small RNAs, RsmY and RsmZ (Heurlier *et al.*, 2004, Kay *et al.*, 2006). For cells cultivated in broth cultures, HptB negatively affects the expression of RsmY specifically, but with no effect on RsmZ (Bordi *et al.*, 2010). Since the mode of bacterial growth (*i.e.* cells grown planktonically *versus* on a surface) can affect the output of genetic regulation (Overhage *et al.*, 2008, Tremblay *et al.*, 2010), we monitored the expression of both *rsmY* and *rsmZ* in bacteria grown in both planktonic and swarming cultures. In agreement with what was seen in strain PAK (Bordi et al., (2010)),

the RsmY sRNA was also overexpressed in the PA14 $\Delta hptB$ mutant grown in broth cultures while a small (and previously unreported) increase in expression of RsmZ was also observed (Figure 5.2A). Surprisingly, when the same experiment is carried out on swarming cells sampled at the migrating tip of a swarming colony, a marked increase of 2 log₂ in *rsmZ* expression was observed when compared to its planktonic counterpart (Figure 5.2A), suggesting specific upregulation by surface growth. We therefore looked at the swarming phenotypes of $\Delta rsmY$, $\Delta rsmZ$ and $\Delta rsmYZ$ mutants and observed that they all exhibit a hyperswarming phenotype (Figure 5.2B), when compared to the wild-type (Figure 5.1A). To precisely confirm this hyperswarmer behavior, we measured the area covered by the swarming colony using time-lapse image analysis: $\Delta rsmY$ and $\Delta rsmZ$ behave the same way while the increased swarming phenotype of the double mutant is even more pronounced than both simple mutants (Figure 5.2C & Figure 11.6).

To verify the hypothesis that the swarming defect of the $\Delta hptB$ mutant is directly caused by the overexpression of *rsmY* and *rsmZ*, we constructed double $\Delta hptBrsmY$, $\Delta hptBrsmZ$ and triple $\Delta hptBrsmYZ$ mutants. Significantly, the introduction of either a *rsmY* or a *rsmZ* mutation in a $\Delta hptB$ background resulted in rescue of the swarming phenotype, yet not identical as the pattern observed for the single $\Delta rsmY$ and $\Delta rsmZ$ mutants (Figure 5.3A). Finally, swarming motility of the triple $\Delta hptBrsmYZ$ mutant exhibited exactly the same phenotype as the double $\Delta rsmYZ$ (Figure 5.3B). Taken together, these results support a model where HptB promotes swarming motility through the RsmA pathway, likely by decreasing the expression of both inhibitory sRNAs RsmY and RsmZ.





(A) Expression of the sRNAs RsmY and RsmZ in the $\Delta hptB$ mutant strain grown in broth or on a surface (swarming condition) determined by qRT-PCR. (B) Swarming motility of various sRNA mutants. (C) Time-lapse analysis of the $\Delta rsmY/Z$ mutants Error bars represent the standard error of the mean for experiments carried out at least twice with three biological replicates per experiment. Student's *t*-test analysis was applied on two independent experiments with ***, *p* < 0.001; ns = not significant. For Figure 5.2, the data correspond to one single plate per strain. Gene expression variation is shown as relative expression variation (log₂) to the wild-type PA14 strain.





(A) Swarming motility assessment of various double and triple mutants. Shown are the average representative swarming phenotype of various strains. (B) Swarming motility surface coverage of the simple $\Delta hptB$ mutant, the double $\Delta hptBrsmY/Z$ mutants, the triple $\Delta hptBrsmYZ$ mutant and $\Delta rsmYZ$ double mutant. Student's *t*-test analysis was done on the $\Delta rsmYZ$ double mutant and the triple $\Delta hptBrsmYZ$ mutant based on two independent experiments (ns = not significant). Error bars represent the standard deviation of three technical replicates.

5.1.5.3 Regulation of *rsmZ* differs in surface-grown cells compared to their planktonic counterpart

To understand if the regulation of rsmY and rsmZ by HptB is exerted through the GacS/GacA two-component system, which has been characterized as being responsible for the transcription of these two sRNAs in liquid cultures (Brencic *et al.*, 2009b), we engineered a double $\Delta hptBgacA$ mutant (Section 11.2). In that mutant background, we monitored the expression of rsmY and rsmZ in planktonic and surface-associated (swarming) cells. When cells were cultivated in broth, the expression levels of both rsmY and rsmZ were indeed negatively affected in the double $\Delta hptBgacA$ in a comparable way to the single $\Delta gacA$ mutant, supporting the hypothesis that the control of HptB over rsmY

and *rsmZ* occurs downstream of GacA (Figure 5.4A). Similarly, when the same experiment was performed on swarmer cells (surface-growing bacteria), a similar negative effect of HptB on *rsmY* was confirmed to be mediated through GacA. On the other hand, unexpectedly, the overexpression of *rsmZ* that was seen in the $\Delta hptB$ mutant background (Figure 5.2A) is still observed when *gacA* is also abrogated (Figure 5.4A), indicating that HptB regulates *rsmZ* expression via an unidentified alternative regulatory pathway independent of GacA, specific to bacteria growing on a surface.



Figure 5.4 The expression of sRNA is dependent of growth conditions.

(A) Expression of *rsmY* and *rsmZ* determined by qRT-PCR in various genetic backgrounds grown in broth. (B) Expression of *rsmY* and *rsmZ* of strains grown on a surface (swarming). Error bars represent the standard deviation of experiments carried out using three biological replicates. Student's *t*-test analysis was based on two independent experiments (*, p < 0.05; **, p < 0.01). Gene expression variation is shown as relative expression variation (log₂) to the wild-type PA14 strain.

5.1.6 Discussion

Swarming motility is a complex multicellular phenomenon that has been extensively investigated over the years. However, the underlying genetic regulatory pathways controlling this surface-associated type of motility still remain to be fully characterized in *P. aeruginosa*. In the present study, we have identified that the

inactivation of the *hptB* gene renders *P. aeruginosa* incapable of such a type of motility even though this mutant still expresses the necessary propulsion and wetting tools to exert a normal movement on a semi-solid (0.5% agar) medium.

The HptB protein has been well-described and novel pathways implicating this protein have been identified. Bhuwan et al., (2012) observed that transcription of many flagella-related genes was affected in a $\Delta hptB$ mutant grown as swarming cells and that these effects were mediated via a novel regulatory cascade implicating the PA3346 and PA3347 gene products. Surprisingly, they reported no differences in flagellar morphology and swimming motility of the $\Delta hptB$ mutant, indicating that the functionality of this propulsive appendage was apparently not affected. Thus, a regulatory imbalance in that mutant was possibly responsible for such a phenotype. However, Lin et al., (2006) observed that the absence of HptB provoked an important decrease in swimming motility in the PAO1 strain. In contrast to these studies, we looked at flagellar functionality and did not observe a defect in swimming motility of the $\Delta hptB$ mutant that could explain the dramatic decrease in swarming motility. The discrepancies observed between these two studies and ours could be due to differences in experimental design and strains. Bhuwan et al., incubated their swarming plates at 30 °C for 36 hours before proceeding to their transcriptomic analyses. Furthermore, they looked at their swarming phenotypes by incubating their plates at 37 °C for 36 hours. Our experiments were all carried out using plates incubated at 34 °C for 12-16 hours, when the cells are still metabolically active (Tremblay *et al.*, 2010). Also, swimming motility assays of the $\Delta hptB$ mutant performed by Lin and colleagues were realized in a different medium and no prior quantification of the inoculated cells was determined before the experimentations.

Also, previous studies looking at the implication of HptB in motility never addressed the question of RhIABC products (biosurfactants). To express the swarming phenotype, *P. aeruginosa* needs the production of the wetting agent rhamnolipids (Caiazza *et al.*, 2005, Déziel *et al.*, 2003). A Δ *rhIA* mutant is incapable of swarming motility; examining biosurfactant production is imperative in studies investigating this type of surfaceassociated motility. Here, we looked at the production of rhamnolipids in the Δ *hptB* mutant and did not detect any differences in production compared to the wild-type strain when

the cells were cultivated in liquid cultures. Interestingly the same mutant produced more rhamnolipids than wild-type PA14 under swarming conditions. We hypothesize that rhamnolipid production is upregulated to overcome the absence of swarming. Accordingly, a 1:1 co-culture of the $\Delta hptB$ and rhlA- mutants results in a rescue of swarming motility of a $\Delta rhlA$ mutant strain (data not shown) and therefore we have no reason to believe that overproduction of these wetting agents would prevent such a type of motility, quite the opposite.

The membrane sensor RetS is capable of phosphorylating the HptB protein (Hsu et al., 2008). Transcriptomic analyses performed on planktonic bacteria have revealed that the HptB and RetS regulons are partially overlapping but consist of two separate signaling pathways that both converge at the GacS/GacA system through different mechanisms (Bordi et al., 2010). Interestingly, HptB was seen to have an effect on the regulation of the small RNA RsmY specifically and implicated an alternative pathway including the PA3346 and PA3347 gene products whereas no effect of the phosphotransfer protein was observed on RsmZ (Bordi et al., 2010). Thus, since HptB seems to control many phenotypes via RsmY regulation we investigated the effect of a ΔhptB mutation on small RNA regulation in both planktonic and swarming cells and confirmed the same extent of increased transcription of *rsmY* in both conditions. However, in contrast with that study, we observed a moderate increase in rsmZ expression in a planktonic culture (Figure 5.2A). Since swarming is a surface-associated bacterial behavior, we also looked at the expression of both rsmY and rsmZ in cells that were collected at the tip of a migrating colony. Unexpectedly, we observed a 2-log₂ increase in expression of rsmZ in swarming cells compared to their planktonic counterparts. This result indicates that *rsmZ* is differently regulated when cells are grown on a surface. Such a different regulation on sRNAs is not unusual. For instance, Petrova and Sauer (2010) found that the inactivation of *bfiS*, implicated in biofilm formation, resulted in increased rsmY and rsmZ expression strictly in cells cultivated as biofilms but not in planktonic ones (Petrova et al., 2010). Here, we found only rsmZ to be upregulated when comparing cells cultivated in broth versus on a surface. This intriguing result guided us towards asking whether RsmZ could be the main mediator of swarming motility. Thus, we decided to look at the swarming phenotype of the simple and double $\Delta rsmY/Z$ mutants. We expected to

see an effect on swarming only for the $\Delta rsmZ$ mutant. Contrary to what has been observed by other groups (Heurlier *et al.*, 2004, Kay *et al.*, 2006), we observed an increase in swarming motility of both single mutants. The inactivation of both genes resulted in an even better capacity to swarm (Figure 5.2B,C). These results indicate that both RsmY and RsmZ act synergistcally as negative regulatory elements of swarming motility and that the observed surface motility defect of the $\Delta hptB$ mutant is explained by the overexpression of these two sRNA. In fact, we have also observed that the overexpression of either RsmY or RsmZ in the wild-type PA14 strain results in a decrease in swarming motility (data not shown). Interestingly, other reporter phenotypes such as increased exopolysaccharide production and hyperbiofilm formation seen in PAK $\Delta hptB$ (Bordi *et al.*, 2010) were not detected in PA14 $\Delta hptB$ (Figure 11.7 & Figure 11.8), indicating that these strains behave differently, as previously reported for swarming motility (Tremblay *et al.*, 2008).

To further implicate HptB in the regulation of swarming motility *via* the downregulation of both *rsmY* and *rsmZ*, we created the $\Delta hptBrsmYZ$ triple mutant. Swarming motility assay of that mutant resulted in a complete rescue of the phenotype equivalent to that of the double $\Delta rsmYZ$ strain. Swarming assessment of both double $\Delta hptBrsmY$ and $\Delta hptBrsmZ$ mutants somehow resulted in an intermediate surface motility phenotype, further confirming that both sRNAs are important for this type of surface-associated movement and have a cumulative effect. Interestingly, Bordi et al.,(2010) demonstrated the same sRNA summative effect, as the abolishment of either *rsmY* or *rsmZ* in a PAK $\Delta hptB$ mutant background, resulted in the generation of intermediate biofilm phenotypes, whereas a triple $\Delta hptBrsmYZ$ mutant strain behaved exactly like a double $\Delta rsmYZ$ mutant (Bordi *et al.*, 2010). These findings further support that the investigated phenotypes affected by the deletion of the *hptB* gene (in PA14 and PAK strains) are linked to *rsmY* and *rsmZ* overexpression.

Interestingly, an *rsmA*⁻ mutant is not as defective in swarming motility as the $\Delta hptB$ mutant (Figure 11.9). Also, the inactivation of *rsmA* leads to impairment of rhamnolipids synthesis thus explaining its inability to swarm properly (Heurlier *et al.*, 2004) while it is not the case for the $\Delta hptB$ mutant. Recently, the novel post-transcriptional regulator,

RsmN (an RsmA orthologue) has been described as a positive regulator of swarming motility (Morris *et al.*, 2013). However, it was shown that the mutation of the *rsmN* gene did not abolish swarming motility, but rather decreased it. Investigating the effect of a double *rsmArsmN* mutant on swarming motility remains to be further studied. However, since the only known major target of both *rsmY* and *rsmZ* is the RsmA post-transcriptional repressor (Brencic *et al.*, 2009a), our data strongly suggest that these sRNA have alternative targets, yet to be identified.

As there is increasing evidence that sRNA control by HptB can be due to the alternative PA3346/PA3347 regulation pathway and to understand how that phosphotransfer protein can have an effect of sRNA regulation, we created a double $\Delta hptBgacA$ mutant. Knowing that GacA is the main positive regulator of rsmY and rsmZ expression (Brencic et al., 2009b), we expected to see a loss of sRNA upregulation in that double mutant. As anticipated, we observed a downregulation of both rsmY and rsmZ in a planktonic culture of the $\Delta gacA$ mutant as it has already been reported by other groups (Brencic et al., 2009a, Kay et al., 2006) as well as in swarming cells of that same genotype (Figure 5.4). Furthermore, the introduction of an *hptB* deletion in the $\Delta gacA$ mutant strain resulted in the abolishment of both rsmY and rsmZ upregulation that was observed in the $\Delta hptB$ mutant in liquid cultures. Interestingly, Bordi et al., (2010) observed that the hyperbiofilm phenotype of PAK $\Delta hptB$ strain was indeed abolished in a double ΔhptBgacA mutant suggesting that both sRNAs are implicated in the control of such a phenotype in PAK (Bordi et al., 2010). Surprisingly in swarming cells, we observed that rsmZ was still upregulated when compared to a $\Delta gacA$ mutant whereas rsmY overexpression was lost in a double $\Delta hptBgacA$ mutant. This result reveals a differential regulation of both sRNAs in swarming cells, where *rsmZ* transcription does not require the presence of GacA as it has been seen for planktonic cultures, but rather necessitates the contribution of unknown regulator(s) that are specifically active in surface-grown cells.

In addition to GacA being the main activator of *rsmY* and *rsmZ* transcription (Brencic *et al.*, 2009b), there are other global regulators that can influence the expression levels of these sRNAs in planktonic cultures. Accordingly, the DNA-binding global negative regulators MvaT and MvaU, can specifically repress *rsmZ* expression without

affecting *rsmY* (Sandra Castang *et al.*, 2008) thus possibly being the reason why the upregulation was observed in surface-grown cells. We assessed the swarming motility of both $\Delta mvaT$ and $\Delta mvaU$ mutant strains and did not observe any difference in surface movement when compared to the wild-type (Figure 11.10), indicating that any effect on *rsmZ* regulation does not strictly exert an output on swarming motility.

To rule out the possibility of sRNA regulation by the PA3346/PA3347 pathway, we monitored the expression of *rsmY* and *rsmZ* in both swarming cells and their planktonic counterpart of mutants in these genes. Opposite to Bordi et al., (2010) we observed a slight increase in rsmY expression in the PA3346⁻ mutant background but no effect for both sRNAs in PA3347⁻ in planktonic cultures (Figure 11.11). Also, the inactivation of either PA3346 or PA3347 did not affect rsmY and rsmZ expression in surface-grown cells (Figure 11.12). These results indicated that *rsmZ* overexpression in a $\Delta hptB$ genetic mutant background is somehow independent of both GacS/GacA and PA3346/47 regulation pathways and that an unknown surface-activated regulator is responsible for the observed effect. Recently, a study by Wang et al. (Wang et al., 2014) characterized a novel swarming regulator, BswR, capable of controlling the expression of rsmZ directly in PAO1. We verified whether BswR could be responsible for rsmZ regulation in swarming cells, but surprisingly, we did not observe any effect on rsmZ expression in a $\Delta bswR$ mutant in both planktonic and swarming cells (Figure 11.13), indicating that BswR does not play a role in the regulation of this sRNA under our conditions. Earlier this year, a study published by Xu et al. (Xu et al., 2016) characterized the HapZ adaptor protein in a PAO1 strain and observed that it could act as an intermediate between the membrane sensor SagS and the HptB protein. However, it was reported that a mutation in the sagS gene does not affect swarming motility in PA14, (Petrova et al., 2011), making HapZ unlikely to participate in swarming motility regulation, at least, in a PA14 genetic background.

The discrepancies observed between our current study and others (Bhuwan *et al.*, 2012, Bordi *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2014) are consistant with the growing evidence of regulatory differences between the various *P. aeruginosa* strains (Helga Mikkelsen *et al.*, 2011a, Tremblay *et al.*, 2008). Furthermore, we certainly cannot rule out the effects of the

numerous previously characterized elements found to be implicated in the regulation of swarming motility. However, here we present a model where small RNA regulation is dependent on the studied in our current investigation of P. aeruginosa (i.e. broth vs surface) which favor two different bacterial lifestyles. Furthermore, RsmW a novel RNA under the control of the Gac system has been identified to be strongly upregulated in biofilm conditions compared to planktonic cultures which further strengthens the existence of differential genetic regulation depending on the selected growth conditions (C. L. Miller et al., 2016). Our data confirm that the GacS/GacA system is not the only one responsible for the control of rsmZ expression and favors the presence of unidentified key factors that are important when cells are grown on a surface rather than in planktonic cultures, as exemplified by the use of swarming motility as a model for surface behavior (Figure 5.5). Further downstream in the swarming regulatory cascade, we also show evidence that RsmY and RsmZ can modulate swarming motility not only via RsmA inhibition. Further experiments focusing on identifying these regulatory players specific to surface-grown bacteria will unveil a more complete portrait of genetic regulation in P. aeruginosa.



Figure 5.5 Model for broth-surface differential sRNA regulation.

We propose a regulation model where the control of the expression of rsmY and rsmZ by HptB is under the exclusive control of the GacS/GacA system and converges to the post-transcriptional regulator RsmA for both planktonic and swarming cells. However, in cells grown on a surface such as in swarming motility, the regulation of both rsmY and rsmZ is differential and does not strictly mediate their output *via* RsmA. The obtained data in our study indicates that other key-players allows for regulation of rsmZ by HptB and does not implicate the Gac system. This regulation most likely involves other membrane sensors that can modulate the activity of the HptB protein. Presented model integrates previously published data (Bordi *et al.*, 2010, Brencic *et al.*, 2009b, Hsu *et al.*, 2008). Full arrows represent direct positive regulation. Dashed arrows represent indirect positive regulation. X = Unknown regulating factor.

5.1.7 Acknowledgments

We thank Dr. Steve Lory for providing the pEXG2-Δ*rsmY*/pEXG2-Δ*rsmZ* suicide plasmids and the pCTX-*rsmY*-*lacZ*/pCTX-*rsmZ*-*lacZ* reporters, Marie-Christine Groleau for helpful discussions and Sophie Robitaille for technical help. This study was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant RGPIN-2015-03931 awarded to ED. ED holds a Canada Research Chair in Sociomicrobiology. FJP was recipient of Ph.D. scholarships from the Fonds de Recherche - Nature et Technologies (FRQ-NT) and the Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS.

5.2 Données complémentaires à l'article sur la régulation de la motilité de type *swarming* par HptB

5.2.1 Mise en contexte

Étant donné que nous avons identifié que dans un mutant $\Delta hptB$, il y a une forte surexpression du pARN *rsmZ* et que ce dernier reste surexprimé dans un double mutant $\Delta hptBgacA$ (voir Section 5), nous avons voulu établir quel serait le phénotype *swarming* de la souche sauvage dans laquelle *rsmY* ou *rsmZ* sont surexprimés.

5.2.1.1 Méthodologie

5.2.1.1.1 Souches et plasmides utilisés dans cette étude

Les souches bactériennes utilisées pour ce projet sont toutes dérivées de la souche parentale de *P. aeruginosa* PA14 (Rahme *et al.*, 1995) et d'*E. coli*. Les souches bactériennes ont été cultivées à 37 °C dans le milieu TSB (Difco) dans un tambour rotatif TC-7 (New Brunswick, Canada) ou sur des géloses TSB. Le détail des souches et plasmides est disponible dans le Table 5.2

5.2.1.1.2 Synthèse des petits ARN RsmY et RsmZ et clonage dans vecteur pUCP26

Les petits ARN RsmY et RsmZ ont été synthétisés par l'entremise de la compagnie GeneScript (<u>http://www.genscript.com/</u>). Les séquences utilisées ont été tirées du génome de la souche *P. aeruginosa* PA14 à partir de la base de données <u>www.pseudomonas.com</u>. Une séquence promotrice P_{tac} adaptée de (Lambertsen *et al.*, 2004) pour *P. aeruginosa* a été ajoutée à la région 5' des pARN afin de permettre une forte transcription de ces dernières. Des amorces contenant des sites de restriction (Table 5.3) ont été utilisées pour amplifier par PCR les séquences ayant été synthétisées et servies pour clonage chez *E. coli* DH5 α en utilisant le site de clonage multiple présent sur le vecteur d'expression pUCP26. Les clones positifs ont été sélectionnés sur TSB contenant de la tétracycline à une concentration de 15 µg/ml après incubation à 37 °C pour une nuitée. Les clones positifs ont été testés par extraction des plasmides suivis d'une double digestion avec les enzymes de restriction BamHI et HindIII. Une fois confirmés, les plasmides de surexpression ont été utilisés pour être transformées dans les souches d'intérêt par électroporation et les clones positifs sélectionnés sur TSB contenant 125 µg/ml de tétracycline. Les clones positifs ont été testés par extraction plasmidique suivi de digestions ainsi que par la vérification de la surproduction de pyocyanine (un facteur de virulence de couleur bleue) en culture liquide (Heurlier *et al.*, 2004).

| Souches/Plasmides | ED # | Phénotype/Génotype | Référence |
|--------------------|------|---|------------------------------------|
| E. coli | | | |
| DH5a | 78 | fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi- 1 hsdR17 | (Woodcock <i>et al.</i> , 1989) |
| P. aeruginosa | | | |
| UCBPP-PA14 | 14 | Souche sauvage | (Rahme <i>et al.</i> , 1995) |
| PA14 <i>cafA</i> - | | PA14 <i>caf</i> A::MAR2xT7, Gm ^R ID34133 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| Plasmides | | | |
| pTac- <i>rsmZ</i> | 2829 | Vecteur pUC57 contenant la séquence de <i>rsmZ</i> couplée à un promoteur P _{tac} , Cb ^R | GeneScript |
| pTac- <i>rsmY</i> | 2830 | Vecteur pUC57 contenant la séquence de <i>rsmY</i> couplée à un promoteur P _{tac} , Cb ^R | GeneScript |
| pUPC26 | 665 | Vecteur de surexpression, Tc ^R | (West <i>et al.</i> , 1994) |
| pFJP17 | | Vecteur pUCP26 contenant la séquence P _{tac} - <i>rsmZ</i> | Cette étude |
| pFJP18 | | Vecteur pUCP26 contenant la séquence P _{tac} - <i>rsmY</i> | Cette étude |

Table 5.2 Souches/Plasmides utilisés dans cette étude.

Table 5.3 Amorces utilisées dans cette étude.

| Nom | Séquence (5' → 3') |
|---|----------------------------------|
| FJP_HindIII_ptacrsmYZuni_BamHI_For ¹ | AGAGA AAGCTT GGGGAATTC |
| FJP_HindIII_ptacrsmZ_BamHI_Rev ¹ | GTACC GGATCC AAAAAGGGG |
| FJP_HindIII_ptacrsmYZuniV2 _For1 | AGAGA AAGCTT GGGGAATTCTTG |
| FJP_BamHI_ptacrsmYV2_Rev ¹ | GTACC GGATCC AAAACCCCG |

¹En gras, site de restriction

5.2.1.1.3 Tests de surexpression des petits ARN en condition de motilité de type *swarming*

Les tests de motilité de type *swarming* ont été effectués tels que décrits par (Tremblay *et al.*, 2008), mais avec quelques modifications. Le milieu *swarming* M9 modifié a été supplémenté avec de la tétracycline à une concentration de 125 µg/ml. Lors

des tests, trois colonies de la même souche ont été sélectionnées sur gélose TSB contenant 125 µg/ml tétracycline. Les souches contenant les vecteurs de surexpression avec les pARN ont été testées en comparaison à la même souche possédant le vecteur vide. La surface recouverte par la colonie *swarming* des souches a été mesurée en utilisant la suite de logiciels PhotoShop CS3 Extended (Adobe). Les expériences ont été effectuées en triplicata au moins deux fois. Les résultats ont été analysés en utilisant un test de *Student* à l'aide du logiciel GraphPad version 6.0.

5.2.1.2 Résultats

5.2.1.2.1 La surexpression des petits ARN RsmY et RsmZ affecte négativement la motilité de type *swarming*

Suite à la surexpression des petits ARN RsmY et RsmZ en utilisant le plasmide multi-copies pUPC26 dans la souche sauvage, nous avons observé une diminution statistiquement significative dans le recouvrement de surface lorsque ces deux pARN sont présents en plusieurs copies (Figure 5.6A). Étant donné que la diminution de la motilité de type *swarming* de la souche sauvage contenant le plasmide pUCP26-ptac*rsmZ* n'était pas aussi importante que pour celle contenant la construction ptac-*rsmY*, nous avons répété cette même expérience dans un mutant *cafA*⁻. En effet, le gène *cafA* code pour une RNase capable de dégrader spécifiquement le pARN RsmZ (Petrova *et al.*, 2010). Lorsque cette expérience a été répétée, une diminution plus importante (p < 0.01) de la motilité *swarming* du mutant *cafA*⁻ surexprimant *rsmZ* fut observée (Figure 5.6B).





(A) Dans la souche sauvage (B) Dans un mutant *cafA*⁻. Les expériences ont été effectuées en triplicata au moins deux fois en utilisant des colonies isolées à chaque fois. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. * = p < 0.05; ** = p < 0.01; **** = p < 0.001.

5.2.1.3 Discussion

L'impact des pARN sur les comportements bactériens suscite un vif intérêt pour la communauté scientifique, qui leur accorde une place prépondérante dans la régulation génique et métabolique (Bobrovskyy *et al.*, 2013). En effet, chez *P. aeruginosa*, les pARN RsmY et RsmZ sont important dans le contrôle de plusieurs phénotypes bactériens en plus d'être sous le contrôle du système de régulation global GacS/A (Brencic *et al.*, 2009b). De nombreuses études ont mis à jour la complexité de ce système et la présence de nombreux facteurs pouvant moduler la stabilité et/ou l'expression de RsmY et RsmZ (S. Castang *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2016, Sonnleitner *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2014).

Malgré le rôle apparemment redondant de RsmY et RsmZ, la protéine RsmA possède une affinité différente envers ces deux pARN (Marden *et al.*, 2013). Aussi, plusieurs études suggèrent que ces pARN ne sont pas nécessairement contrôlés de manière identique et ce, dépendamment aussi du mode de vie bactérien étudié (planctonique ou sessile) (Bordi *et al.*, 2010, Petrova *et al.*, 2010, Petrova *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2014). Ces éléments d'informations suggèrent fortement que ces pARN puissent intervenir dans le contrôle de différents évènements de régulation.

Dans la publication #2 (Section 5), nous avons mis en évidence l'existence d'un mécanisme de régulation différente du pARN RsmZ en condition de surface (*swarming*) comparativement à une culture liquide. De plus, nous avons découvert que GacA n'est pas le seul régulateur transcriptionnel activant ce pARN, en utilisant un double mutant $\Delta hptBgacA$.

Suite à ces résultats, nous avons émis comme hypothèse que le pARN RsmZ pourrait être le médiateur central de cette motilité de surface. Toutefois, les éléments d'information obtenus et présentés dans la publication #2 (Section 5) suggèrent fortement un rôle des deux pARN sur la motilité de type *swarming*. De plus, nos tests de surexpression ont montré qu'en effet la surexpression de ces pARN a un effet négatif sur ce type de motilité. L'effet négatif de la surexpression de *rsmZ* sur le déplacement de surface a déjà été rapporté par Heurlier et collègues (Heurlier *et al.*, 2004). Toutefois, dans cette étude, la surexpression de *rsmZ* abolissait la motilité de type *swarming*, ce qui n'a pas été observé dans nos conditions (réduction du déplacement de surface plutôt

qu'une abolition complète). Ces différences expérimentales pourraient être dues à plusieurs facteurs tels que le type de plasmide de surexpression utilisé, la souche de *P. aeruginosa* et les conditions de culture qui sont tous différents entre leur étude et la nôtre. De plus, nous avons essayé la surexpression de ces pARN en adoptant une approche impliquant l'utilisation d'un vecteur intégratif chromosomique mini-CTX. Cette stratégie a initialement été choisie afin d'éviter l'ajout d'un marqueur de sélection dans le milieu qui aurait été nécessaire pour la maintenance d'un plasmide non-intégratif. Toutefois, ces tentatives se sont avérées infructueuses étant donné que nous n'avons observé aucun impact de ces petits ARN sur la motilité de type *swarming*. Ces résultats pourraient potentiellement être expliqués par l'expression de ces pARN en faibles copies par l'utilisation d'un tel vecteur.

La capacité de *P. aeruginosa* à présenter une motilité de type *swarming* seulement réduite malgré la surexpression de RsmY ou RsmZ dans nos conditions suggère fortement (a) qu'il existe des systèmes de « compensation » pouvant titrer une concentration trop élevée de ces pARNs et/ou (b) qu'il y a une présence insuffisante de protéines chaperones nécessaire afin de stabiliser les transcrits RsmY ou RsmZ. En effet, chez *P. aeruginosa*, la protéine liant l'ARN Hfq est importante pour le bon repliement et activité de RsmY (Sonnleitner *et al.*, 2006). Plus récemment, un groupe de recherche a rapporté que la protéine polynucléotide phosphorylase (PNPase) affecte négativement la stabilité de ces pARN (Chen *et al.*, 2016). Il se pourrait donc que ces facteurs interviennent afin d'assurer un contrôle stringent des niveaux de ces pARN. Toutefois, cette réponse ne serait pas absolue en milieu liquide étant donné qu'une augmentation dans la production de pyocyanine a été décelée en condition de culture plantonique. En effet, une augmentation de la production de la production de pyocyanine a déjà été rapportée lorsque le petit ARN *rsmZ* est surexprimé chez *P. aeruginosa* (Heurlier et al., 2004) et aussi confirmé par notre laboratoire (Figure 11.14).

En conclusion, l'étude de l'impact des pARN sur la motilité de type *swarming* est complexe et ne peut être facilement étudiée par la surexpression de ces derniers. En effet, tel que démontré à la Figure 5.6, l'abolition du gène *cafA* a permise d'observer un effet plus drastique de RsmZ sur la motilité de type *swarming*. De plus, tel que mentionné

ci-haut, plusieurs autres régulateurs et/ou protéines de repliement sont nécessaires pour le bon fonctionnement ou inhibition de RsmY et RsmZ. Aussi, la surexpression de certaines protéines du type histidine kinase peut favoriser le « cross-talk » où certains systèmes sont activés de manière artificielle et fausser des interprétations expérimentales (Laub *et al.*, 2007). Dans ce cas, il aurait été intéressant comme alternative d'utiliser un plasmide à à nombre moyen de pour effectuer nos tests de surexpression (Chambonnier *et al.*, 2016). Aussi, une autre voie qui pourrait être investiguée serait l'utilisation d'un promoteur inductible pouvant contrôler le niveau d'expression de ces pARN. Ultimement, étant donné l'importance de RsmY et RsmZ dans la motilité de type *swarming*, il serait concevable de procéder à une surexpression de ces deux pARN simultanément afin de déterminer si ce phénotype de surface serait complètement aboli tel que chez un mutant $\Delta hptB$.

6 IDENTIFICATION DE NOUVEAUX RÉGULATEURS DU PETIT ARN RSMZ ACTIFS EN CONDITION DE SURFACE

6.1.1 Mise en contexte

Tel que suggéré dans la discussion de la publication #2 présentée dans cette thèse (Section 5), des résultats probants montrent qu'il existe des régulateurs qui contrôlent l'expression des pARN RsmY et RsmZ spécifiquement en condition de culture en suface. En effet, chez un mutant $\Delta hptB$, il y a une forte surexpression du pARN RsmZ dans des cellules adoptant une motilité de type *swarming* (*versus* WT) comparativement à ces mêmes cellules, mais cultivées en condition planctoniques (bouillon) (Figure 5.2A).

Chez *P. aeruginosa*, le S2C GacS/GacA est le régulateur global du contrôle de l'expression de ces pARN (Brencic *et al.*, 2009b). De plus, de nombreux autres éléments de régulation ont été rapportés capables de contrôler l'expression de ces pARN, toutefois avec la présence minimale du régulateur de réponse GacA (Li *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2014).

En 2010, Bordi et collègues ont levé le voile sur un système de régulation impliquant la protéine *phosphotransfert* HptB, et ils ont montré que cette dernière à la capacité de réguler l'expression de RsmY sans passer par le système GacS/GacA. Ce nouveau mécanisme de régulation par HptB a été défini comme impliquant le produit des gènes *PA3346* et *PA3347* sur le contrôle de l'expression de *rsmY*. Toutefois, dans nos conditions expérimentales, ce système de régulation alternatif ne semble pas impliqué sur la modulation des niveaux de ces pARN (Figure 11.11 et Figure 11.12).

La découverte qu'un mutant $\Delta hptB$ est incapable de se déplacer sur une surface semi-solide et aussi surexprime RsmY et RsmZ nous a menée à la construction du double mutant $\Delta hptBgacA$ afin de déterminer si cette surexpression implique la protéine GacA. Nous avons constaté que la surexpression de *rsmZ* observée chez un mutant $\Delta hptB$ est toujours présente chez des cellules bactériennes du génotype $\Delta hptBgacA$ cultivées en condition de surface spécifiquement lorsque comparé à la souche sauvage (Figure 5.4), ce qui implique que la transcription de *rsmZ* n'est pas obligatoirement régulée par GacA.

Résultats – Chapitre 6: Identification de nouveaux régulateurs de rsmZ actifs en surface

De plus, ayant testé la motilité de type *swarming* du double mutant $\Delta hptBgacA$, nous avons observé que ce dernier présente le même phénotype *swarming* que le simple mutant $\Delta hptB$ (c'est-à-dire non-*swarmer*) (Figure 11.15).

Ayant tous ces éléments d'information en notre possession, nous avons émis comme hypothèse qu'en concert avec la protéine HptB, *rsmZ* peut être contrôlé par des éléments régulateurs encore inconnus strictement en condition de surface et négativement affecter la motilité de type *swarming*. Ainsi, nous avons entrepris d'identifier ces nouveaux régulateurs par l'utilisation de la méthode du séquençage d'ARN à haut débit *RNAseq* en comparant les transcriptomes de la souche sauvage et du mutant $\Delta hptBgacA$ cultivés en condition de culture liquide et *swarming*.

6.1.2 Méthodologie

6.1.2.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées pour ce projet sont toutes dérivées de la souche parentale de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Rahme *et al.*, 1995). Les souches bactériennes ont été cultivées à 37 °C dans le milieu TSB (Difco) dans un tambour rotatif TC-7 (New Brunswick, Canada) ou sur des géloses TSB. Le détail des souches et plasmides est disponible dans le Table 6.1.

Résultats – Chapitre 6: Identification de nouveaux régulateurs de rsmZ actifs en surface

| Souches | ED # | Phénotype/Génotype | Référence |
|-------------------------|------|--|---------------------------------|
| P. aeruginosa | | | |
| UCBPP-PA14 | 14 | Souche sauvage | (Rahme <i>et al.</i> , 1995) |
| ∆hptBgacA | 2654 | Construction markerless du gène hptB chez PA14, | Jean-Pierre et al., |
| | | gacA::MAR2xT7 transposon mutant ID 34781 Gm ^R | 2016 |
| PA14_02290 ⁻ | 2870 | PA14_02290::MAR2xT7, Gm ^R ID43759 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_03580 ⁻ | 2871 | PA14_03580::MAR2xT7, Gm ^R ID54298 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_06260 ⁻ | 2872 | PA14_06260::MAR2xT7, Gm ^R ID26815 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_14280 ⁻ | 2873 | PA14_14280::MAR2xT7, Gm ^R ID43143 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_15150 ⁻ | 2874 | PA14_15150::MAR2xT7, Gm ^R ID27303 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| nalC | 2875 | PA14_16280::MAR2xT7, Gm ^R ID31143 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| amrZ ⁻ | 2876 | PA14_20290::MAR2xT7, Gm ^R ID30296 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_24140 ⁻ | 2877 | PA14_24140::MAR2xT7, Gm ^R ID26502 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_27280 ⁻ | 2878 | PA14_27280::MAR2xT7, Gm ^R ID27833 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_27400 ⁻ | 2879 | PA14_27400::MAR2xT7, Gm ^R ID30582 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| gbdR⁻ | 2880 | PA14_71070::MAR2xT7, Gm ^R ID24457 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_47520 ⁻ | 2881 | PA14_47520::MAR2xT7, Gm ^R ID26040 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_49680 ⁻ | 2882 | PA14_49680::MAR2xT7, Gm ^R ID25987 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_71680 ⁻ | 2884 | PA14_71680::MAR2xT7, Gm ^R ID30269 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_39360 ⁻ | 2885 | PA14_39360::MAR2xT7, Gm ^R ID30104 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_53730 ⁻ | 2887 | PA14_53730::MAR2xT7, Gm ^R ID35077 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_46810 ⁻ | 2893 | <i>PA14_46810</i> ::MAR2xT7, Gm ^R ID35751 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_31780 ⁻ | 2888 | PA14_31780::MAR2xT7, Gm ^R ID39387 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_32450 ⁻ | 2889 | PA14_32450::MAR2xT7, Gm ^R ID44935 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_36420 ⁻ | 2890 | PA14_36420::MAR2xT7, Gm ^R ID39759 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| eraR [_] | 2891 | PA14_38900::MAR2xT7, Gm ^R ID38131 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_40380 ⁻ | 2892 | PA14_40380::MAR2xT7, Gm ^R ID36592 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_45870 ⁻ | 2894 | PA14_45870::MAR2xT7, Gm ^R ID31105 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_48160 ⁻ | 2895 | <i>PA14_48160</i> ::MAR2xT7, Gm ^R ID40171 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_47580 ⁻ | 2896 | PA14_47580::MAR2xT7, Gm ^R ID48146 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_63280 ⁻ | 2897 | PA14_63280::MAR2xT7, Gm ^R ID54414 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_71750 ⁻ | 2898 | PA14_71750::MAR2xT7, Gm ^R ID46414 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_30830 ⁻ | 2492 | PA14_30830::MAR2xT7, Gm ^R ID53740 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| mucR [_] | 600 | PA14_42220::MAR2xT7, Gm ^R ID42074 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_03110 ⁻ | 2899 | PA14_03110::MAR2xT7, Gm ^R ID39716 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| phrS [_] | 2860 | PA14_21260::MAR2xT7, Gm ^R ID37785 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_08090 | 2863 | PA14_08090::MAR2xT7, Gm ^R ID23897 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_19970 | 2865 | PA14_19970::MAR2xT7, Gm ^R ID27349 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_37250 | 2866 | PA14_37250::MAR2xT7, Gm ^R ID36598 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_55940 | 2064 | PA14_55940::MAR2xT7, Gm ^R ID56370 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_56750 | 2867 | PA14_56750::MAR2xT7, Gm ^R ID29825 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_06880 | 2868 | PA14_06880::MAR2xT7, Gm ^R ID46621 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14_72060 | 2869 | PA14_72060::MAR2xT7, Gm ^R ID33760 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |

 Table 6.1 Souches utilisées dans cette étude
6.1.2.2 Transcriptome en condition de motilité de type *swarming* et en culture liquide

6.1.2.2.1 Extractions d'ARN et séquençage

La méthodologie employée pour l'extraction d'ARN est la même que celle décrite dans la Section 5.1.4.4. Deux réplicats biologiques ont été effectués par souche et condition (bouillon et *swarming*).

Une vérification interne par qRT-PCR ciblant le gène *rsmY* a été effectuée sur les ARN qui ont été extraits avant de les envoyer au Service de séquençage du Centre d'Innovation Génome Québec - Université McGill pour un séquençage par la méthode « *paired*-end » sur un Illumina HiSeq 2500 PE125. Une déplétion complète des ARN ribosomaux totaux a été effectuée avant de procéder au séquençage à haut débit.

6.1.2.3 Analyse des données

L'ensemble des méthodes utilisées et décrites dans les sections suivantes pour l'analyse des données transcriptomiques ont été adaptées de (Mauffrey *et al.*, 2015).

6.1.2.3.1 Assemblage des séquences brutes

À partir de la base de données de GénomeQuébec, les séquences brutes ont été téléchargées sur le super-ordinateur Briarée de l'Université de Montréal, qui est géré par CalculQuébec, et assemblées en utilisant le module *fastx_tools/0.0.13* (ttp://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/).

Suite à cela, les séquences assemblées ont été filtrées par qualité en retenant seulement celles ayant une précision de l'identification d'un nucléotide généré par séquençage de 99%.

6.1.2.3.2 Alignement des séquences sur le génome

Le génome de référence de *P. aeruginosa* souche PA14 a été téléchargé en format FASTA à partir de la base de données NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>). Par la suite, un index de ce génome a été créé avec le module *bowtie/2.2.3* afin de pouvoir procéder à l'alignement des séquences sur le génome de PA14. Le fichier de « sortie » produit par

Bowtie a été converti en format compressé «.bam » et trié afin d'avoir le fichier final nécessaire pour la suite des travaux.

6.1.2.3.3 Annotation des séquences sur le génome

Une fois le fichier d'index créé, un fichier d'annotation du génome de PA14 (format .gff) a été récupéré sur le site (<u>http://bacteria.ensembl.org/index.html</u>). Ce fichier d'annotation a ensuite été modifié afin d'y inclure les petits ARN ayant été détectés chez *P. aeruginosa* souche PA14 (PA14_sRNA_total_FJP.gff) (Ferrara *et al.*, 2012, Wurtzel *et al.*, 2012).

En utilisant le module *BedTools/2.20.1* l'annotation a été effectuée afin d'obtenir la position de chaque gène trouvé, le nombre de *reads* de ce gène ainsi que son identité génétique (protéine, ARNt, pARN).

Finalement, le calcul du contenu en GC des séquences a été effectué aussi avec l'aide de *BedTools*. Ceci nous permet d'effectuer les analyses statistiques subséquentes afin de normaliser nos résultats.

6.1.2.3.4 Analyses statistiques

La normalisation et le «*read count* » ont été effectués en utilisant la suite de logiciels NOIseq à partir du programme « R ». Cette normalisation a été réalisée en utilisant la fonction RPKM de NOIseq. Suite à cela, les « *read counts* » ayant été détectés, mais qui pourraient consister en du « bruit » de séquençage ont été éliminés en utilisant la méthode CPM avec une valeur de CPM de 1, ainsi qu'un « *cutoff* » de 100 pour le coefficient de variation. Finalement, seul les transcrits dont une probabilité supérieure à 0,9 ont été gardés pour la suite des analyses.

Une fois les données obtenues, elles ont été triées en utilisant un seuil statistique de 1,50 comme ratio de valeur de changement d'expression.

6.1.2.3.5 Tests de motilité de type *swimming* et *swarming*

Les tests de motilité de type *swimming* et *swarming* ont été effectués tels que décrits dans la Section 5.1.4.3. Les mutants qui ont été considérés initialement intéressants ont été testés de nouveau en triplicata au moins deux fois.

6.1.2.3.6 Dosage de l'activité de la β-galactosidase

Les dosages de l'activité de la β -galactosidase en condition de culture liquide et *swarming* ont été effectués tels que décrits dans la Section 11.2.1.2. Les tests ont été effectués en triplicata au moins deux fois. Les résultats ont été analysés en utilisant un test de *Student* à l'aide du logiciel GraphPad version 6.0.

6.1.2.3.7 Tests de formation de biofilms

Les tests de formation de biofilms ont été effectués à différents temps en suivant les paramètres décrits dans la Section 11.2.1.3. Cette expérience a été réalisée avec des réplicats de 4 par échantillon au moins deux fois. Les résultats ont été analysés par une ANOVA unidirectionnelle en comparant à la souche sauvage à l'aide du logiciel GraphPad version 6.0.

6.1.3 Résultats

6.1.3.1 Les gènes *PA14_16280* et *PA14_03110* affectent positivement l'expression de *rsmZ* en condition de surface spécifiquement

Comme il a été vu à la publication #2, nous avons identifié dans un premier temps que l'abolition du gène *rsmZ* implique une augmentation de la motilité de type *swarming* (Figure 5.2). Aussi, nous avons observé que l'expression de ce pARN est augmentée de manière significative chez des cellules cultivées en surface du mutant $\Delta hptB$ (Figure 5.2) Ainsi, afin d'identifier un nouveau régulateur du pARN *rsmZ* agissant spécifiquement en condition de surface, en plus d'affecter négativement la motilité de type *swarming*, nous avons dressé une liste de gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels, des senseurs membranaires, facteurs sigma, protéines hypothétiques ou autre fonction, étant régulés de manière différente entre les dendrites de la souche sauvage et le centre *swarming* du double mutant $\Delta hptBgacA$, d'après les données du transcriptome (Table 6.2). De plus, nous avions comme critère supplémentaire que la transcription de ces gènes soit affectée strictement en condition de surface (Table 11.4). Les mutants disponibles ont, par la suite, été testés à partir de la banque de mutants PA14NR (Liberati *et al.*, 2006).

Parmi tous les mutants sélectionnés, seize ont été identifiés comme affichant un phénotype hyper ou hyposwarmer par évaluation visuelle (Table 6.2). Ces derniers ont été confirmés par des analyses de recouvrement de surface en utilisant la suite de logiciels PhotoShop CS3 Extended (Adobe) (Figure 11.16). De ceux-ci, quatorze mutants n'ont affiché aucun ou moins de 30% de défaut d'activité flagellaire lorsque analysés par des tests de motilité de type swimming (Figure 11.17). Suite à cela, nous avons étudié l'effet d'une mutation dans ces gènes sur la capacité de régulation des pARN RsmY et RsmZ dans une situation où les cellules ont été cultivées en condition de surface (swarming). Parmi ceux-ci, nous avons identifié que seules des mutations dans les gènes PA14 16280 et PA14 03110 induisent une diminution dans l'expression de l'activité transcriptionnelle de rsmZ de l'ordre de 40 et 30% respectivement spécifiquement en condition de surface lorsque comparés à la souche sauvage (Figure 6.1). Étant donné que nous étions à la recherche d'un régulateur transcriptionnel actif dans des conditions de culture en surface et non en bouillon, l'expression de ce même pARN a été suivie en condition planctonique chez ces mutants. Tel que recherché, aucun effet d'une mutation des gènes PA14_16280 et PA14_03110 sur la transcription de rsmZ n'a été vu chez des cellules cultivées en bouillon (Figure 6.2). Ceci suggère donc que ces deux gènes contrôlent la régulation de rsmZ strictement chez des cellules cultivées en surface en plus d'influencer la motilité de type swarming.

Table 6.2 Transcription des gènes étant affectés spécifiquement en condition de surface chez le double mutant Δ*hptBgacA* comparativement à la souche sauvage.

| Gène PA14 | Nom du gène | Fonction | Swarming | Swimming | Twitching | Activité transcriptionnelle rsmZ-lacZ |
|------------|----------------|---|----------|----------|-----------|---|
| PA14_02290 | | LysR family transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_03580 | | transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_06260 | | LysR family transcriptional regulator | Ø | - | + | |
| PA14_14280 | | LysR family transcriptional regulator | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_15150 | | transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_16280 | nalC | transcriptional regulator | ++ | + | + | Sous-expression en surface/Aucun effet en liquide |
| PA14_20290 | amrZ | DNA binding-protein | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_24140 | | AraC family transcriptional regulator | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_27280 | | LysR family transcriptional regulator | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_27400 | | LysR family transcriptional regulator (MFS trans) | - | - | - | |
| PA14_71070 | gbdR | AraC family transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_47520 | | transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_49680 | | transcriptional regulator | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_71680 | | GntR family transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_39360 | | sigma-54 dependent transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_53730 | | transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_46810 | | RNA polymerase ECF-subfamily sigma-70 factor | + | | | |
| PA14_31780 | | LysR family transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_32450 | | AraC family transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_36420 | | sensor/response regulator hybrid | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_38900 | eraR | two-component response regulator | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_40380 | | TetR family transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_45870 | | two-component sensor | + | | | |
| PA14_48160 | | sensor/response regulator hybrid | + | | | |
| PA14_47580 | | MarR family transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_63280 | | transcriptional regulator | + | | | |
| PA14_71750 | | LysR family transcriptional regulator | + | | | |

| Gène PA14 | Nom du gène | Fonction | Swarming | Swimming | Twitching | Activité transcriptionnelle rsmZ-lacZ |
|-------------------------|----------------|---|----------|----------|-----------|---|
| PA14_30830 | | two-component response regulator | + | | | |
| PA14_42220 | mucR | membrane sensor domain-containing protein | + | | | |
| <mark>PA14_03110</mark> | | Hypothetical protein | ++ | + | + | Sous-expression en surface/Aucun effet en liquide |
| PA14_21260 | phrS | pARN | + | | | |
| PA14_08090 | | Phage tail tube protein | + | | | |
| PA14_19970 | | Hypothetical protein | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_37250 | | Major facilitator transporter | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_55940 | | Putative pilus assembly protein | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_56750 | | Hypothetical protein | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_06880 | | Putative transcriptional regulator, LysR family | ++ | + | + | Aucun effet |
| PA14_72060 | | Hypothetical | + | | | |

Colonne swarming : + = phénotype WT, ++ = hyperswarmer, - = hyposwarmer, Ø = non-swarmer Colonnes swimming et twitching = + = Plus de 70% de l'activité de la souche sauvage retenue, - = moins de 70% de l'activité de la souche sauvage retenue

En gras : Mutants pour lesquels une augmentation de la motilité de type swarming a été observée.

En jaune : Gènes pour lesquels des études supplémentaires ont été réalisées et exposées dans cette section.



Figure 6.1 Activité transcriptionnelle relative *rsmY-lacZ* et *rsmZ-lacZ* des souches d'intérêt cultivées en condition de motilité de type *swarming*. ns = non-significatif ; * = p < 0.05



Figure 6.2 Activité transcriptionnelle *rsmY-lacZ* et *rsmZ-lacZ* des souches d'intérêt cultivées en condition de bouillon.

6.1.3.2 Une mutation dans les gènes PA14_16280 et PA14_03110 affecte la formation de biofilms

Étant donné que nous avons déterminé qu'une mutation dans les gènes *PA14_16280* et *PA14_03110* affecte la motilité de type *swarming* ainsi que la capacité à réguler positivement l'expression du pARN RsmZ spécifiquement en condition de surface, nous avons voulu déterminer l'effet de ces mutants sur la formation de biofilms. Nous avons décidé d'étudier ce phénotype parce que ces deux comportements bactériens de surface sont souvent retrouvés comme étant inversement régulés chez *P. aeuginosa* (Caiazza *et al.*, 2007).

Tel qu'attendu, l'inactivation du gène *PA14_03110*⁻ entraîne une réduction dans la formation de biofilm après 48 heures d'incubation comparativement à la souche sauvage (Figure 6.3), ce qui est en accord avec une régulation inverse avec une motilité de type *hyperswarming*. Toutefois, le mutant *PA14_16280*⁻ présente une augmentation significative (p < 0.001) dans sa capacité à former un biofilm et ce, même après avoir testé ce phénotype jusqu'à 96 heures d'incubation (Figure 6.4).



Figure 6.3 Cinétique de formation de biofilms sur 48 heures. ns = non-significatif ; *** = p < 0.001



Figure 6.4 Cinétique de formation de biofilms du mutant *PA14_16280⁻* sur 96 heures.

6.1.4 Discussion

L'étude du contrôle génétique de la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* est un domaine en pleine effervescence qui suscite la découverte de nombreux facteurs de régulation. Au courant des dernières années, plusieurs études ont levé le voile sur de nouvelles composantes génétiques pouvant affecter ce comportement bactérien, ce qui rend sa compréhension complexe (A. E. Baker *et al.*, 2016, Kuchma *et al.*, 2015, McGuffie *et al.*, 2016, Xu *et al.*, 2016, Zhu *et al.*, 2016).

Ici, notre recherche se distingue de la plupart des autres en étudiant la mécanistique génétique du *swarming* en comparant le profil d'expression de cellules de génotypes différents cultivées spécifiquement en surface ou en liquide strictement. Une telle approche a été sélectionnée afin d'identifier de potentiels régulateurs actifs en surface spécifiquement. Dans l'article #2 (Section 5), nous avons levé un dogme sur le contrôle des pARN par le système GacS/A. Aussi, l'utilisation du mutant $\Delta hptB$ incapable de se déplacer en swarming mais dont le phénotype normal a pu être recupéré par l'abolition supplémentaire de *rsmY* et *rsmZ* a confirmé le rôle essentiel de ces pARN dans

ce type de motilité. Ultimement, nos résultats indiquent qu'il existe de nouveaux systèmes de contrôle sur l'expression des pARN, et que ces facteurs agissent sur la régulation de *rsmZ* en condition de surface spécifiquement.

Afin d'identifier ces éléments de régulation, nous avons choisi une approche transcriptomique à haut débit en utilisant la méthode *RNAseq* et comparé les transcriptomes de la souche sauvage et celui du double mutant $\Delta hptBgacA$ cultivés en conditions *swarming* ou planctoniques. Puisque nous étions à la recherche de nouveaux régulateurs affectant la motilité de surface ainsi que l'expression de *rsmZ*, nous avons dirigé nos efforts sur des candidats dont l'expression est influencée par la mise en culture en condition de motilité de type *swarming* spécifiquement (Table 11.4). Suite à cette recherche, nous avons identifié deux potentiels régulateurs de la motilité de surface ainsi que de l'expression de *rsmZ* (Table 6.2, Figure 6.1 et Figure 6.2).

Le gène *PA14_16280* (*PA3721*, chez la souche de référence PAO1) code pour un régulateur nommé NalC, de la famille des régulateurs TetR qui contrôle négativement la pompe MexAB-OprM (impliquée dans la résistance aux antibiotiques) indirectement en régulant l'expression d'un peptide anti-répresseur ArmR (L. Cao *et al.*, 2004, Wilke *et al.*, 2008). La découverte de l'effet de NalC sur le contrôle de la motilité de surface ainsi que de *rsmZ* n'a jamais été décrite chez *P. aeruginosa* au meilleur de nos connaissances. Toutefois, il serait intéressant de vérifier si le contrôle de l'expression de *rsmZ* en surface par PA14_16280 est dépendant du peptide anti-répresseur ArmR.

Généralement, les régulateurs de la famille TetR sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques, le métabolisme, le transport de petites molécules ainsi que sur le QS (Cuthbertson *et al.*, 2013). Chez *Vibrio cholerae*, la protéine HapR (un régulateur de type TetR) est impliquée dans la communication intercellulaire et est sous le contrôle de pARN (Lenz *et al.*, 2004). Toutefois, aucune étude n'a rapporté, à ce jour, la capacité de protéines faisant partie de cette famille, à réguler l'expression de pARN.

Afin de mieux caractériser le gène $PA14_16280$, nous avons effectué des tests de formation de biofilms à plusieurs temps. Contre toute attente, nous avons décelé une augmentation significative (p < 0.001) de la formation de biofilm dès 48 heures chez ce mutant (Figure 6.3). Ce phénotype s'est avéré encore plus important après des

incubations prolongées (Figure 6.4). Ce résultat inattendu est difficilement explicable étant donné que l'abolition du gène rsmZ seulement n'influence pas significativement sa capacité à former un biofilm étant donné que rsmY peut compenser pour l'absence de ce pARN (Figure 6.3 et (Brencic et al., 2009b)). Une approche intéressante à adopter dans notre étude aurait été d'effectuer ce même test, mais sur des plus courtes périodes d'incubation afin de vérifier si un mutant nalC ne serait pas plutôt défavorisé dans sa capacité d'attachement à une surface. Aussi, pour mieux comprendre le rôle de ce gène dans la formation de biofilm, l'intégration de rapporteurs transcriptionnel et traductionnel pelA-lacZ chez un mutant PA14 16280⁻ pourrait permettre d'obtenir de nouveaux éléments d'information sur sa fonction. Étant donné que PA14 16280 fait partie de la famille de régulateurs de type TetR, reconnus pour affecter diverses fonctions métaboliques chez les bactéries, il se pourrait fortement que les résultats que nous avons observés dans notre étude soient le bilan de l'effet d'une mutation du gène PA14 16280 sur plusieurs facteurs de régulation. En effet, le peu d'information disponible sur ce gène ainsi que les résultats que nous avons obtenus nous laissent présager que son mécanisme de contrôle sur l'expression de rsmZ par PA14 16280 est indirect et mérite d'être étudié plus en profondeur.

L'explication de l'augmentation de la formation de biofilm et de la motilité de type *swarming* que présente le mutant *PA14_16280*⁻ demeure complexe. Shrout et collègues (2006) ont rapporté que dans des conditions favorisant le *swarming*, des biofilms plats et non-structurés sont formés par *P. aeruginosa*. Toutefois, cette étude n'a pu confirmer cela que par des modélisations mathématiques se basant des données biologiques connues. Une autre étude caractérisant le rôle de la protéine SadB a déjà identifié qu'un mutant dans ce gène affecte la formation de biofilms, mais favorise le déplacement sur une surface semi-solide (Caiazza *et al.*, 2007). D'ailleurs, cette protéine fait partie d'une cascade de régulation impliquant le système GacS/A ainsi que SadC, une diguanylate cyclase qui affecte les niveaux de di-GMP cyclique (Moscoso *et al.*, 2014). Toutefois, le rôle de SadB reste à être déterminé. Plusieurs autres études ont démontré un rôle inverse entre la motilité de type *swarming* et la formation de biofilms qui implique la présence de protéines modulant les concentrations de di-GMP-cyclique (Merritt *et al.*, 2007, Merritt *et al.*, 2010). Cependant, l'étude de la motilité de type *swarming* et des biofilms impliquant

cette molécule semble plus complexe qu'un simple modèle de régulation inverse dépendant de la concentration totale de cette dernière. En effet, une étude récente démontre qu'un niveau élevé de di-GMP cyclique ne bloque pas automatiquement la motilité de type *swarming* (A. E. Baker et al., 2016). Donc, il se pourrait bien que NalC puisse exercer un effet sur ce messager secondaire, ce qui expliquerait ce résultat en apparence contradictoire que nous observons. Il serait intéressant de déterminer si NalC peut influencer la motilité de type *swarming* par la modulation de la concentration de c-di-GMP cyclique en impliquant la pompe MexAB-OprM. Des dosages de cette molécule seront donc à être effectués chez les mutants *nalC*⁻ et MexAB-OprM. Aussi, la vérification du caractère hyperbiofilm d'un mutant *nalC*⁻ par l'utilisation de *flow cells* serait à envisager pour confirmer nos résultats.

La capacité de régulation de NalC sur *rsmZ* en condition de surface reste à être étudiée. Le rôle de cettre protéine semble être indirect étant donné qu'une réduction d'environ 40% de l'expression de *rsmZ* en condition de surface chez un tel mutant a été observée (Figure 6.1). De plus, dans nos analyses transcriptomiques, ce gène est sousexprimé chez un double mutant $\Delta hptBgacA$ que par deux fois comparativement à la souche sauvage en condition *swarming* (Table 11.6). Toutefois, ceci demeure une découverte intéressante qui appuie fortement qu'il est important de considérer le mode de culture bactérien utilisé pour l'étude de certains phénomènes de régulation. Il faudra aussi confirmer par qRT-PCR que les résultats que nous avons obtenus par l'utilisation de rapporteurs transcriptionnels *rsmY/Z-lacZ* sont valides.

Nous avons, dans une moindre mesure, étudié l'impact du gène *PA14_03110* (*PA0252*) sur la motilité de type *swarming* ainsi que sur le contrôle de l'expression de *rsmZ*. Tout comme un mutant *PA14_16280*-, *PA14_03110* contrôle négativement la motilité de type *swarming* et positivement l'expression de *rsmZ* (Table 6.2, Figure 6.1 et Figure 6.2). Le gène *PA14_03110* code pour une protéine hypothétique de 95 acides aminés (<u>www.pseudomonas.com</u>). Il s'agit d'une protéine présente chez plusieurs souches du *P. aeruginosa* et où aucun autre homologue bactérien n'a été identifié à ce jour (<u>https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</u>). De plus, aucun domaine n'a pu être défini suite à des

analyses bioinformatiques (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</u> et http://prosite.expasy.org/) Le rôle de cette protéine reste inconnu.

À la lumière de cette étude, nos résultats renforcent l'idée globale que la motilité de type swarming est un comportement impliquant une multitude de facteurs de régulation. En effet, ce comportement de surface ne peut pas être strictement étudié qu'en se fiant aux niveaux d'expression des pARN RsmY et RsmZ. Nos résultats indiquent aussi que malgré qu'un effet sur cette motilité ait été observé chez plusieurs mutants sans pour autant affecter la fonction flagellaire (Figure 11.16 et Figure 11.17), à peine deux mutants ont démontré un effet sur le contrôle de rsmZ. Toutefois, il aurait été intéressant de vérifier si la production de rhamnolipides expliquerait les phénotypes hyperswarmer des autres candidats que nous avons identifiés. Bref, il est impossible d'exclure hors de tout doute l'importance et l'implication des facteurs de régulation qui ont déjà identifiés comme ayant un effet sur la motilité de type swarming. Toutefois, le message que nous avons pu faire ressortir de nos études est que certains sytèmes de régulation bien étudiés tel le système GacS/GacA, semblent réorganisés et nonessentiels au contrôle de rsmZ dans des conditions de culture en surface. En effet, de plus en plus d'études en viennent aux mêmes conclusions que nous et démontrent l'ampleur des cascades de régulation qui peuvent être générées chez des cellules cultivées en surface (Luo et al., 2015, C. L. Miller et al., 2016). Tout dernièrement, le pARN RsmW a été identifié par la méthode RNAseq comme étant spécifiquement surexprimé en condition de croissance en surface (biofilm) lorsque comparé à une culture planctonique (C. L. Miller et al., 2016). Les résultats publiés par ce groupe confirment une fois de plus que la régulation bouillon/surface est redéfinie chez des cellules cultivées dans deux modes de vie bactériens différents. Ainsi, un nouveau secteur d'investigation semble être en émergence et l'utilisation de la motilité de type swarming peut être considéré comme un bon modèle pour l'étude des différences bouillon-surface qui existent.

Il est intéressant de noter que le pARN PhrS (*PA14_21260*) a été identifié dans notre étude comme étant surexprimé plus de 10 fois chez le double mutant $\Delta hptBgacA$ comparativement à la souche sauvage strictement en condition de surface (Table 11.4).

Étant donné que ce pARN a été décrit comme étant un activateur de l'expression au niveau traductionnel de la protéine MvfR qui est responsable de l'activation du système de QS pqs chez P. aeruginosa (H. Cao et al., 2001, Sonnleitner et al., 2011a), nous avons vérifié l'impact de PhrS sur la motilité de type swarming. Toutefois, aucun effet n'a été observé sur ce comportement de surface (Figure 11.19). De manière étonnante, il a déjà été rapporté dans un mémoire de maîtrise que l'abolition de PhrS chez P. aeruginosa entraîne une réduction dans la motilité de surface dans la souche PA14 (Taylor, 2014). Afin de comprendre ces résultats opposés, il serait important de créer un mutant « propre » phrS afin de pouvoir déterminer son rôle au sein du swarming étant donné que le mutant phrS utilisé dans notre étude et celle de Taylor proviennent tous deux de la banque de mutants non-redondants PA14. Une limite de notre étude a été la difficulté d'analyse des données de transcriptomique et de la sélection des gènes candidats sur lesquels poursuivre nos expériences. En effet, l'utilisation du RNAseq a généré une multitude de résultats qui peuvent être interprétées de plusieurs façons (ANNEXE D : Matériel supplémentaire du Chapitre 6 - Identification de nouveaux régulateurs du petit ARN RsmZ actifs en condition de surface). De nombreux gènes associés au métabolisme, la réplication et respiration cellulaire ont été identifiés et consistent en la majeure partie de ces transcriptomes. Ces résultats ne sont pas si surprenants étant donné le caractère multifactoriel qu'est la motilité de type swarming tel qu'il a déjà été décrit par Tremblay & Déziel (2010). Puisque que nous étions à la recherche d'un nouvel régulateur de *rsmZ* actif en surface, une approche par criblage aurait été préférentielle. En effet, l'utilisation d'un rapporteur *rsmZ*-GFP inséré dans le double mutant ΔhptBgacA pour ensuite effectuer un criblage en condition de surface aurait été une façon probablement plus directe d'identifier ces régulateurs. Toutefois, le développement de la méthode aurait nécessité une période d'optimisation d'où la raison pour avoir adopté la voie RNAseq. Cette méthode s'est néanmoins avérée intéressante afin d'obtenir une vision globale des différences qui existent entre la souche sauvage et le double mutant $\Delta hptBgacA.$

7 NOUVELLES PERSPECTIVES ET FONCTIONS DU SYSTÈME GACS/A

7.1.1 Mise en contexte

Plusieurs études ont démontré le rôle central du système GacS/A sur la capacité de *P. aeruginosa* à causer des infections chez différents hôtes (Goodman *et al.*, 2004, Goodman *et al.*, 2009, Rahme *et al.*, 1997, Ventre *et al.*, 2006). Des études menées dans plusieurs laboratoires, incluant le labo Déziel, ont aussi intimement lié ce système à la motilité de type *swarming* (Heurlier *et al.*, 2004). Chez les pseudomonades, le senseur membranaire non-orthodoxe GacS a pour partenaire le régulateur de réponse GacA (Workentine *et al.*, 2009). En effet, chez *P. aeruginosa*, ce système a été décrit comme étant responsable de l'activation de l'expression des petits ARN, RsmY et RsmZ et de contrôler l'expression des gènes impliqués dans la transition mode de vie planctonique et sessile *via* le régulateur post-transcriptionnel RsmA (Brencic *et al.*, 2009a, Brencic *et al.*, 2009b, Goodman *et al.*, 2004).

Malgré que le senseur GacS et le régulateur de réponse GacA forment un système à part entière, certains résultats publiés semblent contradictoires sur le phénotype biofilm engendré par une mutation dans l'un ou l'autre de ces gènes. En effet, il a été vu par Yeung et collègues qu'une mutation dans le gène *gacS* entraîne une augmentation x2 de la capacité de la souche sauvage à former un biofilm (Yeung *et al.*, 2009). Toutefois, le phénotype inverse a été observé chez un mutant *gacA*⁻ dans cette même étude et d'autres aussi (Brencic *et al.*, 2009b, Yeung *et al.*, 2009). Ces différences ne se limitent pas au phénoype biofilm. Une mutation dans le gène *gacA* ou *gacS* entraîne aussi deux phénotypes *swarming* opposés (*hyperswarmer* et *hyposwarmer*) (Brinkman *et al.*, 2001, Yeung *et al.*, 2009).

Étant donné l'importance du système GacS/GacA sur le contrôle des pARN RsmY et RsmZ et le peu d'études comparant les phénotypes qu'engendre des mutations dans les gènes *gacS*⁻ et *gacA*⁻ chez une même souche, nous avons décidé d'effectuer ces expériences chez PA14 afin de mieux comprendre comment ces différences peuvent être expliquées.

7.1.2 Méthodologie

7.1.2.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes utilisées pour ce projet sont toutes dérivées de la souche parentale de *P. aeruginosa* PA14 (Rahme *et al.*, 1995). Les souches bactériennes ont été cultivées à 37 °C dans le milieu TSB (Difco) dans un tambour rotatif TC-7 (New Brunswick, Canada) ou sur des géloses TSB. Le détail des souches et plasmides est disponible dans le Table 7.1.

| | • | | |
|------------------------------------|------|---|------------------------------------|
| Souches | ED # | Phénotype/Génotype | Référence |
| E. coli | | | |
| SM10 λ pir | 222 | <i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu Km ^R λpir | (Simon <i>et al.</i> , 1983) |
| P. aeruginosa | | | |
| UCBPP-PA14 | 14 | Souche sauvage | (Rahme <i>et al.</i> , 1995) |
| PA14 gacA ⁻ | 1800 | <i>PA14_30650</i> ::MAR2xT7, Gm ^R ID34781 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14 gacS⁻ | 1360 | PA14_52260::MAR2xT7, Gm ^R ID47013 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14 gacS⁻ ∆gacA | 2964 | Double mutant <i>gacS</i> ::MAR2xT7 <i>gacA markerless</i> , Gm ^R | Cette étude |
| PA14 rhlA ⁻ | 1 | <i>PA14_19100</i> ::MAR2xT7, Gm ^R ID23291 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA14 <i>fliC</i> ⁻ | 13 | <i>PA14_50290</i> ::MAR2xT7, Gm ^R ID36424 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| Plasmides | | | |
| pCTX- <i>rsm</i> Y- <i>lacZ</i> | 1993 | Vecteur chromosomique CTX intégratif contenant le gène rapporteur <i>lacZ</i> pour suivre l'expression transcriptionnelle du gène <i>rsmY</i> | (Brencic <i>et al.</i> , 2009b) |
| pCTX- <i>rsmZ-lacZ</i> | 1994 | Vecteur chromosomique CTX intégratif contenant le gène rapporteur <i>lacZ</i> pour suivre l'expression transcriptionnelle du gène <i>rsmZ</i> | (Brencic <i>et al.</i> , 2009b) |
| pEX18Ap | 689 | Vecteur suicide, Cb ^R , <i>sacB</i> | (Hoang <i>et al.</i> , 1998) |
| pFJP19 | 2966 | pEX18Ap avec la construction du gène <i>gacA</i> tronguée | Cette étude |

Table 7.1 Souches et plasmides utilisés dans cette étude.

7.1.2.2 Tests de motilité

Les tests de motilité de type *swimming* et *swarming* ont été effectués tels que décrits à la Section 5.1.4.3.

7.1.2.3 Tests de complémentation

Les tests de complémentation en condition de motilité de type *swarming* ont été effectués en utilisant un stock de mélange de rhamnolipides (Jeneil) dilué dans du méthanol 100% à une concentration de 10 000 ppm. Brièvement, un volume de 5 µl de la solution de rhamolipides était ajouté au centre de la gélose *swarming* 20 minutes avant l'inoculation de la souche directement par-dessus cette goutte afin que le solvant puisse s'évaporer. Une fois inoculées, les géloses ont été mises dans un sac fermé hermétiquement et incubées pour une durée de 16 heures à une température de 34 °C avant observation des résultats.

7.1.2.4 Dosage de l'activité de la β-galactosidase

En bref, les dendrites des souches bactériennes cultivées en condition de motilité de type *swarming* ont été récoltées avec un écouvillon et solubilisées dans un volume de 1 ml de PBS 1X stérile dans un tube de type Falcon de 15 ml. Les tubes ont par la suite été mélangés par brassage à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes et la DO₆₀₀ mesurée à l'aide d'un Nanodrop. La DO₆₀₀ a ensuite été ajustée à 0,05 dans un volume final de 100 μ l de PBS 1X stérile. Par la suite, le protocole de (Jeffrey H. Miller, 1972) modifié a été utilisé afin de mesurer l'activité de la β -galactosidase.

7.1.2.5 Construction du double mutant ΔgacAgacS

La méthode de PCR en boîte a été utilisée afin de construire le vecteur suicide pEX18Ap-AgacA. La délétion du gène gacA (PA2586/PA14 30650) a été effectuée en utilisant les paires d'amorces FJP_UP_gacA_pEX_For/FJP_UP_gacA_pEX_Rev et FJP DN gacA pEX For/FJP DN gacA pEX Rev afin d'amplifier les fragments de gauche et de droite jonchant la séquence du gène à déléter (Table 7.2). Une fois les deux fragments amplifiés, ceux-ci ont été mélangés ensemble afin de permettre l'hybridation des séquences homologues et ensuite amplifiés avec la paire d'amorces FJP_UP_gacA_pEX_For/FJP_DN_gacA_pEX_Rev 7.2). (Table Le produit d'amplification obtenu a par la suite été cloné dans le SCM présent sur le vecteur suicide pEX18Ap en utilisant les sites de restriction EcoRI et Pstl. Le plasmide recombinant (pFJP17) a par la suite été utilisé pour transformer des cellules compétentes SM10 d'E.

Résultats – Chapitre 7: Nouvelles perspectives du système GacS/A

coli et les colonies positives, sélectionnées sur gélose TSB contenant 50 µg/ml de carbénicilline. Une conjugaison à deux partenaires entre la souche *gacS*⁻ et SM10pFJP17 a ensuite été effectuée. Les simples recombinants ont été sélectionnés en utilisant des géloses TSB contenant 300 µg/ml de carbénicilline et 20 µg/ml de triclosan et repiquées dans du TSB liquide pour la nuit. Les doubles recombinants ont été sélectionnés sur gélose LB sans sel contenant 10% de sucrose. Les colonies positives ont été confirmées par PCR. La partie délétée du gène *gacA* correspond à 99% de la séquence codante du gène original.

Table 7.2 Amorces utilisées pour cette étude.

| Nom | Séquence (5' → 3') | | | |
|---|--|--|--|--|
| FJP_UP_gacA_pEX_For ¹ | atccgg <mark>gaattc</mark> TCGGCGATGGTCGCTATGG | | | |
| FJP_UP_gacA_pEX_Rev ² | AACGGCGCTCATCTAGCTGGCCACGCTGCACCTCGTCGC | | | |
| FJP_DN_gacA_pEX_For | GCCAGCTAGATGAGCGCCG | | | |
| FJP_DN_gacA_pEX_Rev ¹ | atccggctgcagGTCGTCCCGCAGCAGGATG | | | |
| Sites de restriction utilisés (rouge): ² Séquence homologue aux fragments (en gras). | | | | |

7.1.3 Résultats

7.1.3.1 Un mutant gacA⁻ ne présente pas le même phénotype de motilité de type swarming qu'un mutant gacS⁻

Suite à l'incubation des mutants *gacA*⁻ et *gacS*⁻, nous avons observé que ceux-ci affichent une motilité de type *swarming* opposée (*hyperswarmer* et *hyposwarmer* respectivement, Figure 7.1A). Comme mentionné plus tôt dans cette thèse, la présence d'un flagelle et la production d'un agent mouillant sont nécessaires à la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa*. Nous avons donc vérifié si ces facteurs seraient en cause des résultats observés.

Lors de nos tests de motilité de type *swimming*, nous avons identifié une diminution de la fonctionalité flagellaire du mutant *gacS*⁻ comparativement à la souche sauvage (Figure 7.1B). En effet, une diminution de plus de 30% de l'activité du flagelle a été détectée. Aussi, l'ajout exogène de rhamnolipides à un tel mutant n'a que très légèrement amélioré sa capacité à se mouvoir sur une surface semi-solide (Figure 7.1C).

7.1.3.2 GacS et GacA sont responsables du contrôle de l'expression de RsmY et RsmZ en condition *swarming*

Étant donné que les phénotypes *swimming* et *swarming* des mutants *gacA*⁻ et *gacS*⁻ sont diamétralement opposés, nous avons vérifié l'effet d'une mutation de ces gènes sur l'expression des petits ARN RsmY et RsmZ puisque ce système a bien été défini comme responsable de leur expression en condition de culture liquide (Brencic *et al.*, 2009b).

En utilisant des rapporteurs transcriptionels *lacZ*, nous avons observé une diminution de l'expression de *rsmY* et *rsmZ* chez les mutants *gacA*⁻ et *gacS*⁻ en condition de motilité de type *swarming* (Figure 7.1D).

7.1.3.3 Le senseur GacS peut activer une autre cible que GacA

Puisque les phénotypes *swimming* et *swarming* des mutants $gacA^-$ et $gacS^-$ ne sont opposés malgré qu'ils fonctionnent en temps que partenaires pour le contrôle de l'expression de *rsmY* et *rsmZ*, nous avons voulu redéfinir la hiérarchie des protéines GacA et GacS sur le contrôle du déplacement de surface. Pour cela, nous avons crée un double mutant $\Delta gacAgacS$ et testé sa capacité à se déplacer sur une surface semi-solide.

En utilisant la méthode d'échange allélique, nous avons pu éliminer 99% du gène *gacA* dans le simple mutant *gacS*. Suite à cela, nous avons étudié la motilité de type *swarming* du double mutant $\Delta gacAgacS$ et avons vu que ce dernier affiche un déplacement de surface réduit mais pas tout à fait équivalent à celui d'un simple mutant *gacS*⁻ (Figure 7.2A). Des analyses de recouvrement de surface ont en effet confirmé qu'un double mutant $\Delta gacAgacS$ occupe une plus grande surface de manière significative (*p* < 0.01) lorsque comparé au mutant *gacS*⁻ (Figure 7.2B).



Figure 7.1 Tests phénotypiques et génotypiques associés au mutant gacS

(A)Phénotypes *swarming* (B) Activité flagellaire (C) Tests de complémentation en ajoutant du méthanol (MeOH) ou un mélange de rhamnolipides (RL) (D) Activité transcriptionnelle *rsmY-lacZ* et *rsmZ-lacZ* en condition de motilité de type *swarming*.



Figure 7.2 Tests et analyses de la motilité de type swarming d'un double mutant gacAgacS. (A)Phénotypes *swarming* (B) Recouvrement de surface des souches en condition *swarming*. ** = *p* < 0.01

7.1.4 Discussion

Les systèmes à deux composantes permettent aux bactéries de s'adapter rapidement à des changements environnementaux (Stock *et al.*, 2000). En effet, chez la bactérie *P. aeruginosa*, il existe plus d'une soixantaine de ces systèmes, ce qui lui confère la capacité de coloniser plusieurs niches écologiques (Rodrigue *et al.*, 2000).

L'étude du système GacS/GacA chez *P. aeruginosa* a permis de comprendre l'importance d'un tel système sur la capacité d'une bactérie à pouvoir causer des infections. Plus récemment, des études ont révélé que ce système exerce ses effets par la modulation de l'expression de deux petits ARN : RsmY et RsmZ (Brencic *et al.*, 2009b). Ces derniers ont une capacité de titration de la protéine liant l'ARN, RsmA, responsable de l'inhibition des gènes associés à l'établissement d'infections chroniques (tels que les biofilms) et l'activation indirecte de gènes nécessaires pour ceux responsables à la production de facteurs de virulences liés aux infections aigües (Figure 1.9) (Brencic *et al.*, 2009a).

Comme il a été publié par plusieurs groupes que des senseurs membranaires agissent directement au niveau de l'activité du senseur GacS pour ainsi moduler l'expression des petits ARN RsmY et RsmZ (Brencic *et al.*, 2009b, Chambonnier *et al.*, 2016, Goodman *et al.*, 2004, Goodman *et al.*, 2009, Kong *et al.*, 2013), il a toujours été considéré que le couple GacA/GacS régule exclusivement la transcription de ces derniers. Toutefois, des études ont rapporté que certains phénotypes qui devraient normalement être semblables entre un mutant *gacS*⁻ et *gacA*⁻ sont opposés chez ces derniers (Brinkman *et al.*, 2001, Yeung *et al.*, 2009). Étant donné les différences expérimentales et variabilité qui existe d'études en études, nous avons initialement entrepris d'étudier la motilité de type *swarming* chez les simples mutants *gacA*⁻ et *gacS*⁻ chez la souche PA14. Dans nos conditions, la mutation de ces gènes entraîne des phénotypes *hyper* et *hyposwarmer* respectivement (Figure 7.1). De plus, la fonction flagellaire d'un mutant *gacS*⁻ est réduite de plus de 30% ce qui explique partiellement un défaut de motilité de surface d'un tel mutant, d'autant plus que l'ajout exogène de rhamnolipides n'a pas complémenté le phénotype de migration (Figure 7.1).

Résultats – Chapitre 7: Nouvelles perspectives du système GacS/A

Tel qu'il a été vu dans la publication #2 (Section 5), le mode de vie bactérien étudié peut grandement influencer la régulation génétique des pARN. Afin de vérifier si la régulation de RsmY et RsmZ pourrait être modulée en fonction des conditions de culture et expliquer nos résultats, nous avons suivi la transcription de ces pARN en condition *swarming*. Toutefois, nous n'avons observé aucune différence dans la régulation de ces pARN entre les mutants *gacA*⁻ et *gacS*⁻. (Figure 7.1).

Afin de comprendre la hiérarchie des composantes GacS et GacA sur la motilité de type *swarming*, nous avons entrepris la construction du double mutant $\Delta gacAgacS$. L'abolition des gènes *gacA* et *gacS* a généré un défaut important dans la motilité de surface similaire au simple mutant *gacS*⁻ (Figure 7.2)

Généralement, l'utilisation d'un mutant $\Delta gacA$ est l'approche utilisée pour l'étude des effets du système GacS/GacA chez *Pseudomonas*. Toutefois, certaines études ont déjà utilisé des mutants dans ces deux gènes afin de mieux comprendre le rôle de ce système sur des phénomènes étudiés. Par exemple, Yu et collègues ont identifié qu'un sidérophore non-fluorescent produit par la bactérie *Pseudomonas* sp. Souche HYZ est sous le contrôle du système GacS/A (Yu *et al.*, 2014). Dans cette étude, l'utilisation de mutants dans les gènes *gacA* et *gacS* a généré un phénotype équivalent dans la production du sidérophore ce qui suggère très fortement qu'ils agissent en tant que partenaires. De plus, des analyses par *Yeast two-hybrid* en utilisant les protéines GacS et GacA semblent renforcer que GacA interagisse spécifiquement avec ce senseur membranaire (Workentine *et al.*, 2009).

En 2007, Davies et collègues ont découvert que le senseur membranaire GacS est impliqué dans le contrôle de l'apparition de variants phénotypiques nommée *small colony variants* (SCV) (Davies *et al.*, 2007). En travaillant avec la souche PA14, il a été vu que pareillement à un mutant $\Delta gacA$, un mutant $\Delta gacS$ affiche une augmentation de la motilité de type *swarming* ainsi qu'une diminution dans la formation de biofilm. Toutefois, après des incubations prolongées sur une surface, des cellules du génotype $\Delta gacS$ favorisent l'apparition de SCV. Davies *et al.*, ont déterminé que des SCV produits par un mutant $\Delta gacS$ résultent en une diminution de la motilité ainsi qu'une augmentation de l'auto-aggrégation. En effet, ce phénomène a déjà été rapporté chez des SCV de *P.*

aeuginosa (Deziel *et al.*, 2001). Ces indices suggèrent que le mutant $\Delta gacS$ avec lequel nous avons travaillé génère des SCV en condition de motilité de type *swarming* étant donné que nous n'avons pas observé de défaut de croissance d'un mutant $\Delta gacS$ cultivé dans un milieu *swarming* liquide (Figure 11.20). De plus, nous n'avons pas observé de différences au niveau de la taille des colonies des mutants $\Delta gacS$ et $\Delta gacAgacS$ sur gélose lorsque comparé à la souche sauvage et au mutant $\Delta gacA$.

La compréhension de la formation des SCV par *P. aeruginosa* est un phénomène d'importance étant donné que ces derniers démontrent une augmentation de la résistance aux antibiotiques en plus de jouer un rôle prépondérant dans les infections chroniques (Davies *et al.*, 2007, Drenkard *et al.*, 2002, Malone, 2015, Malone *et al.*, 2010). Au courant des dernières années, la régulation de ces variants phénotypiques a de plus en plus été caractérisée et implique la modulation du messager secondaire, le c-di-GMP (Jenal *et al.*, 2006). En effet, artificiellement alterer les niveaux de c-di-GMP peut moduler l'apparition ou la disparition des SCV chez *P. aeruginosa* (Malone *et al.*, 2010).

Pris ensemble, nos résultats indiquent que malgré que GacS et GacA aient bien été définis comme des partenaires qui exercent leur effet par la modulation de l'expression de *rsmY* et *rsmZ* (Brencic *et al.*, 2009b), il semble que ces partenaires ne possèdent pas le même régulon. En effet, les résultats contradictoires obtenus chez un mutant $\Delta gacA$ et $\Delta gacS$ suggèrent que leur régulons ne soit pas complètement identiques et puissent activer d'autres cibles que RsmY et RsmZ, contrairement à ce qui est actuellement pensé. Cette hypothèse est renforcée par la capacité d'un mutant $\Delta gacA$ (Davies *et al.*, 2007).

Une approche transcriptomique tel le *RNAseq* serait ici intéressante à considérer. Afin de découvrir les facteurs impliqués dans la différentiation d'un mutant $\Delta gacS$ en SCV, il faudrait s'assurer de séparer une population « propre » d'un mutant $\Delta gacS$ et de comparer ces deux variants phénotypiques à un mutant $\Delta gacA$. Il est intéressant de noter qu'un double mutant $\Delta gacAgacS$ présente un phénotype *swarming* semblable à celui d'un mutant $\Delta gacS$ ce qui renforce l'hypothèse que GacS puisse réguler une autre cible que GacA (Figure 7.2). Étant donné l'implication de RsmA sur l'apparition de SCV qui est

Résultats – Chapitre 7: Nouvelles perspectives du système GacS/A

du à sa capacité de régulation post-transcriptionnelle directe sur le gène *psl* impliqué dans la formation de biofilm (Irie *et al.*, 2010), il serait important de comprendre comment un mutant $\Delta gacS$ peut présenter un phénotype SCV similaire à $\Delta rsmA$ étant donné que leurs rôles sont généralement antagonistes (Brencic *et al.*, 2009a, Brencic *et al.*, 2009b). Aussi, l'étude de la production du c-di-GMP serait intéressante à vérifier chez les mutants $\Delta gacA$, $\Delta gacS$ et $\Delta gacAgacS$ afin de déterminer si l'inhibition de la motilité de type *swarming* pourrait être liée à une surproduction de ce messager secondaire.

Puisqu'il est bien connu que GacS est en mesure de phosphoryler le régulateur de réponse GacA (Workentine *et al.*, 2009), et que nous avons accumulé des indices suggérant que GacS pourrait potentiellement phosphoryler d'autres protéines, il serait intéressant d'identifier ces dernières. Afin de répondre à cette question, il faudrait mettre en place un dispositif expérimental où la protéine GacS serait exprimée en plusieurs copies chez un mutant $\Delta gacA$ et ensuite enrichir les phosphoprotéines selon des méthodes existantes se basant sur la chromatographie d'affinité spécifiques aux résidus phosphorylés (Barbieri *et al.*, 2008, Kinoshita *et al.*, 2011, Wolschin *et al.*, 2005). Suite à cela, une séparation des protéines phosphorylées pourrait être effectuée sur gel SDS-PAGE et les protéines identifiées par spectrométrie de masse.

8 INTERACTION ENTRE DIFFÉRENTES SOUCHES DANS DES CO-CULTURES EN CONDITION DE MOTILITÉ DE TYPE SWARMING

8.1.1 Mise en contexte

L'importance de la motilité de type *swarming* dans le développement ou la vie d'un biofilm est un questionnement d'importance étant donné qu'il s'agit de deux modes de vie bactériens de groupe sur une surface. De nombreux indices indiquent que ces deux comportements bactériens sont inversement régulés chez *P. aeruginosa*; en effet des cellules hautement motiles en condition *swarming* sont généralement affectées négativement en condition biofilm (Caiazza *et al.*, 2007, Kong *et al.*, 2013, Shrout *et al.*, 2006). Récemment, nous avons identifié et caractérisé le mutant $\Delta hptB$ chez lequel la motilité de type *swarming* est sévèrement affectée mais possède un flagelle fonctionnel et produit suffisamment de rhamnolipides afin d'effectuer ce type de déplacement. De plus, une mutation dans ce gène n'empêche par la formation d'un biofilm (Figure 11.7 et Figure 11.8). Nous avons, voulu examiner la possibilité qu'un élément supplémentaire puisse complémenter le défaut de motilité de type *swarming* engendré par une mutation dans le gène *hptB* avant de poursuivre notre étude de biofilms en de co-cultures en cellules d'écoulement (*flow cell*). Pour ce faire, nous avons adopté une approche de mise en co-culture de souches fluorescentes en condition *swarming*.

8.1.2 Méthodologie

8.1.2.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes utilisées pour ce projet sont toutes dérivées de la souche parentale de *P. aeruginosa* PA14 (Rahme *et al.*, 1995). Les souches bactériennes ont été cultivées à 37 °C dans le milieu TSB (Difco) dans un tambour rotatif TC-7 (New Brunswick, Canada) ou sur des géloses TSB. Le détail des souches et plasmides est disponible dans le Table 8.1.

| Souches | ED # | Phénotype/Génotype | Référence |
|--------------------------------------|------|---|---------------------------------|
| P. aeruginosa | | | |
| UCBPP-PA14 | 14 | Souche sauvage | (Rahme <i>et al.</i> , 1995) |
| PA14∆hptB | 1214 | Délétion partielle du gène <i>hptB</i> dans lequel le domaine histidine phosphotransfert a été retiré | Cette étude |
| PA14 <i>rhlA</i> - | 1 | <i>PA14_19100</i> ::MAR2xT7, Gm ^R | (Liberati <i>et al</i> ., 2006) |
| PA14 <i>pilA</i> - | 12 | <i>PA14_58730</i> ::MAR2xT7, Gm ^R | (Liberati <i>et al</i> ., 2006) |
| PA14 fliC- | 13 | <i>PA14_50290</i> ::MAR2xT7, Gm ^R | (Liberati <i>et al</i> ., 2006) |
| PA14::gfpmut3 | 2725 | Souche sauvage avec intégration chromosomique attTn7 de la protéine fluorescente GFPmut3 | Cette étude |
| PA14∆ <i>hptB</i> ::mKO1 | 2682 | Mutant Δ <i>hptB</i> avec intégration chromosomique <i>attTn</i> 7 de la protéine fluorescente mKO1 | Cette étude |
| Plasmides | | | |
| pUC18T-mini- Tn7T- <i>gfpmut3</i> | 2621 | pUC18T contenant le transposon mini-Tn7 exprimant la <i>gfp</i> sous le contrôle du promoteur constitutif P _{A1/04/03} , Ap ^R , Gm ^R | (Zhao <i>et al</i> ., 2013) |
| pUC18T-mini- Tn7T-mKO1 | 2625 | pUC18T contenant le transposon mini-Tn7 exprimant <i>mKO1</i> sous le contrôle du promoteur constitutif P _{A1/04/03} , Ap ^R , Gm ^R | (Zhao <i>et al</i> ., 2013) |
| pTNS2 | 201 | Vecteur d'expression de la T7 transposase, Ap ^R | (Choi <i>et al.</i> , 2006) |

Table 8.1 Souches et plasmides utilisés dans cette étude.

8.1.2.2 Construction des souches fluorescentes

Pour la construction des souches fluorescentes, les transformations plasmidiques ont été effectuées tel que détaillé par (Choi *et al.*, 2006). En résumé, un volume de 1 mL de bactéries de la souche d'intérêt était lavée 4 fois avec 1 mL sucrose 300 mM et resuspendu dans un volume final de 100 µL sucrose 300 mM. Une quantité de 1 µg du plasmide rapporteur fluorescent et du plasmide pTNS2 était ajouté aux bactéries resuspendues, puis électoporées à 2500 volts. Les cellules transformées étaient resuspendues immédiatement dans 1 mL de TSB pré-chauffé à 37 °C et incubées pour une durée de 2 h à cette même température. Suite à cela, la culture bactérienne était étalée sur une gélose TSB contenant 50 µg/mL gentamicine et incubée pour la nuit. Après 16 à 18 heures d'incubation, la fluorescence des colonies présentes était visualisée à

l'aide d'un Typhoon FLA9500 (GE Healthcare) en comparaison avec la souche non transformée (témoin négatif).

8.1.2.3 Tests de co-culture en condition de motilité de type swarming

Pour l'étude des tests de co-culture en condition de motilité de type *swarming*, le milieu de culture M9DCAA contenant 20 mM NH₄Cl, 12 mM Na₂HPO₄, 8,6 mM NaCl, 1 mM MgSO₂, 1 mM CaCl₂, 11 mM dextrose, 0,5% casamino acids (Difco) et 0,5% de Bacto-agar (Difco) était autoclavé et une fois refroidi à température-pièce, un volume de 20 mL était versé dans des boîtes de Pétri et séchées pour une durée de 75 minutes dans une hotte à flux laminaire (Tremblay *et al.*, 2010). Suite à cela, les géloses étaient inoculées avec 5 μ L d'une suspension bactérienne de DO₆₀₀ = 3,0 provenant d'un mélange 1:1 de deux souches mélangées (chacune à DO₆₀₀ = 3,0) juste avant inoculation. Les géloses étaient ensuite incubées à 34 °C pour une durée de 16 à 20 h dans des sacs fermés hermétiquement.

8.1.2.4 Décomptes bactériens

Afin d'effectuer un décompte bactérien des colonies *swarming*, les souches testées en triplicata étaient récupérées après incubation *overnight* à 34 °C et à l'aide d'un emporte-pièce, le centre de la colonie *swarming* était séparée des dendrites. Suite à cela, une spatule stérile était utilisée pour transférer les centres *swarming* dans des tubes de type Falcon de 50 mL contenant 2 mL de PBS stérile. Toutes les extrémités des dendrites d'une gélose *swarming* étaient récoltées à l'aide d'un écouvillon et transférées dans un autre tube de 50 mL contenant 2 mL de PBS stérile. Ensuite, les tubes étaient vortexés pour une durée de 10 secondes et des dilutions en série jusqu'à 10⁻⁷ étaient effectuées. Un volume de 100 µL de chaque dilution était déposé sur une gélose TSB et incubé à 37°C pour une durée de 16 à 20 heures. Le lendemain, les géloses contenant entre 30 et 100 colonies étaient gardées pour des analyses subséquentes. Une fois les décomptes effectués, les résultats étaient par la suite analysés en utilisant le logiciel GraphPad Prism v6.0.

8.1.2.5 Observation de la fluorescence

Afin d'observer la fluorescence des souches testées, celles-ci étaient placées dans un Typhoon FLA9500 (GE Healthcare) et analysées par balayage à une résolution de 100 µM à un voltage de 250 en utilisant le filtre JH1 pour la protéine fluorescente mKO1 et le filtre JH3 pour la protéine GFPmut3. Les souches non-marquées par une protéine fluorescente étaient aussi analysées afin de pouvoir normaliser le signal de fluorescence. Par la suite, les images étaient traitées en utilisant la suite de logiciels ImageQuant TL v8.1.

8.1.3 Résultats

8.1.3.1 Le défaut de motilité s*warming* du mutant Δ*hptB* ne peut être complémenté

Suite à l'incubation du mutant $\Delta hptB$ et de la souche sauvage toutes deux marquées avec une protéine fluorescente (mKO1 en rouge et GFP en vert respectivement) en condition de motilité de type *swarming*, nous avons initialement observé que le mutant $\Delta hptB$ (rouge) se retrouve concentré au centre de la colonie *swarming* tandis que la souche sauvage se déplace normalement (Figure 8.1). Ce résultat indique que l'incapacité d'un tel mutant à générer une motilité de surface ne peut être complémentée par un élément supplémentaire fourni par la souche sauvage. Ce résultat fut aussi corroboré par des tests de co-culture du mutant $\Delta hptB$ et du mutant *fliC* (mutant dans la synthèse flagellaire) où aucun déplacement de surface n'a été observé (Figure 8.2). Dans de telles conditions, le mutant $\Delta hptB$ ne se déplace pas et reste au centre de la gélose *swarming*. (Figure 8.2).

Afin de mieux comprendre la dynamique des populations présentes dans nos essais de co-culture, j'ai séparé les deux groupes bactériens présents au niveau d'une co-culture *swarming* c'est-à-dire les cellules présentes à l'extrémité des dendrites et au centre de la colonie. Étonnamment, lorsque nous avons effectué des décomptes sur les cellules présentes au niveau des dendrites d'une co-culture *swarming* entre la souche sauvage et le mutant $\Delta hptB$ ainsi que dans notre condition témoin (PA14 en combinaison avec un mutant *fliC*), nous avons observé qu'environ 30% de la population totale est représentée par ces mutants (Figure 8.3A). Toutefois, au centre de la colonie, un ratio

équivalent du mutant Δ*hptB* et de la souche sauvage est retrouvé (Figure 8.3B). Aussi, un mutant *fliC*⁻ est grandement avantagé lorsque retrouvé au centre de la colonie *swarming* avec la souche sauvage (Figure 8.3B). Afin de déterminer si la capacité du mutant *fliC*⁻ à se retrouver en grande proportion au centre de colonie *swarming* lorsque co-inoculé avec une autre souche est dû à une croissance plus rapide de cette souche, nous avons effectué un dénombrement cellulaire de la souche sauvage, du mutant Δ*hptB* et du mutant *fliC*⁻ en condition *swarming*. Après décompte cellulaire, nous n'avons décelé aucune différence significative (p > 0.05, test *t* de *Student*) dans le nombre de cellules présentes en surface après incubation des mutants Δ*hptB* et *fliC*⁻ (Figure 8.3C). Toutefois, environ une réduction d'approximativement 1log₁₀ entre le centre *swarming* de la souche sauvage comparativement aux mutants a été observée (Figure 8.3C).

Outre la présence d'un flagelle fonctionnel et la production d'un agent mouillant, éléments ayant été définis comme obligatoire pour la motilité de type *swarming*, certaines études ont rapporté l'importance des pili dans ce type de déplacement bactérien (Kohler *et al.*, 2000). Nous avons voulu vérifier si la co-inoculation de la souche sauvage et d'un mutant *pilA*- pourrait expliquer pourquoi le mutant $\Delta hptB$ est capable de se déplacer en faible proportion dans les dendrites de la souche sauvage. Au niveau des dendrites, nous n'avons observé aucune cellules du génotype *pilA*- lorsque combiné avec la souche sauvage PA14 (Figure 8.3D). De plus au niveau des centres de la colonie *swarming*, moins de 10% de la population totale est représentée par ce même mutant (Figure 8.3D). Le même phénomène fut observé pour la co-culture des mutants $\Delta hptB$ et *pilA*- (Figure 8.3D).



PA14::GFP+ Δ*hptB*::mKO1

Figure 8.1 Tests de co-cultures de différentes souches en fluorescence. (A)Fluorescence de la souche sauvage (B) Fluorescence du mutant $\Delta hptB$ (C) Fluoresence de la co-culture PA14+ $\Delta hptB$



Figure 8.2 Tests de co-cultures entre différentes souches.



Figure 8.3 Décompte en UFC de cultures bactériennes en condition swarming.

(A)Représentation de l'abondance relative en UFC de différents mutants présents dans les dendrites d'une colonie *swarming* en co-culture (B) Représentation de l'abondance relative en UFC de différents mutants présents dans le centre d'une colonie *swarming* en co-culture. (C) Décompte d'UFC de cultures pures en condition *swarming*. (D) Abondance relative en UFC de différentes souches en présence d'un mutant *pilA*⁻. ns = non-significatif ; ** = p < 0.001 ; *** = p < 0.0001

8.1.4 Discussion

Tel que mentionné dans les sections précédentes, une mutation dans le gène *hptB* entraîne un sévère défaut dans la motilité de type *swarming* et n'affiche pas un phénotype hyperbiofilm comme rapporté chez *P. aeruginosa* dans l'étude de certains mutants où ce type de motilité est affecté (Caiazza *et al.*, 2007, Kuchma *et al.*, 2007, Moscoso *et al.*, 2014). L'existence d'un mutant qui ne présente pas cette relation inverse *swarming*-biofilm est d'un grand d'intérêt afin de mieux comprendre le rôle de cette motilité de surface dans la formation de biofilm ainsi qu'au sein d'une population mixte d'une communauté *swarming*.

La présence d'un flagelle fonctionnel et la production de rhamnolipides sont deux éléments essentiels à la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* (Kearns, 2010). Puisqu'un mutant $\Delta hptB$ présente un défaut important dans ce comportement de surface, mais possède ces éléments nécessaires à ce déplacement, nous avons voulu déterminer si la présence d'un facteur supplémentaire pourrait exister afin de favoriser ce type de motilité. Ainsi, cette problématique a été abordée en adoptant une approche de co-cultures en utilisant des souches bactériennes marquées par des protéines fluorescentes.

L'observation des comportements de souches fluorescentes en co-culture lors de tests de motilité de type *swarming* n'est pas suffisante pour tirer des conclusions. En effet, nous avons pu voir qu'initialement, un mélange 1:1 entre la souche sauvage (vert) et du mutant $\Delta hptB$ (rouge) affiche une proportion équivalente de ces deux souches au centre de la colonie *swarming* (couleur jaune) et une absence totale du mutant $\Delta hptB$ aux dendrites (Figure 8.1).

Ce résultat s'est avéré partiellement faux étant donné que lors de décomptes cellulaires effectués en ayant séparé les dendrites des centres de colonies *swarming*, nous avons bel et bien vu une ségrégation 50-50 de la souche sauvage et du mutant $\Delta hptB$ au centre de la colonie (Figure 8.3B). Toutefois, nous avons pu détecter près de 30% de cellules appartenant au génotype $\Delta hptB$ aux extrémités des dendrites (Figure 8.3A). Ceci indique donc que simplement regarder la distribution des populations strictement par fluorescence n'était pas fiable. Il serait intéressant de répéter ces

Résultats – Chapitre 8 : Co-cultures swarming

expériences, mais en inversant les marqueurs fluorescents utilisés chez nos souches (Xavier *et al.*, 2011) et/où en utilisant des protéines fluorescentes plus intenses (ou stable) chez le mutant $\Delta hptB$ afin de mieux détecter sa présence. Alternativement, l'utilisation d'un microscope confocal aurait pu être utile pour l'interprétation des résultats de co-cultures tel qu'il a déjà été utilisé dans des circonstances semblables par Anyan et collègues (Anyan *et al.*, 2014). Dans cette étude, les auteurs ont décortiqué le déplacement de souches fluorescentes en co-cultures au niveau du centre, mi-dendrite et extrémité des dendrites d'une colonie *swarming*. Effectuer de tels tests pourra nous fournir davantage d'éléments d'informations sur la distribution du mutant $\Delta hptB$ présent en co-culture avec la souche sauvage.

Étant donné que les pili bactériens nécessaires à la motilité de type *twitching* pourraient être impliqués dans la motilité de type *swarming* (Kohler *et al.*, 2000), nous nous sommes questionnés quant à l'importance que cet appendice locomoteur dans l'interprétation de nos résultats. Nous avons déterminé qu'aucune colonie du génotype *pilA*⁻ n'est détectée au niveau des dendrites d'une co-culture PA14 + *pilA*⁻ (Figure 8.3D). Toutefois, cette interprétation nécessite d'être approfondie étant donné qu'un mutant *pilA*⁻ semble très fortement désavantagé lorsque mélangé avec des cellules du génotype WT ou même $\Delta hptB$ au centre d'une colonie *swarming* (Figure 8.3D).

Au niveau de la croissance en condition *swarming*, le mutant *pilA*⁻ démontre un phénotype semblable à celui d'un mutant *fliC*⁻, ce qui suggère que la croissance bactérienne n'est pas affectée lorsque *pilA*⁻ est incubée en monoculture (Figure 11.21A). Afin de mieux comprendre comment le mutant *pilA*⁻ pourrait être désavantagé lors de co-cultures, il serait intéressant d'effectuer une cinétique en UFC au cours du temps en prenant des prélèvements à des temps donnés d'une co-culture PA14 + *pilA*⁻. De cette manière, nous pourrions répondre à ce questionnement suite à nos observations initiales.

Autre résultat intéressant : au niveau du centre d'une colonie *swarming* d'une coculture PA14 + *fliC*⁻, environ 80% des cellules retrouvées sont du génotype *fliC*⁻ (Figure 8.3B). Nous avons pu observer une diminution importante de la motilité de type *swarming* d'une telle co-culture à l'opposé d'une co-culture entre la souche sauvage et un mutant *rhlA*⁻ (Figure 11.21B). Ce même phénomène de présence élevée du génotype *fliC*⁻ a aussi

été observé lors de co-cultures entre le mutant Δ*hptB* et le mutant *fliC*⁻ (Figure 11.21C). Tous ces éléments portent à croire qu'une mutation dans le gène *fliC* lui confère un avantage en croissance sur surface comparativement à la souche sauvage et au mutant Δ*hptB*. Bien que nous n'ayons pas observé de différences en UFC statistiquement significatives entre un mutant *fliC*⁻ et Δ*hptB* (p > 0.05), il serait important d'effectuer une cinétique de croissance en condition de surface chez ces mutants (en co-culture) ainsi qu'avec la souche sauvage. Une avenue intéressante à explorer serait aussi de faire des tests de co-cultures dans différentes conditions (c'est-à-dire colonies sur géloses TSB et en culture liquide) afin de déterminer si ce comportement se limite strictement à la motilité de type *swarming*.

À la lumière de notre étude, nos résultats indiquent qu'il existe potentiellement un phénomène de transport collectif chez les bactéries adoptant une motilité de type *swarming*. À l'instar d'un mutant $\Delta rh/A$ qui peut exploiter les rhamnolipides produits par une autre souche (tel que vu ici à la Figure 8.2 et précedemment rapporté par Xavier *et al.*, 2011), le mutant $\Delta hptB$ semble conférer un autre type d'avantage à la souche sauvage lorsque présent en co-culture (Figure 11.21C). Toutefois, il serait important d'effectuer des tests de co-culture entre la souche sauvage et un double mutant $\Delta hptBrh/A$ afin d'exclure le rôle des rhamnolipides de l'équation.

Un tel exemple de relation mutualiste, mais entre deux espèces différentes, en condition de motilité de type *swarming* a déjà été rapporté lors de co-cultures entre la bactérie *Paenibacillus vortex* et *E. coli*. En utilisant une souche de *E. coli* possédant un plasmide de résistance à une β -lactamase, il a été vu en co-culture qu'une souche de *P. vortex* naturellement sensible à de l'ampicilline, peut exploiter la bactérie *E. coli* résistante afin de pouvoir colonier une gélose contenant cet antibiotique (Finkelshtein *et al.*, 2015). En rapport avec nos résultats, il serait intéressant de proposer une relation de symbiose entre différents mutants incapables de se déplacer par eux-même. En effet, il a déjà été observé lors de co-cultures de *P. aeruginosa* et *Burkholderia* en condition *swarming* que ces deux espèces bactériennes peuvent coopérer afin de coloniser un environnement sur lequel il leur serait impossible de se déplacer (Venturi *et al.*, 2010).
Résultats - Chapitre 8 : Co-cultures swarming

Ultimement, il serait intéressant d'approfondir notre étude sur la capacité des mutants $\Delta hptB$ et *fliC*⁻ à pouvoir se retrouver aux extrémités des dendrites de co-cultures (PA14 + $\Delta hptB$) ainsi que (PA14 + *fliC*⁻) malgré leur incapacité à se déplacer en monoculture. Étant donné qu'une mutation dans le gène *pilA*⁻ résulte en l'incapacité de ce dernier à se retrouver aux extrémités des dendrites d'une co-culture PA14+*pilA*⁻, cela porte à croire que les pili pourraient jouer un rôle du type ancrage afin d'arrimer des cellules et se déplacer dans nos conditions. De manière semblable en utilisant des souches marquées par protéines fluorescentes, une étude réalisée par Anyan et collègues chez *P. aeruginosa* a démontré que les pili de type IV favorisent les interactions cellule-cellule (Anyan *et al.*, 2014). De ce fait, il serait intéressant de créer des doubles mutants $\Delta hptBpilA$ et $\Delta fliCpilA^-$ afin de mieux comprendre comment des souches incapables de se déplacer par elles-même, peuvent exploiter celles qui le peuvent.

9 VUE D'ENSEMBLE

9.1 Conclusion

Cette thèse avait pour but d'obtenir une meilleure compréhension du système HptB/Gac/Rsm en caractérisant premièrement la régulation génétique de *rsmA* et deuxièmement en redéfinissant les mécanismes de contrôle des facteurs impliqués dans la balance entre les modes de vie bactériens en liquide et en surface.

Dans un premier lieu, nous avons focusé nos efforts sur la capacité d'auto-régulation de RsmA sur son propre ARNm. Dans cette première publication, nous avons levé le voile sur un mécanisme de contrôle post-transcriptionnel complexe qui n'avait jamais été rapporté chez *Pseudomonas*. Cette découverte nous a permis d'approfondir notre compréhension de la régulation post-transcriptionnelle chez les bactéries et nous ouvre une nouvelle voie sur de potentielles cibles de ce régulateur pléïotropique. En effet, la régulation post-transcriptionnelle semble être un mécanisme de contrôle fortement exploité par *P. aeruginosa* afin d'utiliser de manière optimale ses ressources. Ceci est encore plus probant avec la récente découverte d'un orthologue de RsmA (RsmN) dont le rôle reste à être largement caractérisé (Marden *et al.*, 2013, Morris *et al.*, 2013, Schulmeyer *et al.*, 2016).

Dans un deuxième temps, nos efforts ont été dirigés vers la compréhension de la régulation différentielle des petits ARN RsmY et RsmZ chez des cellules de *P. aeruginosa* cultivées soit en condition planctonique, soit en condition de surface. En effet, l'identification du mutant $\Delta hptB$ qui est incapable d'effectuer une motilité de type *swarming* normale tandis qu'il possède un flagelle fonctionnel et qui produit de rhamnolipides de manière suffisante, nous a servi de modèle pour mieux aborder les mécanismes de contrôle géniques impliqués dans ce phénomène de surface.

De manière surprenante, des études menées sur ce même mutant par un autre groupe de recherche avaient démontré des résultats contradictoires aux notres sur la régulation des pARN RsmY et RsmZ (Bordi *et al.*, 2010). Étant donné qu'il a été déterminé par Tremblay & Déziel (2010), que la compréhension des facteurs génétiques impliqués dans la motilité de type *swarming* est intimement liée aux conditions de culture utilisées

(c'est-à-dire liquide *versus* surface), nous avons décidé de comprendre les disparités observées entre notre étude et celle de (Bordi *et al.*, 2010).

Suite à nos expérimentations, nous avons pu conclure avec certitude qu'en plus d'être essentiels au contrôle de la motilité de type *swarming*, la régulation des pARN est sensible au mode de vie bactérien. De plus, nous avons observé que ce contrôle n'est pas strictement dépendant du système GacS/GacA. En effet, cette étude nous a permis de partir d'un modèle de régulation initial (Figure 2.1) et de le redéfinir de manière à revisiter un dogme de régulation de RsmZ chez des cellules cultivées en condition de surface (Figure 5.5).

Afin d'identifier les facteurs actifs spécifiquement en surface agissant sur *rsmZ*, nous avons opté pour une approche transcriptomique à haut débit en utilisant la technologie *RNAseq*. En visant spécifiquement les gènes étant affectés en condition de surface chez un double mutant $\Delta hptBgacA$ (*versus* la souche sauvage) comparativement à une culture liquide, nous avons dressé une liste de candidats majoritairement composée de facteurs de régulation. En observant l'effet d'une mutation de ces gènes sur la motilité de type *swarming* ainsi que leur effet sur l'expression du pARN *rsmZ*, nous avons pu identifier deux gènes agissant sur la motilité de type *swarming* et sur *rsmZ* spécifiquement en surface, mais dont la fonction reste à être identifiée.

Étant donné l'importance du système GacS/GacA sur la régulation des pARN et à l'observation de phénotypes biofilm et *swarming* opposés entre un simple mutant $\Delta gacA$ et $\Delta gacS$ (Brencic *et al.*, 2009b, Brinkman *et al.*, 2001, Yeung *et al.*, 2009), nous avons exploré la possibilité que ces différences soient une conséquence liée à la croissance en surface sur RsmY et RsmZ. Comme vu dans la littérature, l'expression de ces pARN est similiaire en surface et en bouillon chez les mutants $\Delta gacA$ et $\Delta gacS$ (Figure 7.1). Toutefois, les différences phénotypiques entre $\Delta gacA$ et $\Delta gacS$ indiquent que le schéma de régulation par ce système reste encore incomplet et à être mieux défini et que GacS peut vraisemblablement activer d'autres cibles que GacA, présumement par phosphotransfert vers un autre élément régulateur partenaire qui serait minoritaire comparativement à la phosphorylation majeure de GacA par GacS.

Ultimement, étant donné la spécificité apparente du gène *hptB* sur le contrôle de la motilité de type *swarming*, l'utilisation d'un mutant dans ce gène a été d'un grand intérêt pour obtenir de nouvelles informations sur la fonction de ce déplacement de surface dans la nature. En effet, suite aux expériences menées dans le Chapitre 8, nous avons pu découvrir la possible existence d'un nouveau mécanisme de coopération bactérienne entre différentes souches. Lors de co-cultures entre différents mutants, nous avons observé que des mutants incapables de se déplacer par eux-même en mono-culture, peuvent exploiter des souches qui possèdent les éléments nécessaires à ce mode de déplacement. Ceci représente un type de commensalisme des bactéries déficientes en motilité de type *swarming* sur des souches pouvant effectuer ce déplacement de surface. Toutefois, cette relation impliquerait la présence de pili de type IV afin de pouvoir profiter de cet avantage.

Somme toutes, cette thèse nous a permis dans un premier temps de mettre en évidence les nombreux mécanismes de régulation complexes encore inconnus impliquant le système global GacS/GacA/Rsm. Aussi, nous avons pu renforcer le concept de l'utilisation de la motilité de type *swarming* comme modèle intéressant afin de mieux caractériser les différences bouillon-surface qui existent chez les bactéries. En effet, la il est remarquable de noter la plasticité de *P. aeruginosa* à intégrer des signaux environnementaux lorsqu'elle est cultivée en bouillon ou en surface, ce qui lui permet d'optimiser ses outils métaboliques afin de mieux survivre (Figure 9.1).







Figure 9.1 Régulation globale du système HptB/Gac/Rsm chez P. aeruginosa cultivée en bouillon ou en surface

В

(A) En condition planctonique (liquide), différents senseurs membranaires peuvent être activés par des signaux environnementaux inconnus afin de déclencher une cascade de régulation intracellulaire qui résulte en la modulation de l'expression des pARN *rsmY* et *rsmZ* agissant ultimement sur RsmA/N. (B) Contrairement à la littérature utilisant des cultures liquides, la protéine HptB peut agir spécifiquement sur *rsmZ* en ne passant pas par le système GacS/A lorsque *P. aeruginosa* est cultivée en surface. Cette régulation fait intervenir une protéine encore inconnue (Y) et n'implique pas le produit des gènes *PA3346/47*. Cette nouvelle voie de régulation impliquant la protéine HptB est fort probablement sous le contrôle d'un senseur membranaire détectant un signal de croissance en surface (X). Aussi, la protéine BswR n'affecte pas la régulation de *rsmZ* en surface. Selon nos recherches, une protéine régulatrice sous le régulon du système GacS/A (Z) serait aussi un facteur-clé dans le contrôle de la motilité de type *swarming*. Lignes pleines : régulation directe. Lignes hachurées : Régulation indirecte. Fèches : Activation. Barres : Inhibition. Schéma adapté de (Bordi *et al.*, 2010, Brencic *et al.*, 2009a, Brencic *et al.*, 2009b, S. Castang *et al.*, 2010, Goodman *et al.*, 2009, Heurlier *et al.*, 2004, Kong *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013, Marden *et al.*, 2013, Morris *et al.*, 2013, Petrova *et al.*, 2010, Petrova *et al.*, 2011, Sonnleitner *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2014).

Pris ensemble, les résultats présentés dans cette thèse indiquent aussi que de nombreux efforts restent encore à être fournis pour (i) redéfinir le régulon de la protéine RsmA étant donné que les données présentées dans l'article #1 suggèrent que la séquence codante d'un ARNm peut être utilisé comme site de régulation par RsmA (ii) l'importance de considérer le mode de vie bactérien étudié afin de comprendre le portrait de régulation génique d'une bactérie (iii) des systèmes de régulation globaux tel que le système GacS/A ne sont pas totalement bien définis et (iv) que la motilité de type *swarming* peut être utilisé comme un modèle d'étude pour la compréhension de la coopération entre bactéries.

9.2 Difficultés inhérentes à cette étude et perspectives

Malgré le dévoilement dans notre étude de nouveaux mécanismes de régulation existant chez *P. aeruginosa*, il est à noter que de ces derniers méritent d'être étudiés plus en profondeur.

La capacité de RsmA à s'auto-réguler par un mécanisme non-orthodoxe est en soi intéressante. Toutefois, les découvertes récentes de RsmN et encore plus récemment de PA4570, tous deux orthologues de RsmA (Marden *et al.*, 2013, C. L. Miller *et al.*, 2016, Morris *et al.*, 2013), renforcent l'idée générale que la régulation post-transcriptionnelle est un mécanisme important chez *P. aeruginosa* qu'il ne faut pas aborder de manière simpliste. Jusqu'à preuve du contraire, RsmA semble être l'élément-clé par lequel une panoplie de gènes sont affectés, en incluant l'expression négative directe au niveau traductionnel de RsmN (Marden *et al.*, 2013). Toutefois, il serait intéressant de répéter les expériences *in vivo* effectuées dans la publication #1 chez des mutants pour ces orthologues (ou des mutations combinées avec *rsmA*) afin d'éclaircir notre compréhension sur l'auto-régulation de *rsmA*. Le mécanisme de régulation que nous avons dévoilé pourrait servir à des études subséquentes dans lesquelles des expériences de *pull-down* pourraient être mises en place afin d'élargir le régulon de RsmA.

L'étude de la motilité de type *swarming* chez *P. aeruginosa* consiste en un défi de taille. En effet, plusieurs études ont tenté de caractériser ce phénomène de surface par des méthodes de criblage et par analyses transcriptomiques (Overhage *et al.*, 2008, Tremblay *et al.*, 2010, Yeung *et al.*, 2009). Ce qu'il est ressorti de ces études est principalement que la régulation de la motilité de type *swarming* est multifactorielle et implique de nombreux éléments. Étant donné l'importance des pARN RsmY et RsmZ dans ce type de motilité, nous avons essayé de sur-exprimer ces derniers, mais en vain. Toutefois, il serait intéressant de poursuivre sur cette voie soit en utilisant des plasmides de différentes catégories (faible/moyenne copie) ou tout simplement en fabriquant une construction intégrative qui contient ces pARN sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ces expériences nous permettraient de confirmer d'une nouvelle manière les résultats que nous avons rapportés dans la publication #2.

L'approche transcriptomique RNAseq est puissante et peut générer une panoplie de résultats. Afin d'identifier de nouveaux régulateurs actifs en surface, cette méthode s'est avérée intéressante. Toutefois, l'interprétation des résultats peut facilement devenir complexe puisqu'il est difficile de séparer les évènements de régulation à ceux liés au métabolisme cellulaire et autres. Afin de remédier à cela, il serait envisageable de développer une méthode de criblage en surface en créant un rapporteur du type rsmZ-GFP. L'utilisation d'une telle technique représenterait en soi un défi de taille. En effet, afin d'identifier ces régulateurs, il faudrait que le criblage soit effectué strictement en condition de surface. Cependant, il serait primordial de vérifier si la sur-expression du pARN rsmZ chez un mutant ΔhptBgacA s'effectue strictement en condition swarming ou si des cellules de ce génotype simplement cultivées en surface (par exemple sur une gélose LB) affichent aussi cette augmentation dans l'abondance de RsmZ. De ce fait, la méthodologie serait grandement simplifiée et permettrait de cribler des colonies de manière plus simple. Aussi, une approche protéomique sur la motilité de type swarming est à envisager. En effet, la régulation de la motilité de type swarming peut être aussi contrôlée au niveau post-traductionnel comme il a été décrit chez Bacillus subtilis par la protéine LonA (Mukherjee et al., 2015).

L'implication de RsmA dans le contrôle de la motilité de type *swarming* reste encore à être mieux étudiée. Dans la publication #2, nous avons démontré que le phénotype d'un mutant $\Delta hptB$ ne correspond pas à celui d'un mutant $\Delta rsmA$ ce qui suggère que RsmY et RsmZ ne ciblent pas seulement RsmA puisque ces pARN peuvent contrebalancer les effets d'une mutation sur le gène *hptB* lorsque combinés (Figure 5.3 & Figure 11.9). Toutefois, RsmN, une protéine homologue de RsmA semble aussi être impliquée dans le contrôle de la motilité de surface (Morris *et al.*, 2013). Étant donné les différences de phénotype *swarming* existant entre les différentes souches de *P. aeruginosa* (Section 5.1.6), il est impératif de créer les mutants $\Delta rsmN$ et $\Delta rsmArsmN$ ainsi que $\Delta PA4570$ et de vérifier leur capacité à se déplacer sur une surface semi-solide.

Des analyses supplémentaires sur l'incapacité des mutants $\Delta hptB$ et $\Delta hptBgacA$ à effectuer une motilité de type *swarming* tandis que le triple mutant $\Delta hptBrsmYZ$ affiche un phénotype identique à celui du double mutant $\Delta rsmYZ$ (*hyperswarmer*) méritent d'être

effectuées de manière plus intensive. Nos résultats indiquent fortement que l'incapacité du double mutant $\Delta hptBgacA$ à effectuer une motilité de type *swarming* ne dépend pas de son activité flagellaire (Figure 11.15C) ni de la capacité à produire des rhamnolipides puisque l'opéron *rhIAB* ainsi que *rhIC* sont tous sur-exprimés comparativement à la souche sauvage exclusivement en condition de surface (Table 11.4). Pris ensemble, ces indices suggèrent que les pARN RsmY et RsmZ restent exprimés dans un mutant $\Delta gacA$ dans des conditions de culture en surface. Aussi, les divergences observées entre notre étude et celle de Bordi et collègues concernant le caractère hyperbiofilm d'un mutant $\Delta hptB$ chez la souche PAK, tandis que ce phénotype n'est pas affecté dans la souche PA14 mérite d'être étudiée plus en détails. En effet, malgré que nous ayons utilisé une approche impliquant des tests sur gélose rouge congo et par fixation de crystal violet, il serait intéressant d'adopter une approche complémentaire par l'utilisation de rapporteurs transcriptionnels/traductionnels *pelA-lacZ* ainsi qu'une étude en *flow cell*.

Tout récemment, un groupe a rapporté que GacA ne contrôle pas seulement l'expression de rsmY et rsmZ (C. L. Miller et al., 2016). Le nouvel pARN RsmW a été identifié comme étant sur-exprimé à partir du 3' UTR du gène PA4570 (PA14 60480) en condition biofilm comparativement à une culture planctonique. De plus, ce pARN serait négativement contrôlé par GacA, en condition liquide. Les résultats obtenus de nos analyses transcriptomiques indiquent que PA4570 (PA14 60480), un homologue probable de RsmA, est sur-exprimé chez un double mutant ΔhptBgacA en condition de surface seulement (Table 11.4). Toutefois, des vérifications par qPCR au niveau du 3' UTR de ce gène seraient essentielles afin de conclure si RsmW et aussi sur-exprimé dans ces conditions. Il sera, par la suite, impératif de redéfinir les rôles de chacune des composantes du système HptB/Gac/Rsm sur la régulation de RsmW en condition de culture liquide et en surface ainsi que l'impact de ce pARN sur la motilité de type swarming. De ce fait, des qRT-PCR sur ce pARN dans les mutants $\Delta hptB$ et $\Delta gacA$ devraient être effectuées en bouillon et surface afin de déterminer leur hiérarchie dans le contrôle de RsmW. Étant donné la possible implication de RsmW dans le contrôle négatif dans la motilité de type swarming (C. L. Miller et al., 2016), ceci pourrait expliquer les différences observées dans le phénotype de déplacement de surface opposé des mutants ΔhptBgacA et ΔhptBrsmYZ. Dans cette suite d'idées, il pourrait être intéressant

de cumuler les mutations de *rsmZ* et *rsmW* chez le double mutant Δ*hptBgacA* afin de vérifier si l'abolition de ces pARN entraînerait le déclenchement de la motilité de type *swarming*.

L'utilisation d'un script bio-informatique tel que celui utilisé par Miller et al, (2016) qui permet la détection de nouveaux pARN (script qui devrait faire l'objet d'une publication à venir par ce groupe, tel que stipulé dans l'article caractérisant RsmW) ouvrirait une voie qui nous est encore inconnue sur le rôle de ces derniers dans la motilité de type swarming. En accord avec cela, chez E. coli plusieurs pARN affectent le déplacement de surface de cette bactérie (Bak et al., 2015). Il serait donc intéressant d'étudier les transcriptomes des simples mutants $\Delta hptB$ et $\Delta gacA$ ainsi que celui du double mutant $\Delta hptBgacA$ afin de déterminer des nouvelles cibles (plus spécifiquement les pARN) régulées en condition de surface et/ou en bouillon et qui pourraient affecter la motilité de type swarming. Outre cela, il serait captivant de continuer à explorer les données RNAseq plus en profondeur en utilisant des approches complémentaires. En effet, l'utilisation de la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; (Kanehisa et al., 2017)) serait à envisager. Une telle approche pourrait permettre d'établir un réseau des voies métaboliques et interactions moléculaires qui sont affectées chez un double mutant ΔhptBgacA cultivé en bouillon et en surface comparativement à la souche sauvage. Ceci pourrait nous permettre de tirer de nouvelles informations sur la génétique du *swarming* et l'incapacité du double mutant $\Delta hptBgacA$ à se déplacer sur une surface.

Étant donné le rôle de GacS dans le contrôle de la variation phénotypique et de l'importance du di-GMP cyclique dans la modulation de l'apparition de SCV (Malone, 2015, Malone *et al.*, 2010), il est fortement recommandé de ne pas négliger la création de doubles mutants tels que $\Delta hptBgacS$ afin de vérifier si celui-ci se comporte comme un double mutant $\Delta hptBgacA$. Ces expériences nous permettraient de s'assurer que le régulon bouillon-surface soit bien caractérisé.

La création de souches fluorescentes en utilisant des plasmides du type mini-Tn7t s'est avérée laborieuse et très difficile. Plusieurs mois ont été nécessaires afin de réussir à créer les souches PA14:GFP ainsi que $\Delta hptB$::mKO1 utilisées dans le Chapitre 8 de cette thèse. Étant donné les résultats intéressants que nous avons obtenus, il est

impératif de poursuivre ce projet. Tout premièrement, une alternative à l'utilisation des plasmides du type Tn7t serait à envisager. En effet, pour nos tests de co-culture en fluorescence, il pourrait être intéressant de travailler avec un plasmide de type mini-CTX-GFP (Hoang *et al.*, 2000) et de construire par nous même des rapporteurs utilisant la structure de base des plasmides mini-CTX étant donné la facilité d'intégration de ces derniers dans le chromosome de *P. aeruginosa*. Aussi, des études plus poussées en utilisant la microscopie confocale sont suggérées, étant donné que la résolution maximale permise par le Typhoon est de 10 μ m; résolution qui n'a jamais pu être atteinte étant donné le manque de puissance de l'ordinateur qui ne pouvait pas supporter la création de fichiers volumineux en utilisant une telle précision.

Ultimement, le projet exposé dans le Chapitre 8 de notre étude nous permettra d'approfondir nos connaissances sur le rôle biologique de la motilité de type *swarming*. L'utilisation d'un double mutant $\Delta hptBrhlA$ lors de co-cultures avec la souche sauvage ainsi qu'avec des mutants dans la synthèse flagellaire et des pili en fluorescence est à envisager pour confirmer cela. En effet des tests avec ces mutants permettront de mieux comprendre le phénomène de mutualisme existant entre bactéries. Puisque nous avons identifié que ce déplacement de surface pourrait être bénéfique à des souches ne pouvant pas adopter ce mode de vie bactérien, il serait aussi intéressant d'observer comment se comporterait des co-cultures de *P. aeruginosa* avec des espèces bactériennes dont ce type de motilité n'a jamais été identifié. Rapporté récemment, le groupe de recherche du Laboratoire Burrows a observé que la bactérie non-motile *Staphylococcus aureus* peut se faire transporter par *P. aeruginosa*, probablement par l'intermédiaire des pili de type IV (<u>https://npibiofilmscommunity.nature.com/users/7121-lori-l-burrows/posts/14864-irresistible-force-meets-moveable-object</u>). Ceci renforce qu'il existe bel et bien un mécanisme de coopération interespèces chez les bactéries.

Un des points faible des études présentées dans cette thèse est l'utilisation de mutants transpositionnels provenant de la banque de mutants non-redondants pour la souche PA14 de *P. aeruginosa* (Liberati *et al.*, 2006). En effet, l'utilisation de tels mutants peut être risquée, car le transposon pourrait provoquer un effet polaire sur des gènes situés en aval/amont ou sur des séquences du brin chromosomique complémentaire à

son site d'insertion. Toutefois, avant de poursuivre des études plus poussées en utilisant de tels mutants (gacA⁻, rsmA⁻, pilA⁻, rhlA⁻, gacS⁻, fliC⁻) nous nous sommes efforcés à vérifier que les phénotypes des mutants transpositionnels utilisés correspondaient aux phénotypes observés dans la littérature. Cela étant dit, l'utilisation d'un mutant transpositionnel dans le gène PA14_16280 pourrait aussi expliquer pourquoi nous avons observé une augmentation dans sa motilité de type swarming ainsi que dans sa capacité à former un biofilm. À cet effet, il aurait été intéressant d'inclure des tests de complémentation lors de nos études utilisant de tels mutants afin de confirmer hors de tout doute que le phénotype observé était bel et bien dû à l'abolition de l'expression du gène codant. Afin de mieux caractériser le rôle du gène hptB dans la motilité de type swarming, nous avons essayé, en vain, de complémenter une mutation dans ce gène (données non-montrées). L'approche initiale que nous avons adoptée consistait à utiliser un plasmide multicopies dans lequel la séquence codante du gène *hptB* a été clonée. Toutefois, lors de tests menés en condition swarming, nous avons été incapables de complémenter le défaut de déplacement de surface d'un tel mutant. De manière surprenante, d'autres études ont déjà réussi cela (Bhuwan et al., 2012, Hsu et al., 2008). Il serait donc essentiel d'essayer de complémenter ce mutant en utilisant un plasmide de type intégratif (mini-CTX, mini-Tn7t).

À plus long terme, il serait vital d'identifier quel est le signal environnemental détecté par des cellules bactériennes et qui déclenche la motilité de type *swarming* (le *surface sensing*). Tel qu'exposé dans cette thèse, les systèmes à deux composantes sont des outils performants que les bactéries utilisent afin de pouvoir mieux s'adapter. Ceci est encore plus probant étant donné que ces systèmes sont impliqués dans plusieurs comportements bactériens tel que la virulence et le contrôle temporal de la formation de biofilms chez *P. aeruginosa*, par exemple (Broder *et al.*, 2016, Goodman *et al.*, 2004, Petrova *et al.*, 2009, Petrova *et al.*, 2010, Petrova *et al.*, 2011, Ventre *et al.*, 2006). Un candidat intéressant serait la protéine PilY1. O'Toole et collègues ont démontré que lorsque des cellules de *P. aeruginosa* sont cultivées spécifiquement en surface, cette protéine est exprimée et déclenche une multitude de cascades intracellulaires affectant les concentrations d'AMP cyclique ainsi que de c-di-GMP (Luo *et al.*, 2015). Dans cette étude, la modulation des niveaux de concentration de c-di-GMP en passant par SadC

(une diguanylate cyclase) affecte la motilité de type *swarming* par l'entremise de la protéine PilY1 et que le tout est dépendant des pili de type IV.

Malgré le rôle encore contradictoire de cet appendice dans la motilité de type *swarming*, une intégration de notre étude en utilisant le mutant $\Delta hptB$ incapable de se déplacer normalement et du mécanisme impliquant la protéine PilY1 serait à envisager. En effet, malgré que nos travaux indiquent que les pARN soient important pour la régulation du *swarming*, les messagers chimiques secondaires semblent aussi d'importance dans le contrôle de ce comportement de surface. De plus, plusieurs indices suggèrent que la régulation du c-di-GMP est en partie contrôlé par le système Gac/Rsm, malgré que le rôle de cette molécule sur la motilité de type *swarming* reste largement à être caractérisé (A. E. Baker *et al.*, 2016, Moscoso *et al.*, 2014). Une telle étude permettrait de réconcilier un grand nombre de systèmes ayant été individuellement déterminés comme ayant un effet sur la motilité de type *swarming* et obtenir un portrait global du contrôle de ce phénomène de surface.

10 BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Mawgoud AM, Lepine F & Deziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology* 86(5):1323-1336.
- Abdel-Mawgoud AM, Lepine F & Deziel E (2014) Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Identification and Quantification of Rhamnolipids. *Pseudomonas Methods and Protocols,* (Methods in Molecular Biology, Filloux A & Ramos J-L (Édit.) Springer New York, Vol 1149. p 359-373.
- Ang S, Horng YT, Shu JC, Soo PC, Liu JH, Yi WC, Lai HC, Luh KT, Ho SW & Swift S (2001) The role of RsmA in the regulation of swarming motility in *Serratia marcescens. Journal of biomedical science* 8(2):160-169.
- Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM & Finlay BB (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156(Pt 8):2271-2282.
- Antunes LC, Schaefer AL, Ferreira RB, Qin N, Stevens AM, Ruby EG & Greenberg EP (2007) Transcriptome analysis of the Vibrio fischeri LuxR-LuxI regulon. Journal of bacteriology 189(22):8387-8391.
- Anyan ME, Amiri A, Harvey CW, Tierra G, Morales-Soto N, Driscoll CM, Alber MS & Shrout JD (2014) Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(50):18013-18018.
- Armbruster CE, Hodges SA & Mobley HL (2013) Initiation of swarming motility by *Proteus mirabilis* occurs in response to specific cues present in urine and requires excess L-glutamine. *Journal of bacteriology* 195(6):1305-1319.
- Armbruster CE & Mobley HL (2012) Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature reviews*. *Microbiology* 10(11):743-754.
- Atkinson S & Williams P (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 6(40):959-978.
- Bak G, Lee J, Suk S, Kim D, Young Lee J, Kim KS, Choi BS & Lee Y (2015) Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli*. *Scientific reports* 5:15287.
- Baker AE, Diepold A, Kuchma SL, Scott JE, Ha DG, Orazi G, Armitage JP & O'Toole GA (2016) PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 198(13):1837-1846.
- Baker CS, Eory LA, Yakhnin H, Mercante J, Romeo T & Babitzke P (2007) CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *Journal of bacteriology* 189(15):5472-5481.

- Baker CS, Morozov I, Suzuki K, Romeo T & Babitzke P (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of glgC in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 44(6):1599-1610.
- Barbieri CM & Stock AM (2008) Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Analytical biochemistry* 376(1):73-82.
- Barria C, Malecki M & Arraiano CM (2013) Bacterial adaptation to cold. *Microbiology* 159(Pt 12):2437-2443.
- Beier D & Gross R (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current opinion in microbiology* 9(2):143-152.
- Belas R & Suvanasuthi R (2005) The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *Journal of bacteriology* 187(19):6789-6803.
- Bhuwan M, Lee HJ, Peng HL & Chang HY (2012) Histidine-containing phosphotransfer protein-B (HptB) regulates swarming motility through partner-switching system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. *The Journal of biological chemistry* 287(3):1903-1914.
- Bobrovskyy M & Vanderpool CK (2013) Regulation of bacterial metabolism by small RNAs using diverse mechanisms. *Annual review of genetics* 47:209-232.
- Boor KJ (2006) Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. *PLoS Biol* 4(1):e23.
- Bordi C, Lamy MC, Ventre I, Termine E, Hachani A, Fillet S, Roche B, Bleves S, Mejean V, Lazdunski A & Filloux A (2010) Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Molecular microbiology* 76(6):1427-1443.
- Borukhov S & Nudler E (2003) RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Current opinion in microbiology* 6(2):93-100.
- Brencic A & Lory S (2009a) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular microbiology* 72(3):612-632.
- Brencic A, McFarland KA, McManus HR, Castang S, Mogno I, Dove SL & Lory S (2009b) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular microbiology* 73(3):434-445.
- Brinkman FS, Macfarlane EL, Warrener P & Hancock RE (2001) Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. *Infection and immunity* 69(8):5207-5211.
- Broder UN, Jaeger T & Jenal U (2016) LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Microbiology* 2:16184.

- Burrowes E, Baysse C, Adams C & O'Gara F (2006) Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152(Pt 2):405-418.
- Burrows LL (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual review of microbiology* 66:493-520.
- Bush M & Dixon R (2012) The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of $\sigma(54)$ -Dependent Transcription. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 76(3):497-529.
- Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM & O'Toole GA (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* 189(9):3603-3612.
- Caiazza NC, Shanks RM & O'Toole GA (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 187(21):7351-7361.
- Calvio C, Osera C, Amati G & Galizzi A (2008) Autoregulation of swrAA and motility in *Bacillus subtilis. Journal of bacteriology* 190(16):5720-5728.
- Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R & Rahme LG (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(25):14613-14618.
- Cao L, Srikumar R & Poole K (2004) MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of *PA3720-PA3719*. *Molecular microbiology* 53(5):1423-1436.
- Capra EJ & Laub MT (2012) Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual review of microbiology* 66:325-347.
- Castang S & Dove SL (2010) High-order oligomerization is required for the function of the H-NS family member MvaT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 78(4):916-931.
- Castang S, McManus HR, Turner KH & Dove SL (2008) H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(48):18947-18952.
- Chambers JR & Sauer K (2013) Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends in microbiology* 21(1):39-49.
- Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, Fadel F, Filloux A, Sivaneson M, de Bentzmann S & Bordi C (2016) The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS genetics* 12(5):e1006032.
- Chen R, Weng Y, Zhu F, Jin Y, Liu C, Pan X, Xia B, Cheng Z, Jin S & Wu W (2016) Polynucleotide Phosphorylase Regulates Multiple Virulence Factors and the

Stabilities of Small RNAs RsmY/Z in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology* 7:247.

- Choi KH & Schweizer HP (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature protocols* 1(1):153-161.
- Cock PJ & Whitworth DE (2007) Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Molecular biology and evolution* 24(11):2355-2357.
- Collins VG (1957) Planktonic bacteria. Journal of general microbiology 16(1):268-272.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Cuthbertson L & Nodwell JR (2013) The TetR family of regulators. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 77(3):440-475.
- Davies JA, Harrison JJ, Marques LL, Foglia GR, Stremick CA, Storey DG, Turner RJ, Olson ME & Ceri H (2007) The GacS sensor kinase controls phenotypic reversion of small colony variants isolated from biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *FEMS microbiology ecology* 59(1):32-46.
- De Lay N, Schu DJ & Gottesman S (2013) Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *The Journal of biological chemistry* 288(12):7996-8003.
- Deziel E, Comeau Y & Villemur R (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of bacteriology* 183(4):1195-1204.
- Déziel E, Lepine F, Milot S & Villemur R (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149(Pt 8):2005-2013.
- Donlan RM & Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 15(2):167-193.
- Dötsch A, Eckweiler D, Schniederjans M, Zimmermann A, Jensen V, Scharfe M, Geffers R & Haussler S (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *PloS one* 7(2):e31092.
- Drenkard E & Ausubel FM (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416(6882):740-743.
- Dubey AK, Baker CS, Romeo T & Babitzke P (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* 11(10):1579-1587.
- Dufour A, Furness RB & Hughes C (1998) Novel genes that upregulate the *Proteus mirabilis flhDC* master operon controlling flagellar biogenesis and swarming. *Molecular microbiology* 29(3):741-751.

- Dunny GM & Leonard BA (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. Annual review of microbiology 51:527-564.
- Eberl L, Christiansen G, Molin S & Givskov M (1996) Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *Journal of bacteriology* 178(2):554-559.
- Eberl L, Molin S & Givskov M (1999) Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal* of bacteriology 181(6):1703-1712.
- Feklistov A, Sharon BD, Darst SA & Gross CA (2014) Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annual review of microbiology* 68:357-376.
- Ferrara S, Brugnoli M, De Bonis A, Righetti F, Delvillani F, Deho G, Horner D, Briani F & Bertoni G (2012) Comparative profiling of *Pseudomonas aeruginosa* strains reveals differential expression of novel unique and conserved small RNAs. *PloS* one 7(5):e36553.
- Finkelshtein A, Roth D, Ben Jacob E & Ingham CJ (2015) Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *mBio* 6(3):e00074-00015.
- Flemming HC & Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology* 8(9):623-633.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176(2):269-275.
- Furukawa S, Kuchma SL & O'Toole GA (2006) Keeping their options open: acute versus persistent infections. *Journal of bacteriology* 188(4):1211-1217.
- Galperin MY (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC microbiology* 5:35.
- Gao R & Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. Annual review of microbiology 63:133-154.
- Garrett TR, Bhakoo M & Zhang Z (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18(9):1049-1056.
- Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Ceragioli M, Beecher DJ, Senesi S & Wong AC (2007) Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* 73(12):4089-4093.
- Gode-Potratz CJ, Kustusch RJ, Breheny PJ, Weiss DS & McCarter LL (2011) Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Molecular microbiology* 79(1):240-263.
- Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS & Lory S (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental cell* 7(5):745-754.
- Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A & Lory S (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes & development* 23(2):249-259.

- Gottesman S (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends in genetics : TIG* 21(7):399-404.
- Gottesman S & Storz G (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(12).
- Ha DG, Richman ME & O'Toole GA (2014) Deletion mutant library for investigation of functional outputs of cyclic diguanylate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Applied and environmental microbiology* 80(11):3384-3393.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* 2(2):95-108.
- Hamze K, Autret S, Hinc K, Laalami S, Julkowska D, Briandet R, Renault M, Absalon C, Holland IB, Putzer H & Seror SJ (2011) Single-cell analysis in situ in a *Bacillus subtilis* swarming community identifies distinct spatially separated subpopulations differentially expressing hag (flagellin), including specialized swarmers. *Microbiology* 157(Pt 9):2456-2469.
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual review of microbiology* 57:249-273.
- Harshey RM & Matsuyama T (1994) Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(18):8631-8635.
- Harshey RM & Partridge JD (2015) Shelter in a Swarm. *Journal of molecular biology* 427(23):3683-3694.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews* 36(4):478-503.
- Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Camara M, Williams P & Haas D (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 186(10):2936-2945.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ & Schweizer HP (1998) A broad-hostrange FIp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomallylocated DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212(1):77-86.
- Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A & Schweizer HP (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43(1):59-72.
- Hoch JA & Varughese KI (2001) Keeping Signals Straight in Phosphorelay Signal Transduction. *Journal of bacteriology* 183(17):4941-4949.
- Hrabak EM & Willis DK (1992) The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *Journal of bacteriology* 174(9):3011-3020.

- Hsu JL, Chen HC, Peng HL & Chang HY (2008) Characterization of the histidinecontaining phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The Journal of biological chemistry* 283(15):9933-9944.
- Huttenhofer A & Vogel J (2006) Experimental approaches to identify non-coding RNAs. *Nucleic acids research* 34(2):635-646.
- Irie Y, Starkey M, Edwards AN, Wozniak DJ, Romeo T & Parsek MR (2010) Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. Molecular microbiology 78(1):158-172.
- Jenal U & Malone J (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual review of genetics* 40:385-407.
- Jones HE & Park RW (1967) The influence of medium composition on the growth and swarming of *Proteus*. *Journal of general microbiology* 47(3):369-378.
- Julkowska D, Obuchowski M, Holland IB & Seror SJ (2005) Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *Journal of bacteriology* 187(1):65-76.
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y & Morishima K (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research* 45(D1):D353-D361.
- Kay E, Humair B, Denervaud V, Riedel K, Spahr S, Eberl L, Valverde C & Haas D (2006) Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa. Journal of bacteriology* 188(16):6026-6033.
- Kazmierczak MJ, Wiedmann M & Boor KJ (2005) Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(4):527-543.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews*. *Microbiology* 8(9):634-644.
- Kearns DB, Chu F, Rudner R & Losick R (2004) Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Molecular microbiology* 52(2):357-369.
- Kearns DB & Losick R (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 49(3):581-590.
- Kearns DB & Losick R (2005) Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes & development* 19(24):3083-3094.
- Kim W & Surette MG (2005) Prevalence of surface swarming behavior in Salmonella. *Journal of bacteriology* 187(18):6580-6583.

- Kinoshita E & Kinoshita-Kikuta E (2011) Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* 11(2):319-323.
- Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C & Pechere JC (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of bacteriology* 182(21):5990-5996.
- Kong W, Chen L, Zhao J, Shen T, Surette MG, Shen L & Duan K (2013) Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Molecular microbiology* 88(4):784-797.
- Kuchma SL, Brothers KM, Merritt JH, Liberati NT, Ausubel FM & O'Toole GA (2007) BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* 189(22):8165-8178.
- Kuchma SL, Delalez NJ, Filkins LM, Snavely EA, Armitage JP & O'Toole GA (2015) Cyclic di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the MotAB stator. *Journal of bacteriology* 197(3):420-430.
- Lai S, Tremblay J & Déziel E (2009) Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental microbiology* 11(1):126-136.
- Lambertsen L, Sternberg C & Molin S (2004) Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environmental microbiology* 6(7):726-732.
- Lapouge K, Schubert M, Allain FH & Haas D (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular microbiology* 67(2):241-253.
- Laub MT & Goulian M (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual review of genetics* 41:121-145.
- Laville J, Voisard C, Keel C, Maurhofer M, Defago G & Haas D (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(5):1562-1566.
- Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG & Ausubel FM (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome biology* 7(10):1-14.
- Lee YY & Belas R (2015) Loss of FliL alters *Proteus mirabilis* surface sensing and temperature-dependent swarming. *Journal of bacteriology* 197(1):159-173.
- Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS & Bassler BL (2004) The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118(1):69-82.

- Lesic B & Rahme LG (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC molecular biology* 9:20.
- Li K, Xu C, Jin Y, Sun Z, Liu C, Shi J, Chen G, Chen R, Jin S & Wu W (2013) SuhB is a regulator of multiple virulence genes and essential for pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 4(6):e00419-00413.
- Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T & Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8):2833-2838.
- Lin CT, Huang YJ, Chu PH, Hsu JL, Huang CH & Peng HL (2006) Identification of an HptB-mediated multi-step phosphorelay in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Research in microbiology* 157(2):169-175.
- Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, Eberl L, Molin S & Givskov M (1998) *N*-Acyl-I-Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide Biosurfactant Required for Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology* 180(23):6384-6388.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Livny J, Brencic A, Lory S & Waldor MK (2006) Identification of 17 *Pseudomonas aeruginosa* sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2. *Nucleic acids research* 34(12):3484-3493.
- Luo Y, Zhao K, Baker AE, Kuchma SL, Coggan KA, Wolfgang MC, Wong GC & O'Toole GA (2015) A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *mBio* 6(1).
- Majdalani N, Vanderpool CK & Gottesman S (2005) Bacterial small RNA regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 40(2):93-113.
- Malone JG (2015) Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infection and drug resistance* 8:237-247.
- Malone JG, Jaeger T, Spangler C, Ritz D, Spang A, Arrieumerlou C, Kaever V, Landmann R & Jenal U (2010) YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* 6(3):e1000804.
- Marden JN, Diaz MR, Walton WG, Gode CJ, Betts L, Urbanowski ML, Redinbo MR, Yahr TL & Wolfgang MC (2013) An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(37):15055-15060.

- Marshall KC (2006) Planktonic Versus Sessile Life of Prokaryotes. The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E (Édit.) Springer New York, New York, NY10.1007/0-387-30742-7_1. p 3-15.
- Mattick JS (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annual review of microbiology* 56:289-314.
- Mauffrey F, Martineau C & Villemur R (2015) Importance of the Two Dissimilatory (Nar) Nitrate Reductases in the Growth and Nitrate Reduction of the Methylotrophic Marine Bacterium Methylophaga nitratireducenticrescens JAM1. Frontiers in microbiology 6:1475.
- McGuffie BA, Vallet-Gely I & Dove SL (2016) sigma Factor and Anti-sigma Factor That Control Swarming Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 198(5):755-765.
- Merritt JH, Brothers KM, Kuchma SL & O'Toole GA (2007) SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of bacteriology* 189(22):8154-8164.
- Merritt JH, Ha DG, Cowles KN, Lu W, Morales DK, Rabinowitz J, Gitai Z & O'Toole GA (2010) Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *mBio* 1(4).
- Mikkelsen H, McMullan R & Filloux A (2011a) The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in *IadS*. *PloS one* 6(12):e29113.
- Mikkelsen H, Sivaneson M & Filloux A (2011b) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology* 13(7):1666-1681.
- Miller CL, Romero M, Karna SL, Chen T, Heeb S & Leung KP (2016) RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC microbiology* 16(1):155.
- Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. xvi, 466 p. p
- Mobley HL & Belas R (1995) Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends in microbiology* 3(7):280-284.
- Moll I, Afonyushkin T, Vytvytska O, Kaberdin VR & Blasi U (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* 9(11):1308-1314.
- Morgenstein RM, Szostek B & Rather PN (2010) Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *FEMS microbiology reviews* 34(5):753-763.
- Morris ER, Hall G, Li C, Heeb S, Kulkarni RV, Lovelock L, Silistre H, Messina M, Camara M, Emsley J, Williams P & Searle MS (2013) Structural Rearrangement in an

RsmA/CsrA Ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* Creates a Dimeric RNA-Binding Protein, RsmN. *Structure* 21(9):1659-1671.

- Moscoso JA, Jaeger T, Valentini M, Hui K, Jenal U & Filloux A (2014) The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa. Journal of bacteriology* 196(23):4081-4088.
- Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P & Filloux A (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environmental microbiology* 13(12):3128-3138.
- Mukherjee S, Bree AC, Liu J, Patrick JE, Chien P & Kearns DB (2015) Adaptor-mediated Lon proteolysis restricts *Bacillus subtilis* hyperflagellation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(1):250-255.
- Nakano MM, Corbell N, Besson J & Zuber P (1992) Isolation and characterization of sfp: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular & general genetics : MGG* 232(2):313-321.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of bacteriology* 104(1):313-322.
- Ng WL & Bassler BL (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics* 43:197-222.
- Ogura M & Tsukahara K (2012) SwrA regulates assembly of *Bacillus subtilis* DegU via its interaction with N-terminal domain of DegU. *Journal of biochemistry* 151(6):643-655.
- Oslizlo A, Stefanic P, Dogsa I & Mandic-Mulec I (2014) Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(4):1586-1591.
- 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. *Journal of bacteriology* 190(8):2671-2679.
- Paget MS (2015) Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* 5(3):1245-1265.
- Paget MS & Helmann JD (2003) The sigma70 family of sigma factors. *Genome biology* 4(1):203.
- Parsek MR & Singh PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology* 57:677-701.
- Partridge JD & Harshey RM (2013) Swarming: flexible roaming plans. Journal of bacteriology 195(5):909-918.
- Patrick JE & Kearns DB (2009) Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *Journal of bacteriology* 191(22):7129-7133.
- Patrick JE & Kearns DB (2012) Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Molecular microbiology* 83(1):14-23.

- Pesavento C & Hengge R (2009) Bacterial nucleotide-based second messengers. *Current opinion in microbiology* 12(2):170-176.
- Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Haas D & Williams P (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas* aeruginosa. Journal of bacteriology 183(22):6676-6683.
- Petrova OE & Sauer K (2009) A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS pathogens* 5(11):e1000668.
- Petrova OE & Sauer K (2010) The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA *rsmZ* through CafA. *Journal of bacteriology* 192(20):5275-5288.
- Petrova OE & Sauer K (2011) SagS contributes to the motile-sessile switch and acts in concert with BfiSR to enable *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Journal of bacteriology* 193(23):6614-6628.
- Pirt SJ (1975) *Principles of microbe and cell cultivation.* John Wiley & Sons, Inc., New York
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG & Ausubel FM (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219):1899-1902.
- Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, Calderwood SB & Ausubel FM (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94.
- Rashid MH & Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(9):4885-4890.
- Rather PN (2005) Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental microbiology* 7(8):1065-1073.
- Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW & Kjelleberg S (2005) Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *Journal of bacteriology* 187(10):3477-3485.
- Rich JJ, Kinscherf TG, Kitten T & Willis DK (1994) Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology* 176(24):7468-7475.
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Mejean V & Foglino M (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in microbiology* 8(11):498-504.
- Romeo T, Vakulskas CA & Babitzke P (2013) Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environmental microbiology* 15(2):313-324.

- Ruby EG (1996) Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the Vibrio fischeri-Euprymna scolopes light organ symbiosis. *Annual review of microbiology* 50:591-624.
- Rutherford ST & Bassler BL (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(11).
- Santangelo TJ & Artsimovitch I (2011) Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nature reviews. Microbiology* 9(5):319-329.
- Schirmer T & Jenal U (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature reviews. Microbiology* 7(10):724-735.
- Schneider R, Lockatell CV, Johnson D & Belas R (2002) Detection and mutation of a *luxS*-encoded autoinducer in *Proteus mirabilis*. *Microbiology* 148(Pt 3):773-782.
- Schulmeyer KH, Diaz MR, Bair TB, Sanders W, Gode CJ, Laederach A, Wolfgang MC & Yahr TL (2016) Primary and Secondary Sequence Structure Requirements for Recognition and Discrimination of Target RNAs by *Pseudomonas aeruginosa* RsmA and RsmF. *Journal of bacteriology* 198(18):2458-2469.
- Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS & Greenberg EP (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular microbiology* 51(4):973-985.
- Séguin M (2012) *La régulation de rsmA chez Pseudomonas aeruginosa*. M.Sc. (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval). 177 p
- Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M & Parsek MR (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular microbiology* 62(5):1264-1277.
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M & Romling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology* 53(4):1123-1134.
- Simon R, Priefer U & Puhler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech* 1(9):784-791.
- Sonnleitner E, Gonzalez N, Sorger-Domenigg T, Heeb S, Richter AS, Backofen R, Williams P, Huttenhofer A, Haas D & Blasi U (2011a) The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Molecular microbiology* 80(4):868-885.
- Sonnleitner E & Haas D (2011b) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Applied microbiology and biotechnology* 91(1):63-79.
- Sonnleitner E, Schuster M, Sorger-Domenigg T, Greenberg EP & Blasi U (2006) Hfqdependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 59(5):1542-1558.

- Soo P-C, Horng Y-T, Wei J-R, Shu J-C, Lu C-C & Lai H-C (2008) Regulation of Swarming Motility and *flhDCSm* Expression by RssAB Signaling in *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology* 190(7):2496-2504.
- Stahl SJ, Stewart KR & Williams FD (1983) Extracellular slime associated with *Proteus mirabilis* during swarming. *Journal of bacteriology* 154(2):930-937.
- Stock AM, Robinson VL & Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* 69:183-215.
- Storz G, Vogel J & Wassarman KM (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular cell* 43(6):880-891.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrock-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S & Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-964.
- Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189(1):113-130.
- Sturgill G & Rather PN (2004) Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Molecular microbiology* 51(2):437-446.
- Takahashi C, Nozawa T, Tanikawa T, Nakagawa Y, Wakita J, Matsushita M & Matsuyama T (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. *FEMS microbiology letters* 280(2):169-175.
- Taylor PK (2014) Involvement of Regulatory Non-Coding RNA in Motility, Biofilm
formation and Adaptive Resistance in Pseudomonas aeruginosa. M.Sc.
(University of British Columbia). 65 p.
https://open.library.ubc.ca/clRcle/collections/ubctheses/24/items/1.0167460
(Consulté le May 2014)
- Thormann KM & Paulick A (2010) Tuning the flagellar motor. *Microbiology* 156(Pt 5):1275-1283.
- Toutain CM, Zegans ME & O'Toole GA (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 187(2):771-777.
- Tremblay J (2007) *Caractérisation de la motilité de type swarming chez Pseudomonas aeruginosa*. M.Sc. (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval). 198 p
- Tremblay J (2011) Caractérisation de la motilité de type swarming chez Pseudomonas aeruginosa. Ph.D. (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval). 258 p
- Tremblay J & Déziel E (2008) Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of basic microbiology* 48(6):509-515.

- Tremblay J & Déziel E (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC genomics* 11:587.
- Tremblay J, Richardson AP, Lepine F & Déziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental microbiology* 9(10):2622-2630.
- Tsai YH, Wei JR, Lin CS, Chen PH, Huang S, Lin YC, Wei CF, Lu CC & Lai HC (2011) RssAB signaling coordinates early development of surface multicellularity in *Serratia marcescens*. *PloS one* 6(8):e24154.
- Valverde C & Haas D (2008) Small RNAs controlled by two-component systems. Advances in experimental medicine and biology 631:54-79.
- Valverde C, Heeb S, Keel C & Haas D (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular microbiology* 50(4):1361-1379.
- Van Assche E, Van Puyvelde S, Vanderleyden J & Steenackers HP (2015) RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Frontiers in microbiology* 6:141.
- Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S & Filloux A (2006) Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(1):171-176.
- Venturi V, Bertani I, Kerenyi A, Netotea S & Pongor S (2010) Co-swarming and local collapse: quorum sensing conveys resilience to bacterial communities by localizing cheater mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one* 5(4):e9998.
- Wang C, Ye F, Kumar V, Gao Y-G & Zhang L-H (2014) BswR controls bacterial motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through modulation of the small RNA *rsmZ*. *Nucleic acids research* 42(7):4563-4576.
- Waters LS & Storz G (2009) Regulatory RNAs in bacteria. Cell 136(4):615-628.
- West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK & Runyen-Janecky LJ (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas* aeruginosa. Gene 148(1):81-86.
- Wilke MS, Heller M, Creagh AL, Haynes CA, McIntosh LP, Poole K & Strynadka NC (2008) The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(39):14832-14837.
- Wolschin F, Wienkoop S & Weckwerth W (2005) Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* 5(17):4389-4397.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ & Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli*

host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic acids research* 17(9):3469-3478.

- Workentine ML, Chang L, Ceri H & Turner RJ (2009) The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS microbiology letters* 292(1):50-56.
- Wuichet K, Cantwell BJ & Zhulin IB (2010) Evolution and phyletic distribution of twocomponent signal transduction systems. *Current opinion in microbiology* 13(2):219-225.
- Wurtzel O, Yoder-Himes DR, Han K, Dandekar AA, Edelheit S, Greenberg EP, Sorek R & Lory S (2012) The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS pathogens* 8(9):e1002945.
- Xavier JB, Kim W & Foster KR (2011) A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 79(1):166-179.
- Xu L, Venkataramani P, Ding Y, Liu Y, Deng Y, Yong GL, Xin L, Ye R, Zhang L, Yang L & Liang ZX (2016) A Cyclic di-GMP-binding Adaptor Protein Interacts with Histidine Kinase to Regulate Two-component Signaling. *The Journal of biological chemistry* 291(31):16112-16123.
- Yakhnin H, Baker CS, Berezin I, Evangelista MA, Rassin A, Romeo T & Babitzke P (2011a) CsrA represses translation of *sdiA*, which encodes the N-acylhomoserine-L-lactone receptor of *Escherichia coli*, by binding exclusively within the coding region of *sdiA* mRNA. *Journal of bacteriology* 193(22):6162-6170.
- Yakhnin H, Yakhnin AV, Baker CS, Sineva E, Berezin I, Romeo T & Babitzke P (2011b) Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by Esigma(7)(0) and Esigma(S), and indirect transcriptional activation by CsrA. *Molecular microbiology* 81(3):689-704.
- Yeung AT, Torfs EC, Jamshidi F, Bains M, Wiegand I, Hancock RE & Overhage J (2009) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *Journal of bacteriology* 191(18):5592-5602.
- Young GM, Smith MJ, Minnich SA & Miller VL (1999) The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *Journal of bacteriology* 181(9):2823-2833.
- Yu X, Chen M, Jiang Z, Hu Y & Xie Z (2014) The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding Pseudomonas sp. strain HYS. *Journal of bacteriology* 196(18):3259-3270.
- Zhang N & Buck M (2015) A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. *Biomolecules* 5(2):1012-1019.

- Zhao K, Tseng BS, Beckerman B, Jin F, Gibiansky ML, Harrison JJ, Luijten E, Parsek MR & Wong GC (2013) PsI trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 497(7449):388-391.
- Zhu M, Zhao J, Kang H, Kong W & Liang H (2016) Modulation of Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the PA4857 Gene Product. *Frontiers in microbiology* 7:7.

11 ANNEXE

11.1 ANNEXE A: Matériel supplémentaire de l'article #1 – Complex autoregulation of the post-transcriptional regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*

11.1.1 Supplemental tables

Table 11.1 Primers used in this study

| Ger Shint assays | | |
|---|---|--|
| Name | Primer sequence | |
| 5'-rsmA -92 | 5'- <u>TAATACGACTCACTATA</u> GGGTGAAGGATCGCGCTCTT | |
| 5'-rsmA -85 | 5'- <u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGATCGCGCTCTTGATTTCT | |
| 5'- <i>rsmA</i> -40 | 5'- <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GCAGACTGTTGTCCTGAAAT | |
| 5'- <i>rsmA</i> -20 | 5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATTCGCGTGAGGAGAAAGGA | |
| 5'-rsmA ATG | 5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATGCTGATTCTGACTCGTCG | |
| 3'- <i>rsmA</i> Rev | 5'-TTAATGGTTTGGCTCTTGAT | |
| 3'- <i>rsmA</i> +38 | 5'-ATCAGGGTCTCTCCGACCGACGAGTC | |
| 5'-rsmA Mut UniS | TAATACGACTCACTATAGGGCAGACTGTTGTCCTGAAATATTCGCGTGAGGAGAAAG | |
| 5'-Mut6GAASD | TAATACGACTCACTATAGGGCAGACTGTTGTCCTGAAATATTCGCGTGAGAAGAAAG | |
| 3'-Mut1GGA | 5'- | |
| | ATCAGGGTCTCTCCGACCCGACGAGTCAGAATCAGCATTTCTTCTCCTCACGCGAATATTTC | |
| 3'-Mut2GAA | 5'- | |
| | ATCAGGGTCTCTTCGACCCGACGAGTCAGAATCAGCATTCCTTTCTCCTCACGCGAATATTTC | |
| 3'-Mut3GAAX2 | 5'- | |
| | ATCAGGGTCTCTTCGACCCGACGAGTCAGAATCAGCATTTCTTCTCCTCACGCGAATATTTC | |
| | | |
| 3'-Mut4HPCC | 5'- | |
| | ATCAGGGTCTCTCCGAGGCGACGAGTCAGAATCAGCATTCCTTCTCCTCACGCGAATATTTC | |
| 3'- | 5'- | |
| Mut5HPcompGG | ATCAGCCTCTCTCCGAGGCGACGAGTCAGAATCAGCATTCCTCTCCTCACGCGAATATTTC | |
| - | | |
| 3'-Mut6GAASD | ATCAGGGTCTCTCCGACCCGACGAGTCAGAATCAGCATTCCTTTCTTCTCACGCGAATATTTC | |
| 5'-rsmY | 5'- <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GTCAGGACATTGCGCAGGA | |
| 3'-rsmY | 5'- GCACTCGAACCAGCGGCT | |
| 3'-rsmY nested | 5'- AAAACCCCGCCTTTTGGG | |
| *Underlined is T7-RNA polymerase recognition sequence | | |

| rsmA'-'lacZ in vivo constructs | | |
|--|---|--|
| Name | Primer sequence | |
| 5'- <i>rsmA Pst</i> l | 5'- CTGCAG CGCTGGCAGGCGAAAGGC | |
| 3'- <i>rsmA</i> wild-type | 5'-GACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATCAGGGTCTCTCCGACCCGAC | |
| 3'- <i>rsmA</i> Mut2 | GACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATCAGGGTCTCTTCGACCCGAC | |
| 3'- <i>rsmA</i> Mut4 | 5'-GACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATCAGGGTCTCTCCGAGGCGAC | |
| 3'- <i>rsmA</i> Mut5 | 5'-GACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATCAGCCTCTCTCCGAGGCGAC | |
| 5'- <i>lacZ</i> wild-type | 5'-ATTCTGACTCGTCGGGTCGGAGAGACCCTGATGACCATGATTACGGATTCACT | |
| 5'- <i>lacZ</i> Mut2 | 5'-ATTCTGACTCGTCGGGTCGAAGAGACCCTGATGACCATGATTACGGATTCACT | |
| 5'- <i>lacZ</i> Mut4 | 5'-ATTCTGACTCGTCGCCTCGGAGAGACCCTGATGACCATGATTACGGATTCACT | |
| 5'- <i>lacZ</i> Mut5 | 5'-ATTCTGACTCGTCGCCTCGGAGAGAGGGCTG <u>ATGACCATGATTACGGATTCACT</u> | |
| 3'-lacZ Aatii | 5'-CTGCATAAACCGACTACACAAAT | |
| *In bold, <i>PstI</i> restriction site | | |

11.1.2 Supplemental figures



Figure 11.1 Construction of translation rsmA'-'lacZ reporters with various points mutations in regions implicated in RsmA-rsmA interaction

SD = Shine-Dalgarno. In bold: start codon



Figure 11.2 Determination of RsmA-RNA complex affinity for M4 and M5 rsmA fragments



Figure 11.3 RNA mobility shift assay with purified RsmA rsmA -40 to +38 RNA fragment containing a GGA \rightarrow GAA single nucleotide polymorphism (M6) in the RBS (ribosome binding site).


Figure 11.4 Time-course of rsmA'-'lacZ translation with a GGA \rightarrow GAA mutation in the Shine-Dalgarno in a $\Delta rsmA$ background

Data represent the average of triplicate cultures. Error bars represent the standard deviation of each triplicate.

11.2 ANNEXE B: Matériel supplémentaire de l'article #2 – Broth versus surface-grown cells: Differential regulation of RsmYZ small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB system

11.2.1 Supporting experimental procedures

11.2.1.1 Congo Red assay

Tryptone (1%) agar plates were supplemented with 80 μ g ml⁻¹ Congo Red and 20 μ g ml⁻¹ Coomassie brilliant blue solidified with 0.5% agar (Bacto) were inoculated with 5 μ l of bacterial suspension diluted to OD₆₀₀ = 0.05 and incubated at room temperature for 7 days. Experiment was done using three replicates on two different days. Shown is typical EPS production phenotype.

11.2.1.2 β-galactosidase assays

Activity of *lacZ* fusion reporters was tested for β -galactosidase activity with *o*nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG, Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) as substrate (Jeffrey H. Miller, 1972). Each experiment was performed using three biological replicates. Overnight TSB cultures were diluted at a starting OD₆₀₀ of 0.05 in M9DCAA and incubated at 34 °C. Results were obtained for five sampling points during bacterial growth over 8 hours.

After 12 hours incubation at 34 °C the cells located at the extremity of three separate tendrils of a swarming strain were collected. The tendrils were resuspended in 100 μ l of 1X PBS and vortexed thoroughly. The OD₆₀₀ was measured using a Nanodrop ND-1000 and adjusted to an OD₆₀₀ = 0.1. β -galactosidase activity was determined as described above.

11.2.1.3 Static biofilm formation

A 500 µl bacterial suspension volume at $OD_{600} = 0.05$ was cultivated statically in a 5 mL polystyrene tube at 34 °C during various sampling times in M9DCAA medium. For analysis, the tube was vigorously rinsed by milli-Q water then incubated 10 min with 1 mL of 1% crystal violet at room temperature then rinsed again with milli-Q water. The colorized biofilm ring was then solubilized with 4 mL of 95% ethanol then vortexed with glass beads. OD_{595} was measured using a spectrophotometer. The experiment were performed using three technical replicates at least three times.

11.2.1.4 Creation of a Δ*hptBgacA* mutant by lambda-red recombinase

The mutated *gacA* gene was amplified from the *gacA*::MaR2xT7 ID34781 PA14 non-redundant set with the primers listed in Table 11.2. The Δ *hptB* mutant containing the pUCP18-RedS was grown in TSB supplemented with 300 µg ml⁻¹ carbenicillin to an OD₆₀₀ = 0.5 at 37 °C. Then, the plasmid was induced for 3 hr with 0.2% L-arabinose. After induction, the cells were washed four times with 1 ml of 10% sucrose and concentrated to a final volume of 100 µl. A concentration of 5 µg the gel-purified *gacA*::Mar2xT7 gene amplification was electroporated and incubated in 1 ml TSB for 2 hr at 37 °C. Transformants were selected by plating electroporated cells on TSB agar plates supplemented with 300 µg ml⁻¹ and incubated at 37 °C until colonies were visible. The selected colonies were further verified by PCR for correct insertion using the PA14_gacA_For_FJP + FJP_PA14_gacA_Rev and PA3345_Left_FWD_HindIII + PA3345_Right_REV_Smal primer sets.

11.2.2 Supporting tables

| Table 11.2 Primers used in this study | | | | |
|--|--|--|--|--|
| Mutagenesis primers (5' → 3') | | | | |
| Name | Primer sequence | | | |
| PA3345_Left_FWD_HindIII | cccaagcttgggTGCGGGTCGAGGACAGCGG | | | |
| PA3345_Left_REV | ttctatcgttcgctaGAGATGCGGCGCGGACATTC | | | |
| PA3345_Right_FWD | tagcgaacgatagaaCGCCTGCGCAGCCTGCAT | | | |
| PA3345_Right_REV_Smal | tcc ccggg ggaTACGCCAGGGAGGCTCGA | | | |
| PA14_gacA_For_FJP | TCGGCGATGGTCGCTATG | | | |
| FJP_PA14_gacA_Rev | TAGCGAGGAAGGCGCTCGC | | | |
| | | | | |
| RT-PCR primers | | | | |
| rsmZq_fwd | GAACACGCAACCCCGAAG | | | |
| rsmZq_rev | CCACTCTTCAGTCCCTCGTC | | | |
| rsmYq_fwd | AGGAAGCGCCAAAGACAATA | | | |
| rsmYq_few | GGGTTTTGCAGACCTCTATCC | | | |
| nadBq_fwd ¹ | CTACCTGGACATCAGCCACA | | | |
| nadBq_rev ¹ | GGTAATGTCGATGCCGAAGT | | | |
| *In bold = restriction sites. In italics = overlapping sequences to <i>hptB</i> gene | | | | |

¹*nadB* housekeeping gene qRT-PCR primers from (Tremblay et al., 2010)

| Strains/Plasmids | ED # | Phenotype/Genotype | Reference |
|------------------------|------|--|------------------------------------|
| Strains | | | |
| PA14 | 14 | UCBPP-PA14 wild-type strain | (Rahme <i>et al.</i> , 1995) |
| ∆hptB | 1214 | Markerless <i>hptB</i> deletion | This study |
| mvaT- | 289 | <i>MrT7</i> transposition insertion mutant, Gm ^R , ID34492 | (Liberati et al., 2006) |
| mvaU⁻ | 806 | <i>MrT7</i> transposition insertion mutant, Gm ^R , ID42058 | (Liberati et al., 2006) |
| rsmA⁻ | 282 | <i>MrT7</i> transposition insertion mutant, Gm ^R , ID44507 | (Liberati et al., 2006) |
| PA3346 ⁻ | 1260 | <i>MrT7</i> transposition insertion mutant, Gm ^R , ID31270 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| PA3347- | 1261 | <i>MrT7</i> transposition insertion mutant, Gm ^R , ID39911 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| bswR⁻ | 2681 | <i>MrT7</i> transposition insertion mutant, Gm ^R , ID24728 | (Liberati <i>et al.</i> , 2006) |
| Plasmids | | | |
| pUCP18-RedS | | Arabinose-inducible recombination plasmid, Cb ^R | (Lesic <i>et al.</i> , 2008) |
| pCTX- <i>rsmY-lacZ</i> | | Self-proficient integration vector with <i>lacZ</i> reporter for <i>rsm</i> Y transcriptional expression | (Brencic <i>et al.</i> , 2009a) |
| pCTX- <i>rsmZ-lacZ</i> | | Self-proficient integration vector with <i>lacZ</i> reporter for <i>rsmZ</i> transcriptional expression | (Brencic <i>et al.</i> , 2009b) |

Table 11.3 Strains used in this study

11.2.3 Supporting figures



Figure 11.5 Growth curve of the PA14 and $\Delta hptB$ strain in M9DCAA at 34°C. Data represents the average of triplicate cultures. Error bars represent the standard deviation of triplicates. Experiment was repeated at least twice.



Figure 11.6 Endpoint pictures of the $\Delta rsm Y/Z$ mutants time-lapse analysis at different time points.



PA14 $\Delta hptB$

Figure 11.7 Exopolysaccharide fixation determined by Congo Red assay



Figure 11.8 Biofilm formation assay of the PA14 and $\Delta hptB$ strains. Data represents the average of three replicates. Error bars represent the standard deviation. Experiment was

repeated at least twice.



Figure 11.9 Various swarming phenotypes.

(A) Swarming motility of the PA14, $rsmA^-$ and $\Delta hptB$ strains. (B) Surface coverage of the PA14, $rsmA^-$ and $\Delta hptB$ strains. Data represents the average of three technical replicates. Error bars represent the standard deviation of the three technical replicates. Experiment was repeated at least twice. Statistical Student's *t*-test analysis was based on two independent experiments (**, p < 0.01).











Data represents the average of three biological replicates. Error bars represent the standard deviation.



Figure 11.12 Time-course of *rsmY-lacZ* and *rsmZ-lacZ* in various genetic backgrounds grown as swarming colonies on M9DCAA.

Data represents the average of three biological replicates. Error bars represent the standard deviation. Statistical Student's *t*-test analysis was performed with ns = not significant.



Figure 11.13 qRT-PCR on the $\Delta bswR$ mutant grown in M9DCAA broth and swarming conditions. Data represents the average of three biological replicates. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates. Statistical Student's *t*-test analysis was performed on two independent experiments with *, p < 0.05, ns = not significant.

11.3 ANNEXE C : Données complémentaires à l'article sur la régulation de la motilité de type *swarming* par HptB



Figure 11.14 Test de production de pyocyanine dans le milieu King A.

11.4 ANNEXE D : Matériel supplémentaire du Chapitre 6 - Identification de nouveaux régulateurs du petit ARN RsmZ actifs en condition de surface

11.4.1 Phénotypes swarming de différents mutants du système HptB/GacSA





Annexe D – Matériel Supplémentaire Chapitre6

Figure 11.15 Phénotypes de différents mutants du système HptB/GacSA (A). Phénotypes swarming de différents mutants du système HptB/GacS/GacA (B) Production de rhamnolipides en culture liquide dans le milieu M9DCAA (C) Activité flagellaire du double mutant ΔhptBgacA

Annexe D – Matériel Supplémentaire Chapitre6

11.4.2 Résultats motilité de type *swarming*, activité flagellaire et transcriptionnelle *rsmY/Z-lacZ* des souches testées.



Figure 11.16 Analyses de recouvrement de surface des souches d'intérêt en condition de motilité de type *swarming*.



Figure 11.17 Activité flagellaire des souches d'intérêt.



Figure 11.18 Activité transcriptionnelle relative *rsmY-lacZ* et *rsmZ-lacZ* des mutants d'intérêt en condition de motilité de type *swarming*.



Figure 11.19 Effet de l'abolition du pARN PhrS sur la motilité de type swarming. (A) Phénotype *swarming* d'un mutant *phrS* chez *P. aeruginosa* dans nos conditions expérimentales et (B) tel que publié par (Taylor, 2014).

11.4.3 Analyses transcriptomiques

Table 11.4 Gènes affectés spécifiquement en surface chez le double mutant hptBgacA VS WT

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_39700 | PA14_39700 | 16.77 | hypothetical protein (oxidoreductase) |
| PA14_56570 | PA14_56570 | 14.88 | acyltransferase |
| PA14_35360 | PA14_35360 | 14.53 | hypothetical protein |
| PA14_35340 | PA14_35340 | 11.43 | 2-ketogluconate kinase |
| PhrS | PA14_21260 | 10.02 | pARN |
| PA14_35320 | PA14_35320 | 9.64 | 2-hydroxyacid dehydrogenase |
| PA14_36820 | PA14_36820 | 8.55 | hypothetical protein |
| PA14_41970 | PA14_41970 | 8.44 | hypothetical protein |
| mmsB | PA14_18140 | 8.21 | 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase |
| PA14_56540 | PA14_56540 | 7.24 | hypothetical protein |
| PA14_35330 | PA14_35330 | 6.95 | 2-ketogluconate transporter |
| PA14_56590 | PA14_56590 | 6.74 | hypothetical protein |
| nirE | PA14_06660 | 6.67 | uroporphyrin-III c-methyltransferase |
| SPA0154 | #N/A | 6.55 | pARN |
| adhA | PA14_71630 | 6.24 | alcohol dehydrogenase |
| PA14_36650 | PA14_36650 | 6.03 | hypothetical protein |
| PA14_21220 | PA14_21220 | 5.91 | hypothetical protein |
| PA14_72260 | PA14_72260 | 5.73 | hypothetical protein |
| PA14_19910 | PA14_19910 | 5.48 | pyruvate dehydrogenase E1 component, beta chain |
| nirM | PA14_06740 | 5.35 | cytochrome c-551 |
| PA14_19920 | PA14_19920 | 5.35 | branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2 |
| SPA0126 | #N/A | 5.31 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|----------------|----------------------|--|
| mmsA | PA14_18120 | 5.24 | methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase |
| PA14_60560 | PA14_60560 | 5.24 | hypothetical protein |
| PA14_19900 | PA14_19900 | 5.18 | pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha |
| PA14_02520 | PA14_02520 | 5.15 | hypothetical protein |
| PA14_39710 | PA14_39710 | 5.00 | radical SAM protein |
| SPA0117 | #N/A | 4.98 | pARN |
| PA14_19930 | PA14_19930 | 4.97 | hypothetical protein |
| PA14_42520 | PA14_42520 | 4.84 | hypothetical protein |
| PA14_28500 | PA14_28500 | 4.67 | hypothetical protein |
| PA14_36490 | PA14_36490 | 4.62 | hypothetical protein |
| PA14_36620 | PA14_36620 | 4.48 | hypothetical protein |
| PA14_36930 | PA14_36930 | 4.47 | hypothetical protein |
| PA14_36920 | PA14_36920 | 4.47 | hypothetical protein |
| SPA0012 | #N/A | 4.41 | pARN |
| PA14_36390 | PA14_36390 | 4.12 | hypothetical protein |
| ligD | PA14_36910 | 4.02 | ATP-dependent DNA ligase |
| PA14_36690 | PA14_36690 | 4.00 | cardiolipin synthase 2 |
| PA14_61000 | PA14_61000 | 3.96 | hypothetical protein |
| PA14_36520 | PA14_36520 | 3.96 | hypothetical protein |
| PA14_36780 | PA14_36780 | 3.91 | hypothetical protein |

3.91

3.88

pARN

3.87 hypothetical protein

hypothetical protein

Annexe D – Gènes seulement affectés en surface ΔhptBgacA vs WT

PA14_46160

PA14sr_083

PA14_11230

PA14_46160

PA14_11230

#N/A

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| SPA0124 | #N/A | 3.85 | pARN |
| PA14_36590 | PA14_36590 | 3.84 | 4-alpha-glucanotransferase |
| PA14_36605 | PA14_36605 | 3.84 | maltooligosyl trehalose synthase |
| ersA | PA14_72485 | 3.79 | ErsA |
| Pseudomon_1 | #N/A | 3.79 | pARN |
| SPA0122 | #N/A | 3.75 | pARN |
| PA14_36850 | PA14_36850 | 3.73 | hypothetical protein |
| PA14_36880 | PA14_36880 | 3.73 | ompetence-damaged protein |
| PA14_36560 | PA14_36560 | 3.69 | hypothetical protein |
| PA14sr_093 | #N/A | 3.68 | pARN |
| PA14_36580 | PA14_36580 | 3.68 | glycosyl hydrolase |
| PA14_36980 | PA14_36980 | 3.62 | hypothetical protein |
| PA14sr_097 | #N/A | 3.55 | pARN |
| PA14_49050 | PA14_49050 | 3.53 | hypothetical protein |
| PA14_00650 | PA14_00650 | 3.49 | hypothetical protein |
| PA14_39690 | PA14_39690 | 3.48 | anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase |
| SPA0165 | #N/A | 3.43 | pARN |
| PA14_18100 | PA14_18100 | 3.39 | hypothetical protein |
| PA14_33460 | PA14_33460 | 3.37 | hypothetical protein |
| PA14_36700 | PA14_36700 | 3.31 | hypothetical protein |
| PA14_13290 | PA14_13290 | 3.28 | protease |
| nirC | PA14_06730 | 3.28 | c-type cytochrome |
| PA14_36370 | PA14_36370 | 3.28 | carboxylate-amine ligase |
| PA14_36790 | PA14_36790 | 3.28 | hypothetical protein |
| PA14_31080 | PA14_31080 | 3.24 | conjugal transfer protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---------------------------------------|
| SPA0068 | #N/A | 3.24 | pARN |
| PA14_21680 | PA14_21680 | 3.20 | hypothetical protein |
| SPA0026 | #N/A | 3.20 | pARN |
| PA14_37830 | PA14_37830 | 3.15 | pyridoxal-phosphate dependent protein |
| PA14_36660 | PA14_36660 | 3.14 | alcohol dehydrogenase |
| PA14_36830 | PA14_36830 | 3.12 | hypothetical protein |
| PA14_38050 | PA14_38050 | 3.11 | hypothetical protein |
| PA14_01340 | PA14_01340 | 3.09 | hypothetical protein |
| PA14_22400 | PA14_22400 | 3.06 | hypothetical protein |
| PA14_36870 | PA14_36870 | 3.02 | short-chain dehydrogenase |
| pqqA | PA14_38825 | 3.01 | coenzyme PQQ synthesis protein PqqA |
| PA14_54640 | PA14_54640 | 3.01 | enoyl-CoA hydratase |
| PA14_18150 | PA14_18150 | 3.00 | acetyl-coa synthetase |
| PA14_19690 | PA14_19690 | 3.00 | hypothetical protein |
| sndH | PA14_33480 | 2.99 | L-sorbosone dehydrogenase |
| PA14_01350 | PA14_01350 | 2.99 | hypothetical protein |
| osmC | PA14_00710 | 2.98 | osmotically inducible protein OsmC |
| PA14_56670 | PA14_56670 | 2.98 | hypothetical protein |
| PA14_36410 | PA14_36410 | 2.97 | hypothetical protein |
| glgA | PA14_36570 | 2.96 | glycogen synthase |
| ccpR | PA14_60700 | 2.96 | cytochrome c551 peroxidase |
| PA14_36540 | PA14_36540 | 2.96 | hypothetical protein |
| PA14_28410 | PA14_28410 | 2.95 | hypothetical protein |
| hemN | PA14_44470 | 2.93 | coproporphyrinogen III oxidase |
| 6S | #N/A | 2.93 | pARN |
| SPA0094 | #N/A | 2.92 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| SPA0184 | #N/A | 2.92 | pARN |
| PA14_61010 | PA14_61010 | 2.92 | hypothetical protein |
| PA14_38900 | PA14_38900 | 2.89 | two-component response regulator |
| PA14_36375 | PA14_36375 | 2.88 | hypothetical protein |
| PA14_36500 | PA14_36500 | 2.88 | hypothetical protein |
| PA14_54630 | PA14_54630 | 2.86 | acyl-CoA dehydrogenase |
| PA14_51590 | PA14_51590 | 2.85 | hypothetical protein |
| PA14_14330 | PA14_14330 | 2.83 | chaperone |
| PA14_06840 | PA14_06840 | 2.83 | dinitrification protein NorD |
| PA14_38370 | PA14_38370 | 2.82 | hypothetical protein |
| PA14_32280 | PA14_32280 | 2.82 | hypothetical protein |
| PA14_36460 | PA14_36460 | 2.80 | hypothetical protein |
| PA14_45970 | PA14_45970 | 2.79 | cation-transporting P-type ATPase |
| PA14_44340 | PA14_44340 | 2.79 | cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I |
| ехоҮ | PA14_36345 | 2.79 | adenylate cyclase |
| PA14_36630 | PA14_36630 | 2.78 | glycosyl hydrolase |
| PA14_36680 | PA14_36680 | 2.78 | hypothetical protein |
| PA14_01310 | PA14_01310 | 2.77 | cytochrome C oxidase assembly protein |
| PA14_32480 | PA14_32480 | 2.77 | hypothetical protein |
| PA14_01360 | PA14_01360 | 2.76 | hypothetical protein |
| PA14_34580 | PA14_34580 | 2.76 | hypothetical protein |
| PA14_36400 | PA14_36400 | 2.75 | hypothetical protein |
| ptxS | PA14_35370 | 2.74 | transcriptional regulator PtxS |
| PA14_21670 | PA14_21670 | 2.74 | hypothetical protein |
| pfpl | PA14_04650 | 2.68 | protease PfpI |
| PA14_28470 | PA14_28470 | 2.67 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| nirF | PA14_06720 | 2.65 | heme d1 biosynthesis protein NirF |
| PA14_36450 | PA14_36450 | 2.65 | hypothetical protein |
| PA14_40380 | PA14_40380 | 2.65 | TetR family transcriptional regulator |
| oprG | PA14_11270 | 2.63 | outer membrane protein OprG precursor |
| PA14_32650 | PA14_32650 | 2.62 | glutathione S-transferase |
| PA14_48540 | PA14_48540 | 2.61 | hypothetical protein |
| lasA | PA14_40290 | 2.61 | LasA protease |
| PA14_21090 | PA14_21090 | 2.60 | hypothetical protein |
| napE | PA14_49210 | 2.59 | periplasmic nitrate reductase NapE |
| PA14_44350 | PA14_44350 | 2.59 | cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II |
| SPA0034 | #N/A | 2.58 | pARN |
| PA14_36760 | PA14_36760 | 2.58 | KU domain-containing protein |
| PA14_13300 | PA14_13300 | 2.57 | hypothetical protein |
| SPA0131 | #N/A | 2.57 | pARN |
| PA14_15530 | PA14_15530 | 2.57 | entry/exclusion protein TrbK |
| PA14_54750 | PA14_54750 | 2.56 | hypothetical protein |
| SPA0115 | #N/A | 2.56 | pARN |
| PA14_54620 | PA14_54620 | 2.55 | aldehyde dehydrogenase |
| PA14_31820 | PA14_31820 | 2.54 | aminotransferase |
| P11 | #N/A | 2.53 | pARN |
| gcdH | PA14_05840 | 2.53 | glutaryl-CoA dehydrogenase |
| SPA0172 | #N/A | 2.52 | pARN |
| nirJ | PA14_06670 | 2.52 | heme d1 biosynthesis protein NirJ |
| PA14_36740 | PA14_36740 | 2.51 | hypothetical protein |
| PA14_11020 | PA14_11020 | 2.51 | 3-ketoacyl-ACP reductase |
| PA14_36860 | PA14_36860 | 2.50 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| pslF | PA14_35680 | 2.50 | hypothetical protein |
| treA | PA14_33450 | 2.50 | trehalase |
| pemB | PA14_44480 | 2.49 | PemB |
| PA14_67540 | PA14_67540 | 2.48 | hypothetical protein |
| PA14_28050 | PA14_28050 | 2.47 | chemotaxis transducer |
| PA14_41960 | PA14_41960 | 2.46 | hypothetical protein |
| PA14_36350 | PA14_36350 | 2.46 | hypothetical protein |
| сохА | PA14_01300 | 2.45 | cytochrome c oxidase subunit I |
| PA14_36550 | PA14_36550 | 2.45 | hypothetical protein |
| PA14_56660 | PA14_56660 | 2.45 | xenobiotic reductase |
| PA14_36960 | PA14_36960 | 2.44 | transporter |
| mdcC | PA14_02570 | 2.43 | malonate decarboxylase subunit delta |
| napF | PA14_49220 | 2.43 | ferredoxin protein NapF |
| PA14_38270 | PA14_38270 | 2.42 | hypothetical protein |
| PA14_20480 | PA14_20480 | 2.42 | hypothetical protein |
| PA14_38260 | PA14_38260 | 2.42 | hypothetical protein |
| SPA0129 | #N/A | 2.41 | pARN |
| PA14_07050 | PA14_07050 | 2.41 | hypothetical protein |
| PA14_15140 | PA14_15140 | 2.41 | hypothetical protein |
| PA14_38770 | PA14_38770 | 2.40 | peptidase |
| PA14_44360 | PA14_44360 | 2.39 | cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit III |
| psIN | PA14_35570 | 2.39 | hypothetical protein |
| PA14_55260 | PA14_55260 | 2.38 | hypothetical protein |
| PA14_36420 | PA14_36420 | 2.38 | sensor/response regulator hybrid |
| PA14_46220 | PA14_46220 | 2.38 | periplasmic spermidine/putrescine-binding protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_36730 | PA14_36730 | 2.38 | trehalose synthase |
| PA14_05880 | PA14_05880 | 2.37 | membrane-bound protease |
| PA14_54550 | PA14_54550 | 2.37 | hypothetical protein |
| PA14_60520 | PA14_60520 | 2.37 | hypothetical protein |
| PA14_50880 | PA14_50880 | 2.36 | hypothetical protein |
| PA14_64490 | PA14_64490 | 2.35 | hypothetical protein |
| nirQ | PA14_06770 | 2.35 | regulatory protein NirQ |
| PA14_54080 | PA14_54080 | 2.34 | hypothetical protein |
| SPA0086 | #N/A | 2.33 | pARN |
| nirN | PA14_06650 | 2.32 | c-type cytochrome |
| PA14_56560 | PA14_56560 | 2.32 | hypothetical protein |
| PA14_26300 | PA14_26300 | 2.32 | hypothetical protein |
| PA14_39540 | PA14_39540 | 2.31 | ferredoxin |
| PA14_00150 | PA14_00150 | 2.31 | hypothetical protein |
| PA14_29650 | PA14_29650 | 2.30 | hypothetical protein |
| dhT | PA14_05770 | 2.30 | phenylhydantoinase |
| hasR | PA14_20010 | 2.30 | heme uptake outer membrane receptor HasR |
| arcD | PA14_68300 | 2.29 | arginine/ornithine antiporter |
| PA14_54740 | PA14_54740 | 2.29 | hypothetical protein |
| PA14_59390 | PA14_59390 | 2.28 | hypothetical protein |
| PA14_39530 | PA14_39530 | 2.27 | hydroxylase molybdopterin-containing subunit |
| PA14_16100 | PA14_16100 | 2.26 | hypothetical protein |
| PA14_15130 | PA14_15130 | 2.26 | hypothetical protein |
| glgP | PA14_36840 | 2.26 | glycogen phosphorylase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| gnd | PA14_35290 | 2.25 | gluconate dehydrogenase |
| PA14_28600 | PA14_28600 | 2.24 | hypothetical protein |
| PA14_54660 | PA14_54660 | 2.24 | enoyl-CoA hydratase/isomerase |
| PA14_19860 | PA14_19860 | 2.24 | hypothetical protein |
| PA14_07650 | PA14_07650 | 2.24 | SpoVR family protein |
| PA14_16110 | PA14_16110 | 2.24 | hypothetical protein |
| PA14_35920 | PA14_35920 | 2.23 | acetate permease |
| nirH | PA14_06680 | 2.23 | hypothetical protein |
| PA14_26310 | PA14_26310 | 2.23 | short chain dehydrogenase |
| PA14_36150 | PA14_36150 | 2.22 | hypothetical protein |
| PA14_36480 | PA14_36480 | 2.22 | hypothetical protein |
| PA14_34740 | PA14_34740 | 2.22 | hypothetical protein |
| PA14_39560 | PA14_39560 | 2.21 | chemotaxis transducer |
| PA14_54520 | PA14_54520 | 2.21 | porin |
| PA14_47530 | PA14_47530 | 2.21 | hypothetical protein |
| arcA | PA14_68330 | 2.19 | arginine deiminase |
| osmE | PA14_64480 | 2.19 | DNA-binding transcriptional activator OsmE |
| colll | PA14_01320 | 2.19 | cytochrome c oxidase subunit III |
| PA14_70160 | PA14_70160 | 2.19 | omega amino acidpyruvate transaminase |
| PA14_68840 | PA14_68840 | 2.18 | hypothetical protein |
| cpg2 | PA14_28060 | 2.18 | glutamate carboxypeptidase |
| PA14_31110 | PA14_31110 | 2.17 | replication initiator and transcriptional repressor protein |
| PA14_37080 | PA14_37080 | 2.17 | hypothetical protein |
| PA14_55290 | PA14_55290 | 2.17 | hypothetical protein |
| PA14_40300 | PA14_40300 | 2.16 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_54670 | PA14_54670 | 2.16 | 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase |
| PA14_50020 | PA14_50020 | 2.16 | hypothetical protein |
| PA14_56770 | PA14_56770 | 2.15 | transporter |
| PA14_31100 | PA14_31100 | 2.15 | plasmid partitioning protein |
| PA14_10650 | PA14_10650 | 2.15 | hypothetical protein |
| pqqE | PA14_38780 | 2.14 | pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqE |
| PA14_56220 | PA14_56220 | 2.14 | hypothetical protein |
| PA14_29220 | PA14_29220 | 2.14 | porin |
| PA14_32490 | PA14_32490 | 2.13 | hypothetical protein |
| xdhA | PA14_44710 | 2.13 | xanthine dehydrogenase |
| PA14_06900 | PA14_06900 | 2.13 | hypothetical protein |
| ureF | PA14_64660 | 2.13 | urease accessory protein UreF |
| PA14_31160 | PA14_31160 | 2.13 | hypothetical protein |
| PA14_55110 | PA14_55110 | 2.12 | hypothetical protein |
| PA14_48830 | PA14_48830 | 2.12 | transcriptional regulator |
| PA14_36470 | PA14_36470 | 2.12 | hypothetical protein |
| PA14_09940 | PA14_09940 | 2.12 | protease |
| rfaD | PA14_20890 | 2.12 | ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6- epimerase |
| PA14_07660 | PA14_07660 | 2.12 | hypothetical protein |
| PA14_41500 | PA14_41500 | 2.11 | lyase |
| PA14_48240 | PA14_48240 | 2.11 | outer membrane component of multidrug efflux pump |
| PA14_28070 | PA14_28070 | 2.11 | hypothetical protein |
| PA14_64930 | PA14_64930 | 2.11 | hypothetical protein |
| PA14_65040 | PA14_65040 | 2.11 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_67150 | PA14_67150 | 2.11 | oxidoreductase |
| PA14_20060 | PA14_20060 | 2.10 | hypothetical protein |
| morB | PA14_26130 | 2.10 | morphinone reductase |
| ibpA | PA14_23680 | 2.09 | heat-shock protein IbpA |
| PA14_68830 | PA14_68830 | 2.09 | hypothetical protein |
| pilP2 | PA14_59280 | 2.09 | type IV B pilus protein |
| SPA0121 | #N/A | 2.09 | pARN |
| PA14_01330 | PA14_01330 | 2.08 | hypothetical protein |
| PA14_24970 | PA14_24970 | 2.08 | lipid kinase |
| PA14_63860 | PA14_63860 | 2.07 | hypothetical protein |
| SPA0150 | #N/A | 2.07 | pARN |
| PA14_16680 | PA14_16680 | 2.07 | hypothetical protein |
| PA14_20050 | PA14_20050 | 2.06 | outer membrane protein |
| PA14_46150 | PA14_46150 | 2.05 | hypothetical protein |
| SPA0155 | #N/A | 2.05 | pARN |
| PA14_46240 | PA14_46240 | 2.05 | hypothetical protein |
| PA14_26140 | PA14_26140 | 2.05 | transcriptional regulator |
| PA14_34730 | PA14_34730 | 2.05 | XRE family transcriptional regulator |
| pqqD | PA14_38790 | 2.05 | pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqD |
| PA14_10730 | PA14_10730 | 2.05 | hypothetical protein |
| PA14_06960 | PA14_06960 | 2.04 | hypothetical protein |
| SPA0136 | #N/A | 2.04 | pARN |
| PA14_20470 | PA14_20470 | 2.04 | hypothetical protein |
| PA14_56640 | PA14_56640 | 2.04 | MFS transporter |
| PA14_23720 | PA14_23720 | 2.04 | translation initiation inhibitor |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| ldh | PA14_19870 | 2.04 | leucine dehydrogenase |
| SPA0123 | #N/A | 2.04 | pARN |
| PA14_37340 | PA14_37340 | 2.03 | thiamine pyrophosphate protein |
| PA14_37350 | PA14_37350 | 2.03 | hypothetical protein |
| PA14_19360 | PA14_19360 | 2.03 | GNAT family acetyltransferase |
| exoU | PA14_51530 | 2.03 | ExoU |
| PA14_34280 | PA14_34280 | 2.02 | hypothetical protein |
| xylZ | PA14_32110 | 2.02 | toluate 1,2-dioxygenase electron transfer component |
| PA14_00340 | PA14_00340 | 2.02 | sulfate transporter |
| PA14_47130 | PA14_47130 | 2.02 | hypothetical protein |
| rhlB | PA14_19110 | 2.02 | rhamnosyltransferase chain B |
| PA14_00740 | PA14_00740 | 2.02 | lipoprotein |
| PA14sr_009 | #N/A | 2.02 | pARN |
| PA14_48160 | PA14_48160 | 2.01 | sensor/response regulator hybrid |
| PA14_13840 | PA14_13840 | 2.01 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC- type |
| PA14_47930 | PA14_47930 | 2.01 | hypothetical protein |
| PA14_49680 | PA14_49680 | 2.01 | transcriptional regulator |
| PA14_37670 | PA14_37670 | 2.01 | hypothetical protein |
| PA14_13210 | PA14_13210 | 2.01 | hypothetical protein |
| PA14_39000 | PA14_39000 | 2.00 | hypothetical protein |
| SPA0043 | #N/A | 2.00 | pARN |
| PA14_24820 | PA14_24820 | 1.99 | hypothetical protein |
| PA14_34940 | PA14_34940 | 1.99 | hypothetical protein |
| gcvP1 | PA14_68850 | 1.99 | glycine dehydrogenase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_29040 | PA14_29040 | 1.99 | ferredoxin |
| PA14_19350 | PA14_19350 | 1.99 | hypothetical protein |
| SPA0059 | #N/A | 1.98 | pARN |
| P4 | #N/A | 1.98 | pARN |
| PA14_02960 | PA14_02960 | 1.98 | hypothetical protein |
| PA14_15120 | PA14_15120 | 1.97 | hypothetical protein |
| pqqC | PA14_38800 | 1.97 | pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqC |
| PA14_37070 | PA14_37070 | 1.97 | hypothetical protein |
| PA14_56030 | PA14_56030 | 1.97 | hypothetical protein |
| PA14_40130 | PA14_40130 | 1.97 | hypothetical protein |
| PA14_64920 | PA14_64920 | 1.97 | methyl-accepting chemotaxis protein |
| PA14_39670 | PA14_39670 | 1.97 | hypothetical protein |
| PA14_12440 | PA14_12440 | 1.96 | AcrR family transcriptional regulator |
| PA14_54540 | PA14_54540 | 1.96 | hypothetical protein |
| PA14_36990 | PA14_36990 | 1.96 | Cyclic-guanylate-specific phosphodiesterase |
| fusA2 | PA14_37710 | 1.96 | elongation factor G |
| PA14_02620 | PA14_02620 | 1.96 | epsilon subunit of malonate decarboxylase |
| pqqB | PA14_38820 | 1.96 | pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB |
| PA14_35270 | PA14_35270 | 1.96 | cytochrome c precursor |
| PA14_33830 | PA14_33830 | 1.96 | hypothetical protein |
| qacH | PA14_65990 | 1.95 | SMR multidrug efflux transporter |
| PA14_46840 | PA14_46840 | 1.95 | hypothetical protein |
| PA14_53750 | PA14_53750 | 1.95 | hypothetical protein |
| PA14_17580 | PA14_17580 | 1.95 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_01730 | PA14_01730 | 1.95 | hypothetical protein |
| PA14_02410 | PA14_02410 | 1.95 | TonB-dependent receptor |
| PA14_46810 | PA14_46810 | 1.95 | RNA polymerase ECF-subfamily sigma-70 factor |
| PA14_42150 | PA14_42150 | 1.95 | hypothetical protein |
| PA14_44210 | PA14_44210 | 1.95 | glycine/D-amino acid oxidase |
| PA14_66510 | PA14_66510 | 1.94 | MFS transporter |
| PA14sr_048 | #N/A | 1.94 | pARN |
| plcR | PA14_53370 | 1.94 | phospholipase accessory protein PlcR |
| PA14_39230 | PA14_39230 | 1.94 | hypothetical protein |
| phnK | PA14_20400 | 1.93 | phosphonate C-P lyase system protein PhnK |
| PA14_19310 | PA14_19310 | 1.93 | hypothetical protein |
| PA14_06000 | PA14_06000 | 1.93 | ClpA/B protease ATP binding subunit |
| aphA | PA14_46230 | 1.93 | acetylpolyamine aminohydrolase |
| PA14_20780 | PA14_20780 | 1.93 | two-component response regulator |
| PA14_56520 | PA14_56520 | 1.93 | hypothetical protein |
| PA14_37090 | PA14_37090 | 1.92 | aldehyde dehydrogenase |
| pcrR | PA14_42490 | 1.92 | transcriptional regulator protein PcrR |
| PA14_36110 | PA14_36110 | 1.92 | hypothetical protein |
| PA14_28490 | PA14_28490 | 1.92 | hypothetical protein |
| PA14_35170 | PA14_35170 | 1.92 | redox-sensing activator of soxS |
| PA14_19970 | PA14_19970 | 1.92 | hypothetical protein |
| merD | PA14_15450 | 1.92 | transcriptional regulator MerD |
| leuC | PA14_23750 | 1.92 | isopropylmalate isomerase large subunit |
| PA14_29210 | PA14_29210 | 1.92 | MFS transporter |
| trxB2 | PA14_53290 | 1.92 | thioredoxin reductase 2 |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_66520 | PA14_66520 | 1.91 | short chain dehydrogenase |
| PA14_37870 | PA14_37870 | 1.91 | peptide ABC transporter permease |
| PA14_58080 | PA14_58080 | 1.91 | hypothetical protein |
| hxcV | PA14_55500 | 1.90 | HxcV |
| PA14_51050 | PA14_51050 | 1.90 | aldehyde dehydrogenase |
| PA14_02770 | PA14_02770 | 1.90 | CoA transferase subunit B |
| PA14_38140 | PA14_38140 | 1.90 | glutamine synthetase |
| PA14_30820 | PA14_30820 | 1.89 | methyl-accepting chemotaxis transducer |
| PA14_31390 | PA14_31390 | 1.89 | hypothetical protein |
| lasB | PA14_16250 | 1.89 | elastase LasB |
| PA14_03490 | PA14_03490 | 1.89 | hypothetical protein |
| PA14_48010 | PA14_48010 | 1.89 | semialdehyde dehydrogenase |
| PA14_11140 | PA14_11140 | 1.89 | nonribosomal peptide synthetase |
| PA14_30890 | PA14_30890 | 1.89 | hypothetical protein |
| PA14_28520 | PA14_28520 | 1.88 | hypothetical protein |
| PA14_54680 | PA14_54680 | 1.88 | hypothetical protein |
| PA14_47580 | PA14_47580 | 1.88 | MarR family transcriptional regulator |
| PA14_37840 | PA14_37840 | 1.88 | ABC transporter ATP-binding protein |
| PA14_47610 | PA14_47610 | 1.88 | transcriptional regulator |
| PA14_30870 | PA14_30870 | 1.87 | conjugal transfer protein TrbF |
| PA14_39630 | PA14_39630 | 1.87 | hypothetical protein |
| PA14_39750 | PA14_39750 | 1.87 | amino acid permease |
| PA14_20770 | PA14_20770 | 1.87 | hypothetical protein |
| pac | PA14_50980 | 1.87 | penicillin amidase |
| PA14_37400 | PA14_37400 | 1.87 | AraC family transcriptional regulator |
| PA14_06300 | PA14_06300 | 1.87 | GNAT family acetyltransferase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|-----------------------------------|
| сохВ | PA14_01290 | 1.86 | cytochrome c oxidase subunit II |
| hasE | PA14_20040 | 1.86 | metalloprotease secretion protein |
| PA14_44200 | PA14_44200 | 1.86 | hypothetical protein |
| PA14_46750 | PA14_46750 | 1.86 | hypothetical protein |
| PA14_03550 | PA14_03550 | 1.86 | MFS transporter |
| PA14_49780 | PA14_49780 | 1.86 | fosfomycin resistance protein |
| PA14sr_080 | #N/A | 1.86 | pARN |
| spcU | PA14_51520 | 1.86 | SpcU |
| PA14_28960 | PA14_28960 | 1.86 | hypothetical protein |
| PA14_46540 | PA14_46540 | 1.86 | hypothetical protein |
| PA14_33250 | PA14_33250 | 1.85 | hypothetical protein |
| PA14_12740 | PA14_12740 | 1.85 | hypothetical protein |
| PA14_67410 | PA14_67410 | 1.85 | hypothetical protein |
| PA14_49860 | PA14_49860 | 1.85 | hypothetical protein |
| PA14_63780 | PA14_63780 | 1.85 | hypothetical protein |
| P24 | #N/A | 1.84 | pARN |
| PA14_64750 | PA14_64750 | 1.84 | MFS transporter |
| PA14_38910 | PA14_38910 | 1.84 | sensor kinase |
| PA14_29290 | PA14_29290 | 1.84 | hypothetical protein |
| PA14_28620 | PA14_28620 | 1.84 | hypothetical protein |
| PA14_12260 | PA14_12260 | 1.84 | hypothetical protein |
| PA14_39660 | PA14_39660 | 1.84 | hypothetical protein |
| PA14_73100 | PA14_73100 | 1.83 | hypothetical protein |
| PA14_18870 | PA14_18870 | 1.83 | hypothetical protein |
| SPA0151 | #N/A | 1.83 | pARN |
| SPA0125 | #N/A | 1.83 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_42160 | PA14_42160 | 1.83 | hypothetical protein |
| PA14_67440 | PA14_67440 | 1.83 | N-formimino-L-glutamate deiminase |
| PA14_32470 | PA14_32470 | 1.83 | hypothetical protein |
| PA14_48350 | PA14_48350 | 1.82 | hypothetical protein |
| PA14_40280 | PA14_40280 | 1.82 | hypothetical protein |
| PA14_60960 | PA14_60960 | 1.82 | hypothetical protein |
| PA14_37410 | PA14_37410 | 1.82 | hypothetical protein |
| PA14_00320 | PA14_00320 | 1.82 | hypothetical protein |
| PA14_45890 | PA14_45890 | 1.82 | RND efflux transporter |
| PA14_37380 | PA14_37380 | 1.82 | flavin-binding monooxygenase |
| PA14_22340 | PA14_22340 | 1.82 | hypothetical protein |
| PA14_11760 | PA14_11760 | 1.81 | ethanolamine ammonia-lyase small subunit |
| PA14_21690 | PA14_21690 | 1.81 | ATP-dependent DNA helicase |
| actP | PA14_22350 | 1.81 | acetate permease |
| PA14_04790 | PA14_04790 | 1.81 | hypothetical protein |
| PA14_26780 | PA14_26780 | 1.81 | hypothetical protein |
| PA14_71380 | PA14_71380 | 1.81 | hypothetical protein |
| PA14_63250 | PA14_63250 | 1.81 | acetyl-CoA acetyltransferase |
| PA14_28980 | PA14_28980 | 1.81 | Fe2+-dicitrate sensor |
| feoB | PA14_56680 | 1.81 | ferrous iron transport protein B |
| PA14_55750 | PA14_55750 | 1.81 | chemotaxis transducer |
| PA14_47840 | PA14_47840 | 1.81 | hypothetical protein |
| PA14_38840 | PA14_38840 | 1.81 | NAD+ dependent acetaldehyde dehydrogenase |
| PA14_56550 | PA14_56550 | 1.81 | hypothetical protein |
| PA14_20460 | PA14_20460 | 1.81 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_42130 | PA14_42130 | 1.81 | hypothetical protein |
| PA14_39730 | PA14_39730 | 1.81 | hypothetical protein |
| PA14_68450 | PA14_68450 | 1.81 | hypothetical protein |
| nosR | PA14_20230 | 1.80 | regulatory protein NosR |
| PA14_72060 | PA14_72060 | 1.80 | hypothetical protein |
| PA14_31340 | PA14_31340 | 1.80 | hypothetical protein |
| rhIC | PA14_49760 | 1.80 | rhamnosyltransferase 2 |
| PA14sr_100 | #N/A | 1.80 | pARN |
| PA14_70140 | PA14_70140 | 1.80 | aldehyde dehydrogenase |
| PA14_35040 | PA14_35040 | 1.80 | hypothetical protein |
| PA14_66460 | PA14_66460 | 1.80 | hypothetical protein |
| PA14_22880 | PA14_22880 | 1.79 | Fe-S protein |
| PA14_01240 | PA14_01240 | 1.79 | carbonic anhydrase |
| PA14_01670 | PA14_01670 | 1.79 | ABC transporter ATP-binding protein |
| PA14_47920 | PA14_47920 | 1.79 | ABC transporter substrate-binding protein |
| SPA0080 | #N/A | 1.79 | pARN |
| PA14_67310 | PA14_67310 | 1.79 | amino acid permease |
| PA14_43290 | PA14_43290 | 1.79 | lipoprotein |
| PA14_09730 | PA14_09730 | 1.79 | dihydrodipicolinate synthase |
| PA14_42830 | PA14_42830 | 1.79 | hypothetical protein |
| lipH | PA14_27090 | 1.79 | lipase chaperone |
| gapA | PA14_22890 | 1.79 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| PA14_17880 | PA14_17880 | 1.79 | acetyl-CoA acetyltransferase |
| rmID | PA14_68190 | 1.79 | dTDP-4-dehydrorhamnose reductase |
| PA14_17570 | PA14_17570 | 1.79 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|----------------|----------------------|---|
| PA14_26280 | PA14_26280 | 1.79 | chemotaxis transducer |
| PA14_11740 | PA14_11740 | 1.78 | hypothetical protein |
| PA14_49940 | PA14_49940 | 1.78 | hypothetical protein |
| PA14_56750 | PA14_56750 | 1.78 | hypothetical protein |
| PA14sr_074 | #N/A | 1.78 | pARN |
| gloA3 | PA14_67500 | 1.78 | lactoylglutathione lyase |
| PA14_04810 | PA14_04810 | 1.78 | aldehyde dehydrogenase |
| PA14_20240 | PA14_20240 | 1.77 | ring-cleaving dioxygenase |
| PA14_50050 | PA14_50050 | 1.77 | MFS family transporter |
| PA14_45240 | PA14_45240 | 1.77 | amino acid permease |
| PA14_71080 | PA14_71080 | 1.77 | hypothetical protein |
| psIO | PA14_35550 | 1.77 | hypothetical protein |
| PA14_12680 | PA14_12680 | 1.77 | short chain dehydrogenase |
| pcaF | PA14_02790 | 1.77 | beta-ketoadipyl CoA thiolase |
| narK1 | PA14_13750 | 1.77 | nitrite extrusion protein 1 |
| PA14_51040 | PA14_51040 | 1.77 | oxidoreductase |
| PA14_48210 | PA14_48210 | 1.76 | hydrolase |
| PA14_08570 | PA14_08570 | 1.76 | 16S ribosomal RNA |
| PA14_26190 | PA14_26190 | 1.76 | hypothetical protein |
| PA14_64460 | PA14_64460 | 1.76 | hypothetical protein |
| PA14_05820 | PA14_05820 | 1.76 | hypothetical protein |
| PA14_32460 | PA14_32460 | 1.76 | transcriptional regulator |
| PA14_46030 | PA14_46030 | 1.76 | chemotaxis transducer |
| PA14_34710 | PA14_34710 | 1.76 | major facilitator transporter |
| PA14_69260 | PA14_69260 | 1.76 | isoprenoid biosynthesis protein with amidotransferase-like domain |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|-------------------------------------|
| cynS | PA14_37965 | 1.76 | cyanate hydratase |
| PA14_27930 | PA14_27930 | 1.76 | hypothetical protein |
| PA14_31270 | PA14_31270 | 1.76 | hypothetical protein |
| PA14_40750 | PA14_40750 | 1.76 | hypothetical protein |
| PA14_46860 | PA14_46860 | 1.76 | lysine decarboxylase |
| PA14_37690 | PA14_37690 | 1.76 | sensory box protein |
| PA14_16370 | PA14_16370 | 1.75 | hypothetical protein |
| PA14_21380 | PA14_21380 | 1.75 | hypothetical protein |
| PA14_07680 | PA14_07680 | 1.75 | hypothetical protein |
| PA14_26650 | PA14_26650 | 1.75 | short chain dehydrogenase |
| PA14sr_082 | #N/A | 1.75 | pARN |
| PA14_39810 | PA14_39810 | 1.75 | transmembrane sensor |
| PA14_06930 | PA14_06930 | 1.75 | glutamine amidotransferase |
| PA14_46000 | PA14_46000 | 1.75 | hypothetical protein |
| PA14_10350 | PA14_10350 | 1.75 | secretion protein |
| alc | PA14_44850 | 1.75 | allantoicase |
| oprC | PA14_15070 | 1.75 | outer membrane copper receptor OprC |
| PA14_42140 | PA14_42140 | 1.74 | transglutaminase |
| PA14_23170 | PA14_23170 | 1.74 | formimidoylglutamase |
| PA14_35300 | PA14_35300 | 1.74 | hypothetical protein |
| PA14_64940 | PA14_64940 | 1.74 | hypothetical protein |
| acsA | PA14_52800 | 1.73 | acetyl-CoA synthetase |
| PA14_61600 | PA14_61600 | 1.73 | hypothetical protein |
| PA14_19480 | PA14_19480 | 1.73 | hypothetical protein |
| SPA0053 | #N/A | 1.73 | pARN |
| SPA0088 | #N/A | 1.73 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_01680 | PA14_01680 | 1.73 | ABC transporter permease |
| SPA0096 | #N/A | 1.73 | pARN |
| PA14_29500 | PA14_29500 | 1.73 | type II secretion system protein |
| PA14_41740 | PA14_41740 | 1.73 | hypothetical protein |
| PA14_51490 | PA14_51490 | 1.73 | hypothetical protein |
| PA14_21830 | PA14_21830 | 1.72 | hypothetical protein |
| PA14_13140 | PA14_13140 | 1.72 | hypothetical protein |
| PA14_19380 | PA14_19380 | 1.72 | transcriptional regulator |
| kdpE | PA14_43340 | 1.72 | two-component response regulator KdpE |
| PA14_42010 | PA14_42010 | 1.72 | amidotransferase |
| norB | PA14_06830 | 1.72 | nitric-oxide reductase subunit B |
| PA14_15110 | PA14_15110 | 1.72 | hypothetical protein |
| PA14_46300 | PA14_46300 | 1.72 | hypothetical protein |
| mdcE | PA14_02590 | 1.72 | malonate decarboxylase subunit gamma |
| PA14_48570 | PA14_48570 | 1.71 | 2-isopropylmalate synthase |
| katA | PA14_09150 | 1.71 | catalase |
| pqqF | PA14_39010 | 1.71 | pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein F |
| PA14_53730 | PA14_53730 | 1.71 | transcriptional regulator |
| PA14_37100 | PA14_37100 | 1.71 | dehydrogenase |
| PA14_19370 | PA14_19370 | 1.71 | asparagine synthetase |
| PA14_37680 | PA14_37680 | 1.71 | hypothetical protein |
| iciA | PA14_56740 | 1.71 | chromosome replication initiation inhibitor protein |
| kynB | PA14_37590 | 1.71 | kynurenine formamidase, KynB |
| PA14_38690 | PA14_38690 | 1.71 | acetoacetyl-CoA synthetase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| rbsA | PA14_39330 | 1.71 | ribose transporter |
| PA14_06920 | PA14_06920 | 1.71 | class III pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase |
| PA14_72370 | PA14_72370 | 1.71 | hypothetical protein |
| PA14_11610 | PA14_11610 | 1.71 | ABC transporter permease |
| SPA0160 | #N/A | 1.71 | pARN |
| PA14_11730 | PA14_11730 | 1.71 | protein kinase |
| PA14_42200 | PA14_42200 | 1.71 | hypothetical protein |
| hasD | PA14_20030 | 1.70 | transport protein HasD |
| PA14_03860 | PA14_03860 | 1.70 | glutamine synthetase |
| PA14_25480 | PA14_25480 | 1.70 | competence protein |
| PA14_33840 | PA14_33840 | 1.70 | transcriptional regulator |
| PA14_67130 | PA14_67130 | 1.70 | ABC transporter substrate-binding protein |
| PA14_10710 | PA14_10710 | 1.69 | hypothetical protein |
| ntrC | PA14_67680 | 1.69 | two-component response regulator NtrC |
| PA14_46820 | PA14_46820 | 1.69 | hypothetical protein |
| moeA1 | PA14_13280 | 1.69 | molybdenum cofactor biosynthetic protein A1 |
| PA14_45150 | PA14_45150 | 1.69 | transcriptional regulator |
| PA14_02290 | PA14_02290 | 1.69 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_30830 | PA14_30830 | 1.69 | two-component response regulator |
| PA14_54810 | PA14_54810 | 1.69 | hypothetical protein |
| PA14_61340 | PA14_61340 | 1.69 | hypothetical protein |
| PA14_14270 | PA14_14270 | 1.69 | isochorismatase family hydrolase |
| PA14_31350 | PA14_31350 | 1.69 | hypothetical protein |
| PA14_06270 | PA14_06270 | 1.69 | hydrolase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_68800 | PA14_68800 | 1.69 | hypothetical protein |
| PA14_28970 | PA14_28970 | 1.69 | hypothetical protein |
| SPA0065 | #N/A | 1.69 | pARN |
| PA14_00470 | PA14_00470 | 1.69 | hypothetical protein |
| PA14_64850 | PA14_64850 | 1.69 | ornithine cyclodeaminase |
| PA14_36060 | PA14_36060 | 1.69 | hypothetical protein |
| PA14_11810 | PA14_11810 | 1.69 | aldehyde dehydrogenase |
| PA14_34270 | PA14_34270 | 1.68 | ABC transporter ATP-binding protein |
| PA14_24210 | PA14_24210 | 1.68 | hypothetical protein |
| PA14_57950 | PA14_57950 | 1.68 | hypothetical protein |
| PA14_26350 | PA14_26350 | 1.68 | hypothetical protein |
| PA14_11240 | PA14_11240 | 1.68 | DNA-binding transcriptional activator FeaR |
| PA14_22420 | PA14_22420 | 1.68 | hypothetical protein |
| PA14_06710 | PA14_06710 | 1.68 | transcriptional regulator |
| PA14_27720 | PA14_27720 | 1.68 | hypothetical protein |
| hutH | PA14_67320 | 1.68 | histidine ammonia-lyase |
| PA14_16640 | PA14_16640 | 1.68 | lipoprotein |
| PA14_48840 | PA14_48840 | 1.68 | hypothetical protein |
| PA14_01660 | PA14_01660 | 1.68 | guanine deaminase |
| PA14_28170 | PA14_28170 | 1.68 | formate/nitrate transporter |
| PA14_50500 | PA14_50500 | 1.67 | hypothetical protein |
| PA14_37170 | PA14_37170 | 1.67 | hypothetical protein |
| PA14_70170 | PA14_70170 | 1.67 | hypothetical protein |
| hxcR | PA14_55440 | 1.67 | HxcR |
| PA14_21860 | PA14_21860 | 1.67 | hypothetical protein |
| PA14_36940 | PA14_36940 | 1.67 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---------------------------------------|
| PA14_30940 | PA14_30940 | 1.67 | conjugal transfer protein |
| PA14_21050 | PA14_21050 | 1.67 | short chain dehydrogenase |
| PA14_31090 | PA14_31090 | 1.67 | hypothetical protein |
| PA14_11210 | PA14_11210 | 1.67 | amino acid permease |
| PA14_21240 | PA14_21240 | 1.67 | hypothetical protein |
| PA14_46830 | PA14_46830 | 1.67 | hypothetical protein |
| PA14_63320 | PA14_63320 | 1.67 | hypothetical protein |
| PA14_72230 | PA14_72230 | 1.66 | hypothetical protein |
| PA14_26160 | PA14_26160 | 1.66 | hypothetical protein |
| PA14sr_028 | #N/A | 1.66 | pARN |
| PA14sr_050 | #N/A | 1.66 | pARN |
| PA14_28140 | PA14_28140 | 1.66 | hypothetical protein |
| PA14_71070 | PA14_71070 | 1.66 | AraC family transcriptional regulator |
| PA14_24830 | PA14_24830 | 1.66 | glutathione S-transferase |
| PA14_55590 | PA14_55590 | 1.66 | hypothetical protein |
| PA14_35950 | PA14_35950 | 1.66 | dehydrogenase |
| PA14_56040 | PA14_56040 | 1.66 | hypothetical protein |
| PA14_28610 | PA14_28610 | 1.66 | hypothetical protein |
| PA14_71590 | PA14_71590 | 1.66 | hypothetical protein |
| mmsR | PA14_18110 | 1.66 | transcriptional regulator MmsR |
| xdhB | PA14_44740 | 1.66 | xanthine dehydrogenase |
| PA14_73140 | PA14_73140 | 1.65 | hypothetical protein |
| SPA0103 | #N/A | 1.65 | pARN |
| PA14_70910 | PA14_70910 | 1.65 | 16S ribosomal RNA |
| PA14_29060 | PA14_29060 | 1.65 | transcriptional regulator |
| PA14_40050 | PA14_40050 | 1.65 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| phzH | PA14_00640 | 1.65 | potential phenazine-modifying enzyme |
| PA14_01780 | PA14_01780 | 1.65 | nucleoside 2-deoxyribosyltransferase |
| PA14_00720 | PA14_00720 | 1.65 | hypothetical protein |
| PA14_59030 | PA14_59030 | 1.65 | hypothetical protein |
| rmlC | PA14_68210 | 1.65 | dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase |
| vanA | PA14_64800 | 1.65 | vanillate O-demethylase oxygenase |
| PA14_24140 | PA14_24140 | 1.64 | AraC family transcriptional regulator |
| PA14_13190 | PA14_13190 | 1.64 | hypothetical protein |
| PA14_56730 | PA14_56730 | 1.64 | hypothetical protein |
| PA14_40270 | PA14_40270 | 1.64 | cation transporter |
| PA14_29620 | PA14_29620 | 1.64 | anaerobic nitric oxide reductase transcriptional regulator |
| lldP | PA14_63080 | 1.64 | L-lactate permease |
| PA14sr_078 | #N/A | 1.64 | pARN |
| phnP | PA14_20450 | 1.64 | carbon-phosphorus lyase complex accessory protein |
| SPA0179 | #N/A | 1.64 | pARN |
| PA14_36070 | PA14_36070 | 1.64 | hypothetical protein |
| PA14_21570 | PA14_21570 | 1.64 | hypothetical protein |
| PA14_23770 | PA14_23770 | 1.64 | biotin synthesis protein |
| PA14_48170 | PA14_48170 | 1.64 | hypothetical protein |
| hutU | PA14_67350 | 1.63 | urocanate hydratase |
| PA14_05890 | PA14_05890 | 1.63 | stomatin-like protein |
| PA14_08420 | PA14_08420 | 1.63 | HIT family protein |
| PA14_40430 | PA14_40430 | 1.63 | hypothetical protein |
| phaD | PA14_66830 | 1.63 | poly(3-hydroxyalkanoic acid) depolymerase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_70310 | PA14_70310 | 1.63 | hypothetical protein |
| PA14_60480 | PA14_60480 | 1.63 | hypothetical protein |
| PA14_15090 | PA14_15090 | 1.63 | hypothetical protein |
| PA14_14100 | PA14_14100 | 1.63 | amino acid-binding protein |
| PA14_00310 | PA14_00310 | 1.63 | peptidyl-prolyl isomerase |
| PA14_21580 | PA14_21580 | 1.63 | hypothetical protein |
| SPA0164 | #N/A | 1.63 | pARN |
| arcC | PA14_68350 | 1.63 | carbamate kinase |
| PA14_33920 | PA14_33920 | 1.63 | transcriptional regulator |
| PA14_47250 | PA14_47250 | 1.63 | hypothetical protein |
| PA14_24810 | PA14_24810 | 1.62 | hypothetical protein |
| PA14_63330 | PA14_63330 | 1.62 | glycerolphosphodiesterase |
| PA14_47080 | PA14_47080 | 1.62 | transcriptional regulator |
| PA14_62090 | PA14_62090 | 1.62 | 16S ribosomal RNA |
| PA14_22540 | PA14_22540 | 1.62 | flavodoxin |
| PA14_31780 | PA14_31780 | 1.62 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_39360 | PA14_39360 | 1.62 | sigma-54 dependent transcriptional regulator |
| PA14_36090 | PA14_36090 | 1.62 | porin |
| PA14_10700 | PA14_10700 | 1.62 | bacteriophytochrome |
| glcC | PA14_70710 | 1.62 | DNA-binding transcriptional regulator GlcC |
| PA14_35030 | PA14_35030 | 1.62 | hypothetical protein |
| PA14_70740 | PA14_70740 | 1.62 | hypothetical protein |
| PA14_72360 | PA14_72360 | 1.62 | hypothetical protein |
| PA14_55637 | PA14_55637 | 1.62 | 16S ribosomal RNA |
| PA14_19940 | PA14_19940 | 1.62 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| napD | PA14_49230 | 1.62 | NapD protein of periplasmic nitrate reductase |
| soxD | PA14_71490 | 1.62 | sarcosine oxidase delta subunit |
| algU | PA14_54430 | 1.62 | RNA polymerase sigma factor AlgU |
| PA14_06010 | PA14_06010 | 1.62 | hypothetical protein |
| PA14_48660 | PA14_48660 | 1.62 | hypothetical protein |
| pscG | PA14_42300 | 1.62 | type III export protein PscG |
| PA14_38660 | PA14_38660 | 1.62 | CoA transferase, subunit A |
| PA14_62240 | PA14_62240 | 1.62 | hypothetical protein |
| PA14_03580 | PA14_03580 | 1.61 | transcriptional regulator |
| SPA0064 | #N/A | 1.61 | pARN |
| PA14_58840 | PA14_58840 | 1.61 | hypothetical protein |
| PA14_43180 | PA14_43180 | 1.61 | short chain dehydrogenase |
| PA14_63890 | PA14_63890 | 1.61 | short-chain dehydrogenase |
| PA14_21960 | PA14_21960 | 1.61 | hypothetical protein |
| SPA0105 | #N/A | 1.61 | pARN |
| PA14_63900 | PA14_63900 | 1.61 | hemolyin III |
| PA14_31370 | PA14_31370 | 1.61 | hypothetical protein |
| PA14_72900 | PA14_72900 | 1.61 | lipoprotein |
| PA14_37150 | PA14_37150 | 1.61 | hypothetical protein |
| PA14_06310 | PA14_06310 | 1.61 | ACT domain-containing protein |
| PA14_63210 | PA14_63210 | 1.61 | two-component response regulator |
| PA14_33930 | PA14_33930 | 1.61 | hypothetical protein |
| PA14_34330 | PA14_34330 | 1.61 | hypothetical protein |
| PA14_55280 | PA14_55280 | 1.61 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PpiC- type |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_45190 | PA14_45190 | 1.61 | glycerol kinase |
| PA14_49960 | PA14_49960 | 1.61 | hypothetical protein |
| PA14_09930 | PA14_09930 | 1.61 | exonuclease III |
| PA14_61330 | PA14_61330 | 1.61 | magnesium transporter, MgtC family |
| ptsN | PA14_57960 | 1.61 | nitrogen regulatory IIA protein |
| PA14_29120 | PA14_29120 | 1.61 | hypothetical protein |
| PA14_48440 | PA14_48440 | 1.61 | NAD(P)H dehydrogenase |
| cupA4 | PA14_37010 | 1.61 | fimbrial subunit CupA4 |
| PA14_27400 | PA14_27400 | 1.61 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_19340 | PA14_19340 | 1.61 | sensor/response regulator hybrid |
| PA14_11790 | PA14_11790 | 1.61 | amino acid transporter |
| PA14_15620 | PA14_15620 | 1.61 | oxidoreductase |
| vanB | PA14_64810 | 1.61 | vanillate O-demethylase |
| SPA0177 | #N/A | 1.61 | pARN |
| PA14_43810 | PA14_43810 | 1.61 | cytochrome c |
| PA14_48460 | PA14_48460 | 1.60 | polyamine ABC transporter substrate- binding protein |
| PA14_55200 | PA14_55200 | 1.60 | amidase |
| PA14_54240 | PA14_54240 | 1.60 | hypothetical protein |
| PA14_04230 | PA14_04230 | 1.60 | ABC transporter permease |
| PA14_43840 | PA14_43840 | 1.60 | hypothetical protein |
| PA14_45910 | PA14_45910 | 1.60 | RND efflux membrane fusion protein |
| PA14_65820 | PA14_65820 | 1.60 | acyl-CoA dehydrogenase |
| PA14_07630 | PA14_07630 | 1.60 | hypothetical protein |
| PA14_63840 | PA14_63840 | 1.60 | hypothetical protein |
| PA14_31450 | PA14_31450 | 1.60 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---------------------------------------|
| PA14_46890 | PA14_46890 | 1.60 | short-chain dehydrogenase |
| PA14_28580 | PA14_28580 | 1.60 | hypothetical protein |
| PA14_02435 | PA14_02435 | 1.60 | hypothetical protein |
| apbA | PA14_57160 | 1.60 | 2-dehydropantoate 2-reductase |
| PA14_39520 | PA14_39520 | 1.60 | hydroxylase large subunit |
| PA14_04520 | PA14_04520 | 1.59 | hypothetical protein |
| PA14_28530 | PA14_28530 | 1.59 | hypothetical protein |
| pctA | PA14_56000 | 1.59 | chemotactic transducer PctA |
| SPA0023 | #N/A | 1.59 | pARN |
| PA14_40520 | PA14_40520 | 1.59 | hypothetical protein |
| PA14sr_114 | #N/A | 1.59 | pARN |
| PA14_72890 | PA14_72890 | 1.59 | transcriptional regulator |
| PA14_26010 | PA14_26010 | 1.59 | acyl-CoA thiolase |
| PA14_26870 | PA14_26870 | 1.59 | hypothetical protein |
| PA14_23650 | PA14_23650 | 1.59 | short chain dehydrogenase |
| PA14sr_073 | #N/A | 1.59 | pARN |
| PA14_32450 | PA14_32450 | 1.59 | AraC family transcriptional regulator |
| PA14_44830 | PA14_44830 | 1.59 | hypothetical protein |
| rhlA | PA14_19100 | 1.59 | rhamnosyltransferase chain A |
| PA14_46320 | PA14_46320 | 1.59 | pyruvate carboxylase |
| PA14_30260 | PA14_30260 | 1.59 | arginyl-tRNA-protein transferase |
| PA14_00360 | PA14_00360 | 1.59 | hypothetical protein |
| PA14_68120 | PA14_68120 | 1.59 | outer membrane protein |
| PA14_31380 | PA14_31380 | 1.59 | sulfate transporter |
| PA14_35940 | PA14_35940 | 1.59 | acyl-CoA synthetase |
| PA14_58070 | PA14_58070 | 1.59 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_48560 | PA14_48560 | 1.59 | hypothetical protein |
| katE | PA14_36810 | 1.58 | hydroperoxidase II |
| PA14_54790 | PA14_54790 | 1.58 | hypothetical protein |
| PA14_50790 | PA14_50790 | 1.58 | hypothetical protein |
| leuB | PA14_23790 | 1.58 | 3-isopropylmalate dehydrogenase |
| PA14_35880 | PA14_35880 | 1.58 | gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase |
| PA14_27450 | PA14_27450 | 1.58 | hypothetical protein |
| PA14_66350 | PA14_66350 | 1.58 | acyl-CoA dehydrogenase |
| PA14_56470 | PA14_56470 | 1.58 | MFS transporter |
| PA14_01940 | PA14_01940 | 1.58 | RND efflux membrane fusion protein |
| PA14_26980 | PA14_26980 | 1.58 | hypothetical protein |
| PA14_72870 | PA14_72870 | 1.58 | aminotransferase |
| PA14_49720 | PA14_49720 | 1.58 | hypothetical protein |
| tnpS | PA14_35820 | 1.58 | cointegrate resolution protein S |
| sdaA | PA14_33030 | 1.58 | L-serine dehydratase |
| atoB | PA14_38630 | 1.58 | acetyl-CoA acetyltransferase |
| PA14_59840 | PA14_59840 | 1.58 | hypothetical protein |
| dkgB | PA14_09980 | 1.58 | 2,5-diketo-D-gluconate reductase B |
| mtlZ | PA14_34340 | 1.58 | fructokinase |
| narX | PA14_13740 | 1.58 | two-component sensor NarX |
| PA14_72350 | PA14_72350 | 1.57 | hypothetical protein |
| acnA | PA14_44290 | 1.57 | aconitate hydratase |
| PA14_71390 | PA14_71390 | 1.57 | hypothetical protein |
| PA14_56510 | PA14_56510 | 1.57 | hypothetical protein |
| PA14_42180 | PA14_42180 | 1.57 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_50900 | PA14_50900 | 1.57 | hypothetical protein |
| PA14_28260 | PA14_28260 | 1.57 | hypothetical protein |
| SPA0171 | #N/A | 1.57 | pARN |
| PA14_18050 | PA14_18050 | 1.57 | hypothetical protein |
| PA14_45870 | PA14_45870 | 1.57 | two-component sensor |
| SPA0100 | #N/A | 1.57 | pARN |
| PA14_03780 | PA14_03780 | 1.57 | transcriptional regulator |
| lapC | PA14_55410 | 1.57 | LapC |
| SPA0162 | #N/A | 1.57 | pARN |
| PA14_01380 | PA14_01380 | 1.57 | protoheme IX farnesyltransferase |
| PA14_45450 | PA14_45450 | 1.57 | hypothetical protein |
| PA14_23690 | PA14_23690 | 1.57 | secreted protein |
| ptxR | PA14_35380 | 1.57 | transcriptional regulator PtxR |
| PA14_38395 | PA14_38395 | 1.57 | periplasmic multidrug efflux lipoprotein |
| PA14_67340 | PA14_67340 | 1.57 | cytosine/purines uracil thiamine allantoin permease |
| PA14_18720 | PA14_18720 | 1.56 | OmpA family membrane protein |
| PA14_60970 | PA14_60970 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_51160 | PA14_51160 | 1.56 | hypothetical protein |
| leuD | PA14_23760 | 1.56 | isopropylmalate isomerase small subunit |
| plcN | PA14_21110 | 1.56 | non-hemolytic phospholipase C |
| PA14_71680 | PA14_71680 | 1.56 | GntR family transcriptional regulator |
| PA14_70120 | PA14_70120 | 1.56 | MFS transporter |
| PA14_18860 | PA14_18860 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_70330 | PA14_70330 | 1.56 | oxidoreductase |
| PA14_11600 | PA14_11600 | 1.56 | ABC transporter |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_20000 | PA14_20000 | 1.56 | transmembrane sensor |
| lasi | PA14_45940 | 1.56 | autoinducer synthesis protein Lasl |
| PA14_38340 | PA14_38340 | 1.56 | ring-cleaving dioxygenase |
| тисВ | PA14_54410 | 1.56 | negative regulator for alginate biosynthesis MucB |
| PA14_61910 | PA14_61910 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_60790 | PA14_60790 | 1.56 | ABC transporter ATP-binding protein |
| PA14_40440 | PA14_40440 | 1.56 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_44190 | PA14_44190 | 1.56 | sugar MFS transporter |
| gcvP2 | PA14_33000 | 1.56 | glycine dehydrogenase |
| PA14_10330 | PA14_10330 | 1.56 | outer membrane protein |
| PA14_14960 | PA14_14960 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_11890 | PA14_11890 | 1.56 | hypothetical protein |
| exaA | PA14_38860 | 1.56 | quinoprotein alcohol dehydrogenase |
| PA14_10820 | PA14_10820 | 1.56 | HDIG domain-containing protein |
| PA14_56800 | PA14_56800 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_31840 | PA14_31840 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_24570 | PA14_24570 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14sr_150 | #N/A | 1.56 | pARN |
| PA14_66850 | PA14_66850 | 1.56 | TetR family transcriptional regulator |
| PA14_52500 | PA14_52500 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_41440 | PA14_41440 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_37570 | PA14_37570 | 1.56 | ring-hydroxylating dioxygenase, large terminal subunit |
| PA14_14280 | PA14_14280 | 1.55 | LysR family transcriptional regulator |
| hemD | PA14_69440 | 1.55 | uroporphyrinogen-III synthase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_29280 | PA14_29280 | 1.55 | thioredoxin |
| PA14_51080 | PA14_51080 | 1.55 | dioxygenase |
| PA14_56530 | PA14_56530 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_58820 | PA14_58820 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_35460 | PA14_35460 | 1.55 | AGCS sodium/alanine/glycine symporter |
| psIE | PA14_35690 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_49870 | PA14_49870 | 1.55 | peptide deformylase |
| PA14_10640 | PA14_10640 | 1.55 | hypothetical protein |
| phnJ | PA14_20390 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_15150 | PA14_15150 | 1.55 | transcriptional regulator |
| PA14_05775 | PA14_05775 | 1.55 | hypothetical protein |
| nirD | PA14_41540 | 1.55 | assimilatory nitrite reductase small subunit |
| PA14_44840 | PA14_44840 | 1.55 | hypothetical protein |
| amaB | PA14_05810 | 1.55 | allantoate amidohydrolase |
| PA14_31300 | PA14_31300 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_46610 | PA14_46610 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_71410 | PA14_71410 | 1.55 | ring hydroxylating dioxygenase, alpha- subunit |
| PA14_06890 | PA14_06890 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_69770 | PA14_69770 | 1.55 | hypothetical protein |
| PA14_48680 | PA14_48680 | 1.54 | hypothetical protein |
| PA14_32950 | PA14_32950 | 1.54 | hypothetical protein |
| PA14_16660 | PA14_16660 | 1.54 | metal-transporting P-type ATPase |
| PA14_34370 | PA14_34370 | 1.54 | ABC maltose/mannitol transporter ATP- binding protein |
| PA14_63280 | PA14_63280 | 1.54 | transcriptional regulator |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_68780 | PA14_68780 | 1.54 | phosphate transporter |
| SPA0093 | #N/A | 1.54 | pARN |
| PA14_49330 | PA14_49330 | 1.54 | hypothetical protein |
| PA14_59180 | PA14_59180 | 1.54 | topoisomerase I - like protein |
| PA14_38640 | PA14_38640 | 1.54 | CoA transferase subunit B |
| fdnG | PA14_63605 | 1.54 | formate dehydrogenase-O, major subunit |
| PA14_50930 | PA14_50930 | 1.54 | hypothetical protein |
| SPA0110 | #N/A | 1.54 | pARN |
| PA14_11880 | PA14_11880 | 1.54 | hypothetical protein |
| PA14_08600 | PA14_08600 | 1.54 | 23S ribosomal RNA |
| SPA0139 | #N/A | 1.53 | pARN |
| PA14_10300 | PA14_10300 | 1.53 | efflux protein |
| PA14_09740 | PA14_09740 | 1.53 | MFS transporter |
| PA14_60540 | PA14_60540 | 1.53 | hypothetical protein |
| PA14_44420 | PA14_44420 | 1.53 | ferredoxin |
| PA14_29470 | PA14_29470 | 1.53 | hypothetical protein |
| SPA0016 | #N/A | 1.53 | pARN |
| clpB | PA14_60190 | 1.53 | clpB protein |
| PA14_31400 | PA14_31400 | 1.53 | chemotaxis transducer |
| SPA0128 | #N/A | 1.53 | pARN |
| PA14_49580 | PA14_49580 | 1.53 | iron-containing alcohol dehydrogenase |
| pvcC | PA14_35400 | 1.53 | pyoverdine biosynthesis protein PvcC |
| PA14_59530 | PA14_59530 | 1.53 | hypothetical protein |
| PA14_39020 | PA14_39020 | 1.53 | hypothetical protein |
| PA14_48530 | PA14_48530 | 1.53 | AMP-binding protein |
| PA14_11130 | PA14_11130 | 1.53 | short chain dehydrogenase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_38970 | PA14_38970 | 1.53 | two-component sensor |
| PA14_13630 | PA14_13630 | 1.53 | hypothetical protein |
| PA14_37640 | PA14_37640 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14_72250 | PA14_72250 | 1.52 | metalloprotease |
| PA14_06970 | PA14_06970 | 1.52 | Cro/CI family transcriptional regulator |
| PA14_52940 | PA14_52940 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14sr_001 | #N/A | 1.52 | pARN |
| PA14_21940 | PA14_21940 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14_47520 | PA14_47520 | 1.52 | transcriptional regulator |
| PA14_47120 | PA14_47120 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14_54070 | PA14_54070 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14_71160 | PA14_71160 | 1.52 | hypothetical protein |
| pelE | PA14_24530 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14_45210 | PA14_45210 | 1.52 | hypothetical protein |
| algR | PA14_69470 | 1.52 | alginate biosynthesis regulatory protein AlgR |
| PA14_45430 | PA14_45430 | 1.52 | short chain dehydrogenase |
| PA14_65810 | PA14_65810 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14_06260 | PA14_06260 | 1.52 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_69600 | PA14_69600 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14sr_055 | #N/A | 1.52 | pARN |
| PA14_07200 | PA14_07200 | 1.52 | hypothetical protein |
| сро | PA14_29020 | 1.52 | chloroperoxidase |
| PA14_44430 | PA14_44430 | 1.52 | hypothetical protein |
| PA14_32710 | PA14_32710 | 1.52 | ECF subfamily RNA polymerase sigma-70 factor |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_22470 | PA14_22470 | 1.52 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_61350 | PA14_61350 | 1.51 | hypothetical protein |
| PA14_52840 | PA14_52840 | 1.51 | C4-dicarboxylate-binding periplasmic protein |
| merE | PA14_15445 | 1.51 | mercury resistance protein |
| PA14sr_015 | #N/A | 1.51 | pARN |
| PA14_54090 | PA14_54090 | 1.51 | hypothetical protein |
| PA14_46380 | PA14_46380 | 1.51 | hypothetical protein |
| eutB | PA14_11770 | 1.51 | ethanolamine ammonia-lyase large subunit |
| PA14_27740 | PA14_27740 | 1.51 | hypothetical protein |
| merA | PA14_15460 | 1.51 | mercuric reductase |
| PA14_05860 | PA14_05860 | 1.51 | hypothetical protein |
| PA14_27280 | PA14_27280 | 1.51 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_12450 | PA14_12450 | 1.51 | acyl-CoA dehydrogenase |
| PA14_13220 | PA14_13220 | 1.51 | protein-tyrosine-phosphatase |
| PA14_27510 | PA14_27510 | 1.51 | methionine sulfoxide reductase B |
| PA14_39420 | PA14_39420 | 1.51 | hypothetical protein |
| glyA1 | PA14_71460 | 1.51 | serine hydroxymethyltransferase |
| PA14_06160 | PA14_06160 | 1.51 | hydroxamate-type ferrisiderophore receptor |
| lipC | PA14_63620 | 1.51 | lipase LipC |
| RsmZ | #N/A | 1.51 | pARN |
| moaA2 | PA14_44970 | 1.51 | molybdenum cofactor biosynthesis protein A |
| PA14_06390 | PA14_06390 | 1.51 | hypothetical protein |
| PA14_43610 | PA14_43610 | 1.51 | AMP-binding protein |
| PA14_13490 | PA14_13490 | 1.51 | hypothetical protein |
| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_23700 | PA14_23700 | 1.50 | LysR family transcriptional regulator |
| PA14_48490 | PA14_48490 | 1.50 | peptidylarginine deiminase |
| alg8 | PA14_18565 | 1.50 | alginate biosynthesis protein Alg8 |
| P5 | #N/A | 1.50 | pARN |
| pncA | PA14_64950 | 1.50 | hypothetical protein |
| PA14_54730 | PA14_54730 | 1.50 | hypothetical protein |
| plcB | PA14_00300 | 1.50 | phospholipase C, PlcB |
| PA14_48140 | PA14_48140 | 1.50 | hypothetical protein |
| PA14_71170 | PA14_71170 | 1.50 | AraC family transcriptional regulator |
| PA14_30500 | PA14_30500 | 1.50 | acyl-CoA dehydrogenase |
| PA14_53780 | PA14_53780 | 1.50 | MFS family transporter |
| PA14_30580 | PA14_30580 | 1.50 | LuxR family transcriptional regulator |
| cupB3 | PA14_11080 | 1.50 | usher CupB3 |
| SPA0098 | #N/A | 1.50 | pARN |
| SPA0112 | #N/A | 1.50 | pARN |
| PA14_37730 | PA14_37730 | 1.50 | TonB dependent receptor |
| PA14_38020 | PA14_38020 | 1.50 | antibiotic biosynthesis monooxygenase |
| PA14_33910 | PA14_33910 | 1.50 | hypothetical protein |
| ubiA | PA14_70730 | 1.50 | 4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase |
| PA14_39410 | PA14_39410 | 1.50 | hypothetical protein |
| SPA0028 | #N/A | 1.50 | pARN |
| PA14_39570 | PA14_39570 | 1.50 | hypothetical protein |
| PA14_57460 | PA14_57460 | -1.50 | cell division protein MraZ |
| PA14_25430 | PA14_25430 | -1.50 | hypothetical protein |
| rpml | PA14_28670 | -1.50 | 50S ribosomal protein L35 |
| PA14_67750 | PA14_67750 | -1.50 | rhodanese-like domain-containing protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| slyD | PA14_53430 | -1.50 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD |
| PA14_36260 | PA14_36260 | -1.50 | signal transduction protein |
| orfK | PA14_23370 | -1.50 | UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase |
| PA14_41590 | PA14_41590 | -1.51 | cytoplasmic membrane protein |
| PA14_62890 | PA14_62890 | -1.51 | hypothetical protein |
| PA14_60350 | PA14_60350 | -1.51 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkbP- type |
| PA14_65260 | PA14_65260 | -1.51 | hypothetical protein |
| PA14sr_096 | #N/A | -1.51 | pARN |
| pqsB | PA14_51420 | -1.52 | PqsB |
| PA14_64180 | PA14_64180 | -1.52 | hypothetical protein |
| PA14_61820 | PA14_61820 | -1.52 | GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD |
| асрР | PA14_25670 | -1.52 | acyl carrier protein |
| pqsE | PA14_51380 | -1.53 | quinolone signal response protein |
| PA14sr_017 | #N/A | -1.53 | pARN |
| rpsN | PA14_08980 | -1.53 | 30S ribosomal protein S14 |
| glyA | PA14_60890 | -1.53 | serine hydroxymethyltransferase |
| PA14_59550 | PA14_59550 | -1.53 | hypothetical protein |
| рра | PA14_11690 | -1.54 | inorganic pyrophosphatase |
| carA | PA14_62930 | -1.54 | carbamoyl phosphate synthase small subunit |
| PA14_57880 | PA14_57880 | -1.54 | ABC transporter ATP-binding protein |
| dut | PA14_70260 | -1.54 | deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase |
| hflK | PA14_65280 | -1.54 | protease subunit HflK |
| PA14_07470 | PA14_07470 | -1.54 | tRNA-Met |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| hisC2 | PA14_23290 | -1.55 | histidinol-phosphate aminotransferase |
| PA14_28740 | PA14_28740 | -1.55 | tRNA-Pro |
| tig | PA14_41250 | -1.55 | trigger factor |
| PA14_30420 | PA14_30420 | -1.55 | tRNA-Ser |
| tolR | PA14_51740 | -1.56 | TolR protein |
| tauD | PA14_12970 | -1.56 | taurine dioxygenase |
| rpmJ_1 | #N/A | -1.56 | pARN |
| PA14_52330 | PA14_52330 | -1.56 | hypothetical protein |
| PA14_39870 | PA14_39870 | -1.57 | hydrolase |
| PA14_39460 | PA14_39460 | -1.57 | hypothetical protein |
| PA14_39480 | PA14_39480 | -1.57 | hypothetical protein |
| PA14_64000 | PA14_64000 | -1.57 | translation initiation factor Sui1 |
| oprL | PA14_51710 | -1.57 | peptidoglycan associated lipoprotein OprL precursor |
| atpl | PA14_73320 | -1.57 | F0F1 ATP synthase subunit I |
| sRNA2626 | #N/A | -1.57 | pARN |
| SPA0089 | #N/A | -1.57 | pARN |
| large_SRP | #N/A | -1.57 | pARN |
| pbpA | PA14_12060 | -1.58 | penicillin-binding protein 2 |
| PA14_51680 | PA14_51680 | -1.58 | radical activating enzyme |
| serA | PA14_04110 | -1.58 | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase |
| tolQ | PA14_51750 | -1.58 | TolQ protein |
| ybtQ | PA14_54980 | -1.58 | ABC-type transporter protein ybtQ |
| rpe | PA14_07910 | -1.58 | ribulose-phosphate 3-epimerase |
| infB | PA14_62760 | -1.58 | translation initiation factor IF-2 |
| recR | PA14_44610 | -1.59 | recombination protein RecR |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| mnmA | PA14_30150 | -1.59 | tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA |
| PA14_54840 | PA14_54840 | -1.59 | tRNA-Gly |
| PA14_25140 | PA14_25140 | -1.59 | hypothetical protein |
| PA14_57560 | PA14_57560 | -1.59 | cytochrome b |
| gyrB | PA14_00050 | -1.59 | DNA gyrase subunit B |
| PA14sr_027 | #N/A | -1.59 | pARN |
| fabB | PA14_43690 | -1.59 | 3-oxoacyl-ACP synthase |
| lpxC | PA14_57260 | -1.59 | UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N- acetylglucosamine deacetylase |
| PA14_28380 | PA14_28380 | -1.60 | hypothetical protein |
| PA14_24700 | PA14_24700 | -1.60 | hypothetical protein |
| техВ | PA14_05540 | -1.60 | RND multidrug efflux transporter MexB |
| PA14_44090 | PA14_44090 | -1.60 | Fe-S-cluster oxidoreductase |
| accA | PA14_17270 | -1.60 | acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha |
| groEL | PA14_57010 | -1.61 | chaperonin GroEL |
| thrH | PA14_41830 | -1.61 | phosphoserine phosphatase |
| grx | PA14_67740 | -1.61 | glutaredoxin |
| SPA0044 | #N/A | -1.62 | pARN |
| PA14_54960 | PA14_54960 | -1.62 | hypothetical protein |
| sRNA2315 | #N/A | -1.62 | pARN |
| SPA0076f | #N/A | -1.62 | pARN |
| P3 | #N/A | -1.62 | pARN |
| PA14_63300 | PA14_63300 | -1.62 | hypothetical protein |
| PA14_52010 | PA14_52010 | -1.62 | DNA replication initiation factor |
| PA14_61830 | PA14_61830 | -1.62 | tRNA-Met |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_60570 | PA14_60570 | -1.63 | hypothetical protein |
| PA14_28390 | PA14_28390 | -1.63 | hypothetical protein |
| PA14_67050 | PA14_67050 | -1.63 | ABC transporter substrate-binding protein |
| PA14_47490 | PA14_47490 | -1.63 | hypothetical protein |
| PA14_12990 | PA14_12990 | -1.63 | choline transporter |
| PA14_25490 | PA14_25490 | -1.63 | tolQ-type transport protein |
| guaA | PA14_15340 | -1.63 | GMP synthase |
| wbpM | PA14_23470 | -1.63 | nucleotide sugar epimerase/dehydratase WbpM |
| PA14_69250 | PA14_69250 | -1.63 | hypothetical protein |
| rplT | PA14_28680 | -1.63 | 50S ribosomal protein L20 |
| sucD | PA14_43940 | -1.63 | succinyl-CoA synthetase subunit alpha |
| fabF1 | PA14_25690 | -1.64 | 3-oxoacyl-ACP synthase |
| secB | PA14_67720 | -1.64 | preprotein translocase subunit SecB |
| PA14_44390 | PA14_44390 | -1.65 | cytochrome c oxidase subunit |
| queA | PA14_14590 | -1.65 | S-adenosylmethioninetRNA ribosyltransferase-isomerase |
| PA14_32820 | PA14_32820 | -1.65 | hypothetical protein |
| tgt | PA14_14600 | -1.65 | queuine tRNA-ribosyltransferase |
| PA14_31150 | PA14_31150 | -1.65 | hypothetical protein |
| SPA0090 | #N/A | -1.66 | pARN |
| phnA | PA14_51360 | -1.66 | anthranilate synthase component I |
| lpxA | PA14_17210 | -1.66 | UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase |
| lysS | PA14_16530 | -1.66 | lysyl-tRNA synthetase |
| arsC | PA14_35100 | -1.66 | arsenate reductase |
| суоА | PA14_47210 | -1.67 | cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| P31 | #N/A | -1.67 | pARN |
| PA14_21800 | PA14_21800 | -1.67 | tRNA-Val |
| PA14sr_012 | #N/A | -1.67 | pARN |
| PA14_14680 | PA14_14680 | -1.67 | extragenic suppressor protein SuhB |
| PA14_28400 | PA14_28400 | -1.67 | outer membrane OprD family porin |
| PA14_19570 | PA14_19570 | -1.67 | ABC transporter permease |
| rpmE2 | PA14_17700 | -1.67 | 50S ribosomal protein L31 |
| purH | PA14_64200 | -1.68 | bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase |
| truB | PA14_62730 | -1.68 | tRNA pseudouridine synthase B |
| 4.5S_RNA | #N/A | -1.68 | pARN |
| PA14_59400 | PA14_59400 | -1.68 | hypothetical protein |
| rpsO | PA14_62720 | -1.69 | 30S ribosomal protein S15 |
| PA14_67840 | PA14_67840 | -1.69 | ABC-type amino acid transporter |
| PA14_72630 | PA14_72630 | -1.69 | ABC transporter permease |
| PA14sr_134 | #N/A | -1.69 | pARN |
| PA14_47370 | PA14_47370 | -1.69 | signal peptidase |
| maeB | PA14_66680 | -1.69 | malic enzyme |
| SPA0015 | #N/A | -1.69 | pARN |
| PA14_54830 | PA14_54830 | -1.69 | transferase |
| суоВ | PA14_47190 | -1.70 | cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I |
| rpsL | PA14_08790 | -1.70 | 30S ribosomal protein S12 |
| PA14_44400 | PA14_44400 | -1.70 | cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit III |
| braB | PA14_43920 | -1.70 | branched chain amino acid transporter |
| nusA | PA14 62770 | -1.70 | transcription elongation factor NusA |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| glmR | PA14_73190 | -1.70 | GlmR transcriptional regulator |
| PA14_08690 | PA14_08690 | -1.70 | tRNA-Trp |
| SPA0102 | #N/A | -1.71 | pARN |
| PA14_44380 | PA14_44380 | -1.71 | cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II |
| 72_101 | #N/A | -1.71 | pARN |
| PA14_51300 | PA14_51300 | -1.71 | hypothetical protein |
| PA14_24870 | PA14_24870 | -1.71 | tRNA-Pro |
| pckA | PA14_68580 | -1.72 | phosphoenolpyruvate carboxykinase |
| t44 | #N/A | -1.72 | pARN |
| PA14_68030 | PA14_68030 | -1.72 | tRNA-Phe |
| PA14_17250 | PA14_17250 | -1.72 | amino acid permease |
| aroQ1 | PA14_64090 | -1.73 | 3-dehydroquinate dehydratase |
| orfH | PA14_23380 | -1.73 | UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronate dehydrogenase |
| PA14_62360 | PA14_62360 | -1.73 | Rieske family iron-sulfur cluster-binding protein |
| retS | PA14_64230 | -1.73 | RetS (regulator of exopolysaccharide and Type III secretion) |
| PA14_08090 | PA14_08090 | -1.73 | phage tail tube protein |
| PA14_62440 | PA14_62440 | -1.73 | transporter |
| ІрхВ | PA14_17220 | -1.73 | lipid-A-disaccharide synthase |
| fdxA | PA14_17490 | -1.74 | ferredoxin I |
| uppS | PA14_17110 | -1.74 | UDP pyrophosphate synthetase |
| pqsD | PA14_51390 | -1.74 | 3-oxoacyl-ACP synthase |
| P2 | #N/A | -1.74 | pARN |
| dsbB2 | PA14_69400 | -1.75 | DsbB2 |
| PA14sr_016 | #N/A | -1.75 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| nqrD | PA14_25330 | -1.75 | Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit D |
| PA14_67040 | PA14_67040 | -1.75 | ABC transporter permease |
| PA14_61080 | PA14_61080 | -1.75 | c4-dicarboxylate-binding protein |
| comL | PA14_60230 | -1.75 | competence protein ComL |
| dksA | PA14_62490 | -1.75 | suppressor protein DksA |
| PA14_60110 | PA14_60110 | -1.75 | hypothetical protein |
| PA14_67860 | PA14_67860 | -1.76 | ABC-type amino acid transporter |
| mreB | PA14_58150 | -1.76 | rod shape-determining protein MreB |
| PA14_28750 | PA14_28750 | -1.76 | hypothetical protein |
| PA14_42670 | PA14_42670 | -1.76 | hypothetical protein |
| SPA0041 | #N/A | -1.76 | pARN |
| PA14_20290 | PA14_20290 | -1.76 | DNA binding-protein |
| PA14sr_037 | #N/A | -1.77 | pARN |
| ispD | PA14_17340 | -1.77 | 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase |
| PA14_52560 | PA14_52560 | -1.77 | tRNA-Ser |
| PA14_60090 | PA14_60090 | -1.77 | hypothetical protein |
| PA14_24120 | PA14_24120 | -1.77 | tRNA-Asp |
| msbA | PA14_66080 | -1.77 | transport protein MsbA |
| PA14_42220 | PA14_42220 | -1.78 | membrane sensor domain-containing protein |
| PA14sr_155 | #N/A | -1.78 | pARN |
| PA14_23490 | PA14_23490 | -1.78 | tRNA-Asn |
| PA14_16710 | PA14_16710 | -1.78 | hypothetical protein |
| PA14_06430 | PA14_06430 | -1.79 | hypothetical protein |
| atpB | PA14_73310 | -1.79 | F0F1 ATP synthase subunit A |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| cobA | PA14_41563 | -1.79 | uroporphyrin-III C-methyltransferase |
| PA14_17410 | PA14_17410 | -1.79 | esterase |
| rho | PA14_69190 | -1.79 | transcription termination factor Rho |
| PA14_63820 | PA14_63820 | -1.79 | hypothetical protein |
| PA14_25600 | PA14_25600 | -1.79 | peptidase |
| PA14_66420 | PA14_66420 | -1.79 | hypothetical protein |
| PA14_21810 | PA14_21810 | -1.79 | tRNA-Asp |
| PA14_27190 | PA14_27190 | -1.80 | tRNA-Ser |
| PA14_13950 | PA14_13950 | -1.80 | hypothetical protein |
| aspA | PA14_71650 | -1.81 | aspartate ammonia-lyase |
| PA14_52540 | PA14_52540 | -1.81 | tRNA-Arg |
| PA14_22260 | PA14_22260 | -1.81 | hypothetical protein |
| thil | PA14_67580 | -1.81 | thiamine biosynthesis protein Thil |
| nqrE | PA14_25340 | -1.81 | Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit E |
| aroP1 | PA14_25270 | -1.81 | aromatic amino acid transport protein AroP1 |
| mreC | PA14_58130 | -1.81 | rod shape-determining protein MreC |
| nusG | PA14_08710 | -1.81 | transcription antitermination protein NusG |
| PA14_08250 | PA14_08250 | -1.81 | hypothetical protein |
| PA14_24130 | PA14_24130 | -1.81 | tRNA-Asp |
| nuoM | PA14_29860 | -1.81 | NADH dehydrogenase subunit M |
| rpsB | PA14_17060 | -1.82 | 30S ribosomal protein S2 |
| rpsJ | PA14_08840 | -1.82 | 30S ribosomal protein S10 |
| fabl | PA14_41170 | -1.83 | NADH-dependent enoyl-ACP reductase |
| lysP | PA14_61250 | -1.83 | APC family lysine-specific permease |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| ppiC2 | PA14_09890 | -1.83 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C2 |
| PA14_58720 | PA14_58720 | -1.83 | hypothetical protein |
| PA14_68620 | PA14_68620 | -1.84 | hypothetical protein |
| PA14_55030 | PA14_55030 | -1.84 | ABC transporter permease |
| PA14_59970 | PA14_59970 | -1.84 | hypothetical protein |
| PA14_44370 | PA14_44370 | -1.84 | cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I |
| yajC | PA14_14610 | -1.84 | preprotein translocase subunit YajC |
| PA14_62780 | PA14_62780 | -1.84 | hypothetical protein |
| суоС | PA14_47180 | -1.84 | cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III |
| purE | PA14_71620 | -1.84 | phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit |
| rpsA | PA14_23330 | -1.85 | 30S ribosomal protein S1 |
| orfE | PA14_23390 | -1.85 | polysaccharide biosynthesis protein |
| PA14_15940 | PA14_15940 | -1.85 | hypothetical protein |
| PA14_61780 | PA14_61780 | -1.86 | 50S ribosomal protein L25 |
| pth | PA14_61790 | -1.86 | peptidyl-tRNA hydrolase |
| PA14_27630 | PA14_27630 | -1.86 | protein associated with synthesis and assembly of refractile inclusion bodies |
| adhC | PA14_17400 | -1.86 | alcohol dehydrogenase |
| dnpA | PA14_66140 | -1.86 | de-N-acetylase involved in persistence, DnpA |
| PA14_24110 | PA14_24110 | -1.87 | tRNA-Val |
| PA14_36250 | PA14_36250 | -1.87 | hypothetical protein |
| metN | PA14_72620 | -1.87 | DL-methionine transporter ATP-binding subunit |
| glyQ | PA14_00100 | -1.87 | glycyl-tRNA synthetase subunit alpha |
| morA | PA14_60870 | -1.87 | motility regulator |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---------------------------------------|
| rpsM | PA14_09080 | -1.87 | 30S ribosomal protein S13 |
| cdsA | PA14_17120 | -1.87 | phosphatidate cytidylyltransferase |
| PA14_35080 | PA14_35080 | -1.87 | arsenical resistance protein |
| PA14_37250 | PA14_37250 | -1.87 | major facilitator transporter |
| mqoA | PA14_19470 | -1.88 | malate:quinone oxidoreductase |
| metK | PA14_07090 | -1.89 | S-adenosylmethionine synthetase |
| secE | PA14_08695 | -1.89 | preprotein translocase subunit SecE |
| dtd | PA14_60100 | -1.89 | deoxycytidine triphosphate deaminase |
| rpmA | PA14_60450 | -1.89 | 50S ribosomal protein L27 |
| rpsl | PA14_57580 | -1.90 | 30S ribosomal protein S9 |
| typA | PA14_67560 | -1.90 | ТурА |
| rnpA | PA14_73420 | -1.90 | ribonuclease P |
| tsf | PA14_17070 | -1.90 | elongation factor Ts |
| PA14_57650 | PA14_57650 | -1.90 | hypothetical protein |
| toxA | PA14_49560 | -1.90 | exotoxin A |
| atpC | PA14_73230 | -1.90 | F0F1 ATP synthase subunit epsilon |
| PA14_52130 | PA14_52130 | -1.90 | hypothetical protein |
| PA14_28820 | PA14_28820 | -1.91 | hypothetical protein |
| rplQ | PA14_09130 | -1.92 | 50S ribosomal protein L17 |
| atpE | PA14_73300 | -1.92 | F0F1 ATP synthase subunit C |
| PA14_28830 | PA14_28830 | -1.92 | hypothetical protein |
| PA14_25900 | PA14_25900 | -1.92 | trans-2-enoyl-CoA reductase |
| PA14_58710 | PA14_58710 | -1.94 | tRNA-Thr |
| PA14_72640 | PA14_72640 | -1.95 | TonB-dependent receptor |
| ppiD | PA14_41190 | -1.95 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D |
| P26 | #N/A | -1.96 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| rplE | PA14_08970 | -1.96 | 50S ribosomal protein L5 |
| efp | PA14_27210 | -1.96 | elongation factor P |
| PA14_62880 | PA14_62880 | -1.97 | hypothetical protein |
| nalC | PA14_16280 | -1.97 | transcriptional regulator |
| PA14_54850 | PA14_54850 | -1.97 | hypothetical protein |
| PA14sr_102 | #N/A | -1.98 | pARN |
| PA14_51560 | PA14_51560 | -1.98 | acetyltransferase |
| rpsP | PA14_15970 | -1.98 | 30S ribosomal protein S16 |
| gltP | PA14_72340 | -1.98 | glutamate/aspartate:proton symporter |
| accC | PA14_64110 | -1.98 | acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit |
| PA14_67180 | PA14_67180 | -1.98 | hypothetical protein |
| orfM | PA14_23450 | -1.99 | NAD dependent epimerase/dehydratase |
| rplN | PA14_08950 | -1.99 | 50S ribosomal protein L14 |
| secY | PA14_09050 | -1.99 | preprotein translocase subunit SecY |
| PA14_41340 | PA14_41340 | -2.00 | tRNA-Arg |
| PA14_71750 | PA14_71750 | -2.00 | LysR family transcriptional regulator |
| pnp | PA14_62710 | -2.00 | polynucleotide phosphorylase |
| PA14_34520 | PA14_34520 | -2.00 | ABC transporter permease |
| PA14_61760 | PA14_61760 | -2.01 | tRNA-Gln |
| tufA | PA14_08830 | -2.01 | elongation factor Tu |
| PA14_41610 | PA14_41610 | -2.01 | hypothetical protein |
| SPA0042 | #N/A | -2.02 | pARN |
| PA14_07550 | PA14_07550 | -2.02 | hypothetical protein |
| rpmG | PA14_70180 | -2.02 | 50S ribosomal protein L33 |
| PA14_39470 | PA14_39470 | -2.03 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| PA14_55000 | PA14_55000 | -2.03 | ABC transporter periplasmic protein |
| bfrB | PA14_18670 | -2.04 | bacterioferritin |
| tufB | PA14_08680 | -2.05 | elongation factor Tu |
| rplU | PA14_60460 | -2.05 | 50S ribosomal protein L21 |
| PA14_27600 | PA14_27600 | -2.05 | tRNA-Glu |
| mreD | PA14_58120 | -2.06 | rod shape-determining protein MreD |
| fabD | PA14_25650 | -2.06 | malonyl-CoA-ACP transacylase |
| pctC | PA14_55960 | -2.06 | chemotactic transducer PctC |
| PA14_23400 | PA14_23400 | -2.06 | hypothetical protein |
| dsbA2 | PA14_59960 | -2.06 | DsbA2 |
| rplX | PA14_08960 | -2.08 | 50S ribosomal protein L24 |
| PA14_12360 | PA14_12360 | -2.08 | hypothetical protein |
| PA14_61260 | PA14_61260 | -2.09 | hypothetical protein |
| nosY | PA14_20170 | -2.09 | NosY protein |
| bacA | PA14_39190 | -2.09 | UDP pyrophosphate phosphatase |
| PA14_43910 | PA14_43910 | -2.09 | hypothetical protein |
| PA14_67850 | PA14_67850 | -2.10 | ABC-type amino acid transport protein, periplasmic component |
| PA14sr_077 | #N/A | -2.11 | pARN |
| PA14_52550 | PA14_52550 | -2.11 | tRNA-Arg |
| ribC | PA14_11410 | -2.12 | riboflavin synthase subunit alpha |
| rpmE | PA14_66710 | -2.12 | 50S ribosomal protein L31 |
| sdhD | PA14_44050 | -2.12 | succinate dehydrogenase (D subunit) |
| PA14_08580 | PA14_08580 | -2.12 | tRNA-lle |
| infA | PA14_30240 | -2.13 | translation initiation factor IF-1 |
| PA14_06420 | PA14_06420 | -2.13 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_23420 | PA14_23420 | -2.13 | zinc-binding dehydrogenase |
| pqsC | PA14_51410 | -2.14 | PqsC |
| PA14_08650 | PA14_08650 | -2.14 | tRNA-Tyr |
| ipk | PA14_61750 | -2.14 | 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase |
| rpmB | PA14_70190 | -2.14 | 50S ribosomal protein L28 |
| PA14_18660 | PA14_18660 | -2.14 | hypothetical protein |
| PA14_23570 | PA14_23570 | -2.14 | tRNA-Ala |
| fabA | PA14_43680 | -2.15 | 3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase |
| atpF | PA14_73290 | -2.15 | F0F1 ATP synthase subunit B |
| PA14_41330 | PA14_41330 | -2.15 | tRNA-His |
| prs | PA14_61770 | -2.16 | ribose-phosphate pyrophosphokinase |
| PA14_55770 | PA14_55770 | -2.17 | phosphate transporter |
| rplM | PA14_57590 | -2.17 | 50S ribosomal protein L13 |
| PA14_12550 | PA14_12550 | -2.18 | hypothetical protein |
| PA14_27610 | PA14_27610 | -2.18 | tRNA-Gly |
| 102_16 | #N/A | -2.19 | pARN |
| plsX | PA14_25640 | -2.19 | glycerol-3-phosphate acyltransferase PIsX |
| PA14_49740 | PA14_49740 | -2.20 | hypothetical protein |
| PA14_08590 | PA14_08590 | -2.20 | tRNA-Ala |
| PA14_70900 | PA14_70900 | -2.21 | tRNA-Ile |
| sucC | PA14_43950 | -2.21 | succinyl-CoA synthetase subunit beta |
| PA14_27620 | PA14_27620 | -2.22 | tRNA-Gly |
| PA14_36200 | PA14_36200 | -2.22 | ABC transporter substrate-binding protein |
| orfL | PA14_23440 | -2.24 | group 1 glycosyl transferase |
| PA14_62790 | PA14_62790 | -2.24 | tRNA-Met |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| rplC | PA14_08850 | -2.24 | 50S ribosomal protein L3 |
| PA14_55635 | PA14_55635 | -2.24 | tRNA-Ile |
| PA14_41650 | PA14_41650 | -2.24 | esterase |
| PA14_08660 | PA14_08660 | -2.25 | tRNA-Gly |
| rpoB | PA14_08760 | -2.25 | DNA-directed RNA polymerase subunit beta |
| PA14_62080 | PA14_62080 | -2.26 | tRNA-Ile |
| aroP2 | PA14_53050 | -2.26 | aromatic amino acid transport protein AroP2 |
| PA14_14560 | PA14_14560 | -2.27 | hypothetical protein |
| PA14_23430 | PA14_23430 | -2.28 | heparinase |
| rpsG | PA14_08810 | -2.28 | 30S ribosomal protein S7 |
| rimM | PA14_15980 | -2.29 | 16S rRNA-processing protein RimM |
| rpoA | PA14_09115 | -2.29 | DNA-directed RNA polymerase subunit alpha |
| secG | PA14_62810 | -2.29 | preprotein translocase subunit SecG |
| glpT | PA14_69130 | -2.30 | sn-glycerol-3-phosphate transporter |
| PA14_25620 | PA14_25620 | -2.30 | hypothetical protein |
| rplL | PA14_08750 | -2.30 | 50S ribosomal protein L7/L12 |
| orfN | PA14_23460 | -2.32 | group 4 glycosyl transferase |
| PA14_70890 | PA14_70890 | -2.32 | tRNA-Ala |
| rplK | PA14_08720 | -2.33 | 50S ribosomal protein L11 |
| PA14_65210 | PA14_65210 | -2.34 | tRNA-Leu |
| PA14_30680 | PA14_30680 | -2.35 | tRNA-Gly |
| atpA | PA14_73260 | -2.36 | F0F1 ATP synthase subunit alpha |
| PA14_08670 | PA14_08670 | -2.36 | tRNA-Thr |
| PA14_55634 | PA14_55634 | -2.36 | tRNA-Ala |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|---|
| PA14_62070 | PA14_62070 | -2.37 | tRNA-Ala |
| PA14_56180 | PA14_56180 | -2.37 | hypothetical protein |
| secF | PA14_14650 | -2.38 | preprotein translocase subunit SecF |
| PA14_65220 | PA14_65220 | -2.38 | tRNA-Leu |
| PA14_62800 | PA14_62800 | -2.39 | tRNA-Leu |
| atpH | PA14_73280 | -2.39 | F0F1 ATP synthase subunit delta |
| rpsC | PA14_08910 | -2.40 | 30S ribosomal protein S3 |
| orfJ | PA14_23410 | -2.40 | glycosyl transferase family protein |
| PA14_34510 | PA14_34510 | -2.40 | hypothetical protein |
| tpiA | PA14_62830 | -2.41 | triosephosphate isomerase |
| PA14_06880 | PA14_06880 | -2.41 | LysR family transcriptional regulator |
| rplV | PA14_08900 | -2.41 | 50S ribosomal protein L22 |
| SPA0106 | #N/A | -2.41 | pARN |
| rplA | PA14_08730 | -2.42 | 50S ribosomal protein L1 |
| atpG | PA14_73250 | -2.43 | F0F1 ATP synthase subunit gamma |
| PA14_09880 | PA14_09880 | -2.43 | hypothetical protein |
| rplB | PA14_08880 | -2.44 | 50S ribosomal protein L2 |
| rpsK | PA14_09090 | -2.44 | 30S ribosomal protein S11 |
| rpoC | PA14_08780 | -2.45 | DNA-directed RNA polymerase subunit beta' |
| PA14_73410 | PA14_73410 | -2.46 | inner membrane protein translocase component YidC |
| PA14_60180 | PA14_60180 | -2.48 | tRNA-Asn |
| PA14sr_057 | #N/A | -2.49 | pARN |
| PA14_54040 | PA14_54040 | -2.49 | amino acid permease |
| PA14_23580 | PA14_23580 | -2.50 | tRNA-Glu |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|--|
| rpli | PA14_65150 | -2.51 | 50S ribosomal protein L9 |
| trmD | PA14_15990 | -2.52 | tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase |
| rpsF | PA14_65180 | -2.54 | 30S ribosomal protein S6 |
| P27_1 | #N/A | -2.54 | pARN |
| rpsS | PA14_08890 | -2.54 | 30S ribosomal protein S19 |
| rpmF | PA14_25630 | -2.59 | 50S ribosomal protein L32 |
| rpsQ | PA14_08940 | -2.59 | 30S ribosomal protein S17 |
| PA14_60160 | PA14_60160 | -2.60 | tRNA-Pro |
| PA14_68150 | PA14_68150 | -2.61 | tRNA-Thr |
| atpD | PA14_73240 | -2.61 | F0F1 ATP synthase subunit beta |
| PA14_14570 | PA14_14570 | -2.62 | tRNA-Leu |
| secD | PA14_14630 | -2.62 | preprotein translocase subunit SecD |
| PA14_41320 | PA14_41320 | -2.63 | tRNA-Leu |
| PA14_60150 | PA14_60150 | -2.64 | tRNA-Lys |
| PA14_34490 | PA14_34490 | -2.65 | hypothetical protein |
| SPA0182 | #N/A | -2.65 | pARN |
| ассВ | PA14_64100 | -2.66 | acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit |
| PA14_51570 | PA14_51570 | -2.68 | hypothetical protein |
| PA14_10500 | PA14_10500 | -2.70 | cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I |
| PA14_17990 | PA14_17990 | -2.72 | hypothetical protein |
| сарВ | PA14_21760 | -2.73 | cold acclimation protein B |
| PA14_34500 | PA14_34500 | -2.73 | ABC transporter ATP-binding protein |
| rpsD | PA14_09100 | -2.75 | 30S ribosomal protein S4 |
| rpsR | PA14_65170 | -2.75 | 30S ribosomal protein S18 |
| PA14_36230 | PA14_36230 | -2.76 | amino acid ABC transporter permease |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|-------------|------------|----------------------|------------------------------------|
| PA14_20280 | PA14_20280 | -2.78 | hypothetical protein |
| rplO | PA14_09040 | -2.88 | 50S ribosomal protein L15 |
| fusA1 | PA14_08820 | -2.89 | elongation factor G |
| rpmD | PA14_09030 | -2.96 | 50S ribosomal protein L30 |
| PA14_65160 | PA14_65160 | -2.96 | hypothetical protein |
| rplJ | PA14_08740 | -2.97 | 50S ribosomal protein L10 |
| rplP | PA14_08920 | -3.00 | 50S ribosomal protein L16 |
| rplF | PA14_09000 | -3.01 | 50S ribosomal protein L6 |
| PA14_34460 | PA14_34460 | -3.04 | hypothetical protein |
| rpmC | PA14_08930 | -3.04 | 50S ribosomal protein L29 |
| glpK | PA14_17960 | -3.08 | glycerol kinase |
| rplR | PA14_09010 | -3.08 | 50S ribosomal protein L18 |
| rpsE | PA14_09020 | -3.08 | 30S ribosomal protein S5 |
| PA14_36220 | PA14_36220 | -3.10 | amino acid permease |
| PA14_64620 | PA14_64620 | -3.24 | oxidoreductase |
| PA14_27370 | PA14_27370 | -3.33 | ATP-dependent RNA helicase |
| rplD | PA14_08860 | -3.33 | 50S ribosomal protein L4 |
| rplW | PA14_08870 | -3.43 | 50S ribosomal protein L23 |
| PA14_03110 | PA14_03110 | -4.50 | hypothetical protein |
| glpD | PA14_17930 | -4.77 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase |
| | | | |
| | | | |

Table 11.5 Gènes affectés en bouillon seulement chez le double mutant *hptBgacA* VS WT

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|---|
| PA14_19490 | PA14_19490 | 4.08 | antioxidant protein |
| ssuD | PA14_19560 | 4.07 | alkanesulfonate monooxygenase |
| PA14_19530 | PA14_19530 | 4.06 | NAD(P)H-dependent FMN reductase |
| cysW | PA14_03670 | 3.72 | sulfate transport protein CysW |
| cysA | PA14_03650 | 3.68 | sulfate transport protein CysA |
| cysT | PA14_03680 | 3.62 | sulfate transport protein CysT |
| mdcA | PA14_02550 | 3.54 | malonate decarboxylase subunit alpha |
| PA14_12960 | PA14_12960 | 3.52 | taurine ABC transporter permease |
| glcD | PA14_70690 | 3.46 | glycolate oxidase subunit GlcD |
| PA14_62400 | PA14_62400 | 3.33 | aminotransferase |
| PA14_13010 | PA14_13010 | 3.18 | hypothetical protein |
| pscl | PA14_42280 | 3.17 | type III export protein Pscl |
| PA14_64260 | PA14_64260 | 3.16 | hypothetical protein |
| PA14_13000 | PA14_13000 | 2.95 | transcriptional regulator |
| PA14_70650 | PA14_70650 | 2.73 | GlcG protein |
| PA14_68440 | PA14_68440 | 2.73 | oxidoreductase |
| exsA | PA14_42390 | 2.57 | transcriptional regulator ExsA |
| PA14_67270 | PA14_67270 | 2.50 | ABC transporter ATP-binding protein |
| glcF | PA14_70670 | 2.38 | glycolate oxidase iron-sulfur subunit |
| PA14_12910 | PA14_12910 | 2.07 | hypothetical protein |
| PA14_02560 | PA14_02560 | 2.04 | triphosphoribosyl-dephospho-CoA synthase |
| PA14_67280 | PA14_67280 | 1.94 | ABC transporter permease |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|---|
| pilA | PA14_58730 | 1.83 | type IV pilin structural subunit |
| PA14_37200 | PA14_37200 | 1.72 | hypothetical protein |
| PA14_71720 | PA14_71720 | 1.71 | pyruvate carboxylase subunit B |
| dppD | PA14_58470 | 1.70 | dipeptide ABC transporter ATP-binding protein DppD |
| dadX | PA14_69990 | 1.69 | alanine racemase |
| PA14_18800 | PA14_18800 | 1.62 | hypothetical protein |
| oprB | PA14_23030 | 1.60 | glucose/carbohydrate outer membrane porin OprB precursor |
| gltD | PA14_66560 | 1.59 | glutamate synthase subunit beta |
| PA14_62060 | PA14_62060 | 1.52 | 23S ribosomal RNA |
| PA14_18690 | PA14_18690 | 1.52 | peroxidase |
| PA14_70880 | PA14_70880 | 1.51 | 23S ribosomal RNA |
| PA14_55631 | PA14_55631 | 1.51 | 23S ribosomal RNA |
| cioA | PA14_13030 | -1.50 | CioA, cyanide insensitive terminal oxidase |
| PA14_55820 | PA14_55820 | -1.50 | hypothetical protein |
| PA14_23630 | PA14_23630 | -1.50 | hypothetical protein |
| P9 | #N/A | -1.50 | pARN |
| PA14_18350 | PA14_18350 | -1.50 | bifunctional UDP-glucuronic acid decarboxylase/UDP-4-amino-4-deoxy-L- arabinose formyltransferase |
| smpB | PA14_63060 | -1.50 | SsrA-binding protein |
| prmA | PA14_64140 | -1.51 | 50S ribosomal protein L11 methyltransferase |
| SPA0038 | #N/A | -1.51 | pARN |
| PA14_20600 | PA14_20600 | -1.51 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|---|
| PA14_44930 | PA14_44930 | -1.51 | hypothetical protein |
| PA14_61460 | PA14_61460 | -1.51 | hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase |
| PA14_69820 | PA14_69820 | -1.51 | hypothetical protein |
| dcd | PA14_19090 | -1.51 | deoxycytidine triphosphate deaminase |
| mutM | PA14_04670 | -1.51 | formamidopyrimidine-DNA glycosylase |
| PA14_46700 | PA14_46700 | -1.51 | hypothetical protein |
| PA14_49280 | PA14_49280 | -1.51 | transglycosylase |
| kdgA | PA14_23620 | -1.51 | aldolase |
| PA14_11910 | PA14_11910 | -1.51 | hypothetical protein |
| PA14sr_036 | #N/A | -1.52 | pARN |
| PA14_21820 | PA14_21820 | -1.52 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FkbP-type |
| PA14_68570 | PA14_68570 | -1.52 | hypothetical protein |
| PA14_28240 | PA14_28240 | -1.52 | hypothetical protein |
| PA14_32905 | PA14_32905 | -1.52 | hypothetical protein |
| pruR | PA14_54190 | -1.52 | proline utilization regulator |
| rubA1 | PA14_70640 | -1.52 | rubredoxin 1 |
| nhaP | PA14_13620 | -1.53 | Na+/H+ antiporter NhaP |
| pchD | PA14_09240 | -1.53 | pyochelin biosynthesis protein PchD |
| PA14_69620 | PA14_69620 | -1.53 | hypothetical protein |
| PA14_56950 | PA14_56950 | -1.53 | two-component response regulator |
| PA14sr_111 | #N/A | -1.53 | pARN |
| PA14_04700 | PA14_04700 | -1.53 | hypothetical protein |
| PA14sr_063 | #N/A | -1.53 | pARN |
| PA14_14710 | PA14_14710 | -1.53 | Rrf2 family protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--|
| PA14_34640 | PA14_34640 | -1.53 | gluconokinase |
| PA14_24790 | PA14_24790 | -1.54 | outer membrane porin |
| PA14_71400 | PA14_71400 | -1.54 | hypothetical protein |
| PA14_64560 | PA14_64560 | -1.54 | hypothetical protein |
| PA14_50590 | PA14_50590 | -1.54 | HSP90 family protein |
| PA14_26080 | PA14_26080 | -1.54 | hypothetical protein |
| PA14sr_090 | #N/A | -1.54 | pARN |
| сстА | PA14_45380 | -1.55 | cytochrome c biogenesis protein CcmA |
| PA14_61550 | PA14_61550 | -1.55 | hypothetical protein |
| PA14_14540 | PA14_14540 | -1.55 | hypothetical protein |
| PA14_16150 | PA14_16150 | -1.55 | hypothetical protein |
| PA14_08020 | PA14_08020 | -1.55 | bacteriophage protein |
| PA14_22560 | PA14_22560 | -1.56 | permease |
| PA14_32370 | PA14_32370 | -1.56 | DNA damage-inducible gene |
| PA14sr_003 | #N/A | -1.56 | pARN |
| PA14_56260 | PA14_56260 | -1.56 | hypothetical protein |
| PA14_21030 | PA14_21030 | -1.56 | ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit |
| PA14_63100 | PA14_63100 | -1.56 | ferredoxin |
| PA14_56890 | PA14_56890 | -1.56 | multidrug efflux protein |
| PA14_66450 | PA14_66450 | -1.56 | hypothetical protein |
| opmD | PA14_09500 | -1.56 | outer membrane protein |
| cioB | PA14_13040 | -1.57 | CioB, cyanide insensitive terminal oxidase |
| folE | PA14_42850 | -1.57 | GTP cyclohydrolase I |
| PA14_48510 | PA14_48510 | -1.57 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--|
| minE | PA14_22010 | -1.57 | cell division topological specificity factor MinE |
| рсаН | PA14_01900 | -1.57 | protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit beta |
| fdhE | PA14_63550 | -1.57 | formate dehydrogenase accessory protein FdhE |
| PA14_53890 | PA14_53890 | -1.57 | hypothetical protein |
| PA14_64320 | PA14_64320 | -1.57 | hypothetical protein |
| PA14_09370 | PA14_09370 | -1.58 | hypothetical protein |
| PA14_53980 | PA14_53980 | -1.58 | hypothetical protein |
| PA14_02910 | PA14_02910 | -1.58 | IclR family transcriptional regulator |
| SPA0142 | #N/A | -1.58 | pARN |
| PA14sr_105 | #N/A | -1.59 | pARN |
| PA14_18370 | PA14_18370 | -1.59 | UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose oxoglutarate aminotransferase |
| PA14_13110 | PA14_13110 | -1.59 | long-chain-fatty-acidCoA ligase |
| PA14_55740 | PA14_55740 | -1.59 | transporter |
| PA14_07380 | PA14_07380 | -1.59 | hypothetical protein |
| PA14_21440 | PA14_21440 | -1.59 | HIT family protein |
| PA14_63430 | PA14_63430 | -1.59 | hypothetical protein |
| PA14_04370 | PA14_04370 | -1.60 | MFS transporter |
| P15 | #N/A | -1.60 | pARN |
| PA14_54760 | PA14_54760 | -1.60 | hypothetical protein |
| PA14_68480 | PA14_68480 | -1.60 | chorismate mutase |
| PA14_71110 | PA14_71110 | -1.60 | lipolytic protein |
| PA14_09350 | PA14_09350 | -1.60 | hypothetical protein |
| PA14sr_142 | #N/A | -1.60 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|---|
| PA14_32810 | PA14_32810 | -1.60 | hypothetical protein |
| PA14_52610 | PA14_52610 | -1.61 | hypothetical protein |
| PA14_28130 | PA14_28130 | -1.61 | hypothetical protein |
| PA14_55810 | PA14_55810 | -1.61 | two-component response regulator |
| omlA | PA14_63030 | -1.61 | outer membrane lipoprotein OmlA precursor |
| rnk | PA14_69630 | -1.61 | nucleoside diphosphate kinase regulator |
| PA14_11350 | PA14_11350 | -1.61 | hypothetical protein |
| PA14_58620 | PA14_58620 | -1.61 | hypothetical protein |
| PA14_11320 | PA14_11320 | -1.61 | hypothetical protein |
| PA14_07970 | PA14_07970 | -1.61 | hypothetical protein |
| PA14_33340 | PA14_33340 | -1.62 | helicase |
| PA14_22230 | PA14_22230 | -1.62 | hypothetical protein |
| PA14_31700 | PA14_31700 | -1.62 | CDP-alcohol phosphatidyltransferase |
| pchE | PA14_09270 | -1.62 | dihydroaeruginoic acid synthetase |
| PA14_43090 | PA14_43090 | -1.62 | hypothetical protein |
| PA14_01490 | PA14_01490 | -1.62 | hemolysin |
| PA14_03190 | PA14_03190 | -1.63 | hypothetical protein |
| PA14_63410 | PA14_63410 | -1.63 | hypothetical protein |
| PA14_08470 | PA14_08470 | -1.63 | hypothetical protein |
| snr1 | PA14_24860 | -1.64 | cytochrome c Snr1 |
| PA14_68110 | PA14_68110 | -1.64 | transcriptional regulator |
| PA14_68400 | PA14_68400 | -1.64 | LysM domain/BON superfamily protein |
| PA14_39790 | PA14_39790 | -1.64 | hypothetical protein |
| PA14_14310 | PA14_14310 | -1.64 | transcriptional regulator |
| PA14_38060 | PA14_38060 | -1.65 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--|
| PA14_43240 | PA14_43240 | -1.65 | hypothetical protein |
| PA14_33320 | PA14_33320 | -1.65 | hypothetical protein |
| PA14_68280 | PA14_68280 | -1.65 | dicarboxylate transporter |
| fdnl | PA14_63570 | -1.66 | nitrate-inducible formate dehydrogenase subunit gamma |
| PA14_13130 | PA14_13130 | -1.66 | hypothetical protein |
| PA14sr_118 | #N/A | -1.66 | pARN |
| PA14_16340 | PA14_16340 | -1.66 | hypothetical protein |
| PA14_28020 | PA14_28020 | -1.66 | hypothetical protein |
| PA14_40310 | PA14_40310 | -1.67 | acyl carrier protein |
| PA14sr_144 | #N/A | -1.67 | pARN |
| PA14_00490 | PA14_00490 | -1.68 | hemolysin activation/secretion protein |
| PA14_43230 | PA14_43230 | -1.68 | hypothetical protein |
| PA14_56880 | PA14_56880 | -1.68 | membrane fusion protein |
| PA14_00480 | PA14_00480 | -1.69 | hypothetical protein |
| cheW | PA14_02230 | -1.69 | purine-binding chemotaxis protein |
| PA14_69780 | PA14_69780 | -1.69 | hypothetical protein |
| phzA1 | PA14_09480 | -1.69 | phenazine biosynthesis protein |
| SPA0140 | #N/A | -1.69 | pARN |
| fur | PA14_63020 | -1.70 | ferric uptake regulation protein |
| PA14_50570 | PA14_50570 | -1.70 | hypothetical protein |
| PA14_24740 | PA14_24740 | -1.70 | hypothetical protein |
| PA14_26020 | PA14_26020 | -1.71 | aminopeptidase |
| PA14_61290 | PA14_61290 | -1.71 | lipoprotein |
| PA14_24760 | PA14_24760 | -1.71 | hypothetical protein |
| сусВ | PA14_69970 | -1.72 | cytochrome c5 |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|---|
| PA14_12170 | PA14_12170 | -1.72 | hypothetical protein |
| PA14_29410 | PA14_29410 | -1.72 | serine/threonine dehydratase |
| PA14_43650 | PA14_43650 | -1.73 | hypothetical protein |
| PA14_29200 | PA14_29200 | -1.73 | hypothetical protein |
| PA14_02220 | PA14_02220 | -1.74 | chemotaxis transducer |
| PA14_33970 | PA14_33970 | -1.74 | hypothetical protein |
| PA14_61200 | PA14_61200 | -1.74 | hypothetical protein |
| PA14_53970 | PA14_53970 | -1.74 | aconitate hydratase |
| rhsP2 | PA14_43100 | -1.74 | RhsP2 |
| PA14_14210 | PA14_14210 | -1.75 | hypothetical protein |
| PA14_58600 | PA14_58600 | -1.75 | hypothetical protein |
| PA14_16140 | PA14_16140 | -1.75 | hypothetical protein |
| PA14_71430 | PA14_71430 | -1.75 | hypothetical protein |
| PA14_58040 | PA14_58040 | -1.75 | hypothetical protein |
| PA14_53230 | PA14_53230 | -1.75 | oxidoreductase |
| pmtA | PA14_53910 | -1.76 | phospholipid methyltransferase |
| PA14_33980 | PA14_33980 | -1.76 | hypothetical protein |
| hsiJ3 | PA14_34100 | -1.76 | HsiJ3 |
| PA14_07370 | PA14_07370 | -1.77 | hypothetical protein |
| PA14_46520 | PA14_46520 | -1.77 | hypothetical protein |
| mnmC | PA14_19400 | -1.78 | 5-methylaminomethyl-2-thiouridine methyltransferase |
| PA14_68290 | PA14_68290 | -1.78 | C4-dicarboxylate transporter |
| PA14_55800 | PA14_55800 | -1.79 | hypothetical protein |
| PA14_29390 | PA14_29390 | -1.79 | hypothetical protein |
| PA14_28920 | PA14_28920 | -1.80 | chaperone |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--------------------------------------|
| PA14_34800 | PA14_34800 | -1.80 | amino acid transporter LysE |
| PA14_28120 | PA14_28120 | -1.81 | hypothetical protein |
| PA14_54600 | PA14_54600 | -1.81 | hypothetical protein |
| PA14_08450 | PA14_08450 | -1.81 | hypothetical protein |
| PA14_71420 | PA14_71420 | -1.83 | ferredoxin |
| aptA | PA14_01620 | -1.84 | beta alaninepyruvate transaminase |
| PA14_31770 | PA14_31770 | -1.84 | oxidoreductase |
| lldD | PA14_63090 | -1.84 | L-lactate dehydrogenase |
| prpC | PA14_53950 | -1.84 | methylcitrate synthase |
| PA14_15000 | PA14_15000 | -1.84 | hypothetical protein |
| PA14_46370 | PA14_46370 | -1.84 | two-component sensor |
| PA14_10540 | PA14_10540 | -1.85 | iron-sulfur cluster-binding protein |
| PA14_44920 | PA14_44920 | -1.86 | hypothetical protein |
| PA14_71840 | PA14_71840 | -1.87 | hypothetical protein |
| PA14_71830 | PA14_71830 | -1.87 | hypothetical protein |
| PA14_00810 | PA14_00810 | -1.87 | DNA repair photolyase |
| PA14_02200 | PA14_02200 | -1.88 | chemotaxis protein methyltransferase |
| vgrG3 | PA14_33960 | -1.89 | VgrG3 |
| PA14_11370 | PA14_11370 | -1.90 | lipoprotein |
| PA14sr_159 | #N/A | -1.90 | pARN |
| PA14_60620 | PA14_60620 | -1.91 | tRNA-Arg |
| PA14_40210 | PA14_40210 | -1.92 | hypothetical protein |
| PA14_18320 | PA14_18320 | -1.95 | hypothetical protein |
| fumC2 | PA14_53220 | -1.95 | fumarate hydratase |
| PA14_61430 | PA14_61430 | -1.95 | hypothetical protein |
| PA14_22700 | PA14_22700 | -1.96 | ferredoxin |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--|
| PA14_24990 | PA14_24990 | -1.96 | hypothetical protein |
| PA14_06600 | PA14_06600 | -1.97 | acyl-CoA dehydrogenase |
| PA14_18340 | PA14_18340 | -1.99 | hypothetical protein |
| PA14_01160 | PA14_01160 | -1.99 | hypothetical protein |
| PA14_48800 | PA14_48800 | -2.00 | hypothetical protein |
| PA14_39440 | PA14_39440 | -2.04 | hypothetical protein |
| PA14_01500 | PA14_01500 | -2.04 | transcriptional regulator |
| PA14_03590 | PA14_03590 | -2.05 | hypothetical protein |
| PA14_54770 | PA14_54770 | -2.06 | hypothetical protein |
| PA14_10410 | PA14_10410 | -2.06 | hypothetical protein |
| SPA0099 | #N/A | -2.06 | pARN |
| PA14_58580 | PA14_58580 | -2.08 | hydroxylase |
| PA14_63110 | PA14_63110 | -2.09 | S-adenosylmethionine decarboxylase |
| PA14_33880 | PA14_33880 | -2.10 | hypothetical protein |
| PA14_55790 | PA14_55790 | -2.10 | hypothetical protein |
| hcnB | PA14_36320 | -2.10 | hydrogen cyanide synthase HcnB |
| arnT | PA14_18330 | -2.12 | 4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase |
| PA14_02190 | PA14_02190 | -2.12 | hypothetical protein |
| PA14_18960 | PA14_18960 | -2.16 | hypothetical protein |
| csaA | PA14_22570 | -2.16 | CsaA protein |
| PA14_55900 | PA14_55900 | -2.17 | hypothetical protein |
| PA14_12900 | PA14_12900 | -2.17 | DNA binding protein |
| PA14_44910 | PA14_44910 | -2.18 | hypothetical protein |
| PA14sr_123 | #N/A | -2.18 | pARN |
| PA14sr_026 | #N/A | -2.18 | pARN |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|---|
| cheB | PA14_02180 | -2.19 | chemotaxis-specific methylesterase |
| sRNA1466 | #N/A | -2.20 | pARN |
| PA14sr_044 | #N/A | -2.20 | pARN |
| PA14_55850 | PA14_55850 | -2.21 | pilus assembly protein |
| PA14_55880 | PA14_55880 | -2.22 | hypothetical protein |
| PA14_55890 | PA14_55890 | -2.24 | type II secretion system protein |
| PA14_55860 | PA14_55860 | -2.25 | hypothetical protein |
| PA14_16330 | PA14_16330 | -2.25 | hypothetical protein |
| PA14_28930 | PA14_28930 | -2.25 | hypothetical protein |
| lecB | PA14_20610 | -2.26 | fucose-binding lectin PA-IIL |
| PA14_16160 | PA14_16160 | -2.26 | hypothetical protein |
| PA14_40340 | PA14_40340 | -2.26 | hypothetical protein |
| PA14_44230 | PA14_44230 | -2.27 | hypothetical protein |
| PA14_17000 | PA14_17000 | -2.27 | hypothetical protein |
| PA14_29400 | PA14_29400 | -2.27 | hypothetical protein |
| PA14_55780 | PA14_55780 | -2.29 | two-component sensor |
| PA14_46530 | PA14_46530 | -2.30 | hypothetical protein |
| PA14_55920 | PA14_55920 | -2.31 | type II secretion system protein |
| SPA0013 | #N/A | -2.34 | pARN |
| SPA0145 | #N/A | -2.35 | pARN |
| PA14_03610 | PA14_03610 | -2.35 | Zn-dependent protease with chaperone function |
| mexl | PA14_09520 | -2.35 | RND efflux transporter |
| PA14_55840 | PA14_55840 | -2.35 | hypothetical protein |
| PA14_28230 | PA14_28230 | -2.37 | hypothetical protein |
| PA14_55930 | PA14_55930 | -2.38 | pilus assembly protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--------------------------------|
| lrs2 | #N/A | -2.42 | pARN |
| PA14_18680 | PA14_18680 | -2.42 | hypothetical protein |
| PA14sr_020 | #N/A | -2.45 | pARN |
| PA14_61520 | PA14_61520 | -2.46 | hypothetical protein |
| PA14_16190 | PA14_16190 | -2.47 | hypothetical protein |
| PA14_67520 | PA14_67520 | -2.51 | hypothetical protein |
| hcnA | PA14_36330 | -2.62 | hydrogen cyanide synthase HcnA |
| prpB | PA14_53940 | -2.64 | 2-methylisocitrate lyase |
| PA14_67530 | PA14_67530 | -2.66 | hypothetical protein |
| PA14_13390 | PA14_13390 | -2.66 | hypothetical protein |
| PA14_40220 | PA14_40220 | -2.68 | hypothetical protein |
| dotU3 | PA14_34110 | -2.69 | DotU3 |
| hsiF3 | PA14_34020 | -2.70 | HsiF3 |
| PA14_00510 | PA14_00510 | -2.74 | hemagglutinin |
| PA14_45700 | PA14_45700 | -2.75 | hypothetical protein |
| hcp3 | PA14_34030 | -2.79 | Нср3 |
| icmF3 | PA14_34130 | -2.79 | IcmF3 |
| PA14_00830 | PA14_00830 | -2.85 | hypothetical protein |
| SPA0037 | #N/A | -2.87 | pARN |
| clpV3 | PA14_33990 | -2.88 | ClpV3 |
| PA14_58260 | PA14_58260 | -2.88 | hypothetical protein |
| PA14_66540 | PA14_66540 | -3.01 | hypothetical protein |
| hsiC3 | PA14_34050 | -3.05 | HsiC3 |
| PA14_28220 | PA14_28220 | -3.07 | hypothetical protein |
| PA14_61510 | PA14_61510 | -3.08 | hypothetical protein |
| PA14_31750 | PA14_31750 | -3.11 | acyltransferase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--|
| PA14_69540 | PA14_69540 | -3.11 | hypothetical protein |
| PA14_58250 | PA14_58250 | -3.13 | hypothetical protein |
| PA14_03200 | PA14_03200 | -3.13 | hypothetical protein |
| pldA | PA14_18970 | -3.13 | phospholipase D |
| hsiG3 | PA14_34010 | -3.18 | HsiG3 |
| PA14_58230 | PA14_58230 | -3.20 | hypothetical protein |
| PA14_58270 | PA14_58270 | -3.20 | hypothetical protein |
| PA14_53210 | PA14_53210 | -3.22 | hypothetical protein |
| PA14_18985 | PA14_18985 | -3.25 | hypothetical protein |
| PA14_40230 | PA14_40230 | -3.26 | secretion protein |
| PA14_31740 | PA14_31740 | -3.31 | hypothetical protein |
| PA14_00970 | PA14_00970 | -3.35 | hypothetical protein |
| PA14_40650 | PA14_40650 | -3.36 | hypothetical protein |
| PA14_44900 | PA14_44900 | -3.50 | hypothetical protein |
| hsiH3 | PA14_34000 | -3.51 | HsiH3 |
| PA14_01150 | PA14_01150 | -3.62 | hypothetical protein |
| PA14_61540 | PA14_61540 | -3.66 | hypothetical protein |
| PA14_40250 | PA14_40250 | -3.66 | outer membrane protein |
| PA14_40660 | PA14_40660 | -3.74 | hypothetical protein |
| PA14_40260 | PA14_40260 | -3.75 | hypothetical protein |
| PA14_46140 | PA14_46140 | -3.76 | hypothetical protein |
| hsiB3 | PA14_34070 | -3.79 | HsiB3 |
| PA14sr_004 | #N/A | -3.84 | pARN |
| vgrG14 | PA14_43080 | -3.91 | VgrG14 |
| PA14_40240 | PA14_40240 | -3.93 | ABC transporter ATP-binding protein/permease |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène |
|----------------|------------|----------------------|--------------------------------------|
| PA14_01130 | PA14_01130 | -4.00 | hypothetical protein |
| PA14_03220 | PA14_03220 | -4.04 | hypothetical protein |
| PA14_58240 | PA14_58240 | -4.14 | hypothetical protein |
| PA14_03210 | PA14_03210 | -4.36 | hypothetical protein |
| stk1 | PA14_42880 | -4.41 | Stk1 |
| PA14_01540 | PA14_01540 | -4.62 | hypothetical protein |
| PA14_14020 | PA14_14020 | -4.64 | hypothetical protein |
| PA14_01220 | PA14_01220 | -4.80 | hypothetical protein |
| PA14_01170 | PA14_01170 | -4.85 | hypothetical protein |
| PA14_53920 | PA14_53920 | -4.90 | transcriptional regulator |
| PA14sr_087 | #N/A | -4.97 | pARN |
| PA14_01120 | PA14_01120 | -5.22 | hypothetical protein |
| PA14_39780 | PA14_39780 | -5.31 | hypothetical protein |
| PA14_00940 | PA14_00940 | -5.32 | hypothetical protein |
| PA14_46120 | PA14_46120 | -5.38 | hypothetical protein |
| PA14_32770 | PA14_32770 | -5.43 | hypothetical protein |
| PA14_61530 | PA14_61530 | -5.55 | pili assembly chaperone |
| PA14_01230 | PA14_01230 | -5.58 | hypothetical protein |
| PA14_00900 | PA14_00900 | -6.37 | hypothetical protein |
| PA14_01200 | PA14_01200 | -6.58 | hypothetical protein |
| PA14_14000 | PA14_14000 | -6.66 | hypothetical protein |
| PA14_01190 | PA14_01190 | -7.03 | 3-oxoacyl-ACP synthase |
| PA14_01180 | PA14_01180 | -7.06 | hypothetical protein |
| PA14_00890 | PA14_00890 | -7.52 | phosphoprotein phosphatase |
| ppkA | PA14_00875 | -7.69 | serine/threonine protein kinase PpkA |
| PA14_46110 | PA14_46110 | -7.72 | sodium:solute symport protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Ratio (Mutant/WT) | Fonction du gène | | | | | |
|----------------|------------|----------------------|--------------------|--|--|--|--|--|
| PA14_14010 | PA14_14010 | -9.49 | amino acid oxidase | | | | | |
| PA14_46100 | PA14_46100 | -18.98 | transporter | | | | | |

Mutant/WT

swarming

3.24

3.24

3.14

3.11

3.07

3.05

2.75

2.71

2.67

2.62

2.61

2.57

2.53

2.44

2.44

2.41

2.35

2.34

2.34

2.27

2.20

2.19

Fonction du gène

hypothetical protein

hypothetical protein

hypothetical protein

hypothetical protein

secretion

pARN

exoenzyme T

metallothionein

hypothetical protein

hypothetical protein

hypothetical protein

hypothetical protein

hypothetical protein

secretion

secretion

beta

glycogen branching protein

translocation protein in type III

type III secretion system protein

translocation protein in type III

malonate decarboxylase subunit

heme acquisition protein HasAp

translocation protein in type III

type III secretion system protein

exoenzyme S synthesis protein C

protein in type III secretion

Table 11.6 Gènes affectés en surface et bouillon chez le double mutant hptBgacA VS WT

| J = | | | | | | | bouillon |
|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|---|------------|------------|----------|
| Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène | PA14_33160 | PA14_33160 | -1.73 |
| pcrH | PA14_42460 | 3.04 | 5.67 | regulatory protein PcrH | PA14_19680 | PA14_19680 | -1.60 |
| rmf | PA14_24650 | -1.59 | 5.67 | ribosome modulation factor | PA14_36360 | PA14_36360 | 2.06 |
| pcrG | PA14_42480 | 3.58 | 5.26 | regulator in type III secretion | PA14_42410 | PA14_42410 | 2.87 |
| PA14_42860 | PA14_42860 | 1.70 | 4.71 | hypothetical protein | pscP | PA14_42600 | 3.32 |
| pcrV | PA14_42470 | 3.52 | 4.63 | type III secretion protein PcrV | nscO | DA14 42610 | 2 71 |
| PA14_36530 | PA14_36530 | -1.79 | 4.55 | hypothetical protein | pscQ | PA14_42010 | 2 5.71 |
| PA14sr_030 | #N/A | 4.48 | 4.18 | pARN | CDA0140 | PA14_42450 | 2.51 |
| SPA0087 | #N/A | 4.37 | 4.17 | pARN | SPA0148 | #N/A | 4.19 |
| nirS | PA14 06750 | 3.22 | 4.09 | nitrite reductase | PA14_42540 | PA14_42540 | 2.72 |
| popD | PA14 42440 | 4.22 | 3.92 | translocator outer membrane | ехоТ | PA14_00560 | 2.68 |
| <i>F</i> • <i>F</i> - | | | | protein PopD precursor | PA14_36890 | PA14_36890 | -2.13 |
| pscN | PA14_42570 | 3.74 | 3.89 | type III secretion system ATPase | PA14_15050 | PA14_15050 | -1.88 |
| рорВ | PA14_42450 | 4.35 | 3.89 | translocator protein PopB | PA14_36670 | PA14_36670 | -1.66 |
| PA14_33870 | PA14_33870 | -1.80 | 3.74 | hypothetical protein | glgB | PA14_36710 | -1.57 |
| PA14_36770 | PA14_36770 | -1.50 | 3.67 | hypothetical protein | PA14_14660 | PA14_14660 | 1.56 |
| PA14_42510 | PA14 42510 | 3.03 | 3.66 | hypothetical protein | PA14_58690 | PA14_58690 | 2.12 |
| PA14_36900 | PA14 36900 | -3.92 | 3.58 | hypothetical protein | PA14_06860 | PA14_06860 | 2.38 |
| exsB | _ PA14_42400 | 3.47 | 3.47 | exoenzyme S synthesis protein B | pscT | PA14_42640 | 4.13 |
| popN | PA14_42550 | 3.36 | 3.44 | Type III secretion outer membrane protein PopN | pscR | PA14_42620 | 3.35 |
| | | | | precursor | PA14_42630 | PA14_42630 | 5.25 |
| pscO | PA14_42580 | 3.66 | 3.39 | translocation protein in type III | | | |
| | | | | secretion | mdcD | PA14_02580 | 2.62 |
| PA14_42530 | PA14_42530 | 2.99 | 3.31 | type III secretion protein | | | |
| PA14_26060 | PA14_26060 | -1.50 | 3.29 | hypothetical protein | hasAp | PA14_20020 | 1.56 |

Nom du gène

Locus PA14

Mutant/WT

| Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène | Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène |
|-----------------|-------------|-----------------------|-----------------------|---|-------------|------------|-----------------------|-----------------------|---|
| SPA0107 | #N/A | 2.11 | 2.15 | pARN | hutG | PA14_67240 | 2.71 | 1.71 | N-formylglutamate amidohydrolase |
| тисА | PA14_54420 | 1.50 | 2.07 | anti-sigma factor MucA | butl | PA14 67250 | 2 72 | 1 70 | imidazolonenronionase |
| pscF | PA14_42310 | 3.89 | 2.03 | type III export protein PscF | naci | 1714_07250 | 2.75 | 1.70 | |
| PA14_42380 | PA14_42380 | 2.81 | 1.96 | hypothetical protein | phaC2 | PA14_66840 | -1.54 | 1.69 | poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2 |
| PA14_31170 | PA14_31170 | 2.57 | 1.96 | hypothetical protein | PA14_33290 | PA14_33290 | -1.56 | 1.66 | hypothetical protein |
| pscB | PA14_42360 | 3.70 | 1.96 | type III export apparatus protein | PA14_22380 | PA14_22380 | -2.15 | 1.66 | DNA polymerase III subunit |
| pcrD | PA14_42500 | 2.86 | 1.96 | type III secretory apparatus | | | | | epsilon |
| | | | | protein PcrD | pscC | PA14_42350 | 3.10 | 1.62 | Type III secretion outer |
| PA14_46280 | PA14_46280 | -2.13 | 1.91 | hypothetical protein | | | | | membrane protein PscC |
| PA14_48900 | PA14_48900 | -1.59 | 1.86 | hypothetical protein | PA14sr 033 | #N/A | -1 55 | 1 62 | nARN |
| aprF | PA14_48090 | 1.78 | 1.86 | alkaline protease secretion outer membrane protein AprF precursor | aprD | PA14_48115 | 1.94 | 1.62 | alkaline protease secretion protein AprD |
| pscE | PA14_42320 | 3.35 | 1.85 | type III export protein PscE | SPA0141 | #N/A | -1.69 | 1.61 | pARN |
| pa1L | PA14_31290 | -2.91 | 1.83 | PA-I galactophilic lectin | PA14_61380 | PA14_61380 | -1.64 | 1.60 | hypothetical protein |
| gbuA | PA14_46070 | -11.85 | 1.83 | guanidinobutyrase | PA14_24770 | PA14_24770 | -1.63 | 1.60 | hypothetical protein |
| PA14_13050 | PA14_13050 | -1.97 | 1.79 | hypothetical protein | arcB | PA14_68340 | -1.88 | 1.60 | ornithine carbamoyltransferase |
| mexH | PA14_09530 | -2.10 | 1.78 | RND efflux membrane fusion | PA14_13990 | PA14_13990 | -8.44 | 1.57 | amino acid ABC transporter |
| | | | | protein | PA14_28460 | PA14_28460 | -1.60 | 1.56 | hypothetical protein |
| aprE | PA14_48100 | 2.20 | 1.77 | alkaline protease secretion protein AprE | pscU | PA14_42660 | 2.39 | 1.56 | translocation protein in type III secretion |
| cspD | PA14_30200 | -1.66 | 1.77 | cold-shock protein CspD | PA14_00990 | PA14_00990 | -5.13 | 1.56 | hypothetical protein |
| PA14_67260 | PA14_67260 | 2.60 | 1.76 | histidine/phenylalanine ammonia-lyase | PA14_16630 | PA14_16630 | -1.51 | 1.54 | outer membrane protein, OmpA |
| PA14 41980 | PA14 41980 | -1.57 | 1.74 | hypothetical protein | PA14_46080 | PA14_46080 | -11.03 | 1.54 | hypothetical protein |
| – PA14 35160 | PA14 35160 | -2.23 | 1.73 | hypothetical protein | PA14_26580 | PA14_26580 | -1.60 | 1.54 | hypothetical protein |
| PA14 54720 | PA14 54720 | 1 75 | 1 71 | hypothetical protein | mexG | PA14_09540 | -2.49 | 1.53 | hypothetical protein |
| . 717_37/20 | 1 717_34720 | 1.75 | 1./1 | | PA14_56910 | PA14_56910 | -1.61 | 1.50 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène | Fonction du gène Nom du gène | | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène |
|-------------|------------|-----------------------|-----------------------|---|------------------------------|------------|-----------------------|-----------------------|--|
| PA14_30730 | PA14_30730 | -2.53 | -1.51 | hypothetical protein | hsiJ2 | PA14_42920 | -5.87 | -1.73 | HsiJ2 |
| PA14_71100 | PA14_71100 | -1.57 | -1.52 | hypothetical protein | PA14_43660 | PA14_43660 | -1.67 | -1.76 | hypothetical protein |
| PA14_00080 | PA14_00080 | -1.99 | -1.53 | hypothetical protein | PA14_33350 | PA14_33350 | -2.23 | -1.76 | hypothetical protein |
| PA14_00630 | PA14_00630 | -6.18 | -1.53 | hypothetical protein | PA14_00590 | PA14_00590 | -1.72 | -1.76 | lipoprotein |
| cysN | PA14_57710 | 1.82 | -1.54 | bifunctional sulfate | PA14_33300 | PA14_33300 | -1.94 | -1.78 | hypothetical protein |
| | | | | adenylyltransferase subunit 1/adenylylsulfate kinase | PA14sr_002 | #N/A | -1.56 | -1.78 | pARN |
| PA14 33310 | PA14 33310 | -2.16 | -1.55 | hypothetical protein | PA14_67210 | PA14_67210 | -1.56 | -1.79 | hypothetical protein |
| | #N/A | -1.54 | -1.55 | pARN | PA14_05960 | PA14_05960 | -1.55 | -1.79 | cold-shock protein |
| PA14_49410 | PA14_49410 | -1.88 | -1.55 | cold-shock protein | PA14_31760 | PA14_31760 | -2.83 | -1.80 | phosphatidate cytidylyl transferase |
| PA14_63120 | PA14_63120 | -1.70 | -1.56 | hypothetical protein | PA14_16210 | PA14 16210 | -2.05 | -1.81 | hypothetical protein |
| PA14sr_104 | #N/A | 1.99 | -1.58 | pARN | PA14_04350 | PA14 04350 | -1.51 | -1.82 | integral membrane protein |
| phzB1 | PA14_09470 | -1.50 | -1.58 | phenazine biosynthesis protein | | #N/A | -1.55 | -1.83 | pARN |
| PA14_19010 | PA14_19010 | -3.38 | -1.60 | hypothetical protein | PA14_01100 | PA14 01100 | -17.20 | -1.84 | ClpA/B-type chaperone |
| PA14_01110 | PA14_01110 | -16.17 | -1.61 | hypothetical protein | PA14_51840 | PA14 51840 | -1.62 | -1.85 | cold-shock protein |
| PA14_56280 | PA14_56280 | -1.70 | -1.61 | hypothetical protein | PA14_56090 | PA14_56090 | -2.90 | -1.85 | hypothetical protein |
| hcpA | PA14_44890 | -5.69 | -1.63 | secreted protein Hcp | PA14_28000 | PA14_28000 | -2.99 | -1.87 | hypothetical protein |
| PA14_31420 | PA14_31420 | -2.63 | -1.64 | hypothetical protein | pgsA | PA14 30670 | -1.62 | -1.87 | CDP-diacylglycerolglycerol-3- |
| PA14_32830 | PA14_32830 | -1.62 | -1.64 | hypothetical protein | | | | | phosphate 3- |
| PA14_61500 | PA14_61500 | -4.27 | -1.64 | hypothetical protein | PA1A 01140 | PA14 01140 | -5 55 | -1 88 | hypothetical protein |
| PA14_67220 | PA14_67220 | -1.70 | -1.66 | hypothetical protein | PA14_01140 | PA14_01140 | 5.55 | 1.00 | hypothetical protein |
| phzS | PA14_09400 | -1.57 | -1.68 | hypothetical protein | PA14_21400 | PA14_21400 | -5.55 | -1.91 | |
| PA14_45710 | PA14_45710 | -2.22 | -1.68 | hypothetical protein | PA14_22160 | PA14_22160 | -1.62 | -1.93 | nypotnetical protein |
| PA14_29590 | PA14_29590 | -1.61 | -1.69 | transcriptional regulator | PA14_67190 | PA14_6/190 | -1.74 | -1.95 | nypothetical protein |
| sdhC | PA14_44060 | -1.59 | -1.70 | succinate dehydrogenase, | PA14_56170 | PA14_56170 | -1.66 | -2.00 | nypothetical protein |
| | | | | cytochrome b556 subunit | PA14_31720 | PA14_31720 | -2.66 | -2.01 | hypothetical protein |
| PA14 32790 | PA14 32790 | -2.77 | -1.72 | hypothetical protein | | | | | |

| Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène | Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène |
|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|---|
| PA14_00860 | PA14_00860 | -11.61 | -2.03 | ABC transporter ATP-binding | PA14_56100 | PA14_56100 | -3.14 | -2.32 | hypothetical protein |
| | | | | protein | PA14_56110 | PA14_56110 | -2.77 | -2.33 | hypothetical protein |
| PA14_00570 | PA14_00570 | -2.43 | -2.07 | lipoprotein | PA14_00925 | PA14_00925 | -7.47 | -2.33 | hypothetical protein |
| PA14_16180 | PA14_16180 | -3.02 | -2.08 | hypothetical protein | PA14 01040 | PA14 01040 | -15.69 | -2.34 | secretion protein |
| PA14_56160 | PA14_56160 | -2.50 | -2.08 | hypothetical protein | PA14_69550 | - PA14 69550 | -6.36 | -2.38 | hypothetical protein |
| PA14_20550 | PA14_20550 | -2.48 | -2.08 | hypothetical protein | PA14 00850 | PA14_00850 | -10.95 | -2.38 | hypothetical protein |
| PA14_07330 | PA14_07330 | -14.74 | -2.12 | hypothetical protein | PA14_00520 | PA14_00520 | 1 5 9 | 2.50 | hypothetical protein |
| rpsH | PA14_08990 | -1.66 | -2.12 | 30S ribosomal protein S8 | PA14_00320 | PA14_00520 | 2.00 | -2.55 | hypothetical protein |
| PA14_64120 | PA14_64120 | -1.62 | -2.12 | hypothetical protein | PA14_50140 | PA14_50140 | -5.09 | -2.41 | |
| hsiA3 | PA14_34140 | -2.54 | -2.13 | HsiA3 | | PA14_42900 | -9.00 | -2.41 | icmF2 |
| PA14_19020 | PA14 19020 | -3.18 | -2.16 | hypothetical protein | PA14_37260 | PA14_37260 | 1.76 | -2.44 | porin |
| - PA14 32780 | PA14 32780 | -1.81 | -2.19 | hypothetical protein | hcpC | PA14_03240 | -8.62 | -2.44 | secreted protein Hcp |
| – PA14_28200 | PA14_28200 | -2.87 | -2.19 | hypothetical protein | PA14_01070 | PA14_01070 | -23.83 | -2.49 | hypothetical protein |
| PA14_28210 | PA14_28210 | -3.99 | -2.21 | hypothetical protein | PA14_21020 | PA14_21020 | -1.87 | -2.56 | non-ribosomal peptide synthetase |
| PA14_28895 | PA14_28895 | -2.12 | -2.21 | hypothetical protein | PA14_00960 | PA14_00960 | -6.62 | -2.58 | lipoprotein |
| PA14_67230 | PA14_67230 | -2.03 | -2.23 | hypothetical protein | PA14_52320 | PA14_52320 | 3.90 | -2.59 | tRNA-Met |
| rpsT | PA14_60400 | -1.93 | -2.23 | 30S ribosomal protein S20 | putA | PA14_54170 | -5.93 | -2.59 | bifunctional proline |
| PA14_04710 | PA14_04710 | -1.84 | -2.24 | hypothetical protein | | | | | dehydrogenase/pyrroline-5- carboxylate dehydrogenase |
| PA14_00580 | PA14_00580 | -2.58 | -2.25 | lipoprotein | PA14 31730 | PA14 31730 | -4.33 | -2.60 | hypothetical protein |
| rpsU | PA14_07560 | -2.06 | -2.25 | 30S ribosomal protein S21 | PA14_35750 | PA14 35750 | -1.96 | -2.62 | tonA repressor protein |
| PA14_46460 | PA14_46460 | -1.67 | -2.25 | hypothetical protein | PA14 28880 | PA14 28880 | -1.74 | -2.64 | hypothetical protein |
| PA14_56130 | PA14_56130 | -2.70 | -2.26 | hypothetical protein | clpV2 | PA14 42980 | -8 34 | -2 65 | ClnV2 |
| PA14_16200 | PA14_16200 | -4.09 | -2.29 | hypothetical protein | PA14 29190 | PA14 29190 | -3.24 | -2.66 | hypothetical protein |
| PA14_38110 | PA14_38110 | -1.74 | -2.31 | serine/threonine transporter SstT | PA14 67830 | PA14 67830 | -2.40 | -2.69 | hypothetical protein |
| PA14_37270 | PA14_37270 | 1.96 | -2.31 | LamB/YcsF family protein | PA14 00910 | PA14 00910 | -8.12 | -2.70 | hypothetical protein |
| PA14_41420 | PA14_41420 | -2.79 | -2.31 | hypothetical protein | PA14_49310 | PA14 49310 | 1.60 | -2.70 | hypothetical protein |

| Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène | Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène |
|-------------|------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| PA14_01020 | PA14_01020 | -18.22 | -2.85 | hypothetical protein | stp1 | PA14_42890 | -9.77 | -3.90 | Stp1 |
| PA14_53580 | PA14_53580 | -2.44 | -2.85 | hypothetical protein | hsiA2 | PA14_43050 | -2.20 | -3.98 | HsiA2 |
| PA14_20900 | PA14_20900 | -2.24 | -2.87 | MFS transporter | PA14_13350 | PA14_13350 | -3.00 | -4.02 | hypothetical protein |
| PA14_37310 | PA14_37310 | 2.08 | -2.87 | hypothetical protein | PA14_55940 | PA14_55940 | -4.79 | -4.04 | hypothetical protein |
| hcp2 | PA14_43070 | -10.33 | -2.90 | Нср2 | PA14_53610 | PA14_53610 | -1.95 | -4.05 | hypothetical protein |
| PA14_20800 | PA14_20800 | -1.71 | -2.93 | histidine phosphotransfer | PA14_53600 | PA14_53600 | -1.78 | -4.07 | hypothetical protein |
| | | | | domain-containing protein | cyp23 | PA14_20970 | -2.01 | -4.09 | cytochrome P450 |
| hcpB | PA14_69560 | -11.29 | -2.96 | secreted protein Hcp | hsiC2 | PA14_43030 | -13.67 | -4.13 | HsiC2 |
| PA14_01060 | PA14_01060 | -23.63 | -2.97 | hypothetical protein | P10 | #N/A | -8.44 | -4.18 | pARN |
| PA14_28010 | PA14_28010 | -5.25 | -3.00 | hypothetical protein | PA14_13370 | PA14_13370 | -3.47 | -4.23 | hypothetical protein |
| PA14_20920 | PA14_20920 | -2.60 | -3.00 | hypothetical protein | PA14_13360 | PA14_13360 | -3.40 | -4.29 | hypothetical protein |
| PA14_16270 | PA14_16270 | -1.78 | -3.01 | hypothetical protein | PA14_21480 | PA14_21480 | -6.58 | -4.32 | hypothetical protein |
| PA14_37290 | PA14_37290 | 2.02 | -3.08 | hypothetical protein | PA14_01030 | PA14_01030 | -50.80 | -4.33 | hypothetical protein |
| uvrC | PA14_30660 | -3.85 | -3.17 | excinuclease ABC subunit C | PA14_20980 | PA14 20980 | -1.80 | -4.66 | short chain dehydrogenas |
| hsiG2 | PA14_43000 | -6.32 | -3.24 | HsiG2 | PA14 01080 | PA14 01080 | -35.52 | -4.72 | hypothetical protein |
| PA14_13380 | PA14_13380 | -3.55 | -3.26 | hypothetical protein | _ PA14 21010 | _ PA14 21010 | -1.61 | -4.76 | FAD-dependent monooxygenase |
| dotU2 | PA14_42910 | -11.31 | -3.37 | DotU2 | _ PA14 43020 | PA14 43020 | -9.75 | -4.82 | hypothetical protein |
| lip2.1 | PA14_42940 | -9.74 | -3.37 | Lip2.2 | PA14 21470 | PA14 21470 | -8.35 | -4.85 | hypothetical protein |
| PA14_21450 | PA14_21450 | -6.43 | -3.46 | hypothetical protein | PA14 01010 | PA14 01010 | -20.00 | -4.97 | hypothetical protein |
| PA14_21000 | PA14_21000 | -1.60 | -3.62 | hypothetical protein | PA14 20940 | PA14 20940 | -2.21 | -5.43 | acyl carrier protein |
| putP | PA14_54150 | -5.15 | -3.65 | sodium/proline symporter PutP | hsiH2 | PA14 42990 | -8 50 | -5 51 | HsiH2 |
| PA14_00820 | PA14_00820 | -10.44 | -3.67 | hypothetical protein | PA14 49480 | PA14 49480 | -3 40 | -5 57 | hypothetical protein |
| PA14_10380 | PA14_10380 | 1.91 | -3.68 | hypothetical protein | sfa2 | PA14 42970 | -10 71 | -5 71 | Sfa2 |
| PA14_53590 | PA14_53590 | -1.93 | -3.69 | hypothetical protein | PA14 25790 | PA14 35790 | -6.02 | -5 7/ | homospermidine synthese |
| PA14_35760 | PA14_35760 | -2.80 | -3.75 | hypothetical protein | PA14 35770 | PA1/ 35770 | _/ 10 | -5.78 | hynothetical protein |
| PA14_64610 | PA14_64610 | 1.81 | -3.84 | hypothetical protein | PA14 20960 | PA14 20960 | -1.95 | -5.95 | isomerase |

| Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène | Nom du gène | Locus PA14 | Mutant/WT bouillon | Mutant/WT swarming | Fonction du gène |
|-------------|------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------|------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| fabH2 | PA14_20950 | -2.28 | -6.10 | 3-oxoacyl-ACP synthase | hsiB2 | PA14_43040 | -12.94 | -7.20 | HsiB2 |
| PA14sr_051 | #N/A | -11.27 | -6.65 | pARN | fha2 | PA14_42950 | -11.34 | -7.33 | Fha2 |
| PA14_35780 | PA14_35780 | -7.08 | -6.90 | hypothetical protein | lip2.2 | PA14_42960 | -10.24 | -7.49 | Lip2.2 |

11.5 ANNEXE E : Matériel supplémentaire du Chapitre 7 - Nouvelles perspectives et fonctions du système GacS/A



Figure 11.20 Courbe de croissance de différents mutants d'intérêt dans le milieu M9DCAA. Les cellules ont été incubées durant 48 heures à 34°C.

11.6 ANNEXE F : Matériel supplémentaire du Chapitre 8 - Interaction entre différentes souches dans des co-cultures en condition de motilité de type *swarming*







Figure 11.21 Phénotypes bactériens en condition de mono et co-culture en condition swarming. (A)Phénotype swarming du mutant $pi|A^-$ comparativement au mutant $fi|C^-$ (B)Phénotypes swarming de co-cultures bactériennes (C) Dénombrement en UFC d'une co-culture swarming entre un mutant $fi|C^-$ et $\Delta hptB$. **** = p < 0.0001

11.7 ANNEXE G : Communications scientifiques

11.7.1 Communications orales

- Fabrice Jean-Pierre, Julien Tremblay, Eric Déziel Congrès de Bactériologie intégrative : Symbiose & Pathogénèse 2016, Québec, Québec, Canada (Novembre 2016) Cellules cultivées en liquide versus surface : Régulation différentielle de l'expression des petits ARN RsmY/Z par le système Gac/HptB chez la bactérie Pseudomonas aeruginosa
- Fabrice Jean-Pierre, Mariane Séguin, Jonathan Perreault & Eric Déziel Congrès de l'Union Internationale des Sociétés de Microbiologie 2014 (IUMS 2014), Montréal, Québec, Canada (Juillet 2014) The expression of the global post-transcriptional regulator RsmA is capable of selfregulation in the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa
- Fabrice Jean-Pierre, Mariane Séguin, Jonathan Perreault & Eric Déziel Congrès Armand-Frappier 2013, Orford, Québec, Canada (Novembre 2013) L'expression du régulateur global post-transcriptionnel RsmA s'auto-régule négativement chez le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*

11.7.2 Communications par affiches

- Fabrice Jean-Pierre, Julien Tremblay, Eric Déziel Congrès Armand-Frappier 2015, Orford, Québec, Canada (Novembre 2015) L'impact des conditions de croissance sur la régulation des petits ARN RsmY et RsmZ chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et leur implication dans la motilité de type *swarming*
- Fabrice Jean-Pierre, Julien Tremblay, Eric Déziel Congrès Pseudomonas 2015 de l'ASM, Washington, DC, États-Unis (Septembre 2015) Broth versus surface: The impact of growth conditions on RsmY and RsmZ small
- RNAs regulation and their involvement in swarming motility
 Xiaoling Yang, Fabrice Jean-Pierre, Reza Naghdi, Jonathan Perreault
- Congrès Riboclub 2013, Orford, Québec, Canada (Septembre 2013)
 Identification of a novel S-adenosylmethionine riboswitch in Betaproteobacteria

 Fabrice Jean-Pierre, Mariane Séguin, Jonathan Perreault & Eric Déziel Congrès de la Société Canadienne des Microbiologistes (CSM), Ottawa, Canada (Juin 2013)

The expression of the global post-transcriptional regulator RsmA is capable of selfregulation in the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa

 Fabrice Jean-Pierre, Mariane Séguin, Eric Déziel Envoi d'une affiche à la conférence du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), Uruguay, (Octobre 2012) Expression of the post-transcriptional regulator RsmA is controlled at multiple levels in the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa

222