Rôles du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX dans l'adaptation, la formation de biofilm et la réponse à des stress de l'enveloppe chez Pseudomonas aeruginosa.

Rachel Duchesne

▶ **To cite this version:**

Rachel Duchesne. Rôles du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX dans l'adaptation, la formation de biofilm et la réponse à des stress de l'enveloppe chez Pseudomonas aeruginosa.. Biologie moléculaire. Normandie Université, 2017. Français. ⟨NNT : 2017NORMR005⟩. ⟨tel-01678677⟩

HAL Id: tel-01678677

https://theses.hal.science/tel-01678677v1

Submitted on 9 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Rôles du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX dans l'adaptation, la formation de biofilm et la réponse à des stress de l'enveloppe chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Présentée et soutenue par
Rachel DUCHESNE

Thèse soutenue publiquement le 6 janvier 2017 devant le jury composé de		
Mme Katy JEANNOT	Maitre de conférences, Université de Besançon	Rapporteur
Mr Christophe BORDI	Maitre de conférences, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Mr Alain DUFOUR	Professeur d'université, Université de Bretagne Sud	Examinateur
Mme Nicole ORANGE	Professeur d'université, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mme Sylvie CHEVALIER	Professeur d'université, Université de Rouen Normandie	Directrice de thèse
Mme Emeline BOUFFARTIGUES-MAILLOT	Maitre de conférences, Université de Rouen Normandie	Co-encadrante de thèse

Thèse dirigée par Sylvie CHEVALIER, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA4312

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative, Santé, Environnement

LMSM

A ma famille

et mes amis,

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, EA4312 de l'Université de Rouen. Je remercie la région Haute Normandie pour l'attribution du financement nécessaire à la réalisation de ce travail de recherche.

Je remercie le Professeur **Marc Feuilloley**, directeur du LMSM, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et m'avoir fait confiance durant toutes ces années.

Je tiens à remercier très profondément Madame **Katy Jeannot**, Maitre de Conférences à l'Université de Franche-Comté et Monsieur **Christophe Bordi**, Maitre de Conférences à l'Université d'Aix-Marseille, d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse en tant que rapporteur. J'ai conscience des arrangements auxquels vous avez dû consentir et du privilège que vous m'accordez en acceptant de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur **Alain Dufour**, Professeur à l'Université de Bretagne Sud d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateur.

Je remercie Madame **Nicole Orange**, Professeur à l'Université de Rouen, qui suit ce projet depuis le début et me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse le Professeur **Sylvie Chevalier** et ma co-encadrante de thèse le Docteur **Emeline Maillot** de m'avoir accueillie dans leur équipe depuis mon arrivée en Master 1 et pour m'avoir guidée dans mes travaux de recherche durant toutes ces années. Merci pour votre confiance, votre disponibilité et votre soutient. Merci également de m'avoir guidée scientifiquement tout en me laissant libre de choix, et de m'avoir permis d'élargir ma culture scientifique et personnelle en participant à des congrès. J'ai beaucoup appris à votre contact et je vous en suis profondément reconnaissante.

Je voudrais également remercier les membres du LMSM, **Camille**, **Magalie**, **Cathy**, **Pierre-Jean**, **Olivier Lesouhaitier**, **Annabelle**, **Jérémy**, **Lucille**, **Andréa**, **Ségolène**, **Mathias**, **Thomas**, **Valérie**... je ne cite surement pas tout le monde, mais je vous remercie tous pour votre gentillesse, votre bonne humeur et pour tous ces bons moments passés en votre compagnie. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite pour la suite.

Merci beaucoup à **Olivier Maillot**, merci « chef » de m'avoir aidée au quotidien et de m'avoir fait beaucoup rire avec tes « blagues ».

Un très grand merci à **Manuella** également pour sa gentillesse et son aide précieuse sur mes derniers mois de thèse.

Un grand merci à mes « coplègues » pour votre soutien, et votre amitié. Merci **Thibaut**, mon binôme de congrès, de m'avoir nourrie avec tes petits plats et pour les soirées tisanes. Princesse **Cécé** et **Dodo** chéri d'amour je vous remercie pour toutes ces soirées passées chez vous et les rires qu'on a partagé même dans les moments difficiles. Merci également à ma petite **Chacha** pour ta douceur, ta gentillesse et ton écoute ainsi qu'à **Nini**, je me souviendrais toujours des petites ballades en carrosse. Je ne peux évidemment pas oublier ma **Tatana** avec qui j'ai partagé tant de discussions scientifiques et moins scientifiques... Merci de m'avoir fait découvrir la gastronomie russe... mais surtout merci pour ta présence, ton soutien et ton amitié même à distance.

Puisque les amis sont là dans les bons comme dans les mauvais moments, je tiens à remercier chaleureusement **Julie** de m'avoir toujours soutenue et encouragée, **Djou** pour ton écoute et ta bonne humeur en toute circonstance, **Lucie** même si nos emplois du temps ne nous permettent pas souvent de nous voir, ton amitié depuis 10 ans m'est toujours aussi précieuse ainsi que **Jaja** et **Veda** pour me faire aimer la Bretagne.

Merci également à **David**, merci pour ton soutien, ta patience et ta compréhension surtout lors des derniers mois de ma thèse.

Enfin, un très grand merci à ma famille sans qui je ne serais rien, merci à **mes parents**, de m'avoir permis d'arriver jusqu'ici et de m'avoir encouragée, et à ma petite sœur **Mathilde** pour être toujours là à mes côtés.

Table des matières

Liste des abréviations **1**

Liste des figures et tables **3**

Synthèse bibliographique **5**

Chapitre I- *Pseudomonas aeruginosa* 7

1- Présentation du modèle 7

2- Infections aigues 7

3- Régulation de la virulence 9

a- La voie cAMP/Vfr 11

b- Le quorum sensing 13

4- Infections chroniques 13

Chapitre II- Le biofilm de *P. aeruginosa* 15

1- Définition 15

2- La matrice exocellulaire 17

a- Les polysaccharides 17

i. Le polysaccharide *psl* 19

ii. Le polysaccharide *pel* 21

iii. L'alginate 23

iv. Le β-glucane cyclique 25

b- L'ADN extracellulaire 27

c- Les protéines 27

d- Les vésicules membranaires 29

3- Régulation de la formation de biofilm 31

a- La voie Gac/Rsm 31

b- La voie du c-di-GMP 35

Chapitre III- L'enveloppe de *P. aeruginosa* 39

1- La membrane interne 39

a- Les phospholipides 39

b- Les lipoprotéines 41

c- Fonctions de la membrane interne 43

2- Le périplasme 43

a- Biosynthèse du peptidoglycane 45

b- Fonction du peptidoglycane 45

3- La membrane externe 47

a- Le lipopolysaccharide (LPS) 47

b- Les lipoprotéines 51

c- Les porines 51

i. Les porines spécifiques 53
ii. « Gated porin » ou récepteurs TonB-dépendant 53
iii. Les porines couplées à des pompes à efflux 55
iv. Les porines aspécifiques ou porines générales 57

4- La porine majoritaire de membrane externe OprF 57

a- Fonctions d'OprF 59

i. Rôle structural 59
ii. Rôle de senseur 59
iii. Rôle dans la virulence 61
iv. Rôle d'adhésine 61
v. Formation de biofilm 63

b- Expression d'*oprF* 63

5- Fonctions de la paroi 65

Chapitre IV- La réponse au stress de l'enveloppe 67

1- Facteurs affectant la paroi bactérienne 67

a- Facteurs environnementaux 67
b- Les antibiotiques 69
i. Les antibiotiques ciblant la synthèse du peptidoglycane 69
ii. Les antibiotiques ciblant la membrane 71
iii. Les antibiotiques agissant indirectement sur la paroi 73
c- La tobramycine 75

2- Régulation du CESR 75

a- Les systèmes à deux composants (TCS) 77
i. Les TCS régulant les pompes à efflux 77
ii. Les TCS impliqués dans la modification du LPS 81
iii. Les TCS répondant à l'altération de la biosynthèse du peptidoglycane 87
iv. Les TCS impliqués dans la modification de la perméabilité membranaire 89
v. Les TCS ne répondant pas aux antibiotiques 91
b- Les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF) 95
i. Généralités 95
ii. Le facteur sigma ECF AlgU 99
iii. Le facteur sigma ECF SigX 109

Objectifs de la thèse **117**

Matériels et Méthodes **121**

Résultats **139**

Partie I- Homéostasie de la structure pariétale 141

Article 1. Etude protéomique du rôle de SigX dans la composition de la membrane externe de *P. aeruginosa* 141

Article 2. L'absence du facteur sigma SigX entraine la dérégulation de la voie Crc/Hfq/CbrAB chez *P. aeruginosa* 153

Partie II- Formation de biofilm 207

Article 3. Le sucrose favorise la production de pellicule via le facteur sigma ECF SigX chez *P. aeruginosa*.....207

Article 4. L'absence de la protéine OprF de *P. aeruginosa* conduit à l'augmentation de la formation de biofilm due à une variation du taux de c-di-GMP 217

Partie III- Effet de concentrations subinhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* 233

Discussion **249**

Conclusions et Perspectives **272**

Annexes **279**

Valorisation scientifique 281

Curriculum vitae 289

Références **293**

Liste des abbréviations

ABC	ATP-binding cassette
ACP	Acyl carrier protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	ADN extracellulaire
AHL	N-acyl homosérine lactone
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
c-di-GMP	Diguanylate monophosphate cyclique
CoA	Coenzyme A
DGC	Diguanylate cyclase
ECF	Extracytoplasmic function
HCN	Cyanure d'hydrogène
IATS	International Antigen Typing Scheme
INF-γ	Interféron gamma
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IQS	Integrated quorum sensing
LC-MS	Liquid chormatography-Mass spectrometry
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption Ionisation-Time of fly
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAG	N-acétylglucosamine
NAM	N-acétylmuramique
NFκB	Nuclear factor Kappa-B
OMV	Outer membrane vesicle
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction

PDE	Phosphodiestérase
PIP	Protéine liant les pénicillines
PQS	Pseudomonas quinolone signal
QS	Quorum sensing
RND	Résistance nodulation division
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sncARN	small non coding ARN
TCS	Two component system

Liste des figures et tables.

Figures :

Figure 1. Représentation schématique de la régulation de la virulence de *P. aeruginosa*

Figure 2. Etapes de formation du biofilm

Figure 3. Représentation schématique de la régulation de *psl*

Figure 4. Représentation schématique de la régulation de *pel*.

Figure 5. Régulation de l'alginate

Figure 6. Représentation des facteurs influençant la production de vésicules membranaires

Figure 7 : La voie Gac/Rsm

Figure 8. Représentation schématique de la voie du c-di-GMP

Figure 9. Représentation schématique des principaux phospholipides composant les membranes de *P. aeruginosa*

Figure 10. Représentation schématique de la biosynthèse des acides gras

Figure 11. Représentation schématique de la synthèse des lipoprotéines

Figure 12. Représentation schématique de la biosynthèse du peptidoglycane

Figure 13. Représentation schématique du core oligosaccharidique du LPS de *P. aeruginosa*

Figure 14. Modèle montrant l'association du transporteur de membrane externe FhuA d'*Escherichia coli* avec le complexe TonB/ExbB/ExbD

Figure 15. Représentation schématique des différentes conformations d'OprF

Figure 16. Les différentes fonctions d'OprF

Figure 17. Schéma de l'organisation génomique et des régions promotrices d'*oprF* chez *P. aeruginosa* PAO1

Figure 18. Schéma représentant les différents modes d'action des antibiotiques altérant l'enveloppe cellulaire

Figure 19. Structure de la tobramycine

Figure 20. Les systèmes à deux composants impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe chez *P. aeruginosa*.

Figure 21. Structure moléculaire des facteurs sigma primaires (σ70) et des ECF

Figure 22. Modèle des systèmes de transport et de régulation du citrate de fer chez *E. coli*

Figure 23. Représentation de la cascade protéolytique conduisant à l'activité d'AlgU

Figure 24. Environnement génomique de *sigX* chez *P. aeruginosa* PAO1.

Figure 25. Potentielles fonctions de SigX chez *P. aeruginosa* PAO1 et PA14 selon les conditions d'études.

Figure 26. Effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* H103

Figure 27. Effet de la tobramycine (0,8 µg.ml^{-1}) sur l'expression des gènes codant les facteurs sigma ECF SigX, AlgU et leurs cibles chez H103 cultivée en biofilm pendant 24 heures

Figure 28. Analyse *in situ* de l'expression de *sigX* chez *P. aeruginosa* H103 cultivée en biofilm en présence ou en absence de tobramycine

Figure 29. Effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAOSX

Figure 30. Effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAOSX+.

Figure 31. Effet de la tobramycine sur le taux intracellulaire de c-di-GMP chez H103 cultivée en biofilm pendant 24 heures.

Figure 32. Effet de la tobramycine sur la composition de la matrice des biofilms de H103 et PAOSX.

Figure 33. Représentation schématique du contrôle de l'utilisation des sources de carbone et d'azote par le système à deux composants CbrAB chez *P. aeruginosa*.

Figure 34. Représentation schématique de l'ensemble des résultats obtenus lors de ces travaux de thèse.

Tables :

Table 1. Principaux facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa*

Table 2. Composition des unités d'antigène O chez les souches de référence de *P. aeruginosa*

Table 3. Pompe à efflux de la famille RND chez *P. aeruginosa*

Table 4. Homologies entre les mécanismes contrôlant l'activité des ECF AlgU de *P. aeruginosa* et RpoE.d'*E.coli*

Table 5. Souches utilisées dans cette étude

Table 6. Composition des milieux de culture.

Table 7. Plasmides utilisés dans cette étude

Table 8. Amorces utilisées dans cette étude

Table 9. Variation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe et la production d'ADNe chez H103 et PAOSX cultivée en biofilm en LB ou LBT

I- *Pseudomonas aeruginosa*

1- Présentation du modèle

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif capable de se développer dans de nombreux environnements grâce à un métabolisme très versatile lui permettant d'utiliser divers composés comme source énergétique. Le génome de *P. aeruginosa* contient 6.3 millions de paires de bases et 5570 cadres de lecture ouverts ou Open Reading Frames (ORFs). Parmi ces ORFs, 8.4% sont prédits pour coder des systèmes de régulation et d'adaptation témoignant d'une complexité génétique et d'un grand pouvoir d'adaptation (Stover *et al.*, 2000). Ce « bacille pyocyanique » isolé pour la première fois d'une infection humaine par Gessard en 1882, est l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes. En effet, presque tous les cas cliniques d'infections à *P. aeruginosa* sont associés à une altération des défenses de l'hôte que ce soit des infections extra ou intra-hospitalières (Driscoll *et al.*, 2007). Aujourd'hui, *P. aeruginosa* est devenu un enjeu majeur en termes de sécurité sanitaire puisqu'il représente après *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, la 3ème cause d'infections nosocomiales en France (InVS, Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, 2012). Dans les unités de soins intensifs, *P. aeruginosa* est responsable de 13.8% des pneumonies chez des patients sous assistance respiratoire (Wałaszek *et al.*, 2016), 14.8% des infections du sang chez de patients en neurochirurgie (Tsitsopoulos *et al.*, 2016), 9% des infections du sang chez des patients atteints de cancer (El-Mahallawy *et al.*, 2016), et 13 à 44% des infections de la peau chez les grand brulés, en Europe et aux Etats unis respectivement (Branski *et al.*, 2009). Ce germe est notamment connu pour son implication dans l'aggravation des symptômes liés à la mucoviscidose. Les infections provoquées par *P. aeruginosa* sont de deux types, aigues et chroniques, et correspondent à des modes de vie (planctonique et sessile, respectivement), et des phénotypes distincts. La transition entre ces deux types d'infections répond à des facteurs environnementaux et est finement régulée par de nombreux systèmes de régulations (Coggan *et* Wolfgang, 2012).

2- Infections aigues

Les infections aigues sont généralement associées à un mode de vie planctonique où les bactéries sont mobiles, produisent et sécrètent de nombreux

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
Lipopolysaccharide (LPS)	Stimulation de la production de cytokines	Choc
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	Provoque le phénotype muqueux Adhésion aux cellules trachéales Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire	Pathogénicité respiratoire Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux antibiotiques Responsable du caractère mucoïde des souches
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules cibles	Mort cellulaire : nécrose tissulaire Rôle important dans la virulence
Exoenzyme S	Effet cytotoxique Prolifération des LT	Nécrose tissulaire Entraîne des lésions du glycopeptide, de la vimentine et des IgG et IgA
Exoenzyme U	Rôle antiphagocytaire	Lésions des cellules épithéliales Responsable de bactériémie voire de choc septique
Rhamnolipide	Effet détergent	Hydrolyse du surfactant
Elastases (LasA+LasB)	Dégradation de l'élastine, de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	Destruction des tissus contenant de l'élastine Rôle important dans la virulence
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes
Pyocyanine + Pyoverdine	Action bactéricide sur les autres bactéries Augmentation de la libération d'élastase Inhibition des battements des cils Captage du fer Induisent la synthèse de radicaux libres	Favorise l'émergence du bacille pyocyanique Diminution de la clairance des bacilles Rôle dans la survenue de vascularite d'artères pulmonaires.
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	Pathogénicité respiratoire Rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique local	Lyse des cellules cibles (atélectasie pulmonaire) Rôle dans l'infection aiguë et chronique.

Table 1. Principaux facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* (Khalifa *et al.*, 2011).

facteurs de virulence impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection, l'invasion, ou encore la dissémination. Ces facteurs de virulence sont soit des déterminants associés à la cellule tels que le lipopolysaccharide, le flagelle et les pilis, ou des facteurs sécrétés. Les facteurs associés à la cellule sont généralement des composants de la cellule bactérienne dont la présence chez l'hôte entraine une réponse inflammatoire. Le lipopolysaccharide est un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Egalement connu sous le terme d'endotoxine, il entraine une réponse inflammatoire importante pouvant parfois causer un choc septique et entrainer la mort (Ramachandran, 2014). Le flagelle et les pilis sont des appendices permettant à *P. aeruginosa* d'être mobile et ainsi de coloniser et de se disséminer au sein des tissus cellulaires de l'hôte. Ces appendices sont également impliqués dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales (Bucior *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* est capable de produire également de nombreuses enzymes, toxines et autres protéines impliquées dans la cytotoxicité vis-à-vis des cellules de l'hôte. Ainsi, parmi les enzymes on trouve des élastases, des protéases et des phospholipases qui dégradent les composés cellulaires de l'hôte. Les toxines peuvent être secrétées dans le milieu extracellulaire ou injectées directement dans le cytoplasme de la cellule hôte *via* des systèmes de sécrétion. La pyocyanine est un pigment bleu secrété par la bactérie provoquant notamment un stress oxydatif (Hall *et al.*, 2016). La pyoverdine est un chélateur du fer qui est impliqué dans la régulation d'autres facteurs de virulence (tels que l'exotoxine A et l'endoprotéase PrpL) et dans sa propre régulation (Beare *et al.*, 2003). Les principaux facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* sont listés dans la table 1.

3- Régulation de la virulence

La capacité de *P. aeruginosa* à provoquer différents types d'infections repose sur sa capacité à contrôler l'expression de ses gènes en réponse à des stimuli environnementaux. *P. aeruginosa* possède de nombreux systèmes de régulation capables de percevoir des conditions environnementales particulières et d'intégrer les informations dans le but de moduler en conséquence l'expression de ses gènes ou de son comportement (Stover *et al.*, 2000). Deux systèmes majeurs sont impliqués dans

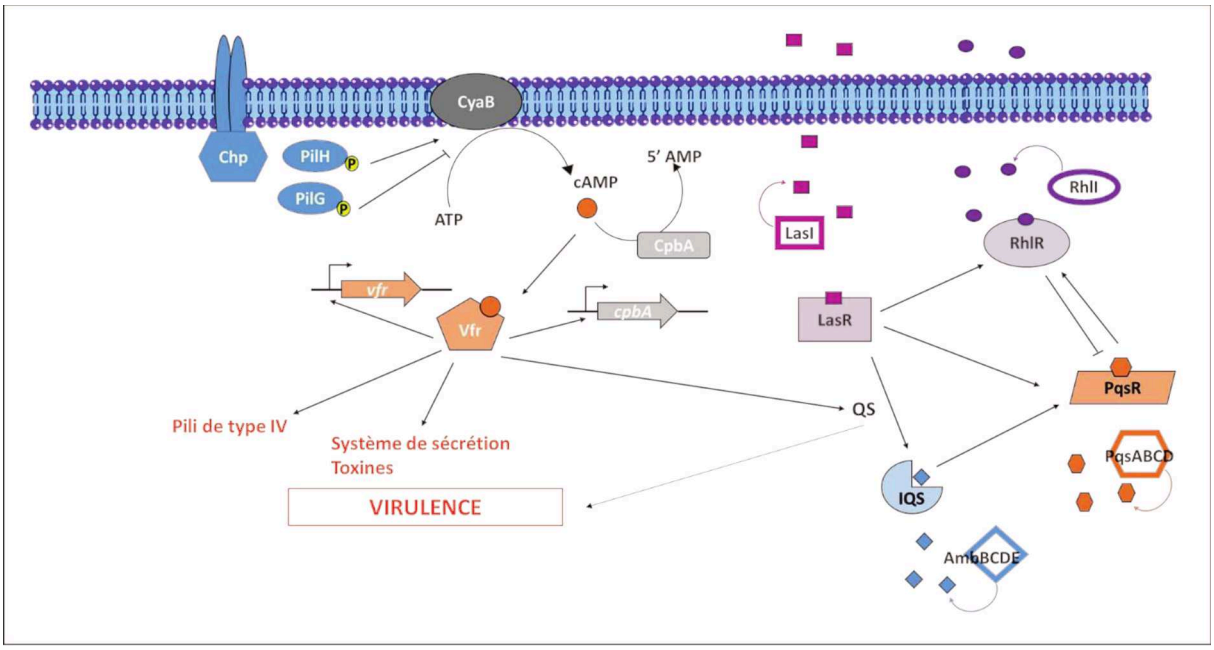


Figure 1. Représentation schématique de la régulation de la virulence de *P. aeruginosa* (adapté de Coggan et Wolfgang, 2012 ; Lee et Zhang, 2015). **cAMP/Vfr** : Le cAMP intracellulaire est majoritairement synthétisé par CyaB, dont l'activité adénylate cyclase est modulée par le système chimiosenseur Chp, et dégradée par la phosphodiestérase CpbA. En quantité suffisante, le cAMP fixe et active le régulateur transcriptionnel Vfr. Le système cAMP/Vfr régule de nombreux facteurs de virulence associés à une infection aigue. **Quorum sensing** : En quantité suffisante, les molécules auto-inductrices produites par LasI, RhlI, PqsABCD et AmbBCDE activent les régulateurs LasR, RhlR, PqsR et IQS respectivement. Activés, ces régulateurs contrôlent la production de nombreux facteurs de virulence.
Les flèches indiquent une stimulation. Les lignes perpendiculaires indiquent une inhibition.

l'expression de la virulence chez *P. aeruginosa*, le système cAMP/Vfr et le Quorum sensing.

a- La voie cAMP/Vfr

Cette voie de signalisation repose sur la production d'un second messager, l'AMP cyclique ou cAMP (3',5'-adénosine monophosphate cyclique), capable de se lier et d'activer des régulateurs transcriptionnels de la famille des CRP (cAMP regulator protein). Le cAMP est une molécule largement retrouvée chez les bactéries. Il est produit par des enzymes ayant une activité adénylate cyclase, et dégradé par des enzymes ayant une activité cAMP phosphodiestérase. Chez *P. aeruginosa*, la production de cAMP est majoritairement due à l'enzyme CyaB dont l'activité est modulée par un système qui s'apparente à un système de chimiotactisme, le système Chp (Fulcher *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2004). Ces systèmes chimiosenseurs permettent à la bactérie de percevoir des variations de concentration de composés chimiques présents dans l'environnement et en réponse d'adapter leur comportement. Chez *P. aeruginosa*, le cAMP contrôle de nombreux gènes impliqués dans la virulence de la bactérie *via* la régulation allostérique de Vfr, un régulateur transcriptionnel de la famille CRP (virulence factor regulator) (West *et al.*, 1994). En effet, la liaison du cAMP sur la protéine Vfr entraine un changement de conformation du régulateur permettant ainsi sa fixation sur des séquences d'ADN spécifiques et l'initiation ou la répression de la transcription de gènes cibles. Parmi les gènes positivement contrôlés par le complexe cAMP/Vfr, on trouve notamment les gènes codant des enzymes de dégradation, des toxines secrétées, et des systèmes de sécrétion, ainsi que des gènes impliqués dans la biosynthèse des pilis de type IV (Beatson *et al.*, 2002; Davinic *et al.*, 2009; Wolfgang *et al.*, 2003). Vfr intervient aussi dans la régulation du gène *cdpA* codant une phosphodiestérase impliquée dans la dégradation du cAMP. Cette boucle de rétroaction négative permet ainsi à la bactérie de contrôler le taux de cAMP et de maintenir l'homéostasie au sein de la cellule (Fuchs *et al.*, 2010). Le système cAMP/Vfr intervient également dans le contrôle des systèmes Las et Rhl du quorum sensing, des systèmes de communication intercellulaire permettant une expression synchronisée des gènes en fonction de la densité cellulaire (Albus *et al.*, 1997; Croda-García *et al.*, 2011). L'interconnexion entre ces voies témoigne d'une nécessité de contrôler finement l'expression génétique afin d'adapter au mieux le comportement de la cellule (Figure 1).

b- Le quorum sensing

Le quorum sensing est un système de communication intercellulaire permettant l'expression coordonnée de gènes en fonction de la densité cellulaire. Les bactéries produisent et libèrent de petites molécules signales diffusibles appelées autoinducteurs. Au fur et à mesure que la densité cellulaire augmente, ces molécules s'accumulent dans le milieu extracellulaire. Lorsque le seuil de concentration en autoinducteurs est atteint, ces molécules se lient à leur récepteurs, induisant directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes dont ceux impliqués dans la production de facteurs de virulence (Rutherford *et* Bassler, 2012). *P. aeruginosa* possède 4 systèmes de quorum sensing, les systèmes Las et Rhl basés sur la production de N-acyl-homosérine lactones (AHLs), le système PQS basé sur la production de 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolones ou *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) ,et le système IQS (Integrated quorum sensing system) dont la molécule autoinductrice est un carbaldéhyde (Lee *et* Zhang, 2015). Ensemble, ces systèmes contrôlent de nombreux gènes impliqués dans la production de facteurs de virulence et la mobilité des bactéries (Coggan *et* Wolfgang, 2012; Nadal Jimenez *et al.*, 2012). Le système Las par exemple contrôle l'expression de gènes codant des enzymes de dégradation (l'elastase LasB, la protéase LasA, l'alcaline protéase) tandis que les systèmes Rhl et PQS sont impliqués dans la production de facteurs de virulence secrétés tel que la pyocyanine et le cyanure d'hydrogène (HCN) (Lee *et* Zhang, 2015). Le système IQS semble lui impliqué dans la régulation des systèmes Rhl et PQS *(Lee et al.*, 2013). Un degré de complexité dans la régulation du mode de vie chez *P. aeruginosa*, est atteint avec l'existence entre ces systèmes d'une interconnexion et d'une relation hiérarchique avec au sommet le système Las qui contrôle l'activité des systèmes Rhl, PQS et IQS (Lee *et* Zhang, 2015) (Figure 1).

4- Infections chroniques

Selon Hoiby *et al.*, une infection chronique est «une infection qui persiste en dépit des traitements antibiotiques et de l'action du système immunitaire de l'hôte, et qui est caractérisée par une réponse immunitaire et une pathologie persistantes» (Høiby *et al.*, 2011). Ces infections sont liées à la formation d'un biofilm bactérien, et sont favorisées par la mise en place de dispositifs médicaux invasifs tels que les sondes

urinaires, vésicales ou les cathéters intravasculaires. Elles nécessitent souvent un retrait du dispositif pour traiter efficacement l'infection. Ce type d'infection est également retrouvé chez des sujets atteints de mucoviscidose (Bjarnsholt *et al.*, 2009). La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive caractérisée par la mutation du gène *cftr* « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». Le défaut ou l'absence de ce régulateur affecte le transport ionique au niveau des membranes apicales des glandes exocrines entrainant un effet pléiotropique sur l'organisme et notamment une inflammation du système respiratoire. La production d'un mucus épais crée un environnement favorable au développement de pathogènes opportunistes (Crabbé *et al.*, 2014; Hassett *et al.*, 2009). Chez les sujets adultes, *P. aeruginosa* est le pathogène majoritairement responsable de l'atteinte pulmonaire, et sa persistance est la cause de la dégradation progressive des fonctions respiratoires et de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité (Goetz *et* Singh, 2016).

Dans la littérature, de nombreuses études conduisent à l'hypothèse que les réseaux de régulation contrôlant la formation de biofilm, jouent un rôle important dans la transition entre infections aigue et chronique (Coggan *et* Wolfgang, 2012).

II- Biofilm de *P. aeruginosa*

1- Définition

Le biofilm est un mode de vie multicellulaire dans lequel les bactéries sont attachées irréversiblement à une surface biotique ou abiotique et entourées d'une matrice exocellulaire, composée de polysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire, qu'elles produisent elles même (Donlan *et* Costerton, 2002). La formation de biofilm est un processus « cyclique » et est initiée par l'attachement réversible de cellules planctoniques sur une surface. Cet attachement devient ensuite irréversible formant ainsi la base du biofilm mature. La prolifération et la production de la matrice exocellulaire permet ensuite la formation de microcolonies puis plus tard un biofilm mature adoptant généralement une forme en « champignon » où les bactéries sont concentrées dans des structures tridimensionnelles contenant des canaux permettant la diffusion de nutriments au sein du biofilm. Enfin la dernière étape de la formation de biofilm est la dispersion de cellules du biofilm mature. Ces cellules se

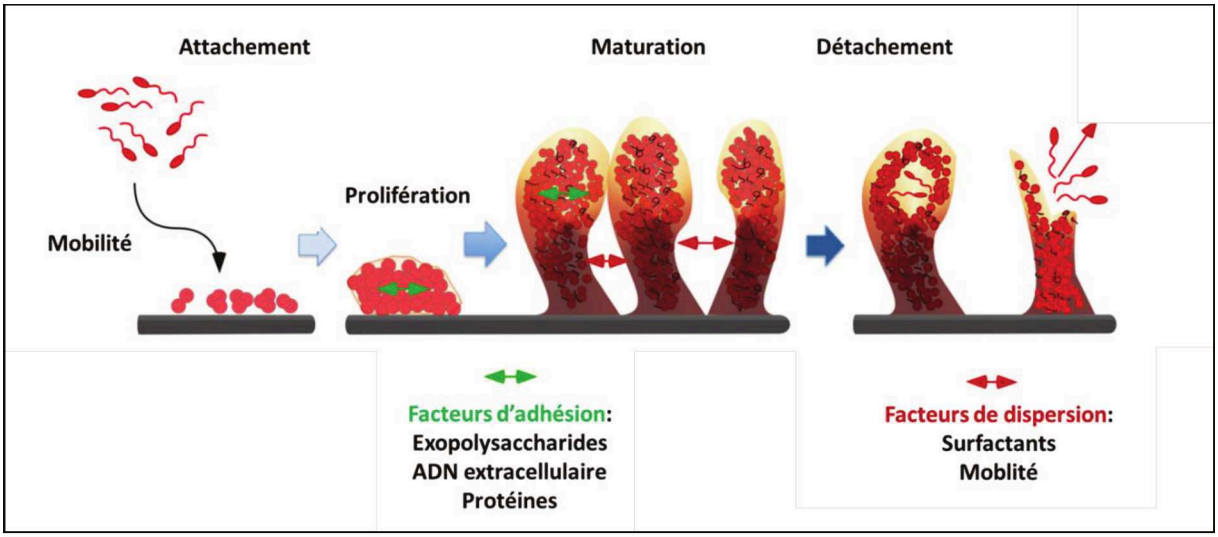


Figure 2. Etapes de formation du biofilm (Joo et Otto, 2012). La formation de biofilm débute par l'attachement irréversible de bactéries sur une surface. La prolifération et la production de la matrice exocellulaire permet d'obtenir un biofilm mature. La production de facteurs de dispersion et l'expression de gènes impliqués dans la mobilité permet le détachement des cellules du biofilm mature et la colonisation de nouvelles surfaces.

détachent du biofilm pour reprendre un mode de vie planctonique et ainsi coloniser de nouvelles surfaces sur lesquelles elles pourront établir de nouveaux biofilms (Joo *et* Otto, 2012), (Figure2).

La formation de biofilm est largement dépendante des conditions environnementales. Il est décrit dans la littérature que des conditions environnementales telles que la disponibilité de l'oxygène, de certains composés nutritifs, le pH, la température ou encore la présence d'antibiotiques favorisent la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Kumar *et* Ting, 2016; Scoffield *et* Silo-Suh, 2016; Toyofuku *et al*., 2015). Ces facteurs environnementaux déterminent également l'architecture du biofilm et la composition de la matrice exocellulaire permettant ainsi aux cellules à la fois de se protéger des variations de l'environnement mais également d'adapter en fonction de l'environnement la diffusion des nutriments au sein du biofilm ou l'évacuation de composés toxiques. En effet, Ghanbari *et al.* ont montré qu'à faible densité cellulaire et à faible de taux de nutriments, les bactéries forment de petites microcolonies réparties de manière uniforme. En revanche, lorsque la densité cellulaire de l'inoculum est augmentée, les bactéries ont tendance à former des structures de plus en plus hautes et fortement connectées suggérant que la compétition entre les cellules vis-à-vis de la disponibilité des nutriments est un paramètre important pour l'architecture du biofilm (Ghanbari *et al*., 2016).

2- La matrice exocellulaire

La matrice joue un rôle essentiel dans la stabilité du biofilm mais également dans la protection des cellules contre l'action du système immunitaire de l'hôte et des antimicrobiens (Parsek *et* Singh, 2003; Rybtke *et al*., 2015b; Ryder *et al*., 2007). La composition de la matrice varie selon le contexte génétique, les conditions nutritionnelles et les différentes phases de développement du biofilm (Wei *et* Ma, 2013).

a- Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des carbohydrates polymériques composés d'unités monosaccharidiques liées entre elles par des liaisons glycosidiques. Plusieurs polysaccharides contribuent selon la souche, à la formation de la matrice chez *P. aeruginosa* : Psl, Pel, les alginates et les β-glucanes cycliques.

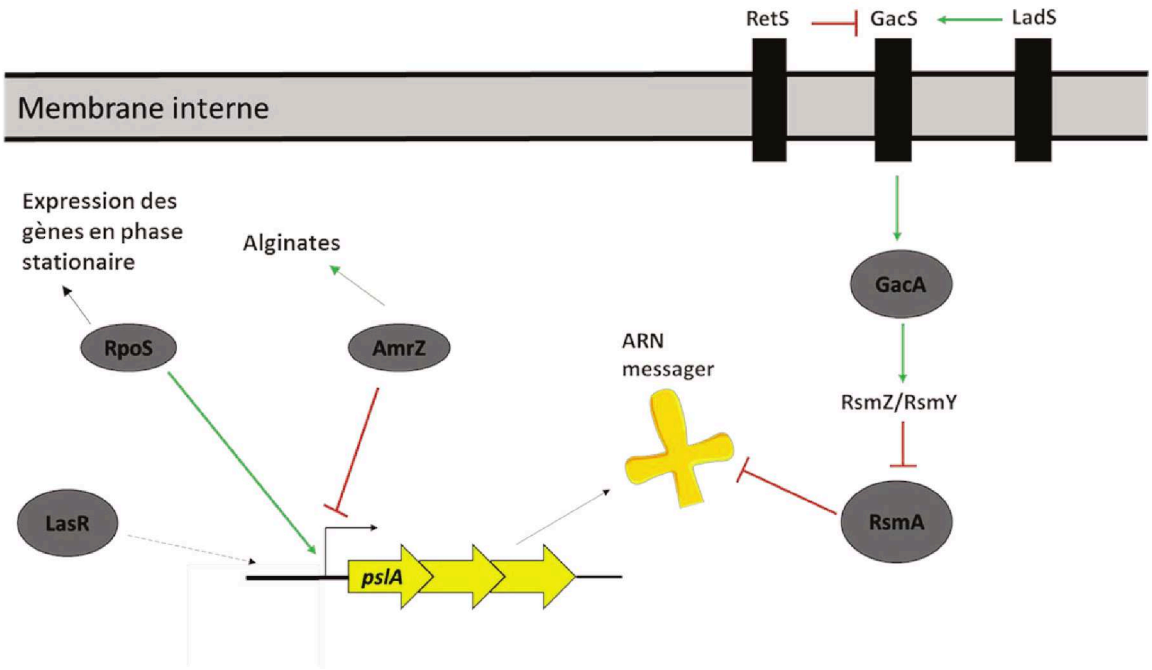


Figure 3. Représentation schématique de la régulation de *psl*. L'opéron *psl* dont le premier gène est *pslA* est positivement régulé par le facteur sigma de phase stationnaire RpoS et négativement régulé par le régulateur de la synthèse d'alginate AmrZ, au niveau transcriptionnel. La production de Psl est contrôlée au niveau post trancriptionnel par le système Gac/Rsm.

i. Le polysaccharide Psl

Psl pour « Polysaccharide Synthesis Locus » est formé par la répétition de penta saccharides de D-mannose, D-glucose et L-rhamnose (Byrd *et al*., 2009). Non synthétisé chez *P. aeruginosa* PA14, ce polysaccharide joue un rôle important dans l'initiation de la formation de biofilm de la souche PAO1 sur des surfaces biotiques et abiotiques (Jackson *et al*., 2004). Produit lors de la croissance planctonique, il favorise les interactions cellules-cellules et cellules-surface permettant ainsi la formation de microcolonies. Durant la maturation du biofilm, Psl est localisé à la périphérie des structures tridimensionnelles et intervient ainsi dans le maintien de l'architecture du biofilm (Ma *et al*., 2009). Les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de Psl sont organisés en un cluster de 15 gènes (*pslA* à *pslO*) et il a été montré que les gènes *pslA*, *pslB* et *pslD,* prédits pour être respectivement des transférases et un transporteur, sont essentiels pour la formation de biofilm et la synthèse de Psl (Byrd *et al., 2009; Overhage et al., 2005)*. L'expression de *psl* est régulée positivement au niveau transcriptionnel par le facteur sigma alternatif RpoS, impliqué dans l'initiation de la transcription des gènes en phase stationnaire (Irie *et al*., 2010). Un second contrôle positif de l'expression de *psl* a été suggéré par Gilbert et collègues lors d'une étude du régulon de LasR, le régulateur transcriptionnel du système LasI/LasR. En effet, cette étude a révélé que LasR serait capable de se fixer en amont du gène *pslA* suggérant que l'expression du cluster *psl* serait également sous le contrôle du QS (Gilbert *et al*., 2009). L'expression de *psl* est également négativement régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel par deux protéines, AmrZ et RsmA, respectivement. AmrZ est un facteur de transcription régulant positivement l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'alginate, un autre polysaccharide impliqué dans la formation de biofilm de *P. aeruginosa*. Cependant *in vitro,* AmrZ est capable de se lier au promoteur de *pslA* empêchant ainsi l'initiation de la transcription des gènes du locus *psl* (Jones *et al*., 2013). La régulation de l'expression de *psl* au niveau post-transcriptionnel est effectuée par RsmA (Irie *et al*., 2010), (figure 3). RsmA est une protéine de liaison à l'ARN dont l'activité est modulée par le système Gac/Rsm qui sera décrit ultérieurement (Chapitre I, partie 3). Enfin il est décrit dans la littérature qu'en plus de son rôle dans l'initiation et l'organisation du biofilm, Psl serait impliqué dans la résistance et la pathogénicité du biofilm. En effet il a été démontré que Psl joue un rôle dans la défense contre les antibiotiques dans les phases initiales de la

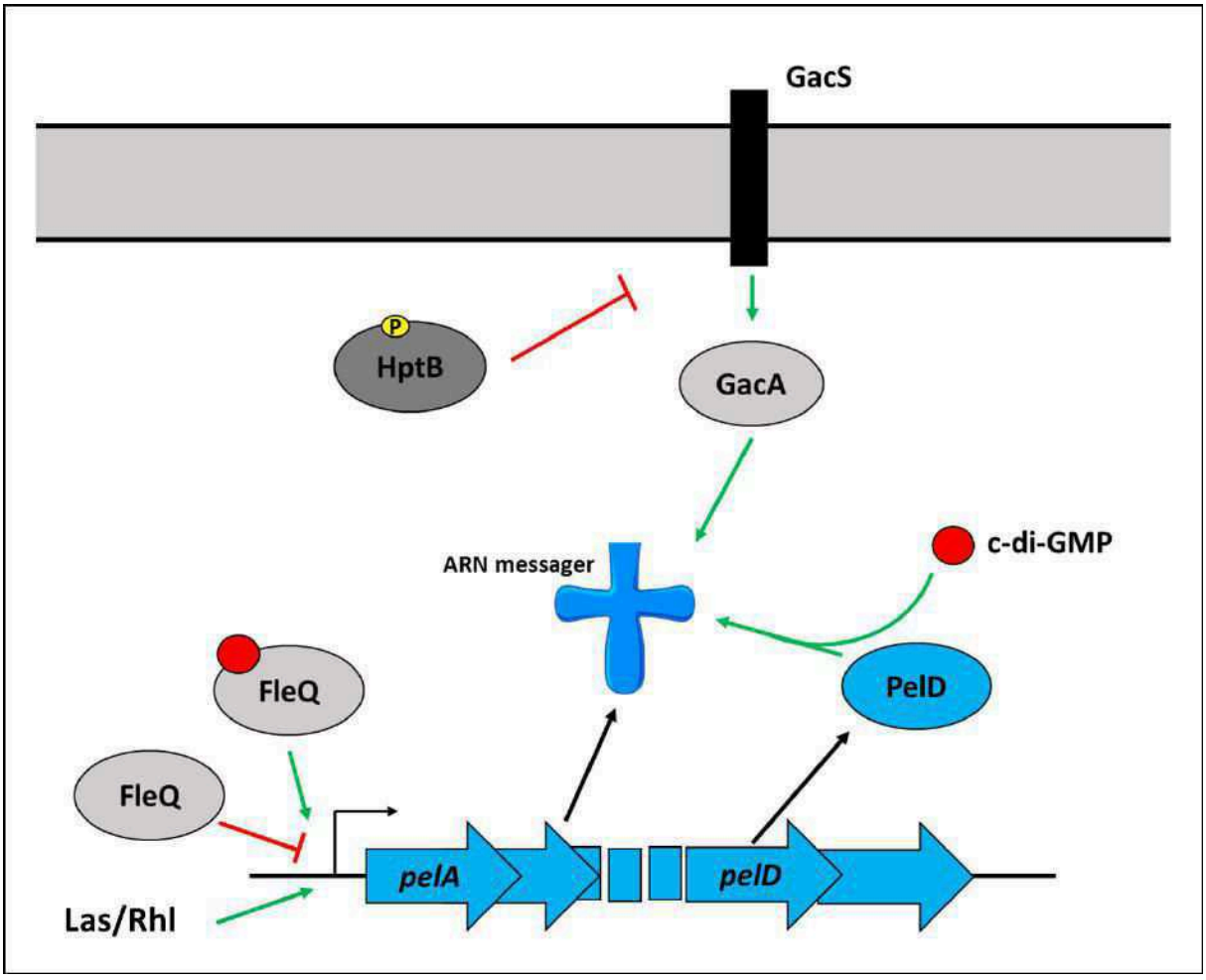


Figure 4. Représentation schématique de la régulation de *pel*. L'opéron *pel* est positivement régulé par le quorum sensing et le c-di-GMP au niveau transcriptionnel. En absence de c-di-GMP, la protéine FleQ se fixe sur la région promotrice de l'opéron *pel* empêchant la fixation de l'ARN polymérase. A un taux intracellulaire élevé, le c-di-GMP se lie à FleQ qui libère la région promotrice de *pel*. En même temps, FleQ sous sa forme liée au c-di-GMP est capable de se fixer sur une autre région du promoteur stimulant la transcription de *pel*. Au niveau post transcriptionnel, *pel* est contrôlé négativement par la protéine HptB phosphorylée dont l'activité antagonise le système Gac/Rsm, et positivement par la protéine PelD liée au c-di-GMP.

formation de biofilm en limitant l'interaction des antibiotiques (colistine, polymyxine B, tobramycine, ciprofloxacine) avec les cellules bactériennes (Billings *et al*., 2013). Ce polysaccharide est également impliqué dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales pulmonaires entrainant une réponse pro-inflammatoire via l'activation du NFκB (Byrd e*t al*., 2010). NFκB est un facteur de transcription des cellules eucaryotes impliqué dans la réponse immunitaire et le stress cellulaire. Il permet notamment d'activer les cellules phagocytaires en réponse à une infection bactérienne. Enfin Psl intervient dans la protection des cellules bactériennes contre l'action du système immunitaire de l'hôte en réduisant la reconnaissance des cellules infectieuses par le système immunitaire, et par conséquent en diminuant la phagocytose (Mishra *et al*., 2012).

ii. Le polysaccharide Pel

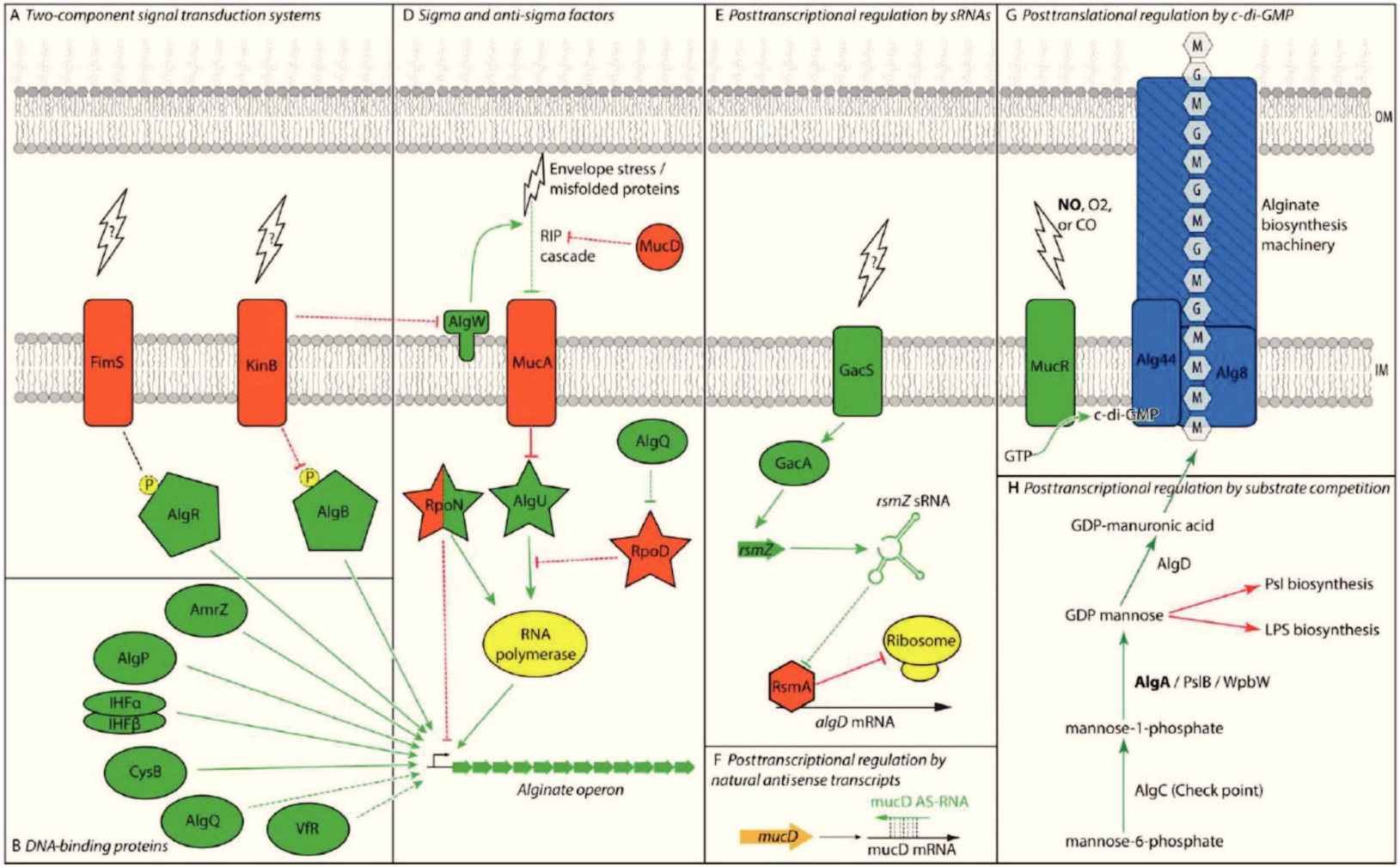
Pel est un polysaccharide cationique riche en N-acétyl-galactosamine et N-acétyl-glucosamine (Jennings *et al*., 2015). Bien que son rôle ne soit pas clairement défini, Pel est essentiel à la formation de biofilm à l'interface air-liquide, en condition statique, et est requis pour l'attachement à des surfaces solides (Ghafoor *et al*., 2011; Vasseur *et al*., 2005). Chez *P. aeruginosa* PA14, puisque Psl n'est pas produit, Pel joue un rôle majeur dans l'initiation de la formation de biofilm en permettant les interactions cellules-cellules, servant ainsi de support structural pour la communauté (Colvin *et al*., 2011). Chez *P. aeruginosa* PAO1, Pel participe avec les autres polysaccharides à l'initiation et la maturation du biofilm. Cependant la mutation de *pel* n'affectant pas la formation de biofilm chez cette souche. Il semble, contrairement à *P. aeruginosa* PA14, que son rôle soit moins important que Psl (Colvin *et al*., 2011, 2012). Les gènes impliqués dans la biosynthèse de Pel sont organisés en un opéron de 7 gènes (*pelA* à *pelG*) codant des enzymes, des transporteurs et le régulateur PelD (Colvin *et al*., 2013; Ghafoor *et al*., 2013; Lee *et al*., 2007). PelD est une protéine localisée dans la membrane cytoplasmique qui possède un domaine de fixation au c-di-GMP. Le c-di-GMP est un second messager impliqué dans la transition entre les modes de vie planctonique et sessile de *P. aeruginosa* et dont le mécanisme d'action sera décrit dans la partie 3. Il a été montré que la fixation du c-di-GMP sur PelD est essentielle pour la synthèse de Pel suggérant que cette protéine agirait comme un effecteur du c-di-GMP, permettant une régulation post-transcriptionnelle de la biosynthèse de Pel (Lee *et al*., 2007; Whitney *et al*., 2012). En plus de PelD, le

c-di-GMP intervient également dans la régulation de *pel* via la protéine FleQ. FleQ est le régulateur majeur de la biosynthèse du flagelle dont l'activité est modulée par le c-di-GMP. Il a été proposé

qu'en absence et en présence de c-di-GMP, FleQ agirait respectivement comme un répresseur et un activateur de l'expression de *pel* (Baraquet *et al.*, 2012; Hickman *et* Harwood, 2008). Un second contrôle post-transcriptionnel de la biosynthèse de Pel a été proposé et fait intervenir HptB et le système Gac/Rsm. Lorsqu'il est activé, HptB agirait comme un répresseur de la production de Pel en antagonisant le système Gac/Rsm (Bordi *et al.*, 2010). Enfin, les systèmes Las et Rhl du quorum sensing ont été identifiés comme étant impliqués dans la régulation positive de *pel* (Sakuragi *et* Kolter, 2007) (Figure 4). Comme Psl, Pel joue un rôle dans l'organisation et la structure du biofilm mais également dans la protection des cellules au sein du biofilm. En effet il a été montré que chez *P. aeruginosa* PA14, la surexpression et la mutation de *pel* diminue et augmente respectivement la sensibilité du biofilm aux antibiotiques et plus particulièrement aux aminoglycosides. Le mécanisme par lequel Pel confère une protection des cellules contre les antibiotiques n'est pas connu. Cependant, Il a été suggéré que Pel pourrait intervenir en liant ou en séquestrant les antibiotiques, ou en modifiant la structure du biofilm qui en retour influencerait la sensibilité aux antibiotiques (Colvin *et al.*, 2012).

iii. L'alginate

L'alginate est un polysaccharide anionique composé d'acide mannuronique et d'acide glucuronique, retrouvé dans la matrice extracellulaire des biofilms de *P. aeruginosa* mucoïdes. Ce polysaccharide n'est pas essentiel pour la formation de biofilm puisque des souches non mucoïdes, prédominantes dans l'environnement, sont capables de former des biofilms dont la matrice extracellulaire est composée des polysaccharides Pel et Psl uniquement (Wozniak *et al.*, 2003). Cependant il a été suggéré que la production d'alginates serait nécessaire pour la survie du biofilm en conditions de faible hydratation, une condition retrouvée dans l'environnement pulmonaire de patients atteint de mucoviscidose (Boucher, 2007; Chang *et al.*, 2007). Lorsqu'il est surproduit ce polysaccharide augmente également la résistance aux antibiotiques tel que la tobramycine, et protège les bactéries contre les espèces réactives de l'oxygène libérées par les cellules immunitaires de l'hôte (Cao *et al.*, 2016;


A Two-component signal transduction systems
FimS
KinB
AlgR
AlgB
B DNA-binding proteins
AmrZ
AlgP
IHFα
IHFβ
CysB
AlgQ
VfR
D Sigma and anti-sigma factors
Envelope stress / misfolded proteins
RIP cascade
MucD
AlgW
MucA
RpoN
AlgU
AlgQ
RpoD
RNA polymerase
Alginate operon
E Posttranscriptional regulation by sRNAs
GacS
GacA
rsmZ sRNA
rsmZ
RsmA
Ribosome
algD mRNA
F Posttranscriptional regulation by natural antisense transcripts
mucD AS-RNA
mucD
mucD mRNA
G Posttranslational regulation by c-di-GMP
NO, O2, or CO
MucR
Alg44
Alg8
c-di-GMP
GTP
Alginate biosynthesis machinery
OM
IM
H Posttranscriptional regulation by substrate competition
GDP-manuronic acid
AlgD
GDP mannose
Psl biosynthesis
LPS biosynthesis
AlgA / PslB / WpbW
mannose-1-phosphate
AlgC (Check point)
mannose-6-phosphate

Mathee *et al.*, 1999). Les 12 gènes impliqués dans la biosynthèse d'alginate sont organisés en un opéron et sont principalement transcrits à partir du promoteur du premier gène de l'opéron, *algD*. Les mécanismes moléculaires conduisant à la surproduction d'alginates ont été largement étudiés et il est maintenant établi que le facteur sigma à fonction extracytoplasmique AlgU est au sommet de la cascade de régulation contrôlant positivement la transcription d'*algD* (Hay *et al.*, 2014). AlgU est un facteur sigma ECF, c'est-à-dire une sous-unité de l'ARN polymérase permettant l'initiation de la transcription d'un certain nombre de gènes, dont l'activité est modulée en réponse à des signaux extracytoplasmiques. Il sera décrit ultérieurement dans cette introduction. En plus du gène *algD*, l'expression des gènes codant la plupart des régulateurs transcriptionnels du promoteur P_{algD} est dépendante d'AlgU : c'est le cas d'*algR* codant le régulateur du système à deux composants AlgZ/AlgR, *algB* codant le régulateur du système KinB/AlgB et *amrZ* codant le régulateur d'alginate et de motilité AmrZ. En plus d'un contrôle positif au niveau transcriptionnel par les régulateurs AlgR, AlgB et AmrZ, la biosynthèse d'alginate est également régulée au niveau post-transcriptionnel par GacA et post-traductionnel par le c-di-GMP. La régulation par le c-di-GMP fait intervenir Alg44 et MucR. Alg44 est une protéine transmembranaire constituée d'un domaine cytoplasmique possédant un site de fixation pour le c-di-GMP. Bien que le rôle d'Alg44 dans la régulation de la synthèse d'alginate ne soit pas clairement défini, il est établit que l'activité de cette protéine est essentielle pour la polymérisation de l'alginate (Oglesby *et al.*, 2008). MucR est une protéine localisée dans la membrane cytoplasmique possédant à la fois une activité diguanylate cyclase et une activité phosphodiestérase. Il a été suggéré que MucR serait responsable de la production d'un pool de c-di-GMP à proximité d'Alg44 lors de la croissance en biofilm, et de la dégradation de ce c-di-GMP lorsque les cellules adoptent un mode de vie planctonique (Li *et al.*, 2013; Y. Wang *et al.*, 2015), (Figure 5).

iv. Le β-glucane cyclique

L'analyse de la composition en carbohydrates des biofilms formés par *P. aeruginosa* PA14 et un mutant *retS* de *P. aeruginosa* PAK a permis d'identifier un polysaccharide appartenant à la famille des glucanes cycliques, composé de 12 à 16 résidus glucose dont au moins 50% sont phosphorylés (Sadovskaya *et al.*, 2010). Il a été suggéré que ce polysaccharide jouerait un rôle dans l'architecture du biofilm de *P. aeruginosa* PA14 notamment dans la formation de la pellicule à l'interface air-liquide

(Coulon *et al.*, 2010). Bien que les mécanismes moléculaires conduisant à la production de ce polysaccharide ne soient pas connus, le gène *ndvB* codant une glycosyltransférase, a été identifié comme étant essentiel pour la biosynthèse du β-glucane cyclique (Sadovskaya *et al.*, 2010). NdvB a également été identifiée comme étant impliqué dans la résistance du biofilm aux antibiotiques (Zhang *et al.*, 2013). En effet, les glucanes cycliques, de par leur forte charge négative sont capables d'interagir avec la kanamycine, un antibiotique cationique. Ils seraient ainsi capables de former des complexes moléculaires stabilisés par des interactions ioniques avec les antibiotiques chargés positivement, limitant alors leur diffusion au sein du biofilm (Mah *et al.*, 2003; Sadovskaya *et al.*, 2010).

b- L'ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) constitue un autre composant majeur de la matrice exocellulaire. Il semble être généré à partir d'ADN chromosomique aléatoire provenant de la sécrétion directe, de la lyse d'une partie de la population par les prophages, ou de la libération de vésicules membranaires (Spoering *et* Gilmore, 2006; Wei *et* Ma, 2013). L' ADNe serait principalement localisé à forte concentration dans les structures tridimensionnelles où il serait relié à Pel par des interactions ioniques (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Jennings *et al.,* 2015). Dans les pellicules ou dans des biofilm cultivés en condition de flux dynamique, il peut s'associer à Psl pour former un « squelette » de fibres Psl-ADNe formant ainsi un support pour l'attachement et le développement des bactéries (Wang *et al.*, 2015). De nombreuses études ont montré que l'ADNe joue également un rôle de chélateur de cation de par sa nature anionique, et confère ainsi une protection des cellules contre les antibiotiques et les peptides cationiques (Chiang *et al.*, 2013; Lewenza, 2013; Mulcahy *et al.*, 2008; Wilton *et al.*, 2015).

c- Les protéines

Contrairement aux polysaccharides, il existe dans la littérature très peu de données concernant les protéines de la matrice exocellulaire. Une analyse protéomique a révélé qu'elle est constituée de protéines secrétées, ou dérivées de débris cellulaires ou associées aux vésicules de membrane externe. On y trouve ainsi des enzymes impliquées dans la dégradation de macromolécules (chitinase, protéase alcaline, Protéase IV, LasA), des protéines impliquées dans la réponse au stress

oxydatif (catalase KatE, péroxydase, KatA), et des protéines associées aux polysaccharides (Toyofuku *et al*., 2012). Parmi ces dernières, CdrA, LecA et LecB ont été caractérisées chez *P. aeruginosa*. CdrA est une adhésine localisée à la surface de la cellule. Cette protéine intervient dans la formation de biofilm et l'auto-agrégation des cellules en reliant les polymères d'exopolysaccharides et/ou en ancrant Psl aux cellules (Borlee *et al*., 2010). La présence de CdrA à la surface de la cellule est régulée par une protéine possédant une homologie fonctionnelle avec la protéine LapG de *P. putida* et *P. fluorescens*. Chez ces bactéries LapG est une protéase périplasmique contrôlant la présence à la surface de la cellule de l'adhésine LapA essentielle pour la formation de biofilm. L'activité de LapG est régulée par une protéine localisée dans la membrane interne LapD possédant un site de fixation du c-di-GMP. En présence de c-di-GMP, LapD séquestre la protéine LapG l'empêchant ainsi de cliver LapA (Rybtke *et al*., 2015a). LecA et LecB sont des lipoprotéines également connues sous le nom de PA-IL et PA-IIL, respectivement. Les lectines sont des protéines liant les carbohydrates et présentant des spécificités de liaison vis-à-vis des sucres. LecA se lie aux résidus galactose, N-acétyl-galactosamine et glucose, et est impliquée dans la formation de biofilm sur des surfaces en polystyrène et en acier inoxydable (Diggle *et al*., 2006). LecB possède une forte affinité pour les résidus fucose mais peut également se lier à certains monosaccharides dont le L-galactose et le D-mannose et est impliquée dans la formation de biofilm sur verre (Fong *et* Yildiz, 2015; Funken *et al*., 2012).

d- Les vésicules membranaires

La production de vésicules membranaires est une caractéristique des bactéries à Gram négatif. Ces vésicules sphériques d'environ 90 nm de diamètre, sont des dérivés de la membrane externe et leur contenu varie en fonction de l'état physiologique de la cellule dont elles dérivent. Ainsi ces vésicules peuvent contenir des protéines périplasmiques telles que des protéases, des phosphatases et des toxines, et de l'ADN (Beveridge, 1999; Kadurugamuwa *et* Beveridge, 1995; Schooling *et al*., 2009). Aujourd'hui il est clairement établit que les vésicules membranaires sont un constituant important de la matrice exocellulaire. En effet, par microscopie électronique à transmission, Schooling et Beveridge ont observé la présence de vésicules membranaires au sein du biofilm formés dans des environnements naturels tels que les canalisations d'eau usées, les aquariums ou les rivières (Schooling *et* Beveridge,

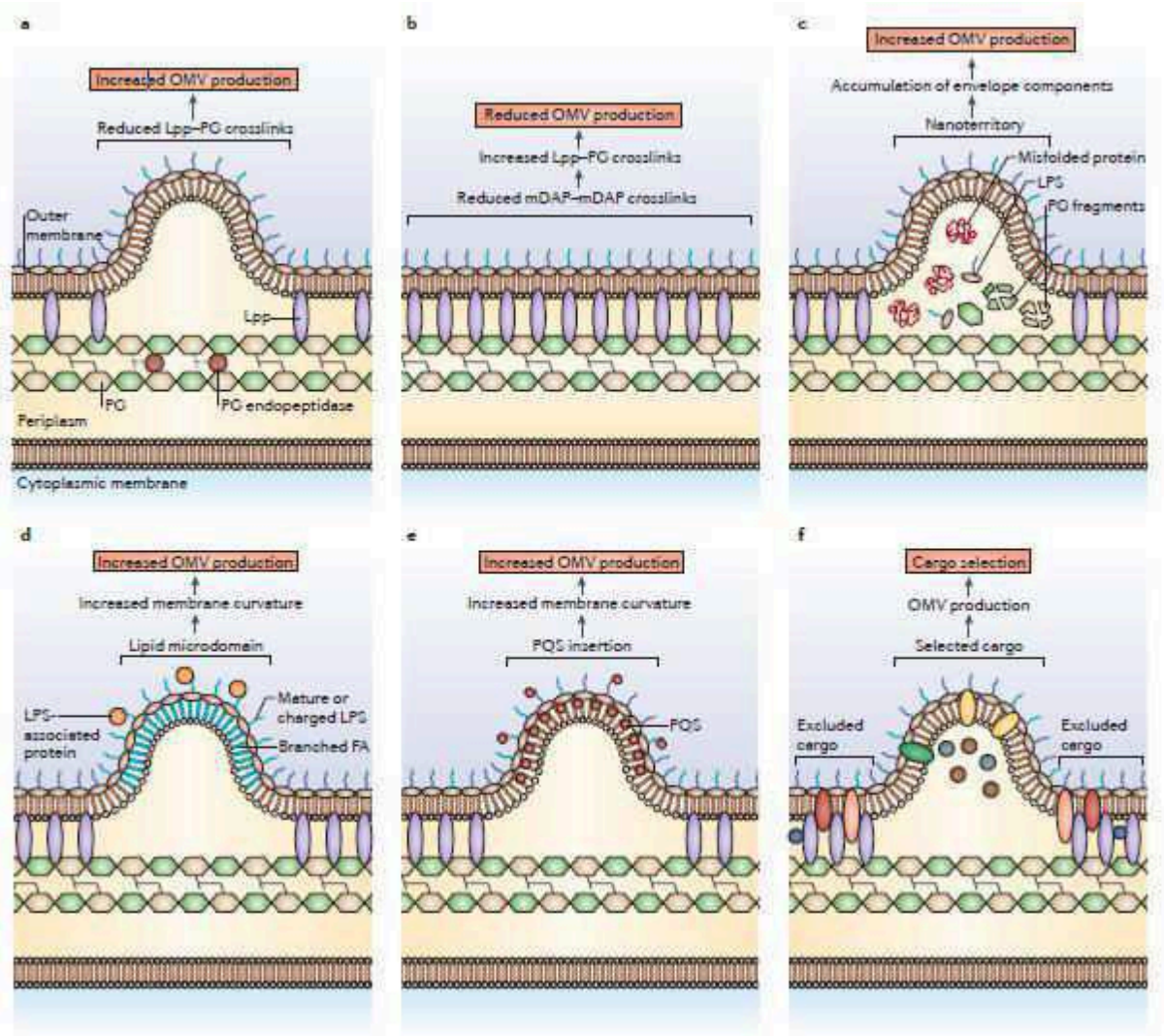


Figure 6. Représentation des facteurs influençant la production de vésicules membranaires (OMV) (Schwechheimer et Kuehn, 2015) : a) et b) le nombre de pontage entre les lipoprotéines de Braun (Lpp) et le peptidoglycane (PG), c) l'accumulation de protéines mal repliées ou de composés de l'enveloppe, d) la courbure de la membrane liée à la modification de la composition en lipides, e) la courbure de la membrane liée à l'insertion de molécule de PQS.
mDAP : acide *Méso*-diaminopimélique, FA ; acide gras (Fatty acid)

2006). Une analyse protéomique a révélé que les vésicules membranaires constituent environ 20% du protéome de la matrice de *P. aeruginosa* (Couto *et al*., 2015). Ces vésicules permettent la circulation de molécules biologiquement actives au sein d'une population bactérienne et jouent un rôle dans la prédation : certains de leurs composants (enzymes de dégradation du peptidoglycane, phosphatases alcalines, protéases) sont en effet capables de dégrader les bactéries avoisinantes. Ce mécanisme de prédation permet alors de cibler et de lyser certaines cellules libérant et augmentant ainsi la disponibilité de nutriments pour la communauté bactérienne (Beveridge *et al*., 1997). Il a également été suggéré que ces vésicules seraient impliquées dans l'agrégation des cellules et serviraient de plate-forme pour les interactions entre les polysaccharides, les protéines et l'ADNe (Kulkarni *et* Jagannadham, 2014). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la biosynthèse des vésicules membranaires restent à ce jour largement méconnus. Cependant plusieurs mécanismes ont été proposés. Ainsi les vésicules membranaires pourraient trouver leur origine dans le renouvellement naturel de l'enveloppe cellulaire. Elles pourraient également correspondre à une réponse à un stress, bien que la présence de composés cytosoliques ou le production de vésicules en conditions non stressantes n'expliquent pas ces théories (Kulkarni *et* Jagannadham, 2014; Macdonald *et* Kuehn, 2013). Il a également été proposé que la formation de vésicules serait due à l'accumulation de PQS dans la membrane externe, où cette molécule interagirait avec le lipopolysaccharide (LPS) déstabilisant et induisant une courbure de la membrane menant à la libération de vésicules (Mashburn-Warren *et al*., 2008; Schertzer *et* Whiteley, 2012), (figure 6).

3- Régulation de la formation de biofilm

La formation de biofilm est régulée par deux voies principales de signalisation impliquées dans la transition entre les modes de vie planctonique et sessile, la voie Gac/Rsm et la voie du c-di-GMP.

a- La voie Gac/Rsm

La voie Gac/Rsm repose sur un système à deux composants, le système GacS/GacA. Les systèmes à deux composants (TCS) sont composés d'une protéine senseur localisée dans la membrane interne et ayant une fonction histidine kinase et d'une protéine cytoplasmique, le régulateur de réponse. La transduction du signal du

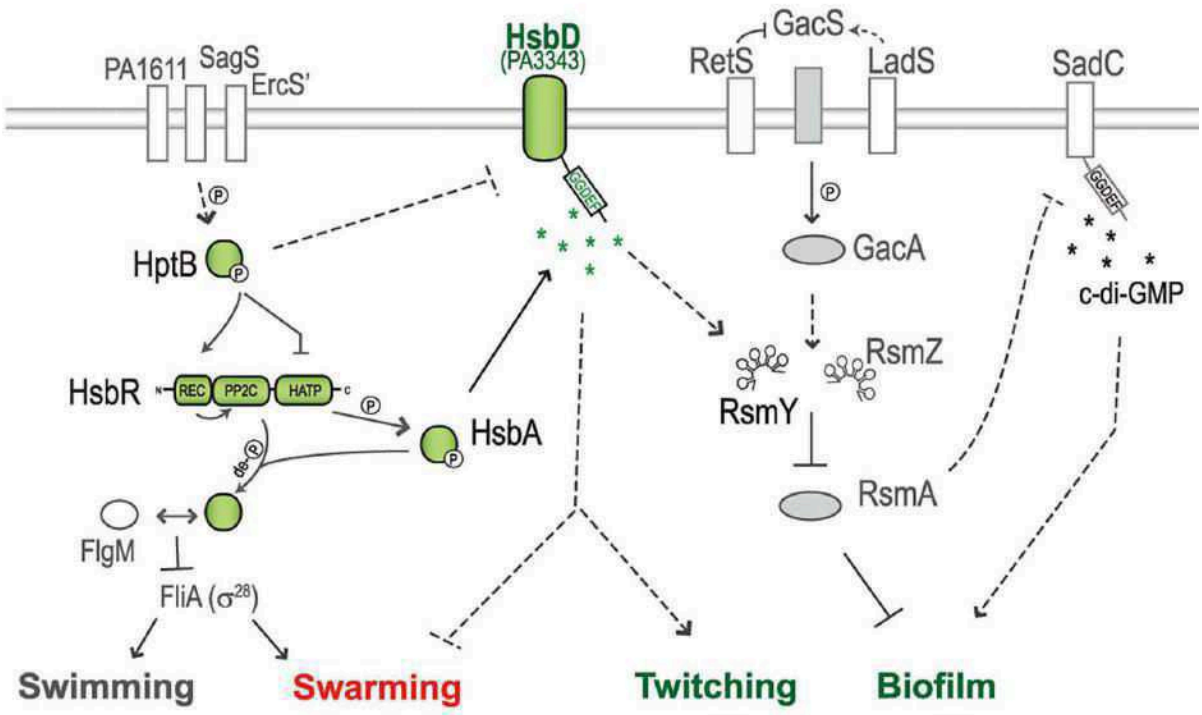


Figure 7 : La voie Gac/Rsm (Valentini *et al*., 2016). En présence d'un stimulus, le senseur GacS phosphoryle le régulateur de réponse GacA. GacA phosphorylé stimule la production de deux sncARNs RsmZ et RsmY. RsmZ et RsmY séquestrent la protéine RsmA empêchant son activité. En absence des sncARNs, RsmA réprime la formation de biofilm et stimule la production de facteurs de virulence. La protéine HptB phosphorylée par les senseurs PA1611, SagS et/ou ErcS, inhibe l'activité kinase et stimule l'activité phosphatase de HsbR. L'activité phosphatase de HsbR permet la déphosphorylation de HsbA qui interagit alors avec le facteur anti-sigma FlgM. L'interaction HsbA/FlgM permet la libération de FliA et l'expression des gènes impliqués dans la mobilité. En absence de HptB phosphorylée, l'activité kinase de HsbR phosphoryle HsbA. HsbA phosphorylée interagit avec HsbD stimulant la production de c-di-GMP et de RsmY.

senseur membranaire au régulateur cytoplasmique se fait par des mécanismes de phosphorylation (Mascher *et al.*, 2006). L'extrémité N-terminale de l'histidine kinase, localisée dans l'espace périplasmique, perçoit un signal spécifique. Des changements de conformation intramoléculaires permettent de transduire l'information jusqu'à l'extrémité C-terminale cytoplasmique, appelée domaine transmetteur de la protéine. Ce domaine est capable de lier l'ATP et possède une activité histidine kinase : il va ainsi s'autophosphoryler sur un résidu histidine conservé, conduisant à sa forme activée. Le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate conservé du domaine receveur du régulateur transcriptionnel. La phosphorylation du domaine receveur modifie l'activité du domaine dit de « sortie » (ou output) qui est généralement un domaine de liaison à l'ADN organisé en hélice-boucle-hélice. Dans la majorité des cas, la phosphorylation du régulateur modifie l'affinité de celui-ci pour une séquence spécifique de l'ADN (Gooderham *et* Hancock, 2009). Ces séquences appelées séquences consensus sont localisées dans les régions promotrices d'un certain nombre de gènes permettant ainsi au régulateur de moduler l'expression de ces gènes et d'apporter une réponse cellulaire adaptée. Dans le système GacA/GacS, GacS est le senseur histidine kinase et GacA le régulateur de réponse. GacA régule positivement l'expression de deux sncARNs, RsmZ et RsmY. Ces petits ARNs sont des régulateurs post-traductionnels puisqu'ils sont capables de séquestrer la protéine régulatrice RsmA empêchant ainsi son activité (Brencic *et al.*, 2009). RsmA une protéine de liaison à l'ARN, qui module l'initiation de la traduction ou altère la stabilité des ARNs messagers cibles. RsmA est un régulateur post-transcriptionnel global qui contrôle l'expression de plus de 500 gènes. Ces gènes sont pour beaucoup impliqués dans la virulence ou la formation de biofilm et sont pour la plupart régulés négativement. Quarante gènes organisés en six opérons, dont ceux permettant la production du système de sécrétion de type VI (T6SS) et d'exopolysaccharides, ont été montrés pour être directement réprimés par RsmA au niveau traductionnel (Brencic *et* Lory, 2009). Le système Gac/Rsm joue un rôle clé dans la transition entre les infections aigue et chronique. En effet, lorsque le système Gac est inactif, la protéine RsmA libre stimule la production de facteurs de virulences impliqués dans l'infection aigue, et réprime l'expression de gènes associés à la formation de biofilm. En revanche, lorsque le système GacS/GacA est actif, la production des sncARNs RsmZ et RsmY empêche la fixation de RsmA sur les ARNs messagers cibles. La répression exercée sur les gènes impliqués dans la formation de biofilm est alors levée au

détriment des gènes impliqués dans la production de facteurs de virulence (Nadal Jimenez *et al*., 2012; Wolska *et al*., 2016). En plus de GacS, les 2 senseurs RetS et LadS, ayant une activité kinase modulent également l'expression des gènes *via* le régulateur GacA. LadS avec GacS contrôle positivement, (*via* l'activation de GacA) l'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm et réprime l'expression des gènes impliqués dans la virulence de la bactérie. RetS lorsqu'il est activé, antagonise le système GacS/GacA empêchant la phosphorylation de GacA. RetS entraine alors la répression des gènes impliqués dans la formation de biofilm et stimule la production des facteurs de virulence (Nadal Jimenez *et al*., 2012). Le système Gac/Rsm est interconnecté avec la voie de régulation HptB qui contrôle la formation de biofilm et la mobilité. HptB est une protéine hybride constituée d'un domaine receveur et d'un domaine histidine kinase, ayant un rôle de phosphorelais, (impliqué dans la transduction du signal d'un senseur membranaire vers un régulateur de réponse). En réponse à un stimulus, HptB est phosphorylé par les senseurs membranaires PA1161, SagS ou ErcS et transfère le groupement phosphoryle sur la protéine HsbR possédant les activités phosphatase et kinase. La phosphorylation d'HsbR entraine l'activation de son activité phosphatase et la répression de son activité kinase. L'activité phosphatase d'HsbR permet la déphosphorylation de HsbA. HsbA est un facteur anti-anti-sigma : en effet, à l'état déphosphorylé cette protéine interagit avec le facteur anti-sigma FlgM, impliqué dans la répression de l'activité du facteur sigma FliA. L'interaction entre HsbA et FgIM conduit à la libération de FliA, qui une fois libéré peut initier la transcription des gènes impliqués dans la mobilité des bactéries. En absence de stimulus, HptB est à l'état inactif et la protéine HsbR possède uniquement son activité kinase. Ainsi HsbR phosphoryle HsbA empêchant son interaction avec FgIM et la libération de FliA. HsbA phosphorylée stimule l'activité de HsbD, une protéine localisée dans la membrane cytoplasmique, et impliquée dans la production de c-di-GMP et dans l'expression du sncARN RsmY (Bordi *et al*., 2010; Valentini *et al*., 2016), (Figure 7).

b- Le c-di-GMP

Le c-di-GMP (3'-5' di-guanosine mono phosphate cyclique) est un second messager impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, la formation de biofilm et la virulence (Hengge, 2009). Ce messager secondaire joue un rôle clé dans la transition entre les modes de vie

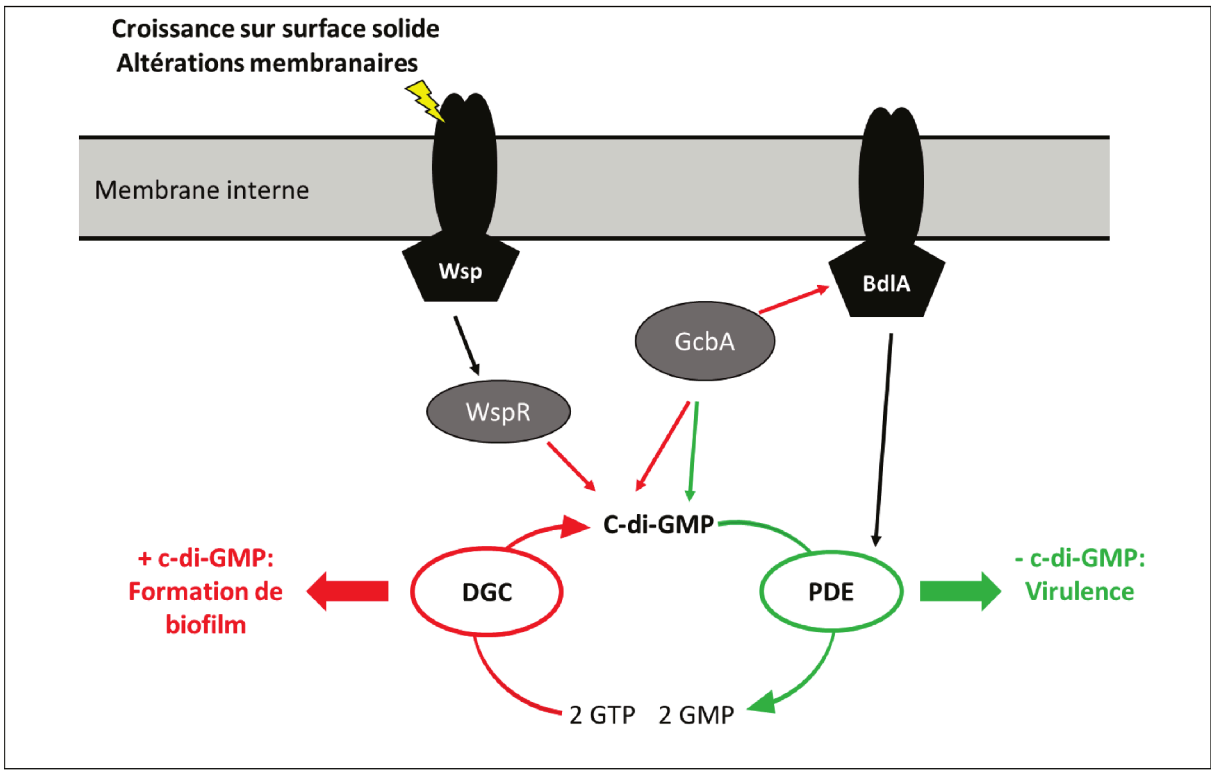


Figure 8. Représentation schématique de la voie du c-di-GMP : Le c-di-GMP est synthétisé par des diguanylate cyclases (DGC) et dégradé par des phosphodiestérases (PDE). L'activité de la DGC WspR est stimulée par le système chimiosenseur Wsp en réponse à la croissance sur une surface ou une altération de l'enveloppe cellulaire. L'activité DGC de GcbA favorise l'activation du système chimiosenseur BdlA. BdlA activé permet la dégradation du c-di-GMP par les PDE.

planctonique et sessile. En effet un taux intracellulaire élevé de c-di-GMP est associé à la formation de biofilm tandis qu'un taux plus faible est associé à un mode de vie planctonique (Ha *et* O'Toole, 2015). Le taux intracellulaire de c-di-GMP dépend des conditions environnementales et de l'activité d'enzymes, possédant un domaine diguanylate cyclase (DGC) permettant sa production, et/ou un domaine phosphodiestérase (PDE) responsable de sa dégradation. *P. aeruginosa* possède 17 protéines ayant un domaine diguanylate cyclase, 6 protéines possédant un domaine phosphodiestérase et 14 protéines possédant les deux domaines (Hickman *et al*., 2005). Les diguanylate cyclases sont activées par des protéines senseurs capable de percevoir le taux de c-di-GMP ainsi que des conditions environnementales particulières. Chez *P. aeruginosa* le système le mieux caractérisé est le système Wsp qui contrôle la formation de biofilm en modulant le taux de c-di-GMP en réponse à la perception d'une surface (Huangyutitham *et al*., 2013; O'Connor *et al*., 2012). En effet lorsque la bactérie se développe sur une surface, WspA est activé et phosphoryle la diguanylate cyclase WspR dont l'activité cyclase est augmentée (figure 8). WspR serait également activée par des altérations membranaires conduisant à une production constitutive de c-di-GMP (Blanka *et al*., 2015). Les phosphodiestérases quant à elles sont activées par des conditions environnementales telles que la carence nutritive ou la faible concentration en oxygène (Wolska *et al*., 2016). Bien que les mécanismes moléculaires conduisant à leur activation restent peu connus, il a été montré que la dispersion du biofilm nécessite l'activation par protéolyse du système chimiosenseur BdlA capable d'interagir avec les phosphodiestérases (Morgan *et al*.,2006; Petrova *et* Sauer, 2012). Chez *P. fluorescens*, la protéine PA4843 (GcbA), possédant les domaines diguanylate cyclase et phophodiestérase, est nécessaire pour l'activation de BdlA. En effet, il a été suggéré que l'activité diguanylate cyclase de cette protéine stimule la protéolyse de BdlA qui à son tour stimule la dégradation du c-di-GMP par les phosphodiestérases (Petrova *et al*., 2015). Comme le cAMP, le c-di-GMP doit se lier à un effecteur afin de contrôler diverses fonctions cellulaires (Christen *et al., 2006)*. En revanche à la différence du système cAMP/Vfr, le c-di-GMP est capable de se lier à différentes protéines régulatrices agissant comme des activateurs ou répresseurs de fonctions cellulaires spécifiques. Les protéines Alg44 et PelD, par exemple, activées par le c-di-GMP, contrôlent positivement la production d'alginates et du polysaccharide Pel, des composés impliqués dans la formation de biofilm. Au contraire la liaison du c-di-GMP à la protéine FleQ inhibe son activité de répresseur de

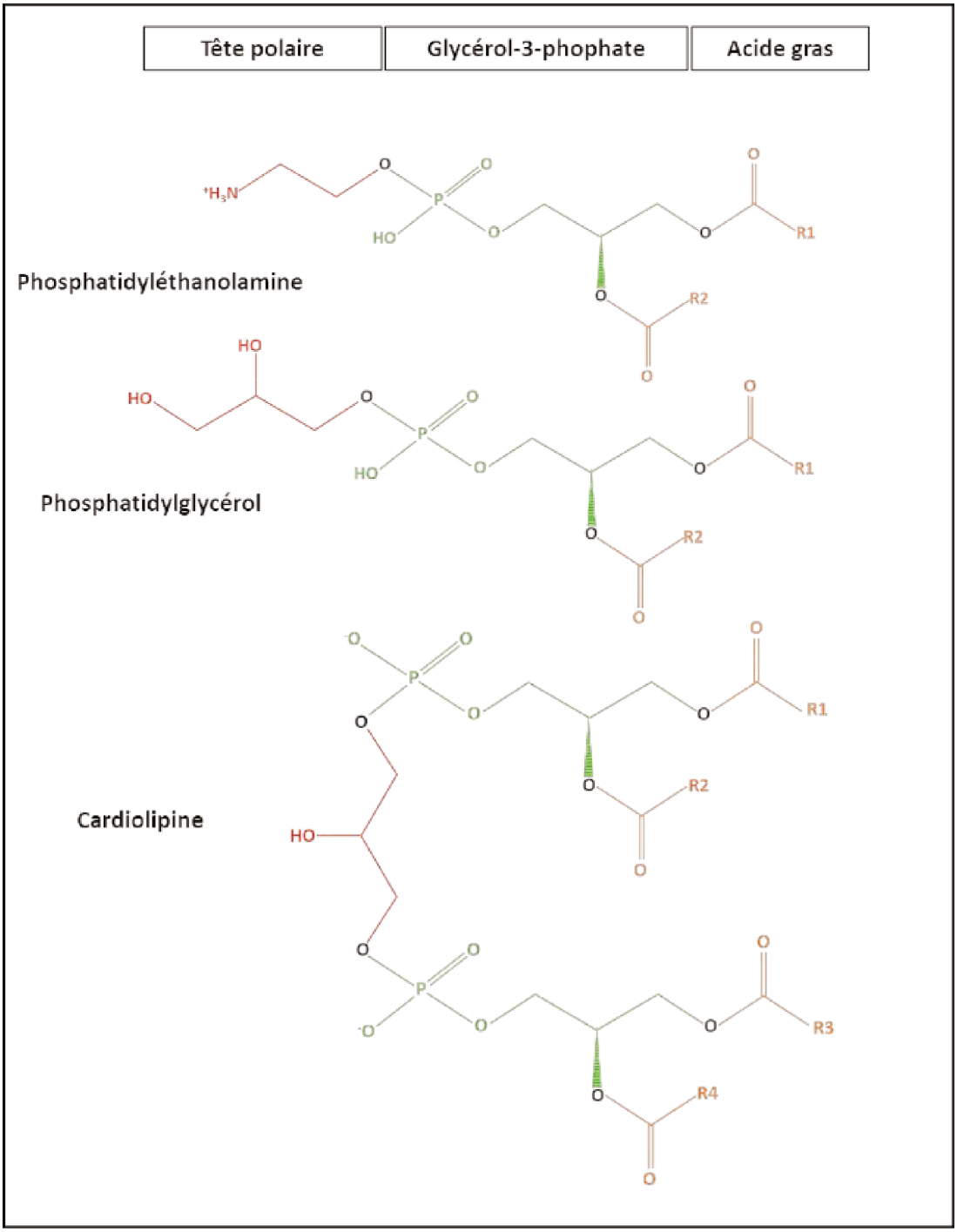


Figure 9. Représentation schématique des principaux phospholipides composant les membranes de *P. aeruginosa*.

la formation de biofilm et d'activateur de la synthèse du flagelle (Hengge, 2009; Rasamiravaka *et al.*, 2015).

III- Enveloppe de *P. aeruginosa*

Première structure en contact avec l'environnement, l'enveloppe constitue un élément essentiel pour l'adaptation et la survie de la bactérie dans son microenvironnement. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi est constituée de deux membranes séparées par une couche de peptidoglycane délimitant un compartiment appelé le périplasme.

1- La membrane interne

La membrane interne est une bicouche lipidique constituée de phospholipides, de lipoprotéines et de protéines assurant la plupart des fonctions des membranes biologiques classiques telles que la respiration cellulaire, la production d'énergie et le transport actif de nutriments vers l'intérieur de la cellule et de déchets vers l'extérieur.

a- Les phospholipides :

Les phospholipides majoritaires des membranes des bactéries du genre *Pseudomonas* sont la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG) et la cardiolipine. Les PE et PG sont des glycérophospholipides composés d'un acide phosphatidique, constitué de deux chaines d'acides gras fixés sur un glycérol-3-phosphate et d'une tête polaire. La cardiolipine est formée par deux acides phosphatidiques reliés par un glycérol (Figure 9). La première étape de la synthèse des acides gras est la carboxylation d'une molécule d'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase ATP-dépendante formant ainsi le malonyl-CoA. Le groupement malonyle est ensuite transféré sur une protéine porteuse d'acyle ou ACP pour « acyl carrier protein », grâce à l'activité de l'enzyme malonyl-CoA-ACP acyltransférase ou FabD. L'initiation de l'élongation de la chaine acylée est réalisée par la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA avec le malonyl-ACP par la β-cétoacyl-ACP synthase III (FabY), formant l'intermédiaire β-cétoacyl-ACP. La molécule subit ensuite une réduction catalysée par FabG, une réductase NADPH-dépendante formant ainsi le β-hydroxyacyl-ACP. L'hydroxyle est ensuite enlevé par FabA ou FabZ, des déshydratases générant une double liaison réduite par la suite par FabI ou FabV, des

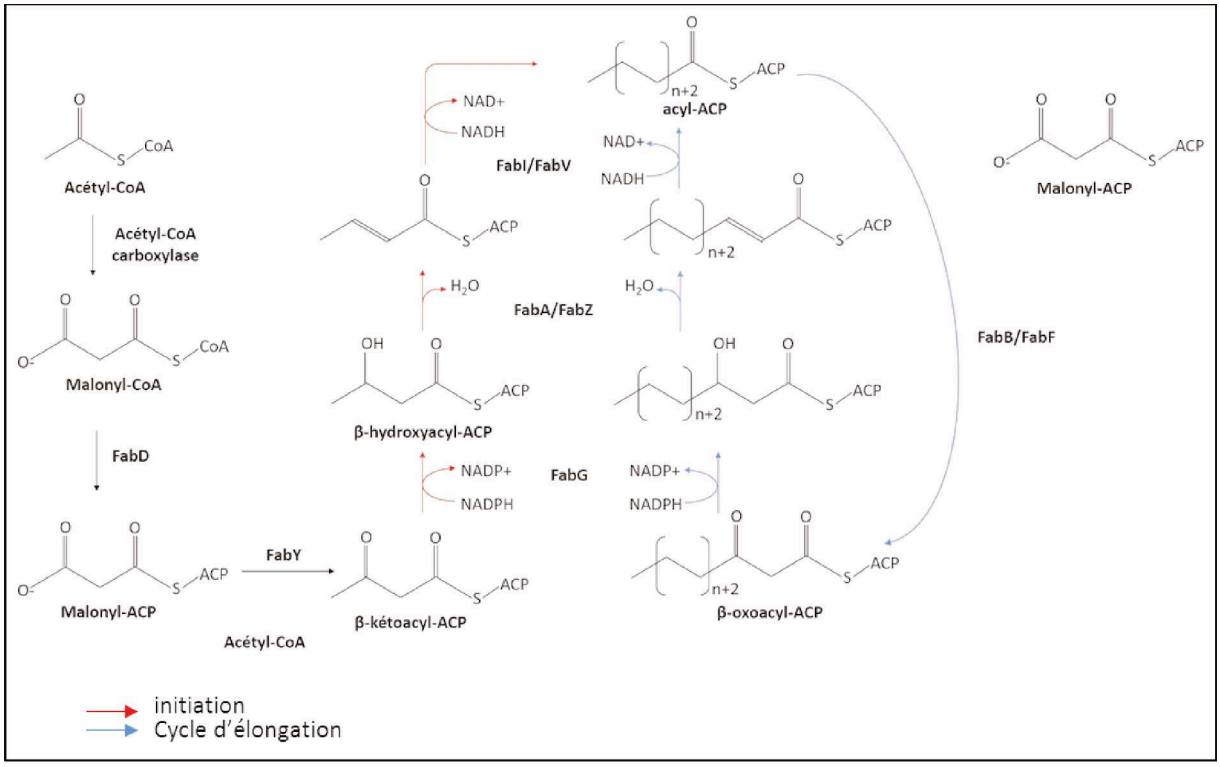


Figure 10. Représentation schématique de la biosynthèse des acides gras (adapté de Kondakova *et al.*, 2015). La première étape de la biosynthèse des acides gras est réalisée par la conversion d'une molécule d'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Le groupement malonyl est ensuite transféré sur une protéine porteuse d'acyles (ACP). L'élongation de la chaine acylée est initiée par la condensation du malonyl-ACP avec une molécule d'acétyl-CoA formant le β-cétoacyl-ACP. Des étapes de réduction et de déshydratation permettent d'obtenir un acyl-ACP sur lequel 2 carbones seront ajoutés de manière cyclique.

réductases NADH-dépendantes. L'élongation de la chaine carbonée a ensuite lieu d'une manière cyclique avec l'ajout de deux carbones à chaque cycle. Le nouveau cycle d'élongation est initié par la condensation de l'acyl-ACP avec une autre molécule de malonyl-ACP. Ces nouvelles réactions de condensation sont réalisées par les β-cétoacyl-ACP synthases I et II (FabB et FabF) (Kondakova *et al*., 2015), (Figure 10). Durant l'élongation, l'acide gras peut subir des modifications conduisant à la formation de doubles liaisons carbone-carbone sur la chaine acylée. FabA peut agir comme une isomérase empêchant l'étape de réduction catalysée par FabI/FabV. Les enzymes DesA et DesBC peuvent également introduire des double liaisons dans les phospholipides existants ou les acyl-CoA respectivement par des réactions dépendantes de l'oxygène (Zhu *et al*., 2006). Ces doubles liaisons sont appelées insaturations et leur nombre détermine la fluidité et la rigidité membranaires. La composition des acides gras peut être modifiée en réponse à des facteurs environnementaux perturbant la structure pariétale (Mansilla *et al*., 2004). Chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, les chaines acylées contiennent généralement entre 16 et 18 carbones contenant ou non des instaurations. Une fois synthétisée, la chaine d'acide gras est transférée dans la membrane sur un glycérol-3-phosphate pour former le 1-acyl-glycérol-3-phosphate ou acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA est ensuite de nouveau acylé pour former l'acide phosphatidique. Les têtes polaires sont ensuite ajoutées pour former les phosphatidyléthanolamines, phosphatidylglycérols, etc. La nature de ces têtes polaires et le ratio entre ces différentes espèces déterminent la charge électrostatique de la membrane. Cette charge peut être modifiée en réponse à des stress environnementaux tels que la température, la présence de solvant ou la pression osmotique (Quinn *et* Chapman, 1980; Shivaji *et* Prakash, 2010).

b- Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont constituées d'une partie lipidique et d'une partie protéique. Elles sont synthétisées à partir d'une préprolipoprotéine possédant à l'extrémité N-terminale, un peptide signal d'environ 20 acides aminés et, à l'extrémité C-terminale, une séquence de quatre acides aminés appelée « lipobox ». Cette dernière est une séquence dégénérée, dont seule la cystéine en position +1 est conservée, témoignant du rôle important de ce résidu pour la synthèse de la lipoprotéine. La première étape de la biosynthèse est la formation d'une liaison covalente entre un diacylglycérol et le groupement thiol de la cystéine. Cette

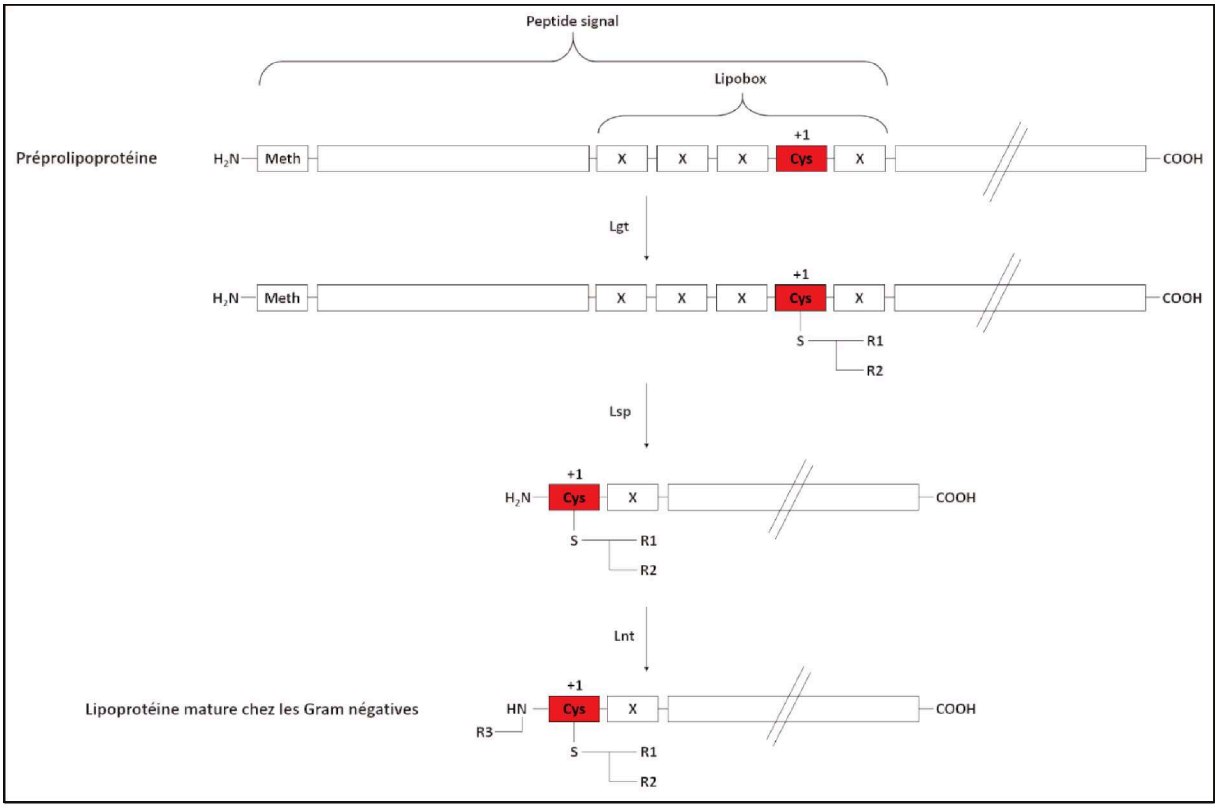


Figure 11. Représentation schématique de la synthèse des lipoprotéines (adapté de Kovacs *et al.*, 2011). La synthèse est initiée par l'ajout d'un diacylglycérol sur la cystéine en position +1 d'une préprolipoprotéine grâce à la lipoprotéine diacylglycérol transférase (Lgt). Le peptide signal en N-terminal est ensuite clivé par une lipoprotéine signal peptidase (Lsp) formant les lipoprotéines matures retrouvées chez la majorité des bactéries à Gram positif. L'ajout d'une chaine acylée sur la cystéine +1 par une lipoprotéine N-acyl transférase (Lnt) permet d'obtenir les lipoprotéines matures retrouvées chez les germes à Gram négatif.

modification est effectuée par une lipoprotéine diacylglycéryl transférase (Lgt) et conduit à la prolipoprotéine. Après cette lipidation, une lipoprotéine signal peptidase (Lsp) clive le peptide signal en N-terminal, la cystéine devient alors le premier résidu de l'extrémité N-terminale. Chez la majorité des bactéries à Gram positif, cette étape permet d'obtenir une lipoprotéine mature ; en revanche chez les bactéries à Gram négatif, l'obtention d'une lipoprotéine mature nécessite la fixation d'un acide gras sur la cystéine N-terminale (Figure 11). Cette réaction est catalysée par une lipoprotéine N-acyl transférase (Lnt) (Kovacs-Simon *et al*., 2011). Le diacylglycérol et le groupement acyl N-terminal sont dérivés des phospholipides membranaires et permettent l'ancrage de la lipoprotéine dans la membrane. Chez les bactéries à Gram négatif la lipoprotéine mature peut être présente sur la face périplasmique de la membrane interne ou de la membrane externe. Chez *P. aeruginosa*, 175 lipoprotéines ont été prédites, 23% seraient localisées dans la membrane interne. Ces lipoprotéines de membrane interne seraient impliquées dans le métabolisme des carbohydrates, la respiration cellulaire, ou encore la sécrétion de type VI (Remans *et al*., 2010).

c- Fonction de la membrane interne

Cette membrane est un élément crucial pour l'enveloppe cellulaire car elle est le lieu de synthèse et d'assemblage des composants de la paroi bactérienne. En effet c'est dans cette membrane que sont localisées les enzymes impliquées dans la biosynthèse puis la translocation du peptidoglycane, du lipopolysaccharide, des protéines périplasmiques et de membrane externe. Cette membrane joue également un rôle important dans la communication et l'adaptation de la bactérie à son microenvironnement car elle contient de nombreux systèmes de transduction de signaux. Ces systèmes sont composés d'un senseur, localisé dans la membrane cytoplasmique pouvant percevoir et transduire des signaux vers le cytoplasme. Ces signaux conduisent à l'activation de réseaux de régulation permettant à la bactérie de répondre à des variations de l'environnement.

2- Le périplasme

Le périplasme ou espace périplasmique est situé entre les membranes cytoplasmique et externe. Cette espace contient la couche de peptidoglycane et de nombreuses enzymes impliquées dans la maturation ou la réparation de composés pariétaux (comme les chaperonnes, les protéases), dans la conversion ou la

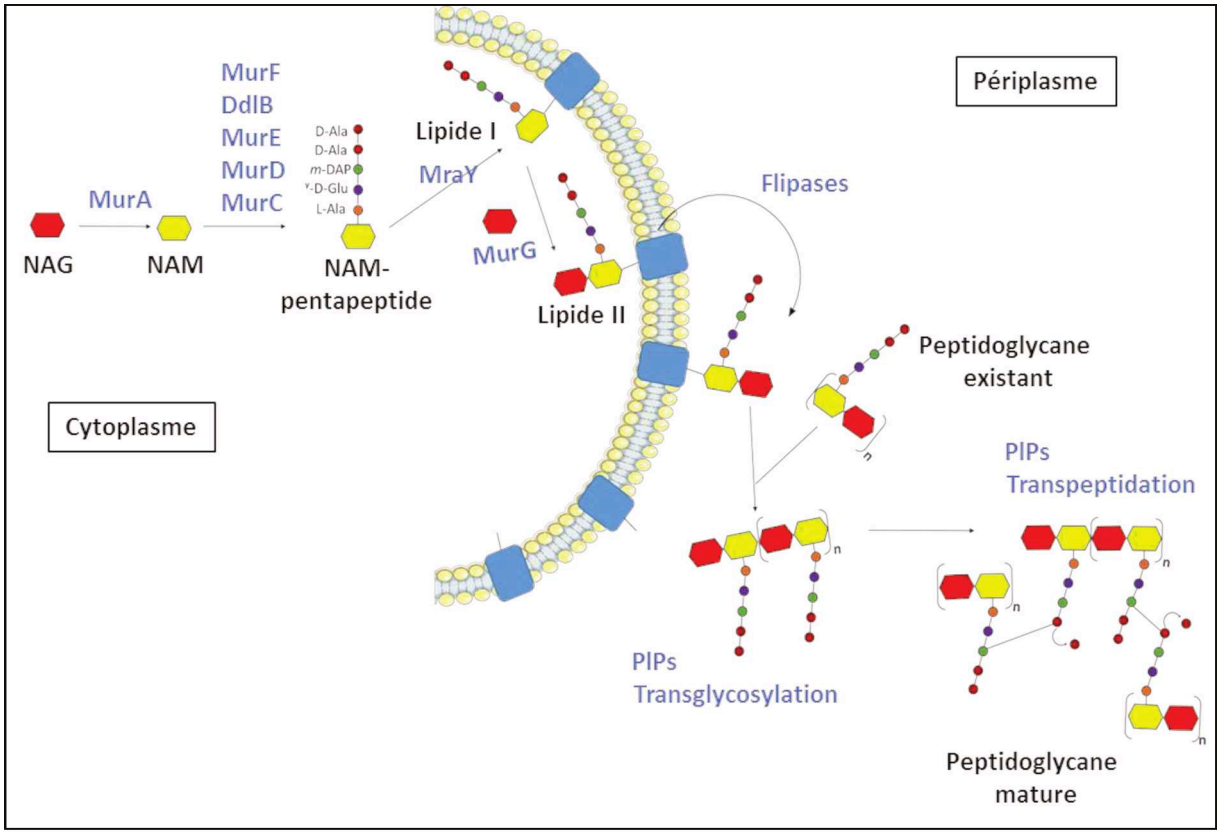


Figure 12. Représentation schématique de la biosynthèse du peptidoglycane. Une molécule de N-acétyglucosamine (NAG) est convertie en acide N-acétylmuramique (NAM). L'ajout progressif d'acides aminés permet d'obtenir le précurseur du peptidoglycane, le NAM-pentapeptide. La fixation du NAM-pentapeptide sur l'accepteur membranaire undécaprényl-phosphate permet l'obtention du lipide I. Une molécule de NAG est ajoutée au lipide formant le lipide II. Le lipide II est ensuite transloqué vers le périplasme où les PlPs (Protéines liant les pénicillines) catalysent des étapes de transglycosylation et transpeptidation permettant d'obtenir le peptidoglycane mature.

dégradation de composés non métabolisables, dans la production et la conversion d'énergie et dans le transport du fer ou d'acides aminés par exemple.

a- Biosynthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane est une répétition d'acide N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) liés par des pentapeptides (Vollmer *et al*., 2008). La biosynthèse du peptidoglycane peut être divisée en 3 étapes (Figure 12). La première étape se déroule dans le cytoplasme et correspond à la synthèse du précurseur du peptidoglycane, le N-acétylmuramyl-pentapeptide (NAM-pentapeptide). Cette première étape est initiée par la conversion d'un monomère de NAG en NAM. Des acides aminés sont progressivement ajoutés à la molécule de NAM pour former le NAM-pentapeptide. Chez la plupart des bactéries à Gram négatif, le pentapeptide est composé d'une L-alanine (L-Ala) en position 1, d'un D-isoglutamate (γ-D-Glu) en position 2, d'un acide méso-2,6-diaminopimélique (*m*-DAP) en position 3, puis deux résidus de D-Alanine (D-Ala) en position 4 et 5.

La deuxième étape de la biosynthèse du peptidoglycane se situe dans la membrane et est initiée par la fixation du précurseur sur l'accepteur membranaire, undecaprényl-phosphate. Cette étape est catalysée par l'enzyme MraY et permet la formation du lipide I. L'activité de la transférase MurG, associée à la membrane, permet ensuite l'addition d'une molécule de NAG pour former le lipide II. La translocation du lipide II vers le périplasme au travers de la membrane cytoplasmique permet l'initiation de la 3ème et dernière étape de la synthèse du peptidoglycane.

Cette étape fait intervenir des enzymes appelées PlPs pour « Protéines liants les Pénicillines » et ayant une activité de transglycosylation et de transpeptidation. La transglycosylation permet l'ajout du peptidoglycane naissant sur une molécule de peptidoglycane préformé. La transpeptidation permet la formation d'une liaison entre les pentapeptides de deux molécules de peptidoglycane. Cette liaison est formée entre l'extrémité N-terminale du 3ème acide aminé et l'extrémité C-terminale de l'avant-dernier résidu D-Ala des pentapeptides. Cette réaction est accompagnée du clivage du lien D-Ala-D-Ala du dernier résidu du pentapeptide.

b- Fonction du peptidoglycane

Le peptidoglycane est localisé juste sous la membrane externe et confère ainsi la forme et la rigidité cellulaires : il peut être considéré comme l'exosquelette de la cellule bactérienne. Cette rigidité est renforcée par la liaison de la couche de peptidoglycane aux membranes interne et externe *via* les lipoprotéines et certaines protéines de membrane externe telles qu'OprF, la protéine majoritaire. Le peptidoglycane est également important pour le maintien de la stabilité osmotique puisque les agents ciblant la synthèse du peptidoglycane entrainent une lyse cellulaire dû à la pression de turgescence du cytoplasme.

3- La membrane externe

Contrairement aux membranes biologiques classiques, la composition de la membrane externe est fortement asymétrique. En effet tandis que le feuillet interne contient des phospholipides et des lipoprotéines, le feuillet externe est majoritairement composé de glycolipides dont l'espèce principale est le lipopolysaccharide (LPS). Directement en contact avec l'environnement, la membrane externe est une barrière de perméabilité sélective propre aux bactéries à Gram négatif. La sélectivité de cette membrane est directement liée à sa composition lipidique et protéique et est responsable en partie de la résistance intrinsèque des bactéries à Gram négatif à de nombreux agents antimicrobiens.

a- Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un important facteur de virulence de *P. aeruginosa*. Ce glycolipide complexe est le composant majoritaire du feuillet externe des membranes externes des bactéries à Gram négatif et constitue une barrière physique, protégeant les cellules contre les défenses de l'hôte et des antibiotiques. Le LPS est une molécule constituée de 3 domaines, une région hydrophobe relativement conservée, le lipide A ou endotoxine, une chaine polysaccharidique plus ou moins variable, le core oligosaccharide et une chaine polysaccharidique très variable, l'antigène O.

Le lipide A est un glycolipide contenant une partie hydrophobe permettant l'ancrage du LPS dans la membrane et une partie hydrophile dirigée vers le milieu extracellulaire. La structure du lipide A est relativement conservée : il s'agit d'une unité disaccharidique phosphorylée sur laquelle sont branchées des chaines acylées. Cependant le degré de phosphorylation, la longueur, le nombre et la position des

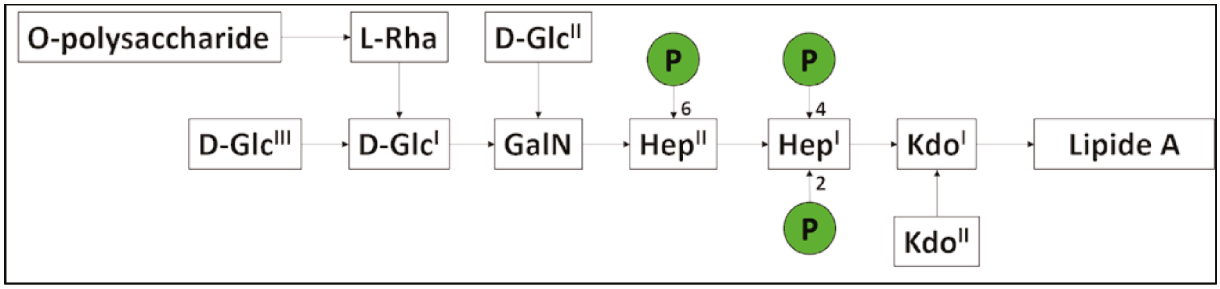


Figure 13. Représentation schématique du core oligosaccharidique du LPS de *P. aeruginosa* (adapté de King *et al.*, 2009).

chaines d'acides gras peuvent varier selon l'espèce bactérienne ou les facteurs environnementaux.

Lié de manière covalente au lipide A, se trouve le domaine central du LPS, le core oligosaccharidique. Chez *P. aeruginosa*, la structure du core est généralement divisée en deux parties, le core interne et le core externe. Le core externe est composé de 3 types d'hexoses, le D-glucose, le L-rhamnose et la D-galactosamine. Le core interne est composé de deux résidus d'acide 3-désoxy-D-manno-octulosonic (Kdo) et de deux résidus de L-glycéro-D-manno-heptose (Hep) servant de sites de phosphorylation. Parmi les bactéries à Gram négatif, *P. aeruginosa* est l'espèce possédant le core olisaccharidique le plus phosphorylé. En effet il contient 3 sites de phosphorylation en positions 2 et 4 de l'heptose I et en position 6 de l'heptose II (Figure 13). Chacun de ces sites de phosphorylation peut être substitué par des mono-, di- ou tri-phosphates. Cette importante phosphorylation permet des interactions ioniques entre les charges négatives des groupements phosphate et des cations divalents, stabilisant le LPS et formant des ponts entre molécules de LPS voisines. Le continuum de LPS formé par ces interactions crée une barrière rigide et très efficace contre les molécules hydrophobes et participe à la stabilisation de la membrane externe.

Enfin, le troisième domaine de la molécule de LPS, qui est également le plus variable est l'antigène O. Exposé à la surface de la cellule, ce polysaccharide hypervariable permet de déterminer le sérotype des souches et peut être produit sous deux formes différentes dans une même cellule. Ces deux formes sont appelées « bande A » ou « common polysaccharide antigen » et « bande B » ou « O specific antigen », et possèdent des structures différentes. La forme A produit par la majorité des souches de *P. aeruginosa* est un homopolymère de D-rhamnose tandis que la bande B contient différents oses organisés en unités répétitives. La nature et le nombre d'oses de ces unités varient d'une souche à l'autre. Selon la classification IATS pour « International Antigen Typing Scheme », *P. aeruginosa* peut être classé en 20 sérotypes majeurs, allant de O1 à O20, reflétant la grande diversité de structures de l'antigène O au sein d'une même espèce (table 2). Certaines espèces de *P. aeruginosa*, notamment des souches cliniques, ne sont pas O-sérotypables car elles ne produisent pas l'antigène O. La perte de la capacité à produire l'antigène O est un mécanisme d'adaptation de la bactérie lui permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte ou à l'action de certains antimicrobiens. Ces bactéries sont dites

Sérotype IATS	Composition en oses de l'antigène O
O1	D-GalN; D-GlcN3NA; D-FucN; D-QuiN
O2	D-ManN3NA; L-GulN3NA; D-FucN
O3	L-Rha; D-GlcN; L-GalN; D-QuiN4N
O4	L-Rha; L–FucN; L-FucN; D-QuiN
O5	D-ManN3N; D-ManN3NA; D-FucN
O6	L-Rha; D-GalN; D-GalN; D-QuiNA
O7	Pse; D-Xyl; D-FucN
O8	Pse; D-Xyl; D-FucN
O9	Pse; D-FucN; D-QuiN
O10	L-Rha; L-GalN; D-QuiN
O11	D-Glc; L-FucN; D-FucN
O12	8eLeg; L-FucN; D-QuiN
O13	L-Rha; L-Rha; D-GalN; D-QuiN
O14	D-Glc; L-Rha; L-Rha; D-GalN; D-QuiN
O15	D-Rib; D-GalN
O16	D-ManN3N; D-ManN3N; D-FucN
O17	L-Rha; D-ManN
O18	L-GulN3N; D-ManN3N; D-FucN
O19	L-Rha; L-GalN; D-QuiN
O20	L-GulN3N; D-ManN3N; D-FucN

GalN: Galactosamine; Rha: Rhamnose; Rib: Ribose; QuiN: 2-amino-2,6-dideoxy-glucose; FucN: 2-amino-2,6-dideoxy-galactose; QuiN4N: 2,4-diamino-2,4,6-trideoxyglucose; GlcN3NA: Acide 2,3-diamino-2,3-dideoxy-glucuronique; ManN3NA: Acide 2,3-diamino-2,3-dideoxy-mannuronique; GulN3NA: Acide 2,3-diamino-2,3-dideoxy-guluronique; Pse: Acide 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoxy-L-*glycero*-L-*manno*-non-2-ulosonique; 8eLeg: Acide 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoxy-L-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulosonique.

Table 2. Composition des unités d'antigène O chez les souches de référence de *P. aeruginosa* (adapté de Knirel *et al.*, 2006).

de « type R » pour « Rough colony » contrairement aux bactéries de « type S » (Smooth colony) produisant l'antigène O (King *et al.*, 2009; Pier, 2007).

b- Les lipoprotéines

Comme chez *Escherichia coli*, la majorité des lipoprotéines de *P. aeruginosa* est localisée dans la membrane externe. Bien que la plupart de ces lipoprotéines ne soit encore que très peu caractérisée, les fonctions de certaines d'entre elles ont été décrites, permettant de les classer selon leur rôle dans la membrane externe. Ces lipoprotéines sont impliquées dans la biogenèse de la membrane externe, dans le maintien de l'intégrité pariétale ou sont associées à des systèmes d'efflux (Remans *et al.*, 2010). Chez *E. coli*, le complexe Bam, responsable de l'assemblage et de l'insertion de protéines dans la membrane externe, est composé de 4 lipoprotéines, BamB, BamC, BamD et BamE. Chez *P. aeruginosa* des homologues de ces protéines ont été proposés : il s'agit de PA3800 (BamB), PA4545 (BamD) et PA4765 (BamE). On trouve également les lipoprotéines LptE et LptD du complexe Lpt impliqué dans le transport du lipopolysaccharide de la membrane interne vers la membrane externe. Les lipoprotéines les plus abondantes chez *P. aeruginosa* sont les lipoprotéines OprI et OprL. OprI est l'homologue de la lipoprotéine de Braun chez *E. coli*. La lipoprotéine de Braun est liée de manière covalente au peptidoglycane et permet l'ancrage de la couche de peptidoglycane à la membrane externe, participant ainsi à la stabilisation de la structure pariétale. OprL est l'homologue de la lipoprotéine Pal d'*E. coli*, associée au peptidoglycane de manière non covalente. Cette lipoprotéine fait partie de la famille OmpA regroupant des protéines de membrane externe possédant une extrémité C-terminale capable de fixer le peptidoglycane.

c- Les porines

Les porines sont des protéines intégrales de membrane externe structurées en tonnelet β et permettant le passage de composés hydrophiles à travers la membrane externe. Le taux d'absorption est déterminé par les propriétés du canal comme la taille et la sélectivité ioniques mais également le nombre de canaux par cellule (Hancock, 1984). Les porines peuvent être classées en quatre catégories : les porines spécifiques dont l'expression et la production sont induites par la présence dans le milieu de composés spécifiques, les porines de haute affinité associées à des systèmes de transport énergie-dépendant, les porines associées à des pompes à

efflux, et les porines aspécifiques, les plus abondantes en termes quantitatifs, qui permettent la diffusion passive de petites molécules telles que les mono et disaccharides (Nestorovich *et al*., 2006)

i. Porines spécifiques

Ces protéines sont des canaux aqueux contenant des sites de fixation spécifiques pour une classe de substrat. Leur expression et leur production sont induites en réponse à des conditions de croissance particulières comme la présence d'un substrat dans le milieu ou une carence nutritive. Parmi ces porines on trouve les porines de la famille OprD caractérisées par un domaine sérine peptidase bien qu'elles n'aient aucune activité enzymatique décrite à ce jour. Les membres de cette famille permettent le transport d'acides aminés spécifiques ou de composés impliqués dans le métabolisme primaire tel que l'histidine (OpdC), la proline (OpdB), le dipeptide glycine-glutamate (OpdD), ou la tyrosine (OpdT), par exemple (Tamber *et al*., 2006). La porine OprD est impliquée dans le transport d'acides aminés et de peptides basiques. Elle est également un transporteur de l'imipenème, un antibiotique de la classe des β-lactames, et la régulation de sa production est un mécanisme de résistance à cet antibiotique. D'autres porines spécifiques sont très bien caractérisées : c'est le cas d'OprB, OprP et OprO qui sont impliquées respectivement dans le transport du glucose, du phosphate et du pyrophosphate (Hancock *et* Benz, 1986; Hancock *et* Brinkman, 2002; Siehnel *et al*., 1992).

ii. « Gated porin » ou récepteur TonB-dépendant

Généralement impliquées dans la capture du fer en agissant comme récepteurs des sidérophores, ces porines sont des canaux fermés (« gated porin ») possédant une grande affinité pour leur ligand. La partie C-terminale de ces protéines forme un large tonneau β organisé en feuillets antiparallèles. Le pore est fermé par un « bouchon » globulaire empêchant la diffusion non-spécifique de molécules à travers la membrane externe (Noinaj *et al*., 2010). L'ouverture du canal est un processus nécessitant un apport d'énergie. La fixation du ligand sur la porine et l'énergie apportée par la force proton-motrice de la membrane cytoplasmique entrainent un changement de conformation du bouchon permettant l'entrée du substrat dans la cellule. L'apport d'énergie de la membrane cytoplasmique vers la membrane externe est effectué par un complexe protéique localisé dans la membrane cytoplasmique, le complexe

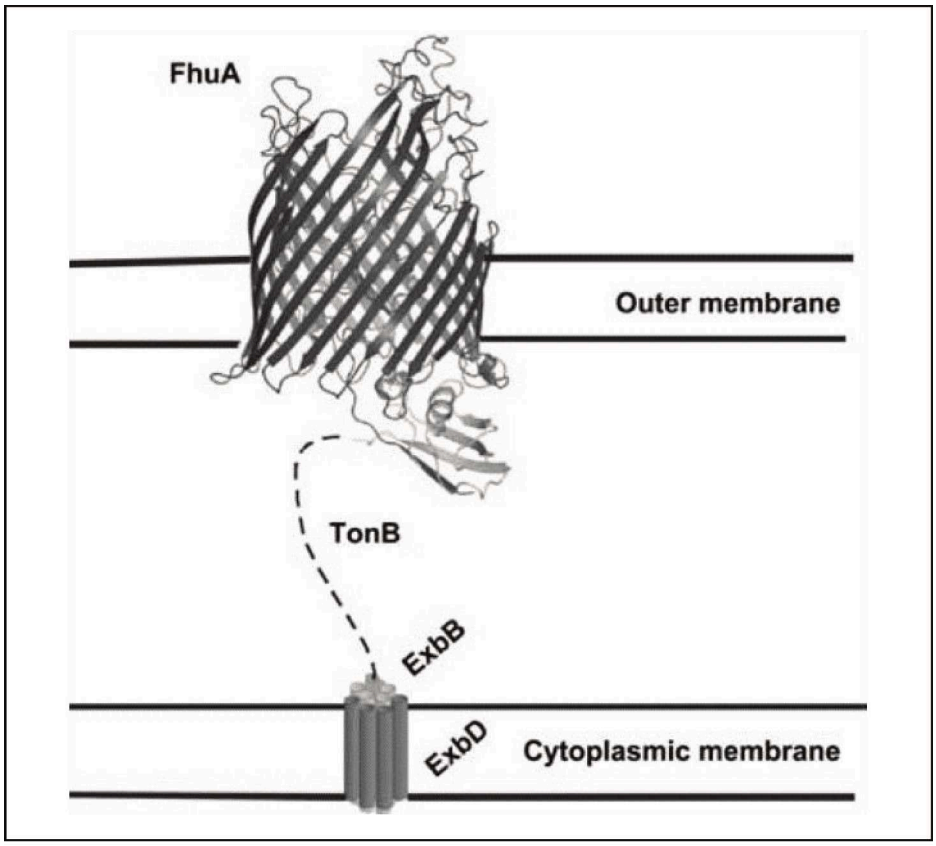


Figure 14. Modèle montrant l'association du transporteur de membrane externe FhuA d'*Escherichia coli* avec le complexe TonB/ExbB/ExbD (Braun *et al.*, 2007).

TonB/ExbB/ExbD. TonB possède une extrémité C-terminale périplasmique qui interagit physiquement avec la région N-terminale de la porine appelée boite TonB (Figure 14). L'énergie produite par le complexe ExbB/ExbD entraine un changement de conformation de TonB. Il est suggéré que TonB dans sa conformation énergisée causerait à son tour un changement de conformation du récepteur permettant l'ouverture du canal et l'import de ferri-sidérophore dans le périplasme. L'expression des différents éléments de ce système est principalement régulée par le répresseur FUR, dont la répression est levée par une carence en fer. Ce système récepteur TonB-dépendant peut de plus être couplé à un système transducteur de signaux, composé d'un facteur sigma à fonctions extracytoplasmiques séquestré par un anti sigma. Dans ce cas, le récepteur TonB-dépendant possède une extension N-terminale caractéristique de la fonction de signalisation, qui interagit avec la partie C-terminale de l'anti-sigma. Il semblerait que la perception par le récepteur d'un ferri-sidérophore soit à l'origine de l'activation du facteur sigma ECF, probablement par protéolyse de l'anti-sigma. Ce système, intégrant la porine, qui joue les fonctions de récepteur et de transducteur de signaux, le complexe énergisant ExbB/ExbD/TonB, le facteur sigma ECF et son anti-sigma, est connu sous l'appellation générale de système de signalisation de surface (Braun *et* Endriß, 2007; Llamas *et al*., 2008; 2014). Ces systèmes seront décrits ultérieurement (chapitre IV, partie 2.b).

iii. Porines couplées à des pompes à efflux

Les pompes à efflux sont des acteurs majoritaires de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Elles peuvent être classées en 6 familles, les MFS (Major Facilitator Superfamily), les MATE (Multidrug And Toxic Efflux), les RND (Resistance-Nodulation-cell Division), les SMR (Small Multidrug Resistance), les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et les PACE (Proteobacteria Antimicrobial Compound Efflux) (Hassan *et al*., 2013; Webber *et* Piddock, 2003). Ces systèmes fonctionnent comme des antiports et nécessitent l'apport d'énergie fournie par un gradient de protons ou par hydrolyse de l'ATP dans le cas des ABC transporteurs. Chez *P. aeruginosa*, les pompes à efflux de la famille RND, au nombre de 12, sont les plus représentées et contribuent à la fois à la résistance intrinsèque et la résistance acquise de la bactérie. Ces pompes sont constituées d'une protéine de membrane interne, d'une protéine périplasmique assurant le maintien du complexe, et d'une protéine de membrane externe formant un canal et permettant le rejet des composés

RND	Porine (ME)	Reference
MexAB	OprM	Li *et al.,* 1995
MexJK	OprM	Chuanchen *et al.,* 2002
	OmpH	Chuanchen *et al.,* 2005
MexVW	OprM	Li *et al.,* 2003
MexXY	OprM	Aires *et al.,* 1999
	OmpG	Chuanchen *et al.,* 2008
MexCD	OprJ	Poole *et al.,* 1996
MexEF	OprN	Kohler *et al.,* 1997
CzcBA	CzcC	Lewenza *et al.,* 2005
PA1435/PA1436 (MexM/MexN)	OprM	Mima *et al.,* 2005
PA3522/PA3523 (MexQ/MexP)	PA3521 (OmpE)	Mima *et al.,* 2005
MexGHI	OpmD	Aendekerk *et al.,* 2002
TriABC	OpmH	Mima *et al.,* 2007
MuxABC	OpmB	Mima *et al.,* 2009

Table 3. Pompe à efflux de la famille RND chez *P. aeruginosa*

toxiques à l'extérieur de la cellule (Li *et al*., 2015). *P. aeruginosa* possède 18 protéines de membrane externe ayant un rôle potentiel dans l'efflux (Stover *et al*., 2000). Une protéine de membrane externe peut s'associer avec différents systèmes RND : c'est le cas de la porine OprM présente dans les systèmes MexAB, MexXY, MexJK et MexVW (Table 3). Ces systèmes sont généralement surexprimés suite à une mutation ou l'activité d'un régulateur transcriptionnel en réponse à une exposition aux antibiotiques.

iv. Porines aspécifiques ou Porines générales

Ces porines sont les porines les plus abondantes de la membrane externe. Elles permettent la diffusion de petits solutés tels que les sucres et sont exprimées de manière constitutive. Chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, la protéine majoritaire de membrane externe OprF, est la seule porine aspécifique.

4- La porine majoritaire de membrane externe, OprF

Chez *P. aeruginosa*, la protéine majoritaire de membrane externe est une porine de 37,6 KDa dont l'homologue chez *E. coli* est OmpA. Cette protéine, nommée OprF, est une porine aspécifique permettant le passage d'ions et de molécules polaires de taille inférieure à 1519 Da (Nestorovich *et al*., 2006). OprF est composée de trois domaines : un domaine N-terminal membranaire replié en 8 feuillets β antiparallèles formant un tonneau bêta (Brinkman *et al*., 2000), d'une région centrale et d'un domaine C-terminal dont la structure secondaire et la localisation restent ambigües. Le domaine C-terminal d'OprF possède 56% de similarité et 39% d'identité de séquence avec la partie C-terminale d'OmpA (Woodruff *et* Hancock, 1989). Comme son homologue, ce domaine peut former une hélice α localisée au moins en partie dans le périplasme où il serait lié au peptidoglycane assurant ainsi le maintien de la structure pariétale (Rawling *et al*., 1998). Cependant, il été démontré que ce domaine peut également se replier en 8 feuillets β dans la membrane externe où certains résidus seraient exposés en surface (Sugawara *et al*., 2006). *In vivo*, OprF serait ainsi présente sous deux conformations, dont la première, majoritaire, formerait un canal fermé tandis que la deuxième, (représentant environ 5%), formerait un canal ouvert, expliquant en partie le faible taux de perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* (Sugawara *et*

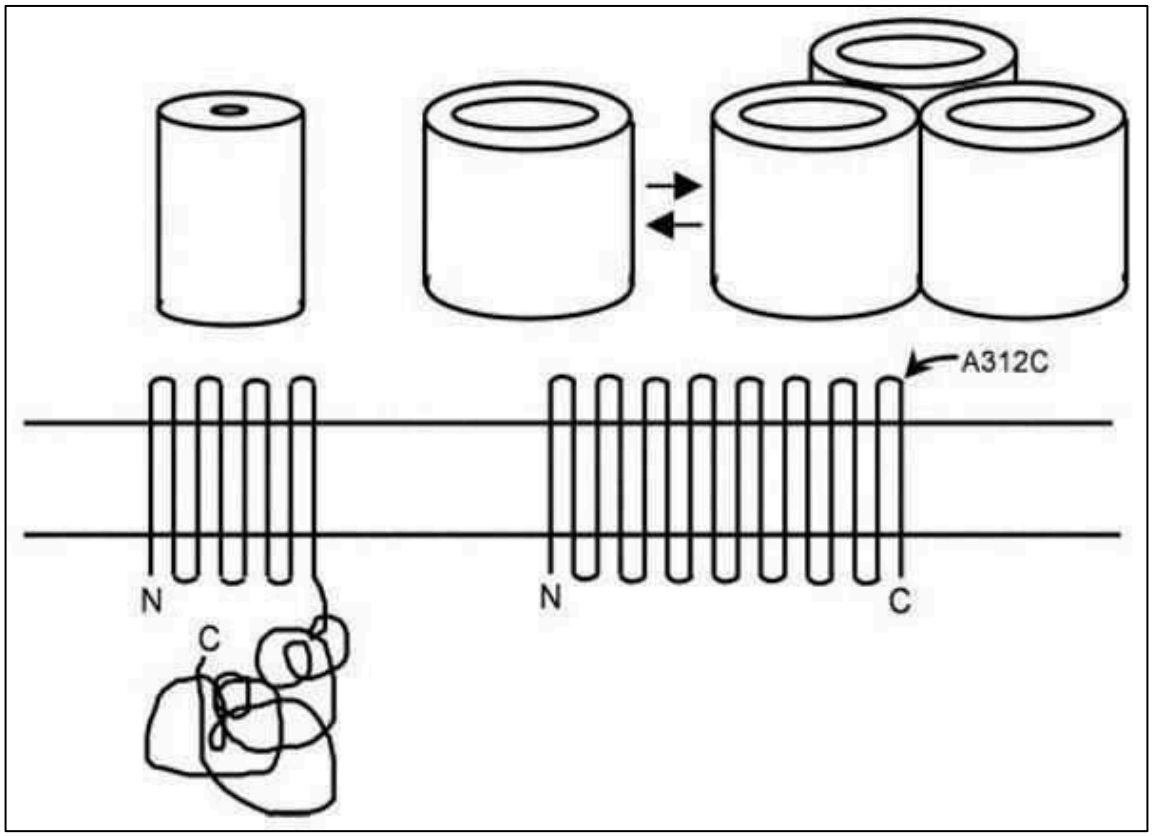


Figure 15. Représentation schématique des différentes conformations d'OprF (Sugawara *et al.*, 2006). A gauche, OprF dans sa conformation « fermée », repliée en deux domaines protéiques où la partie C-terminale seraient ancrée à la couche de peptidoglycane ; à droite, OprF dans sa conformation « ouverte » repliée en un large tonneau β. Dans cette dernière conformation OprF existerait sous forme de trimères.

al., 2006). Bien que considérée comme étant la seule porine monomérique de *Pseudomonas*, il a été suggéré que dans sa conformation ouverte, OprF serait capable de se trimériser (Figure 15). Cette hypothèse est supportée par l'observation d'un canal de taille variable en fonction des conditions de croissance des bactéries. En effet il a été démontré qu'à faible température de croissance la conductance du canal formé par OprF chez *P. aeruginosa* est environ 3 fois inférieure à celle observée à température optimale de croissance (Jaouen *et al*., 2004).

a- Fonctions d'OprF

i. Rôle structural

Comme OmpA, la partie C-terminale d'OprF contient une zone de fixation au peptidoglycane suggérant que ces protéines pourraient jouer un rôle dans le maintien de la stabilité pariétale. Il a été montré qu'un mutant *oprF* apparait plus rond et plus petit que la souche sauvage correspondante (Rawling *et al*., 1998; Woodruff *et* Hancock, 1989) et montre une croissance altérée en milieu de faible osmolarité (Gotoh *et al*., 1989; Woodruff *et* Hancock, 1989). Il est également 3 à 5 fois plus perméable à la sonde hydrophobe fluorescente, le 1-n-phénylnaphtylamine, que la souche sauvage et le taux de bêta-lactamase secrétée dans le milieu est 4 fois plus élevé. L'ensemble de ces données suggère une altération de la barrière de perméabilité chez le mutant (Woodruff *et* Hancock, 1989, 1988). Récemment des expériences de pontage *in vivo* ainsi que des immuno-précipitations ont révélé que la partie C-terminale d'OprF est également capable de lier la partie C-terminale d'OprI et d'OprL (Navare *et al*., 2015), les deux lipoprotéines dont les homologues chez *E. coli* sont Lpp et Pal respectivement. Chez *E. coli* ces lipoprotéines forment un complexe multiprotéique avec la porine majoritaire de membrane externe OmpA. Il a été suggéré que ce complexe serait impliqué dans le maintien de l'intégrité membranaire (Cascales *et al*., 2002).

ii. Rôle de senseur

Directement en contact avec l'environnement, OprF a été proposée comme senseur de signaux extracellulaires. En effet il a été montré qu'OprF est capable de lier de façon spécifique l'interféron gamma (INF-γ), une cytokine produite par les cellules immunitaires de l'hôte. L'interaction entre OprF et l'INF-γ provoque une cascade de signalisation entrainant l'activation du quorum sensing et l'expression du

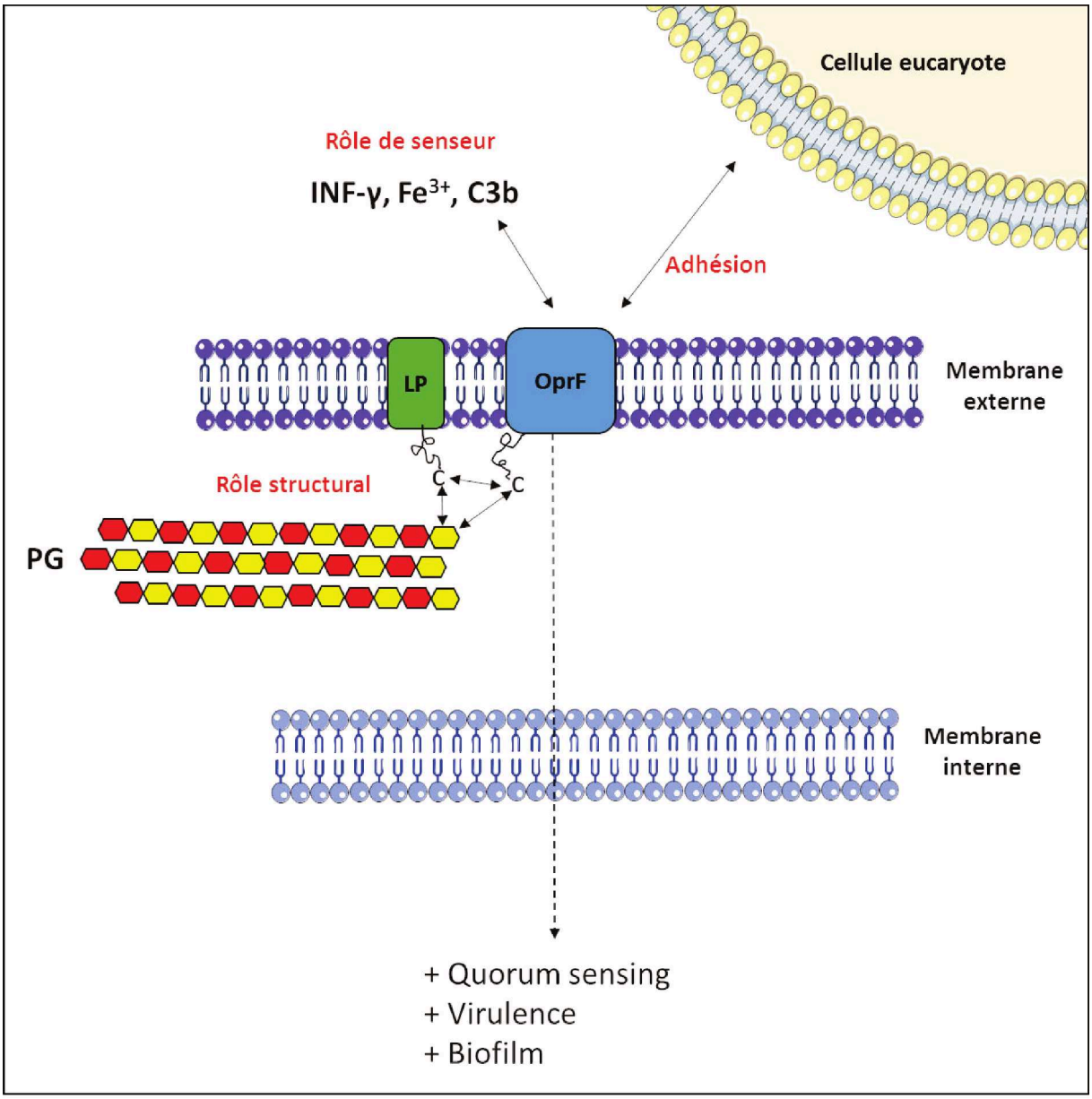


Figure 16. Les différentes fonctions d'OprF. Les pointillés indiquent un rôle indirect.

caractère virulent de la bactérie (Wu *et al*., 2005). OprF est également un récepteur pour la molécule C3b du système du complément humain. Le système du complément est un mécanisme immunitaire faisant partie de l'immunité innée. C'est un ensemble de protéines plasmatiques capables de se fixer à la surface des cellules bactériennes et de provoquer une lyse osmotique. La molécule C3b est un fragment protéique intervenant dans l'étape de reconnaissance et de recouvrement de la cellule infectieuse (Mishra *et al*., 2015). Chez *P. fluorescens*, OprF a également été proposée comme un système de reconnaissance spécifique pour le fer minéral dont la fixation sur OprF conduirait à l'inhibition de la biosynthèse de pyoverdine et la stimulation de la production d'un sidérophore secondaire encore inconnu (Magro *et al*., 2016) (Figure 16).

iii. Rôle dans la virulence

OprF est également impliquée dans la virulence de *P. aeruginosa* puisqu'il a été démontré que l'absence d'OprF entraine une diminution du caractère virulent de la souche sur plusieurs modèles. En effet, la souche sauvage *P. aeruginosa* H103 est capable de provoquer des nécroses sur feuille d'endive entre 5 et 8 jours après inoculation, tandis qu'un mutant *oprF* ne cause qu'une nécrose limitée même 8 jours après inoculation. Sur le modèle de *Caenorhabditis elegans,* la cytotoxicité du mutant *oprF* est également réduite puisque seulement 50% des vers meurent après 11 jours d'exposition contre la totalité de la population pour la souche sauvage et la souche complémentée H636O. Enfin sur deux lignées cellulaires eucaryotes, cellules gliales de rat et cellules humaines immortalisées Caco2/TC7, un mutant *oprF* ne provoque que 37% et 29% de mort cellulaire respectivement contre 100% pour la souche sauvage. Il a été démontré que la diminution du caractère virulent du mutant *oprF* vis-à-vis de ces différents modèles cellulaires est lié à l'altération de la production des facteurs de virulence tels que ceux sécrétés par le système de sécrétion de type III (ExoS, ExoT), la pyocyanine, ou encore l'exotoxine A (Fito-Boncompte *et al*., 2011).

iv. Rôle d'adhésine

OprF joue un rôle dans les interactions bactéries cellules hôtes et participe à l'adhésion des bactéries du genre *Pseudomonas* sur plusieurs types cellulaires. Chez *P. fluorescens*, OprF permet l'adhésion des bactéries aux racines de blé ou à la fibronectine humaine (De Mot *et al*., 1992; Rebière-Huët *et al*., 2002). Chez

P. aeruginosa, elle permet en partie l'adhésion aux cellules intestinales Caco2/TC7 et aux cellules gliales de rat (Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Elle participe à l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales pulmonaires A549 d'une manière dose-dépendante et est capable de s'associer à la lectine LecB. Elle aussi impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires et de l'oreille moyenne chez l'Homme et dans la formation de biofilm (Azghani *et al.*, 2002; Funken *et al.*, 2012; Mittal *et al.*, 2016, 2014). Enfin chez *P. fluorescens*, OprF est impliquée dans l'adhésion thermo-dépendante sur surfaces abiotiques (Hèmery *et al.*, 2006).

v. Formation de biofilm

Impliquée dans l'adhésion qui est la première étape de la formation de biofilm, OprF a été identifiée comme étant nécessaire à la formation de biofilm en conditions anaérobies (Hoboth *et al.*, 2009; Sriramulu *et al.*, 2005). Chez des patients atteints de mucoviscidose, le mucus présent dans les voies respiratoires crée un environnement pauvre en oxygène, favorisant la formation d'un biofilm plus stable (Yoon *et al.*, 2002). Les souches de *P. aeruginosa* capables de survivre dans ces conditions présentent une forte production d'OprF (Hassett *et al.*, 2009, 2002). Il a été suggéré que dans ces conditions, OprF pourrait fonctionner comme une perméase pour la capture du NO_3^- /NO_2^- et permettre ainsi la dénitrification (Yoon *et al.*, 2002). OprF est nécessaire pour la production de rhamnolipides, un biosurfactant jouant un rôle central dans le swarming et capable de modifier les propriétés physicochimiques de la surface cellulaire (Bouffartigues *et al.*, 2011). Ce glycolipide est impliqué dans la formation de biofilm via la formation de microcolonies et en maintenant les canaux fluidiques à l'intérieur du biofilm (Davey *et al.*, 2003; Pamp *et* Tolker-Nielsen, 2007).

b- Expression d'*oprF*

OprF est la protéine la plus abondante de la membrane externe (environ 200 000 molécules par cellule) dont le nombre de copies peut varier en fonction des conditions environnementales, témoignant d'une production contrôlée au niveau transcriptionnel et/ou post transcriptionnel. Bien que certaines conditions environnementales affectant la production et l'expression d'*oprF* soient connues, la régulation d'*oprF* reste cependant peu étudiée. L'étude de la région promotrice d'*oprF*

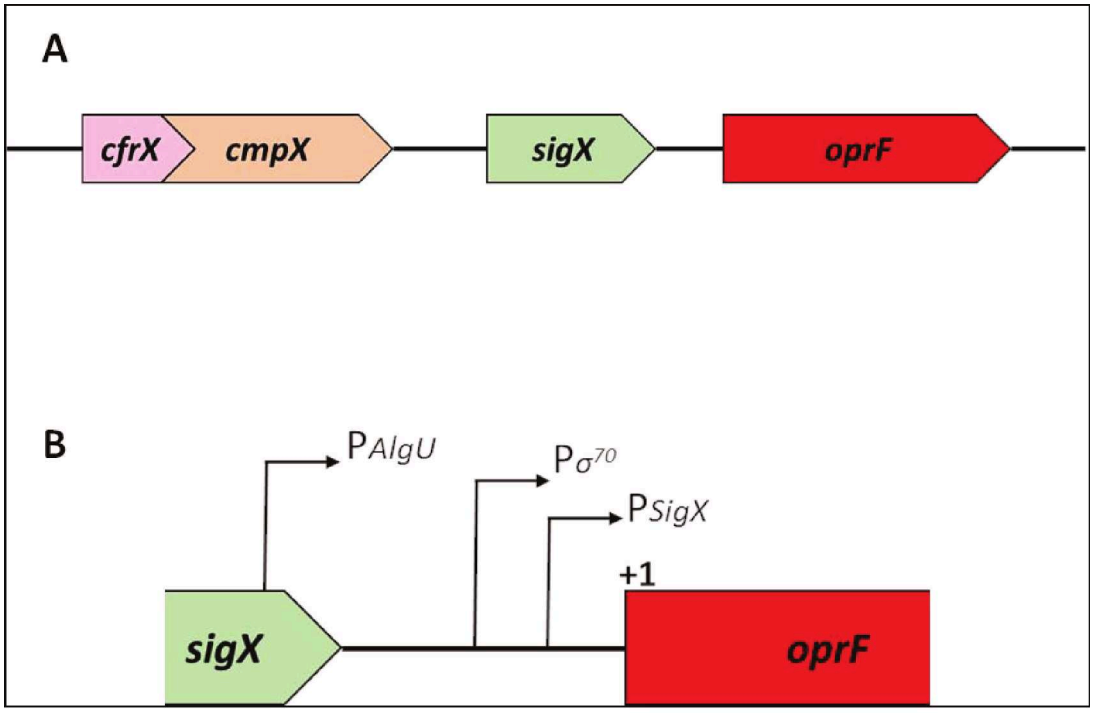


Figure 17. Schéma de l'organisation génomique (A) et des régions promotrices (B) d'*oprF* chez *P. aeruginosa* PAO1

a révélé que ce gène est sous le contrôle d'au moins 3 promoteurs dépendants de facteurs sigma différents :

- un promoteur dépendant du facteur sigma 70 permettant une expression constitutive d'*oprF* (Duchêne *et al*., 1988),
- un promoteur dépendant du facteur sigma ECF SigX localisé en amont du promoteur sigma 70 et le plus proximal du site de début de transcription (Brinkman *et al*., 1999),
- un promoteur dépendant du facteur sigma à fonctions extracytoplasmiques AlgU localisé dans le gène *sigX* situé en amont du gène *oprF* (Firoved *et al*., 2002), (Figure 17).

Le gène *oprF* est localisé en amont du gène codant le facteur sigma ECF *sigX* avec lequel il pourrait être co-transcrit (Brinkman *et al*., 1999). En milieu LB ou en présence de sucrose, l'expression d'*oprF* est majoritairement contrôlée par le facteur sigma SigX suggérant un lien fonctionnel entre ces deux protéines (Bouffartigues *et al*., 2012; Brinkman *et al*., 1999). Des expériences de RNA-seq ont permis d'identifier un motif potentiellement reconnu par AmpR en amont du gène *oprF*. AmpR est un régulateur transcriptionnel de type LysR impliqué dans la régulation de nombreux gènes codant des facteurs de virulence. Ce régulateur transcriptionnel contrôle également l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques tels que *ampC* codant une bêta-lactamase et *mexEF-oprN* codant une pompe à efflux (Balasubramanian *et al*., 2014).

5- Fonctions de la paroi

La principale fonction de la paroi est de protéger la cellule contre des variations environnementales pouvant endommager le contenu cellulaire. Elle forme une barrière rigide protégeant la cellule contre des variations de pression, de températures, de pH ou la présence de composés chimiques. La structure pariétale est une structure dynamique qui est également le siège de réactions enzymatiques, d'échanges nutritifs et d'informations. En contact direct avec l'environnement, elle contient de nombreux systèmes de perceptions de signaux permettant à la cellule de percevoir des variations de l'environnement et de mettre en place des mécanismes d'adaptation. De par ses fonctions cruciales, le maintien de son intégrité est essentiel pour la survie de la bactérie et nécessite la mise en place de nombreux réseaux de régulations.

IV- La réponse au stress de l'enveloppe (CESR)

La paroi bactérienne étant la première structure en contact avec l'environnement, elle est soumise à de nombreux stress liés aux variations des conditions environnementales.

1- Facteurs affectant la paroi bactérienne

a- Facteurs environnementaux

Dans leur habitat naturel, les bactéries sont soumises à des stress dus à des variations de facteurs environnementaux tels que la température, la pression osmotique, ou la présence de composés nécessaires à leur métabolisme, qui à forte concentration deviennent toxiques (métaux par exemple). La température et la pression osmotique sont des facteurs environnementaux pouvant altérer la fluidité des membranes lipidiques. L'état physiologique de la bicouche lipidique est important pour la fonction de barrière des membranes car il intervient directement dans la régulation de la fonction des protéines associées à la membrane telles que les translocateurs (de petites molécules), les canaux ioniques, et les protéines senseurs. La fluidité membranaire fait référence au désordre moléculaire et à la capacité des molécules à se mouvoir au sein de la bicouche lipidique. Dans des conditions optimales de croissance, la bicouche lipidique de la plupart des bactéries est entièrement ou majoritairement fluide, un état nécessaire au fonctionnement normal de la cellule. Lorsque la température diminue ou que la cellule encourt un stress hyper osmotique, la fluidité de la membrane diminue, on dit qu'elle se rigidifie. Au contraire lorsque la température augmente ou lorsque la cellule subit un stress hypo osmotique, la fluidité membranaire augmente pouvant conduire à la désintégration de la bicouche lipidique (Shivaji *et* Prakash, 2010). La fluidité membranaire dépend de la composition en acide gras, un des composants des phospholipides, et plus particulièrement du nombre d'acides gras insaturés et de la longueur des chaines acylées. Ces acides gras sont dits insaturés lorsqu'ils comportent une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone sur la chaine acylée (Los *et* Murata, 2004; Mansilla *et al.*, 2004). Lorsque la membrane se rigidifie, des enzymes appelées désaturases sont activées et le nombre d'acides gras insaturés est augmenté soit par modification de chaines d'acides gras existantes soit par synthèse de nouvelles chaines acylées. Plus le nombre d'insaturations augmente plus la membrane se fluidifie.

Certains métaux, comme le cuivre et le zinc, sont nécessaires en faibles concentrations à la croissance bactérienne. Cependant, présents en excès, ils sont très toxiques pour la cellule, le zinc pouvant se fixer aux groupements thiols affectant la fonction des protéines, et le cuivre pouvant générer des espèces réactives de l'oxygène. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent altérer à la fois l'ADN, les protéines et les lipides membranaires. L'altération des protéines a lieu sur les résidus cystéine et méthionine contenant des sulfures. Ces sulfures permettent la formation de ponts disulfures entre deux résidus et sont importants dans la stabilité et le repliement des protéines dans leur conformation native. Les ROS oxydent les résidus cystéine et méthionine produisant de l'acide sulfénique et des méthionines sulfoxides respectivement, conduisant à l'inactivation, le mauvais repliement, ou la dégradation des protéines. L'espace périplasmique contient de nombreuses protéines enzymatiques, ayant des fonctions importantes dans la biogenèse de la paroi. Ces protéines contiennent des résidus cystéine majoritairement oxydées en disulfures les rendant particulièrement sensibles au stress oxydant (Arts *et al.*, 2015).

b- Les antibiotiques

L'intégrité de la paroi cellulaire étant un élément crucial pour la survie de la bactérie, elle constitue une cible privilégiée pour l'action de nombreux antibiotiques (Figure 18).

i. Les antibiotiques ciblant la biosynthèse du peptidoglycane

Les β-lactamines sont des peptides non ribosomaux, ce qui signifie que la chaine peptidique est synthétisée par des complexes enzymatiques plutôt que par le ribosome, comme c'est le cas pour les protéines. Ils regroupent les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Ces antibiotiques interviennent lors d'étapes spécifiques de la biosynthèse du peptidoglycane. Les β-lactamines possèdent une analogie de structure avec le résidu D-Ala-D-Ala et agissent donc comme un substrat des PlPs, ces enzymes intervenant dans la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane. Ces molécules bloquent la formation des liaisons entre les chaines peptidiques des unités de peptidoglycane en inhibant la réaction catalysée par les PlPs (Bush *et* Bradford, 2016).

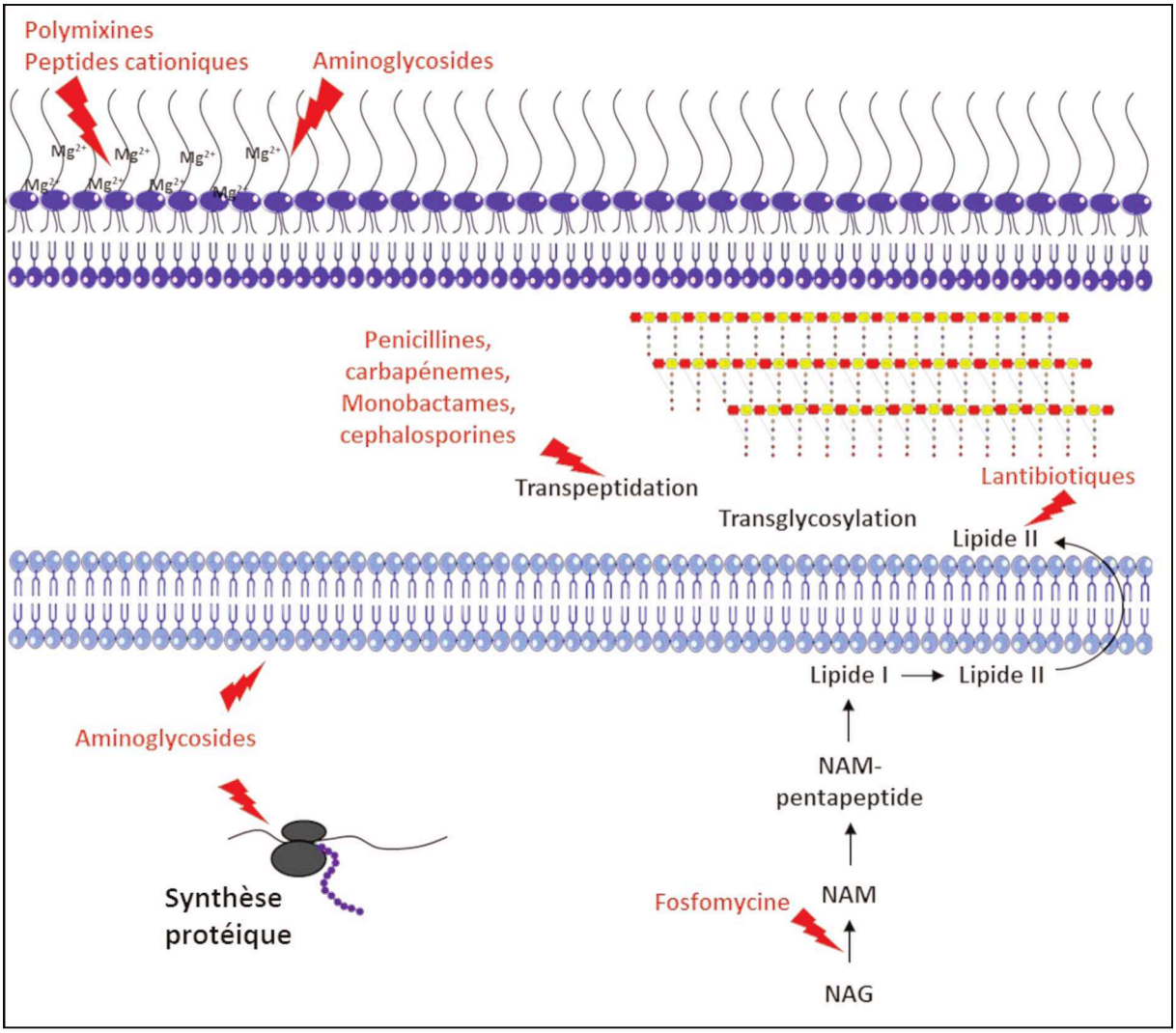


Figure 18. Schéma représentant les différents modes d'action des antibiotiques altérant l'enveloppe cellulaire.

La fosfomycine est un antibiotique appartenant à la classe des acides phosphoniques. Cette molécule inhibe la première étape de la synthèse du peptidoglycane en empêchant l'activité de l'enzyme MurA. La fosfomycine forme une liaison covalente avec le site actif de MurA impliqué dans la conversion du NAG en acide NAM.

Les lantibiotiques sont des peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif. Ces peptides subissent des modifications post-traductionnelles entrainant la création d'acides aminés inhabituels telle que la lanthionine/méthyllanthionine d'où ils tiennent leur nom. Le lantibiotique le plus caractérisé est la nisine A produit par *Lactococcus lactis subsp lactis*. Ces antimicrobiens agissent sur la biosynthèse du peptidoglycane mais entrainent également la formation de pores dans les membranes cellulaires. Les lantibiotiques se fixent sur le lipide II séquestrant ainsi le précurseur de la synthèse du peptidoglycane et empêchant son utilisation par les transglycosylases et transpeptidases. Pour certains lantibiotiques dont la nisine, la liaison au lipide II facilite également la formation de pores conduisant à la sortie d'ions et de petites molécules dans le milieu extracellulaire (Draper *et al.*, 2015).

ii. Les antibiotiques ciblant la membrane :

Les polymyxines : les polymyxines sont des peptides cationiques non ribosomaux possédant une grande affinité pour les molécules de LPS chargées négativement. Ces molécules pénètrent dans la cellule par la voie du « self-promoted uptake » en déplaçant les cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+}, qui forment les ponts ioniques entre deux molécules de LPS voisines. L'insertion des polymyxines dans la membrane entraine une dépolarisation, et la formation de pores, une augmentation de la perméabilité membranaire (Falagas *et al.*, 2005).

Les peptides antimicrobiens cationiques ribosomaux : ces peptides sont une part importante de l'immunité innée chez tous les êtres vivants, mammifères, amphibiens, insectes, champignon et bactéries. Chez les mammifères, ces peptides sont présents dans les neutrophiles, les secrétions de muqueuses ou de peau provenant des cellules épithéliales, ou sont des produits de la dégradation des protéines. Les peptides antimicrobiens les plus caractérisés chez les mammifères sont les défensines. Ces peptides sont divisés en deux groupes, les β-défensines présentes

dans les cellules épithéliales, les neutrophiles et les leucocytes, et les défensines classiques présentes dans les neutrophiles et les cellules de Paneth. Chez les bactéries, les peptides cationiques sont sécrétés par les bactéries à Gram positif et sont nommées bactériocines. Ces molécules sont généralement produites pour tuer des espèces bactériennes compétitrices. Le double caractère cationique et hydrophobe de ces peptides favorise l'interaction avec les membranes externe et cytoplasmique des bactéries. Certains de ces peptides se lient au LPS avec une affinité trois plus importante que celle des cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+}. Par un mécanisme de compétition ces peptides déplacent les cations natifs et étant volumineux, perturbent la membrane (Hancock *et* Chapple, 1999).

iii. Les antibiotiques agissant indirectement sur la paroi :

D'autres classes d'antibiotiques n'ayant pas pour cible directe l'enveloppe cellulaire peuvent cependant altérer la structure pariétale. C'est le cas des aminoglycosides, des antibiotiques à large spectre agissant sur la synthèse protéique. Ils inhibent la synthèse protéique en se fixant avec une forte affinité sur le site de décodage ou site A de l'ARN ribosomique 16S de la sous unité 30S du ribosome. Cette interaction entraine des erreurs de lecture de l'ARN messager par le ribosome et l'incorporation d'un acide aminé inapproprié dans la protéine en cours de synthèse. Ces erreurs de traduction conduisent à la production de protéines défectueuses (Wilson, 2014). Certains aminoglycosides peuvent également affecter la synthèse protéique en bloquant l'élongation ou en inhibant l'initiation de la traduction. L'entrée des aminoglycosides dans la cellule est initiée par la fixation de l'aminoglycoside polycationique sur la membrane via des interactions électrostatiques avec les phospholipides et le LPS chargés négativement. Ces interactions entrainent le déplacement des ions magnésiums associés aux molécules de LPS, perméabilisant ainsi la membrane et permettant l'entrée de l'antibiotique dans la cellule. L'entrée dans le cytoplasme se fait ensuite par un mécanisme de transport d'électrons énergie-dépendant. Elle est dépendante de la respiration et repose sur l'activité de cytochromes associés à la membrane. Les aminoglycosides peuvent également affecter la composition membranaire en permettant l'incorporation de protéines défectueuses dans la membrane cytoplasmique augmentant ainsi la perméabilité et facilitant l'entrée d'autres molécules d'aminoglycosides (Kohanski *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2016).

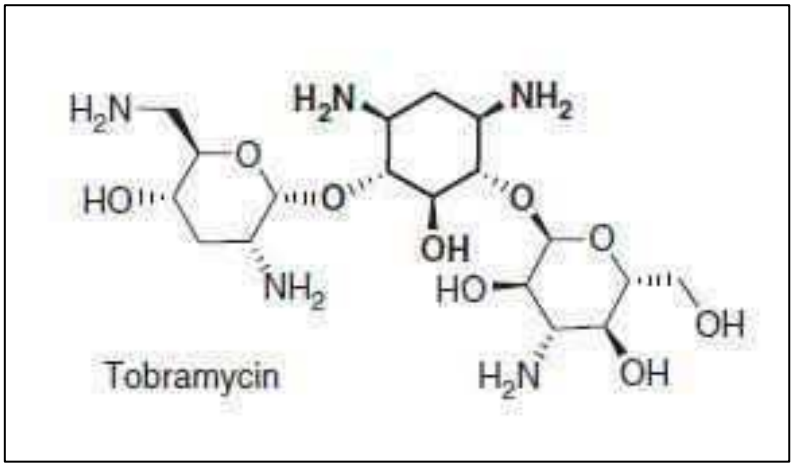


Figure 19. Structure de la tobramycine (Krause et *al.,* 2016).

Les aminoglycosides représentent une des classes d'antibiotiques les plus utilisées pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*. Ils sont généralement utilisés en combinaison avec des pénicillines car leur action sur la membrane facilite l'entrée des antibiotiques dans la cellule. L'un des aminoglycosides le plus utilisé est la tobramycine.

c- La Tobramycine

La tobramycine est un aminoglycoside produit par *Streptomyces tenebrarius* et introduit en usage clinique en 1967. Cette molécule est composée d'un noyau central commun à tous les aminoglycosides, le 2-désoxystreptamine substitué en positions 4 et 6 par des sucres aminés (Krause *et al.*, 2016) (Figure 19). Délaissée dans les années 80 au profit de β-lactames de 3ème génération et de fluoroquinolones considérées comme moins toxiques, l'utilisation des aminoglycosides et notamment de la tobramycine, a connu un intérêt nouveau avec l'émergence de bactéries multirésistantes. Ces molécules sont désormais largement utilisées dans l'union européenne et aux Etats Unis pour le traitement d'infections pulmonaires chronique à *P. aeruginosa*, chez des patients atteint de mucoviscidose. De plus les formes inhalées majoritairement utilisées en clinique permettent une meilleure exposition locale et une toxicité réduite (Tiddens *et al.*, 2014). Lors des infections chroniques, *P. aeruginosa* se développe sous forme de biofilm. Il a été montré que la tobramycine, ainsi que de nombreux autres antibiotiques pouvaient également agir comme des molécules signal à l'intérieur de communautés bactériennes et affecter l'expression des gènes (Andersson *et* Hughes, 2014; Ryan *et* Dow, 2008). Utilisée en concentration sub-inhibitrices, la tobramycine est notamment capable d'inhiber le quorum sensing, d'augmenter la mobilité de la souche et d'induire la formation de biofilm (Babić *et al.*, 2010; Goh *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2005).

2- Régulation du CESR

Le maintien de l'intégrité pariétale constitue un enjeu majeur pour la survie de la cellule. Il est crucial pour celle-ci de pouvoir percevoir et répondre rapidement aux variations de l'environnement pouvant nuire à son intégrité. Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des génomes bactériens contenant le plus de gènes codant pour

des systèmes de régulation, qui représentent environ 10% de la totalité des gènes. La majorité de ces gènes est impliquée dans des systèmes de perception-transduction de signaux. Dans ces systèmes une protéine de membrane interne jouant le rôle de senseur, est capable de percevoir une altération de la structure pariétale et de transduire ce signal à un ou des régulateurs cytoplasmiques. Une fois activés, ces régulateurs vont pouvoir contrôler la transcription d'un certain nombre de gènes impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe. Parmi ces systèmes de perception-transduction de signaux, on trouve majoritairement les systèmes à deux composants (TCS pour Two Components System) et les systèmes sigma-antisigma.

a- Les systèmes à deux composants (TCS)

Le génome de *P. aeruginosa* possède 64 gènes codant des histidine kinases et 72 codant des régulateurs de réponse, témoignant du fort pouvoir d'adaptation de la bactérie (Gooderham *et* Hancock, 2009). Parmi ces systèmes, au moins 10 sont impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe (Figure 20).

i. Les TCS régulant les pompes à efflux

Les gènes codant ces systèmes d'efflux sont généralement organisés en opéron. Leur expression est contrôlée par des réseaux de régulation complexes impliquant des régulateurs transcriptionnels spécifiques ou plus généraux. Dans le cadre de la réponse à un stress pariétal, la régulation de ces gènes fait intervenir les systèmes à deux composants. Chez *P. aeruginosa*, 2 TCS interviennent dans la régulation de ces pompes à efflux, les systèmes AmgRS, ParRS.

AmgR-AmgS : Le TCS AmgR-AmgS, pour « Aminoglycoside resistance », a été décrit pour la première fois en 2009 par Lee *et al.* lors de l'analyse d'une banque de mutants de *P. aeruginosa* PAO1 dont la sensibilité à la tobramycine était augmentée. Cette étude a révélé qu'une mutation inactivant la fonction du TCS PA5200/PA5199 (AmgR/AmgS) entraine une réduction de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de tobramycine de 8 à 16 fois (Lee *et al.*, 2009). Ce système est impliqué dans la résistance intrinsèque de la bactérie aux aminoglycosides et contrôle des gènes impliqués dans la protéolyse et le transport membranaire (Hinz *et al.*, 2011;

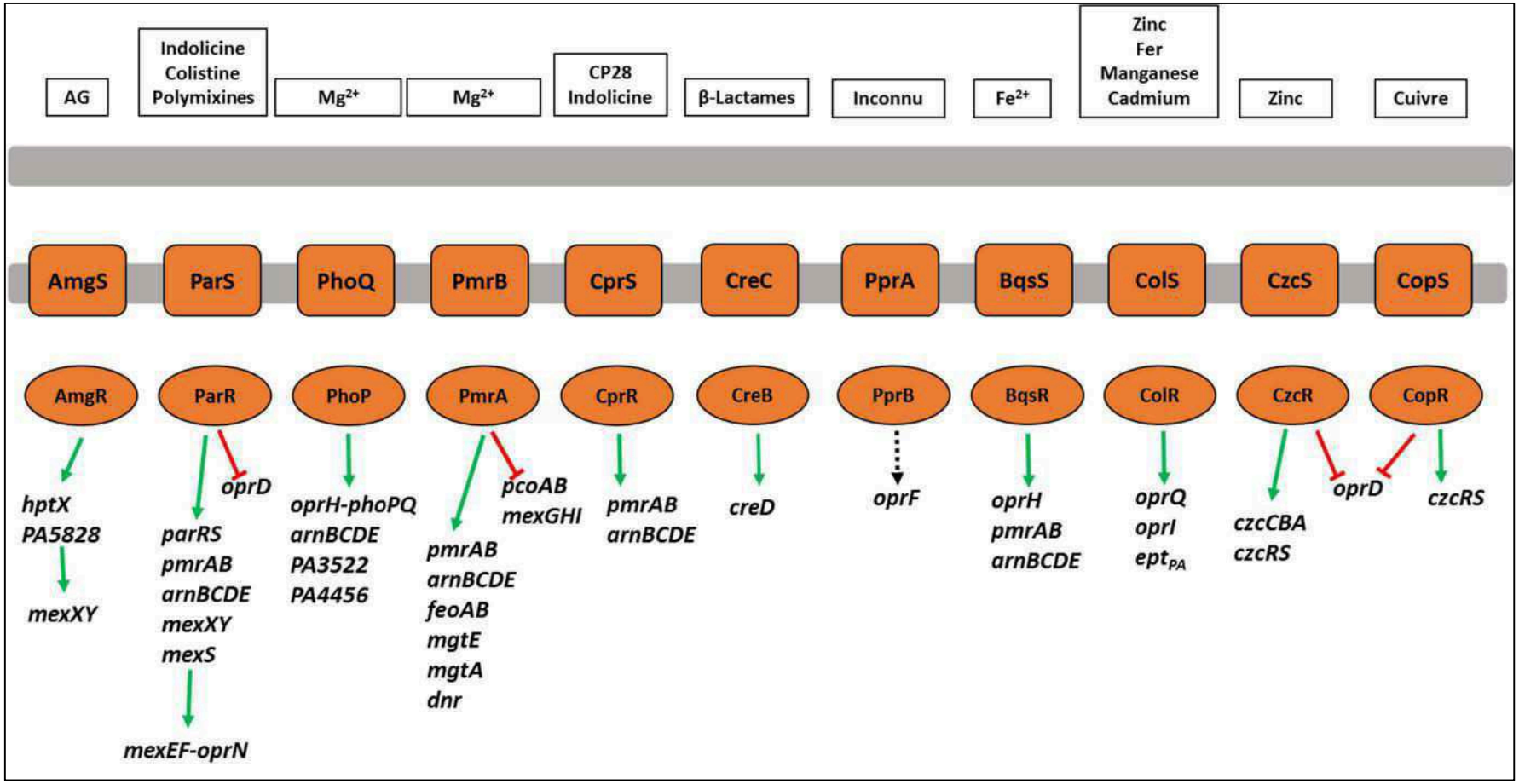


Figure 20. Les systèmes à deux composants impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe chez *P. aeruginosa*

Krahn *et al*., 2012; Lee *et al*., 2009). L'homologue de ce système chez *E. coli* est le TCS CpxRA impliqué dans la réponse au stress de l'enveloppe provoqué par la présence de protéines mal repliées ou de polypeptides aberrants dans la membrane. AmgRS contrôle l'expression de gènes tels que *htpX* codant une protéase, et *mexXY* codant des éléments de la pompe à efflux MexXY-OprM (Lau *et al*., 2015, 2013; Lee *et al*., 2009). MexXY-OprM est une pompe à efflux de la famille des RNDs dont les substrats sont des composés ciblant la synthèse protéique tels que les aminoglycosides. En absence de signal, la présence du répresseur MexZ sur la région promotrice de l'opéron *mexXY* empêche la fixation de l'ARN polymérase et la transcription de ces gènes. En présence de protéines aberrantes suite à l'action des aminoglycosides, la répression de l'expression de *mexXY* est levée grâce à l'activité d'un anti répresseur ArmZ capable de séquestrer MexZ. Il a été suggéré que la régulation de *mexXY* par AmgRS serait indirecte et nécessiterait l'activité des protéines HtpX et PA5528, qui elles-mêmes interviendraient dans la levée de répression en favorisant l'interaction entre ArmZ et MexZ (Lau *et al*., 2015)**,**

ParR-ParS : Le système ParRS est un TCS clé de la résistance intrinsèque et acquise de *P. aeruginosa* à de nombreux antibiotiques. Ce système est activé en présence de peptides polycationiques eucaryotes (indolicine) ou bactériens (polymyxine, colistine), et intervient dans la résistance aux polymyxines, aminoglycosides, fluoroquinolones et β-lactames (Fernández *et al*., 2010; Muller *et al*., 2011) via trois mécanismes distincts, à savoir i) la modification du LPS, ii) une diminution de la perméabilité membranaire en réduisant la production de porines, et iii) un efflux actif des antibiotiques. Deux pompes à efflux sont sous le contrôle de ce système, les pompes MexXY-OprM et MexEF-OprN. Contrairement au système AmgRS, ParRS semble réguler la production de MexXY indépendamment d'ArmZ. Il a également été montré que la régulation de l'expression de *mexY* par ParRS n'intervient que lorsque la souche est exposée à des peptides cationiques. Les aminoglycosides, inducteurs et substrats de la pompe, n'ont aucun effet sur l'activité du système (Muller *et al*., 2011). Une analyse transcriptomique a révélé que l'inactivation des gènes *parS* et *parR* conduit à la dérégulation de 331 et 257 gènes, respectivement. Parmi eux, 24 sont sous exprimés à la fois dans les mutants *parR* et *parS,* en comparaison avec la souche sauvage, parmi lesquels *mexE*, *mexF*, *mexS* et *oprN* (Wang *et al*., 2013). Ces gènes codent la pompe à efflux MexEF-OprN, et

l'oxydoréductase MexS, impliquée dans la régulation de cette pompe (Sobel *et al.*, 2005). MexEF-OprN est très peu exprimée chez les souches sauvages. Elle est impliquée dans la résistance aux quinolones, au chloramphénicol, et au triméthoprime, ainsi que dans la tolérance aux solvants, colorants et biocides (Köhler *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2015). Contrairement aux autres pompes, MexEF-OprN est contrôlée positivement par MexT, dont le gène est localisé en amont de l'opéron *mexEF*. MexT est un régulateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de nombreux gènes dont *mexEF*, *oprN*, *oprD* et *mexS*. Il a été montré que la mutation de *mexS* augmente l'expression de *mexEF oprN* via l'activité de MexT. Le mécanisme par lequel MexT interagit avec MexS n'est pas encore complétement décrit mais il a été suggéré que l'altération de MexS, ayant une fonction de détoxification, pourrait entrainer une accumulation de métabolites toxiques dans la cellule. Ces métabolites agiraient alors comme des co-inducteurs de MexT (Sobel *et al.*, 2005). La régulation de la production de MexEF-OprN par MexS étant dépendante de MexT. ParRS pourrait intervenir dans l'activité de l'opéron en favorisant l'interaction entre MexS-MexT (Wang *et al.*, 2013). ParRS est ainsi un TCS jouant un rôle central dans la réponse au stress pariétal et la résistance aux antibiotiques. En présence d'antimicrobiens tel que l'indolicine, ParR intervient dans la répression d'*oprD* codant la porine OprD impliquée dans le transport des carbapénèmes, dans l'expression de l'opéron *arnBCADTEF-ugd* codant des enzymes modifiant le LPS, et de l'opéron PA4773-PA4775-*pmrAB* codant le TCS PmrAB. Ce système, impliqué lui aussi dans la réponse au stress de l'enveloppe, sera décrit ultérieurement (Muller *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

ii. Les TCS impliqués dans la modification du LPS

Le LPS est la cible privilégiée des peptides cationiques de par les nombreuses charges négatives qu'il comporte. L'un des mécanismes de protection des bactéries vis-à-vis de ces composés est la modification du LPS réduisant ainsi l'interaction de ces antimicrobiens avec la molécule. Ce mécanisme de protection implique majoritairement la surexpression de l'opéron *arnBCADTEF-ugd*. Cet opéron code des enzymes permettant l'addition d'un 4-aminoarabinose sur le lipide A, réduisant ainsi la charge nette du LPS. L'expression de cet opéron est sous le contrôle de plusieurs TCS, témoignant de l'importance de ce mécanisme dans la résistance de la bactérie.

PhoP-PhoQ : Le système PhoP-PhoQ est un TCS activé en réponse à de faibles concentrations de Mg^{2+}, une exposition à des peptides cationiques ou à des composés polycationiques issus de la décarboxylation de résidus arginine, ornithine ou lysine, des polyamines, ou encore suite à l'interaction de la bactérie avec des cellules eucaryotes (Gellatly *et al*., 2012; Kwon *et* Lu, 2006; Macfarlane *et al*., 1999; McPhee *et al*., 2003). Il est codé par l'opéron *oprH-phoP-phoQ* où *oprH* code la porine OprH impliquée dans la stabilisation de la membrane externe, *phoP* le régulateur et *phoQ* l'histidine kinase du TCS (Macfarlane *et al*., 1999). Lorsqu'il est activé par de faibles concentrations en Mg^{2+}, ce système est impliqué dans la résistance aux polymyxines, aux peptides cationiques, aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones (Kwon *et* Lu, 2006; Miller *et al*., 2011). PhoP-PhoQ intervient dans la résistance aux antibiotiques principalement en activant la transcription de l'opéron *arn* codant les enzymes impliquées dans la voie de modification du LPS, permettant l'ajout d'un 4 aminoarabinose sur le lipide A, et empêchant ainsi l'interaction des peptides cationiques avec le LPS (McPhee *et al*., 2003; Miller *et al*., 2011). L'analyse transcriptomique d'un mutant *phoP* cultivé en présence de faibles concentrations de Mg^{2+}, a révélé que sur 158 gènes dont l'expression est dépendante de la concentration en Mg^{2+}, seuls 18 sont régulés par PhoP. PhoP agit principalement comme un activateur transcriptionnel puisque la majorité de ces gènes (14/18) sont positivement régulés (McPhee *et al*., 2006). Parmi eux on trouve l'opéron *arn* de modification du LPS, l'opéron *oprH-phoPQ*, des gènes codant des enzymes de dégradation des polyamines, le gènes PA3522 codant un transporteur de la famille des RNDs, et un opéron codant un ABC transporteur impliqué dans l'efflux de tétracycline (Chen *et* Duan, 2016; McPhee *et al*., 2006) . Contrairement à PhoP, le senseur PhoQ est lui impliqué dans diverses fonctions cellulaires telles que la virulence, la mobilité et la formation de biofilm (Gooderham *et al*., 2009). La mutation de ce senseur entraine également une surexpression de l'opéron PA4776-4777 codant le TCS PmrA/PmrB.

PmrA-PmrB : PmrA-PmrB est un TCS activé en réponse à de faibles concentrations de Mg^{2+} ou à l'exposition de la bactérie à des polymyxines et peptides cationiques. Il est impliqué dans l'expression de l'opéron *arn* indépendamment de l'activité de PhoP (McPhee *et al*., 2003). Il peut également être régulé par l'activité du système ParRS (Muller *et al*., 2011). Comme PhoPQ, ce système est impliqué dans la résistance aux polymyxines et peptides cationiques dont l'interaction avec le LPS

entraine une déstabilisation de la membrane (Moskowitz *et al*., 2004). Trente-six gènes ont été identifiés comme faisant partie du régulon de PmrA, qui agit principalement en tant qu'activateur transcriptionnel (McPhee *et al*., 2006). Ce régulon comprend par exemple, l'opéron *feoAB* impliqué dans le transport du fer ferreux, des gènes *mgtE* et *mgtA* impliqués dans le transport des ions magnésium, l'opéron *pmrAB*, et des gènes codant des protéines de régulation, dont Dnr un régulateur transcriptionnel impliqué dans la réponse au stress nitrosant. Quelques gènes sont cependant négativement régulés par PmrAB, parmi lesquels l'opéron *pcoAB* impliqué dans la résistance au cuivre et l'opéron *mexGHI* codant une pompe a efflux de la famille RND dont la régulation par PmrAB n'est pas dépendante du magnésium (McPhee *et al*., 2006).

CprR-CprS : Le système CprR-CprS pour « Cationic Peptide Resistance » a été identifié par Fernãndez *et al* chez des souches de *P. aeruginosa* dont la surexpression de l'opéron *arn* en réponse à une exposition à certains peptides cationiques ne pouvait s'expliquer par l'induction des systèmes ParRS, PhoPQ et PmrAB. C'est le cas du peptide antimicrobien à CP28. Après exposition de *P. aeruginosa* à ce peptide, la surexpression de l'opéron *arn* est uniquement dépendante de CprR (Fernández *et al*., 2012). De manière intéressante, CprRS peut également être activé en réponse à différentes concentrations d'indolicine, un peptide cationique activant le système ParRS. Cependant, à faibles concentrations, seul le système ParRS est responsable de la surexpression de l'opéron *arn*. Il a été suggéré que cette différence d'induction serait liée à l'affinité des senseurs CprS et ParS pour ces peptides. L'analyse transcriptomique du régulon de CprR en réponse à une exposition au CP28 a révélé que seuls 15 gènes (dont les opérons arn, pmrAB) sont dérégulés de manière négative chez le mutant *cprR* en comparaison avec la souche sauvage, suggérant que CprR agit uniquement en tant qu'activateur transcriptionnel. L'exposition au CP28 n'affectant pas l'expression des gènes *cprRS*, ce système ne semble pas être autorégulé. Enfin il a été montré que chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* résistantes aux polymyxines, l'activation constitutive du régulateur PhoP entraine une modification du lipide A. La mutation de *cprRS* chez ces souches réduit la modification du lipide A ainsi que la résistance aux polymyxines suggérant que la résistance due à l'activation du PhoPQ serait dépendante de CprRS. Cette étude a également montré qu'un deuxième TCS, ColRS activé en réponse à un excès de

métaux était lui aussi impliqué dans la résistance aux polymyxines via PhoPQ (Gutu *et al*., 2013). Il sera décrit ultérieurement.

iii. Les TCS répondant à l'altération de la biosynthèse du peptidoglycane

CreB-CreC : La résistance aux β-lactames est généralement médiée i) par des mécanismes de dégradation de l'antibiotique *via* l'action d'enzymes appelées β-lactamases ou ii) par la modification de leurs cibles, les PIPs. Chez les entérobactéries et *P. aeruginosa*, la résistance aux β-lactames, notamment aux pénicillines, céphalosporines et monobactames, est principalement liée à la surexpression du gène *ampC* présent sur le chromosome et codant une β-lactamase. La surexpression d'*ampC* est induite par la présence de certains β-lactames, appelés inducteurs de β-lactamases, tels que la céfoxitine ou l'imipinème. Elle est due à l'apparition de mutations spontanées au sein des gènes codant des répresseurs d'*ampC* tel qu'AmpR (Pfeifer *et al*., 2010). AmpR est un régulateur transcriptionnel codé par un gène localisé directement en amont d'*ampC*. Son activité de répresseur est inhibée par l'accumulation dans le cytoplasme de peptidoglycanes non conformes conduisant à la production d'AmpC (Zeng *et* Lin, 2013). La résistance aux β-lactames provient également de mutations des gènes codant les PIPs, des enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane. La mutation d'un gène dont l'homologue chez *E. coli*, *dacB* code une PIP non essentielle (PIP4), est la principale voie d'acquisition d'un haut niveau de résistance aux β-lactames. Cette mutation entraine la surexpression d'*ampC* et de gènes codant le TCS CreBC (Moya *et al*., 2009). Chez *E. coli* ce système est décrit comme un régulateur global de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone. Chez les espèces d'*Aeromonas*, ce système nommé BlrAB est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes codant les β-lactamases. Chez *P. aeruginosa*, CreBC est activé en présence de β-lactames induisant fortement la production d'AmpC et l'inhibition de PIP4. Comme chez *Aeromonas* ce système joue un rôle majeur dans l'acquisition de la résistance aux β-lactames puisque l'inactivation de CreBC chez des souches sauvages de *P. aeruginosa* PAO1 réduit considérablement l'émergence de mutants spontanés *dacB*, résistants à la ceftazidime (Moya *et al*., 2009). Il a été suggéré que ce système répondrait à des signaux générés dans l'enveloppe, comme son homologue chez *Aeromonas,* mais régulerait

l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, agissant comme un régulateur global à l'image de son homologue chez *E. coli*. En effet, en présence ou en absence d'antibiotiques, ce système contrôle l'expression de 53 gènes dont *creD* codant une protéine de membrane interne de fonction inconnue et des gènes impliqués dans la dénitrification et le transport de nitrates et nitrites. De manière intéressante la plupart de ces gènes sont surexprimés chez un mutant *creBC* en absence d'antibiotiques et sous exprimés en présence de céfoxitine ou ceftazidime. Ce système est également impliqué dans la formation de biofilm puisque l'inactivation de *creBC* et *creD*, la cible directe de CreBC, réduit très fortement la biomasse en absence et en présence d'antibiotiques (Zamorano *et al.*, 2014).

iv. Les TCS impliqué dans la modification de la perméabilité membranaire

La modification de la composition protéique des membranes, et notamment de la membrane externe contenant les porines, est un mécanisme commun de résistance à de nombreux antibiotiques. Ainsi, l'activation du TCS ParRS diminue la production de la porine OprD impliquée dans le transport de l'imipenème, et surproduit les pompes à efflux MexXY-OprM et MexEF-OprN permettant le rejet des composés toxiques.

PprA-PprB : Le système PprAB a été identifié chez des mutants de *P. aeruginosa* PAK résistants aux aminoglycosides et possédant une croissance altérée, suggérant un défaut de perméabilité membranaire. Ces souches arborent une mutation dans le gène *pprA* codant le senseur histidine kinase du système PprAB. Ce système est impliqué dans la régulation de la perméabilité membranaire puisque l'inactivation de *pprA* conduit à une diminution de 30% de la perméabilité membranaire en comparaison de la souche sauvage. De plus la composition protéique de la membrane externe est également modifiée chez un mutant *pprA*, avec une différence majeure dans la production d'OprF qui est plus abondante chez le mutant que chez la souche sauvage (Wang *et al.*, 2003). L'analyse transcriptomique d'un mutant *pprB* a révélé que 175 gènes sont contrôlés par PprB, dont 113 sont réprimés et 62 sont activés, suggérant un rôle tout du moins partiel de PprB dans le contrôle du transport membranaire de différentes molécules (Wang *et al.*, 2003). De manière intéressante, PprB intervient également dans l'expression de gènes impliqués dans le transport et

la synthèse de molécules du quorum sensing, ce système de communication intercellulaire impliqué dans l'expression du caractère virulent de la bactérie (Dong *et al*., 2005). Bien que les signaux conduisant à l'activation de PprA-PprB ne soient pas encore caractérisés, ce système apparait comme un régulateur majeur de l'adaptation de *P. aeruginosa* à son environnement.

v. Les TCS ne répondant pas aux antibiotiques

BqsR-BqsS : Le système BqsR-BqsS est un TCS activé en présence de Fer, particulièrement sous sa forme soluble Fe(II). Le senseur BqsS possède sur son domaine périplasmique un motif de reconnaissance du Fe(II), analogue à celui des protéines senseur de Fer. En réponse à des variations de Fe(II), une centaine de gènes serait régulée par BqsR, dont un tiers serait impliqué dans des mécanismes de réponse au stress. BqsR serait impliqué dans l'expression des opérons *oprH-phoP-phoQ*, *arn pmrAB*, et des gènes impliqués dans le transport de polyamines, dont la spermidine (Kreamer *et al*., 2015). La spermidine est une polyamine dont la production permet à *P. aeruginosa* de résister à de nombreux antibiotiques en stabilisant le LPS mais aussi en séquestrant les peptides cationiques.

ColR-ColS : Le système ColRS a été identifié chez *P. fluorescens* comme étant impliqué dans la capacité de la bactérie à coloniser des racines de plantes. Chez *P. putida* ce système est activé en réponse à de fortes concentrations environnementales de métaux, dont le zinc, le fer, le manganèse et le cadmium, et intervient dans la tolérance au phénol. Il est impliqué dans le contrôle de l'expression de la pompe à efflux TtgABC, l'homologue de MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* (Putrins *et al.*, 2010), de la lipide A 3-O-deacylase PagL, et de la porine OprQ (Ainsaar *et al*., 2014; Kivistik *et al*., 2006). Une analyse bio-informatique du régulon de ColR, basée sur la recherche de sites de fixation de ColR sur l'intégralité du génome de *P. putida*, a prédit que ColR serait impliqué dans la régulation de plus de 50 gènes dont la moitié interviendrait dans les fonctions membranaires (Kivistik *et al*., 2009). Chez *P. putida*, ce TCS a été proposé pour être impliqué dans la préservation de l'intégrité de la membrane externe suite à une surproduction de certaines porines, notamment en cas de carence nutritive (Putrins *et al*., 2011). Chez *P. aeruginosa*, ce système a été associé à la résistance aux polymyxines chez des souches cliniques arborant une mutation du gène *phoQ*. Bien qu'il ne soit pas activé par la présence d'antibiotiques, il été montré que la

présence d'un système ColRS fonctionnel est nécessaire à l'acquisition de cette résistance et la modification du lipide A, suggérant que ColRS contrôlerait l'expression de facteurs inconnus impliqués dans ce mécanisme (Gutu *et al*., 2013). Chez *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* et *Nesseria gonorrhoeae*, l'addition d'un groupement phosphoéthanolamine sur le lipide A par une enzyme appelée EtpA a également été associée à la résistance aux polymyxines et la virulence des souches. Chez *E. coli*, le transfert du groupement phosphoéthanolamine sur le lipide A par EtpA est induit par la présence d'ions ferriques ou zinc dans le milieu extérieur et dépendant de l'activité du TCS BasRS (Hagiwara *et al*., 2004). Chez *P. aeruginosa* le transfert d'un phosphoéthanolamine sur le lipide A est assuré par une enzyme appelée $EtpA_{Pa}$ dont l'activité est contrôlée par le système ColRS en réponse à un excès de Zinc uniquement (Nowicki *et al*., 2015).

CzcR-CzcS : Le système CzcRS est un TCS activé en réponse à un excès de zinc dans le milieu extracellulaire. Ce système régule positivement un opéron codant la pompe à efflux CzcCBA, impliquée dans le transport de métaux lourds dont le cadmium et le cobalt. La surexpression de la pompe s'accompagne de la sous production de la porine OprD sur laquelle CzcR agit comme un répresseur, connectant ainsi la résistance aux métaux et la résistance à l'imipenème (Perron *et al*., 2004). Ce système est également impliqué dans la virulence, la formation de biofilm et la régulation du quorum sensing (Dieppois *et al*., 2012).

CopR-CopS : Le système CopRS est activé en réponse au cuivre et régule l'opéron *copRSCD* impliqué dans l'homéostasie du cuivre chez *P. fluorescens* (Hu *et al*., 2009). Chez *P. aeruginosa*, le régulateur CopR possède 73% de similarité et 55% d'identité de séquence avec le régulateur CzcR impliqué dans la réponse au zinc. CopR relie la résistance au cuivre et la tolérance au zinc en régulant le système *czcRS*. En absence de cuivre, CopR, lorsqu'il est surproduit, est capable de se fixer directement sur une séquence appelée « cop box » en amont de l'opéron *czcCBA* codant pour la pompe à efflux impliqué dans le transport de métaux lourds. En absence de signal ce régulateur serait alors impliqué dans la tolérance au zinc indépendamment du système CzcRS. En revanche en présence de cuivre, CopR régule *czcCBA* via l'activation de l'opéron *czcRS* uniquement. Enfin, comme CzcR, CopR est également un répresseur de la porine OprD (Caille *et al*., 2007).

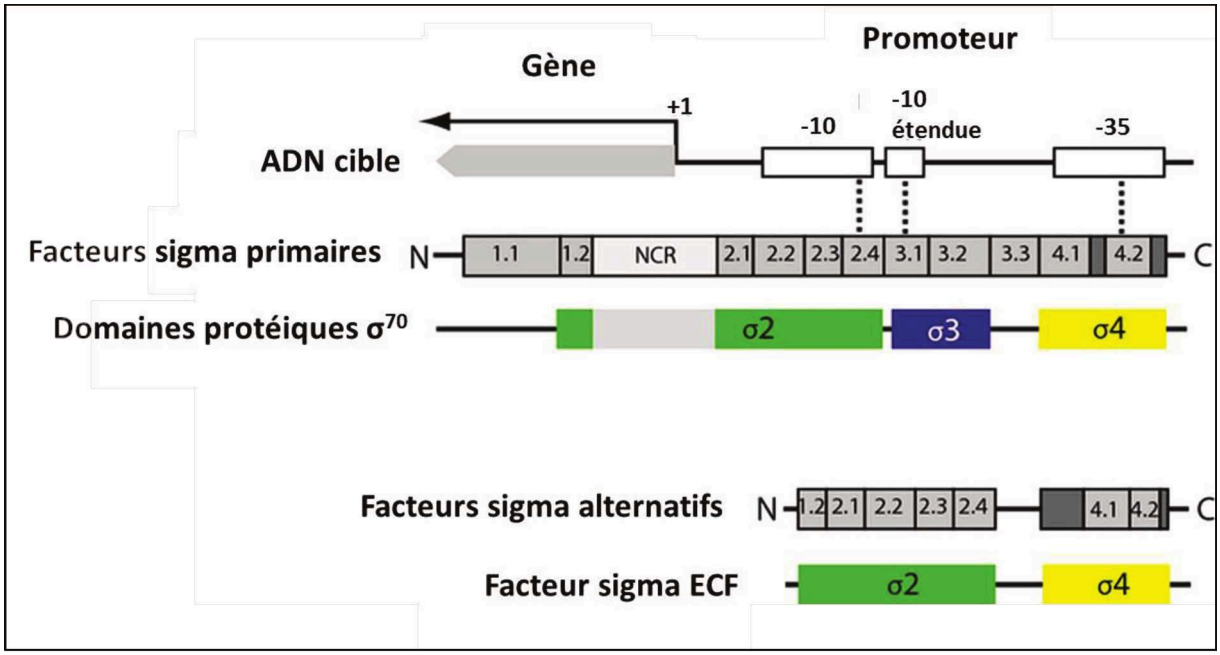


Figure 21. Structure moléculaire des facteurs sigma primaires (σ70) et des ECF (adapté de Llamas *et al.*, 2014). Les régions conservées sont indiquées en couleurs et les régions non conservées (NCR) sont indiquées en gris. L'interaction entre les domaines protéiques du facteur sigma et les boites -10 et -35 du gène cible sont indiquées par des pointillés.

b- Les facteurs sigma à fonctions extracytoplasmiques (ECF)

i. Généralités

Les facteurs sigma sont des sous-unités transitoires de l'ARN polymérase permettant l'initiation de la transcription. Il existe deux grandes familles de facteurs sigma, la famille sigma 54 homologue à RpoN, et la famille sigma 70, en lien avec le principal facteur sigma d'*E. coli* σ70. Les facteurs sigma 70 dirigent l'ARN polymérase vers des éléments spécifiques des promoteurs généralement localisées à 10 et 35 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Les membres de cette famille sont des protéines relativement conservées et contiennent 4 régions distinctes (Figure 21). La région 1 à l'extrémité N-terminale est la moins conservée. Sa fonction serait d'antagoniser la liaison du facteur sigma à l'ADN lorsqu'il est sous sa forme libre c'est-à-dire lorsqu'il n'est pas associé à l'ARN polymérase. La région 2, la plus conservée est divisée en 4 sous régions et est impliquée dans la reconnaissance de la boite -10 (la région 2.4) et la formation de la bulle de transcription (la région 2.3). La région 3 est très peu conservée et est absente chez certain facteurs sigma. Elle est impliquée dans la liaison à l'ADN en amont des boites -10 de certains types promoteurs ne possédant pas de boite -35. Enfin la région 4 est divisée en 2 sous régions impliquées dans l'interaction avec des régulateurs (4.1) et la reconnaissance des boites -35 (4.2) (Paget *et al.* ,2003). Les facteurs sigma de la famille sigma 70 peuvent être classés en 4 groupes phylogénétiques en fonction de leur homologie de séquence (Lonetto *et al.*, 1994) :

- les facteurs sigma primaires (groupe 1), auquel appartient σ70, contrôlent la transcription des gènes dits de « ménage » durant la phase exponentielle de croissance et sont essentiels à la viabilité cellulaire.

- les facteurs sigma du groupe 2, sont très proches des facteurs sigma primaires à la différence qu'ils ne sont pas essentiels pour la viabilité des cellules Ces facteurs interviennent généralement dans la transcription des gènes en cas de carence nutritionnelle comme le facteur sigma de phase stationnaire, RpoS

- les facteurs sigma alternatifs sont structuralement plus éloignés des facteurs sigma des groupes 1 et 2 puisqu'ils ne possèdent pas la région 1. La région 3, lorsqu'elle est présente, est raccourcie. Ces facteurs sigma interviennent dans la

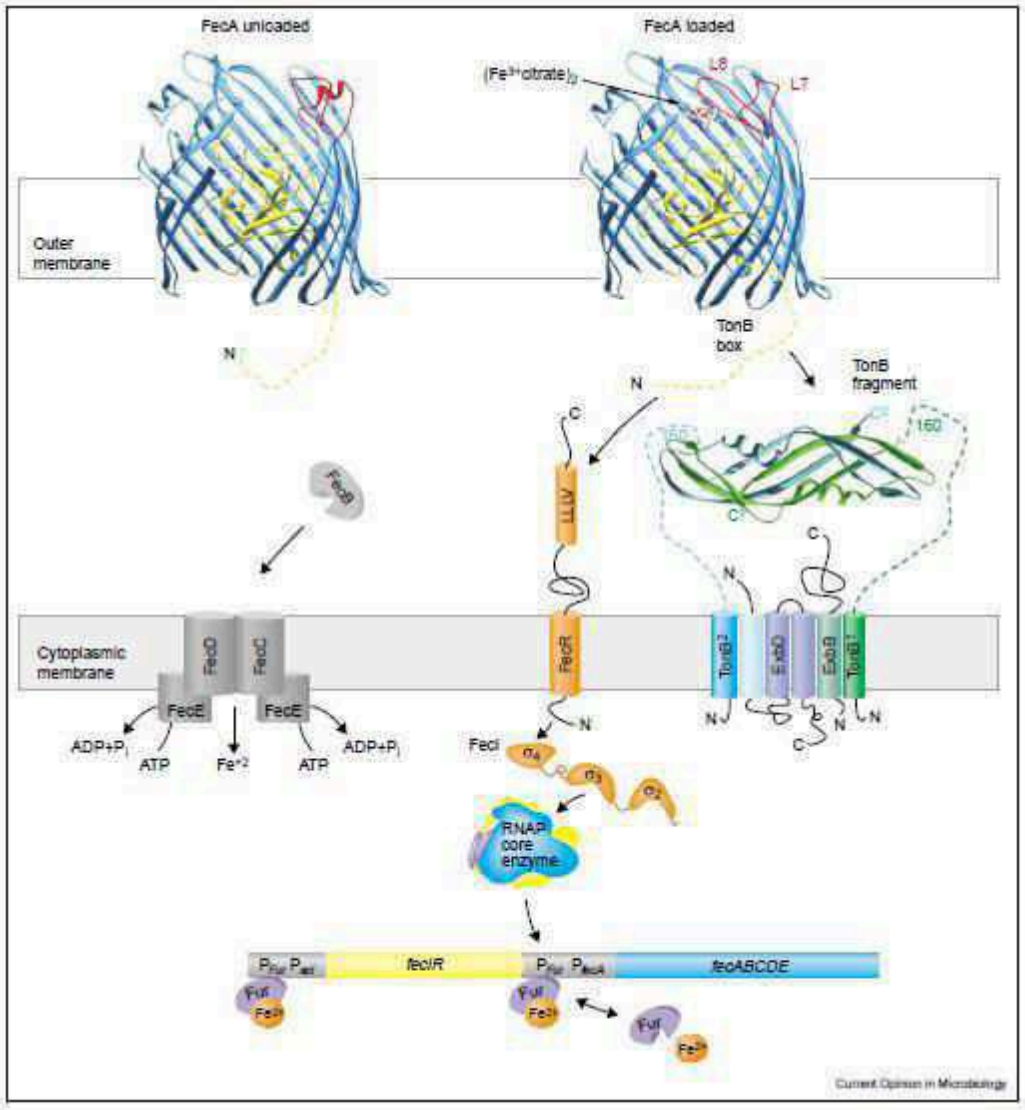


Figure 22. Modèle des systèmes de transport et de régulation du citrate de fer chez *E. coli* (Braun et *al.,* 2003). La fixation du citrate de fer sur FecA entraine un changement de conformation de la protéine conduisant à l'interaction du bouchon (en jaune) avec la protéine TonB au niveau de son domaine « boite TonB ». L'interaction de FecA avec le complexe TonB/ExbD/ExbB permet le transport du citrate de fer dans l'espace périplasmique. Le changement de conformation subit par FecA entraine également l'interaction de son extrémité N-terminale avec le facteur anti-sigma FecR. L'interaction de FecR avec FecA entraine la libération du facteur sigma FecI. FecI libéré peut ainsi initier la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Le transport du citrate de fer du périplasme vers le cytoplasme est réalisé par un ABC transporteur (FecBCDE). Dans le cytoplasme Fur chargé en fer ferreux (Fe^{2+}) se fixe sur les boites Fur (P_{fur}) et réprime les gènes impliqués dans l'acquisition du fer.

transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress (comme RpoH impliqué dans la réponse au choc thermique), ou des fonctions cellulaires spécifiques.

- les facteurs sigma à fonctions extracytoplasmiques (ECF) sont des facteurs sigma alternatifs ne possédant ni la région 1 ni la région 3 (Figure 21). Ce groupe est le plus diversifié en termes de séquences primaires. Les ECF peuvent être classés en 43 groupes phylogénétiques majeurs dont les 2 plus représentés sont le groupe de type FecI et le groupe de type RpoE chez les germes à Gram négatif (Staroń *et al*., 2009). Ces facteurs sigma partagent cependant d'autres caractères communs. Bien que ces facteurs sigma soient impliqués dans diverses fonctions cellulaires, ils régulent et répondent tous à des conditions extracytoplasmiques. L'activité de la plupart de ces facteurs sigma est négativement régulée par le produit d'un gène localisé dans leur propre opéron. En effet, en absence de signal ces ECF sont à l'état inactif dans la cellule puisque piégés par une protéine appelée facteur antisigma, généralement localisée dans la membrane cytoplasmique. Lorsqu'un signal extracytoplasmique est perçu, le facteur sigma ECF est libéré et peut ainsi initier la transcription d'un certain nombre de gènes organisés en régulon ou sigmulon. La séquence -35 des promoteurs reconnus par les ECF est relativement conservée contrairement à la séquence -10, et il n'est pas rare d'observer des recouvrements entre les régulons de plusieurs ECF (Lonetto *et al*., 1994; Schulz *et al*., 2015; Staroń *et al*., 2009).

Les facteurs sigma ECF de type FecI sont en lien avec le facteur sigma ECF FecI d'*E. coli* impliqué dans la régulation des systèmes de transport du fer ferrique. Ces ECF sont associés à des systèmes de signalisation de surface, majoritairement impliqués dans la capture du fer *via* des sidérophores endogènes ou exogènes, et répondent à une carence en fer. Ils sont constitués d'un récepteur TonB-dépendant localisé dans la membrane externe, appelé transducteur TonB-dépendant lorsqu'il est associé à un couple antisigma/ sigma ECF, et d'un complexe énergisant ExbB/ExbD/TonB (Koebnik, 2005; Cornelis, 2009) (Figure 22). Ce dernier permet de fournir l'énergie apportée par la force proton-motrice de la membrane cytoplasmique pour le transport des substrats à travers la membrane. Globalement en conditions de carences en fer, la fixation du sidérophore sur le récepteur de membrane externe entraine un changement de sa conformation conduisant à l'interaction du bouchon localisé à l'intérieur du canal avec la protéine TonB. Le récepteur membranaire

Locus PAO1	Protéine	Homologue E. coli	Localisation	Fonction
PA0762	AlgU	RpoE	Cytoplasme	Facteur sigma ECF
PA0763	MucA	RseA	Membrane interne	Facteur anti-sigma
PA0764	MucB	RseB	Périplasme	Chaperonne
PA0765	MucC	RseC	Inconnu	inconnue
PA0766	MucD	DegP	Périplasme	Chaperonne/Protéase, degrade les molecules activant AlgW et MucP
PA4446	AlgW	DegS	Périplasme/ Membrane interne	Protéase, clive MucA dans son domaine périplasmique
PA3649	MucP	RseP	Membrane interne	Protéase, clive MucA dans son domaine membranaire
PA4033	MucE	-	Périplasme	Proteine membrane, active AlgW
PA3257	Prc	Prc	Périplasme	Protéase, facilite la degradation de MucA chez les mutants mucA
PA1802/ PA1801	ClpX/P	ClpX/P	Cytoplasme	Protéase, clive MucA dans son domaine cytoplasmique

Table 4. Homologies entre les mécanismes contrôlant l'activité des ECF AlgU de *P. aeruginosa* et RpoE.d'*E.coli* (Adapté de Damron *et al.* 2012).

nécessite la protéine TonB pour le transport actif du substrat. Enfin, l'extrémité N-terminale du récepteur interagit avec la partie périplasmique du facteur antisigma entrainant un changement de conformation de l'antisigma et la libération du facteur sigma ECF (Braun *et al*., 2003; Llamas *et al*., 2014). En général, en présence de fer, ces systèmes sont réprimés par la fixation du régulateur Fur dans sa forme complexée au Fe^{2+} sur le promoteur. En absence de fer, la libération du facteur sigma ainsi que la levée de la répression par Fur permet l'initiation de la transcription de l'opéron codant pour le facteur sigma/antisigma et des gènes impliqués dans la capture du fer (Braun *et al*., 2003). *P. aeruginosa* possède 13 ECF de type FecI.

Les ECF de type RpoE sont des homologues du facteur sigma RpoE d'*E. coli* impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe. Ces facteurs sigma régulent l'expression de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité pariétale. Ils sont généralement libérés après dégradation de leur facteur antisigma par des protéases en réponse à la présence de protéines mal repliées ou tronquées dans l'enveloppe cellulaire. Chez *P. aeruginosa*, le facteur sigma AlgU était le seul facteur sigma ECF de type RpoE caractérisé au début de ma thèse.

ii. Le facteur sigma ECF AlgU

AlgU a été identifié en 1993 par Martin *et al* comme étant responsable de la conversion de *P. aeruginosa* sous forme mucoïde, due à la surproduction d'alginates, chez des patients atteint de mucoviscidose (Martin *et al*., 1993). Cependant au-delà de son rôle dans la mucoïdie, AlgU est aujourd'hui décrit comme un régulateur clé de la réponse au stress de l'enveloppe chez les bactéries du genre *Pseudomonas*. AlgU possède 66% d'identité de séquence avec le facteur sigma RpoE d'*E. coli,* et ces deux ECF sont fonctionnellement interchangeables (Deretic *et al*., 1994; Yu *et al*., 1995). Les mécanismes contrôlant l'activité de ces ECF sont également très similaires (Table 4). Chez *E. coli* l'activité du facteur sigma RpoE est contrôlée par RseA et RseB, dont les gènes sont organisés en opéron avec *rpoE*. RseA est une protéine de membrane interne possédant un domaine cytoplasmique qui interagit physiquement avec RpoE, et un domaine périplasmique stabilisé par la protéine RseB. Bien que RseB ne soit pas capable de réguler l'activité de RpoE en absence de RseA, cette protéine joue un rôle important dans la régulation du système car elle protège RseA de l'action des protéases. La présence de protéines anormales dans l'enveloppe est

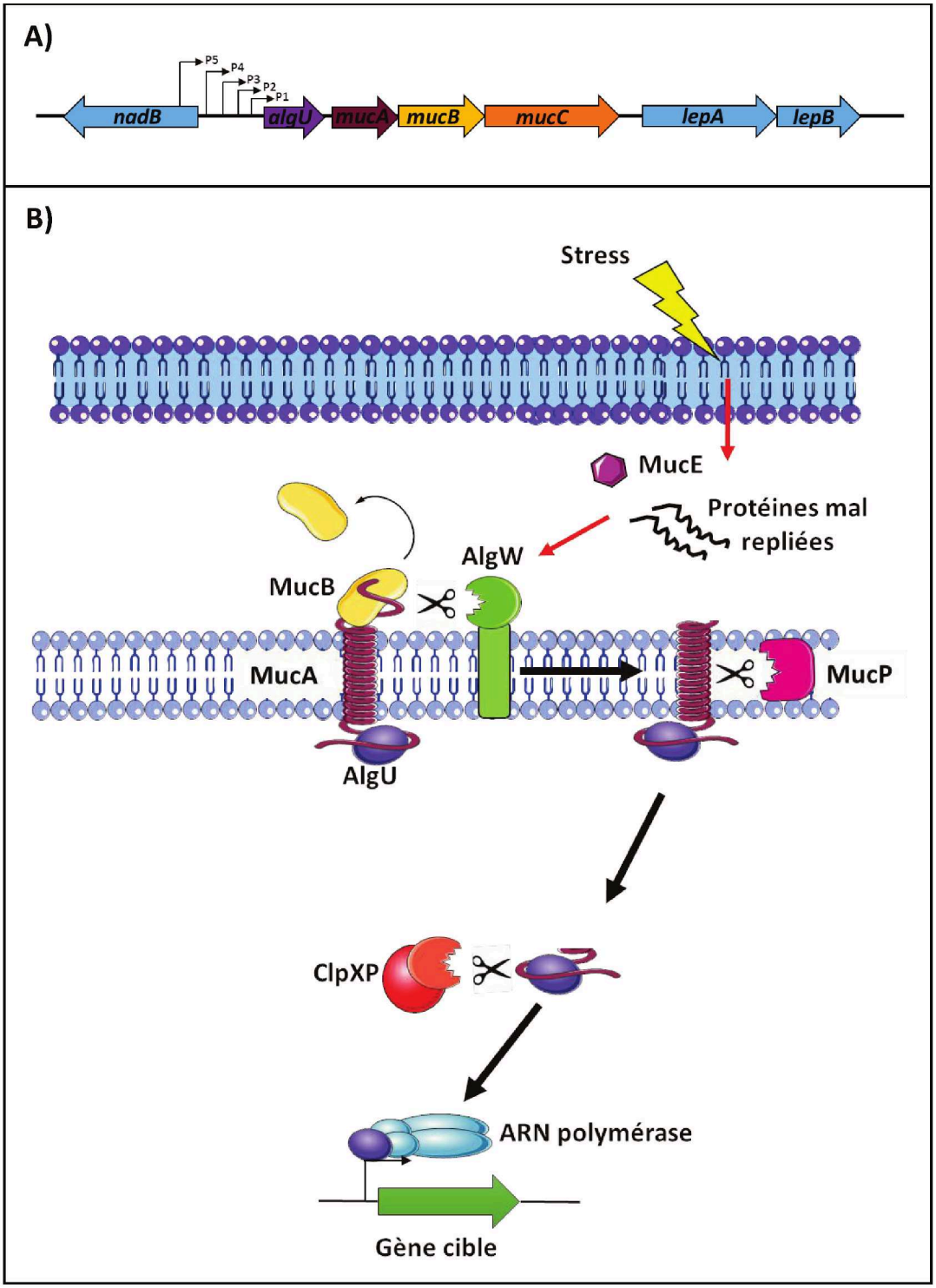


Figure 23. Représentation de la cascade protéolytique conduisant à l'activité d'AlgU (adapté de Damron *et al.*, 2012). A) Environnement génomique d'*algU.* B) Cascade protéolytique intramembranaire. En réponse à un stimulus, la protéase AlgW clive le facteur anti-sigma MucA au niveau de son domaine périplasmique. Le clivage de MucA par AlgW requiert la libération de la chaperone MucB. MucA tronquée est ensuite clivée au niveau de son domaine transmembranaire par MucP permettant la libération de son domaine cytoplasmique lié à AlgU. Le complexe ClpXP dégrade le domaine cytoplasmique de MucA conduisant à la libération d'AlgU.

perçue comme un signal, dont la transduction est contrôlé par une cascade protéolytique intramembranaire régulée au cours de laquelle RseA subit une série de clivages inactivant sa fonction d'antisigma (RIP, Barchinger *et* Ades, 2013). Chez *P. aeruginosa*, l'activité d'AlgU est contrôlée par les produits de l'opéron *algU-mucA-mucB-mucC* (Figure 23A). Le gène *mucA* code le facteur antisigma MucA possédant 28% d'identité et 72% de similarité de séquence avec le facteur antisigma RseA d'*E. coli* (Yu *et al*., 1995). MucA est une protéine de membrane interne possédant une extrémité N-terminale cytoplasmique, liant le facteur sigma AlgU et une extrémité C-terminale périplasmique. Le gène *mucB* code la protéine périplasmique MucB, homologue de RseB d'*E. coli*, capable de se lier à MucA. Les gènes *mucC* et *mucD* codent des protéines périplasmiques impliquées également dans la répression de l'activité d'AlgU. Bien que la fonction de MucC ne soit pas encore définie, il a été montré que MucD assure un rôle de chaperonne/protéase, comme DegP chez *E. coli*. La cascade protéolytique est initiée par l'activation d'AlgW, une protéase homologue à DegS (42% d'identité), et la libération de MucA par MucB (Cezairliyan *et* Sauer, 2009). AlgW est constitué d'un domaine protéase suivi d'un domaine PDZ capable de fixer des peptides. La présence du domaine PDZ permet de maintenir la protéine à l'état inactif en absence de ligand. AlgW est activée par la fixation sur son domaine PDZ de peptides provenant de la dégradation ou de la synthèse de protéines anormales. Elle peut également être activée par la surexpression d'une protéine de l'enveloppe, MucE, possédant une extrémité C-terminale similaire à celle des protéines activant la protéolyse de RseA par DegS (Cezairliyan *et* Sauer, 2009; Li *et al*., 2016; Qiu *et al*., 2007). Une fois activée, AlgW peut exercer sa fonction de protéase en clivant le domaine périplasmique de MucA. La seconde étape de la cascade de protéolyse nécessite l'intervention d'une deuxième enzyme localisée dans la membrane interne, MucP. MucP est l'homologue de RseP d'*E. coli* et clive MucA au niveau de son domaine transmembranaire (Qiu *et al*., 2007). MucP possède deux domaines PDZ suggérant que cette protéine possède une spécificité de ligand. Enfin la dernière étape de la cascade de protéolyse se situe dans le cytoplasme et fait intervenir un complexe protéique semblable à celui d'*E. coli*, le complexe ClpXP. ClpX et ClpP sont des protéases impliquées dans la dégradation de protéines non structurées. Ces protéases sont activées par MucA tronquée, et clivent MucA au niveau de son domaine cytoplasmique libérant ainsi le facteur sigma ECF AlgU

(Figure 23B), (Qiu *et al*., 2008). Comme dans le cas de son homologue, l'activité d'AlgU est induite par de nombreuses conditions affectant la structure pariétale, telles qu'une exposition aux antibiotiques affectant la biosynthèse du peptidoglycane, une élévation de la température ou des conditions d'hyper osmolarité ((Schnider-Keel *et al*., 2001; Schurr *et al*., 1995; Schurr *et* Deretic, 1997). L'activité d'AlgU entraine l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'enveloppe (Schurr *et al*., 1995; Wood *et al*., 2006). Wood et Ohman ont montré qu'une exposition de *P. aeruginosa* à la D-cyclosérine, un antibiotique de la classe des β-lactames, conduit à l'activation d'AlgU dont l'activité induit directement ou indirectement l'expression de 293 gènes dont les produits sont impliqués dans l'adaptation et la protection, la synthèse d'alginates, la biosynthèse du peptidoglycane et du LPS, ou des gènes codant des porines, lipoprotéines et des régulateurs transcriptionnels (Wood *et al*., 2006; Wood *et* Ohman, 2009). Certains membres de son régulon sont impliqués dans l'adaptation et la protection : c'est le cas i) du gène *osmC* codant la protéine OsmC inductible par des variations d'osmolarité, qui serait également impliquée dans la régulation de la formation de ponts disulfures et le repliement des protéines, ii) du gène *cpo* dont le produit serait impliqué dans la conversion du péroxyde d'hydrogène en eau, iii) d'un gène codant pour une probable β-lactamase, ainsi que iv) des enzymes impliquées dans la synthèse d'osmoprotectants. On trouve également des gènes dont les produits sont impliqués dans le transport membranaire tel que ceux codant des pompes à efflux de la famille des RND, MFS ou ABC transporteurs, *mscL* codant un large canal mécanosensible, et PA1048 codant une porine de la famille OmpA, capable de fixer le peptidoglycane. Le régulon d'AlgU dans ces conditions contient également des gènes codant des protéines impliquées dans la biogenèse de la paroi. C'est le cas par exemple de *wzz* codant un régulateur de la synthèse de l'antigène O, des opérons *rml* et *wbp* impliqués dans la biosynthèse du LPS, et des gènes *mrcB* et *mpl* codant une PIP et une enzyme de synthèse du peptidoglycane. AlgU contrôle également l'expression de régulateurs transcriptionnels comme *rpoH* codant un facteur sigma alternatif de réponse au stress thermique chaud, ou *algR et algZ* codant respectivement le régulateur et le senseur du TCS impliqué dans la régulation de l'opéron alginate. Chez des souches mucoïdes, où AlgU est constitutivement activé, cet ECF contrôle la régulation du régulateur transcriptionnel AmpR impliqué dans la résistance aux β-lactames mais également dans la régulation de l'acquisition du fer,

dans la réponse à un choc chaud ou un stress oxydatif et dans la régulation d'oprF (Balasubramanian *et al*., 2014). Ce régulateur est impliqué dans l'expression de gènes codant pour des β-lactamases et est autorégulé chez *E. coli*. En revanche en présence d'inducteur chez *P. aeruginosa*, l'autorégulation d'AmpR requiert l'activité d'AlgU. Il a également été suggéré qu'AmpR serait impliqué dans la répression de l'expression d'AlgU en présence d'inducteurs, puisque la mutation d'*ampR* entraine une augmentation significative de l'expression d'*algU* (Balasubramanian *et al*., 2013). En présence de chlorexidine, un agent altérant les membranes, AlgU contrôle l'expression d'une pompe à efflux de la famille RND, la pompe MexCD-OprJ. Cette pompe à efflux est contrôlée négativement par un répresseur codé par le gène *nfxB* dont la mutation spontanée conduit à la surexpression de la pompe. La mutation d'*algU* chez ces mutants *nfxB* entraine une altération de la surexpression de *mexCD-oprJ*. Le phénotype des mutants *nfxB* est restauré lorsque la mutation d'*algU* est complémentée suggérant que l'activation d'origine mutationnelle de la pompe est dépendante d'AlgU (Fraud *et al*., 2008). Récemment un nouveau régulateur de la pompe MexCD-OprJ a été identifié. Comme NfxB, ce régulateur nommé EsrC est un répresseur de la pompe MexCD-OprJ dont l'expression est induite par AlgU dans des conditions affectant la structure pariétale et réprimée par NfxB en conditions basales (Purssell *et al*., 2015).

En plus de la réponse à des composés chimiques affectant la paroi, il a été montré qu'AlgU pouvait être impliqué dans la réponse à des dommages physiques de l'enveloppe. Dans une étude visant à identifier les facteurs affectant la virulence de *P. aeruginosa* soumise à des conditions similaires à celle retrouvées dans l'espace, Crabbé *et al* ont exposé les bactéries à des variations de gravité entrainant un stress mécanique sur l'enveloppe. Dans ces conditions, l'expression d'*algU* est augmentée d'un facteur 3 et de nombreux gènes identifiés comme étant sous le contrôle direct ou indirect d'AlgU sont également surexprimés. Parmi ces gènes on trouve les opérons de biosynthèse de l'alginate, *algU-mucABC*, le gène *oprF* codant la protéine majoritaire de membrane externe, et des gènes dont les produits sont impliquées dans la réponse au choc chaud comme *rpoH* ou le repliement des protéines (Crabbé *et al*., 2010). De manière intéressante, dans ces mêmes conditions, le gène *hfq* codant une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le contrôle de la stabilité des sncARNs et des ARN messagers, ainsi que des gènes uniquement sous le contrôle positif d'Hfq

sont surexprimés suggérant un lien entre la protéine Hfq et le facteur sigma AlgU. Chez *E. coli* ou *Salmonella enterica*, RpoE est indirectement sous le contrôle de Hfq. Cependant, l'analyse transcriptomique d'un mutant *hfq* chez *P. aeruginosa* a montré que la perte d'Hfq n'a aucun effet sur l'expression de l'opéron de biosynthèse de l'alginate indiquant que l'activité d'AlgU n'est pas contrôlée par Hfq (Sonnleitner *et al*., 2006).

Dans le cadre de la mucoviscidose, la conversion de la souche sous forme mucoïde est majoritairement due à des mutations spontanées du gène *mucA* inactivant sa fonction d'antisigma (Boucher *et al*., 1997). Chez ces souches, la surproduction d'alginates s'accompagne d'une diminution de la production de facteurs de virulence tels que le système de sécrétion de type III, la production d'exotoxine A, d'élastase et de pyocyanine. La production de ces facteurs de virulence est en partie régulée par le second messager 3',5'-AMP cyclique (cAMP) et un régulateur transcriptionnel dépendant du taux intracellulaire de cAMP, Vfr. Il été montré que chez les souches de *P. aeruginosa* possédant une mutation du gène *mucA*, le régulateur Vfr est réprimé par AlgR, le régulateur du système à deux composant AlgR/AlgZ impliqué dans l'expression de l'opéron alginate. Cette répression du système cAMP/Vfr par AlgR est dépendante du facteur sigma ECF AlgU suggérant que cet ECF joue un rôle majeur dans la transition entre infection aigue et infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose (Jones *et al*., 2010). La transition entre les infections aigues et chroniques peut également être contrôlée par des TCS. C'est le cas du système KinB/AlgB où KinB est la protéine senseur capable d'assurer une fonction d'histidine kinase et de phosphatase et AlgB le régulateur transcriptionnel. Il a été décrit que la mutation du gène KinB entraine une surproduction d'alginates dépendante à la fois du régulateur AlgB et du facteur sigma alternatif RpoN. La surproduction d'alginates chez ce mutant est due à une surexpression des gènes *algU* et *algD* et nécessite l'intervention d'AlgW (Damron *et al*., 2009). Cependant l'analyse transcriptomique du régulon RpoN chez un mutant *kinB* n'a pas permis d'identifier *algU* comme étant une cible de RpoN (Damron *et al*., 2012). Il a donc été suggéré qu'en absence de KinB, AlgB et RpoN induisent l'expression de gènes codant des peptides signaux reconnus par AlgW, activant ainsi la protéolyse de MucA et la libération d'AlgU (Chand *et al*., 2012; Damron *et al*., 2009)

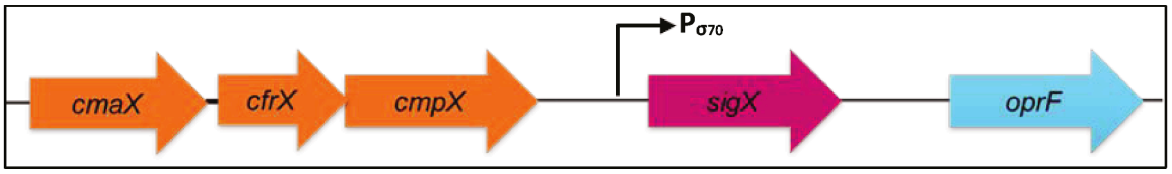


Figure 24. Représentation de l'environnement génomique de *sigX* chez *P. aeruginosa* PAO1 (www.Pseudomonas.com). En amont de *sigX*, l'opéron *cmaX-cfrX-cmpX* codant respectivement une protéine de membrane interne possédant un domaine homologue au domaine fonctionnel de transporteurs de cations, une protéine hypothétique de fonction et de localisation inconnue et une protéine de membrane interne possédant un domaine homologue au domaine fonctionnel des canaux mécanosensibles. En aval de *sigX*, le gène *oprF* codant la protéine majoritaire de membrane externe.

iii. Le facteur sigma ECF SigX

Depuis quelques années, un deuxième facteur sigma ECF émerge comme étant impliqué dans la réponse à un stress de l'enveloppe, SigX. SigX a été identifié en 1999 par Brinkman *et al.* lors d'une étude portant sur l'expression d'*oprF* le gène codant la protéine majoritaire de membrane externe (Brinkman *et al.*, 1999). Dans cette étude les auteurs ont mis en évidence l'existence d'un gène localisé en amont d'*oprF*, dont le produit possède 40 à 45% de similarité de séquence avec le facteur sigma ECF SigW de *Bacillus subtilis*, cette similarité étant plus prononcée dans les régions connues pour être fortement conservées chez les ECF (Figure 24). L'analyse de la région promotrice du gène *oprF* a également permis d'identifier un promoteur dépendant de SigX dont la région -35 ressemble à celle reconnue par les facteurs sigma ECF. Le gène *sigX* est fortement conservé chez les bactéries du genre Pseudomonas et est co-transcrit avec le gène *oprF* suggérant un lien fonctionnel entre les deux protéines. Cependant il est apparu au cours de cette étude que SigX n'était pas uniquement impliqué dans l'expression *d'oprF*. En effet les auteurs ont observé que la mutation du gène *sigX* entraine une réduction du taux de croissance de la bactérie en milieu de faible osmolarité et en milieu riche, un phénotype qui n'est pas restauré par la complémentation *d'oprF*, suggérant que SigX serait impliqué directement ou indirectement dans la croissance ou la survie en milieu de faible osmolarité et dans l'utilisation des nutriments en milieu riche (Brinkman *et al.*, 1999). Une seconde étude portant sur la transcription *d'oprF* a permis de confirmer l'implication de SigX dans l'expression de ce gène et d'identifier des conditions environnementales conduisant à l'activité de SigX (Bouffartigues *et al.*, 2012). Dans cette étude, il a été montré que la transcription *d'oprF* est principalement dépendante de SigX et que ce facteur sigma intervient également dans sa propre transcription, un caractère commun aux facteurs sigma ECF. Il a également été observé que la transcription de *sigX* est augmentée chez un mutant *oprF*, dans un milieu contenant une faible concentration de NaCl et en présence de fortes concentrations de sucrose, un composé non métabolisé par *P. aeruginosa*. Ces trois conditions ayant été identifiées comme étant des conditions perturbant l'enveloppe cellulaire, il a été suggéré que SigX jouerait un rôle important dans la réponse au stress de l'enveloppe (Bouffartigues *et al.*, 2012). En accord avec cette hypothèse, deux analyses transcriptomiques ont révélé que *sigX* est surexprimé d'un facteur 2 environ après

exposition de *P. aeruginosa* à la D-cyclosérine ou à des variations de la gravité (Crabbé *et al*., 2010; Wood *et* Ohman, 2009). Ces deux conditions altèrent la structure pariétale et conduisent à l'activation d'AlgU. Bien que les fonctions cellulaires de SigX ne soient pas totalement connues, plusieurs études ont cependant permis de renforcer l'hypothèse du rôle de SigX dans la réponse au stress de l'enveloppe notamment grâce à l'étude de son régulon. Une première analyse transcriptomique menée par Gicquel *et al.* a déterminé que la mutation du gène *sigX* chez *P. aeruginosa* PAO1, cultivée en milieu minimum M9 contenant du glucose comme seule source de carbone, entraine directement ou indirectement la dérégulation de 307 gènes dont certains sont impliqués dans la virulence, l'adhésion, la formation de biofilm et 9 codent des régulateurs transcriptionnels, suggérant que SigX serait au sommet d'une cascade de régulation (Gicquel *et al*., 2013). Parmi ces régulateurs on retrouve notamment PprB, le régulateur transcriptionnel du système PprA/PprB impliqué dans le contrôle de la perméabilité membranaire, le régulateur PsrA impliqué dans la synthèse des acides gras et SigX lui-même. Une seconde étude réalisée chez *P. aeruginosa* PA14 cultivée en milieu LB et dans différentes conditions d'osmolarité, a identifié SigX comme un régulateur majeur de l'adaptation à un stress osmotique. En comparant les résultats obtenus par immunoprécipitation de la chromatine (précipitation des complexes ADN-protéines formés *in vivo*) et analyses transcriptomiques chez un mutant ou une souche surexprimant *sigX*, ces auteur ont mis en évidence l'implication de SigX dans la régulation de plus de 250 gènes (Blanka *et al*., 2014). Parmi ces gènes certains sont impliqués dans le métabolisme des acides gras et des phospholipides, le transport et la sécrétion de facteurs de virulence, ou encore le transport de divers métabolites. Cette étude a également identifié les gènes *sigX* et *cmpX* comme faisant partie du régulon de SigX. En revanche dans cette étude il a été suggéré que SigX intervient indirectement dans la régulation d'*oprF*. Le gène *cmpX* est localisé en amont de *sigX* et code une protéine cytoplasmique possédant un domaine fonctionnel retrouvé chez les protéines de la famille des canaux ioniques mécanosensibles de faible conductance (MscS). Ces protéines sont impliquées dans la protection contre un choc hypoosmotique et répondent à la fois à une courbure et une dépolarisation de la membrane cellulaire (Cox *et al*., 2015). Dans cette étude les auteurs ont également montré que SigX est impliqué dans la formation de biofilm notamment *via* une modulation du taux de c-di-GMP. En effet parmi les gènes appartenant au régulon de SigX, 4 gènes codant des protéines possédant les domaines fonctionnels des

diguanylate cyclases et des phosphodiestérases ont été identifiés, PA14_37690 (PA2072), PA14_49160 (PA1181), PA14_63210 (PA4781) et PA14_64050 (PA4843). Enfin cette étude a également mis en évidence que la mutation de *sigX* entraine une modification de la composition en acide gras dans les membranes. En effet, chez le mutant *sigX*, la production de chaines acylées à 16 carbones est fortement réduite dans toutes les conditions tandis que la production de chaines acylés insaturées à 18 carbones est réduite dans des conditions de faible osmolarité suggérant l'implication de SigX dans le contrôle de la fluidité membranaire. Boechat *et al.,* ont montré par étude protéomique et l'analyse du taux d'ARNs messagers par qRT-PCR, que la surexpression de *sigX* chez *P. aeruginosa* PA14 en milieu LB entraine la surexpression de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acides gras. En effet au moins 7 enzymes (FabD, FabY, FabH3, FabG, FabG2, FabV, FabF2) impliquées dans la voie de synthèse des acides gras à courte chaine et 3 sous unités de l'acétyl-coA carboxylase (AccA, AccB, AccD), la première enzyme de la voie de synthèse des acides gras, sont induites en réponse à la surexpression de *sigX* (Boechat *et al*., 2013). SigX est également impliqué dans l'expression d'un gène codant un facteur sigma ECF, PA14_21550 (PA3285), organisé en opéron avec *fabH3*. En accord avec les résultats de Blanka *et al*., il a été montré que la surexpression de *sigX* entraine une augmentation du pourcentage d'acide gras à courte chaine dans les membranes et que les souches surexprimant *sigX* sont plus résistantes aux basses températures et plus sensibles aux fortes températures. Dans cette étude, les auteurs ont également observé que la surexpression de *sigX* entraine une courbe de croissance biphasique en corrélation avec la mort cellulaire. Il a été suggéré que la surproduction de SigX entraine un déséquilibre du ratio lipide/protéine provoquant un stress membranaire et nécessitant la mise en place d'une réponse adaptée. L'analyse protéomique chez la souche surexprimant *sigX* a révélé que la surproduction de SigX n'affecte pas la production d'OprF et que cette porine n'est que légèrement induite lorsque SigX est à peine détectable, suggérant un effet négatif de la surproduction de SigX sur la protéine OprF. Enfin, les auteurs ont montré que le taux d'ARN messager et de protéines SigX chute suivant la surexpression tandis qu'il augmente chez la souche sauvage suggérant un mécanisme d'autorégulation de son activité.

A ce jour, les fonctions cellulaires précises de SigX et son mécanisme d'activation ne sont pas complètement connus. Les différences observées entre ces

PAO1 en milieu riche (**Brinkman *et al.*, 1999**)	PAO1 en milieu riche LB, 340 mM sucrose (**Bouffartigues *et al.*, 2012**)	PAO1 en milieu minimum M9 (**Gicquel *et al.*, 2013**)	PA14 en milieu riche LB, variation d'osmolarité (**Blanka *et al.*, 2014**)	PA14 en milieu riche (**Boechat *et al.*, 2013**)
• Transcription d'*oprF* • Croissance en faible osmolarité	• Transcription d'*oprF*	• Métabolisme énergétique • Virulence • Biofilm • Résistance aux antibiotiques • Métabolisme des acides gras • Transcription *oprF*	• Production facteurs secrétés • Métabolisme des acides gras • Adaptation/protection • Biofilm • Régulation indirecte *oprF*	• Métabolisme des acides gras • Répression production OprF

études menées chez des souches de *P. aeruginosa* et des conditions de croissance différentes suggèrent que SigX pourrait avoir des fonctions variables selon la souche étudiée (Figure 25). Cependant l'ensemble de ces études suggère un rôle de SigX dans l'adaptation de la cellule à son environnement et dans la modulation de la structure pariétale. SigX pourrait alors être avec AlgU, un acteur important de la réponse au stress de l'enveloppe.

La persistance de *P. aeruginosa* notamment dans le cadre médical, est largement due à sa grande capacité à s'adapter via des systèmes de perceptions et de transduction de signaux parmi lesquels on retrouve les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF). *P. aeruginosa* possède 19 ECF dont 13 sont de type FecI et AlgU est de type RpoE. (Potvin *et al.,* 2008). SigX est l'un de ces ECF, mais n'avait que peu été étudié lorsque j'ai débuté ma thèse.

Les données disponibles dans la littérature avaient identifiées SigX comme étant impliqué dans la transcription d'*oprF* codant la porine majoritaire de *P. aeruginosa* et exprimé dans des conditions altérant la paroi cellulaire.

Ma thèse fait suite aux travaux initiés au LMSM (thèse de G. Gicquel, 2010-2013) qui portaient sur l'étude du régulon de SigX et son implication dans l'expression d'*oprF* (Bouffartigues *et al.*, 2012 ; Gicquel *et al.,* 2013). Lors de cette étude il a été montré par analyse transcriptomique que la mutation de *sigX* entraine la dérégulation de nombreux gènes impliqués dans la virulence, la formation de biofilm ou sont associés à des fonctions membranaires. Cependant aucune cible directe n'avait pu être identifiée.

Dans ce contexte l'objectif majeur de ma thèse a été de préciser les fonctions cellulaires de SigX dans l'homéostasie pariétale et dans la formation de biofilm, et de caractériser des conditions conduisant à l'activité de SigX.

Table 5. Souches utilisées dans cette étude

Souche	Caractéristiques	Antibiotique	Reference
Pseudomonas aeruginosa			
H103	Souche sauvage PAO1		Hancock et Carey, 1979
PAOSX	H103 Δ*sigX*		Bouffartigues *et al.,* 2012
H636	H103 Δ*oprF::Ω*	Streptomycine (500)	Woodruff et Hancock, 1988
H636O	H636 contenant le pRW5	Carbénicilline (300)	Woodruff et Hancock, 1988
H636C	H636 complémentée sur le chromosome par une copie d'*oprF*		Cette étude
PAO1	Souche sauvage		Holloway *et al*., 1979
Δ*pelA*	PAO1 Δ*pelA*		Cette étude
Escherichia coli			
DH5α	Souche de clonage		Life technologies
JM109	Souche de clonage		Promega

Table 6. Composition des milieux de culture.

Milieu	Composition	
Luria Bertani 10N pH7,4	Bactotryptone	10 $g.L^{-1}$
	Extrait de levure	5 $g.L^{-1}$
	NaCl	10 $g.L^{-1}$
M9	M9 salt 5X	1X
	$MgSO_4.7H_2O$	1mM
	Glucose	2%
M9 salt 5X	Na_2HPO_4	30 $g.L^{-1}$
	KH_2HPO_4	15 $g.L^{-1}$
	NH_4Cl	5 $g.L^{-1}$
	NaCl	2,5 $g.L^{-1}$

I- Techniques microbiologiques

1- Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches de *P. aeruginosa* utilisées dans cette étude sont listées dans la table 5. Ces souches sont stockées à -80°C en milieu Luria Bertani contenant 15% de glycérol. Les précultures sont réalisées en milieu LB 10N (10 g/L de NaCl) dans un volume respectant le ratio d'oxygénation 1/10, supplémenté si nécessaire d'antibiotique à la concentration adéquate (table 5).

Après une nuit d'incubation à 37°C, la densité optique à 580 nm (DO_{580}) des précultures est mesurée. Le volume de préculture utilisé pour la préparation des cultures bactériennes est calculé afin d'obtenir une DO_{580} initiale de 0,08 dans un volume respectant un ratio d'oxygénation de 1/10. Les cultures bactériennes sont incubées à 37°C sous agitation (180 rpm) en milieu LB 10N ou en milieu minimum M9 contenant du glucose comme seule source de carbone. Selon la finalité des expérimentations, le milieu LB 10N a pu être supplémenté par différentes molécules. La composition des milieux est listée dans la table 6.

2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La sensibilité des bactéries à la tobramycine a été déterminée par la technique de l'E-test® (Biomérieux). Une gélose de LB a été ensemencée par inondation avec une suspension bactérienne de turbidité Mac Farland 0,5. Une bandelette E-test® contenant un gradient de concentration de tobramycine prédéfini a été déposée à la surface de la gélose. Après 24h d'incubation à 37°C, la concentration à partir de laquelle un halo d'inhibition est observé a été définie comme étant la concentration minimale inhibitrice.

a- Formation de biofilm

A partir d'une préculture de 10 ml, les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 7500 g pendant 10 minutes puis lavées avec 5 ml d'eau physiologique stérile. Apres le lavage les bactéries ont été centrifugées à 7500 g pendant 10 minutes et le culot bactérien a été resuspendu dans 5 ml d'eau physiologique. La DO_{580} a été ajustée à une valeur de 1 afin d'obtenir la suspension bactérienne utilisée pour l'inoculation des plaques. Trois cent µl de la suspension bactérienne ont été déposés

dans une plaque de 24 puits à fond en verre puis incubés pendant 2 heures à 37°C sans agitation afin de permettre l'adhésion des cellules. Les bactéries planctoniques ont été écartées et l'adhésion de *P. aeruginosa* a été observée en microscopie confocale à balayage laser (LSM 710, ZEISS) avec un objectif à immersion x 63. Après l'ajout de 600 µl de milieu LB supplémenté ou non par la tobramycine, les biofilms bactériens ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Le milieu a ensuite été écarté et les biofilms ont été rincés avec 1 ml d'eau physiologique. Les biofilms ont ensuite été marqués par différentes sondes fluorescentes avant observation au microscope.

b- Microscopie confocale à balayage laser

i. Marquage fluorescent des cellules

Selon les expérimentations, les cellules ont été marquées par 5µM de la sonde fluorescente rouge SYTO 62 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain (Thermofisher®) ou de la sonde fluorescente verte SYTO 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Thermofisher®).

ii. Live dead

Le marquage fluorescent Live Dead a été réalisé à l'aide du kit LIVE/DEAD *Bac*Light Bactérial Viability Kit (Thermofisher®). Les cellules ont été marquées par un mélange (v/v) du composant A (SYTO 9, 1,67 mM / iodure de propidium, 1,67 mM) et du composant B (SYTO 9, 1,67 mM / iodure de propidium 18,3 mM) selon les recommandations du fournisseur.

iii. Marquage de l'ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire a été marqué par 1 µM de la sonde fluorescente rouge DDAO, 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one) (Thermofisher®).

iv. Analyse des images

Les images de microscopie confocale ont été analysées à l'aide du logiciel COMSTAT. Pour chaque condition, l'épaisseur moyenne, l'épaisseur maximale et le biovolume ont été estimés sur 3 vues de 3 expériences indépendantes.

II- Techniques de biologie moléculaire

1- Extraction des acides nucléiques

a- Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) suivant les recommandations du fournisseur. Les plasmides utilisés dans cette étude sont listés dans la table 7.

Table 7. Plasmides utilisés dans cette étude

Nom du vecteur	Caractéristiques	Origine
p*cdrA*gfp		Rybtke *et al.,* 2012
pjAB113	Vecteur réplicatif chez *P. aeruginosa*, Gm^R, sans promoteur, contient une GFP instable (*gfp asv)*	Andersen *et al.,* 1998
pBBR-MCS5	Vecteur de clonage	Kovach *et al.,* 1995
pBBGFP	pBBR-MCS5 portant le gène *gfp asv*	Cette étude
pBB686GFP	pBBGFP portant la région promotrice de *sigX*	Cette étude

b- Extraction des ARNs totaux

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode de phénol acide chaud. Pour les cultures planctoniques, 10^9 cellules bactériennes ont été prélevées à différents temps selon l'expérimentation. Un volume d'éthanol à 100%, équivalent à celui de la culture bactérienne prélevée, leur a été ajouté. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 7500 g pendant 10 min, puis ont été lysées dans 300 µl de tampon I (acétate de sodium 0,02 M ; SDS 0,5% ; EDTA 1 mM). Pour l'extraction des ARNs en biofilm, 5 ml de préculture ont été centrifugés à 7500 g pendant 10 minutes. Après un lavage en eau physiologique, les bactéries ont été resuspendues en eau physiologique et la DO_{580} a été ajustée à une valeur de 1. Des filtres de nitrocellulose préalablement déposés sur un milieu LB gélosé supplémenté ou non par 0,8 $\mu g.ml^{-1}$ de tobramycine ont été inoculés avec 200 µl de la suspension bactérienne puis incubés à 37°C sans agitation. Apres 24 heures d'incubation les filtres de nitrocellulose ont été resuspendus

dans 10 ml d'eau physiologique. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 13000 g pendant 15 minutes puis lysées dans 600 µl de tampon I.

Les ARNs totaux ont été extraits 2 fois dans 600 µl de phénol acide chaud (pH 4,3 ; 60°C). Après incubation pendant 3 min à 60°C la phase aqueuse contenant les ARNs a été séparée de la phase organique contenant l'ADN génomique et les protéines par centrifugation à 18700 g pendant 4 min. 500 µl d'un mélange de chloroforme / alcool isoamylique (24 :1) ont été ajoutés à la phase aqueuse. Une centrifugation est réalisée comme précédemment pour séparer les deux phases. Les ARNs totaux ont été précipités à l'éthanol froid (100%) en présence de 100 mM d'acétate de sodium. Le précipité a été récupéré par centrifugation à 18700 g pendant 10 min à 4°C puis rincé avec 1 ml d'éthanol 75% avant d'être repris dans 50 µl d'eau traitée au DEPC. L'ADN génomique contaminant a été éliminé par ajout de 10 U de Dnase I (New England Biolabs, Ipswich, MA) dans un mélange réactionnel contenant 6,25 mM $MgCl_2$. La réaction a été incubée à 37°C pendant approximativement 1 h. L'absence d'ADN génomique a été contrôlée par PCR avec le couple d'amorces *FnadB*/*RnadB.* Si nécessaire l'échantillon a été de nouveau traité à la DNase I pendant 1 h. La Dnase I a ensuite été inactivée par ajout de 1 µl de 0,5 M d'EDTA à 75°C pendant 10 min. La qualité des ARNs totaux a été appréciée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% / TAE 1X et leur concentration a été mesurée par spectrophotométrie à une absorbance à 260 nm à l'aide du nanodrop2000. L'absence de contaminants protéiques et organiques a été contrôlée par mesure des ratios $D0_{260}/DO_{280}$ et DO_{260}/DO_{240}

c- Extraction du c-di-GMP

Le c-di-GMP intracellulaire a été extrait et quantifié selon la méthode décrite par Spangler *et al*. et Strehmel *et al*. (Spangler *et al*., 2010; Strehmel *et al*., 2015). Le c-di-GMP a été obtenus à partir de biofilms cultivés sur gélose selon la méthode décrite dans la partie 2.1.2. Après récupération des cellules en eau physiologique, l'équivalent de 5.10^9 UFC ont été récolté par centrifugation à 8000g, 4°C pendant 2 minutes, en duplicat pour chaque conditions. Les culots bactériens ont été resuspendu dans 600 µl de tampon d'extraction glacial (acétonitrile / méthanol / eau ultrapure ; 2v / 2v / 1v). Cinq µl de xanthosine-(3',5')-cyclic monophosphate (CXMP) à 10 $\mu g.ml^{-1}$ a été ajouté dans l'un des réplicat, servant ainsi de calibrant interne. Après 15 min d'incubation sur

glace, les cellules ont été lysées à 95°C pendant 10 min puis centrifugées à 20000g, 4°C pendant 5 min. Les surnageants de chaque échantillon ont été récupérés puis conservés sur glace. Les culots ont été resuspendu dans 400 µl de tampon d'extraction puis incubés sur glace pendant 15 min et centrifugation à 15000g, 4°C pendant 5 min. Après 3 répétitions de l'extraction les surnageants obtenus sont combinés dans le même microtube puis évaporés à 43°C. Les nucléotides obtenus sont ensuite récupérés dans 500 µl d'eau ultrapure afin d'être quantifiés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Ces analyses ont été effectuées par le Dr G. Brenner-Weiβ du Karlsruhe Institute of Technology en Allemagne.

2- PCR

a- Dessin et optimisation des amorces

Les séquences des gènes cibles ont été obtenues sur le site www.pseudomonas.com (Winsor *et al.,* 2011a). Pour les expériences de qRT-PCR les amorces des gènes cibles ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer Express® Software v3.0.1. Pour la construction des plasmides, les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 plus et les sites de restrictions correspondant aux enzymes utilisées ont été ajoutés aux extrémités 5'. Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans la table 8

b- Réaction de polymérisation en chaine

La PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µl contenant le tampon 1X de la Taq DNA polymérase (GMP Grade, 1,5 mM $MgCl_2$, Biolabs), 200 nM de dNTPs, 500 nM de chaque amorce et 5 unités de Taq DNA polymérase (Biolabs). La réaction a été effectuée dans un thermocycleur (iCycler) et comprend une première étape de dénaturation de l'ADN pendant 5 min à 95°C, une seconde étape de 30 cycles d'amplification (dénaturation de l'ADN pendant 30 s à 95°C, hybridation des amorces sur la matrice pendant 40 s à 60°C, puis élongation à 72°C pendant 30 s). Une dernière étape d'élongation de 7 min à 72°C termine la réaction.

3- qRT-PCR

a- Réaction de transcription inverse

Table 8. Amorces utilisées dans cette étude

Nombre PA	Gene	Amorce	Séquence
qRT-PCR			
PA0291	*oprE*	FoprE	GGCGATGGCGAAGGTTCTA
		RoprE	CGCTGGAACTTGCCGATCT
PA0527	*dnr*	Fdnr	TTCCGGCTGCGTGAAGAT
		Rdnr	GCCTCGGCGAAGGTGTT
PA0527.1	*rsmY*	FrsmY	CGCCAAAGACAATACGGAAAC
		RrsmY	TTTTGCAGACCTCTATCCTGACATC
PA0762	*algU*	FalgU	GAAGCCCGAGTCTATCTTGG
		RalgU	GCGATACCTCTCTTGGCATT
PA0779	*asrA*	FasrA	CCGCTTCAGTCCCAACGA
		RasrA	GCGGCAAGACCTTCTCCAT
PA0894	*aruB*	FaruB	GCGAGGTGCTGTTCCATCA
		RaruB	CAGTTCGGCAAGGACCTTCTC
PA0958	*oprD*	FoprD	CTACGGCTACGGCGAGGAT
		RoprD	CACGTACTTGGCTTCGAGGTT
PA0996	*pqsA*	FpqsA	CGGAGTTGCTGGCATTGC
		RpqsA	CTGTTGCCCATGCCATAGC
PA1053		FPA1053	GGCGGCTGCCAATCC
		RPA1053	GGGCTTCCTCACGGCTGTA
PA1179	*phoP*	FphoP	TCAAGCCGTTCCAGTTCGA
		RphoP	GAGGAGCGTCGCAGCAA
PA1181		FPA1181	CCAGATGGAGAAGCGCTACCTCGCTT
		RPA1181	CGCTTGCGACTGTCGATATC
PA1687	*speE*	FspeE	CGCTTCAGCATCGACAACAT
		RspeE	TCCGGGCGTTTTCGAAA
PA1774	*cfrX*	FcfrX	CTGCGGGACCTGCTCAAG
		RcfrX	GCCGACCTGGCGATTG
PA1775	*cmpX*	FcmpX	TCGCCGGGCAGATCATT
		RcmpX	CACCTGTTGTCCGACCTGATAC
PA1776	*sigX*	FsigX	AATTGATGCGGCGTTACCA
		RsigX	CCAGGTAGCGGGCACAGA
PA1777	*oprF*	FoprF	GCGTACAGCTGGACATGAAG
		RoprF	TTCATGAAGTCAGCCAGGTTCTT
PA2060	*pelB*	FpelB	CGGCTACGTGCAGCGTTAT
		RpelB	CACTGCATGCGTTCCTTGAC
PA2072		FPA2072	CCAGGCATCAGGACGACAT
		RPA2072	CGATTCTGCAGCGCCTTT

Les ARNs totaux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du Kit « High capacity cDNA RT Kit » (Applied Biosystem®, Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. La synthèse d'ADNc a été réalisée dans un volume final de 50 µl à partir de 2,5 µg d'ARN pendant 2 h à 37°C. La réaction a été arrêtée par chauffage de l'échantillon à 85°C pendant 5 min. Des échantillons témoins (notés RT négatifs) ont été réalisés dans les mêmes conditions en omettant d'ajouter de la rétro-transcriptase au mélange réactionnel. La présence d'ADNc a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% / TAE 1X.

b- Optimisation des amorces

Les amorces des gènes cibles ont été dessinées avec le logiciel Primer Express® Software v3.0.1 (Table 8). Chaque couple d'amorces a été testé sur des dilutions en séries d'un mélange de tous les échantillons d'ADNc de l'expérience par amplification quantitative. Chaque point de gamme a été réalisé en duplicata. A partir de cette gamme de dilution, a été obtenue une droite dont le coefficient directeur a permis de déterminer l'efficacité (E) de l'amplification : $E=10^{(1/pente)}$. La spécificité de la réaction a été vérifiée par la réalisation d'une courbe de fusion des produits d'amplification, la réalisation d'une amplification sur de l'eau et sur les échantillons RT négatifs en remplacement de l'ADNc.

a- Amplification quantitative en temps réel

L'amplification quantitative en temps réel a été réalisée à l'aide de l'appareil 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystem®, Life Technologies). La réaction a été effectuée dans 13 µl en présence de 6,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (2X de mélange SYBR Green 1 Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs avec dUTPs, Référence passive et Tampons), 300 nM de chaque amorce et 7,5 ng d'ADNc. Le programme suivant a été utilisé pour l'amplification : une étape à 95°C pendant 20 min permet d'activer la polymérase, 40 cycles à 95°C, 60°C et 72°C pendant 10 min, 30 min et 6 min respectivement. La sonde ROX a été utilisée comme référence pour normaliser les variations de fluorescence qui ne sont pas dues à la réaction de PCR. La quantification relative des ARNm d'intérêt a été obtenue par comparaison des Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en utilisant l'ARNr 16S comme contrôle endogène. L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Data Assist.

Table 8. suite

Nombre PA	Gene	Amorce	Séquence
PA2113	*opdO*	FopdO	CGGCTACCAGCGGATCAGT
		RopdO	GTAGCGCAGTTGCCAGGAA
PA2232	*pslB*	FpslB	ACACCAACGAATCCACCTTCA
		RpslB	CGCTCTGTACCTCGATCATCAC
PA2513	*antB*	FantB	GCGTCGAACAGTTCCTCTACC
		RantB	CTGCTCGGACTCCCACTG
PA2818	*arr*	Farr	CATGCTGAGCCCGTATTTCC
		Rarr	CGCAGGGAGGAGCAATAGAC
PA3006	*psrA*	FpsrA	CGATTTCGGCGTGAACACTT
		RpsrA	CGAAGAACGGCACCATCAG
PA3038	*opdQ*	FopdQ	CGCCAACAAGGACGAGAAAT
		RopdQ	GGTCAGCAGGTCGATGTTGTC
PA3186	*oprB*	FoprB	GGACGCTACACCGACCAGTT
		RoprB	ATGCGGTCGTTGGAAAGGT
PA3366	*amiE*	FamiE	GGCGAGGAGGAAATGGGTAT
		RamiE	GTGGTTCTGCGACTGATCGTT
PA3405	*hasE*	FhasE	TGGACGAGAAGCGTTTTTCC
		RhasE	GAGACCCCGACACCCTTGT
PA3540	*algD*	FalgD	GGGCTATGTCGGTGCAGTATG
		RalgD	GCGACTTGCCCTGGTTGAT
PA3552	*arnB*	FarnB	TCACTGGACTTTCTGCCATTCTC
		RarnB	CGGCCCGGTGGTGAT
PA3621.1	*rsmZ*	FrsmZ	CGTACAGGGAACACGCAAC
		RrsmZ	ATTACCCCGCCCACTCTTC
PA4296	*pprB*	FpprB	TCGTCAAGGTCCTGGTTTCG
		RpprB	GGCGATGGTGGTGAGGAA
PA4306	*flp*	Fflp	GCAAACGCCATCGAATACG
		Rflp	TGGGACTCAATACGGCAATCA
PA4525	*pilA*	FpilA	TTGCCATTCCCCAGTATCAGA
		RpilA	CAGCGCCGAAGCACCTT
PA4726.11	*crcZ*	FcrcZ	AGCGCACAGACTGGTTGGAT
		RcrcZ	GCTGGGAGTTCAATAGCAAACG
PA4776	*pmrA*	FpmrA	AGCGGTGCCGACGACTAC
		RpmrA	CACCCGTGCCTGCAGTTC
PA4843	*gcbA*	FPA4843	CGGCGGACAGGTAGATGATC
		RPA4843	CCTGGGCACCGAATTGG
PA5091	*hutG*	FhutG	ACCGATACCGACTGGCACAT
		RhutG	TCGGAAGGGCGGTTGAG

4- Techniques de clonage

a- Purification des produits PCR

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur.

b- Ligature

La ligature est réalisée en utilisant 1 µl de DNA ligase 400 $U.ml^{-1}$ (New England Biolabs®), 2 µl de tampon de ligature 10X (New England Biolabs®) et 10 à 20 ng d'ADN, dans un volume réactionnel de 20 µl.

c- Transformation des bactéries

i. Transformation par choc thermique d'*E. coli*

Les cellules d'*E. coli* compétentes ont été transformées par choc thermique. Cent ng de vecteur ont été ajoutés à 50 µl de solution bactérienne et incubés pendant 20 min sur glace. Le choc thermique a été réalisé par transfert des cellules à 42°C pendant 45 s puis sur glace pendant 2 min. Les cellules ont été reprises dans 500 µl de LB puis incubées à 37°C pendant 1h30. Les transformants ont été sélectionnés sur une gélose LB contenant l'antibiotique approprié.

ii. Transformation par électroporation de P. aeruginosa

Les souches de *P. aeruginosa* ont été transformées par électroporation. 3 ml d'une culture saturée de la veille a été centrifugée à 16200 g pendant 1 min à température ambiante. Le culot bactérien a été rincé trois fois avec 1 ml d'une solution de sucrose à 300 mM avant d'être repris dans 200 µl de cette même solution. Cinquante ng d'ADN plasmidique ont été ajoutés à 100 µl de solution bactérienne dans une cuve d'électroporation. Les cellules ont été exposées à un pulse de 1800 volts. Les cellules ont été reprises dans 500 µl de LB et incubées à 37°C pendant 1h30, afin de permettre la reprise de la croissance bactérienne. Les transformants ont été sélectionnés sur une gélose LB contenant l'antibiotique approprié.

5- Construction du vecteur pBB686GFP

Un fragment de 859 pb contenant le gène *gfp* (asv) et le site de fixation du ribosome (RBS) a été généré par PCR à l'aide des amorces RGFP et FGFP (table 8).

Table 8. suite

Nombre PA	Gene	Amorce	Séquence
PA5332	*crc*	Fcrc	TGATCAGCGGCTTAGGTTTC
		Rcrc	TTCTGGTTCAAGCTCTCGTC
16SRNA		F16S	AACCTGGGAACTGCATCCAA
		R16S	CTTCGCCACTGGTGTTCCTT
Vecteur pBB686GFP			
Amorce sens utilisée pour l'amplification du gene *gfp*. Elle porte le site de restriction EcoRI		FGFP	taataaGAATTCAGAGGAGAAATTAAGCATGCG T
Amorce antisens utilisée pour l'amplification du gene *gfp*		RGFP	AACCGAGCGTTCTGAACAAA
Amorce sens utilisée pour l'amplification de la région promotrice de *sigX*. Elle porte le site de restriction BamHI		F686	taataaGGATCCGAGTCGCTCGGCCTGCA
Amorce antisens utilisée pour l'amplification de la région promotrice de *sigX*. Elle porte le site de restriction EcoRI.		R686	taataaGAATTCGTGGAACAGCTCCGAGTGCG

Le fragment de 859 pb a été cloné dans le pBBR1-MCS5 aux sites de restrictions *Eco*RI et *Hin*dIII, générant le pBBGFP. La présence des inserts a été validée par PCR. Le fragment de 859 pb construit a été vérifié par séquençage (Beckman).

Un fragment de 686 pb correspondant à la grande région promotrice de *sigX* a été généré par PCR à l'aide des amorces F686 et R686. Le fragment de 686 pb a été cloné dans le pBBGFP aux sites de restrictions *Eco*RI et *Bam*HI générant le pBB686GFP. Le fragment ainsi construit a été vérifié par séquençage (Beckman).

III- Techniques de Protéomique

1- Analyse protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF

a- Extraction des protéines de membrane externe

Les bactéries ont été prélevées en phase exponentielle de croissance (DO_{580} 0,5) à partir d'une culture de 50 ml, culotées par centrifugation à 8031 rpm, pendant 10 minutes à 4°C, puis lavées trois fois avec 10ml de PBS. Les culots bactériens ont été repris dans 4 ml d'une solution A (30 mM Tris-HCl, pH8), avant d'être cassés par sonication. Les cellules non lysées ont été séparées du lysat bactérien par une centrifugation à 7500g, pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines membranaires insolubles, sont récupérées par ultracentrifugation à 30000g pendant 1 heure à 4°C du lysat bactérien. Après un lavage avec 1 ml de solution A, le culot résultant a été repris dans 3 ml de solution B (30 mM Tris-HCl, pH8, 2% sarkosyl) et dissous à température ambiante pendant 1 heure.

Les protéines de membrane externe insolubles dans le sarkosyl à 2% sont récupérées par une ultracentrifugation à 30000g, pendant 1 h à 4°C. La fraction insoluble a été rincée avec 500 µl de solution B, puis reprise dans 100 µl d'eau.

b- Dosage des protéines

Le dosage colorimétrique Biorad Protein Assay, qui dérive de la méthode de Bradford a été utilisé conformément aux recommandations du fournisseur. La quantité de protéines dans l'échantillon a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec des quantités connues d'albumine de sérum bovin (BSA ; Sigma).

c- Electrophorèse bidimensionnelle

i. Focalisation isoélectrique (IEF)

Des bandelettes de gel commerciales (Readystrip IPG Biorad, 11 cm, pH 4-7) ont été réhydratées de façon passive pendant 16h à 20°C avec le système Biorad « Protean IEF Cell » avec 250 µl de solution de réhydratation (5M Urée, 2M Thiourée, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 1% Ampholytes, 0,2% Tris Base, 0,5% Triton X), contenant 150 µg de protéines. A la fin de la réhydratation, deux pièces de papier filtre ont été placées entre le gel et chacune des deux électrodes, avant de réaliser l'IEF selon les paramètres suivant : 0 à 250 V en mode "rapid ramp" (15 min) ; 250 V à 4000 V en mode "linear ramp" (2 h) ; le voltage a ensuite été conservé constant (4000 V) jusqu'à ce qu'un total de 30000 $V.H^{-1}$ soit atteint. Dans le but de charger négativement les protéines et de réduire les ponts disulfures des protéines isofocalisées, les bandelettes de gel ont été saturées avec du SDS et du DTT. En pratique les bandelettes ont été incubées pendant 5 min dans la solution d'équilibration I (6 M Urée, 2 % SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20 % glycérol, 130 mM DTT). Pour prévenir la ré-oxydation des protéines au cours de l'électrophorèse et bloquer le DTT résiduel, les bandelettes de gel ont été incubées pendant 5 min dans la solution d'équilibration II (6 M Urée, 2 % SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20 % glycérol, 135 mM iodoacétamide)

ii. SDS-PAGE

Les protéines ont été séparées sur gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes, selon la méthode décrite par Laemmli, Les bandelettes de gel équilibrées ont été placées perpendiculairement puis scellées par une gélose (0,6% d'agarose) sur le gel dénaturant avant que les électrophorèses ne soit réalisées dans le système protean II xi (Biorad) à 10 mA/gel pendant 1h puis à 25 mA/gel pendant environ 5h à 10°C. Les protéines ont été colorées avec 0,2% de bleu de Coomassie contenue dans un mélange acide acétique / méthanol / eau (10/40/50) avant décoloration du gel dans ce mélange sans bleu de Coomassie.

d- Analyse d'images

L'analyse densitométrique comparative des gels a été réalisée avec le logiciel d'analyse PDquest 2D software (version 7.5, Biorad). Les triplicatas de gel ont été alignés et comparés, de manière à ne considérer que les spots dont l'intensité était significativement différente entre les deux souches sur les 3 gels. Les spots d'intérêt

ont été découpés et congelés à -80°C pour analyser leur contenu protéique par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

e- Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les protéines ont été soumises à une digestion trypsique selon la procédure décrite par Shevchenko *et al*. avec quelques modifications (Shevchenko et al., 1996). Les spots protéiques ont été repris dans 100 µl d'un mélange acétonitrile / 100mM bicarbonate d'ammonium (V/V) pendant 30 min à température ambiante. Les échantillons ont été ensuite déshydratés par ajout de 500 µl d'acétonitrile et incubés comme précédemment. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 10 µl d'une solution de digestion contenant 13 $ng.ml^{-1}$ de trypsine (Promega) repris dans 10 mM de bicarbonate d''ammonium et 10% d'acétonitrile (V/V). Une incubation de 30 min à 4°C permet de vérifier si le volume de solution de digestion est suffisant, la solution ne devant pas être totalement absorbée par le gel. Les spots ont été ensuite digérés à 37°C sur la nuit. 20 µl de solution d'extraction (Acide formique 5% ; acétonitrile [1:2]) a été ajoutée pendant 15 min à 37°C et les peptides ont été extraits du gel par sonication durant 2 min suivie d'une incubation à 37°C de 20 min. Les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse MS et MS-MS en tandem en utilisant un AutoFlexIII MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, USA).

La calibration a été réalisée à l'aide de l'étalon peptidique Peptide calibration standard (Bruker Daltonics) et l'α-cyano-4-acide hydroxycinnamique (HCCA) a été utilisé comme matrice (10 $mg.ml^{-1}$). L'échantillon peptidique (1.5 µl) et la matrice (1,5µl) ont été co-cristallisés sur une plaque en acier MTP 384 ground steel. L'analyse des spectres a été réalisée *via* le logiciel FlexAnalysis™ ayant permis l'exclusion des pics de contamination de la trypsine d'un spectre et la sélection des ions parents. Les paramètres utilisés au cours de l'identification des protéines par le logiciel BioTools™ sont présentés ci-dessous : base de données (NCBI), enzyme (trypsine), modifications fixes (aucune), modifications variables (oxydation [M], carbamylation [K]), valeurs de masse (monoisotopique), charge des peptides (+1), maximum de clivage manqué (1), et la tolérance de masse peptidique de 0,10% (100ppm). Les analyses statistiques des séquences ont été déterminées par probabilité en fonction du score offert par MASCOT.

2- Nano LC-MS/MS

a- Extraction des protéines totales

Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 7500 g pendant 10 min à 4°C puis lavée au PBS à deux reprises. Les culots bactériens ont été repris dans 500 µl de tampon d'extraction (urée 7M, thio-urée 2M, TriButylPhosphine (TBP) 2mM, Dithiothréitol (DTT) 20mM, CHAPS 2%). Les bactéries ont été lysées par sonication à une amplitude de 20% par pulses de 2 s pendant 6 min. Une fois la lyse terminée, une centrifugation à 10000 g pendant 20 min permet de séparer les débris cellulaires du surnageant contenant les protéines solubles.

b- Préparation des échantillons protéiques

Après détermination de la concentration par la méthode colorimétrique de Bradford, 30 µg de chaque échantillon est déposé sur un gel SDS-PAGE à 7% d'acrylamide afin de concentrer les protéines. La migration des protéines est réalisée à 10 mA par gel pendant 45 min puis 20 mA par gel pendant 2 h. Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie (éthanol 50%, acide acétique 10%, eau bidistillée 40%, bleu de Coomassie R-250 0,5 g) pendant 30 s, puis décolorés à l'aide d'une solution de décoloration (éthanol 50%, acide acétique 10%, eau bidistillée 40%) jusqu'à observation d'une bande correspondant aux protéines. Les bandes sont alors excisées puis stockées à 4°C. Les bandes sont rincées par 3 bains successifs de 10 minutes dans 100 µl d'eau bidistillée sous agitation puis 2 bains de DTT (5mM) et d'iodoacétamide (10 mM) dans les mêmes conditions. Les bandes sont ensuite soumises à deux bains successifs de 5 min dans 100 µl de tampon carbonate / acétonitrile (v/v) puis un bain de 10 min d'acétonitrile avant d'être séchées. Pour les lavages suivant, les surnageants de chaque échantillon sont conservés dans un même microtube. La digestion des protéines s'effectue dans 200 µl d'une solution de trypsine (0,01 $mg.ml^{-1}$) en tampon carbonate, pendant 3 h à 37°C, sous agitation. Après digestion, les bandes sont lavées avec 50 µl d'eau bidistillée pendant 10 min sous agitation puis successivement plongées dans des bains de 50 µl d'acétonitrile, d'acide trifluoroacétique (TFA), puis d'acétonitrile pendant 10 min chacun et sous agitation. Les surnageants récupérés sont asséchés au speedvac sur la nuit. Les culots protéiques sont ensuite repris dans du tampon LCMS (eau bidistillée, 0,1% acide formique) avant d'être analysés en spectrométrie de masse.

c- Nano LC-MS/MS

Les peptides obtenus par digestion trypsique ont été analysés en spectrométrie de masse nano LC-MS/MS sur l'appareil LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific®). Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr J. Hardouin du Laboratoire PBS, UMR6270 CNRS de l'Université de Rouen.

Partie I- Homéostasie de la structure pariétale.

Article 1 : Etude protéomique du rôle de SigX dans la composition de la membrane externe de *P. aeruginosa*.

SigX possède 49% de similarité de séquence avec le facteur sigma ECF SigW de *B. subtilis* impliqué dans le contrôle de la fluidité membranaire et activé en réponse à un choc alcalin, un stress osmotique ou en présence d'antibiotiques altérant la paroi cellulaire. Chez *P. aeruginosa*, SigX n'était connu, à ce moment, que pour contribuer à la transcription de son propre gène et pour être majoritairement responsable de la transcription d'*oprF* codant la porine majoritaire de membrane externe. OprF étant une porine impliquée dans des fonctions cruciales dont le maintien de la structure pariétale et la perméabilité membranaire, nous avons supposé que SigX en régulant l'expression d'*oprF* pourrait en partie réguler la perméabilité de la membrane externe. Nous avons lors de cette étude, analysé l'effet de la mutation de *sigX* sur la composition protéique de la membrane externe de *P. aeruginosa* PAO1. Par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse MALDI-TOF, nous avons identifié 8 protéines dont la production est diminuée chez un mutant *sigX*. Parmi elles, 4 sont impliquées dans l'acquisition du fer, la porine OprF et 3 porines spécifiques. Deux protéines sont également surproduites, la porine spécifique OprB et l'enzyme PagL impliquée dans la modification du LPS. Ces résultats suggèrent que SigX pourrait être impliqué dans le contrôle et/ou dans la régulation de l'homéostasie de la membrane externe.

Ma contribution dans cette étude a été de réaliser l'extraction des protéines de membrane externe et l'analyse par spectrométrie de masse.

JOURNAL OF PROTEOMICS 94 (2013) 451–459

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition

Rachel Duchesne[a,1], *Emeline Bouffartigues*[a,1], *Virginie Oxaran*[a], *Olivier Maillot*[a], *Magalie Bénard*[b], *Marc G.J. Feuilloley*[a], *Nicole Orange*[a], *Sylvie Chevalier*[a,*]

[a]*Laboratory of Microbiology Signal and Microenvironment (LMSM) EA 4312, University of Rouen, GRRs SeSa, IRIB, Evreux F-27000, France*
[b]*Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan F-76821, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 August 2013
Accepted 17 October 2013
Available online 26 October 2013

Keywords:
Pseudomonas aeruginosa
Outer membrane proteome
ECF sigma factor SigX
Porins

ABSTRACT

SigX is one of the 19 extracytoplasmic function sigma factors that have been predicted in the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* genome. SigX is involved in the transcription of *oprF*, encoding the major outer membrane protein OprF, a pleiotropic porin that contributes to the maintaining of the wall structure, and is essential to *P. aeruginosa* virulence. This study aimed to get further insights into the functions of SigX. We performed here an outer membrane subproteome of a *sigX* mutant. Proteomic investigations revealed lower production of 8 porins among which 4 gated channels involved in iron or hem uptake, OprF, and the three substrate-specific proteins OprD, OprQ and OprE. On the other side, the glucose-specific porin OprB and the lipid A 3-O-deacylase that is involved in LPS modification were up-regulated. Our results indicate that SigX may be involved in the control and/or regulation of the outer membrane composition.

Biological significance
A proteomic approach was used herein to get further insights into SigX functions in *P. aeruginosa*. The data presented here suggest that SigX is involved in the outer membrane protein composition, and could be linked to a regulatory network involved in OM homeostasis.
© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacterium capable of surviving in a broad range of natural environments, although it is best known as a human pathogen associated with hospital acquired infections in immunocompromised patients, and as a leading cause of death in cystic fibrosis patients [1]. A common mode of adaptation to any environmental changes in bacteria, including those encountered during host–cell interactions, is through the switch in sigma factors utilized by the RNA polymerase core enzyme [2]. In addition to the principal sigma factor (RpoD or σ^{70} in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), which is responsible for the majority of RNA synthesis in exponentially growing cells, most bacteria possess multiple alternative sigma factors, including those involved in extracytoplasmic functions (ECFs) [2]. The most studied ECF

* *Corresponding author*. Tel.: +33 2 32 29 15 60; fax: +33 2 32 29 15 50.
E-mail address: chevalier@univ-rouen.fr (S. Chevalier).
[1] These authors have contributed equally to this study.

1874-3919/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.022

sigma factors belong to the categories of stress-responsive (RpoE-like) and iron starvation (FecI-like) sigma factors [3]. The first ones respond to stress/cell envelope damage and regulate genes that restore proper function of the cell in these conditions [4]. FecI-like sigma factors, which are controlled by cell surface signaling in Gram negative bacteria, mainly respond to the presence of a specific siderophore and regulate iron uptake [3].

Analysis of the *P. aeruginosa* genome sequence revealed the presence of 19 open reading frames (ORFs) encoding putative proteins with greater than 47% similarity to members of the ECF family [5]. In this bacterium, a large majority of the studied ECF sigma factors are involved in iron homeostasis, while only AlgU is homologous to RpoE in *E. coli* and is activated in response to cell wall alterations [6]. The ECF sigma factor SigX shares 49% similarity with the SigX and SigW ECF sigma factors of *Bacillus subtilis* [5], which are induced by alkaline shock, phage infection, salt and antibiotics that affect cell-wall biosynthesis [7,8]. In *P. aeruginosa*, SigX is only known to contribute to the transcription of its own gene and is largely responsible for the transcription of *oprF*, encoding the major outer membrane protein (OMP) OprF [5,9,10]. OprF is involved in several crucial functions, including cell structure maintenance, outer membrane permeability, environment and host immune system sensing, and virulence [11–14].

This work aims to characterize the outer membrane proteomic alterations endorsed in a SigX-deleted mutant strain to get further insights into SigX functions in *P. aeruginosa*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The bacteria utilized were *P. aeruginosa* H103 (prototroph derivative of strain PAO1 [15]), its isogenic *sigX* deletion mutant PAOSX, and PAOSX+ consisting in PAOSX complemented with pAB754 vector that contains a copy of the *sigX* gene under the control of its own promoter [10]. Bacteria were grown overnight at 37 °C on a rotary shaker (180 rpm) in mineral M9 medium containing 0.2% of glucose (M9G). Cultures were inoculated at an initial OD_{580} of 0.08 in fresh M9G medium, and allowed to grow to mid log phase (OD_{580} = 0.4) before OMP extraction.

2.2. Proteomics

2.2.1. Preparation and analysis of OM proteins (OMPs) extracts

OMPs were isolated from at least three independent 25 mL cultures of *P. aeruginosa* H103 and PAOSX by the sarkosyl extraction method [16]. Cells were harvested by centrifugation at 7500 *g* for 15 min at 4 °C, washed three times with phosphate buffer (50 mM, pH 8) before being disrupted by sonication in 4 mL Tris–HCl buffer (30 mM, pH8) on ice (6 cycles of 30 s). Non-broken cells were removed by centrifugation at 7500 *g* for 15 min at 4 °C and the membrane proteins fraction was collected by centrifugation at 30000 *g* for 1 h at 4 °C. Inner membrane proteins were solubilized in 3 mL Tris–HCl buffer (30 mM, pH8) containing 2% N-lauryl sarcosinate at room temperature. Insoluble OMPs were harvested by centrifugation at 30000 *g* for 1 h at 4 °C and resuspended in 100 μL of water. Protein concentrations were determined according to the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France) using bovine serum albumin as standard.

2.2.2. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

OMP patterns were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). A total of 150 μg of proteins was added to isoelectric focusing (IEF) buffer (final volume, 200 μl), containing 5 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) Chaps, 2% (w/v) SB3-10, 1% (v/v) ampholytes pH 4–7, 40 mM Tris-Base, 2 mM tributylphosphine (TBP) and 0.5% Triton. The first dimension was carried out with immobilized linear pH gradients (IPG, 11 cm, pH 4–7, Bio-Rad Laboratories). IPG strips were rehydrated for 16 h at 20 °C. Proteins were focused using a PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad Laboratories) with the following parameters: 0–250 V rapid ramp for 15 min, 250–4000 V linear ramp for 2 h, and then hold at 4000 V until a total of 30000 V-hours was reached. During the process, temperature and current were limited at 25 °C and 50 μA, respectively, per strip. Proteins were then reduced and alkylated in equilibration buffer containing 6 M urea, 0.375 M Tris–HCl, pH 8.8, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, and 130 mM DTT for reduction or 135 mM iodoacetamide for alkylation. The second dimension was obtained by SDS-PAGE using 12% (w/v) polyacrylamide resolving gels (width 16 cm, length 20 cm, thickness, 0.75 mm) as described by Jaouen et al. [17]. After migration, proteins were visualized by CBB R-250 staining.

2.2.3. Gel analysis

Gel images were captured using a GS-800 densitometer (Bio-Rad Laboratories). Image analyses were performed using PDQuest 2-DE analysis 7.4.0 software (Bio-Rad Laboratories). For each condition, three independent samples were analyzed on six gels. For each experimental condition, three 2-DE gels were matched together to form a reference image. The two reference gels were then matched together so that the same spot in different gels had the same number. Protein spots from the two bacterial strains were considered to display significant quantitative difference if they fulfilled the following criteria: p-value < 0.05 (t-test); detection threshold, average volume > 20 (n = 3); differential tolerance, fold change >2 [18].

2.2.4. Protein identification

A slightly modified procedure of that developed by Schevchenko et al. [19] was used for in-gel digestion. Briefly, spots of interest were excised from 2-DE gels. The gel pieces were washed in acetonitrile/100 mM ammonium bicarbonate (1:1) and air-dried. Each sample was then digested for 16 h at 37 °C with 13 $ng.\mu l^{-1}$ of trypsin (Trypsin Gold Mass spectrometry grade, Promega, Charbonnières, France) in 20 μL of 10 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 containing 10% acetonitrile. The peptides were then extracted in 10 μl of extraction buffer (5% formic acid in 50% acetonitrile) before being twice sonicated for 5 min. In-gel trypsin digestion products were analyzed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Quadrupole/Time Of Flight–Time Of Flight-Mass Spectrometry (MALDI/TOF–TOF). In these experiments, 1 μL of peptide mixture (sample or peptide calibration standard II, Brucker Daltonics) was spotted

onto the MALDI ground steel target plate (Brucker Daltonics), and 1 μL of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (10 mg · mL^{-1} in a solution of 0.1% trifluoroacetic acid and 50% acetonitrile) was added onto each sample. The spots were air-dried on the target plate and the latter was introduced into an AutoFlex III MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonique, Wissembourg, France). The samples were ionized with a laser beam (λ) 337 nm. Each spectrum was established over an average of 500–1000 laser shots, and has been analyzed via FlexAnalysis™ software (Brucker Daltonics), leading to exclude the trypsin-contaminating pics from the spectrum and the selection of the parent ions. The more representative monocharged ions were submitted to fragmentation with energy of collision near 0.05 eV/Da. Typically, BioTools™ 3.2 (MS and MS/MS) and FlexAnalysis softwares treated each sample well individually and generated an MS peak list which was submitted for a peptide mass fingerprinting (PMF) search and used as a "survey scan" to determine peptide precursors for MS/MS acquisition. All data were analyzed using MASCOT software (http://matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe) for search into the NCBI protein database (date of accession: 21/04/2012; mass tolerance: 50 ppm, taxonomy: bacteria, enzyme: trypsine, variable modification: methionine oxidation, fixed modification: carbamidomethymation, mass values: monoisotopic).

2.3. *Pyoverdine and siderophore production assays*

To measure pyoverdine and total siderophore production, bacteria were grown overnight in M9G and King B media [20], respectively. Culture supernatants were filtered (0.22 μm) and tested for the absence of bacteria by inoculating 3 mL of LB with an aliquot of supernatant. Pyoverdine was quantified by measuring the absorbance at 405 nm of the cell-free supernatant, and was expressed as OD_{405}/OD_{580} ratio.

3. Results and discussion

3.1. *The growth of the sigX mutant is altered in LB, but not in M9G minimal medium*

In order to assign new functions of the ECF sigma factor SigX, we conducted a proteomic analysis comparing the wildtype H103 PAO1 strain to its isogenic mutant PAOSX [9] that was constructed using the *cre-lox* procedure [21]. Growth of H103, PAOSX and the *in trans sigX*-complemented PAOSX mutant strain PAOSX+ [10], was monitored in M9 mineral medium containing glucose as carbon source (M9G). Growth of the three strains was closely similar in these conditions (data not shown), suggesting that the lack of SigX did not drastically alter the bacterial physiology in this medium. Interestingly, while in many bacteria glucose is a preferred carbon source, *Pseudomonas* prefers organic acids and amino acids to glucose [22,23]. In LB rich medium, in which these latter carbon sources are found, the absence of SigX increased by about 3 fold the doubling time (e.g. 149 min for PAOSX and 58 min for H103 [10]), suggesting that the *sigX* mutant strain was disadvantaged in this condition. In order to get further insights into the functions of SigX, and since the OM is a protective barrier that controls the uptake of nutriments and the efflux of catabolic waste, we performed an OM proteomic study. Since cell density is basically involved in quorum sensing (QS)-dependent gene regulation, the M9G medium was chosen for proteomic study profiling in order to avoid effects on gene

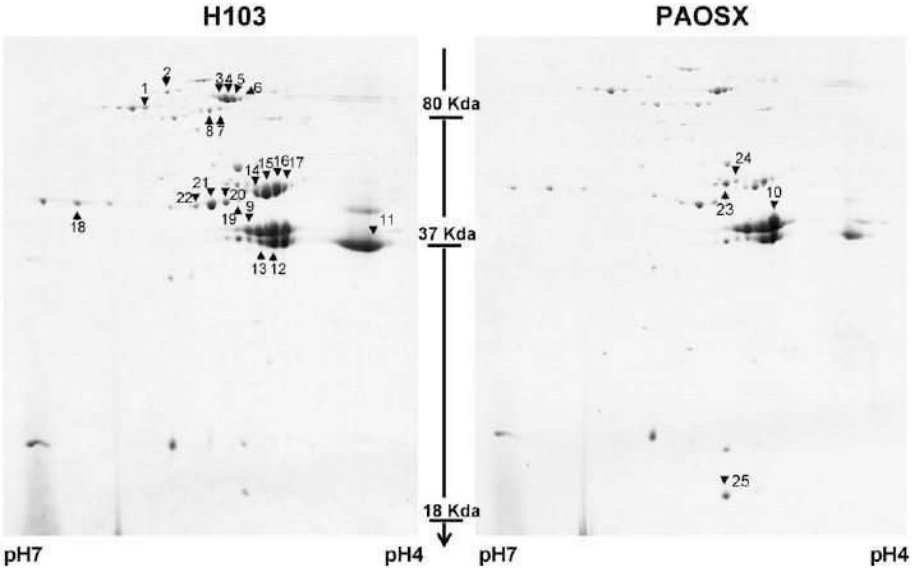


Fig. 1 – OMPs of *P. aeruginosa* H103 and PAOSX (*sigX* mutant strain) grown in M9G medium were separated on 2-DE gels. The identified spots were numbered according to Tables 1 and 2. The gels are representative of three independent OMP extractions. Over-produced spots were indicated by arrows. Non-numbered spots showing intensity variations between the gels were not studied further because the variations were not reproducibly observed.

Table 1 – Identification of the selected OMPs whose amount was differentially expressed in *P. aeruginosa* PAOSX (*sigX* mutant) and H103.

PA number	Gene name	Product or putative function	Theoretical MW (kDa)/pI	Spot number	Mascot score	Matched peptides	Coverage (%)	PAOSX/H103	
								Mean	SD
Porins									
Gated channels involved in iron homeostasis									
PA4710	*phuR*	Hemoglobin uptake outer membrane receptor	84.6/5.72	1	325	36	59.7	0.47	0.06
PA4168	*fpvB*	Second ferric pyoverdine receptor	87.4/5.6	2	136	21	33.3	0.23	0.08
PA2398	*fpvA*	Ferripyoverdine receptor	91.1/5.38	3	254	32	50.1	0.25	0.05
				4	338	40	54.5	0.67	0.22
				5	280	34	52.2	0.71	0.04
				6	142	24	37.5	0.38	0.01
PA4675	*chtA*	TonB-dependent aerobactin receptor	80.9/5.33	7	189	24	44.2	0.52	0.12
				8	246	31	60.6	0.55	0.15
General/aspecific porin									
PA1777	*oprF*	Major outer membrane protein OprF	37.6/4.98	9	144	15	54.7	0.54	0.11
				10	138	17	54.7	2.12	0.18
				11	91	12	51.4	0.16	0.02
				12	154	17	65.9	0.53	0.01
				13	108	13	54.4	0.34	0.23
Substrate-selective porin									
PA0958	*oprD*	Basic amino-acid specific porin OprD	48.3/4.96	14	210	21	64.3	0.09	0
				15	149	18	58.2	0.16	0.03
				16	147	16	45.8	0.26	0.14
				17	191	20	64.3	0.23	0.18
PA0291	*oprE*	Anaerobically-induced outer membrane porin	49.6/8.67	18	207	20	61.1	0.71	0.11
PA2760	*oprQ*	Outer membrane porin OprQ	46.8/5.54	19	120	19	55.5	0.37	0.01
				20	202	19	47.8	0.36	0.18
				21	223	22	58.1	0.45	0.12
				22	158	16	49.2	0.31	0.08
PA3186	*oprB*	Carbohydrate-selective outer membrane OprB	50.7/5.48	23	213	16	48.2	1.98	0.61
				24	134	19	59.1	1.98	0.65
LPS modification									
PA4661	*pagL*	Lipid A 3-O-deacylase	18.3/5.87	25	104	8	81.3	4.04	0.64

Spots were numbered according to Table 2 and Fig. 1.
SD: standard deviation.

Table 2 – Focus of the selected OMPs whose amount was differentially expressed in *P. aeruginosa* PAOSX (*sigX* mutant) and H103.

Product name	PhuR	FpvB	FpvA	ChtA	OprF	OprD	OprE	OprQ	OprB	PagL
Spot number (s)	1	2	3–6	7–8	9–13	14–17	18	19–22	23–24	25
H103										
PAOSX										

expression which may result from QS alteration rather than from the absence of SigX.

3.2. *Proteomic profiling of SigX-related proteins in outer membranes*

To examine the impact of SigX on the OMP content, OMPs were extracted from both the wildtype strain H103 and its isogenic *sigX* mutant, and submitted to two-dimensional electrophoresis (2-DE). As shown in Fig. 1, 2-DE gels allowed detection of approximately 118 spots, 25 of which showed reproducible intensity variations. Membrane proteins are notoriously complex to analyze by 2-DE owing to difficulties in extracting them from the membranes and to their inherently hydrophobic nature [24,25]. The hydrophobicity of these proteins, mainly folded as β-barrels, makes them indeed difficult to solubilize for isoelectric focusing, a process in which they often precipitate at their isoelectric point (pI) in the immobilized pH gradient, thus, reducing transfer to the second dimension gel [26]. Protein hydrophobicity, protein solubilization, or loss of proteins during the extraction process, revealed to be the major difficulties regarding sample preparation and proteome analysis. Altogether, these issues may explain at least partly the reduced number of OMPs differentially expressed in this study.

All of these spots were excised for protein identification as described in the Protein identification section. The criteria used to accept protein identification based on MS/MS or peptide mass fingerprinting data included the extent of sequence coverage (minimum of 30%), the numbers of matching peptides (minimum of 8), the mascot score (minimum of 100), and the score of probability (minimum of 70 for the Mowse score, data not shown). Many of these proteins migrated as different mass species in 2-DE gels, since the 25 spots, which were numbered accordingly in Fig. 1 and in Table 1, represented 10 different proteins, suggesting putative posttranslational glycosylations or phosphorylations, as previously described for several OMPs of *P. fluorescens* [25] or *P. aeruginosa* [27]. These modifications could have consequences on their folding and/or function. All of these proteins were OMPs, among which 9 belong to the large porin functional class, and one was identified as the 3-O-deacylase PagL, an enzyme that is involved in lipopolysaccharide (LPS) modification (Table 1).

3.2.1. *Porins*

These are proteins that form water-filled channels across the OMs of Gram-negative bacteria and mediate uptake or efflux of a number of compounds including ions, small nutrient molecules, antibiotics and large iron-siderophore complexes [28]. Porins are thus involved in the control of the permeability and the selectivity of the OM, and make this membrane semi-permeable. There are four types of porins: general/nonspecific porins, substrate-specific porins, gated porins, and efflux porins [29]. The most striking result of this study was the down-production in the *sigX* mutant of 8 porins among which four gated channels involved in iron homeostasis (FpvA, FpvB, PhuR and ChtA), the general porin OprF, three members of the substrate-specific OprD-like family (OprD, OprE and OprQ), while the carbohydrate-selective porin OprB was up-regulated (Fig. 1 and Tables 1, 2).

3.2.1.1. Gated channels involved in iron homeostasis. The production of the four gated OM channels FpvA, FpvB, PhuR and ChtA that are involved in iron homeostasis was lowered in the SigX-deficient mutant compared to the H103 wild type strain (Tables 1, 2 and Fig. 1). Iron is a requirement for all microorganisms and it is of particular importance in aerobic metabolism [30]. *P. aeruginosa* has evolved a series of strategies for acquiring iron, including the production and secretion of powerful iron-binding siderophores, and the direct acquisition of iron from hem or hemoglobin. Besides siderophores, cell surface receptors are produced, which function as gated porin channels that recognize and internalize the ferri-siderophore complexes in concert with the TonB protein that energizes the receptor protein [31]. In response to iron depletion, *P. aeruginosa* utilizes mainly the endogenous siderophore pyoverdine (PVD) as the primary iron source. PVD-mediated iron uptake occurs by binding of the ferri-PVD complex to the OM receptor FpvA [32,33], while the secondary PVD receptor FpvB provides a minor contribution to PVD uptake [34]. The hemoglobin uptake OM receptor PhuR and the aerobactin receptor ChtA were also under-produced in the *sigX* mutant strain. PhuR is the OM receptor of one of the two distinct hem-uptake systems that enable this opportunistic pathogen to utilize iron from host proteins such as hemoglobin, and is thus considered as a powerful virulence factor [31]. ChtA is an OM receptor for the xenosiderophores (e.g. produced by other microorganisms) aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen, which probably allows the bacteria to compete effectively with other microorganisms for available iron and consequently to occupy extended ecological niches [35].

Since these receptors were under-produced in the *sigX* mutant strain, we hypothesized the siderophores to be also under-expressed. We thus assayed their production by growing H103, PAOSX and the *sigX*-complemented mutant strain

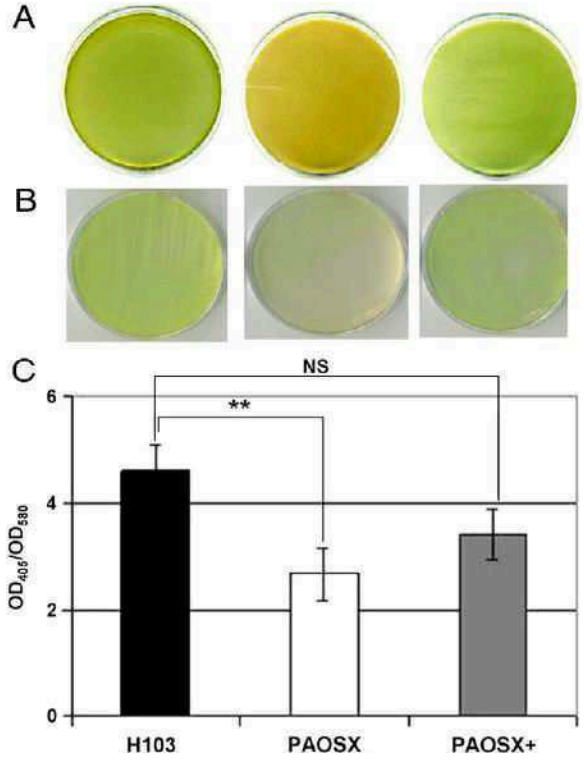


Fig. 2 – H103, PAOSX and PAOSX + culture supernatants were obtained from overnight cultures in (A) King B or (B, C) M9G media. The total siderophores (A, B) and pyoverdine (C) relative amounts were assayed at least three times independently for each strain and means and standard deviations are presented (NS: non-significant; ★★ = p-value < 0.01).

PAOSX + in M9G and King B media [20], this latter being depleted in iron thus forcing the production of siderophores. The mutant strain produced less siderophores than the wildtype H103 and the *sigX*-complemented PAOSX + mutant strains (Fig. 2A and B). Similar results were obtained when PVD production was assayed (Fig. 2C). Taken together, our study shows that SigX may be involved in iron uptake and/or homeostasis, a quite common feature of many ECF sigma factors in *P. aeruginosa*. These ECF sigma factors indeed usually tend to be involved in regulating the uptake of specific siderophore-iron complexes through a cell surface signaling system (CSS [6]). These CSS systems involve an OM gated channel that plays the both two functions of receptor and transducer, and is linked to a TonB/ExbB/ExbD energizing system and to an anti-sigma factor that regulates the activity of an ECF sigma factor [36]. SigX has functions partly overlapping those of these ECF sigma factors, since the *sigX* mutant displays changes in production of siderophore and hem uptake systems as well as reduction in siderophore production. However, unlike the other ECF sigma factors involved in iron uptake [6,30], SigX appears relatively non-specific and lacks other elements of cell surface signaling systems (anti-sigma factor and TonB-dependent transducer) encoded by genes in the vicinity of the *sigX* gene (http://www.pseudomonas.com [37]).

3.2.1.2. *General porin.* In 2-DE gels, the major OMP OprF migrated at least as 5 species with different pI and/or molecular masses (Fig. 1, Tables 1, 2). OprF was globally under-produced in the *sigX* mutant strain, the fold change ranging from –6 to –1.8, except for spot 10 that was about 2 fold over-produced, suggesting post-translational modifications leading possibly to a better folding into the bacterial OM. Some of these OprF forms have been proposed previously to appear according to the solubilization conditions, leading to disruption of the protein structure that is partly folded into β-sheets [15]. Posttranslational modifications have been associated to phosphorylations or glycosylations for example, leading to different pI or molecular masses [38]. While modulation of the phosphorylation degree of OprF has not yet been demonstrated, it has been shown recently that OprF binds efficiently to the N-glycosylated LecB OM lectin [39]. Since LecB interacts specifically with OM glycoproteins, it has been further suggested that OprF itself might be glycosylated, despite no such experimental evidences have been obtained [40]. Interestingly, in *Chlamydia trachomatis*, the major OMP is glycosylated [38]. To date, the number of examples of glycosylation of prokaryotic proteins is rather limited [41]. However, such post-translational modification can significantly increase the OMP apparent molecular mass [38], and would probably modulate the OMP functions. For example, the N-glycosylation of LecB is required for proper transport to its final destination on the cell surface of *P. aeruginosa* [39]. It is tempting to speculate that such putative post-translational modifications would at least partly participate to the pleitropic character of OprF. OprF is indeed a general porin that is non-covalently linked to the peptidoglycan layer, contributing thus to the maintenance of the cell wall structure [15]. It has been involved in adherence [14,42], biofilm formation [43], and in virulence [14]. Besides that, OprF is also a major environmental sensor [13,14,44], which binds specifically to interferon gamma, allowing the bacteria to sense the host cell immune state [13]. Overall, the down-regulation of OprF in the *sigX* mutant strain is consistent with the role of SigX in *oprF* transcription [9,10].

3.2.1.3. *Substrate specific porins.* OprD (Fig. 1, spots 14–17), OprE (Fig. 1, spot 18) and OprQ (Fig. 1, spots 19–22) were down-regulated, while the general carbohydrate-selective porin OprB (Fig. 1, spots 23–24) was over-expressed. These proteins belong to the 19-member family of porins which are similar to OprD at the amino acid level, and are involved in the uptake of small peptides, amino acids or carboxylic acids. OprD is specific for lysine and arginine, and small peptides containing these amino acids, whereas the OprQ substrate remains unknown [29]. OprQ has been involved in adherence to human fibronectin, playing thus a role in *P. aeruginosa* virulence [45]. OprE belongs to the OpdK subfamily of porins, which are related to *Pseudomonas putida* PhaK porin that takes up carboxylic acids [28]. OprE is an anaerobically induced porin [46] that was predicted to take up either arginine or proline [28]. Taken together, the down-production of these substrate-specific porins and the general/aspecific protein OprF, indicate a trend to reduce at least partly the OM permeability, suggesting that SigX may be involved in the regulation of the OM composition. On the opposite, OprB was up-regulated by about 2 fold in the *sigX* mutant compared to

the wildtype strain H103. OprB is a porin that is part of the high affinity glucose transport pathway in *P. aeruginosa*, which is also active during anaerobic growth [47,48]. OprB has also been shown to facilitate the uptake of several carbohydrates, including fructose, mannitol and glycerol, and to be differentially regulated by salicylic acid, pH and temperature [49–51]. Our study was conducted in liquid minimal M9 medium supplemented with 0.2% of glucose as sole carbon source. Interestingly, such a low glucose concentration has been previously shown to induce a hunger-stress response in *P. putida* when grown on solidified agar medium. In these conditions, the up-regulation of OprB was counterbalanced by the down-production of several OMPs, including OprE, in order to maintain membrane homeostasis [52]. In *P. putida*, this stress-response was triggered by the ColR/S two component system (TCS) [53], which has been considered as a safety factor during the hunger response since it ensures the welfare of cell membrane during increased synthesis of OprB [52]. It is tempting to speculate that PAOSX may undergo such a hunger stress, suggesting that SigX could contribute to the regulation of nutriments uptake. Noticeably, in *B. subtilis* the SigX homologue SigW (responding to cell envelope perturbations and controlling the membrane fluidity) and the CssRS two-component regulatory system (responding to unfolded exported proteins) set critical limits to membrane protein production in large quantities [54]. Further studies are currently under way to get insights into the molecular mechanisms linking possibly SigX and OM homeostasis in *P. aeruginosa*.

3.2.2. *LPS modification*

Besides the abundance of 9 porins in the OM, we also noticed the overproduction by 4 fold of spot 25 (Tables 1 and 2, Fig. 1), a protein that was identified as the OM lipid A 3-O-deacylase PagL. This lipase is an 8-stranded anti-parallel β-barrel that removes either the 3-OH C10 or 3-OH C14 β-hydroxy fatty acid from lipid A [55]. Lipid A is the biologically active component of LPS, the remodeling of which can alter the bacterium's OM integrity, susceptibility to antimicrobials peptides, immune stimulation and pathogenesis [56–58]. The activity of PagL may thus have several important impacts on these phenotypes. For example, the activity of PagL has been shown to increase OM fluidity and permeability to hydrophobic agents [59–61], suggesting that the SigX-deleted mutant may be altered in its OM integrity. Interestingly, the SigX homologue SigW ECF sigma factor has been involved in *B. subtilis* membrane fluidity modulation [62]. Changes in lipid A acylation interfere with LPS–LPS and LPS–OMP interactions [63]. Since LPS assists OMP folding into artificial lipid bilayers [64–67], it suggests that the PagL-induced lipid A deacylation might affect OMP folding, a putative function that might comfort the role of SigX in the control of the OM homeostasis. As deacylation reduces LPS–LPS [68,69], LPS may be easier released from the OM, affecting thus the OM fluidity as well as the endotoxic activity of the purified LPS and whole bacterial cells [70]. The endotoxic activity of LPS is indeed determined entirely by the composition of the lipid A moiety, which is recognized by the innate immune system through the Toll-like receptor 4 (TLR4)/MD-2 complex [71]. In general, production of fully acylated lipid A is associated with a more strong TLR4 mediated inflammatory response while lipid A with lower levels of acylation triggers reduced cellular responses [71]. The activity of PagL i) leads to reduced endotoxic activity of purified LPS [69], and ii) modulates signaling through TLR4 that could help whole cells to evade host immune system [72,73]. However, this mechanism might not be easily extrapolated to other Gram-negative bacteria since recognition by innate immune receptors is not necessary decreased by lipid A under-acetylations, as shown for *Brucella abortus* or *Brucella bronchiseptica* [69,74]. On the other side, PagL enzyme activity has been recently reported as being highly regulated by latency in *Salmonella enterica*, a mechanism in which the OM enzyme remains inactive, generating thus a robust permeation barrier [59,75,76]. This study, which was focused on the OMP profile that results from the loss of SigX, showed a 4-fold increase of PagL amount in the mutant OM. Further experiments are currently in progress on the SigX-deleted mutant strain i) to get further insights into PagL activity and consequently in OM homeostasis and pathogenesis, and ii) to decipher the molecular network linking SigX and PagL.

4. Conclusions

A proteomic approach was used herein to get further insights into SigX involvement in the OM composition in *P. aeruginosa*. The most striking result of this study was the down-production of 8 porins that are involved in iron homeostasis, uptake of ionic species or nutriments, while the carbohydrate specific porin OprB and the lipid A deacylase PagL were up-regulated. These data suggest that SigX may be involved in the control and/or the regulation of the OM composition and homeostasis. Interestingly, limiting the critical set of OMPs as well as modulating membrane fluidity are mechanisms that are commonly associated to a general cell wall stress response in bacteria [77,78]. It is thus tempting to speculate that SigX might belong to the network leading to the envelope stress response, like SigW, the SigX homologue in *B. subtilis*. One of the future challenges will now be to decipher the direct targets of the ECF sigma factor SigX leading to these phenotypes in *P. aeruginosa*.

Acknowledgments

This work was supported by the French government and the Région Haute Normandie, GRRs SéSa and IRIB, the Grand Evreux Agglomération and the European FEDER funds No. 32789.

REFERENCES

[1] Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis 1983;5:279–313.
[2] Paget MS, Helmann JD. The σ^{70} family of sigma factors. Genome Biol 2003;4:203.
[3] Bastiaansen KC, Bitter W, Llamas MA. ECF sigma factors: from stress management to iron uptake. In: Filloux AAM, editor. Bacterial regulatory networks; 2012. p. 59–85.
[4] Hayden JD, Ades SE. The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. PLoS One 2008;3:e1573.

[5] Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev 2008;32:38–55.
[6] Llamas MA, Mooij MJ, Sparrius M, Vandenbroucke-Grauls CM, Ratledge C, Bitter W. Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. Mol Microbiol 2008;67:458–72.
[7] Schöbel S, Zellmeier S, Schumann W, Wiegert T. The *Bacillus subtilis* σ^W anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. Mol Microbiol 2004;52:1091–105.
[8] Cao M, Helmann JD. The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigma X factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. J Bacteriol 2004;186:1136–46.
[9] Brinkman FS, Schoofs G, Hancock REW, De Mot R. Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major OM protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. J Bacteriol 1999;181:4746–54.
[10] Bouffartigues E, Gicquel G, Bazire A, Bains M, Maillot O, Vieillard J, et al. Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. J Bacteriol 2012;194:4301–11.
[11] Woodruff WA, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. J Bacteriol 1989;171:3304–9.
[12] Rawling EG, Brinkman FS, Hancock REW. Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. J Bacteriol 1989;180:3556–62.
[13] Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, et al. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. Science 2005;309:774–7.
[14] Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. Infect Immun 2011;79:1176–86.
[15] Hancock REW, Carey AM. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. J Bacteriol 1979;140:902–10.
[16] Ravaoarinoro M, Ciurli C, Toma E, Morisset R. Rapid method for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. Electrophoresis 1994;15:594–6.
[17] Jaouen T, Dé E, Chevalier S, Orange N. Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* species. Appl Environ Microbiol 2004;70:6665–9.
[18] Vilain S, Cosette P, Hubert M, Lange C, Junter GA, Jouenne T. Proteomic analysis of agar gel-entrapped *Pseudomonas aeruginosa*. Proteomics 2004;4:1996–2004.
[19] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Anal Chem 1996;68:850–8.
[20] King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med 1954;44:301–7.
[21] Quenée L, Lamotte D, Polack B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechniques 2005;38:63–7.
[22] Rojo F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. FEMS Microbiol Rev 2010;34:658–84.
[23] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. Nat Rev Microbiol 2008;6:613–24.
[24] Santoni V, Kieffer S, Desclaux D, Masson F, Rabilloud T. Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. Electrophoresis 2000;21:3329–44.
[25] Guyard-Nicodeme M, Bazire A, Hemery G, Meylheuc T, Molle D, Orange N, et al. Outer membrane modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to hyperosmolarity. J Proteome Res 2008;7:1218–25.
[26] Membrane proteomics. In: Peirce MJ, Wait R, editors. Methods and protocols, vol. 528. , Methods in molecular biology™; 2009.
[27] Machado I, Coquet L, Jouenne T, Pereira MO. Proteomic approach to *Pseudomonas aeruginosa* adaptive resistance to benzalkonium chloride. J Proteomics 2013;89:273–9.
[28] Tamber S, Ochs MM, Hancock RE. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2006;188:45–54.
[29] Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol 2002;56:17–38.
[30] Cornelis P, Matthijs S, Van Oeffelen L. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Biometals 2009;22:15–22.
[31] Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 2000;54:881–941.
[32] Poole K, Neshat S, Krebes K, Heinrichs DE. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1993;175:4597–604.
[33] Greenwald J, Zeder-Lutz G, Hagege A, Celia H, Pattus F. The metal dependence of pyoverdine interactions with its outer membrane receptor FpvA. J Bacteriol 2008;190:6548–58.
[34] Ghysels B, Dieu BT, Beatson SA, Pirnay JP, Ochsner UA, Vasil ML, et al. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 2004;150:1671–80.
[35] Cuív PO, Clarke P, O'Connell M. Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 2006;152:945–54.
[36] Koebnik R. TonB-dependent trans-envelope signaling: the exception or the rule? Trends Microbiol 2005;13:343–7.
[37] Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, et al. *Pseudomonas* genome database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. Nucleic Acids Res 2011;39:596–600.
[38] Swanson AF, Kuo CC. Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated. Infect Immun 1991;59:2120–5.
[39] Bartels KM, Funken H, Knapp A, Brocker M, Bott M, Bains M, et al. Glycosylation is required for outer membrane localization of the lectin LecB in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2011;193:1107–13.
[40] Funken H, Bartels KM, Wilhelm S, Brocker M, Bott M, Bains M, et al. Specific association of lectin LecB with the surface of *Pseudomonas aeruginosa*: role of outer membrane protein OprF. PLoS One 2012;7:e46857. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046857.
[41] Nothaft H, Szymanski CM. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. Nat Rev Microbiol 2010;8:765–78.
[42] Azghani AO, Idell S, Bains M, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. Microb Pathog 2002;33:109–14.
[43] Sriramulu DD, Lünsdorf H, Lam JS, Römling U. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. J Med Microbiol 2005;54:667–76.
[44] Wagner VE, Frelinger JG, Barth RK, Iglewski BH. Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. Trends Microbiol 2006;14:55–8.
[45] Arhin A, Boucher C. The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin. Microbiology 2010;156:1415–23.

[46] Yamano Y, Nishikawa T, Komatsu Y. Cloning and nucleotide sequence of anaerobically induced porin protein E1 (OprE) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microbiol 1993;8:993–1004.
[47] Saravolac EG, Taylor NF, Benz R, Hancock RE. Purification of glucose-inducible outer membrane protein OprB of *Pseudomonas putida* and reconstitution of glucose-specific pores. J Bacteriol 1991;173:4970–6.
[48] Wylie JL, Worobec EA. Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* glucose-selective OprB porin gene and distribution of OprB within the family *Pseudomonadaceae*. Eur J Biochem 1994;220:505–12.
[49] Wylie JL, Worobec EA. The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1995;177:3021–6.
[50] Williams SG, Greenwood JA, Jones CW. The effect of nutrient limitation on glycerol uptake and metabolism in continuous cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 1994;140:2961–9.
[51] Adewoye LO, Worobec EA. Multiple environmental factors regulate the expression of the carbohydrate-selective OprB porin of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol 1999;45:1033–42.
[52] Putrinš M, Ainelo A, Ilves H, Hõrak R. The ColRS system is essential for the hunger response of glucose-growing *Pseudomonas putida*. BMC Microbiol 2011;11:170.
[53] Kivistik PA, Putrins M, Püvi K, Ilves H, Kivisaar M, Hõrak R. The ColRS two-component system regulates membrane functions and protects *Pseudomonas putida* against phenol. J Bacteriol 2006;188:8109–17.
[54] Zweers JC, Wiegert T, van Dijl JM. Stress-responsive systems set specific limits to the overproduction of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol 2009;75:7356–64.
[55] Ernst RK, Adams KN, Moskowitz SM, Kraig GM, Kawasaki K, Stead CM, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. J Bacteriol 2006;188:191–201.
[56] King JD, Kocíncová D, Westman EL, Lam JS. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Innate Immun 2009;15:261.
[57] Li Y, Powell DA, Shaffer SA, Rasko DA, Pelletier MR, Leszyk JD, et al. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:8716–21.
[58] Shah NR, Albitar-Nehme S, Kim E, Marr N, Novikov A, Caroff M, et al. Minor modifications to the phosphate groups and the C3′ acyl chain length of lipid A in two *Bordetella pertussis* strains, BP338 and 18–323, independently affect Toll-like receptor 4 protein activation. J Biol Chem 2013;288:11751–60.
[59] Kawasaki K, Manabe T. Latency of the lipid A deacylase PagL is involved in producing a robust permeation barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica*. J Bacteriol 2010;192:5837–40.
[60] Bengoechea JA, Brandenburg K, Seydel U, Díaz R, Moriyoń I. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* show increased outer membrane permeability to hydrophobic agents which correlates with lipopolysaccharide acyl-chain fluidity. Microbiology 1998;144:1517–26.
[61] Bengoechea JA, Brandenburg K, Arraiza MD, Seydel U, Skurnik M, Moriyón I. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains increase the outer membrane permeability in response to environmental stimuli by modulating lipopolysaccharide fluidity and lipid A structure. Infect Immun 2003;71:2014–21.
[62] Kingston AW, Subramanian C, Rock CO, Helmann JD. A σW-dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity. Mol Microbiol 2011;81:69–79.
[63] Vakorina TI, Novikova OD, Krasikova IN, Naberezhnykh GN, Solov'eva TF, Ovodov YS. Interaction of porin from *Yersinia pseudotuberculosis* with different structural forms of endogenous lipopolysaccharide. Biochemistry 2003;68:976–83.
[64] Freulet-Marrière MA, El Hamel C, Chevalier S, Dé E, Molle G, Orange N. Evidence for association of lipopolysaccharide with *Pseudomonas fluorescens* strain MF0 porin OprF. Res Microbiol 2000;151:873–6.
[65] El Hamel C, Freulet MA, Jaquinod M, Dé E, Molle G, Orange N. Involvement of the C-terminal part of *Pseudomonas fluorescens* OprF in the modulation of its pore-forming properties. Biochim Biophys Acta 2000;1509:237–44.
[66] Baboolal TG, Conroy MJ, Gill K, Ridley H, Visudtiphole V, Bullough PA, et al. Colicin N binds to the periphery of its receptor and translocator, outer membrane protein F. Structure 2008;16:371–9.
[67] Qu J, Behrens-Kneip S, Holst O, Kleinschmidt JH. Binding regions of outer membrane protein A in complexes with the periplasmic chaperone Skp. A site-directed fluorescence study. Biochemistry 2009;48:4926–36.
[68] Munford RS, Hall CL, Lipton JM, Dietschy JM. Biological activity, lipoprotein-binding behavior, and in vivo disposition of extracted and native forms of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides. J Clin Invest 1982;70:877–88.
[69] Geurtsen J, Steeghs L, Hamstra HJ, Ten Hove J, de Haan A, Kuipers B, et al. Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of *Bordetella pertussis*. Infect Immun 2006;74:5574–85.
[70] Rutten L, Geurtsen J, Lambert W, Smolenaers JJ, Bonvin AM, de Haan A, et al. Crystal structure and catalytic mechanism of the LPS 3-O-deacylase PagL from *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:7071–6.
[71] Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. Nat Immunol 2002;3:354–9.
[72] Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. J Biol Chem 2004;279:20044–8.
[73] Cigana C, Curcurù L, Leone MR, Ieranò T, Lorè NI, Bianconi I, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. PLoS One 2009;4:e8439.
[74] Manterola L, Moriyón I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MH, et al. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. J Bacteriol 2005;187:5631–9.
[75] Bishop RE. Structural biology of membrane-intrinsic beta-barrel enzymes: sentinels of the bacterial outer membrane. Biochim Biophys Acta 2008;1778:1881–96.
[76] Manabe T, Kawano M, Kawasaki K. Mutations in the lipid A deacylase PagL which release the enzyme from its latency affect the ability of PagL to interact with lipopolysaccharide in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Biochem Biophys Res Commun 2010;396:812–6.
[77] Jordan S, Hutchings MI, Mascher T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Rev 2008;32:107–46.
[78] Raivio TL. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. Mol Microbiol 2005;56:1119–28.

Article 2 : L'absence du facteur sigma SigX entraine la dérégulation de la voie Crc/Hfq/CbrAB chez *P. aeruginosa*.

En accord avec la littérature, des études menées au laboratoire ont révélé que la croissance du mutant *sigX* est fortement altérée lorsque la bactérie est cultivée en milieu riche LB et restaurée en milieu minimum M9 contenant du glucose comme seule source de carbone. Le LB étant un milieu non défini dans lequel les peptides de petite taille et les acides aminés constituent la source majoritaire de carbone, nous avons supposé que le défaut de croissance du mutant *sigX* pouvait être lié à une altération des voies métaboliques. Par des analyses transciptomique et protéomique conduites en LB, nous avons observé que chez le mutant *sigX*, le système à deux composants CbrAB, impliqué dans le contrôle du métabolisme du carbone et de l'énergie, est actif et conduit à la diminution de l'activité des répresseurs traductionnels Crc et Hfq. De manière intéressante, la supplémentation du milieu LB avec le détergent polysorbate 80 restaure la croissance et l'expression des gènes dérégulés chez le mutant *sigX*. Ces résultats suggèrent que l'altération du métabolisme pourrait être liée à une perturbation des membranes due à l'absence de SigX.

Dans cette étude, j'ai réalisé la validation du transcriptome par qRT-PCR, l'analyse protéomique ainsi que le dosage des ARNm en présence de polysorbate 80 par qRT-PCR.

The absence of SigX sigma factor results in dysregulation of the Crc/Hfq/CbrAB networks in *Pseudomonas aeruginosa*

Maud Fléchard[1°], Rachel Duchesne[1°], Emeline Bouffartigues[1], Gwendoline Gicquel[1], Julie Hardouin[2], Manuella Catel-Fereira[1], Olivier Maillot[1], Nicole Orange[1], Marc G. J. Feuilloley[1], Éric Déziel[3], Pierre Cornelis[1] and Sylvie Chevalier[1].

[1]Normandie Université, Université de Rouen, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Micro-environnement, LMSM EA 4312 (France)
[2]Normandie Université, Université de Rouen, Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, PBS, UMR 6270 CNRS, (France)
[3]INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec (Canada)

***Correspondent footnote**. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie « Signaux et Micro-environnement », 55 rue St Germain-27000 Evreux. France.
Phone: (+33) 2.32.29.15.60. Fax: (+33) 2.32.29.15.50.
E-mail: sylvie.chevalier@univ-rouen.fr

° These two authors contributed equally to this manuscript.

Running Title: Membrane alterations and nutritional stress response
Key words: SigX, CbrA/B, Hfq, Crc.

Abstract

The extracytoplasmic sigma factor SigX is a master regulator of bacterial adaptation that is involved in fatty acids biosynthesis, membrane homeostasis and fluidity in *P. aeruginosa*. In previous studies, the growth of the *sigX* mutant was shown to be strongly affected in LB broth, but not in M9-glucose minimal medium. Through comparative transcriptomics and proteomics conducted in LB medium, we show that the absence of SigX results in strong dysregulation of genes, the products of which are mainly involved in carbon and energy metabolisms. The CbrA/B two component system was active in the *sigX* mutant, leading to a higher production of *crcZ* and a reduced activity of the translational repressors Hfq and Crc compared to the wildtype strain. In addition, transcription of *crc* was found to be down-regulated in the mutant strain. Altogether, these data suggest that the *sigX* mutant encounters strong metabolic alterations leading to a reduced carbon catabolic repression response (CCR) compared to H103 wildtype strain. Remarkably, growth as well as genes, the expression of which was dysregulated in the mutant strain, were restored when the C18Δ9-structurally related detergent Polysorbate 80 was supplemented to LB medium. Taken together, our data suggest that the metabolic alterations could be related to the membrane perturbations due to the absence of SigX, linking thus possibly membrane homeostasis and CCR in *P. aeruginosa*.

Introduction

Pseudomonads constitute a diverse and ecologically successful group of γ-Proteobacteria present in many environments, which are exposed to numerous stressors including physico-chemical modifications of their microenvironment as well as strong changes in nutrient availability (Spiers *et al*., 2000). *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing infections in immunocompromised persons and the main etiological agent of chronic infections worsening the state of health of cystic fibrosis patients (Bodey, 1983). In addition to the housekeeping sigma factor σ70, which directs most of the transcription during the exponential growth and in absence of any environmental stress, bacteria possess multiple alternative sigma factors that they activate in response to specific stimuli (Gruber & Gross, 2003; Potvin *et al*., 2008). Since the cell envelope is in direct contact with the bacterial microenvironment, it is the first structure required to sense environmental changes, triggering thus adaptive and stress responses.

P. aeruginosa genome contains 19 alternative sigma factors of the extracytoplasmic function (ECF) family, most of which are predicted or proven to be part in siderophore uptake, reflecting the importance of iron in the bacterial metabolism (Potvin *et al*., 2007; Llamas *et al*., 2008; Cornelis *et al*. 2009). The ECF sigma factor SigX is a master regulator of bacterial adaptation that impacts more than 300 genes, among which genes involved in adaptation/protection, heat shock response, chemotaxis, motility/attachment, virulence and virulence-associated genes linked to the protein secretion/export apparatus or secreted factors (Brinkman *et al*., 1999; Bouffartigues *et al*., 2012; Gicquel *et al*., 2013; Blanka *et al*., 2014; Schultz *et al*., 2015). SigX is involved in modulation of fatty acid and phospholipid metabolisms in *P. aeruginosa* PA14 (Boechat *et al*., 2013; Blanka *et al.,* 2014; Schultz *et al*., 2015), and high levels of SigX result in "swollen" cells that contain higher amounts of shorter chain fatty acids and have a more fluid membrane (Boechat *et al*., 2013). Interestingly, SigX shares 49% similarity with SigW, a membrane-fluidity homeostasis regulator of the Gram-positive *Bacillus subtilis* induced by factors that affect cell wall biosynthesis (Kingston *et al*., 2010) and that belongs to the ECF01 subfamily as proposed by Staron *et al*. In this bacterium SigW is involved in changing the branched-to-linear fatty acid ratio, favoring a less fluid membrane (Kingston *et al*., 2010). Altogether, these studies comfort SigX as a master regulator of membrane homeostasis and fluidity.

We made the puzzling observation in previous studies that the growth of *P. aeruginosa sigX* mutants was severely affected in LB broth, but not in M9-glucose minimal medium (Gicquel *et al*., 2013; Duchesne *et al*., 2013). Whereas the M9-glucose minimal medium contains glucose as sole carbohydrate source, the rich undefined LB medium contains a mixture of compounds among which the most abundant carbon sources are small peptides and amino acids brought by bactotryptone, as well as dicarboxylic acids such as succinate (Sezonov *et al*., 2007). LB is known to generate a strong carbon catabolite repression response (CCR) during exponential growth (Yuste and Rojo, 2001). This important regulatory network controlling carbon metabolism facilitates the hierarchical and sequential use of carbon sources when the growth medium contains several at non-growth-limiting concentrations. This response system directs nutrient flux through the most appropriate metabolic pathway (Deutscher *et al*., 2008; Görke and Stülke, 2008; Moreno *et al*., 2010). In case of Pseudomonads, growth in LB strongly inhibits the expression of genes involved in the assimilation of less-preferred carbon sources, such as *n*-alkanes, toluene, xylene, phenol or benzoate (Moreno *et al*., 2010). When provided as mixtures in a defined medium, amino acids exert a clear CCR effect over the assimilation of sugars and hydrocarbons (Yuste *et al*., 1998; Hester *et al*., 2000). Branched chain amino acids are less preferred than succinate, glucose or amino acids like glutamine, asparagine, aspartate, alanine, or glutamate (Hester *et al*., 2000;

Moreno *et al*., 2009b; Frimmersdorf *et al*., 2010; Behrends *et al*., 2013). In *P. aeruginosa*, CCR is thought to be elicited mainly through a regulatory system based on the Crc and Hfq proteins, and the small non coding (snc)RNA *crcZ* that antagonizes the effects of these regulatory proteins (Sonnleitner *et al*., 2009; Sonnleitner and Bläsi, 2014). Crc and Hfq are post transcriptional regulators that work together to inhibit translation of specific mRNAs that contain an A-rich sequence motif close to the translation initiation site, to which Hfq binds with the help of Crc (Moreno *et al*., 2009; Sonnleitner and Bläsi, 2014). The sncRNA *crcZ* is a direct target of CbrB, which is the transcriptional regulator of the two component system CbrAB that is required for expression of several amino acids catabolic and transport pathways (Nishijyo *et al*., 2001). The level of *crcZ* is inversely proportional to the strength of the CCR effect. When CCR is not needed, *crcZ* forms a complex with Hfq and possibly Crc as well, that renders these proteins unavailable to repress translation initiation (Sonnleitner *et al*., 2014). The strong repression exerted by the Crc/Hfq system during exponential growth in LB medium ceases when the cells reach the stationary phase (Yuste and Rojo, 2001).

Here we carried out comprehensive and comparative global approaches including transcriptomics, proteomics, and qRT-PCR, to get insights into the growth limitation of *P. aeruginosa sigX* mutant in LB medium. Since SigX is involved in membrane homeostasis and fluidity that are required to fulfil important physiological functions including nutriments uptake, we raised the hypothesis that SigX mutant growth alterations observed in LB medium could be linked to changes in some metabolic pathways.

Results and Discussion

The absence of SigX results in strong expression dysregulation of transporters-encoding genes and metabolic pathways.

A transcriptomic analysis based on the comparison of *P. aeruginosa* H103 and its isogenic *sigX* mutant strain PAOSX grown in LB rich medium was performed. In this condition, a total of 762 genes ($p < 0.05$ by Empirical Bayes statistical test, fold change > 2) were differentially expressed, indicating that SigX has a global impact on gene expression during growth in LB, affecting about 15% of H103 genome (Supplementary Table S1). These data are in line with previous studies made on PAOSX grown in M9-glucose minimal medium (Gicquel *et al*., 2013), and others that were conducted on a PA14 *sigX* mutant strain in LB (Blanka *et al*., 2014; Schulz *et al*., 2015). Sixteen genes were selected for validation by qRT-PCR. The comparison of expression data from microarrays and qRT-PCR demonstrated a very good correlation between the two datasets with a Pearson correlation coefficient of 0.83 (Supplementary Figure S1). Of these genes, 339 were down-regulated while 423 were up-regulated, suggesting that a large share of these differences was due to indirect effects of SigX. Based on PseudoCAP analysis (Winsor *et al*., 2016), one of the most striking result is the expression variation of numerous genes, the products of which are involved in several classes related to metabolism, i.e. carbon compound catabolism (9.6 %), amino acids (6.3 %), fatty acids (2.1 %), energy (5.8 %), and central metabolism (4.7 %), and ii) to transport of small molecules (11.2 %), and membrane proteins (9.6 %) (Figure 1, Table S1). Since some of these alterations could explain the mutant strain growth defects in LB, we choose to focus subsequent analyses on selected genes from these principal categories (Table 1).

Transporters of small molecules and membrane proteins.

The expression of 52 membrane transporters or transport-associated proteins was affected in PAOSX *sigX* mutant compared to H103 wildtype strain (Table 1), including porins, outer membrane (OM) receptors, carboxylic acid-, sugar- and amino acid- inner membrane (IM) transporters. Noticeably, expression of genes encoding the specific porins

OprB, OprE, OprH, OpdC, as well as the nicotianamine TonB-dependent receptor OprC (Gi *et al*., 2015), was strongly reduced by 2 to 7.7 fold (Table 1). Similar data have been previously reported when PAOSX was grown in M9-glucose medium (Duchesne *et al*., 2013; Gicquel *et al*., 2013). Conversely, genes encoding OpdQ (a putative nitrate transporter; Fowler & Hanson, 2015) and OpdP (also called OpdD, a glycine-glutamate dipeptide transporter) were increased by 14.8 and 3.2 fold, respectively in the *sigX* mutant strain compared to H103. Expression of many carboxylic acids, carbohydrates and amino acids inner membrane transporters was also dysregulated. For example, the malonate transporter MadL/MadM, and the dicarboxylic acid transporter PcaT encoding genes were strongly increased in the *sigX* mutant. This was noticeably also the case of genes, the products of which are involved in these substrates metabolization (PA0208-PA0214 and PA0226-PA0235, respectively, Table 1, see section carbon metabolism). By contrast, genes encoding DctA and PA4616, a C_4-dicarboxylate transporter of the DctP family were drastically reduced in the *sigX* mutant (Table 1). Two operons were up-regulated in PAOSX, among which PA1946-PA1948 and PA2338-PA2341, encoding components of a ribose transporter and mannose/mannitol transporters, respectively. Conversely, expression of PA3187-PA3190 operon, to which belongs the sugar specific OprB porin (PA3186) was down-regulated. Several genes coding for ABC transporters components were increased, including the amino acids selective transporters encoding genes *agtAB*, *aatPJ*, *braCG*, PA5094-PA5099, PA5153 (Table 1), and *opuC* coding for a glycine betaine transporter involved in osmoprotection (Table 1). Taken together, expression of many OM specific porins as well as IM transporters encoding genes were dysregulated in the *sigX* mutant strain compared to H103

Metabolic genes expression dysregulation.

A large set of genes up- or down- regulated in the *sigX* mutant belonged to the fatty acids, amino acid or other central metabolic pathways, suggesting global and drastic changes in the physiology of the *sigX* mutant. According to previous data (Blanka *et al*., 2014; Schulz *et al*., 2015), the PAOSX *sigX* mutant was strongly altered in expression of genes belonging to *de novo* fatty acids biosynthesis pathway (Table 1). This was particularly the case for genes that are involved in the first steps of this pathway, namely in the conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA, which are markedly decreased in PAOSX, with up to more than 10 fold lower expression levels compared to H103 WT, as in the cases of PA0493 and PA5436. This result was confirmed at the protein level for several members of this pathway, such as FabH1 (PA0999) and FabY (PA5174) (Table 1, Fatty acid metabolism section), consistent with previous studies performed on a PA14 *sigX* mutant, on which ChIP on chip assays combined with RNAseq (Blanka *et al*., 2014; Schulz *et al*., 2015) or proteomic data (Boechat *et al*., 2013) led to the conclusion that at least some of these genes may be direct targets of SigX.

Most genes belonging to the amino acids metabolism functional class were up-regulated, suggesting an indirect effect of SigX on these genes (Table 1). Strikingly, many operons encoding enzymes belonging to the degradation of the branched amino acids leucine, valine and isoleucine into 3-methylbutanoyl-CoA, isobutyryl-CoA or (S)-2-methyl-butanoyl-CoA, respectively, were strongly up-regulated. Expression of genes, the products of which are involved in transport and conversion of L-leucine to acetyl-CoA was increased (*bra*, *bdb*, *liu* operons). Under aerobic conditions, arginine is transported into cells via an ABC transporter system encoded by the *aotJQMP* genes (Nishijyo *et al*., 1998) and is converted into glutamate via the arginine succinyltransferase pathway encoded by the *aruCFGDBE* operon (Itoh, 1997). Both the *aot* and *aru* operons, as well as *argR*, encoding their transcriptional regulator, were strongly increased in the *sigX* mutant strain compared to the wildtype strain. The *hutUHIG* operon, which encodes enzymes for the degradation of histidine into glutamate and formamide (Zhang & Rayney, 2007) was also increased in the *sigX* mutant (Table 1). As

indicated above, the inner membrane nutriment transporters associated to these metabolic pathways were similarly and accordingly dysregulated.

Anthranilate is an important intermediate for the synthesis of tryptophan and the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS; 2-heptyl-3-hydroxyl-4-quinolone), and degradation of aromatic compounds, such as tryptophan toward the tri-carboxylic acid (TCA) cycle in *Pseudomonas* spp. (Choi *et al*., 2011; Pesci *et al*., 1999; Phillips *et al*., 2011). In *P. aeruginosa*, anthranilate is synthesized from chorismate by anthranilate synthases, or alternatively supplied by the degradation of tryptophan through the kynurenine pathway (Farrow and Pesci, 2007). Here we observed that the anthranilate synthase gene *trpE* was increased (Table 1, see the section carbon metabolism, Figure 2) while the kynurenin pathway remained unaffected in the *sigX* mutant (data not shown). The *phzD2, phzC2-phzG2* were increased at the gene, but strongly decreased at the protein level, and *phnAB* were down-regulated in PAOSX suggesting that chorismate may be used primary for anthranilate rather than phenazine production. The degradation of anthranilate in *Pseudomonas* spp. is achieved by anthranilate dioxygenase complex (*antABC* operon), which is involved in the conversion of anthranilate to catechol (Chang *et al*., 2003; Urata *et al*., 2004). Catechol is also a product of the benzoate degradation pathway (*xyl* operon). Catechol is then metabolized by *cat* and *pca* gene products to produce TCA components among which acetyl-CoA. One of the most striking data of both the transcriptomic and the proteomic studies is the large overproduction of the *ant, cat*, *pca* and *xyl* operons (Table 1, Figure 2). In parallel, the *pqs* operon was strongly reduced suggesting that anthranilate may be used primary for TCA cycle feeding. Moreover, genes, the products of which are involved in several metabolic pathways leading to produce acetyl-coA were strongly increased: this was the case for the *mdcABCDEGH* and *acsAB* operons, the products of which are involved in converting malonate or acetate, respectively into acetyl-CoA (Figure 2). Similarly, genes that belong the branch chain amino acids degradation pathway (*bra, liu, bkd, mms* operons) and *atoB,* the products of which are involved in acetyl-coA production, were globally up-regulated in the *sigX* mutant, (Table 1, Figure 2). Likewise, all the *ant* genes of the anthranilate degradative pathway are considerably up-regulated, suggesting that in PAOSX, anthranilate may be mainly used for energy production through the TCA cycle.

In the Energy metabolism functional class, up- and down-regulated genes were both well represented. Interestingly, the genes encoding the membrane respiratory nitrate reductase (*narIG*), the nitrite extrusion proteins (*narK1K2*) and the *narXL* two component system were drastically down-regulated (Table 1). This was also the case for the *ccoNOPQ-2* gene cluster (PA1555-PA1557), encoding the cytochrome Cbb3-2 oxidase, which is up-regulated under low oxygen conditions (Comolli *et al*., 2004; Kawakami *et al*., 2010), and was down-regulated by 2.6 to 5.2 fold in the PAOSX mutant compared to H103. Conversely, the genes coding for the periplasmic nitrate reductase Nap (PA1172-PA1177), and the *cox* (PA0105-PA108) operon encoding the Aa3 cytochrome *c* oxidase which play a dominant role under high oxygen conditions (Kawakami *et al*., 2010), were between 9.4 and 15.7 fold up-regulated in the *sigX* mutant (Table 1). These data suggest that expression of genes involved in the aerobic respiration pathway was increased in the absence of SigX.

Taken together, our data suggest a strong dysregulation of genes, the product of which are involved in carbon and energy metabolisms. Noticeably, many of these genes were up-regulated in the *sigX* mutant, suggesting they would be part of a regulatory cascade, reflecting a compensation of an impairment due to *sigX* deletion. In Bacteria, the uptake and utilization of carbon compounds is controlled in a hierarchical manner by carbon catabolite repression (CCR). Generally speaking, CCR prevents the utilization of less preferred carbon sources until the preferred one is consumed. In most studied *Pseudomonas* spp. the presence of

organic acids (for example succinate) results in CCR, which leads to repression of catabolic genes required for the consumption of other carbon sources. In pseudomonads, CCR is thought to be elicited mainly through a regulatory system based on Crc and Hfq together with the CbrAB target *crcZ*, a small RNA which is reported to antagonize the effects of these regulatory proteins (Sonnleitner & Bläsi, 2014; Madhushani *et al.,* 2015; Moreno *et al*., 2015). Since LB medium is known to elicit a strong CCR (Hester *et al*., 2000; Yuste & Rojo, 2001; Morales *et al*., 2004; La Rosa *et al*., 2016), the involvement of these regulatory networks in the *sigX* mutant strain was then investigated.

The absence of SigX results in alterations of Crc, Hfq and CbrAB regulatory networks.

Reduced expression and activity of the carbon catabolic regulator Crc in the PAOSX mutant strain. CCR is regulated at least partly in *P. aeruginosa* by the Crc regulator (Moreno *et al*., 2009b; Linares *et al*., 2010; Fonseca *et al*., 2013; Sonnleitner *et al*., 2012). In *P. putida*, it was recently found to regulate the central metabolism fluxes contributing to organize and optimize metabolism and growth (La Rosa *et al*., 2015; 2016). In this study, the *crc* gene (PA5332) was about 2 fold lower expressed in PAOSX compared to H103, a result that was confirmed by qRT-PCR (Table 1, Figure 3). Interestingly, PAOSX expression profile exhibits several similitaries with that of a *crc* mutant of *P. aeruginosa* (Sonnleitner *et al*., 2012), or *P. putida* (Fonseca *et al*., 2013) during growth in LB broth (Table 1, Crc). It has been shown that inactivation of *crc* modifies the expression of at least 43 genes in *P. putida* (Moreno *et al*., 2009a), and 57 in *P. aeruginosa* (Sonnleitner *et al*., 2012), among which many are involved in the transport and assimilation of amino acids and sugars, or in energy metabolism. In our conditions, 48 of these Crc-regulated genes were significantly affected in the *sigX* mutant strain. Table 1 shows that most of these genes were taking part in systems for the transport of glutamate or derivatives (porins OpdP, OpdQ) and aspartate (*aat* genes), branched-chain (*braC*) and aromatic (*aroP2*) amino acids, and organic acids (OpdH porin). The stronger expression of these transport systems is paralleled by that of genes involved in the assimilation of valine, leucine and isoleucine (*bkdA1A2B, lpdV, liuABCD*), phenylalanine and tyrosine (*phhAB* and *hpd*). In *P. putida*, expression of *aatP* and *prpC*, is known to be inhibited by Crc in cells growing exponentially in LB (Morales *et al*., 2004; Moreno *et al*., 2009a). In PAOSX *sigX* mutant strain, both *aatP* and *prpC* genes were increased by about 2.6 and 6.1 fold, respectively. Expression of *acsA* (acetyl-CoA synthetase) and *aroP2* (aromatic amino acid uptake protein) is reduced in the *sigX* mutant, as well as in the *P. aeruginosa crc* mutant (Sonnleitner *et al*., 2012). Crc was previously shown to stimulate expression of the low affinity C_4-dicarboxylate transporter DctA transporter system. Noticeably, the C_4-dicarboxylate succinate and fumarate are among the preferred carbon sources for *P. aeruginosa* (Valentini & Lapouge, 2013). Interestingly, *dctA* (PA1183) was strongly down-regulated in PAOSX, in agreement with the lower expression of *crc*. Finally, Crc was shown to mediate catabolite repression of *amiE*, which encodes a short-chain aliphatic amidase and has previously served as a reporter gene for CCR (Sonnleitner *et al*., 2009). Since *amiE* expression was strongly increased at both the mRNA and protein levels (Table 1), our data support that Crc-based regulation was strongly reduced in the *sigX* mutant compared to H103 wildtype strain, at least when grown in LB medium.

Crc regulates gene expression post-transcriptionally (Moreno *et al*., 2009b, Fonseca *et al*., 2013). However, initially deemed to act as a translational regulator, repressing functions involved in uptake and utilization of carbon sources (Moreno *et al*., 2007; 2009; Linares *et al*., 2010), Crc was recently shown to be devoid of RNA binding activity (Milojevic *et al*., 2013). Crc was indeed unable to bind RNA in the absence of the regulator Hfq (Milojevic *et al*., 2013; Moreno *et al*., 2015), indicating that Crc and Hfq may cooperate in catabolite repression (Moreno *et al*., 2015).

Hfq repressor activity is lowered in PAOSX mutant strain. In *P. aeruginosa* PAO1, the RNA chaperone Hfq was identified as the main post-transcriptional regulator of CCR (Sonnleitner & Bläsi, 2014). A transcriptomic analysis of a *hfq* mutant strain revealed that 15% of all genes of *P. aeruginosa* PAO1 were de-regulated, among which a number of genes encoding proteins involved in carbon compound catabolism, which were up-regulated in the absence of Hfq (Sonnleitner *et al*., 2012). Interestingly, 62 genes that were dysregulated in a *hfq* mutant were also altered in PAOSX, at the transcriptomic level and for several genes products also at the proteomic level (Table 1, Hfq). Among them, Crc/Hfq regulated genes which are mainly involved in amino acids metabolism, have been identified (Moreno *et al*., 2009; Browne *et al*., 2010, Sonnleitner *et al*., 2012), and most of them were increased in the PAOSX *sigX* mutant strain (Table 1). Forty-two genes included in the carbon metabolism category (Table 1) that were over-expressed in the *hfq* mutant strain (Sonnleitner *et al*., 2006; Sonnleitner & Bläsi, 2014), were also strongly increased in the *sigX* mutant strain (Table 1). This was particularly clear in case of *ant, cat, xyl* operon for which the enhanced expression was ranging between 3 (*xylZ*) and 5 (*antB*) fold in terms of mRNA, and between 5.4 (AntC) and 25.5 (CatA) fold in terms of protein (Table 1). This was also observed in case of *amiE*, encoding an aliphatic amidase that is used as CCR reporter (Sonnleitner & Bläsi, 2014), which was increased by more than 8 fold at the mRNA level, and 2.6 fold at the protein level in the *sigX* mutant compared to *P. aeruginosa* wildtype strain H103 (Table 1). Since *hfq* transcription was not modified (data not shown), our results suggest that Hfq activity might be lowered. Since reduced activity of both Crc and Hfq seemed to occur in the PAOSX *sigX* mutant strain, this prompted us to investigate CbrAB activity leading to the sncRNA *crcZ* production. The regulatory RNA *crcZ*, the transcription of which is augmented when CCR is alleviated, binds indeed to the RNA chaperone Hfq with high affinity in *P. aeruginosa* PAO1, preventing thus post transcriptional regulation on target mRNAs (Sonnleitner & Bläsi, 2014).

The CbrAB regulatory system is active in the *sigX* mutant strain. Our microarray data revealed that a large number of genes known to be transcriptionally down-regulated in a *cbrB* mutant of *P. aeruginosa* during growth in LB broth (Sonnleitner *et al.,* 2012), are globally up-regulated in PAOSX *sigX* mutant strain (Table 1, CbrAB). This was the case for example of the *hut* operon and the histidine catabolic genes (PA5091 to PA5100) (Figure 3, Table 1), suggesting the CbrAB pathway to be active in the *sigX* mutant. Since expression of *crcZ* was shown to be a good proxy of CbrAB activity (Sonnleitner *et al*., 2009; Filiatrault *et al*., 2013), we next assayed *crcZ* transcription by qRT-PCR. As shown in Figure 3, *crcZ* was about two fold up-regulated in PAOSX compared to H103. In addition, the *pha* genes, the products of which allow bacteria to store excess carbon into the carbon-storage polyhydroxyalkalonates (PHA)-granules (Rojas-Rosas *et al.*, 2007), are markedly up-regulated in the *sigX* mutant (Table 1). PHA are produced by various bacteria as intracellular carbon and energy storage materials under nutrient-limitation conditions in the presence of excess carbon sources (Chen *et al.,* 2006), and their synthesis was shown to be inhibited by the Crc/Hfq system during exponential growth (La Rosa *et al*., 2014). Our data thus suggest that PAOSX *sigX* mutant may undergo a high C/N ratio. Consistently, CbrAB was shown to be activated in the presence of non-preferred carbon sources or a high C/N ratio (Nishijyo *et al*., 2001; Zhang & Rainey, 2007).

Taken together, our data suggest strong metabolic regulatory pathways alterations leading to a reduced CCR in the *sigX* mutant compared to H103 wildtype strain. In particular, the CbrA/B system was found to be activated in the *sigX* mutant, leading to a higher production of *crcZ* which in turn would sequester the translational repressors Hfq and Crc

when the mutant is grown in LB medium. In addition, transcription of *crc* was found to be down-regulated in the mutant strain. As indicated elsewhere, these metabolic alterations in PAOSX are not reflects of a direct effect exerted by *sigX*, but rather represent an adaptive process of the mutant strain, as a compensation of some "collateral" alterations due to *sigX* deletion.

SigX mutant metabolic networks dysregulation are restored by polysorbate 80 supplementation.

Polysorbate 80 restores *sigX* mutant growth. Recent data have shown that SigX is involved in *de novo* fatty acids biosynthesis and in membrane fluidity (Boechat *et al*., 2013; Blanka *et al*., 2014; Schultz *et al*., 2015). Noticeably, this is also the case for σW, an ECF sigma factor of *Bacillus subtilis*, which shares strong similarity with SigX (Kingston *et al*., 2011; Gicquel *et al*., 2013). Since a change in membrane fluidity may have an impact on the anchoring and/or activity of some membrane transporters involved in nutrient uptake, we followed the growth of the H103 wildtype strain and its *sigX* mutant PAOSX in LB broth supplemented with molecules known to destabilize the bacterial envelope due to their detergent properties. Polysorbate 80 (also called Tween 80) and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) can be used to allow the uptake of some nutrients by microorganisms unable to transport them, as it is the case for the transport of glucose in the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Briczinski *et al*., 2008). The moderate destabilization of the bacterial envelope caused by the low detergent concentrations that do not alter the bacterial growth should result in an increased nutrient intake, but in a non-specific way. So, if PAOSX growth defect in LB is due to a decreased nutrient transport, the supplementation with low concentrations of detergent should, at least partially, restore a wild-type growth phenotype. As shown in Figure 4 the growth of PAOSX in LB is strongly affected compared to that of H103 wildtype strain. Remarkably, PAOSX growth is markedly improved by the presence of either of the two molecules tested (Figures 4A, 4B), and even totally restored to wild-type level in the presence of polysorbate 80 (Figure 4A). These data suggest that either i) Tween 80 is a preferred carbon source for *P. aeruginosa*, ii) it increases its membrane permeability, and/or iii) it inserts into *P. aeruginosa* membrane and modifies its properties. It has been previously shown that in addition to being detergents, SDS and polysorbate 80 are efficient carbon sources for PAO1 (Klebensgerger *et al*., 2006). Nevertheless, whether acting by permeabilizing the cell envelope or by being a nutrient consumed by the bacteria, the ability of SDS and polysorbate 80 to restore the growth of PAOSX in LB strongly suggests that the *sigX* mutant strain nutrient supply is impaired. Since polysorbate 80 confers a full restoration of PAOSX growth, we decided to focus on this detergent in further assays. Noticeably, polysorbate 80 harbours an esterified long-chain fatty acid in its hydrophobic part, which is structurally related to C18Δ9 (= C18ω7) fatty acid, a component that was found to be lowered in a *sigX* mutant strain, while being a major component of the total fatty acids membrane composition of the wildtype strain (Boechat *et al*., 2013; Blanka *et al*., 2014).

Polysorbate 80 restores Crc/Hfq-dependent catabolite repression in the *sigX* mutant strain. To investigate the effect of polysorbate 80 on Crc/Hfq/CbrAB networks activity, we then assayed the expression of some target genes (Table 1). Remarkably, growing PAOSX *sigX* mutant in LB medium supplemented with polysorbate 80 to LB led to restore the expression level of each target gene to the wildtype level (Figure 5), suggesting that polysorbate 80 led to restore at least some of the alterations related to *sigX* mutation. Interestingly, previous studies performed on plant cells showed that fatty acids can be incorporated into phospholipidic membranes from tween-fatty acid esters, and that

polysorbate 80 can partially rescue the phenotype of an *Arabidopsis* mutant impaired in fatty acid synthesis (Terzaghi *et al*., 1989).

Remarkably, many of the genes repressed by Crc and/or Hfq were showing stronger expression when *P. putida* was grown in LB at 10°C compared to 30°C (Fonseca *et al*., 2013). This was noticeably the case for genes encoding proteins that are involved in transport and metabolism of some non-preferred carbon sources, suggesting that Crc-regulation is strongly reduced at low temperature, and thus that catabolite repression may not be as effective at low temperature as compared to 30°C (Fonseca *et al*., 2013). Since cold-induced stress is known to reduce membrane fluidity (Moreno & Rojo, 2014), these data suggest a link between membrane fluidity and catabolite repression, in agreement with our data in this study. Since, bacteria remodel the fluidity of their membrane bilayer precisely via the incorporation of proportionally more unsaturated fatty acids, or fatty acids with analogous properties, (de Mendeza *et al*., 2014), it is conceivable that addition of polysorbate 80 at least partly restores the *sigX* mutant membrane fluidity.

Concluding remarks

SigX is a multifaceted major ECF sigma factor of the RpoE-like family (Gicquel *et al*., 2013) that has been proposed to maintain outer membrane protein (Duchesne *et al*., 2013) and membrane functionality homeostasis (Boechat *et al*., 2013; Blanka *et al*., 2014), in response to signals affecting the envelope integrity (Bouffartigues *et al*., 2012; 2014; 2015). This function is further supported by the fact that the Gram-positive *Bacillus subtilis* ECF sigma factor σW, which shares strong similarity with SigX, is a membrane-fluidity homeostasis regulator (Kingston *et al*., 2011). The absence of SigX results in reduced membrane fluidity, a change that could alter the anchorage and/or the activity of some membrane transporters involved in nutrient uptake. Since CCR is only observed when the preferred carbon source is present at concentrations that do not limit growth, or at least when it is present in excess relative to other nutrients (Moreno *et al*., 2009, Fonseca *et al*., 2013), the reduced membrane fluidity of the *sigX* mutant may account, at least partly, for the reduced carbon catabolite repression. Taken together, these data suggest that SigX is indirectly involved in CCR regulation, possibly via regulation of membrane fluidity. How membrane fluidity can impact on the regulators that are involved in CCR (Crc/Hfq/*crcZ*) is not a trivial question. Interestingly, it has been recently proposed that temperature-induced deformations of the cell membrane may act as allosteric regulators of protein function (de Mendoza *et al*., 2014). Further investigations will now be required to explore such hypothesis.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions. The strains used in this study were *P. aeruginosa* H103 (the prototrophic sequenced isolate strain PAO1) (Hancock *et al*., 1979) and its isogenic *sigX* deletion mutant PAOSX (Gicquel *et al*., 2013). Bacteria were grown aerobically on a rotary shaker (180 rpm) at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth containing 171 mM (10 g. L^{-1}) NaCl, supplemented or not with polysorbate 80 (Tween 80) at 0.1%. Growth was followed by OD_{580} determination.

Microarray: sample preparation, hybridization and data analysis. For transcriptomic analysis, bacteria were grown in LB broth to mid-log phase (OD_{580}=0.4), before RNA extraction. Samples for microarray hybridization were prepared as previously described (Gicquel *et al*., 2013), with minor modifications. Briefly, total RNA was prepared by the hot acid-phenol method as previously described (Bouffartigues *et al.,* 2012). The concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm, and the quality of the RNA was assessed by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000) and checked on a 1.2% agarose gel prior to use. Samples showing A260/A280 and A260/A230 ratios above 2.0 were selected. RNA quality was then assessed with a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Samples having a RIN of 9 were retained. Ten µg of total RNA was used for each replicate with random hexamer primers (Invitrogen) and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) for cDNA synthesis, fragmentation and labelling. Hybridizations were performed at the Genome Québec Innovation Centre (McGill University, Montréal, Canada). Raw data were corrected for background signals using the RMA algorithm and quantile normalization (Irizarry, 2003). Expression levels obtained from three replicates for each condition were compared using the FlexArray 1.3 software. Genes (762) showing a P-value < 0.05 using the Empirical Bayes (Wright & Simon, 2003) algorithm were further considered. Since the RMA algorithm decreases the false positive rate and compresses the fold change, a 2-fold change cut-off value was used for the determination of differentially expressed genes. Expression data for all differentially expressed genes is available in Supplementary Table S1.

Quantitative RT-PCR. Total RNAs were prepared by the hot acid-phenol method as previously described (Bouffartigues *et al*., 2012). Each RNA extraction was tested by PCR for the absence of contaminating DNA prior to reverse transcription. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) experiments were then conducted as previously described (Guyard-Nicodème *et al.,* 2008) using primers listed in Supplementary Table S2. PCR reactions were performed in triplicate and standard deviations were lower than 0.15 CT.

LTQ-orbitrap analyses: sample preparation, protein digestion, tandem mass spectrometry and protein analyses. Bacterial pellets (10^9 CFU.mL^{-1}) were lysed with 20 µL of 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma Aldrich, Lyon, France) and sonicated three times for 5 min at 4°C. Non disrupted membrane aggregates were pelleted by centrifugation (10,000 g, 10 min, 4°C). Supernatants containing soluble proteins were mixed with an equivalent volume of Laemmli 2X running buffer (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Proteins were digested according to the following procedure. Twenty µg of proteins were alkylated with 25 mM iodoacetamide for 45 min in the dark. The protein sample was mixed with SDS loading buffer (63 mM Tris–HCl, pH 6.8, 10 mM DTT, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue, 10% glycerol), then loaded onto a SDS-PAGE stacking gel (7%). A short electrophoresis was performed (10 mA, 15 min). After migration, the gels were stained with Coomassie blue and de-stained with a solution containing 50% ethanol, 10% acetic acid and 40% deionized water. The revealed protein band was excised, washed with water, submitted

to protein digestion with trypsin (2 µg per band). The digestion was achieved overnight at 37°C. Several steps of peptide extraction were performed in H_2O/acetonitrile/trifluoroacetic acid (49.5/49.5/1). The peptides were then dried and stored at -20°C. For tandem mass spectrometry, all experiments were performed on a LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) coupled to an Easy nLC II system (Thermo Scientific). One microliter of sample was injected onto an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Scientific). The separation was performed with an analytical column needle (NTCC-360/100-5-153, NikkyoTechnos, Japan). The mobile phase consisted of H_2O/0.1% formic acid (FA) (buffer A) and CH_3CN/FA 0.1% (buffer B). Tryptic peptides were eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient: from 2 to 40% B over 75 min, from 40 to 80% B in 4 min and 11 min at 80% B. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set at 1.5 kV and 275 °C, respectively. The samples were analyzed using CID (collision induced dissociation) method. The first scan (MS spectra) was recorded in the Orbitrap analyzer (R = 60,000) with the mass range m/z 400–1800. Then, the 20 most intense ions were selected for MS^2 experiments. Singly charged species were excluded for MS^2 experiments. Dynamic exclusion of already fragmented precursor ions was applied for 30 s, with a repeat count of 1, a repeat duration of 30 s and an exclusion mass width of ±10 ppm. Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with collision energy of 35 eV. All measurements in the Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at m/z 445.12002 (polydimethylcyclosiloxane). Raw data were imported in Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics). For comparison, one sample was set as a reference and the retention times of all other samples within the experiment were aligned. After alignment and normalization, statistical analysis was performed for one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. For quantitation, peptide features presenting p-value < 0.05, q-value < 0.05 and power > 0.8 _were retained, and MS/MS spectra from selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science) used against the database restricted to *P. aeruginosa* PAO1. Database searches were performed with the following parameters: 1 missed trypsin cleavage sites allowed; variable modifications: carbamido-methylation of cysteine and oxidation of methionine. For each growth condition, the total cumulative abundance of the protein was calculated by summing the abundances of peptides. Proteins presenting p-value < 0.05, q-value < 0.05 and power > 0.8 were kept. Moreover, proteins with a variation above 2-fold in their average normalized abundances between growth conditions were retained. Expression data for all differentially expressed proteins is available in Supplementary Table S3.

ACKNOWLEDGMENTS

The LMSM is supported by the Région Haute-Normandie (France, GRRs Sésa and IRIB), the Grand Evreux Agglomeration and European FEDER funds.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Functional classes of SigX-regulated genes identified by expression profiling on DNA array. All the genes that had a significant difference in expression between wildtype and mutant strains (Fold change ≥2, p-value ≤0.05 as determined by Empirical Bayes) were included and classified according to their function. Functional classes were determined using the Pseudomonas Genome Project website (www.pseudomonas.com; Winsor *et al*., 2016).

Figure 2: Dysregulation of genes, the products of which are involved in carbon metabolism. Increased metabolic pathways are indicated in bold and with full arrays, while reduced ones are shown with dashed arrays.

Figure 3: Expression of *crc* and *crcZ* in H103 and PAOSX grown in LB assayed by qRT-PCR.

Figure 4: Growth of H103 and PAOSX grown in LB supplemented with 0.1% of polysorbate 80 (**A**) or 0.01% of SDS (**B**).

Figure 5: qRT-PCR expression pattern of several genes, encoding products that are involved in metabolic pathways (**A**), or porins (B), in H103 grown in LB, and in the PAOSX *sigX* mutant strain grown in LB or LB containing 0.1% polysorbate 80.

Table

Table 1. Selected up- and down-regulated genes (microarrays) and proteins (proteomics) in *P. aeruginosa* PAOSX (*sigX* mutant) versus H103 (WT). Only significantly dysregulated genes are included (p-value<0.05), and the log2 fold change cut-off between PAOSX and H103 strains is 2. CbrAB-, Crc- and Hfq-regulated genes are indicated in the column "CbrA/B, Crc, Hfq".

* indicates expression of genes that has been validated by qRT-PCR. Operons have been highlighted in grey.

Locus	Gene name	Product name	PAOSX/H103		CbrA/B; Crc; Hfq
			mRNA	Protein	
Transport of small molecules					
Porins and outer membrane receptors					
PA0162	*opdC*	Histidine porine OpdC	-7.7	-8.9	
PA0291	*oprE*	Anaerobically-induced outer membrane porin OprE precursor	-2.2/-5*		Crc
PA1178	*oprH*	PhoP/Q and low Mg^{2+} inducible outer membrane protein H1 precursor	-2		
PA3038	*opdQ*	probable porin. OprD family	14.8/7.9*		
PA3186	*oprB*	Glucose/carbohydrate outer membrane porin OprB precursor	-2.7/-5*		Crc
PA3790	*oprC*	Putative copper transport outer membrane porin OprC precursor	-4.35		
PA4501	*opdD*	Glycine-glutamate dipeptide porin OpdD (OpdP)	3.2		Crc, CbrA/B
Carboxylic acid transporters					
PA0215	*madL*	malonate transporter MadL	15.9		
PA0216	*madM*	malonate transporter MadM	6.9		
PA0229	*pcaT*	dicarboxylic acid transporter PcaT	7.6		
PA1183	*dctA*	C4-dicarboxylate transport protein	-3.3		Crc
PA1863	*modA*	molybdate-binding periplasmic protein precursor ModA	-3.45		
PA4616		probable C4-dicarboxylate-binding protein (DctP family)	-2.44		
Carbohydrate transporters					
PA1946	*rbsB*	binding protein component precursor of ABC ribose transporter	2.7		Crc
PA1947	*rbsA*	ribose transport protein RbsA	4.7		Crc
PA1948	*rbsC*	membrane protein component of ABC ribose transporter	3.3		Crc
PA2338	/	probable binding protein component of ABC maltose/mannitol transporter	4.3		
PA2339	/	probable binding-protein-dependent maltose/mannitol transport protein	3.9		
PA2340	/	probable binding-protein-dependent maltose/mannitol transport protein	4.4		
PA2341	/	probable ATP-binding component of ABC	4		

		maltose/mannitol transporter			
PA3187	/	probable permease of ABC sugar transporter	-10		Crc
PA3188	/	probable permease of ABC sugar transporter	-7.7		Crc
PA3189	/	probable permease of ABC sugar transporter	-2.9		Crc
PA3190	/	probable binding protein component of ABC sugar transporter	-2		Crc
Amino acid transporters					
PA0295	/	probable periplasmic polyamine binding protein	-3.33		
PA0603	*agtA*	ATP-binding cassette (ABC) transporter complex. substrate-binding subunit-containing	8.7		
PA0604	*agtB*	ATP-binding cassette (ABC) transporter complex. substrate-binding subunit-containing	14.8		
PA0782	*putA*	proline dehydrogenase PutA	-14.28		
PA0783	*putP*	proline transporter	-4		
PA0866	*aroP2*	aromatic amino acid transport protein AroP2	3.95		CbrA/B; Crc; Hfq
PA1074	*braC*	branched-chain amino acid transport protein BraC	2.39		CbrA/B; Crc; Hfq
PA1339	*aatP*	amino acid ABC transporter ATP binding protein	2.6		Crc
PA1342	*aatJ*	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems. periplasmic component/domain	2.4		Crc, CbrA/B
PA2711	/	probable periplasmic spermidine/putrescine-binding protein	2.1		
PA3641	/	probable amino acid permease	-2.6		
PA3865	/	probable amino acid binding protein	-2.43		
PA3891	*opuC*	OpuC ABC transporter. ATP-binding protein.	2.1		
PA4496		probable binding protein component of ABC transporter	5.29		CbrA/B; Crc; Hfq
PA4497	/	probable binding protein component of ABC transporter	5.7		
PA4910	/	branched chain amino acid ABC transporter ATP binding protein	2.6		
PA4913	/	probable binding protein component of ABC transporter	5.1		
PA5094		probable ATP-binding component of ABC transporter involved in histidine uptake	6.7		
PA5095		probable permease of ABC transporter involved in histidine uptake	5.2		
PA5096		probable ATB binding cassette involved in	3.8	18.8	

		histidine uptake			
PA5097		probable amino acid permease involved in histidine uptake	5.2		
PA5099		probable transporter involved in histidine uptake	4.6		
PA5153		lysine/arginine/ornithine/histidine/octopine) ABC transporter periplasmic binding protein	2.44		CbrA/B; Hfq
Metabolisms					
Fatty acid metabolism					
PA0492		conserved hypothetical protein	-16.6		
PA0493		probable biotin-requiring enzyme	-11.1		
PA0494		probable acyl-CoA carboxylase subunit	-6.25		
PA0495		hypothetical protein	-8.3		
PA0496		conserved hypothetical protein	-3.125		
PA0999	*fabH1*	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	-2	-6.1	
PA1609	*fabB*	beta-ketoacyl-ACP synthase I	-2.3		
PA1610	*fabA*	beta-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase	-3.7		
PA2966	*acpP*	acyl carrier protein	-2.27		
PA2967	*fabG*	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase		-2.2	
PA2968	*fabD*	malonyl-coA-[acyl-carrier-protein] transacylase		-2.3	
PA3639	*accA*	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha subunit	-2		
PA3645	*fabZ*	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase	-2.38		
PA5174	*fabY*	β-ketoacyl synthase KASI/II domain condensation enzymes	-5.26	-8.9	
PA5435		probable transcarboxylase subunit	-4.16		
PA5436		probable biotin carboxylase subunit of a transcarboxylase	-10.41		
Amino acid metabolism					
PA0865	*hpd*	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase /Tyrosine assimilation	5.2		Crc
PA0870	*phhC*	aromatic amino acid aminotransferase	1.7	2.4	Crc
PA0898	*aruD*	succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	2.3		CbrA/B; Crc; Hfq
PA0899	*aruB*	succinylarginine dihydrolase	2.4		CbrA/B; Crc; Hfq
PA0901	*aruE*	succinylglutamate desuccinylase	2.2		CbrA/B; Crc; Hfq
PA1337	*ansB*	glutaminase-asparaginase	2.4	2.4	
PA1338	*ggt*	gamma-glutamyltranspeptidase precursor	2.7		Hfq
PA2011	*liuE*	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase	4.1		Crc
PA2012	*liuD*	methylcrotonyl-CoA carboxylase. alpha-	4		Crc

		subunit			
PA2013	*liuC*	putative 3-methylglutaconyl-CoA hydratase	3.3		Crc
PA2014	*liuB*	methylcrotonyl-CoA carboxylase. beta-subunit	3.8		Crc
PA2015	*liuA*	putative isovaleryl-CoA dehydrogenase	3.7		Crc
PA2247	*bkdA1*	2-oxoisovalerate dehydrogenase (alpha subunit)	4.4	2.7	CbrA/B; Crc; Hfq
PA2248	*bkdA2*	2-oxoisovalerate dehydrogenase (beta subunit)	5.6		CbrA/B; Crc; Hfq
PA2249	*bkdB1*	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase	6	2.2	CbrA/B; Crc; Hfq
PA2250	*lpdV*	lipoamide dehydrogenase-Val	6.4	2.9	CbrA/B; Crc; Hfq
PA2862	*lipA*	lactonizing lipase precursor	4.7		CbrA/B; Crc; Hfq
PA3569	*mmsA*	branched chain aminoacid assimilation	30		Hfq
PA3570	*mmsB*	branched chain aminoacid assimilation	33.1		Hfq
PA4588	*gdhA*	glutamate dehydrogenase	2.4		Hfq
PA5091	*hutG*	N-formylglutamate amidohydrolase	3		CbrA/B; Crc; Hfq
PA5092	*hutI*	imidazolone-5-propionate hydrolase HutI	2.9		CbrA/B; Crc; Hfq
PA5093		probable histidine/phenylalanine ammonia-lyase	2.9		
PA5098	*hutH*	histidine ammonia-lyase	32.7	15	CbrA/B; Crc; Hfq
PA5100	*hutU*	urocanase	14.4	5.9	CbrA/B; Crc; Hfq
Carbon metabolism					
PA0153	*pcaH*	protocatechuate 3.4-dioxygenase. beta subunit	4		Hfq
PA0154	*pcaG*	protocatechuate 3.4-dioxygenase. alpha subunit	3.3		Hfq
PA0208	*mdcA*	malonate decarboxylase alpha subunit	11.1		
PA0209	*mdcB*	conserved hypothetical protein	13.6		
PA0210	*mdcC*	malonate decarboxylase delta subunit	21.1		
PA0211	*mdcD*	acetyl-CoA carboxylase beta subunit	14.3	31.6	
PA0212	*mdcE*	malonate decarboxylase gamma subunit	5.2	44.4	
PA0213	*mdcG*	hypothetical protein	17.1		
PA0214	*mdcH*	probable acyl transferase	12.4		
PA0226		catechol degradation	9.8		Hfq
PA0227		malonate decarboxylase gamma subunit	20.6	17.5	Hfq
PA0228	*pcaF*	probable CoA transferase. subunit B	13.9	16.1	Hfq
PA0230	*pcaB*	3-carboxy-cis.cis-muconate cycloisomerase	4.2		
PA0231	*pcaD*	beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase	5.4		
PA0232	*pcaC*	gamma-carboxymuconolactone	10.7		

		decarboxylase			
PA0235	*pcaK*	4-hydroxybenzoate transporter PcaK	1.5		
PA0609	*trpE*	anthranilate synthetase component I	1.7		
PA0887	*acsA*	acetyl-coenzyme A synthetase	2.9		CbrA/B; Crc; Hfq
PA0996	*pqsA*	PqsA	-2.5		
PA0997	*pqsB*	PqsB	-2.7	-11.5	
PA0998	*pqsC*	PqsC	-2.38	-4.5	
PA0999	*pqsD*	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	-2	-6.1	
PA1001	*phnA*	anthranilate synthase component I	-2		Crc
PA1002	*phnB*	anthranilate synthase component II	-2		Crc
PA1892		hypothetical protein	4.2		Hfq
PA1893		hypothetical protein	4		Hfq
PA1894		hypothetical protein	9.4		Hfq
PA1895		hypothetical protein	7.3		Hfq
PA1896		hypothetical protein	5.2		Hfq
PA1897		hypothetical protein	4.5		Hfq
PA1901	*phzC2*	phenazine biosynthesis protein PhzC	9.7	-30.4	
PA1902	*phzD2*	phenazine biosynthesis protein PhzD	10.15	-11.7	
PA1903	*phzE2*	phenazine biosynthesis protein PhzE	10.6	-16.2	
PA1904	*phzF2*	probable phenazine biosynthesis protein	11.6	-11.1	
PA1905	*phzG2*	probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	11.8	-8.1	
PA1978	*erbR*	glycerol metabolism activator	2.4		Hfq
PA1981		hypothetical protein	4.3		Hfq
PA1982	*exaA*	quinoprotein ethanol dehydrogenase	4.5		Hfq
PA1983	*exaB*	cytochrome c550	7.5		Hfq
PA1984	*exaC*	NAD+ dependent aldehyde dehydrogenase ExaC	2.4		Hfq; CbrA/B
PA1999	*dhcA (atoD)*	DhcA. dehydrocarnitine CoA transferase. subunit A	2.1		
PA2000	*dhcB (atoA)*	DhcB. dehydrocarnitine CoA transferase. subunit B	3.1		
PA2001	*atoB*	acetyl-CoA acetyltransferase	3.9	3.3	
PA2003	*bdhA*	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	5.9	5.4	Hfq
PA2507	*catA*	catechol 1.2-dioxygenase	160	25.5	Hfq
PA2508	*catC*	muconolactone delta-isomerase	106		Hfq
PA2509	*catB*	muconate cycloisomerase I	7.3	8.5	Hfq
PA2511	*antR*	transcriptional regulator	10.1		Hfq
PA2512	*antA*	anthranilate dioxygenase large subunit	163.1	10.4	Hfq
PA2513	*antB*	anthranilate dioxygenase small subunit	502.1	13	Hfq
PA2514	*antC*	anthranilate dioxygenase reductase	140.4	5.4	Hfq
PA2515	*xylL*	cis-1.2-dihydroxycyclohexa-3.4-diene	4.6		Hfq

		carboxylate dehydrogenase			
PA2516	*xylZ*	toluate 1.2-dioxygenase electron transfer component	3.1		Hfq
PA2517	*xylY*	toluate 1.2-dioxygenase beta subunit	5.5		Hfq
PA2518	*xylX*	toluate 1.2-dioxygenase alpha subunit	4.9		Hfq
PA2519	*xylS*	transcriptional regulator	3.1		Hfq
PA3366	*amiE*	aliphatic amidase	8.4	2.6	Crc; Hfq
PA3367	*amiR*	hypothetical protein	4.7		Hfq
PA3368	*amiS*	probable acetyltransferase	3.2		Hfq
PA3709		probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	2.3		Hfq
PA4209	*phzM*	phenazine specific methyltransferase	10.2		Hfq
PA4496		putative binding protein component of ABC transporter	5.3		Hfq
PA4733	*acsB*	acetyl-coenzyme B synthetase	2.7		CbrA/B; Crc; Hfq
PA4910		putative ABC transporter proteins	2.6		Hfq
PA4913		probable binding protein component of ABC transporter	5.1		Hfq
PA5332	*crc*	catabolite repression control protein	-2.2		Crc
PA5056	*phaC1*	poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 1	2.8		
PA5057	*phaD*	poly(3-hydroxyalkanoic acid) depolymerase	2.1		
PA5058	*phaC2*	poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2	2.6		
PA5060	*phaF*	polyhydroxyalkanoate synthesis protein PhaF	2.2		
PA5380	*gbdR*	Transcriptional regulator for glycine betaine catabolism	2.9		Hfq
PA5543		hypothetical protein	2.5		Hfq
PA5545		hypothetical protein	2.3		Hfq
Energy metabolism					
PA0105	*coxB*	Cytochrome c oxidase. subunit II	13.2		
PA0106	*coxA*	Cytochrome c oxidase. subunit I	15.7		
PA0107	*coxI*	conserved hypothetical protein	9.4		
PA0108	*coIII*	cytochrome c oxidase. subunit III	10.9		
PA0792	*prpD*		7,8		Crc
PA0793			7,4		Crc
PA0794			4,8		Crc
PA0795	*prpC*		6,1		Crc
PA0796	*prpB*		4,2		Crc
PA1172	*napC*	cytochrome c-type protein NapC	4.8		
PA1173	*napB*	cytochrome c-type protein NapB precursor	5.1		
PA1174	*napA*	periplasmic nitrate reductase protein NapA	4.9		
PA1175	*napD*	NapD protein of periplasmic nitrate reductase	4		

PA1176	*napF*	ferredoxin protein NapF	4.5		
PA1177	*napE*	periplasmic nitrate reductase protein NapE	4.4		
PA1555	*ccoN*	Cytochrome c oxidase. cbb3-type. CcoN subunit	-5.26		
PA1556	*ccoO*	Cytochrome c oxidase. cbb3-type. CcoO subunit	-4.54		
PA1557	*ccoP*	Cytochrome c oxidase. cbb3-type. CcoP subunit	-2.63		
PA1561	*aer*	aerotaxis receptor Aer	-4.37		
PA3872	*narI*	respiratory nitrate reductase gamma chain	-4.16		
PA3873	*narJ*	respiratory nitrate reductase delta chain	-7.14		
PA3874	*narH*	respiratory nitrate reductase beta chain	-11.11		
PA3875	*narG*	respiratory nitrate reductase alpha chain	-33.33		Crc
PA3876	*narK2*	nitrite extrusion protein 2	-20		
PA3877	*narK1*	nitrite extrusion protein 1	-20		
PA3878	*narX*	two-component sensor NarX	-1.47		
PA3879	*narL*	two-component response regulator NarL	-2.56		

552
553

References

Behrends, V., Geier, B., Williams, H.D. & Bundy, J.G. Direct assessment of metabolite utilization by *Pseudomonas aeruginosa* during growth on artificial sputum medium. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2467-2470 (2013)

Blanka, A. *et al.* Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *J Bacteriol* **196**, 345–356 (2014).

Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **5**, 279-313 (1983).

Boechat, A.L., Kaihami, G.H., Politi, M.J., Lepine, F. & Baldini, R.L. A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* **8**, e84775 (2013).

Bouffartigues, E. *et al*. Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX. *FEMS Microbiol Lett* **356**,193-200 (2014).

Bouffartigues, E. *et al*. Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. *J Bacteriol* **194**, 4301–4311 (2012).

Bouffartigues, E. *et al.* The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. *Front Microbiol* **6**, 630. doi: 10.3389/fmicb.2015.00630 (2015).

Briczinski, E.P., Phillips, A.T. & Roberts, R.F. Transport of glucose by *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* occurs via facilitated diffusion. *Appl Environ Microbiol* **74**:6941-6948 (2008)

Brinkman, F.S., Schoofs, G., Hancock, R.E. & De Mot, R. Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **181**, 4746–4754 (1999).

Browne, P., Barret, M., O'Gara, F. & Morrissey, J.P. Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. *BMC Microbiol* **10**, 300. doi: 10.1186/1471-2180-10-300 (2010).

Chang, H.K., Mohseni, P. & Zylstra, G.J. Characterization and regulation of the genes for a novel anthranilate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J Bacteriol* **185**, 5871-581 (2003).

Chen, Y.J., Tsai, P.C., Hsu, C.H. & Lee, C.Y. Critical residues of class II PHA synthase for expanding the substrate specificity and enhancing the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate. *Enzyme Microb Technol* **56**, 60-66 (2014).

Choi, Y. *et al*. Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cells* **32**, 57-65. (2011)

Comolli, J.C. & Donohue, T.J. Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb3 cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**, 1193-1203 (2004).

Cornelis, P., Matthijs, S. & Van Oeffelen, L. Iron uptake regulation *in Pseudomonas aeruginosa. Biometals* **22**, 15-22 (2009).

de Mendoza, D. Temperature sensing by membranes. *Annu Rev Microbiol* **68**, 101-116 (2014).

Deutscher J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**, 87-93 (2008).

Duchesne, R. *et al.* A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. *J Proteomics* **94**, 451–459 (2013).

Farrow, J.M. & Pesci, E.C. Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the Pseudomonas quinolone signal. *J Bacteriol* **189**, 3425-3433 (2007).
Filiatrault, M.J. *et al*. CrcZ and CrcX regulate carbon source utilization in *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain DC3000. *RNA Biol* **10**, 245-255 (2013).
Fonseca, P., Moreno, R. & Rojo F. P*seudomonas putida* growing at low temperature shows increased levels of CrcZ and CrcY sRNAs, leading to reduced Crc-dependent catabolite repression. *Environ Microbiol* **15**, 24-35 (2013).
Fowler, R.C. & Hanson, N.D. The OpdQ porin of *Pseudomonas aeruginosa* is regulated by environmental signals associated with cystic fibrosis including nitrate-induced regulation involving the NarXL two-component system. *Microbiologyopen* **4**, 967-982 (2015).
Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L. & Schomburg, D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol* **12**, 1734-1747 (2010).
Gi, M. *et al*. A novel siderophore system is essential for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in airway mucus. *Sci Rep* **5**, 14644. doi: 10.1038/srep14644 (2015).
Gicquel, G. *et al.* The extra-cytoplasmic function sigma factor SigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* **8**, e80407 (2013).
Görke, B. & Stülke, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**, 613-624 (2008).
Gruber, T.M. & Gross, C.A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**, 441-466 (2003).
Guyard-Nicodème, M, *et al.* Outer membrane modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to hyperosmolarity. *J Proteome Res* **7**, 1218-1225 (2008).
Hancock, R.E. & Carey, A.M. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J Bacteriol* **140**, 902–910 (1979).
Hester, K.L. *et al*. Crc is involved in catabolite repression control of the *bkd* operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 1144-1149 (2000).
Irizarry, R.A. *et al*. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**, e15. (2003)
Itoh, Y. Cloning and characterization of the *aru* genes encoding enzymes of the catabolic arginine succinyltransferase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 7280-90 (1997).
Kawakami, T., Kuroki, M., Ishii, M., Igarashi, Y. & Arai, H. Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**, 1399-1412 (2010).
Kingston, A.W., Subramanian, C., Rock, C.O. & Helmann, J.D. A σW-dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity. *Mol Microbiol* **81**, 69-79 (2011)
Klebensberger, J., Rui, O., Fritz, E., Schink, B. & Philipp, B. Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 as an energy-dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate. *Arch Microbiol* **185**, 417-427 (2006).
La Rosa, R., de la Peña, F., Prieto, M.A. & Rojo, F. The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. *Environ Microbiol* **16**, 278-290 (2014).
La Rosa, R., Nogales, J. & Rojo, F. The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **17**, 3362-3378 (2015).

La Rosa, R., Behrends, V., Williams, H.D., Bundy, J.G. & Rojo, F. Influence of the Crc regulator on the hierarchical use of carbon sources from a complete medium in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **18**, 807-818 (2016).

Linares, J.F. *et al*. The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**, 3196-3212 (2010).

Llamas, M.A. *et al*. Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signaling systems. *Mol Microbiol* **67**, 458-472 (2008).

Madhushani, A., Del Peso-Santos, T., Moreno, R., Rojo, F. & Shingler, V. Transcriptional and translational control through the 5'-leader region of the *dmpR* master regulatory gene of phenol metabolism. *Environ Microbiol* **17**, 119-133 (2015).

Milojevic, T., Grishkovskaya, I., Sonnleitner, E., Djinovic-Carugo, K. & Bläsi, U. The *Pseudomonas aeruginosa* catabolite repression control protein Crc is devoid of RNA binding activity. *PLoS One* **8**, e64609. doi: 10.1371/journal.pone.0064609 (2013).

Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martínez, J.L. & Rojo, F. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol* **186**, 1337-1344 (2004).

Moreno, R., Fonseca, P. & Rojo, F. The Crc global regulator inhibits the *Pseudomonas putida* pWW0 toluene/xylene assimilation pathway by repressing the translation of regulatory and structural genes. *J Biol Chem* **285**, 24412-24419 (2010).

Moreno, R., Marzi, S., Romby, P. & Rojo, F. The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* **37**, 7678-7690 (2009).

Moreno, R., Martínez-Gomariz, M., Yuste, L., Gil, C. & Rojo, F. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics* **9**, 2910-2928 (2009).

Moreno, R., Ruiz-Manzano, A., Yuste, L. & Rojo, F. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator. *Mol Microbiol* **64**, 665-675 (2007).

Moreno, R. & Rojo, F. Features of pseudomonads growing at low temperatures: another facet of their versatility. *Environ Microbiol Rep* **6**, 417-426 (2014).

Nishijyo, T., Park, S.M., Lu, C.D., Itoh, Y. & Abdelal, A.T. Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 5559-66 (1998).

Nishijyo, T., Haas, D. & Itoh, Y. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa.* *Mol Microbiol* **40**, 917-931 (2001).

Pesci, E.C. *et al*. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* U S A **96**, 11229-11234 (1999).

Phillips, R.S. Structure, mechanism, and substrate specificity of kynureninase. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 1481-1488 (2011).

Potvin, E., Sanschagrin, F. & Levesque, R.C. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa.* *FEMS Microbiol Rev* **32**, 38-55 (2008).

Rojas-Rosas, O., Villafaña-Rojas, J., López-Dellamary, F.A., Nungaray-Arellano, J. & González-Reynoso, O. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source. *Can J Microbiol* **53**, 840-851 (2007).

Schulz, S. *et al.* Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog* **11**, e1004744. doi: 10.1371/journal.ppat.1004744 (2015).

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **189**, 8746-8749 (2007).

Sonnleitner, E. & Bläsi, U. Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genet* **10**, e1004440. doi: 10.1371/journal.pgen.1004440 (2014).

Sonnleitner, E. et al. Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**, e44637. doi: 10.1371/journal.pone.0044637 (2012).

Sonnleitner, E., Abdou, L. & Haas, D. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* U S A **106**, 21866-21871. doi: 10.1073/pnas.pnas.0910308106 (2009).

Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E.P. & Bläsi, U. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**, 1542-1558 (2006).

Spiers, A.J., Buckling, A. & Rainey, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol Read Engl* **146**, 2345-2350 (2000).

Staroń, A. *et al*. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol Microbiol* **74**, 557-581 (2009).

Terzaghi, W.B. Manipulating membrane Fatty Acid compositions of whole plants with tween-Fatty Acid esters. *Plant Physiol* **91**, 203-212 (1989).

Urata, M. *et al*. Transcriptional regulation of the ant operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *J Bacteriol* **186**, 6815-6823 (2004).

Valentini, M. & Lapouge, K. Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 regulates the uptake of C4 -dicarboxylates depending on succinate concentration. *Environ Microbiol* **15**, 1707-1716 (2013).

Winsor, G.L. *et al*. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the Pseudomonas genome database. *Nucleic Acids Res* **44**, 646-653. (2016)

Wright, G.W. & Simon, R.M. A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. *Bioinformatics* **19**, 2448-2455 (2003).

Yuste, L., Canosa, I. & Rojo, F. Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **180**, 5218-5226 (1998).

Yuste, L. & Rojo, F. Role of the crc gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **183**, 6197-6206 (2001).

Zhang, X.X. & Rainey, P.B. Genetic analysis of the histidine utilization (*hut*) genes in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* **176**, 2165-2176 (2007).

Additional files

Supplementary Figures

Supplementary Figure S1: Concordance coefficient correlation. Correlation between the Log_2 fold change of 16 genes in qRT-PCR and microarray data from *P. aeruginosa sigX* mutant strain PAOSX is represented.

Supplementary Tables

Supplementary Tables S1: Transcriptome data

Supplementary Table S2: Primers used in this study

Supplementary Table S3: Proteomic data

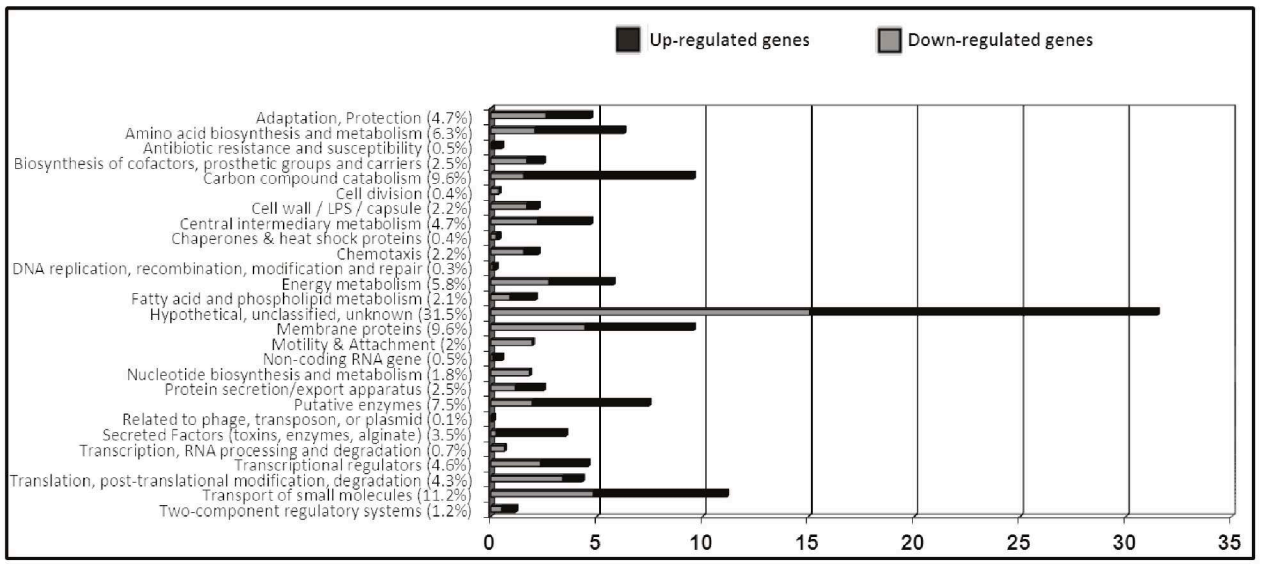


Figure 1. Functional classes of SigX-regulated genes identified by expression profiling on DNA array. All the genes that had a significant difference in expression between wildtype and mutant strains (Fold change ≥2, p-value ≤0.05 as determined by Empirical Bayes) were included and classified according to their function. Functional classes were determined using the Pseudomonas Genome Project website (www.pseudomonas.com; Winsor *et al*., 2016).

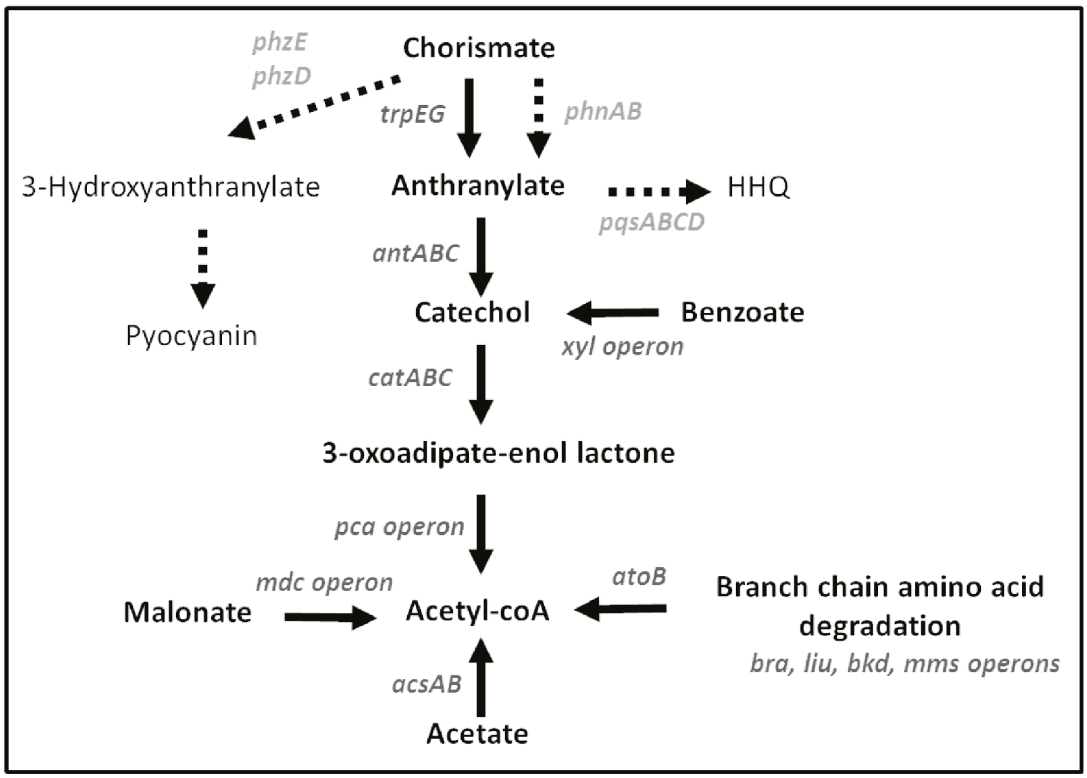


Figure 2: Dysregulation of genes, the products of which are involved in carbon metabolism. Increased metabolic pathways are indicated in bold and with full arrays, while reduced ones are shown with dashed arrays.

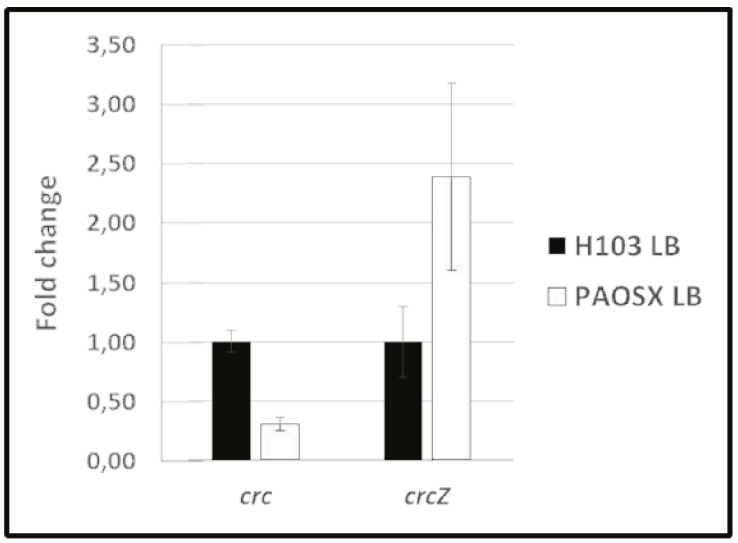


Figure 3: Expression of *crc* and *crcZ* in H103 and PAOSX grown in LB assayed by qRT-PCR.

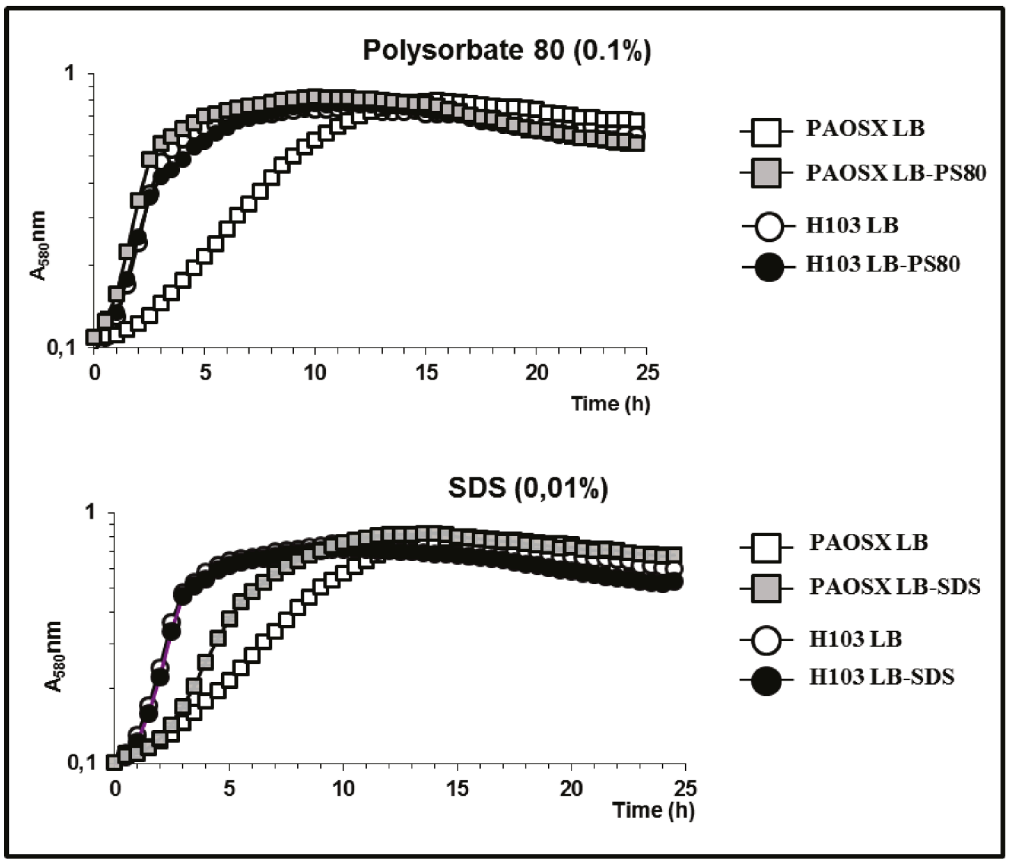


Figure 4: Growth of H103 and PAOSX grown in LB supplemented with 0.1% of polysorbate 80 (**Figure 4A, PS80**) or 0.01% of SDS (**Figure 4B**).

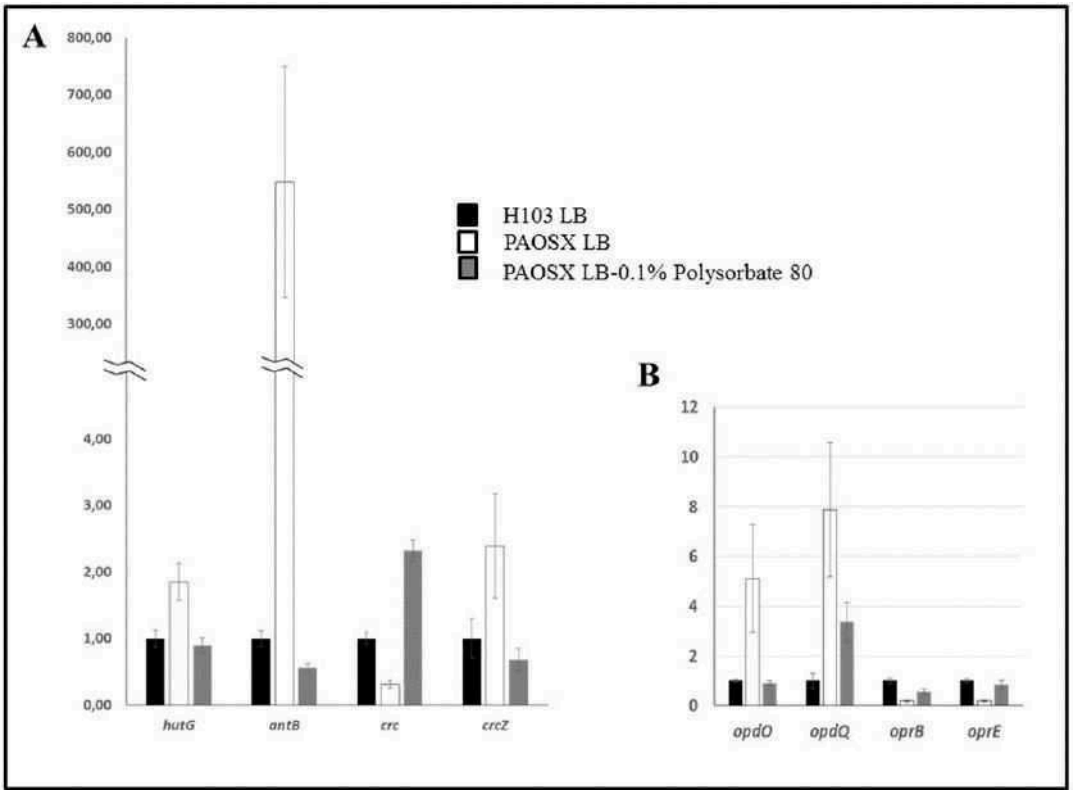
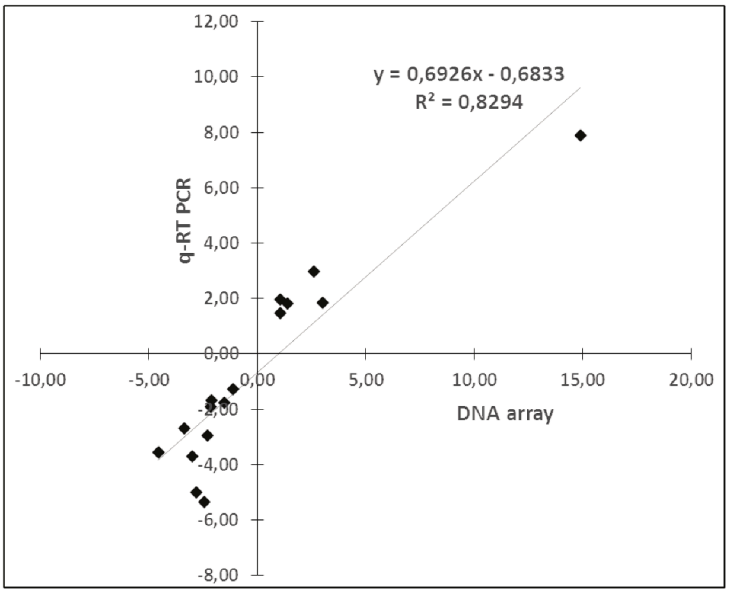


Figure 5: Expression by qRT-PCR of genes belonging the CbrA/B, Crc and Hfq networks (A), or encoding porins (B) in H103 and PAOSX grown in LB supplemented or not with 0.1 % of polysorbate 80

Gene number	DNA array	qRT-PCR
PA0427	-1,52	-1,77
PA0527	-2,12	-1,69
PA0779	1,39	1,81
PA0958	-1,14	-1,28
PA1053	-2,31	-2,95
PA1774	-2,45	-5,35
PA1775	-3,37	-2,69
PA3006	-4,55	-3,55
PA3038	14,88	7,88
PA3186	-2,81	-5,00
PA3405	1,05	1,48
PA4296	2,60	2,97
PA4306	1,06	1,96
PA4843	-2,98	-3,69
PA5091	3,02	1,85
PA5332	-2,15	-1,91



Supplementary Fgure S1: **Concordance coefficient correlation.** Correlation between the Log_2 fold change of 16 genes in qRT-PCR and microarray data from *P. aeruginosa* sigX mutant strain PAOSX is represented.

Supplementary Table S1, Transcriptome data

Locus tag	Gene name	Fold change	T statistic	P-value
Energy metabolism				
PA0105	coxB	13,2	29,7	2,2E-10
PA0106	coxA	15,7	28,7	3,0E-10
PA0107	/	9,4	22,0	3,2E-09
PA0108	coIII	10,9	23,5	1,8E-09
PA0113	/	2,2	10,2	2,7E-06
PA0520	nirQ	2,2	7,0	6,0E-05
PA0794	/	4,8	13,6	2,2E-07
PA1172	napC	4,8	18,0	2,0E-08
PA1173	napB	5,1	11,5	1,0E-06
PA1174	napA	4,9	13,5	2,5E-07
PA1175	napD	4,0	20,2	6,9E-09
PA1176	napF	4,5	17,9	2,0E-08
PA1177	napE	4,4	15,5	7,3E-08
PA1555	ccoP2	0,2	-10,4	2,3E-06
PA1556	ccoO2	0,2	-7,7	2,8E-05
PA1557	ccoN2	0,4	-6,0	1,9E-04
PA1562	acnA	2,5	10,2	2,6E-06
PA1983	exaB	7,5	10,1	2,9E-06
PA2321	/	0,3	-7,8	2,6E-05
PA2516	xylZ	3,1	7,6	3,0E-05
PA2664	fhp	3,3	9,0	7,9E-06
PA3032	snr1	5,1	15,5	7,2E-08
PA3183	zwf	0,2	-17,3	2,7E-08
PA3193	glk	0,4	-12,2	6,0E-07
PA3194	edd	0,4	-11,5	9,8E-07
PA3195	gapA	0,2	-17,9	2,0E-08
PA3416	/	2,0	7,9	2,3E-05
PA3417	/	3,0	9,0	7,8E-06
PA3621	fdxA	0,4	-9,4	5,2E-06
PA3872	narI	0,2	-8,6	1,2E-05
PA3873	narJ	0,1	-11,5	1,0E-06
PA3874	narH	0,1	-10,0	3,3E-06
PA3875	narG	0,0	-21,1	4,6E-09
PA3879	narL	0,4	-12,5	4,9E-07
PA4569	ispB	0,5	-6,8	7,8E-05
PA4571	/	0,4	-7,9	2,3E-05
PA4587	ccpR	0,2	-10,9	1,6E-06
PA4811	fdnH	2,0	6,3	1,4E-04
PA4812	fdnG	2,1	8,1	1,8E-05
PA5491	/	0,5	-6,5	1,0E-04
Amino acid biosynthesis and metabolism				
PA0009	glyQ	0,4	-6,4	1,2E-04

PA0018	fmt	0,4	-8,7	1,1E-05
PA0036	trpB	0,5	-10,9	1,6E-06
PA0293	aguB	0,4	-6,2	1,6E-04
PA0402	pyrB	0,4	-8,5	1,2E-05
PA0546	metK	2,7	7,3	4,1E-05
PA0782	putA	0,1	-41,8	9,8E-12
PA0865	hpd	5,2	23,6	1,7E-09
PA0898	aruD	2,3	11,5	1,0E-06
PA0899	aruB	2,4	11,8	8,0E-07
PA0901	aruE	2,2	8,1	1,8E-05
PA1217	/	6,2	9,9	3,6E-06
PA1337	ansB	2,4	10,0	3,3E-06
PA1338	ggt	2,7	12,2	5,8E-07
PA1818	ldcA	2,1	8,9	8,5E-06
PA1999	dhcA	2,1	7,1	5,1E-05
PA2000	dhcB	3,1	12,0	6,8E-07
PA2247	bkdA1	4,4	18,8	1,3E-08
PA2248	bkdA2	5,6	23,7	1,6E-09
PA2249	bkdB	6,0	17,9	2,1E-08
PA2250	lpdV	6,4	22,5	2,6E-09
PA2443	sdaA	7,8	18,3	1,7E-08
PA2444	glyA2	20,2	21,9	3,3E-09
PA2446	gcvH2	2,1	5,2	5,3E-04
PA2629	purB	0,5	-7,5	3,6E-05
PA3082	gbt	0,5	-7,7	2,7E-05
PA3139	/	0,5	-5,6	3,1E-04
PA3418	ldh	3,1	15,6	6,7E-08
PA3570	mmsA	33,1	28,0	3,7E-10
PA3814	iscS	2,1	3,3	9,4E-03
PA3862	dauB	0,4	-7,7	2,7E-05
PA4588	gdhA	2,4	6,3	1,3E-04
PA4920	nadE	0,2	-18,0	1,9E-08
PA5015	aceE	0,5	-5,4	4,3E-04
PA5091	hutG	3,0	12,9	3,6E-07
PA5092	hutI	2,9	10,6	2,0E-06
PA5098	hutH	32,7	33,8	6,7E-11
PA5100	hutU	14,4	28,9	2,8E-10
PA5173	arcC	0,4	-7,9	2,2E-05
PA5372	betA	0,2	-14,8	1,1E-07
PA5373	betB	0,2	-12,6	4,3E-07
PA5415	glyA1	6,4	14,8	1,1E-07
PA5429	aspA	0,3	-13,0	3,4E-07
Carbon compound catabolism				
PA0153	pcaH	4,0	15,7	6,5E-08
PA0154	pcaG	3,3	15,8	6,1E-08
PA0208	mdcA	11,1	19,0	1,2E-08
PA0210	mdcC	21,1	35,9	3,9E-11
PA0211	mdcD	14,3	32,7	8,9E-11
PA0212	mdcE	5,2	11,0	1,5E-06

PA0213	/	17,1	36,0	3,8E-11
PA0214	/	12,4	30,4	1,7E-10
PA0226	/	9,8	22,0	3,3E-09
PA0227	/	20,6	26,1	6,9E-10
PA0230	pcaB	4,2	17,5	2,5E-08
PA0231	pcaD	5,4	20,9	5,1E-09
PA0232	pcaC	10,7	28,3	3,4E-10
PA0247	pobA	2,0	7,8	2,6E-05
PA0743	/	6,2	18,0	1,9E-08
PA0792	prpD	7,8	21,9	3,3E-09
PA0887	acsA	2,9	11,0	1,4E-06
PA1949	rbsR	4,0	19,7	8,6E-09
PA1950	rbsK	4,3	21,7	3,6E-09
PA1982	exaA	4,5	7,1	5,3E-05
PA2003	bdhA	5,9	19,0	1,2E-08
PA2007	maiA	2,2	7,9	2,2E-05
PA2008	fahA	2,2	9,2	6,5E-06
PA2009	hmgA	2,2	8,7	1,1E-05
PA2011	liuE	4,1	20,0	7,4E-09
PA2012	liuD	4,0	17,2	2,9E-08
PA2013	liuC	3,3	11,9	7,4E-07
PA2014	liuB	3,8	14,6	1,2E-07
PA2015	liuA	3,7	20,7	5,6E-09
PA2265	/	0,5	-6,2	1,6E-04
PA2323	/	0,0	-27,1	5,0E-10
PA2507	catA	160,0	64,3	1,9E-13
PA2508	catC	106,0	47,5	3,1E-12
PA2509	catB	7,3	17,2	2,9E-08
PA2512	antA	163,2	59,2	4,1E-13
PA2513	antB	502,1	54,5	8,7E-13
PA2514	antC	140,4	64,9	1,8E-13
PA2515	xylL	4,6	15,6	6,9E-08
PA2517	xylY	5,5	8,5	1,2E-05
PA2518	xylX	4,9	7,2	4,5E-05
PA2862	lipA	4,7	11,4	1,0E-06
PA3366	amiE	8,4	15,9	5,8E-08
PA3517	/	8,1	4,0	3,0E-03
PA3560	fruA	0,3	-6,6	9,1E-05
PA3569	mmsB	30,0	34,1	6,2E-11
PA3710	/	3,0	11,1	1,3E-06
PA4151	acoB	2,3	11,1	1,3E-06
PA4670	prs	0,4	-6,5	1,0E-04
PA4733	acsB	2,7	13,7	2,2E-07
PA5057	phaD	2,1	6,8	7,6E-05
PA5332	crc	0,5	-7,9	2,2E-05
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers				
PA0024	hemF	0,3	-6,1	1,8E-04
PA0996	pqsA	0,4	-5,2	5,5E-04
PA0997	pqsB	0,4	-7,2	4,6E-05

PA0998	pqsC	0,4	-5,5	3,5E-04
PA1985	pqqA	4,8	11,1	1,3E-06
PA1986	pqqB	2,6	11,0	1,4E-06
PA1987	pqqC	3,6	11,3	1,2E-06
PA1988	pqqD	3,9	9,3	5,7E-06
PA1989	pqqE	2,9	10,7	1,8E-06
PA3914	moeA1	0,1	-21,5	3,9E-09
PA3915	moaB1	0,0	-26,6	5,9E-10
PA3916	moaE	0,3	-12,4	5,0E-07
PA3917	moaD	0,3	-13,8	2,0E-07
PA3918	moaC	0,2	-17,4	2,6E-08
PA4919	pncB1	0,1	-24,7	1,1E-09
PA5118	thiI	0,5	-7,0	5,9E-05
Nucleotide biosynthesis and metabolism				
PA0401	/	0,5	-4,4	1,7E-03
PA0403	pyrR	0,4	-11,6	9,1E-07
PA0590	apaH	0,5	-10,3	2,6E-06
PA1155	nrdB	0,5	-11,8	8,0E-07
PA1156	nrdA	0,5	-6,0	1,8E-04
PA1920	nrdD	0,3	-8,0	2,0E-05
PA3807	ndk	0,4	-7,6	3,0E-05
PA5298	/	0,4	-6,4	1,2E-04
PA5336	gmk	0,4	-5,9	2,1E-04
PA5496	nrdJb	0,2	-6,4	1,2E-04
PA5497	nrdJa	0,2	-8,2	1,6E-05
Central intermediary metabolism				
PA0795	prpC	6,1	20,6	5,8E-09
PA2001	atoB	3,9	18,4	1,6E-08
PA2193	hcnA	0,3	-13,9	1,9E-07
PA2194	hcnB	0,4	-9,4	5,6E-06
PA2442	gcvT2	7,5	24,0	1,5E-09
PA2445	gcvP2	4,6	14,7	1,2E-07
PA2717	cpo	2,4	9,4	5,4E-06
PA3181	/	0,2	-22,4	2,8E-09
PA3182	pgl	0,2	-17,8	2,1E-08
PA3452	mqoA	0,4	-7,9	2,4E-05
PA3561	fruK	0,3	-18,5	1,5E-08
PA3562	fruI	0,3	-15,4	7,9E-08
PA3582	glpK	4,9	18,0	1,9E-08
PA3629	adhC	0,4	-10,9	1,6E-06
PA4563	rpsT	0,5	-3,6	5,9E-03
PA4865	ureA	0,4	-10,0	3,3E-06
PA5046	/	0,4	-9,0	7,9E-06
PA5056	phaC1	2,9	13,3	2,8E-07
PA5058	phaC2	2,6	9,0	7,9E-06
PA5060	phaF	2,2	11,4	1,1E-06
PA5110	fbp	0,5	-5,8	2,5E-04
PA5353	glcF	5,1	12,0	6,6E-07

PA5354	glcE	4,6	15,4	7,9E-08
PA5355	glcD	8,5	30,0	2,0E-10
PA5421	fdhA	2,4	9,7	4,2E-06
PA5435	/	0,2	-10,6	2,0E-06
PA5436	/	0,1	-17,8	2,1E-08
Fatty acid and phospholipid metabolism				
PA0228	pcaF	13,9	31,0	1,5E-10
PA0447	gcdH	15,9	27,2	4,8E-10
PA0796	prpB	4,2	13,6	2,3E-07
PA1609	fabB	0,4	-11,3	1,1E-06
PA1610	fabA	0,3	-12,2	5,8E-07
PA2557	/	6,4	23,7	1,6E-09
PA2966	acpP	0,4	-9,3	6,1E-06
PA2967	fabG	0,4	-7,3	4,3E-05
PA2968	fabD	0,3	-10,9	1,6E-06
PA3300	fadD2	2,0	9,3	5,9E-06
PA3333	fabH2	2,9	7,3	4,2E-05
PA3334	/	4,0	9,7	4,3E-06
PA4888	desB	3,2	16,2	5,0E-08
PA5174	/	0,2	-19,2	1,1E-08
Transport of small molecules				
PA0280	cysA	2,7	8,4	1,3E-05
PA0295	/	0,3	-7,6	3,0E-05
PA0603	agtA	8,7	18,5	1,5E-08
PA0604	agtB	14,8	27,8	3,9E-10
PA0866	aroP2	4,0	7,3	4,1E-05
PA1074	braC	2,4	9,5	4,9E-06
PA1183	dctA	0,3	-16,8	3,6E-08
PA1339	aatP	2,6	10,9	1,6E-06
PA1342	aatJ	2,4	10,9	1,6E-06
PA1863	modA	0,3	-11,7	8,7E-07
PA1946	rbsB	2,8	12,5	4,9E-07
PA1947	rbsA	4,7	20,6	5,8E-09
PA1948	rbsC	3,3	15,9	5,8E-08
PA2018	mexY	6,6	19,4	1,0E-08
PA2019	mexX	8,2	20,1	7,4E-09
PA2113	opdO	0,2	-12,9	3,5E-07
PA2329	/	2,8	7,4	4,0E-05
PA2338	/	4,4	17,2	2,8E-08
PA2339	/	3,9	9,2	6,8E-06
PA2340	/	4,4	15,0	9,9E-08
PA2341	/	4,0	15,7	6,5E-08
PA2711	/	2,1	7,9	2,3E-05
PA3038	/	14,9	37,3	2,7E-11
PA3186	oprB	0,4	-7,3	4,5E-05
PA3187	/	0,1	-17,6	2,4E-08
PA3188	/	0,1	-21,4	4,1E-09
PA3189	/	0,3	-15,3	8,3E-08

PA3190	/	0,5	-6,8	7,2E-05
PA3523	/	3,4	3,0	1,5E-02
PA3641	/	0,4	-10,0	3,3E-06
PA3790	oprC	0,2	-7,9	2,2E-05
PA3865	/	0,5	-9,9	3,5E-06
PA3891	opuCA	2,1	8,0	2,0E-05
PA4496	/	5,3	22,7	2,4E-09
PA4497	/	5,7	23,2	2,0E-09
PA4501	opdD	3,3	13,4	2,5E-07
PA4590	pra	7,6	19,4	1,0E-08
PA4616	/	0,4	-11,2	1,2E-06
PA4675	chtA	0,4	-9,3	6,0E-06
PA4687	hitA	0,4	-8,2	1,7E-05
PA4910	/	2,6	8,9	8,5E-06
PA4913	/	5,1	20,6	5,7E-09
PA5094	/	6,7	22,7	2,5E-09
PA5096	/	3,8	13,8	2,0E-07
PA5153	/	2,4	11,6	9,3E-07
PA5217	/	0,4	-4,9	8,6E-04
PA5531	tonB1	0,4	-4,5	1,4E-03
Membrane proteins				
PA0162	opdC	0,1	-22,3	2,8E-09
PA0215	/	15,9	35,9	3,9E-11
PA0216	/	6,9	24,2	1,4E-09
PA0229	pcaT	7,6	20,4	6,5E-09
PA0281	cysW	3,1	5,5	3,6E-04
PA0291	oprE	0,4	-12,0	6,8E-07
PA0605	agtC	10,9	22,6	2,5E-09
PA0606	agtD	7,4	18,3	1,6E-08
PA0783	putP	0,2	-17,5	2,5E-08
PA0833	/	0,5	-6,3	1,4E-04
PA1041	/	6,7	14,0	1,8E-07
PA1053	/	0,4	-11,2	1,2E-06
PA1190	/	3,2	7,4	3,6E-05
PA1245	aprX	3,8	14,3	1,5E-07
PA1429	/	0,5	-11,9	7,1E-07
PA1647	/	0,4	-10,0	3,2E-06
PA1775	cmpX	0,3	-13,9	1,9E-07
PA1819	/	2,7	9,9	3,4E-06
PA1895	/	7,3	19,6	8,9E-09
PA2004	/	8,5	17,0	3,1E-08
PA2114	/	0,1	-24,2	1,4E-09
PA2331	/	4,7	9,2	6,6E-06
PA2375	/	3,9	16,7	3,8E-08
PA2533	/	2,1	8,6	1,1E-05
PA2662	/	2,5	7,5	3,3E-05

PA2663	ppyR	2,8	9,1	6,8E-06
PA2746	/	3,4	10,2	2,8E-06
PA2761	/	0,4	-6,1	1,8E-04
PA2916	/	3,9	11,3	1,1E-06
PA3041	/	2,0	9,4	5,4E-06
PA3234	/	8,0	19,5	9,5E-09
PA3235	/	6,9	21,4	4,1E-09
PA3267	/	0,5	-10,1	3,0E-06
PA3336	/	2,3	7,0	5,9E-05
PA3362	/	2,1	7,6	3,2E-05
PA3369	/	4,7	15,8	6,3E-08
PA3370	/	3,2	14,8	1,1E-07
PA3431	/	0,1	-24,6	1,2E-09
PA3432	/	0,1	-23,5	1,7E-09
PA3526	/	0,3	-13,0	3,3E-07
PA3575	/	0,3	-14,8	1,1E-07
PA3692	lptF	2,6	10,8	1,7E-06
PA3709	/	2,3	9,5	5,2E-06
PA3730	/	0,4	-10,7	1,8E-06
PA3747	/	0,5	-5,5	3,8E-04
PA3821	secD	0,4	-11,4	1,1E-06
PA3839	/	0,4	-7,0	5,7E-05
PA3876	narK2	0,0	-22,3	2,9E-09
PA3877	narK1	0,0	-20,2	6,8E-09
PA3901	fecA	0,1	-11,3	1,2E-06
PA3920	/	5,6	4,5	1,3E-03
PA4292	/	0,5	-6,4	1,1E-04
PA4317	/	0,4	-14,6	1,2E-07
PA4358	/	0,4	-8,0	2,1E-05
PA4628	lysP	0,5	-9,5	4,8E-06
PA4688	hitB	0,5	-7,6	3,2E-05
PA4757	/	0,4	-8,2	1,7E-05
PA4876	osmE	3,3	14,1	1,7E-07
PA5095	/	5,2	14,3	1,5E-07
PA5097	/	5,2	15,9	5,8E-08
PA5099	/	4,6	14,7	1,1E-07
PA5230	/	0,4	-8,1	1,9E-05
PA5231	/	0,4	-13,3	2,8E-07
PA5244	/	0,5	-8,3	1,5E-05
PA5479	gltP	0,4	-9,8	3,9E-06
PA5482	/	13,5	21,5	3,9E-09
PA5530	/	2,2	8,9	8,4E-06
PA5568	/	0,4	-12,0	6,6E-07
Transcriptional regulators and Two-component regulatory systems				
PA0408	pilG	0,5	-5,3	4,5E-04

PA0527	dnr	0,5	-4,3	1,9E-03
PA0547	/	3,4	18,6	1,4E-08
PA0839	/	0,4	-7,2	5,0E-05
PA0961	/	0,3	-9,2	6,7E-06
PA1776	sigX	0,4	-14,5	1,3E-07
PA1976	ercS'	2,4	6,2	1,4E-04
PA1978	erbR	2,4	9,1	7,4E-06
PA2020	mexZ	8,4	24,3	1,3E-09
PA2320	gntR	0,4	-12,1	6,5E-07
PA2511	antR	10,1	26,7	5,7E-10
PA2519	xylS	3,1	15,3	8,0E-08
PA2572	/	3,0	8,5	1,2E-05
PA2588	/	2,4	8,6	1,1E-05
PA2917	/	2,3	8,2	1,6E-05
PA3006	psrA	0,2	-11,6	9,1E-07
PA3351	flgM	0,5	-6,8	7,4E-05
PA3363	amiR	3,5	9,9	3,4E-06
PA3364	amiC	3,4	14,9	1,0E-07
PA3622	rpoS	2,8	13,7	2,2E-07
PA3757	nagR	0,5	-9,2	6,6E-06
PA3921	/	2,1	9,1	7,3E-06
PA3948	rocA1	0,5	-6,7	8,1E-05
PA4112	/	2,3	8,3	1,5E-05
PA4147	acoR	2,3	7,8	2,5E-05
PA4296	pprB	2,6	8,2	1,7E-05
PA4499	/	0,5	-8,3	1,5E-05
PA4596	esrC	0,3	-12,3	5,7E-07
PA4776	pmrA	3,2	8,8	9,3E-06
PA4843	gcbA	0,3	-13,0	3,4E-07
PA4878	brlR	2,1	3,2	1,1E-02
PA5274	rnk	0,4	-9,0	8,1E-06
PA5374	betI	0,1	-12,9	3,6E-07
PA5380	gbdR	2,9	11,9	7,3E-07
PA5437	/	0,4	-15,3	8,1E-08
Putative enzymes				
PA0075	pppA	0,4	-16,2	4,9E-08
PA0209	/	13,6	24,0	1,5E-09
PA0473	/	2,1	8,3	1,6E-05
PA0493	/	0,1	-34,1	6,1E-11
PA0494	/	0,2	-20,1	7,1E-09
PA0534	pauB1	3,9	11,2	1,2E-06
PA0637	/	2,1	7,9	2,2E-05
PA0704	/	2,0	7,1	5,4E-05
PA0744	/	5,2	22,7	2,5E-09
PA0745	/	6,6	26,1	6,8E-10
PA0746	/	5,0	15,8	6,2E-08
PA0747	/	4,7	19,1	1,1E-08
PA1137	/	0,3	-6,1	1,7E-04
PA1202	/	5,2	18,0	1,9E-08

PA1617	/	2,7	7,7	2,7E-05
PA1654	/	0,3	-9,1	7,3E-06
PA1655	/	0,5	-8,9	8,5E-06
PA1860	/	2,5	8,3	1,5E-05
PA1880	/	3,4	15,6	7,0E-08
PA1881	/	2,9	10,7	1,9E-06
PA1893	/	4,0	18,5	1,5E-08
PA1984	exaC	2,4	9,8	3,8E-06
PA2024	/	4,0	14,7	1,2E-07
PA2069	/	3,1	6,1	1,7E-04
PA2305	ambB	3,4	14,9	1,0E-07
PA2541	/	0,5	-6,0	2,0E-04
PA2552	/	6,5	18,5	1,5E-08
PA2553	/	7,5	24,4	1,3E-09
PA2554	/	5,9	17,9	2,0E-08
PA2555	/	7,6	16,1	5,1E-08
PA2682	/	26,3	24,4	1,2E-09
PA2698	/	2,5	8,6	1,1E-05
PA2815	/	3,6	12,0	6,7E-07
PA3232	/	2,6	6,3	1,3E-04
PA3328	/	3,5	10,6	2,0E-06
PA3330	/	3,3	9,8	3,9E-06
PA3460	/	2,9	6,8	7,2E-05
PA3516	/	24,0	5,5	3,7E-04
PA3535	/	3,9	8,3	1,5E-05
PA3559	/	2,1	4,4	1,6E-03
PA3567	/	0,5	-10,2	2,8E-06
PA3568	/	12,4	21,5	3,9E-09
PA3723	/	4,4	15,0	9,5E-08
PA3768	/	0,4	-5,6	3,1E-04
PA3859	/	0,4	-8,1	1,8E-05
PA3913	/	0,2	-12,3	5,3E-07
PA4209	phzM	10,2	14,0	1,8E-07
PA4217	phzS	6,8	7,6	3,0E-05
PA4786	/	2,0	7,8	2,6E-05
PA4889	/	4,1	12,3	5,4E-07
PA4899	/	3,4	14,0	1,8E-07
PA5093	/	2,9	12,8	4,0E-07
PA5546	/	2,6	12,4	5,1E-07
Secreted Factors (toxins, enzymes, alginate)				
PA0423	pasP	0,4	-12,0	6,8E-07
PA0852	cpbD	4,4	14,3	1,4E-07
PA1246	aprD	4,2	13,3	2,7E-07
PA1247	aprE	6,3	17,3	2,8E-08
PA1248	aprF	3,6	15,9	5,8E-08
PA1249	aprA	46,4	34,7	5,3E-11
PA1250	aprI	6,8	16,1	5,2E-08
PA1871	lasA	8,7	11,6	9,0E-07
PA1901	phzC2	9,7	12,9	3,7E-07

PA1902	phzD2	10,2	11,2	1,3E-06
PA1903	phzE2	10,6	13,8	2,0E-07
PA1904	phzF2	11,2	11,9	7,4E-07
PA1905	phzG2	11,8	12,8	3,9E-07
PA2302	ambE	3,2	11,9	7,1E-07
PA2303	ambD	3,5	17,2	2,8E-08
PA2304	ambC	3,4	12,3	5,3E-07
PA2939	/	25,8	31,4	1,3E-10
PA3478	rhlB	3,9	11,0	1,4E-06
PA3479	rhlA	3,7	14,0	1,8E-07
PA3724	lasB	45,0	39,0	1,8E-11
PA3841	exoS	0,5	-4,6	1,3E-03
PA4175	piv	6,4	20,0	7,4E-09
PA4211	phzB1	11,8	10,7	1,8E-06
Protein secretion/export apparatus				
PA0077	icmF1	0,4	-9,6	4,7E-06
PA3095	xcpZ	2,5	10,9	1,5E-06
PA3096	xcpY	2,7	9,9	3,6E-06
PA3098	xcpW	2,9	12,4	5,2E-07
PA3099	xcpV	2,2	9,4	5,4E-06
PA3100	xcpU	2,3	7,9	2,3E-05
PA3101	xcpT	2,4	12,2	5,9E-07
PA3103	xcpR	2,4	13,4	2,7E-07
PA4276	secE	0,4	-6,6	9,0E-05
Cell wall / LPS / capsule				
PA0869	pbpG	0,4	-8,6	1,2E-05
PA1077	flgB	0,3	-9,1	7,0E-06
PA1078	flgC	0,4	-7,5	3,3E-05
PA1079	flgD	0,4	-12,2	5,9E-07
PA1081	flgF	0,3	-6,8	7,2E-05
PA1082	flgG	0,4	-9,8	3,7E-06
PA1083	flgH	0,5	-9,6	4,7E-06
PA1086	flgK	0,5	-9,4	5,6E-06
PA1100	fliE	0,3	-10,3	2,6E-06
PA1101	fliF	0,4	-11,0	1,5E-06
PA1130	rhlC	3,3	11,8	7,6E-07
PA3337	rfaD	0,4	-11,7	8,7E-07
PA3645	fabZ	0,4	-5,3	4,8E-04
PA4480	mreC	0,4	-12,6	4,5E-07
Adaptation, Protection				
PA0059	osmC	2,4	10,7	1,8E-06
PA0074	ppkA	0,4	-13,0	3,4E-07
PA0176	aer2	2,8	11,7	8,2E-07
PA1459	/	0,5	-9,8	3,7E-06
PA1561	aer	0,2	-16,1	5,3E-08
PA1608	/	0,3	-17,9	2,0E-08
PA1930	/	3,4	13,2	3,0E-07

PA2532	tpx	2,0	8,7	1,0E-05
PA2573	/	4,6	17,3	2,8E-08
PA2652	/	0,3	-17,3	2,7E-08
PA2654	/	0,5	-9,0	7,7E-06
PA2788	/	0,3	-15,9	5,7E-08
PA2850	ohr	0,4	-11,1	1,4E-06
PA3007	lexA	0,4	-7,9	2,3E-05
PA3327	/	2,8	9,2	6,3E-06
PA3331	/	2,8	7,5	3,6E-05
PA3365	/	7,2	22,4	2,8E-09
PA3529	/	0,5	-8,1	1,9E-05
PA4290	/	2,5	10,9	1,5E-06
PA4307	pctC	0,4	-6,8	7,1E-05
PA4309	pctA	0,3	-9,7	4,0E-06
PA4310	pctB	0,2	-14,9	1,0E-07
PA4613	katB	5,3	15,1	9,0E-08
PA4633	/	0,4	-11,2	1,2E-06
PA4671	/	0,5	-11,0	1,4E-06
PA4915	/	2,7	14,8	1,1E-07
PA4954	motA	0,5	-11,0	1,5E-06
PA5272	cyaA	0,4	-8,6	1,2E-05
Motility & Attachment				
PA4525	pilA	0,0	-42,7	8,0E-12
PA4526	pilB	0,2	-18,5	1,5E-08
PA4550	fimU	0,5	-8,1	1,8E-05
PA5041	pilP	0,5	-9,4	5,6E-06
PA5042	pilO	0,5	-9,6	4,7E-06
Antibiotic resistance and susceptibility				
PA0807	ampDh3	2,0	7,8	2,4E-05
PA5471	armZ	6,2	16,2	5,0E-08
Cell division				
PA5563	soj	0,4	-9,3	6,1E-06
PA5564	gidB	0,5	-8,8	9,4E-06
DNA replication, recombination, modification and repair				
PA3940	/	0,3	-18,2	1,8E-08
PA5348	/	3,2	13,3	2,8E-07
Transcription, RNA processing and degradation				
PA2840	/	0,3	-13,3	2,8E-07
PA3308	hepA	0,4	-13,4	2,7E-07
PA4275	nusG	0,4	-5,8	2,6E-04
PA3823	tgt	0,5	-9,2	6,6E-06
PA4264	rpsJ	0,5	-6,6	9,1E-05
Translation, post-translational modification, degradation				

PA0019	def	0,4	-8,9	8,9E-06
PA0090	clpV1	0,4	-10,1	3,0E-06
PA2071	fusA2	2,1	10,1	2,9E-06
PA2618	/	2,5	12,8	3,9E-07
PA2619	infA	0,5	-3,8	4,3E-03
PA2740	pheS	0,5	-9,6	4,5E-06
PA2755	eco	0,3	-16,5	4,1E-08
PA2851	efp	0,5	-8,1	1,8E-05
PA3049	rmf	2,9	8,6	1,1E-05
PA3326	clpP2	3,1	14,8	1,1E-07
PA3655	tsf	0,4	-11,1	1,3E-06
PA3656	rpsB	0,4	-10,9	1,5E-06
PA3871	/	0,4	-7,0	5,7E-05
PA4248	rplF	0,5	-10,2	2,6E-06
PA4249	rpsH	0,4	-7,0	5,9E-05
PA4433	rplM	0,4	-6,0	1,8E-04
PA4482	gatC	0,4	-6,9	7,0E-05
PA4568	rplU	0,4	-6,7	8,7E-05
PA4672	/	0,4	-15,4	7,7E-08
PA4743	rbfA	0,5	-7,7	2,8E-05
PA5051	argS	0,3	-12,4	5,2E-07
PA5440	/	0,5	-8,1	1,8E-05
PA5470	/	10,7	26,9	5,3E-10
Hypothetical, unclassified, unknown				
PA0045	/	0,1	-24,5	1,2E-09
PA0046	/	0,2	-18,3	1,7E-08
PA0047	/	0,2	-18,7	1,4E-08
PA0049	/	0,2	-10,4	2,3E-06
PA0052	/	2,4	11,0	1,5E-06
PA0076	tagF1	0,3	-11,6	9,4E-07
PA0080	tssJ1	0,5	-4,6	1,3E-03
PA0091	vgrG1	0,3	-19,5	9,6E-09
PA0094	/	0,4	-9,7	4,1E-06
PA0110	/	3,0	11,9	7,3E-07
PA0111	/	3,6	9,3	6,1E-06
PA0114	senC	0,4	-10,5	2,2E-06
PA0122	rahU	4,0	14,6	1,3E-07
PA0126	/	0,2	-13,8	2,0E-07
PA0128	/	0,5	-7,1	5,4E-05
PA0141	/	0,3	-12,2	5,7E-07
PA0160	/	0,5	-8,8	9,3E-06
PA0165	/	0,2	-21,9	3,3E-09
PA0201	/	0,5	-7,8	2,5E-05
PA0261	/	0,5	-7,9	2,2E-05
PA0277	/	0,2	-14,4	1,4E-07
PA0354	/	0,5	-5,3	4,6E-04
PA0422	/	0,3	-12,8	4,0E-07
PA0446	/	8,6	28,1	3,5E-10
PA0484	/	4,4	16,5	4,3E-08

PA0492	/	0,1	-38,2	2,2E-11
PA0495	/	0,1	-24,4	1,3E-09
PA0496	/	0,3	-11,9	7,3E-07
PA0529	/	0,5	-9,7	4,0E-06
PA0563	/	0,3	-10,3	2,5E-06
PA0565	/	2,6	6,2	1,4E-04
PA0572	/	3,6	9,6	4,6E-06
PA0586	/	4,1	16,3	4,7E-08
PA0587	/	2,6	9,7	4,2E-06
PA0588	/	3,6	16,0	5,5E-08
PA0591	/	0,5	-7,2	4,7E-05
PA0758	/	0,5	-6,5	1,1E-04
PA0793	/	7,4	19,9	7,9E-09
PA0803	/	2,3	7,9	2,3E-05
PA0911	/	2,6	8,1	1,9E-05
PA1009	/	0,5	-5,8	2,4E-04
PA1035	/	0,4	-10,6	2,0E-06
PA1095	/	0,2	-11,6	9,3E-07
PA1096	/	0,2	-14,7	1,2E-07
PA1123	/	0,5	-6,5	1,0E-04
PA1132	/	0,4	-9,0	7,8E-06
PA1135	/	2,0	6,8	7,6E-05
PA1168	/	2,2	5,6	3,0E-04
PA1198	/	2,1	7,0	5,6E-05
PA1203	/	2,3	11,0	1,4E-06
PA1215	/	2,0	5,0	7,0E-04
PA1216	/	19,7	20,3	6,8E-09
PA1218	/	2,4	9,7	4,3E-06
PA1228	/	0,2	-20,1	7,2E-09
PA1323	/	3,2	14,8	1,1E-07
PA1324	/	3,4	15,7	6,4E-08
PA1348	/	2,2	11,8	7,7E-07
PA1353	/	2,2	9,9	3,4E-06
PA1354	/	2,7	12,6	4,3E-07
PA1404	/	3,3	15,8	6,2E-08
PA1463	/	0,5	-6,9	6,4E-05
PA1517	/	0,4	-9,4	5,4E-06
PA1518	/	0,5	-7,1	5,5E-05
PA1571	/	3,0	11,3	1,1E-06
PA1604	/	0,5	-7,4	3,9E-05
PA1605	/	2,3	6,1	1,6E-04
PA1679	/	0,3	-10,2	2,8E-06
PA1728	/	5,4	21,0	5,0E-09
PA1732	/	2,4	11,7	8,2E-07
PA1733	/	2,9	9,3	5,8E-06
PA1745	/	3,7	11,5	9,5E-07
PA1761	/	2,5	12,3	5,4E-07
PA1774	crfX	0,4	-8,4	1,4E-05
PA1784	/	3,7	11,0	1,5E-06
PA1823	/	2,1	6,6	9,8E-05

PA1837	/	3,2	9,2	6,6E-06
PA1852	/	0,3	-16,4	4,5E-08
PA1888	/	2,4	13,8	2,0E-07
PA1892	/	4,2	12,7	4,0E-07
PA1894	/	9,4	23,5	1,8E-09
PA1896	/	5,2	14,0	1,7E-07
PA1897	/	4,5	10,8	1,7E-06
PA1913	/	0,5	-6,2	1,4E-04
PA1944	/	2,4	7,5	3,6E-05
PA1981	/	4,3	6,5	1,0E-04
PA2002	/	2,0	9,0	7,6E-06
PA2030	/	2,0	10,1	2,9E-06
PA2109	/	0,4	-11,9	7,5E-07
PA2110	/	0,1	-25,0	1,0E-09
PA2111	/	0,1	-16,5	4,1E-08
PA2112	/	0,1	-19,3	1,0E-08
PA2116	/	0,1	-17,0	3,2E-08
PA2126	cgrC	0,4	-11,1	1,3E-06
PA2143	/	2,3	9,1	7,2E-06
PA2146	/	2,2	9,8	3,8E-06
PA2166	/	6,3	18,2	1,7E-08
PA2171	/	3,0	9,4	5,6E-06
PA2174	/	2,9	7,0	6,1E-05
PA2182	/	2,6	10,1	2,9E-06
PA2190	/	5,4	18,1	1,8E-08
PA2264	/	0,5	-8,2	1,7E-05
PA2328	/	2,1	4,7	1,1E-03
PA2330	/	4,4	10,4	2,4E-06
PA2360	/	3,0	14,2	1,6E-07
PA2365	/	6,3	10,8	1,6E-06
PA2366	/	8,2	14,0	1,8E-07
PA2367	/	5,0	12,1	6,5E-07
PA2368	/	3,8	9,2	6,6E-06
PA2370	/	2,5	7,9	2,3E-05
PA2373	vgrG3	2,2	6,2	1,5E-04
PA2423	/	2,3	11,0	1,5E-06
PA2433	/	7,9	24,9	1,0E-09
PA2453	/	0,3	-11,2	1,2E-06
PA2462	/	0,4	-10,7	1,8E-06
PA2504	/	2,4	9,4	5,3E-06
PA2544	/	2,6	12,3	5,6E-07
PA2564	/	2,1	4,0	3,1E-03
PA2565	/	2,7	9,7	4,1E-06
PA2566	/	2,1	4,0	3,3E-03
PA2630	/	0,4	-8,5	1,3E-05
PA2667	mvaU	0,5	-7,9	2,3E-05
PA2699	/	2,4	12,0	6,6E-07
PA2721	/	2,1	10,2	2,8E-06
PA2747	/	11,2	25,7	7,9E-10
PA2753	/	0,5	-6,5	1,0E-04

PA2764	/	2,6	11,2	1,2E-06
PA2779	/	3,1	11,4	1,1E-06
PA2781	/	2,2	6,9	6,4E-05
PA2799	/	2,2	6,2	1,6E-04
PA2937	/	4,0	7,3	4,2E-05
PA3018	/	0,5	-9,7	4,2E-06
PA3054	/	0,4	-7,2	4,8E-05
PA3089	/	2,1	9,3	6,0E-06
PA3233	/	3,6	7,1	5,6E-05
PA3250	/	3,9	16,6	4,0E-08
PA3263	/	0,4	-6,3	1,4E-04
PA3274	/	2,1	9,4	5,3E-06
PA3329	/	3,3	7,6	3,1E-05
PA3332	/	2,7	8,3	1,5E-05
PA3335	/	3,5	10,1	3,0E-06
PA3352	/	0,5	-6,3	1,3E-04
PA3371	/	3,9	11,0	1,5E-06
PA3425	/	3,1	11,7	8,2E-07
PA3436	/	0,4	-6,8	7,0E-05
PA3451	/	3,3	8,7	1,1E-05
PA3461	/	2,3	7,0	5,8E-05
PA3472	/	2,5	10,1	3,0E-06
PA3515	/	10,4	4,0	3,0E-03
PA3518	/	7,7	4,1	2,7E-03
PA3519	/	27,2	5,6	3,4E-04
PA3520	/	9,5	4,7	1,1E-03
PA3566	/	0,3	-10,8	1,7E-06
PA3613	/	0,4	-5,5	3,4E-04
PA3614	/	0,4	-10,7	1,8E-06
PA3631	/	0,5	-7,9	2,3E-05
PA3632	/	0,4	-11,1	1,3E-06
PA3688	/	4,7	22,7	2,4E-09
PA3722	/	0,5	-9,3	6,2E-06
PA3727	/	0,4	-10,5	2,2E-06
PA3728	/	0,5	-10,3	2,5E-06
PA3729	/	0,5	-6,7	7,9E-05
PA3732	/	0,4	-11,1	1,3E-06
PA3822	/	0,4	-8,2	1,7E-05
PA3840	/	0,5	-8,2	1,6E-05
PA3846	/	2,1	10,3	2,5E-06
PA3911	/	0,4	-7,4	3,9E-05
PA3912	/	0,3	-8,9	8,4E-06
PA3922	/	9,2	28,6	3,1E-10
PA3923	/	6,9	13,9	2,0E-07
PA3952	/	2,1	4,5	1,3E-03
PA3967	/	0,4	-6,6	9,6E-05
PA3981	/	0,4	-9,8	3,9E-06
PA3982	/	0,5	-8,2	1,6E-05
PA3986	/	2,9	11,9	7,4E-07
PA4029	/	0,5	-4,7	1,1E-03

PA4129	/	2,0	7,4	3,8E-05
PA4134	/	2,7	4,9	8,6E-04
PA4141	/	5,2	19,5	9,4E-09
PA4311	/	2,2	9,2	6,7E-06
PA4326	/	0,3	-14,3	1,5E-07
PA4348	/	0,5	-5,0	7,3E-04
PA4359	/	0,2	-16,3	4,8E-08
PA4362	/	2,2	9,6	4,5E-06
PA4440	/	0,4	-6,4	1,2E-04
PA4441	/	0,3	-12,5	4,7E-07
PA4454	/	0,5	-9,1	7,0E-06
PA4459	/	0,4	-7,1	5,3E-05
PA4489	magD	0,5	-8,4	1,3E-05
PA4490	magC	0,5	-9,3	5,9E-06
PA4492	magA	0,5	-11,7	8,3E-07
PA4523	/	2,1	8,2	1,7E-05
PA4573	/	3,8	12,1	6,3E-07
PA4583	/	0,5	-7,1	5,3E-05
PA4607	/	7,1	27,2	4,7E-10
PA4610	/	0,5	-4,6	1,2E-03
PA4611	/	0,4	-13,7	2,1E-07
PA4625	cdrA	2,4	8,9	8,7E-06
PA4632	/	0,5	-7,9	2,3E-05
PA4658	/	0,5	-3,5	6,4E-03
PA4683	/	0,2	-22,2	3,0E-09
PA4702	/	3,1	9,6	4,7E-06
PA4703	/	2,8	12,0	6,7E-07
PA4714	/	0,3	-16,7	3,7E-08
PA4737	/	0,5	-11,0	1,4E-06
PA4738	/	28,0	30,9	1,5E-10
PA4739	/	24,9	32,1	1,1E-10
PA4773	/	2,3	4,9	8,2E-04
PA4774	/	2,5	6,2	1,5E-04
PA4866	/	0,5	-7,9	2,3E-05
PA4870	/	2,2	5,3	4,6E-04
PA4877	/	2,4	11,2	1,2E-06
PA4916	/	0,2	-16,1	5,1E-08
PA4917	/	0,2	-19,2	1,1E-08
PA4918	/	0,1	-23,0	2,1E-09
PA4921	choE	0,4	-10,3	2,5E-06
PA4923	/	0,4	-10,1	2,9E-06
PA4925	/	2,8	9,9	3,5E-06
PA4968	/	0,5	-4,9	8,5E-04
PA4998	/	0,5	-5,2	5,5E-04
PA5052	/	0,5	-10,9	1,5E-06
PA5106	/	3,0	10,0	3,1E-06
PA5130	/	0,5	-6,0	2,0E-04
PA5137	/	2,4	11,9	7,4E-07
PA5201	/	0,5	-9,5	4,9E-06
PA5208	/	0,4	-6,4	1,2E-04

PA5220	/	3,8	12,4	5,1E-07
PA5225	/	0,4	-5,4	4,0E-04
PA5232	/	0,4	-11,6	8,8E-07
PA5270	/	0,3	-6,9	6,7E-05
PA5352	/	6,3	20,0	7,4E-09
PA5359	/	3,5	18,6	1,4E-08
PA5414	/	0,4	-8,8	9,8E-06
PA5446	/	0,4	-5,4	3,9E-04
PA5461	/	0,5	-11,7	8,6E-07
PA5462	/	0,4	-11,1	1,4E-06
PA5463	/	0,4	-7,7	2,9E-05
PA5481	/	7,2	19,4	1,0E-08
PA5494	/	0,5	-9,4	5,4E-06
PA5543	/	2,3	8,4	1,3E-05
PA5545	/	2,5	12,0	7,0E-07

Supplementary Table S2: Primers used in this study

PA number	Gene name	Primer name	Sequence (5'-3')
PA0291	*oprE*	FoprE	GGCGATGGCGAAGGTTCTA
		RoprE	CGCTGGAACTTGCCGATCT
PA0527	*dnr*	Fdnr	TTCCGGCTGCGTGAAGAT
		Rdnr	GCCTCGGCGAAGGTGTT
PA0779	*asrA*	FasrA	CCGCTTCAGTCCCAACGA
		RasrA	GCGGCAAGACCTTCTCCAT
PA0894	*aruB*	FaruB	GCGAGGTGCTGTTCCATCA
		RaruB	CAGTTCGGCAAGGACCTTCTC
PA0958	*oprD*	FoprD	CTACGGCTACGGCGAGGAT
		RoprD	CACGTACTTGGCTTCGAGGTT
PA1053		FPA1053	GGCGGCTGCCAATCC
		RPA1053	GGGCTTCCTCACGGCTGTA
PA1774	*cfrX*	FcfrX	CTGCGGGACCTGCTCAAG
		RcfrX	GCCGACCTGGCGATTG
PA1775	*cmpX*	FcmpX	TCGCCGGGCAGATCATT
		RcmpX	CACCTGTTGTCCGACCTGATAC
PA1777	*oprF*	FoprF	GCGTACAGCTGGACATGAAG
		RoprF	TTCATGAAGTCAGCCAGGTTCTT
PA2113	*opdO*	FopdO	CGGCTACCAGCGGATCAGT
		RopdO	GTAGCGCAGTTGCCAGGAA
PA2513	*antB*	FantB	GCGTCGAACAGTTCCTCTACC
		RantB	CTGCTCGGACTCCCACTG
PA3006	*psrA*	FpsrA	CGATTTCGGCGTGAACACTT
		RpsrA	CGAAGAACGGCACCATCAG
PA3038	*opdQ*	FopdQ	CGCCAACAAGGACGAGAAAT
		RopdQ	GGTCAGCAGGTCGATGTTGTC
PA3186	*oprB*	FoprB	GGACGCTACACCGACCAGTT
		RoprB	ATGCGGTCGTTGGAAAGGT
PA3366	*amiE*	FamiE	GGCGAGGAGGAAATGGGTAT
		RamiE	GTGGTTCTGCGACTGATCGTT
PA3405	*hasE*	FhasE	TGGACGAGAAGCGTTTTTCC
		RhasE	GAGACCCCGACACCCTTGT
PA4296	*pprB*	FpprB	TCGTCAAGGTCCTGGTTTCG
		RpprB	GGCGATGGTGGTGAGGAA
PA4306	*flp*	Fflp	GCAAACGCCATCGAATACG
		Rflp	TGGGACTCAATACGGCAATCA
PA4525	*pilA*	FpilA	TTGCCATTCCCCAGTATCAGA
		RpilA	CAGCGCCGAAGCACCTT
PA4726.11	*crcZ*	FcrcZ	AGCGCACAGACTGGTTGGAT
		RcrcZ	GCTGGGAGTTCAATAGCAAACG
PA4843	*gcbA*	FPA4843	CGGCGGACAGGTAGATGATC
		RPA4843	CCTGGGCACCGAATTGG
PA5091	*hutG*	FhutG	ACCGATACCGACTGGCACAT
		RhutG	TCGGAAGGGCGGTTGAG
PA5332	*crc*	Fcrc	TGATCAGCGGCTTAGGTTTC
		Rcrc	TTCTGGTTCAAGCTCTCGTC

16SRNA		F16S	AACCTGGGAACTGCATCCAA
		R16S	CTTCGCCACTGGTGTTCCTT

Supplementary Table S3, Proteomic data

Accession	PA number	gene name	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Highest mean condition	Lowest mean condition	Description
gi|15595360	pa0162	opdC	146,65	4,85E-05	8,9	H103VV	PAOSXVV	probable porin [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595408	pa0211	mdcD	142,07	3,97E-05	31,6	PAOSXVV	H103VV	acetyl-CoA carboxylase beta subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595409	pa0212	mdcE	169,5	9,09E-05	44,4	PAOSXVV	H103VV	malonate decarboxylase gamma subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595424	pa0227	operon 228	397,72	3,85E-05	17,5	PAOSXVV	H103VV	probable CoA transferase, subunit B [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595425	pa0228	pcaF	444,97	1,74E-05	16,1	PAOSXVV	H103VV	acetyl-CoA acetyltransferase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595474	PA0277		554,38	0,000369688	8,1	H103VV	PAOSXVV	hypothetical protein PA0277 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595801	pa0604		163,51	4,47E-05	3,8	PAOSXVV	H103VV	probable binding protein component of ABC transporter [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595819	pa0622		229,56	0,000295543	13,1	H103VV	PAOSXVV	probable bacteriophage protein [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15595951	PA0754		334,32	3,28E-05	7,1	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA0754 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596049	pa0852	cbpD	228	0,000110289	8,3	H103VV	PAOSXVV	chitin-binding protein CbpD precursor [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596067	pa0870	phhC	188,53	0,000704648	2,4	PAOSXVV	H103VV	aromatic amino acid aminotransferase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596155	pa0958	oprD	143,25	4,93E-07	3,5	H103VV	PAOSXVV	Basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD precursor [Pseudomonas aeru
gi|15596194	pa0997	pqsB	290,42	0,000237974	11,5	H103VV	PAOSXVV	beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase-like protein [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596195	pa0998	pqsC	199,16	2,52E-05	4,5	H103VV	PAOSXVV	beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase-like protein [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596196	PA0999	pqsD	297,36	7,54E-06	6,1	H103VV	PAOSXVV	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596534	PA1337	ansB	478,14	0,000791518	2,4	PAOSXVV	H103VV	glutaminase-asparaginase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596651	pa1454	FleN	73,49	0,001628297	2,6	PAOSXVV	H103VV	flagellar synthesis regulator FleN [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596691	pa1494		186,64	0,000305664	2,9	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA1494 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596743	pa1546	hemN	115,65	0,000139144	4,8	H103VV	PAOSXVV	coproporphyrinogen III oxidase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596854	pa1657	hsiB2	147,12	0,000556849	4,9	H103VV	PAOSXVV	hypothetical protein PA1657 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596855	pa1658	hsic2	584,3	0,000433715	5,0	H103VV	PAOSXVV	hypothetical protein PA1658 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15596994	pa1797	amt parRS	156,86	4,81E-05	18,4	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA1797 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597030	pa1833		263,04	0,000515554	2,2	PAOSXVV	H103VV	probable oxidoreductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597098	pa1901	phzC2	265,63	5,47E-05	30,4	H103VV	PAOSXVV	phenazine biosynthesis protein PhzC [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597099	pa1902	PhzD2	124,49	0,000345207	11,7	H103VV	PAOSXVV	phenazine biosynthesis protein PhzD [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597100	pa1903	phzE2	119,69	6,98E-07	16,2	H103VV	PAOSXVV	phenazine biosynthesis protein PhzE [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597101	pa1904	phzF2	219,7	0,000164119	11,1	H103VV	PAOSXVV	probable phenazine biosynthesis protein [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599411	pa1905	phzG2	81,99	0,00018802	8,1	H103VV	PAOSXVV	probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597197	pa2001	atoB	479,63	0,000393062	3,3	PAOSXVV	H103VV	acetyl-CoA acetyltransferase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597215	pa2019	mexX	121,36	0,000165743	48,2	PAOSXVV	H103VV	RND multidrug efflux membrane fusion protein precursor [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597199	pa2023	bdhA	307,12	0,000142373	5,4	PAOSXVV	H103VV	3-hydroxybutyrate dehydrogenase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597221	pa2025	gor	77,81	0,000882542	3,7	PAOSXVV	H103VV	glutathione reductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597265	pa2069		300,25	0,000109468	12,4	H103VV	PAOSXVV	probable carbamoyl transferase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597306	pa2110	op opdO	112,06	0,001707211	2,9	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA2110 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597312	PA2116		144,52	6,45E-05	3,3	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA2116 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597390	pa2194	hcnB	255,7	0,000153095	7,4	H103VV	PAOSXVV	hydrogen cyanide synthase HcnB [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597391	pa2195	hcnC	186,25	1,93E-05	10,3	H103VV	PAOSXVV	hydrogen cyanide synthase HcnC [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597443	pa2247	bkdA1	109,14	0,000937807	2,7	PAOSXVV	H103VV	2-oxoisovalerate dehydrogenase (alpha subunit) [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597445	pa2249	bkdB (op lpd	194,03	0,000545932	2,2	PAOSXVV	H103VV	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase (lipoamide component) [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597446	pa2250	lpdV	382,99	0,00046805	2,9	PAOSXVV	H103VV	dihydrolipoamide dehydrogenase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597499	pa2303	ambD	187,75	0,000514897	3,7	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA2303 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597519	pa2323		280,92	0,000493537	3,9	PAOSXVV	H103VV	probable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597526	pa2330		142,38	0,000417786	3,6	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA2330 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597703	PA2507	catA	492,47	8,16E-05	25,5	PAOSXVV	H103VV	catechol 1,2-dioxygenase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597705	pa2509	catB	257,43	0,000307925	8,5	PAOSXVV	H103VV	muconate cycloisomerase I [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597708	pa2512	antA	319,99	0,000408755	10,4	PAOSXVV	H103VV	anthranilate dioxygenase large subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597709	pa2513	antB	231,73	0,000159838	13,0	PAOSXVV	H103VV	anthranilate dioxygenase small subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597710	pa2514	antC	285,5	0,000174011	5,4	PAOSXVV	H103VV	anthranilate dioxygenase reductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597724	pa2528	muxA	146,45	0,000929962	4,8	PAOSXVV	H103VV	probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein precursor [Pseudomo
gi|15597819	pa2623	icd	189,48	0,000147349	2,5	PAOSXVV	H103VV	isocitrate dehydrogenase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597878	PA2682		797,67	1,36E-05	11,5	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA2682 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15597992	pa2796	tal	98,86	0,000421001	2,3	PAOSXVV	H103VV	transaldolase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598135	PA2939		425,42	0,000132652	5,5	H103VV	PAOSXVV	probable aminopeptidase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598163	pa2967	fabG	158,94	0,000110391	2,2	H103VV	PAOSXVV	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]

gi|15598164	pa2968	fabD	189,83	0,000369748	2,3	H103VV	PAOSXVV	malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598377	pa3181	ED	127,36	6,74E-05	2,0	PAOSXVV	H103VV	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598401	pa3205		62,57	0,000854443	3,9	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA3205 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598432	pa3236		142,34	0,000770749	4,7	H103VV	PAOSXVV	probable glycine betaine-binding protein precursor [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598749	pa3553	arnC	96,09	0,000895981	4,4	PAOSXVV	H103VV	probable glycosyl transferase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598750	pa3554		135,44	0,000997077	51,7	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA3554 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598452	pa3256		225,38	2,32E-05	3,3	PAOSXVV	H103VV	probable oxidoreductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598505	pa3309		131,11	0,001328293	2,0	H103VV	PAOSXVV	hypothetical protein PA3309 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598562	pa3366	amiE	107,94	0,001614823	2,6	PAOSXVV	H103VV	aliphatic amidase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598593	pa3397	fpr	203,4	0,000227622	2,4	H103VV	PAOSXVV	ferredoxin--NADP+ reductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598667	pa3471		105,78	0,000133325	2,5	PAOSXVV	H103VV	probable malic enzyme [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598748	pa3552	arnB	149,05	0,000385769	40,6	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA3552 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598757	pa3561	fruK	127,71	0,000428295	2,6	PAOSXVV	H103VV	1-phosphofructokinase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598778	PA3582	glpK	559,3	6,97E-05	5,3	PAOSXVV	H103VV	glycerol kinase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598803	pa3607	potA	107,19	1,36E-06	42020,3	H103VV	PAOSXVV	polyamine transport protein PotA [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598919	pa3724	lasb	342,45	0,000190492	8,6	H103VV	PAOSXVV	elastase LasB [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15598990	pa3795		97,44	0,000457634	2,5	PAOSXVV	H103VV	probable oxidoreductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599325	pa4130		187,12	0,000430612	2,9	H103VV	PAOSXVV	probable sulfite or nitrite reductase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599326	pa4131		140,21	0,00137996	20,9	H103VV	PAOSXVV	probable iron-sulfur protein [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599413	pa4217	phzS	112,26	0,001027343	5,0	H103VV	PAOSXVV	flavin-containing monooxygenase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599532	pa4336		135,38	0,000602604	3,6	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA4336 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599548	pa4352	uspA	248	0,000428057	3,1	H103VV	PAOSXVV	hypothetical protein PA4352 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599585	pa4389		54,01	0,001396743	5,0	PAOSXVV	H103VV	arginine decarboxylase (ADC) [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599721	pa4525	pilA	399,27	5,67E-06	17,2	H103VV	PAOSXVV	type 4 fimbrial precursor PilA [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599856	pa4661	pagL	158,42	0,000741049	3,3	PAOSXVV	H103VV	Lipid A 3-O-deacylase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599933	pa4739		168,02	0,000253717	6,1	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA4739 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15599968	pa4774		211,72	0,00022092	48,3	PAOSXVV	H103VV	hypothetical protein PA4774 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600073	pa4880		102,74	0,000822679	3,1	PAOSXVV	H103VV	probable bacterioferritin [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600289	pa5096		139,92	3,85E-05	18,8	PAOSXVV	H103VV	probable binding protein component of ABC transporter [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600291	pa5098	hutH	159,06	0,001624578	15,0	PAOSXVV	H103VV	histidine ammonia-lyase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600293	pa5100	hutU	200,25	0,000480114	5,9	PAOSXVV	H103VV	urocanate hydratase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600364	pa5171	arcA	180,76	0,001083277	3,9	H103VV	PAOSXVV	arginine deiminase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600367	pa5174		277,17	0,000124751	8,9	H103VV	PAOSXVV	probable beta-ketoacyl synthase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600413	pa5220		146,89	0,000958657	6,8	H103VV	PAOSXVV	hypothetical protein PA5220 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600609	pa5416	soxB	103,08	0,000508175	30,2	H103VV	PAOSXVV	sarcosine oxidase beta subunit [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600614	pa5421	fdhA	128,53	0,000868549	5,6	H103VV	PAOSXVV	glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600622	pa5429	aspA	466,76	0,000381364	35,9	H103VV	PAOSXVV	aspartate ammonia-lyase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]
gi|15600628	pa5435		162,76	7,50E-05	2,4	PAOSXVV	H103VV	oxaloacetate decarboxylase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]

Partie II- Formation de biofilm

Article 3 : Le sucrose favorise la production de pellicule via le facteur sigma ECF SigX chez *P. aeruginosa*.

Afin de préciser les fonctions cellulaires de SigX, nous avons recherché des conditions environnementales conduisant à son activité. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré qu'en présence de fortes concentrations de sucrose l'expression et l'activité de SigX est augmentée. Nous avons donc étudié l'effet de ces concentrations de sucrose sur la physiologie de *P. aeruginosa* H103 et de son mutant isogénique PAOSX. Nous avons observé qu'en présence de fortes concentrations de sucrose, la production de pellicule à l'interface air-liquide est augmentée chez la souche sauvage H103, un phénotype qui n'est pas observé en absence de SigX. Le dosage des ARN messagers par qRT-PCR a révélé que l'addition de sucrose conduit à la surexpression de *pel* chez la souche H103 tandis que l'expression de ce gène est fortement diminuée chez PAOSX. La formation de biofilm étant liée à un taux élevé de c-di-GMP, nous avons dosé de manière indirecte, grâce à un système rapporteur, le taux intracellulaire de c-di-GMP. Nous avons montré que chez H103, le taux intracellulaire de c-di-GMP augmente en présence de fortes concentrations de sucrose. En revanche ce phénotype est fortement diminué chez le mutant *sigX*. Enfin, en présence de sucrose la surexpression du gène PA4843 codant une diguanylate cyclase est en partie liée à l'activité de SigX. Des études menées au laboratoire ont suggéré que le sucrose présent en fortes concentrations entraine une perturbation de la structure pariétale. Ensembles ces résultats suggèrent que SigX pourrait être impliqué dans la formation de biofilm en réponse à une altération de la structure pariétale.

Lors de cette étude j'ai participé à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la formation de biofilm en réalisant le dosage des ARNm par qRT-PCR.

RESEARCH LETTER

Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX

Emeline Bouffartigues[1], Rachel Duchesne[1], Alexis Bazire[2], Marjolaine Simon[2], Olivier Maillot[1], Alain Dufour[2], Marc Feuilloley[1], Nicole Orange[1] & Sylvie Chevalier[1]

[1]Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM), EA 4312, Normandie Université, Université de Rouen, Rouen, France; and [2]EA 3884, LBCM, IUEM, Université Bretagne-Sud, Lorient, France

Correspondence: Sylvie Chevalier, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Micro-environnement, 55 rue St Germain, 27000 Evreux, France.
Tel.: + 33 2 322915 60;
fax: + 33 2 322915 50;
e-mail: sylvie.chevalier@univ-rouen.fr

Received 25 April 2014; revised 16 May 2014; accepted 16 May 2014.

DOI: 10.1111/1574-6968.12482

Editor: Kendra Rumbaugh

Keywords
c-di-GMP; Pel; pellicle; SigX; sucrose.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa biofilm formation was increased by addition of sucrose to Luria–Bertani medium, whereas addition of NaCl to a final similar osmolarity and use of maltose instead of sucrose, were ineffective. In a previous study, we showed that the extracytoplasmic sigma factor SigX is activated in the presence of sucrose. The sucrose-mediated pellicle increase was abolished in a *sigX* mutant strain. Sucrose addition led to an increase in *pel* expression and cyclic-diguanylate (c-di-GMP) pool level production. Interestingly, these two phenotypes were strongly decreased in a *sigX* mutant. Since *pel* is not known as a SigX-target, we suspect SigX to be involved in the c-di-GMP production. We found that expression of the diguanylate cyclase PA4843 gene was increased in the presence of sucrose at least partly through SigX activity. Our study shows that sucrose itself rather than osmolarity favours the biofilm mode of *P. aeruginosa* through the activation of SigX.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacterium capable of surviving in a broad range of natural environments including water and soils, although it is best known as an opportunistic human pathogen associated with antibiotic-resistant hospital-acquired infections and chronic infections (Filloux & Vallet, 2003; Buchanan *et al.*, 2009). Chronic infections have been associated with the formation of antibiotic-resistant biofilms. Biofilms are surface-associated microbial communities encased within an extracellular matrix that is critical for building and maintaining the biofilm structure, and which functions as a structural scaffold and/or a protective barrier against harsh environments (Mah & O'Toole, 2001; Sutherland, 2001; Branda *et al.*, 2005; Ryder *et al.*, 2007; Harmsen *et al.*, 2010). The matrix is composed of extracellular DNA, proteins, vesicles and exopolysaccharides. *Pseudomonas aeruginosa* is able to produce at least three exopolysaccharides types: Psl, Pel, and alginate. Alginate is a capsular polysaccharide virulence factor that confers the characteristic mucoid phenotype of *P. aeruginosa* in the cystic fibrosis airway (Wozniak *et al.*, 2003; Ryder *et al.*, 2007). In nonmucoid strains, Psl and/or Pel are the major exopolysaccharides components of the biofilm matrix. Psl contains a repeating pentasaccharide consisting of D-mannose, D-glucose and L-rhamnose (Byrd *et al.*, 2009), which serves as a scaffold and as a signalling molecule to stimulate biofilm formation (Irie *et al.*, 2012). Noticeably, Psl has been shown to be produced only by certain *P. aeruginosa* strains, such as PAO1 but not PA14 (Friedman & Kolter, 2004b). In the latter strain, the major exopolysaccharides produced is the glucose-rich and cellulase-sensitive Pel. Pel is required for the formation of pellicles, which develop at the air–liquid interface in standing cultures. It is acknowledged that transcription of *pel* and *psl* gene clusters is highly regulated, at least via the cyclic-diguanylate (c-di-GMP) pool level, which is required to increase biofilm formation (Mikkelsen *et al.*, 2011; Romling *et al.*, 2013).

Sucrose is one of the carbohydrates commonly found in the rhizosphere, creating an attractive niche for many microorganisms (Berg *et al.*, 2005; Reid & Abratt, 2005), and also a major component of the dental plaque, in which it causes major biochemical and physiological changes during the process of biofilm formation, leading

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

to dental caries (Paes Leme *et al.*, 2006). As high sucrose concentrations have been associated with increased medium osmolarity, it has been suggested that osmoadaptation is an important parameter for successful bacterial colonization (Miller & Wood, 1996). Despite the huge distribution of sucrose, little is known about the effects of high sucrose concentrations on bacteria. In this study, we show that sucrose (but not osmolarity) promotes biofilm formation of *P. aeruginosa* through a mechanism leading to increased c-di-GMP production at least partly via the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor SigX.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

The strains and plasmids are listed in Supporting Information, Table S1. Bacteria were grown at 37 °C on a rotary shaker (180 r.p.m.) in Luria–Bertani (LB) broth containing 171 mM NaCl. LB was supplemented with 171 mM NaCl (LBN), 1, 2, 5 or 11.7 % (342 mM, LBS) sucrose or with 11.7% maltose (LBM). Cultures were inoculated at an initial $OD_{580\ nm}$ of 0.08. For *Escherichia coli*, 10 μg mL^{-1} gentamycin (Gm), 100 μg mL^{-1} ampicillin (Ap), or 15 μg mL^{-1} tetracycline (Tc) were used when required. For *P. aeruginosa*, 50 μg mL^{-1} Gm, 300 μg mL^{-1} carbenicillin (Cb) or 250 μg mL^{-1} Tc were used when required. *Pseudomonas aeruginosa* sucrose utilization was assayed on the mineral medium 'Ayers, Rupp and Johnson' (ARJ), supplemented with 0.2 % glucose or sucrose.

Pellicle formation assays

Pellicles were allowed to form as previously described (Friedman & Kolter, 2004a) with minor modifications. Standing cultures were grown in 5 mL of medium in glass tubes, and the pellicles were evaluated by visual inspection of the air–liquid interface after 96 h of growth at 37 °C.

Biofilm formation assays

Quantification of biofilm was performed in 24-well polystyrene microtitre plates (Nunc). LB medium (2 mL per well) was inoculated to a final $OD_{580\ nm}$ of 0.08 and incubated at 37 °C without shaking for 24 h. After removal of the standing culture, the wells were washed with distilled water and then stained with 3 mL of 0.4% crystal violet (v/v) for 20 min at room temperature, before the residual stain was removed. After washing, the stained biofilms were resuspended in 3 mL of 100% ethanol and absorbance was measured at 595 nm.

pelA inactivation

The Δ*pelA* mutant of *P. aeruginosa* PAO1 was obtained by allelic exchange as previously described (Quénée *et al.*, 2005; Bazire *et al.*, 2010; Bouffartigues *et al.*, 2012), using primers pelA1-pelA2 and pelA3-pelA4, leading to a gene deletion of 2779 bp.

pel transcriptional fusion

The 500-bp promoter region of *pelA* was PCR-amplified using upelFsacI/upelRspeI primers, digested by SacI and SpeI, and fused to the promoter-less *luxCDABE* cassette in pAB133, yielding pABpel (Bazire *et al.*, 2005). The insert was verified by DNA sequencing with SpAB and ASpAB primers.

Bioluminescence assays

Pseudomonas aeruginosa strains containing pAB133-derived plasmids were inoculated in LB or LBS to a final $OD_{580\ nm}$ of 0.01 in white 96-well optiplates with a flat transparent bottom (BD Falcon, San Jose, CA). Bioluminescence and absorbance at 580 nm were measured simultaneously to monitor both the promoter activity and bacterial growth, respectively, using a multimode plate reader (Xenius, SAFAS) as previously described (Bouffartigues *et al.*, 2012).

Quantitative RT-PCR

RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR were achieved as previously described (Gicquel *et al.*, 2013) using the primers listed in Table S2 (Fito-Boncompte *et al.*, 2011).

c-di-GMP assays

The c-di-GMP-responsive *cdrA* promoter-*gfp* fusion-encoding vector was used to monitor the c-di-GMP level in H103 and PAOSX strains (Rybtke *et al.*, 2012). Transformed strains were grown to stationary phase in LB or LBS supplemented with 50 μg mL^{-1} Gm. The fluorescence was measured on 10^9 cells in a 96-black well microtitre plate (Nunc), as arbitrary fluorescence intensity units (FIU) using a Xenius multimode plate reader (SAFAS, excitation: 490 nm, emission: 515 nm).

Statistical analyses

All experiments were carried out at least three times. Significances of differences between mean values were assessed using Student's *t*-test with significance set at $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$.

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

Results and discussion

Sucrose, but not NaCl or maltose, increases biofilm production

Pseudomonas aeruginosa can form robust pellicles at the air–liquid interface of a standing liquid culture. The addition of 342 mM sucrose to LB led to the production of a markedly thicker pellicle (Fig. 1a, LBS), which was not observed when adding 171 mM NaCl instead of sucrose (Fig. 1a, LBN). Similar results were observed when biofilm was grown in microtitre wells and stained with crystal violet (Fig. 1b). This suggests that sucrose rather than osmolarity triggers the increase of biofilm formation in our conditions. Using maltose instead of sucrose at the same concentration (342 mM) did not increase the pellicle, suggesting that it was the sucrose that led to the increased pellicle formation in our conditions (Fig. 1a and b, LBM). As pellicle formation has been associated with *pel* and *psl* gene cluster expression in *P. aeruginosa* PAO1 (Friedman & Kolter, 2004b), the transcription levels of *pelB* and *pslB* were compared using qRT-PCR in *P. aeruginosa* H103 grown in LB and LBS (Fig. 1c). The *pelB* mRNA level was increased almost 3.5-fold in the presence of 342 mM sucrose, suggesting that sucrose promotes *pel* transcription (Fig. 1c). Conversely, the *pslB* mRNA levels were found to be very similar in LB and LBS, suggesting that the *psl* gene cluster was not mainly involved in the sucrose-related biofilm production increase (Fig. 1c). As a control, the effect of sucrose on pellicle production was assayed in a *pelA* mutant strain (ratio LBS/LB). As shown on Fig. 1d, the *pelA* mutant strain produced about twofold more pellicle in LBS than LB, and the isogenic parental strain produced about fourfold more pellicle in LBS than LB. These data suggest that Pel polysaccharide was partly involved in the sucrose-mediated pellicle production. However, this also indicates that another part of the sucrose effect on biofilm production remained *pel*-independent. Biofilm-enhanced production by exogenous polysaccharides has been described previously. Sucrose is the most cariogenic carbohydrate, leading to elevated matrix exopolysaccharides production by oral bacteria and accumulation on the tooth surface (Paes Leme *et al.*, 2006). One of these bacteria, *Streptococcus mutans*, was shown to form well-defined and tightly adherent biofilms in the presence of 1% of sucrose (Duarte *et al.*, 2008), but not in high salinity media (Kawarai *et al.*, 2009). In the plant growth-promoting bacterium *Bacillus subtilis*, biofilm formation is triggered by plant-produced polysaccharides such as arabinogalactan, pectin or xylan at very low concentrations (0.5% or even 0.05% of plant arabinogalactan) (Kearns *et al.*, 2005; Beauregard *et al.*, 2013). Plant polysaccharides stimulate biofilm formation in *B. subtilis* by acting as environmental signals that induce matrix gene expression, and as substrates that are processed and incorporated into the exopolysaccharides biofilm matrix (Beauregard *et al.*, 2013). Interestingly, it was shown previously that addition of glucose at a concentration of 1–5% in LB medium increased production of the biofilm-related polysaccharide alginate in *P. aeruginosa* PAO1 (Ma *et al.*, 1997). In our study, we assayed sucrose at a very high concentration, that is 342 mM, corresponding to 11.7%. We further assayed lower sucrose concentrations to investigate the

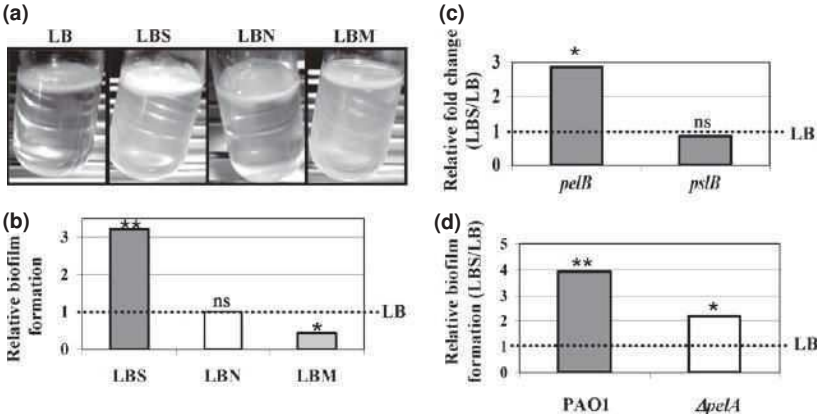


Fig. 1. Sucrose-increased biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* H103. (a) Pellicle and crystal violet (CV)-stained biofilms formed in microtitre wells by *P. aeruginosa* H103 grown in LB, LBS (LB + 342 mM sucrose), LBN (LB + 171 mM NaCl) or LBM (LB + 342 mM maltose) media. (b) Measurement of the biofilm produced in LBS (grey bar), LBN (white bar) and LBM (light grey bar) relative to that formed in LB (dotted line). (c) qRT-PCR assays on *pelB* and *pslB* in *P. aeruginosa* H103 grown in LB and LBS media. PCR reactions were performed in triplicate and the standard deviations were lower than 0.15 C_t. (d) Quantification of CV-stained biofilms formed by the wild-type strain PAO1 (grey bar) and its isogenic *pelA* mutant strain (white bar) grown in LBS compared with LB. Results are given as the ratio LBS/LB. Statistical analysis used pairwise strain comparisons (*t*-test). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; ns, non-significant.

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

putative signalling effect of sucrose on biofilm formation. As shown on Fig. 2a, the sucrose-related effect on biofilm formation occurred only with elevated sucrose concentrations (higher than 5%), suggesting that sucrose did not act as a signal in our conditions. *Pseudomonas aeruginosa* is furthermore unable to metabolize sucrose due to the lack of the sucrose-hydrolyzing corresponding enzymes (Fig. 2b), suggesting that sucrose is thus unlikely to be used as a carbohydrate source for the building of *P. aeruginosa* matrix. The mechanisms by which sucrose might increase *P. aeruginosa* biofilm formation will be further discussed below.

ECF sigma factor SigX is involved in the sucrose-related biofilm increase

SigX is an ECF sigma factor that is involved in fatty acid synthesis (Boechat *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014) and in biofilm formation (Gicquel *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014). As we have previously shown that SigX activity was increased in high sucrose-containing medium (Bouffartigues *et al.*, 2012), we suspected SigX to be involved in the molecular mechanism linking sucrose and biofilm formation. The lack of SigX abolished the sucrose-promoting effect on biofilm formation (Fig. 3a and b). Complementing the *sigX* mutation (PAOSX^{+}) restored this phenotype, showing that SigX triggers the sucrose-related effect on biofilm production (Fig. 3a and b). Using a transcriptional fusion between the *pelA* promoter region and the *luxCDABE* cassette, *pelA* expression was strongly increased (by about 10-fold) in response to sucrose in the wild-type strain (see qRT-PCR experiments in Fig. 1c). In the PAOSX mutant, expression of *pelA* was reduced by about twofold. The *pelA* mRNA level was increased almost 3.4-fold in the presence of 342 mM sucrose in the *sigX* mutant (Fig. 1c). The data suggest that SigX was mainly involved in the expression of the sucrose-related *pel* gene cluster, but also that another part of the sucrose effect on *pel* expression remains SigX-independent. In a previous study, we achieved a comparative transcriptomic study between *P. aeruginosa* H103 and its isogenic *sigX* mutant PAOSX grown in M9 minimal medium (Gicquel *et al.*, 2013). In these conditions, the *pel* gene cluster was not identified as a putative SigX target (Gicquel *et al.*, 2013). In a study integrating chip-on-chip experiments and transcriptomic assays based on *P. aeruginosa* PA14 and its isogenic *sigX* mutant, *pel* was not identified as a direct SigX target (Blanka *et al.*, 2014). Furthermore, we were unable to find a putative SigX consensus binding motif (Blanka *et al.*, 2014) in the promoter region of *pelA* (data not shown). The data suggest that the sucrose-related increase of *pelA* expression is indirectly linked to SigX.

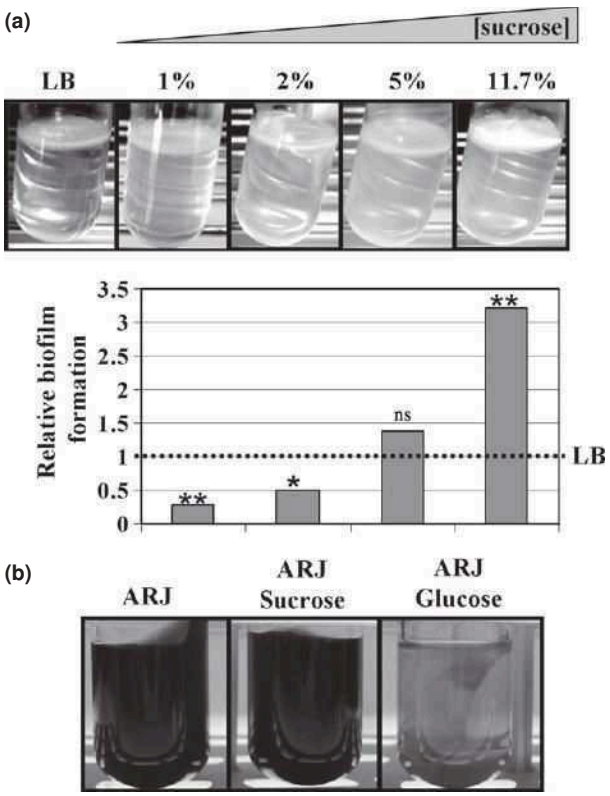


Fig. 2. Effect of sucrose concentration on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. (a) Pellicle at the air–liquid interface and quantification of CV-stained biofilms by *P. aeruginosa* H103 grown in LB or in LB supplemented with 1, 2, 5 or 11.7% sucrose, relative to that formed in LB. (b) Growth of *P. aeruginosa* H103 in mineral medium ARJ containing sucrose or glucose as a carbon source. Statistical analysis used pairwise strain comparisons (*t*-test). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; ns, non-significant.

Sucrose increases the c-di-GMP pool level at least partly through SigX

As *pel* transcription is positively regulated by c-di-GMP, we hypothesized that growth in LBS could affect the c-di-GMP pool level. We thus assayed c-di-GMP intracellular levels using the reporter constructed by Rybtke *et al.* (2012) that is based on transcriptional fusion between the c-di-GMP-responsive *cdrA* promoter and *gfp*. As shown on Fig. 4a, the activity of this promoter region was increased 1.7-fold in H103 wild-type strain grown in LBS compared with LB, indicating that the c-di-GMP pool level was increased in the presence of sucrose. In addition to *pel*, *psl* is also regulated by the c-di-GMP pool level. The question is then, how could c-di-GMP affect *pel* but not *psl* transcription (Mikkelsen *et al.*, 2011)? Interestingly, it has been shown recently that the c-di-GMP produced by the

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

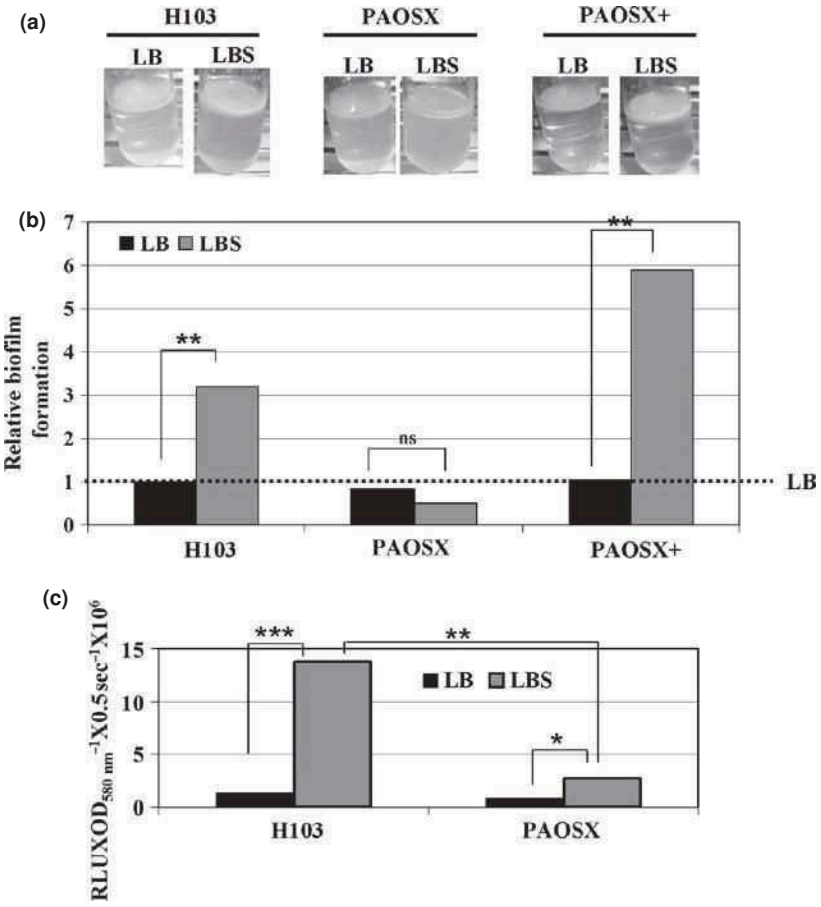


Fig. 3. SigX is involved in sucrose induction of the pellicle production. Pellicle at the air–liquid interface (a) and quantification of CV-stained biofilms (b) formed by *Pseudomonas aeruginosa* H103 grown in LB (black bars) or LBS (grey bars), relative to that formed in LB by *P. aeruginosa* H103. (c) Transcriptional activity (reporter assay) of the *pelA* promoter region in *P. aeruginosa* H103 or PAOSX (isogenic *sigX* mutant) grown in LB (black bars) and in LBS (grey bars). Statistical analysis used pairwise strain comparisons (*t*-test). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$; ns, non-significant.

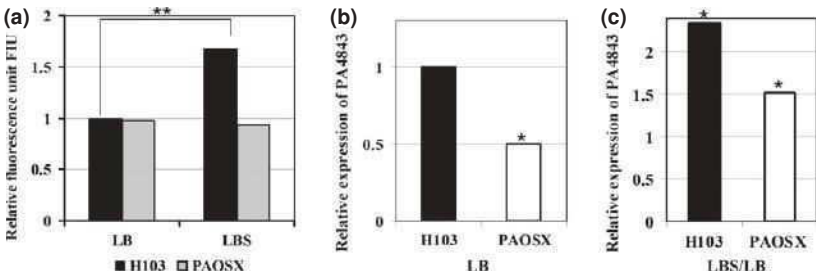


Fig. 4. Sucrose increased the c-di-GMP level via the ECF sigma factor SigX. (a) c-di-GMP level assay (relative FlU) using the *cdrA-gfp* transcriptional fusion reporter system (Rybtke *et al.*, 2012) in H103 (black bars) and PAOSX (*sigX* mutant, grey bars) grown in LB or LBS. (b) Quantification of PA4843 mRNA level assayed using qRT-PCR on RNAs extracted from *Pseudomonas aeruginosa* H103 and PAOSX grown in LB medium. (c) Quantification of PA4843 mRNA level assayed by qRT-PCR on RNAs extracted from *P. aeruginosa* H103 or PAOSX *sigX* mutant strain grown in LBS compared with LB. PCR reactions were performed in triplicate and the standard deviations were lower than 0.15 C_t. Statistical analysis used pairwise strain comparisons (*t*-test). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$.

diguanylate cyclase WspR specifically affects Pel but not Psl synthesis (Huangyutitham *et al.*, 2013). These authors suggested that (1) phenotypes that are very dominant in *P. aeruginosa* may not be greatly affected by the small c-di-GMP increase (this could be the case for Psl, which is the exopolysaccharides mostly responsible for attachment and biofilm formation in *P. aeruginosa* strain PAO1 (Colvin *et al.*, 2012); and (2) the differential effects on c-di-GMP-sensitive processes may be due to differences in the affinities of receptor proteins for c-di-GMP (Hickman & Harwood, 2008; Whitney *et al.*, 2012). However, as mentioned above, a part of the sucrose-mediated effect on biofilm production remained *pel*-independent, and thus may be also unrelated to c-di-GMP.

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

We next assayed the effects of sucrose on the c-di-GMP level in the *sigX* mutant strain PAOSX. As shown on Fig. 4a, the activity of the *cdrA* promoter region was maintained at a similar level in PAOSX grown in the presence or absence of sucrose (Fig. 4a), showing that SigX triggers *P. aeruginosa* response to sucrose. However, these data suggest also that the c-di-GMP level was not drastically affected by the *sigX* mutation. This result should be viewed with caution; although it is useful to detect increases in c-di-GMP levels, the reporter system we used to detect c-di-GMP intracellular levels modulation might be less suitable for detecting decreases in fluorescence (Rybtke *et al.*, 2012). Otherwise, the depletion in total intracellular c-di-GMP due to a *sigX* mutation may be small. Interestingly, a mutant lacking the WspR diguanylate cyclase that is involved in c-di-GMP production only slightly reduced the total intracellular c-di-GMP level (Hickman *et al.*, 2005). Overall, our data show that SigX triggers the *P. aeruginosa* H103 increase of the c-di-GMP level in response to a high sucrose concentration in LB. The question is then, how could SigX increase the c-di-GMP level? The PA4843 gene encoding a diguanylate cyclase was suggested to be a putative SigX-target (Gicquel *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014). As shown on Fig. 4b, PA4843 expression was lowered about twofold in PAOSX mutant compared with H103 strain grown in LB, confirming the involvement of SigX in the expression of PA4843. Sucrose significantly increased PA4843 transcription by about 2.5-fold in H103 (ratio LBS/LB), and 1.5-fold in PAOSX (ratio LBS/LB), showing that SigX was partly involved in the sucrose-related increase of PA4843 expression (Fig. 4c). However, this also indicates that another part of the PA4843 stimulation remains SigX-independent. Although further investigations are needed to confirm the involvement of PA4843 in the c-di-GMP level increase in response to sucrose, our data give a first hint as to the molecular mechanism linking sucrose, the ECF sigma factor SigX and c-di-GMP. Noticeably, in *E. coli*, at least five of the 29 genes encoding diguanylate cyclases or phosphodiesterases are stationary phase-induced under the control of the general stress response sigma factor RpoS, and also exhibit differential control by additional environmental and temporal signals (Weber *et al.*, 2006; Landini, 2009).

How does sucrose activate SigX?

In this study, we show that sucrose increases biofilm formation and c-di-GMP production at least partly via the ECF sigma factor SigX. The mechanisms by which sucrose increased *P. aeruginosa* biofilm production appear highly complex, as *P. aeruginosa* is unable to metabolize sucrose due to the lack of the corresponding sucrose-hydrolyzing enzymes (Fig. 2b). Sucrose is thus unlikely to be used as a carbohydrate source for the building of *P. aeruginosa* matrix. One possibility would be that sucrose itself may act as a potent signal, as plant polysaccharides in the case of *B. subtilis*, activating a regulatory pathway including the ECF sigma factor SigX, and increasing the c-di-GMP pool level. However, as shown elsewhere, this effect on *P. aeruginosa* biofilm production was only observed with high concentrations of sucrose, which are 10–20-fold higher than the concentrations of plant polysaccharides required for signalling in *B. subtilis* (Beauregard *et al.*, 2013). Thus our data suggest that sucrose may not act as an environmental signal on *P. aeruginosa*. Alternatively, high sucrose-containing environments may produce a signal that in turn could activate such a regulatory pathway. In a previous study, we have shown that addition of sucrose strongly disturbs the bacterial envelope (Bouffartigues *et al.*, 2012). This hypothesis is strengthened by the greater expression of SigX when the master cell wall stress responsive ECF sigma factor AlgU is activated, as in the case of the *P. aeruginosa* response to D-cycloserine (Wood *et al.*, 2006), or to a low shear-modelled microgravity (Crabbé *et al.*, 2010). Interestingly, the involvement of SigX in short chain fatty acid synthesis (Boechat *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014) further suggests that SigX may be involved in membrane remodelling and fluidity (Duchesne *et al.*, 2013). It is thus tempting to speculate that sucrose might induce a mechanic stress on the cell envelope that leads to SigX activity and c-diGMP production, thus enhancing the bacterial biofilm mode.

Acknowledgements

We are grateful to T. Tolker-Nielsen for providing the *cdrA-gfp* fusion containing vector, K. Shioya for *pelA* mutant construction, and P. Cornelis for helpful discussion. This work was supported by the French Government, the Région Haute Normandie (GRRs Sésa and IRIB), the Grand Evreux Agglomération and European FEDER funds.

References

Bazire A, Dheilly A, Diab F, Morin D, Jebbar M *et al.* (2005) Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 125–131.

Bazire A, Dheilly A, Diab F, Morin D, Jebbar M, Haras D & Dufour A (2010) The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**: 3001–3010.

Beauregard P, Chai Y, Vlamakis H, Losick R & Kolter R (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *P Natl Acad Sci USA* **110**: 1621–1630.

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* **7**: 1673–1685.

Blanka A, Schulz S, Eckweiler D *et al.* (2014) Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *J Bacteriol* **196**: 345–356.

Boechat AL, Kaihami GH, Politi MJ, Lépine F & Baldini RL (2013) A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**: e84775.

Bouffartigues E, Gicquel G, Bazire A *et al.* (2012) Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. *J Bacteriol* **194**: 4301–4311.

Branda SS, Vik S, Friedman L & Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20–26.

Buchanan PJ, Ernst RK, Elborn JS & Schock B (2009) Role of CFTR, *Pseudomonas aeruginosa* and Toll-like receptors in cystic fibrosis lung inflammation. *Biochem Soc Trans* **37**: 863–867.

Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E *et al.* (2009) Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol* **73**: 622–638.

Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, Howell PL, Wozniak DJ & Parsek MR (2012) The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* **14**: 1913–1928.

Crabbé A, Pycke B, Van Houdt R, Monsieurs P, Nickerson C, Leys N & Cornelis P (2010) Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves AlgU regulation. *Environ Microbiol* **12**: 1545–1564.

Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH & Koo H (2008) Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol* **23**: 206–212.

Duchesne R, Bouffartigues E, Oxaran V, Maillot O, Bénard M, Feuilloley MG, Orange N & Chevalier S (2013) A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. *J Proteomics* **94**: 451–459.

Filloux A & Vallet I (2003) Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med Sci (Paris)* **19**: 77–83.

Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E *et al.* (2011) Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* **79**: 1176–1186.

Friedman L & Kolter R (2004a) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* **186**: 4457–4465.

Friedman L & Kolter R (2004b) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* **51**: 675–690.

Gicquel G, Bouffartigues E, Bains M *et al.* (2013) The extra-cytoplasmic function sigma factor SigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**: e80407.

Harmsen M, Yang L, Pamp SJ & Tolker-Nielsen T (2010) An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**: 253–268.

Hickman JW & Harwood CS (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a ci-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**: 376–389.

Hickman JW, Tifrea DF & Harwood CS (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *P Natl Acad Sci USA* **102**: 14422–14427.

Huangyutitham V, Güvener ZT & Harwood CS (2013) Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. *MBio* **4**: e00242–13.

Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, Hill PJ, Harwood CS, Wozniak DJ & Parsek MR (2012) Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *P Natl Acad Sci USA* **109**: 20632–20636.

Kawarai T, Furukawa S, Narisawa N, Hagiwara C, Ogihara H & Yamasaki M (2009) Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media. *J Biosci Bioeng* **107**: 630–635.

Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R & Losick R (2005) A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **55**: 739–749.

Landini P (2009) Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **160**: 259–266.

Ma JF, Phibbs PV & Hassett DJ (1997) Glucose stimulates alginate production and *algD* transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 217–221.

Mah TF & O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**: 34–39.

Mikkelsen H, McMullan R & Filloux A (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* **6**: e29113.

Miller KJ & Wood JM (1996) Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 101–136.

Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G & Cury JA (2006) The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. *J Dent Res* **85**: 878–887.

Quénée L, Lamotte D & Polack B (2005) Combined sacB-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* **38**: 63–67.

Reid SJ & Abratt VR (2005) Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 312–321.

Romling U, Galperin MY & Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 1–52.

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

Rybtke MT, Borlee BR, Murakami K, Irie Y, Hentzer M, Nielsen TE, Givskov M, Parsek MR & Tolker-Nielsen T (2012) Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5060–5069.

Ryder C, Byrd M & Wozniak DJ (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* **10**: 644–648.

Sutherland I (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3–9.

Weber H, Pesavento C, Possling A, Tischendorf G & Hengge R (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 1014–1034.

Whitney JC, Colvin KM, Marmont LS, Robinson H, Parsek MR & Howell PL (2012) Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **287**: 23582–23593.

Wood LF, Leech AJ & Ohman DE (2006) Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. *Mol Microbiol* **62**: 412–426.

Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA & Parsek MR (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *P Natl Acad Sci USA* **100**: 7907–7912.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Table S2. Primers used for cloning and qRT-PCR assays.

© 2014 Federation of European Microbiological Societies.
Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

Article 4 : L'absence de la protéine OprF de *P. aeruginosa* conduit à l'augmentation de la formation de biofilm due à une variation du taux de c-di-GMP.

Afin de confirmer notre hypothèse selon laquelle SigX est impliqué dans la réponse au stress de l'enveloppe et la formation de biofilm, nous avons étudié l'effet de la mutation d'*oprF* sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa*. Nous avons observé que l'absence d'OprF entraine une augmentation de la formation de biofilm liée à l'augmentation de l'expression de *pel*. Nous avons montré que la surexpression de *pel* est en partie liée à l'augmentation du taux de c-di-GMP. De manière intéressante l'absence d'OprF conduit également à une augmentation de l'expression de *rsmZ*, un sncARN contrôlé par le système Gac/Rsm. Nous avons observé que l'expression de *rsmZ* chez le mutant *oprF* est restaurée à un niveau similaire à celui de la souche sauvage lorsque le c-di-GMP est dégradé confortant le lien existant entre les deux grands réseaux de régulation contrôlant la transition entre les modes de vie planctonique et sessile. Nous avons montré que l'absence d'OprF conduit à la surexpression et l'activité des facteurs sigma ECF AlgU et SigX suggérant que l'augmentation de la formation de biofilm chez le mutant *oprF* est liée à une perturbation de l'enveloppe. Enfin nous avons observé que les gènes codant les diguanylates cyclases PA4843 et PA1181 appartenant au régulon de SigX, sont surexprimés en absence d'OprF. Ensemble ces résultats suggèrent que l'absence d'OprF entraine une altération de la structure pariétale conduisant à l'activation de SigX et la formation de biofilm.

Lors de cette étude, j'ai contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la formation de biofilm en réalisant le dosage des ARNm par qRT-PCR.

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 23 June 2015
doi: 10.3389/fmicb.2015.00630

The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level

*Emeline Bouffartigues[1], Joana A. Moscoso[2], Rachel Duchesne[1], Thibaut Rosay[1], Laurène Fito-Boncompte[1], Gwendoline Gicquel[1], Olivier Maillot[1], Magalie Bénard[3], Alexis Bazire[4], Gerald Brenner-Weiss[5], Olivier Lesouhaitier[1], Patrice Lerouge[6], Alain Dufour[4], Nicole Orange[1], Marc G. J. Feuilloley[1], Joerg Overhage[5], Alain Filloux[2] and Sylvie Chevalier[1]**

[1] EA 4312-Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment, University of Rouen – Normandy University, Evreux, France, [2] MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Department of Life Sciences, Imperial College London, London, UK, [3] Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), Institute for Research and Innovation in Biomedicine, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France, [4] EA 3884-Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne-Sud, Lorient, France, [5] Institute of Functional Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany, [6] Glyco-MeV Laboratory, University of Rouen, Normandy University, Mont-Saint-Aignan, France

OprF is the major outer membrane porin in bacteria belonging to the *Pseudomonas* genus. In previous studies, we have shown that OprF is required for full virulence expression of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Here, we describe molecular insights on the nature of this relationship and report that the absence of OprF leads to increased biofilm formation and production of the Pel exopolysaccharide. Accordingly, the level of c-di-GMP, a key second messenger in biofilm control, is elevated in an *oprF* mutant. By decreasing c-di-GMP levels in this mutant, both biofilm formation and *pel* gene expression phenotypes were restored to wild-type levels. We further investigated the impact on two small RNAs, which are associated with the biofilm lifestyle, and found that expression of *rsmZ* but not of *rsmY* was increased in the *oprF* mutant and this occurs in a c-di-GMP-dependent manner. Finally, the extracytoplasmic function (ECF) sigma factors AlgU and SigX displayed higher activity levels in the *oprF* mutant. Two genes of the SigX regulon involved in c-di-GMP metabolism, PA1181 and *adcA* (PA4843), were up-regulated in the *oprF* mutant, partly explaining the increased c-di-GMP level. We hypothesized that the absence of OprF leads to a cell envelope stress that activates SigX and results in a c-di-GMP elevated level due to higher expression of *adcA* and PA1181. The c-di-GMP level can in turn stimulate Pel synthesis via increased *rsmZ* sRNA levels and *pel* mRNA, thus affecting Pel-dependent phenotypes such as cell aggregation and biofilm formation. This work highlights the connection between OprF and c-di-GMP regulatory networks, likely via SigX (ECF), on the regulation of biofilm phenotypes.

Keywords: OprF, exopolysaccharides, biofilm, c-di-GMP, SigX, ECF

OPEN ACCESS

Edited by:
Dongsheng Zhou, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, China

Reviewed by:
Dean Allistair Rowe-Magnus, Indiana University Bloomington, USA
Efstathios D. Giaouris, University of the Aegean, Greece

****Correspondence:***
Sylvie Chevalier
EA 4312-Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment, University of Rouen – Normandy University, 55 Rue Saint Germain, 27000 Evreux, France
sylvie.chevalier@univ-rouen.fr

Specialty section:
This article was submitted to Microbial Physiology and Metabolism, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *23 February 2015*
Accepted: *09 June 2015*
Published: *23 June 2015*

Citation:
Bouffartigues E, Moscoso JA, Duchesne R, Rosay T, Fito-Boncompte L, Gicquel G, Maillot O, Bénard M, Bazire A, Brenner-Weiss G, Lesouhaitier O, Lerouge P, Dufour A, Orange N, Feuilloley MGJ, Overhage J, Filloux A and Chevalier S (2015) The absence of the Pseudomonas aeruginosa OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. Front. Microbiol. 6:630. doi: 10.3389/fmicb.2015.00630

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium found in almost every wet ecological niches including soils, water, and plants (Spiers et al., 2000). It is also an opportunistic human pathogen, causing a variety of infections including chronic lung infections in cystic fibrosis patients (Ramsey and Wozniak, 2005). This requires a particularly well-developed ability to adapt to changes in environmental conditions, in which outer membrane (OM) proteins may play an important function considering their role in communication with the extracellular medium. The major *Pseudomonas* sp. OM protein OprF is homologous to OmpA of Enterobacteriaceae, and is the only general *P. aeruginosa* porin (Tamber and Hancock, 2004). It allows a non-specific diffusion of ionic species (Yoon et al., 2002) and small polar nutrients, including polysaccharides up to 1.5 kDa in size (Nestorovich et al., 2006). OprF anchors the OM to the peptidoglycan layer (Woodruff and Hancock, 1989; Rawling et al., 1998), is involved in host-pathogen interactions, and is required for expression of full virulence (Fito-Boncompte et al., 2011). Binding of human interferon-γ to OprF leads to the expression of the PA-I lectin, a quorum-sensing-dependent virulence determinant, suggesting that OprF acts as a sensor of the host immune system (Wu et al., 2005). OprF has also been proposed to be involved in rhamnolipid production (Bouffartigues et al., 2011), adhesion onto eukaryotic cells (Azghani et al., 2002; Fito-Boncompte et al., 2011), and biofilm development under anaerobic conditions (Hassett et al., 2002; Yoon et al., 2002). OprF expression is controlled by at least two extracytoplasmic function (ECFs) sigma factors, AlgU and SigX (Brinkman et al., 1999; Firoved et al., 2002; Bouffartigues et al., 2012), which are involved in cell envelope homeostasis (Wood et al., 2006; Boechat et al., 2013; Duchesne et al., 2013; Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014).

Biofilm growth is a bacterial lifestyle of particular importance for *P. aeruginosa* pathogenesis (Ramsey and Wozniak, 2005). These surface-associated microbial communities of cells are embedded into a matrix of extracellular polymeric substances (Donlan and Costerton, 2002; Allesen-Holm et al., 2006; Ma et al., 2009). In *P. aeruginosa*, the matrix contains an array of components such as extracellular DNA (Allesen-Holm et al., 2006; Ma et al., 2009), proteinaceous adhesins, vesicles and exopolysaccharides (EPS; Ryder et al., 2007; Gooderham and Hancock, 2009; Mikkelsen et al., 2011). In several non-mucoid strains, such as the PAO1 strain, Psl and Pel are two key EPS that maintain biofilm structure (Friedman and Kolter, 2004a; Ma et al., 2006; Colvin et al., 2012). Pel is a glucose-rich EPS that is required to form pellicles at the air-liquid interface or mature solid surface-associated biofilms (Friedman and Kolter, 2004a,b; Ghafoor et al., 2011). Psl is a repeating penta-saccharide containing D-mannose, D-glucose and L-rhamnose (Byrd et al., 2009), which is of particular importance for the stability (shear resistance) of non-mucoid biofilms (Bazire et al., 2010). Expression of the *pel* and *psl* gene clusters is highly complex. It is regulated transcriptionally by the second messenger bis-(3′–5′)-cyclic guanosine monophosphate (c-di-GMP; Lee et al., 2007; Starkey et al., 2009; Borlee et al., 2010), and translationally by the Gac/Rsm signaling network (Brencic and Lory, 2009; Irie et al., 2010).

We report here that the absence of OprF in the OM of *P. aeruginosa* results in increased biofilm formation. We show that this is concomitant to (i) the overproduction of Pel but not Psl, (ii) the increase in c-di-GMP levels and (iii) the up-regulation of *rsmZ,* a small non-coding RNA of the Gac/Rsm signaling pathway. The artificial reduction of c-di-GMP in the *oprF* mutant resulted in the restoration of these phenotypes. Two genes of the SigX regulon that are involved in regulating c-di-GMP levels, *adcA* (PA4843; Jones et al., 2014) and PA1181, are up-regulated in the *oprF* mutant, which thus links OprF and c-di-GMP regulatory networks.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

The strains are listed in **Table 1**. Strains were grown overnight at 37°C on a rotary shaker (180 rpm) in Luria Bertani (LB) broth. Five hundred μg streptomycin ml^{-1} only or with 300 μg carbenicillin ml^{-1} were added in H636 and H636O precultures, respectively. Under these conditions, the growth of the three strains was closely similar (Fito-Boncompte et al., 2011). When indicated, 40 $\mu g.ml^{-1}$ of congo red (CR) was added to the LB growth medium. Fifty $\mu g.ml^{-1}$ of tetracyclin were added to the growth medium for the culture of the H636C complemented strain. The P_{cdrA}-gfp, pJN105 and pJN2133 plasmids were introduced into P. aeruginosa strains by electroporation and transformants were selected and grown in LB containing 100 μg gentamicin ml^{-1}.

EPS Production Assays

To observe colony morphology, overnight cultures were diluted at an OD_{580} of 0.08 in LB (8.10^7 $CFU.ml^{-1}$) and 5 μl were spotted onto a LB plate containing 40 $\mu g.ml^{-1}$ of CR and 20 μg Coomassie brilliant blue as described by Friedman and Kolter (2004a,b) . Plates were incubated at 37°C overnight before visual inspection of the colony morphology. To quantify the CR binding on bacterial cells, a CR release assay was achieved as previously described (Lee et al., 2007). Briefly, an aliquot of overnight cultures corresponding to 10^9 cells, were centrifuged at 7,500 *g* during 10 min at room temperature. Cells were resuspended in 1 ml of LB containing CR (40 $\mu g.ml^{-1}$), and incubated for 15 min at room temperature before centrifugation at 7,500 *g* during 10 min. The absorbance of the unbound CR was measured in the supernatant at 490 nm.

Total Carbohydrate Content Assay

Sugar composition of the cell-associated carbohydrates was determined by gas chromatography analysis of trimethylsilyl methyl glycoside derivatives using inositol as internal standard for quantification. Bacteria (200 ml), grown overnight in LB medium, were centrifuged at 7,500 *g* for 5 min. Cells were washed gently with 10 ml of distilled water before centrifugation at 7,500 *g* for 5 min. EPS were detached from cells as followed. Ten ml of distilled water was added to the cell pellet, and the

TABLE 1 | Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains/ plasmids	Relevant characteristic(s)	Source
Strains		
Escherichia coli		
DH5α	Cloning host	Life technology
SM10λpir	Host strain for mini-CTX1	de Lorenzo and Timmis (1994)
Pseudomonas aeruginosa		
H103	PAO1 derivative	Hancock and Carey (1979)
H636	PAO1 H103 *oprF::*Ω	Woodruff and Hancock (1988)
H636O	pRW5 containing H636 strain	Woodruff and Hancock (1988)
H636C	H636 complemented strain with a copy of *oprF* downstream pBAD promoter	This study
Plasmids		
pRW5	OprF cloned in pUCP19 vector, Cb^r	Woodruff and Hancock (1988)
pJN105	araC-pBAD cassette cloned in pBBR1MCS-5, Gm^r	Newman and Fuqua (1999)
pJN2133	PA2133 cloned in pJN105, Gm^r	Hickman et al. (2005)
mini-CTX1	Plasmid for the integration of genes into the *att* site of the *P. aeruginosa* chromosome, Tc^r	Hoang et al. (2000)
mini-CTX-araC-pBAD	araC-pBAD cassette cloned in mini-CTX1, Tc^r	This study
mini-CTX-araC-pBAD-oprF	oprF cloned upstream pBAD promoter in mini-CTX-araC-pBAD, Tc^r	This study
PcdrA-gfp		Rybtke et al. (2012)

Cb^r, carbenicillin resistance; Gm^r, gentamycine resistance; Tc^r, tetracycline resistance.

tubes were vigorously mixed each 2 min for 14 min before centrifugation at 7,500 *g* for 10 min. This step was repeated five times. The supernatants were collected, pooled, filtered through a 0.2 μm filter and precipitated overnight at −20°C by adding cold ethanol to a final concentration of 70% (v/v). The precipitate was collected by centrifugation at 13,000 *g* for 1h at 4°C, resuspended in 5 ml of distilled water, dialyzed against distilled water using a 6–8 kDa molecular weight cut-off membrane for 24 h at 4°C, and lyophilisated. Samples (about 2 mg of dried material) and 50 μL of 2.10^{-3}M inositol were hydrolyzed in 0.5 mL of 2 M trifluoroacetic acid for 2 h at 110°C, dried and then heated in 0.250 mL of dry 1 M HCl in methanol at 80°C for 24 h for methanolysis. After evaporation of the methanol, the sample was resuspended in 500 μL of methanol and dried again. The methyl glycosides were then converted into their trimethylsilyl derivatives by heating the samples for 20 min at 80°C in 200 μL of hexamethyldisilazane/trimethylchlorosilane/pyridine: 3/1/9. After evaporation of the reagent, the samples were suspended in 100 μL of cyclohexane before being injected on a FDB-1 column (DB-1 Supelco). Chromatographic data were integrated with gas chromatography Star Workstation software (Varian), each surface being corrected according to its response factor. For comparison of amounts of cell-associated carbohydrates, total monosaccharide contents for each sample were normalized according to the OD measured at 580 nm.

General DNA Procedures

Restriction enzymes, T4 DNA ligase, and alkaline phosphatase were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) and used accordingly to the manufacturer. PCR assays were carried out with 1 μg of *P. aeruginosa* chromosomal DNA, 20 pmol of each primer and failsafe Taq polymerase (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). When necessary, PCR products and plasmids were purified with the QIAquick or QIAprep Spin Miniprep kits (QIAGEN), respectively. DNA sequencing was achieved by Genome Express (France). *E. coli* [commercial electrocompetent DH5*α* cells (Promega, Madison, WI, USA) or S17.1 cells] and *P. aeruginosa* cells were transformed by electroporation or by conjugation as previously described (Bouffartigues et al., 2012).

H636C Complemented Strain Construction

To complement the H636 *oprF* mutant strain with a copy of the *oprF* gene into the chromosome, the mini-CTX1-araC-pBAD was constructed as follows. The region containing *araC* and the pBAD promoter was amplified from pJN105 (**Table 1**) using the primer pair FaraC-pBAD and RaraC-pBAD (**Table 2**) and cloned into pCR2.1-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Insert was then cut with *Sac*I and *Nhe*I restriction enzymes and inserted into mini-CTX1 using the *Sac*I and *Spe*I sites. A 1113 bp DNA fragment containing the *oprF* gene (PA1777) was amplified by PCR using the primer pair FoprFPstI and RoprFHindIII (**Table 2**). The PCR product was digested with *Pst*I and *Hind*III and ligated into the *Pst*I-*Hind*III digested mini-CTX1-araC-pBAD vector to create the mini-CTX1-araC-pBAD-oprF. The sequence of this construct was verified by DNA sequencing. This vector was constructed in DH5*α*, purified and transferred into *E. coli* SM10 strain. The mini-CTX1-araC-pBAD-oprF vector was mobilized from *E. coli* SM10 into H636 by conjugation. Transconjugants were selected onto PIA agar plate containing 250 $\mu g.ml^{-1}$ of tetracyclin. The insertion was verified by PCR using the FoprFPstI and RoprFHindIII primers. It is known that the pBAD promoter is not fully locked in *P. aeruginosa*, we used the basal level of expression from this promoter, without addition of arabinose, to obtain adequate amount of OprF in complementation experiments (Becher and Schweizer, 2000; Hoang et al., 2000).

Quantitative RT-PCR

Extraction of RNAs, synthesis of cDNAs and real time PCR were achieved as previously described (Gicquel et al., 2013), using primers described in **Table 2**. PCR reactions were performed in triplicate and the standard deviations were lower than 0.15 Cт. The relative quantification of the mRNAs or sRNAs of interest

TABLE 2 | Primer sequences of the indicated genes used for quantitative RT-PCR reactions and for the construction of the mini-CTX1-araC-pBAD and its derivative vector mini-CTX1-araC-pBAD-oprF.

PA number	Gene name	Primer name	Sequence (5′-3′)
PA2063	*pelB*	FPA3063	CGGCTACGTGCAGCGTTAT
		RPA3063	CACTGCATGCGTTCCTTGAC
PA2231	*pslB*	FPA2231	ACACCAACGAATCCACCTTCA
		RPA2231	CGCTCTGTACCTCGATCATCAC
PA3621.1	*rsmZ*	FPA3621.1	CGTACAGGGAACACGCAAC
		RPA3621.1	ATTACCCCGCCCACTCTTC
PA0527.1	*rsmY*	FPA0527.1	CGCCAAAGACAATACGGAAAC
		RPA0527.1	TTTTGCAGACCTCTATCCTGACATC
PA1776	*sigX*	FPA1776	AATTGATGCGGCGTTACCA
		RPA1776	CCAGGTAGCGGGCACAGA
PA1775	*cmpX*	FPA1775	GGCAGATCATTGCAGGAATCTAC
		RPA1775	TCTCTTCAATAGTGCCTTCAACGT
PA0762	*algU*	FPA0762	GAAGCCCGAGTCTATCTTGG
		RPA0762	GCGATACCTCTCTTGGCATT
PA3540	*algD*	FPA3540	GGGCTATGTCGGTGCAGTATG
		RPA3540	GCGACTTGCCCTGGTTGAT
PA4843	*PA4843*	FPA4843	CCTGGGCACCGAATTGG
		RPA4843	CGGCGGACAGGTAGATGATC
PA2072	*PA2072*	FPA2072	CCAGGCATCAGGACGACAT
		RPA2072	CGATTCTGCAGCGCCTTT
PA1181	*PA1181*	FPA1181	CCAGATGGAGAAGCGCTACCTCGCTT
		RPA1181	CGCTTGCGACTGTCGATATC
16sRNA		F16SRNA	AACCTGGGAACTGCATCCAA
		R16SRNA	CTTCGCCACTGGTGTTCCTT
PA1777	*oprF*	FoprFPstI	*taataactgcagAGATGGGGATTTAACG
		RoprFHindIII	*taataaaagcttTCCTTAGAGGCTCAGCCGATT
		FaraC-PBAD	*aacatatgCGTCAATTGTCTGATTCGTTACCAAT
		RaraC-PBAD	*aatcgctagcCCAAAAAAACGG

*Nucleotides not included in the gene sequence are indicated in lower case.

was obtained by the comparative CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method (Livak and Schmittgen, 2001), using 16S rRNA as endogenous control (Corbella and Puyet, 2003).

c-di-GMP Quantification

Indirect c-di-GMP quantification was evaluated using P_{cdrA}-*gfp* plasmid, in which the c-di-GMP depending *cdrA* promoter is fused to *gfp* (Rybtke et al., 2012). *P. aeruginosa* strains containing the P_{cdrA}-*gfp* plasmid were grown overnight and subcultured in LB with gentamicin to a starting OD_{600} of 0.1 (10^8 CFU.ml^{-1}). After 4 h incubation at 37°C in shaking conditions, 1 mL of culture was harvested and re-suspended in the same volume of 1x PBS. OD_{600} and fluorescence (excitation 485 nm, emission 520 nm) was measured in a black 96-well plate with see-through flat bottom (Falcon) using a FLUOstarOptima plate reader (BMG Labtech). Quantifications were performed in triplicate and data are presented as relative fluorescent units (RFUs) which are arbitrary fluorescent units corrected for cell density.

c-di-GMP was also directly quantified by LC-MS/MS. Extraction and quantification of intracellular c-di-GMP was performed with some modifications as previously described (Spangler et al., 2010; Strehmel et al., 2015). Cultures of *P. aeruginosa* were grown for 4 h in LB medium at 37°C under shaking conditions to an optical density OD_{600} of ∼2.0 (2.10^9 CFU.ml^{-1}). Subsequent aliquots of 10 ml of each culture, adjusted to a cell density OD_{600} of 0.5 (5.10^8 CFU.ml^{-1}) by dilution with LB medium, were harvested by centrifugation for 2 min, 8000 × *g* and 4°C. Cell pellets were resuspended in 600 µl ice-cold extraction buffer [40% (v/v) acetonitrile, 40% (vol/vol) methanol and 20% (vol/vol) ddH_2O] by vigorous vortexing with and without 5 µl of a 10 µg.ml^{-1} solution of xanthosine-(3′,5′)-cyclic monophosphate (cXMP; BioLog Life Science Institute; Bremen, Germany) in ddH_2O as an internal standard. After 15 min of incubation on ice, cells were lysed at 95°C for 10 min, followed by centrifugation at 20000 × *g* and 4°C for 5 min. Supernatants were collected in a new 1.5 ml reaction tube and stored on ice. Remaining pellets were again resuspended in 400 µl extraction buffer, incubated on ice for 15 min and subjected to centrifugation (15000 × *g*, 4°C, 5 min). This procedure was repeated, and supernatants of all three extraction steps were pooled and subsequently evaporated using a concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 45°C. The remaining residue were then resuspended in 500 µl ddH_2O and c-di-GMP levels were quantified by LC-MS/MS as described previously (Strehmel et al., 2015), with the following

modifications. The chromatographic separation was performed on a 1100 Series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) using a Multospher AQ RP 18, 5 μm, 250 mm× 4.0 mm HPLC column (CS Chromatography Service GmbH, Langerwehe, Germany) in a gradient mode using 10 mM ammonium acetate with 0.1% acetic acid as eluent A and methanol as eluent B. The injection volume of each sample was set to 40 μl and the flow rate was 0.4 ml/min. The gradient program was as follows: from 0 to 4 min 100% A, followed by a linear gradient from 100 to 80% A in 1 min, held for 2 min at 80% A, followed by a linear gradient from 80 to 60% A in 1 min and held for additional 9 min at 60%. Finally, re-equilibration of the column was obtained by constantly running 100% A for 16 min.

Electrospray ionization (ESI) MS was performed on an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Toronto, ON, Canada) using a turbo ion spray interface used in *positive mode* at an ionization potential of 5000 V and a temperature of 400°C using nitrogen as curtain, nebulizer, heater and collision gas. The parameter settings were optimized by infusion experiments. Data were acquired in multiple reaction monitoring (MRM) mode using the Analyst software version 1.6. (Applied Biosystems, Toronto, ON, Canada). Identification and quantification of c-di-GMP was performed by using three specific mass transitions from molecule ion m/z 691 to the product ions m/z 152, m/z 135, and m/z 540. The external calibration was carried out at c-di-GMP concentrations ranging from 10 to 200 ng in 500 μl ddH_2O using the internal standard cXMP (50 ng). Obtained concentrations of c-di-GMP were normalized against total protein contents of respective cultures, which were determined by the bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985). All experiments were performed for three independent cultures each analyzed in duplicate.

Bacterial Attachment Assay on Glass and Scanning Electron Microscopy

Bacteria were grown overnight in LB at 37°C, harvested by centrifugation for 10 min at 7,000 *g*, washed twice, and suspended in 0.9% NaCl to an OD_{600} of 0.6 (6.10^8 CFU.ml^{-1}). Twenty-five ml were then poured into a Petri dish containing a glass slide (24 × 50 mm) and stored at 37°C for 2 h. The slide was then washed for 5 min with sterile demineralized water to remove non-adherent cells. The attached cells were observed with a scanning electron microscope (SEM) as follows. Each sample was fixed with 3% glutaraldehyde overnight at 4°C and washed three times with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.35). The cells were then sequentially dehydrated with 70, 95, and 100% ethanol (three times for 10 min each). The samples were dried in ethanol in a CPD 030 Critical Point Dryer (Bal-Tec, France), using CO_2 as a transitional fluid to reach the critical point. The samples were mounted on aluminum stubs and coated for 120 s at 20 mA with gold/palladium alloy using a 501 sputter coater (Edwards Pirani, UK) and observed with a JEOL 6460LV microscope (JEOL Ltd, Japan) at a magnification of 4,500. The voltage was kept at 10 or 15 kV, at an average distance from the electron gun of about 10 mm.

Biofilm Formation in a Flow Cell System and Confocal Laser Scanning Microscopy

Biofilms were grown at 37°C in a three-channel flow cell with individual channel dimensions of 1 mm× 4 mm × 40 mm (Biocentrum, DTU, Danemark, Pamp et al., 2009), using a microscope coverslip (ST1, VWR) as substratum. The flow system was assembled, prepared and sterilized as described by Tolker-Nielsen and Sternberg (2011). Flow cells were sterilized by flushing 0.5% sodium hypochlorite for 30 min, then rinsed overnight with sterile water using a 250S Watson Marlow peristaltic pump. Bacteria were grown in LB, harvested by centrifugation for 10 min at 7,000 *g*, washed twice and suspended in 0.9% NaCl to obtain an OD_{600} of 0.6. Each channel was inoculated with 1 ml of bacterial suspension and left for attachment during 2 h without flow at 37°C. LB medium was then pumped with a 2.5 ml h^{-1} flow. Biofilms were visualized after 24 and 48 h by confocal laser scanning microscopy (CLSM) with a TCS-SP2 microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), using a 63x oil immersion objective. Image stacks were collected and processed using Leica Confocal Software and Adobe Photoshop. The thicknesses (μm) and biovolumes (in $\mu m^3/\mu m^2$) of the biofilms were measured using the COMSTAT software (Heydorn et al., 2000). Each experiment was made in triplicate and 10 positions were analyzed per channel.

Biofilm Formation on Polystyrene and Crystal Violet Staining

Quantification of biofilm formation was performed in 12-wells polystyrene microtiter plates as previously described (Bouffartigues et al., 2014). Briefly, LB medium (2 ml per well) supplemented with appropriate antibiotics was inoculated to a final OD_{580} of 0.08 (8.10^7 CFU.ml^{-1}) and incubated at 37°C without shaking for 24 h. Biofilms were stained with 3 ml of 0.4% of crystal violet (CV) for 20 min at room temperature, and washed with 3 ml of water until removing the unbound dye. After washing, CV was solubilized in 100% ethanol before measuring the absorbance at 595 nm. For each biofilm assay, three independent experimental repetitions were performed.

Results

The Lack of OprF Results in Increased EPS Production, Cell Aggregation and Biofilm Formation

We investigated the role of OprF in biofilm formation and EPS production by comparing three strains, i.e., the *P. aeruginosa* H103 wild-type strain (a PAO1 derivative, Hancock and Carey, 1979), the isogenic *oprF* mutant H636 (Woodruff and Hancock, 1988), and the *oprF* complemented control strain H636O (Woodruff and Hancock, 1988). We first examined colony morphologies on CR plates at 37°C. As shown in **Figure 1A**, the *P. aeruginosa* H636 colony, i.e., the *oprF* mutant, displayed a marked red staining, suggesting higher polysaccharide production when compared to the H103 wild-type strain. Upon complementation of the *oprF* mutation, a lower polysaccharide production was restored, confirming that

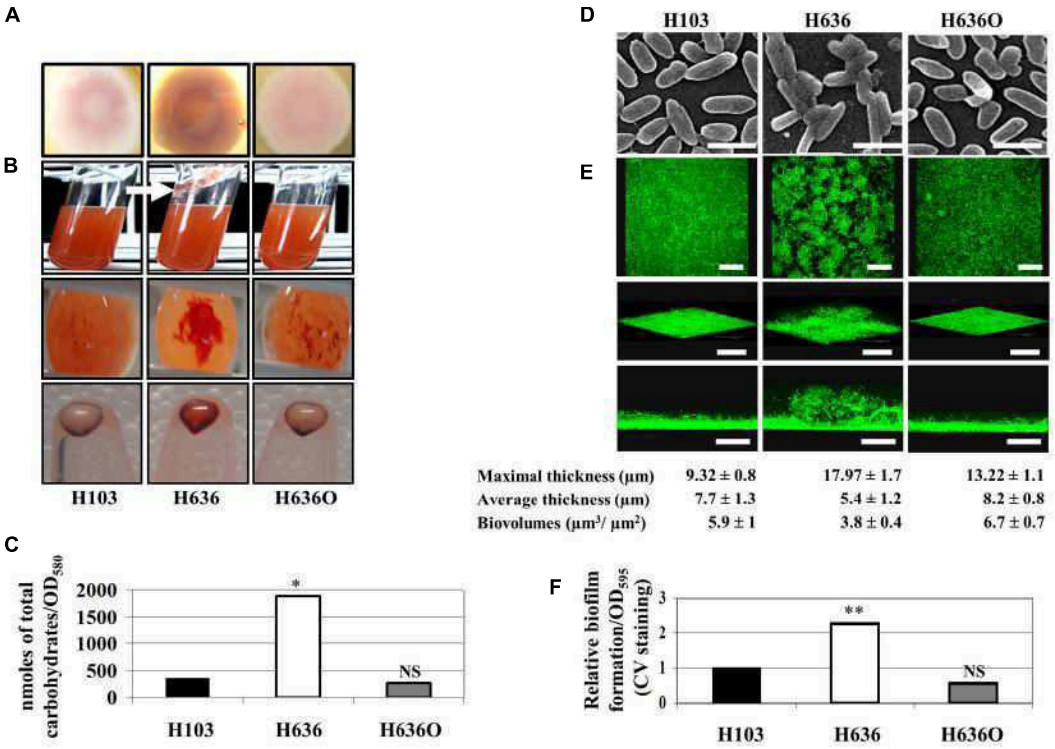


FIGURE 1 | The absence of OprF led to increase EPS production and biofilm formation in *P. aeruginosa*. **(A)** Colony morphology observed on Congo red (CR) containing LB agar plates. **(B)** H103, H636, and H636O were grown in CR containing LB for 24 h at 37°C. Top images: a slime production is indicated by a white arrow in case of H636; middle images: CR colored aggregates were observed at the bottom of the cultures; bottom images: CR binding of pelleted cells (10^9). **(C)** Cell-associated carbohydrates were quantified by gas chromatography. Statistics were achieved by unpaired *t*-test. $*p < 0.05$, NS, not significant. **(D)** Scanning electron microscopy images of H103, H636, and H636O allowed to attach onto a glass coverslip for 2 h (enlargement: 4,500 x; scales represent 2 µm). **(E)** Biofilms of H103, H636, and H636O grown in flow cells for 24 h and examined by CLSM. Top images, top views (x, y-plane; scales represent 48 µm); intermediate images, cross section views (scales represent 67 µm); bottom images, 3D-modelizations (x, y, z-axes, scales represent 48 µm). Maximal (µm), average thicknesses (µm), and biovolumes ($\mu m^3/\mu m^2$) were determined by COMSTAT analyses. The averages and standard deviations were calculated from 10 samples. **(F)** Microtiter grown biofilm formed by H103, H636, and H636O. Biofilms were quantified by measuring absorbance at 595 nm after crystal violet (CV) staining. At least six assays were performed for each strain. Statistics were achieved by unpaired *t*-test. $**p < 0.01$, NS, not significant.

the phenotype was due to the *oprF* deletion. Accordingly, when strains were grown in liquid LB medium, CR staining revealed the presence of cell aggregates and slime attached to the glass in H636, but not in H103 or H636O (**Figure 1B**). Upon centrifugation of the bacterial cultures, the cell pellets showed higher CR staining for H636 but not for H103 or H636O (**Figure 1B**). Quantification of the total cell-associated carbohydrates by gas chromatography confirmed that the levels of EPS in the H636 *oprF* mutant are fivefold higher than in H103 or H636O strains (**Figure 1C**).

It is well established that increased EPS production may result in cell aggregation and biofilm formation. Bacteria were thus allowed to attach onto a glass coverslip for 2 h and then observed by scanning electron microscopy (SEM). SEM images showed that H636 cells were slightly thinner than H103 and H636O, and cells aggregates could be observed, suggesting that the absence of OprF led to cell surface alterations that favored interactions between bacteria (**Figure 1D**). In addition, biofilm formation in flow cells was examined by CLSM after 24 h growth. As shown in **Figure 1E**, H103 and H636O biofilms were homogeneous and flat, displaying similar thicknesses and biovolumes. Conversely, the H636 *oprF* mutant formed a biofilm with heterogeneous cell distribution, increased maximal thickness and weaker biovolume. CV staining and quantification of biofilms grown in microtitre plates revealed that the *oprF* mutant strain yielded a 2.3-fold higher biofilm biomass than the other two strains (**Figure 1F**).

The OprF-Deficient Strain Displays Increased Levels of *pel* mRNA and c-di-GMP

Since Psl and Pel are the major EPS of *P. aeruginosa* PAO1 biofilm matrix (Hickman et al., 2005), we quantified by qRT-PCR the levels of the *pelB* and *pslB* transcripts. While *pslB* mRNA levels were unaffected by the *oprF* mutation, expression of *pelB* was 15-fold up-regulated in the H636 mutant strain (**Figure 2A**). Complementation of the mutant restored the expression of *pelB* to wild-type level, confirming that the observed variation was OprF-dependent. Since the expression of *pel* and *psl* is stimulated by high intracellular c-di-GMP levels (Lee et al., 2007; Starkey

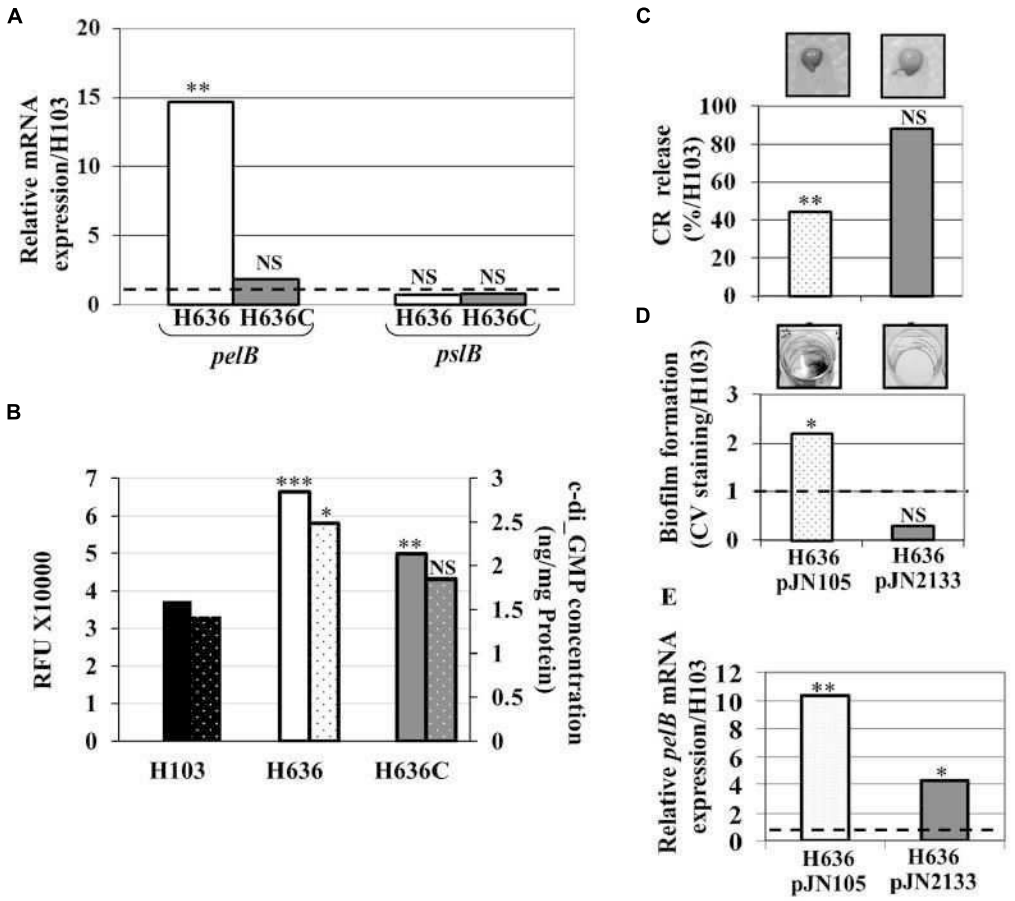


FIGURE 2 | The c-di-GMP level is increased in the *oprF* mutant. **(A)** Relative *pel* and *psl* mRNA expression in H636 (white bars) and H636C (gray bars) relatively to H103 (dashed black line). **(B)** c-di-GMP level evaluation using the P_{cdrA}-*gfp* reporter fusion (full colored bars), and by LC/MS/MS quantification (dotted colored bars), harbored by H103 (black bar), H636 *oprF* mutant (white bar) and the complemented H636C strain (gray bar). **(C)** Exopolysaccharide production by H636 harboring pJN105 (dotted white bar) or pJN2133 (gray bar), using the CR release assay. 100% correspond to the EPS production by *P. aeruginosa* H103. **(D)** Biofilms formed by H636 harboring pJN105 (dotted white bar) or pJN2133 (gry bar) were quantified relatively to H103 by CV staining. **(E)** qRT-PCR assays of *pelB* mRNA level in H636 harboring pJN105 (dotted white bars) or pJN2133 (gray bars), relatively to H103. Each experiment **(A–E)** was performed at least three times. Statistics were achieved by unpaired *t*-test: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, NS, not significant, relatively to H103.

et al., 2009; Borlee et al., 2010), the latter was tested using the P_{cdrA}-*gfp* reporter system in which *gfp* is fused to the c-di-GMP-dependent *cdrA* (Rybtke et al., 2012). The reporter plasmid was introduced into the wild-type H103, the H636 mutant strain, and the *oprF* complemented strain H636C. In this case and in the subsequent experiments, complementation was achieved from a single copy of *oprF* inserted in the chromosome (see Materials and Methods). The **Figure 2B** shows that the activity of the *cdrA* promoter was *ca* 1.8-fold higher in H636 than in H103, a phenotype that was partly complemented in H636C. This result was confirmed by direct quantification of intracellular c-di-GMP (**Figure 2B**) using LC-MS/MS (see Materials and Methods).

To assess whether we could revert the *oprF* mutant phenotypes by modulating the c-di-GMP level, the pJN2133 plasmid carrying the gene encoding the phosphodiesterase PA2133 under control of the pBAD promoter (Hickman et al., 2005), was introduced in the H636 mutant strain. Basal expression of PA2133 without arabinose induction led to restore CR binding (**Figure 2C**) and biofilm formation (**Figure 2D**) to wild-type levels in the pJN2133-carrying strain. In agreement with this observation, we observed that reducing the c-di-GMP level led to a significant decrease in *pelB* expression (**Figure 2E**). Noteworthy, the level of *pelB* was not fully restored, suggesting that additional regulatory mechanisms may account for the up-regulation of the *pel* genes in the *oprF* mutant (**Figure 2E**).

rsmZ is Up-Regulated in the *oprF* Mutant

Pel production is known to be post-transcriptionally repressed by the RNA binding protein RsmA, a downstream target of the GacS/GacA two-component system (TCS; Brencic and

Lory, 2009; Irie et al., 2010). This regulatory system positively controls factors involved in biofilm formation through the production of two small non-coding RNAs, *rsmY* and *rsmZ* that sequester RsmA and thus interfere with its function (Gooderham and Hancock, 2009; Mikkelsen et al., 2011). Using qRT-PCR experiments, we investigated whether the production of *rsmY* and *rsmZ* was affected in the H636 *oprF* mutant. As shown in **Figure 3A**, *rsmZ* expression was increased by about 3.5-fold, while that of *rsmY* was slightly decreased in the *oprF* mutant. Complementation of the mutant led to restoration of *rsmZ* levels. Reducing the c-di-GMP level by overexpressing PA2133 led to lower *rsmZ* expression without affecting that of *rsmY*, suggesting that *rsmZ* transcription is connected to the c-di-GMP increase in the *oprF* mutant (**Figure 3B**). Finally, we have previously shown that the H636 *oprF* mutant was impaired in the production of components of the type III secretion system (T3SS; Fito-Boncompte et al., 2011), which is also regulated by the Gac/RsmA signaling network. Consistently, the production of the T3SS needle tip, PcrV, was strongly reduced in H636 compared to H103. The levels of PcrV were restored when the *oprF* mutation was compensated by reducing the c-di-GMP levels in H636 (**Figure 3C**).

The ECF Sigma Factors AlgU and SigX are Up-Regulated in the *oprF* Mutant

OprF was suspected to be involved in cell shape maintenance, partly through connecting the OM with the peptidoglycan layer. It has been suggested that the absence of OprF leads to alterations of the cell wall integrity (Woodruff and Hancock, 1989; Rawling et al., 1998). *P. aeruginosa* possesses two extracytoplasmic sigma factors involved in maintaining cell wall integrity, the RpoE homologue AlgU (Wood and Ohman, 2009) and SigX (Boechat et al., 2013; Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014). As shown in **Figure 4A**, the expression of *algU* and *algD* genes, which are direct AlgU targets (Schurr et al., 1993), was strongly increased in the *oprF* mutant, a phenotype that is restored in the H636C strain. This strongly supports the idea that the *oprF* mutant strain encounters cell wall stress. On the contrary, the expression of *sigX* was not significantly altered in the conditions tested. However, the expression of *cmpX*, a direct target of SigX (Bouffartigues et al., 2012; Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014), was significantly increased in the *oprF* mutant (**Figure 4B**). We thus hypothesized that SigX activity level is higher in H636 and examined the expression of genes from the SigX regulon that are involved in c-di-GMP metabolism, i.e., PA1181, PA2072 and *adcA* (PA4843; Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014). As shown in **Figure 4C**, PA1181, PA2072 and *adcA* (PA4843) are down-regulated in the isogenic *sigX* mutant of *P. aeruginosa* H103, confirming previous observations made on strain PA14 (Blanka et al., 2014). Using qRT-PCR, we observed that PA1181 and *adcA* mRNAs are overproduced in H636 (but not in the complemented strain) by 2.9- and 2.1-fold, respectively. In contrast, the expression of PA2072 was unaffected (**Figure 4D**). Since AdcA has been shown to have diguanylate cyclase activity (Jones et al., 2014), and PA1181 contains both GGDEF and EAL motifs, our data suggest that the two proteins may be responsible for the c-di-GMP increase in the *oprF* mutant strain.

Discussion

In a previous study, we have shown that an *oprF* mutant is altered in the production of many virulence factors, including pyocyanin, elastase and T3SS effectors (Fito-Boncompte et al., 2011). Here, we further show that an *oprF* mutant overproduces polysaccharides, a phenotype that is mainly linked to *pel* gene overexpression rather than *psl*. In PA14, or when overexpressed in PAO1, Pel promotes attachment to abiotic surfaces, aggregation

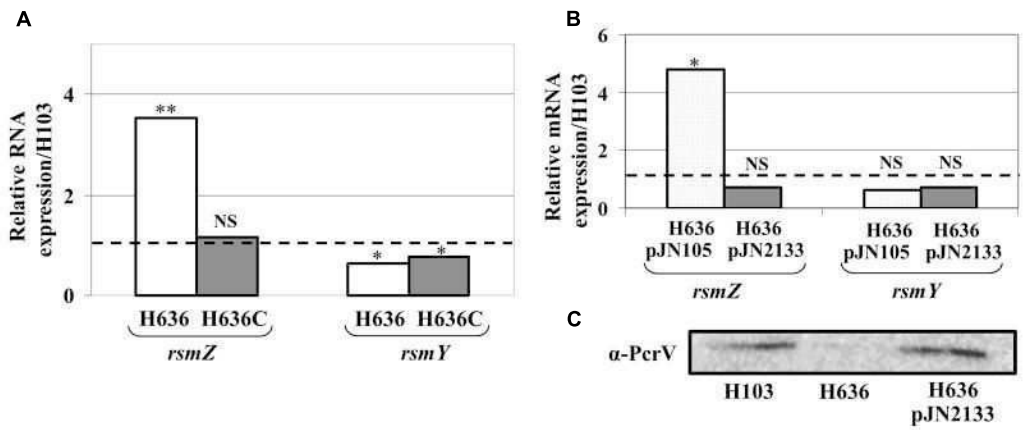


FIGURE 3 | The lack of OprF led to increase *rsmZ*, but not *rsmY* expression. (A) Relative expression of the small RNAs *rsmZ* and *rsmY* in H636 mutant (white bars) and the complemented strain H636C (gray bars), relatively to H103 (dashed black line). **(B)** Relative *rsmZ* and *rsmY* sRNA levels in H636 mutant strain harboring pJN105 (dotted white bars) or pJN2133 (gray bars), relatively to H103 (dashed black line). **(C)** Western blot analyses of T3SS α-PcrV in *P. aeruginosa* H103, H636, and H636 harboring pJN2133. Each experiment was performed at least three times. Statistics were done by unpaired *t*-test. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, NS, not significant.

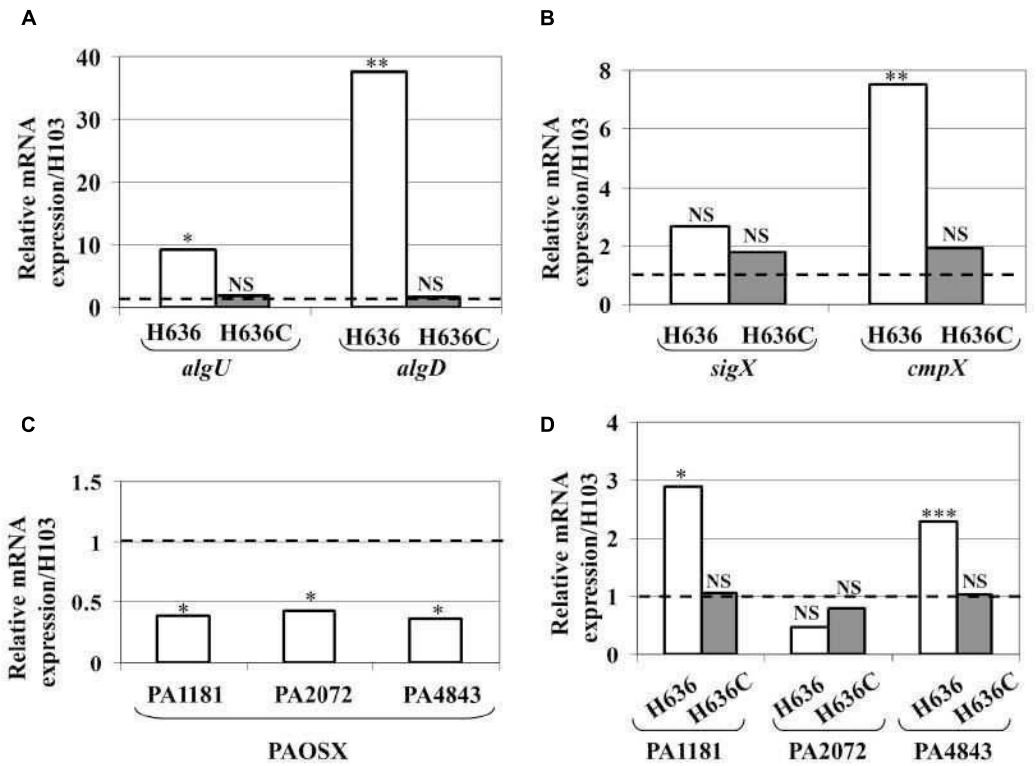


FIGURE 4 | Increased expression and activity of the extracytoplasmic function sigma factors AlgU and SigX. Relative mRNA levels of *algU* and *algD* **(A)**, *sigX* and *cmpX* **(B)** in *P. aeruginosa* H636 (white bars) and H636C (gray bars) relatively to H103. **(C)** Relative mRNA levels of PA1181, PA2072 and *adcA* in PAOSX [*sigX* mutant strain (Bouffartigues et al., 2012) relatively to H103]. **(D)** Relative mRNA levels of the SigX-dependent PA1181, PA2072 and *adcA* (PA4843) gene in *P. aeruginosa* H636 (white bars) and H636C (gray bars) relatively to H103. Each experiment was performed at least three times. Statistics were achieved by unpaired *t*-test. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, NS, not significant.

in broth culture, and biofilm formation (Yang et al., 2011; Colvin et al., 2012). Accordingly, the *oprF* mutant displayed an aggregative phenotype and an increased biofilm formation in our conditions. Interestingly, the biofilm structure produced by the mutant strain was altered. The maximal thickness was increased while the biofilm biovolume was reduced. These data suggest that H636 cells grew slower than both the wild-type and the complemented mutant strains. Otherwise, the lack of OprF may weaken the cell structure leading to increased bacterial death within the biofilm. We also observed increased c-di-GMP level in the *oprF* mutant. High levels of c-di-GMP are known to (i) impact positively polysaccharide production and biofilm formation (Hickman et al., 2005; Güvener and Harwood, 2007; Starkey et al., 2009; Borlee et al., 2010), and (ii) impact negatively the production of T3SS components (Moscoso et al., 2011), which we were able to confirm in the *oprF* mutant. Decrease of the c-di-GMP level in the *oprF* mutant strain upon overproduction of a phosphodiesterase led to the restoration of polysaccharide production, biofilm formation and T3SS activity to wild-type levels. These observations suggest that an elevated c-di-GMP level could be the leading cause of the phenotypic alterations in this strain. Both *pel* and *psl* genes are known to be regulated by intracellular c-di-GMP level (Hickman et al., 2005), so the question remains on how c-di-GMP increase in the *oprF* mutant specifically affects Pel synthesis but not Psl. Recently, another study has shown that c-di-GMP produced by the diguanylate cyclase WspR specifically affects Pel but not Psl synthesis (Huangyutitham et al., 2013). This same study suggests that phenotypes that are very dominant in *P. aeruginosa* may not be much affected by the small c-di-GMP increase [this could be the case for Psl, which is the EPS that is mostly responsible for attachment and biofilm formation in *P. aeruginosa* strain PAO1 (Colvin et al., 2012)]. This study also suggests that the differential effects are due to differences in the affinity of the receptor proteins for c-di-GMP. PelD and FleQ are the two proteins that regulate Pel synthesis in response to c-di-GMP and their affinity to c-di-GMP is in the micromolar range (lower affinity; Hickman et al., 2005; Whitney et al., 2012), whereas other known c-di-GMP receptors have affinities in the nanomolar range (higher affinity; Christen et al., 2010). So it is conceivable that a change in the c-di-GMP level like the one observed in the *oprF* mutant could affect FleQ and/or PelD activity but not other high-affinity receptors which are already saturated for c-di-GMP binding. Finally, the levels of *pelB* mRNA were not fully reverted to wild-type levels upon artificial reduction of the c-di-GMP level in the *oprF* mutant, suggesting that factors other than

c-di-GMP may contribute to *pelB* increased expression in the *oprF* mutant.

It is known that the *pel* and *psl* mRNAs are furthermore post-transcriptionally repressed by RsmA, the activity of which is controlled by the two sRNAs *rsmZ* and *rsmY* through complex regulatory systems involving several sensor kinases and accessory components (Mikkelsen et al., 2011). Interestingly, we show that *rsmZ* transcription is increased in response to the higher c-di-GMP level displayed by the *oprF* mutant. Expression of these sRNAs is positively regulated by the phosphorylated GacA response regulator from the TCS GacS/GacA. GacS is itself regulated by the orphan sensors, LadS and RetS, acting positively and negatively on GacA, respectively. PhoP, the regulator of the PhoPQ TCS that is activated in response to low magnesium concentration, also controls expression of *rsmZ* but not *rsmY* (Mulcahy and Lewenza, 2011). Noticeably, the PA1181 gene encoding a c-di-GMP cyclase is located nearby PA1179 and PA1180, encoding the PhoPQ TCS. However, the three genes were not predicted to be part of an operon (http://www.pseudomonas.com). Furthermore, HptB is a negative regulator of *rsmY* but not of *rsmZ* (Bordi et al., 2010). Similarly, the BfiSR two components system controls *rsmZ* but not *rsmY* via the RNase CafA (Petrova and Sauer, 2010). Remarkably, a mutation in *lptA*, encoding a lysophosphatidyl transferase, altered membrane fluidity (Baysse et al., 2005), led to increase expression of *rsmZ*, but not of *rsmY* (Baysse and O'Gara, 2007). Our study shows a c-di-GMP-dependent control of OprF, on *rsmZ* expression, but not on *rsmY* expression, providing a novel example of the dissociated control of the two sRNAs, *rsmY* and *rsmZ*.

How the c-di-GMP pool level is increased in the *oprF* mutant is not a trivial question. OprF is connecting the OM and the peptidoglycan layer and the absence of OprF provokes OM alterations (Rawling et al., 1998; Chevalier et al., 2000). It has been previously shown that H636 cells were shorter than the wild-type as judged by image analysis (Woodruff and Hancock, 1988) and by electron microscopy (Gotoh et al., 1989). Here we observe by SEM analyses that H636 cells were slightly thinner that H103 and H636O suggesting cell wall alterations. Cell morphology is, however, highly versatile and depends on growth conditions, as well as on the physiological state of the bacteria. However, despite suspected, it has never been clearly demonstrated that an *oprF* mutant encounters cell wall stress. Here, we show that the two ECFs sigma factors AlgU and SigX that are important for peptidoglycan and membrane homeostasis (Wood et al., 2006; Wood and Ohman, 2009; Boechat et al., 2013; Gicquel et al., 2013; Blanka et al., 2014), are active in the *oprF* mutant. Cell wall stress induced by D-cycloserin treatment (Wood and Ohman, 2009), or low shear modeled microgravity (Crabbé et al., 2010), is known to have similar effects on AlgU and SigX so one can hypothesize that deletion of *oprF* may result in a cell wall stress that then leads to production or activation of AlgU and SigX. Interestingly, two diguanylate cyclases, PA1181 and *adcA* were recently reported to belong to the SigX regulon of *P. aeruginosa* PA14 (Blanka et al., 2014). Accordingly, the two genes have lower expression levels in a *sigX*-deleted mutant of strain H103. While PA1181 and *adcA* expression is increased in the *oprF* mutant strain, the same was not true for PA2072, another c-di-GMP related protein belonging to the SigX regulon. Taken together, these data support the idea that *P. aeruginosa oprF* mutant displays higher levels of c-di-GMP as a consequence of the cell wall stress that the lack of OprF imposes to the cells. In addition to this, it is known that the two ECFs are involved in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm formation (Bazire et al., 2010; Gicquel et al., 2013), so this study also highlights the possible role of cell envelope stress in biofilm formation. Our observation might in fact consolidate this concept, since an *ompA* mutant of *Escherichia coli* was shown to form sticky colonies by overproducing the exopolysaccharide cellulose through activation of the CpxRA TCS that responds to membrane stress (Ma et al., 2009). The bacteria might compensate the loss of the major OM protein OprF and the related membrane stress by producing an EPS that may stabilize the membrane, or protect itself from the environment.

This hypothesis is further strengthened by the fact that upon contact with surfaces, c-di-GMP is stimulated through the chemosensory-like surface-sensing system Wsp (Güvener and Harwood, 2007; O'Connor et al., 2012; Huangyutitham et al., 2013), though the exact nature of the signal remains obscure. Very recently, it was suggested that membrane alterations led to increase biofilm production through WspR activation resulting in c-di-GMP production (Blanka et al., 2015). In *Vibrio cholerae*, growth at low temperature modulates membrane fluidity and alters c-di-GMP signaling and biofilm formation (Townsley and Yildiz, 2015). Interestingly, Townsley and Yildiz (2015) show that temperature modulates c-di-GMP levels in a similar fashion in *P. aeruginosa* but not in the Gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes*. Taken together, our study further supports the concept associated with these data and suggests that membrane alterations affect activity of enzymes involved in c-di-GMP metabolism, although the molecular mechanism remains to be elucidated.

The alternative or additional possibility that the effects caused by the absence of OprF result from something else other than OM disorganization cannot be disregarded, especially considering the role of OprF as a host immune system sensor (Wu et al., 2005; Mishra et al., 2015), more generally as an environmental sensor (Wagner et al., 2006; Fito-Boncompte et al., 2011). It is also conceivable that OprF-dependent c-di-GMP modulation is linked to its ability to transmit or to transduce unknown signals through the OM, which would then be detected by a sensor protein in the cytoplasmic membrane. Taken together, our data show for the first time that OprF is linked to c-di-GMP level modulations, through a direct (signaling) and/or indirect (envelope stress) mechanism.

Author Contributions

Conceived and designed experiments: EB, JM, PL, AD, AF, SC.
Performed the experiments: EB, JM, RD, OM, LF-B, GG, AB, GB-W.
Analyzed the data: EB, JM, RD, PL, AD, AF, SC, JO, GB-W.
Contributed reagents/materials/analysis tools: OM, MB.
Wrote the paper: EB, JM, PL, AD, NO, MF, AF, GB-W, JO, SC.
All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We wish to thank Bob Hancock and Manjeet Bains for the gift of *P. aeruginosa* H103 and H636, Matt Parsek for the reporter system P_{cdrA}-*gfp*, Anke Neidig and Michael Nusser for technical assistance. The LMSM is supported by the Région Haute-Normandie (France, GRRs Sésa and IRIB), the Grand Evreux Agglomeration and European FEDER funds. The LBCM is supported by the Région Bretagne (France) and European FEDER funds.

References

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., et al. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* 59, 1114–1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x

Azghani, A. O., Idell, S., Bains, M., and Hancock, R. E. W. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb. Pathog.* 33, 109–114. doi: 10.1006/mpat.2002.0514

Baysse, C., Cullinane, M., Denervaud, V., Burrowes, E., Dow, J. M., Morrissey, J. P., et al. (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151, 2529–2542. doi: 10.1099/mic.0.28185-0

Baysse, C., and O'Gara, F. (2007). "Role of membrane structure during stress signalling and adaptation in *Pseudomonas*," in *Pseudomonas: A Model System in Biology*, Vol. V, eds J. Ramos and A. Filloux (New York, NY: Springer-Verlag), 193–224.

Bazire, A., Shioya, K., Soum-Soutera, E., Bouffartigues, E., Ryder, C., Guentas-Dombrowsky, L., et al. (2010). The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192, 3001–3010. doi: 10.1128/JB.01633-09

Becher, A., and Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. *Biotechniques* 29, 948–950.

Blanka, A., Düvel, J., Dötsch, A., Klinkert, B., Abraham, W. R., Kaever, V., et al. (2015). Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition. *Sci. Signal.* 8, ra36. doi: 10.1126/scisignal.2005943

Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., et al. (2014). Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *J. Bacteriol.* 196, 345–356. doi: 10.1128/JB.01034-13

Boechat, A. L., Kaihami, G. H., Politi, M. J., Lepine, F., and Baldini, R. L. (2013). A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 8:e84775. doi: 10.1371/journal.pone.0084775

Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., et al. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 76, 1427–1443. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x

Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J., and Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 75, 827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x

Bouffartigues, E., Duchesne, R., Bazire, A., Simon, M., Maillot, O., Dufour, A., et al. (2014). Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX. *FEMS Microbiol. Lett.* 356, 193–200. doi: 10.1111/1574-6968.12482

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., et al. (2012). Transcription of the oprF gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. *J. Bacteriol.* 194, 4301–4311. doi: 10.1128/JB.00509-12

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Fito-Boncompte, L., Taupin, L., Maillot, O., et al. (2011). The major outer membrane protein oprf is required for rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2, 118. doi: 10.4172/2155-9597.1000118

Brencic, A., and Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.* 72, 612–632. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x

Brinkman, F. S., Schoofs, G., Hancock, R. E., and De Mot, R. (1999). Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 181, 4746–4754.

Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., et al. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* 73, 622–638. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x

Chevalier, S., Burini, J. F., Freulet-Marriere, M. A., Regeard, C., Schoofs, G., Guespin-Michel, J., et al. (2000). Characterization of an OprF-deficient mutant suggests that OprF is an essential protein for *Pseudomonas fluorescens* strain MF0. *Res. Microbiol.* 151, 619–627. doi: 10.1016/S0923-2508(00)90128-1

Christen, M., Kulasekara, H. D., Christen, B., Kulasekara, B. R., Hoffman, L. R., and Miller, S. I. (2010). Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* 328, 1295–1297. doi: 10.1126/science.1188658

Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., et al. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.* 14, 1913–1928. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x

Corbella, M. E., and Puyet, A. (2003). Real-time reverse transcription-PCR analysis of expression of halobenzoate and salicylate catabolism-associated operons in two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2269–2275. doi: 10.1128/AEM.69.4.2269-2275.2003

Crabbé, A., Pycke, B., Van Houdt, R., Monsieurs, P., Nickerson, C., Leys, N., et al. (2010). Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves AlgU regulation. *Environ. Microbiol.* 12, 1545–1564. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02184.x

de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 1994, 386–405. doi: 10.1016/0076-6879(94)35157-0

Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

Duchesne, R., Bouffartigues, E., Oxaran, V., Maillot, O., Benard, M., Feuilloley, M. G. J., et al. (2013). A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. *J. Proteomics* 94, 451–459. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.022

Firoved, A. M., Boucher, J. C., and Deretic, V. (2002). Global genomic analysis of AlgU (sigma(E))-dependent promoters (sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 184, 1057–1064. doi: 10.1128/jb.184.4.1057-1064.2002

Fito-Boncompte, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., et al. (2011). Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect. Immun.* 79, 1176–1186. doi: 10.1128/IAI.00850-10

Friedman, L., and Kolter, R. (2004a). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51, 675–690. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x

Friedman, L., and Kolter, R. (2004b). Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* 186, 4457–4465. doi: 10.1128/JB.186.14.4457-4465.2004

Ghafoor, A., Hay, I. D., and Rehm, B. H. A. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5238–5246. doi: 10.1128/AEM.00637-11

Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., et al. (2013). The extra-cytoplasmic function sigma factor sigX modulates

biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 8:e80407. doi: 10.1371/journal.pone.0080407

Gooderham, W. J., and Hancock, R. E. W. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 279–294. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x

Gotoh, N., Wakebe, H., Yoshihara, E., Nakae, T., and Nishino, T. (1989). Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J. Bacteriol.* 171, 983–990.

Güvener, Z. T., and Harwood, C. S. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol. Microbiol.* 66, 1459–1473. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06008.x

Hancock, R. E., and Carey, A. M. (1979). Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* 140, 902–910.

Hassett, D. J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lymar, S. V., Rowe, J. J., Yoon, S. S., et al. (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1425–1443. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00152-7

Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., et al. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiol. Read. Engl.* 146, 2395–2407.

Hickman, J. W., Tifrea, D. F., and Harwood, C. S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14422–14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102

Hoang, T. T., Kutchma, A. J., Becher, A., and Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43, 59–72. doi: 10.1006/plas.1999.1441

Huangyutitham, V., Güvener, Z. T., and Harwood, C. S. (2013). Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. *MBio* 4, e00213–e00242. doi: 10.1128/mBio.00242-13

Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A. N., Wozniak, D. J., Romeo, T., and Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol. Microbiol.* 78, 158–172. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x

Jones, C. J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L. K., Xu, B., et al. (2014). ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 10:e1003984. doi: 10.1371/journal.ppat.1003984

Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Lory, S. (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 65, 1474–1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., and Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 5:e1000354. doi: 10.1371/journal.ppat.1000354

Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., and Wozniak, D. J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J. Bacteriol.* 188, 8213–8221. doi: 10.1128/JB.01202-06

Mikkelsen, H., Sivaneson, M., and Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 13, 1666–1681. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x

Mishra, M., Ressler, A., Schlesinger, L. S., and Wozniak, D. J. (2015). Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* doi: 10.1128/IAI.00081-15 [Epub ahead of print].

Moscoso, J. A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., and Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ. Microbiol.* 13, 3128–3138. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x

Mulcahy, H., and Lewenza, S. (2011). Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PLoS ONE* 6:e23307. doi: 10.1371/journal.pone.0023307

Nestorovich, E. M., Sugawara, E., Nikaido, H., and Bezrukov, S. M. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *J. Biol. Chem.* 281, 16230–16237. doi: 10.1074/jbc.M600650200

Newman, J. R., and Fuqua, C. (1999). Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene* 227, 197–203. doi: 10.1016/S0378-1119(98)00601-5

O'Connor, J. R., Kuwada, N. J., Huangyutitham, V., Wiggins, P. A., and Harwood, C. S. (2012). Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol. Microbiol.* 86, 720–729. doi: 10.1111/mmi.12013

Pamp, S. J., Sternberg, C., and Tolker-Nielsen, T. (2009). Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* 75, 90–103. doi: 10.1002/cyto.a.20685

Petrova, O. E., and Sauer, K. (2010). The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA rsmZ through CafA. *J. Bacteriol.* 192, 5275–5288. doi: 10.1128/JB.00387-10

Ramsey, D. M., and Wozniak, D. J. (2005). Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 56, 309–322. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x

Rawling, E. G., Brinkman, F. S., and Hancock, R. E. (1998). Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J. Bacteriol.* 180, 3556–3562.

Rybtke, M. T., Borlee, B. R., Murakami, K., Irie, Y., Hentzer, M., Nielsen, T. E., et al. (2012). Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5060–5069. doi: 10.1128/AEM.00414-12

Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 644–648. doi: 10.1016/j.mib.2007.09.010

Schurr, M. J., Martin, D. W., Mudd, M. H., Hibler, N. S., Boucher, J. C., and Deretic, V. (1993). The algD promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cell. Mol. Biol. Res.* 39, 371–376.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7

Spangler, C., Böhm, A., Jenal, U., Seifert, R., and Kaever, V. (2010). A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J. Microbiol. Methods* 81, 226–231. doi: 10.1016/j.mimet.2010.03.020

Spiers, A. J., Buckling, A., and Rainey, P. B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol. Read. Engl.* 146, 2345–2350.

Starkey, M., Hickman, J. H., Ma, L., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* 191, 3492–3503. doi: 10.1128/JB.00119-09

Strehmel, J., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Brenner-Weiss, G., and Overhage, J. (2015). The sensor kinase PA4398 modulates swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1274–1285. doi: 10.1128/AEM.02832-14

Tamber, S., and Hancock, R. E. W. (2004). "The outer membranes of *Pseudomonas*," in *Pseudomonas*, Vol. 1, *Genomics, Life Style and Molecular Architecture*, ed. J.-L. Ramos (New York, NY: Springer US), 575–601. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-9086-0_19

Tolker-Nielsen, T., and Sternberg, C. (2011). Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 1, Unit 1B.2. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b02s21

Townsley, L., and Yildiz, F. H. (2015). Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-920.12799 [Epub ahead of print].

Wagner, V. E., Frelinger, J. G., Barth, R. K., and Iglewski, B. H. (2006). Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol.* 14, 55–58. doi: 10.1016/j.tim.2005.12.002

Whitney, J. C., Colvin, K. M., Marmont, L. S., Robinson, H., Parsek, M. R., and Howell, P. L. (2012). Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 287, 23582–23593. doi: 10.1074/jbc.M112.375378

Wood, L. F., Leech, A. J., and Ohman, D. E. (2006). Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. *Mol. Microbiol.* 62, 412–426. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05390.x

Wood, L. F., and Ohman, D. E. (2009). Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 72, 183–201. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06635.x

Woodruff, W. A., and Hancock, R. E. (1988). Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after in vitro and in vivo insertion mutagenesis of the cloned gene. *J. Bacteriol.* 170, 2592–2598.

Woodruff, W. A., and Hancock, R. E. (1989). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. *J. Bacteriol.* 171, 3304–3309.

Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J. E., et al. (2005). Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 309, 774–777. doi: 10.1126/science.1112422

Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., and Molin, S. (2011). Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environ. Microbiol.* 13, 1705–1717. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02503.x

Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M., Ochsner, U. A., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* 3, 593–603. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00295-2

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Bouffartigues, Moscoso, Duchesne, Rosay, Fito-Boncompte, Gicquel, Maillot, Bénard, Bazire, Brenner-Weiss, Lesouhaitier, Lerouge, Dufour, Orange, Feuilloley, Overhage, Filloux and Chevalier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Partie III- Effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa*

Il est décrit dans la littérature qu'une exposition de *P. aeruginosa* à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (aminoglycosides, quinolones, tétracycline) entraine une augmentation de la formation de biofilm (Gotoh *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2006). Cependant ce phénotype n'ayant pas été observé pour tous les antibiotiques, puisque la polymyxine B, le chloramphénicol et la carbénicilline n'ont aucun effet sur le biofilm de *P. aeruginosa*, il a été suggéré que la réponse à ces faibles concentrations pourrait être plus ou moins spécifique et que ces antibiotiques seraient perçus comme des molécules signales (Linares *et al.*, 2006). En effet les antibiotiques sont capables d'agir comme des signaux modulant l'expression des gènes dans les communautés bactériennes (Andersson & Hughes, 2014). Par exemple l'effet de la tobramycine en tant que molécule signale, a été montré à la fois sur l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et au niveau post-transcriptionnel (Linares *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2015). La tobramycine est un aminoglycoside majoritairement utilisé dans le traitement des infections pulmonaires à *P. aeruginosa*. Les aminoglycosides sont des antibiotiques ciblant la synthèse protéique et agissant indirectement sur la paroi cellulaire. L'entrée des aminoglycosides dans la cellule est initiée par l'interaction de la molécule polycationique avec les phospholipides et le LPS entrainant une perméabilisation de la membrane. Utilisée en concentrations sub-inhibitrices cette molécule entraine l'augmentation de la formation de biofilm de *P. aeruginosa* via une modulation du taux de c-di-GMP (Hoffman *et al.*, 2005). Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la formation de biofilm en réponse à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques ne sont pas connus. L'enveloppe cellulaire étant la première structure en contact avec l'antibiotique nous avons émis l'hypothèse que l'interaction de l'antibiotique avec la membrane externe pourrait entrainer un stress de l'enveloppe et conduire à l'activité du facteur sigma ECF SigX impliqué dans la formation de biofilm.

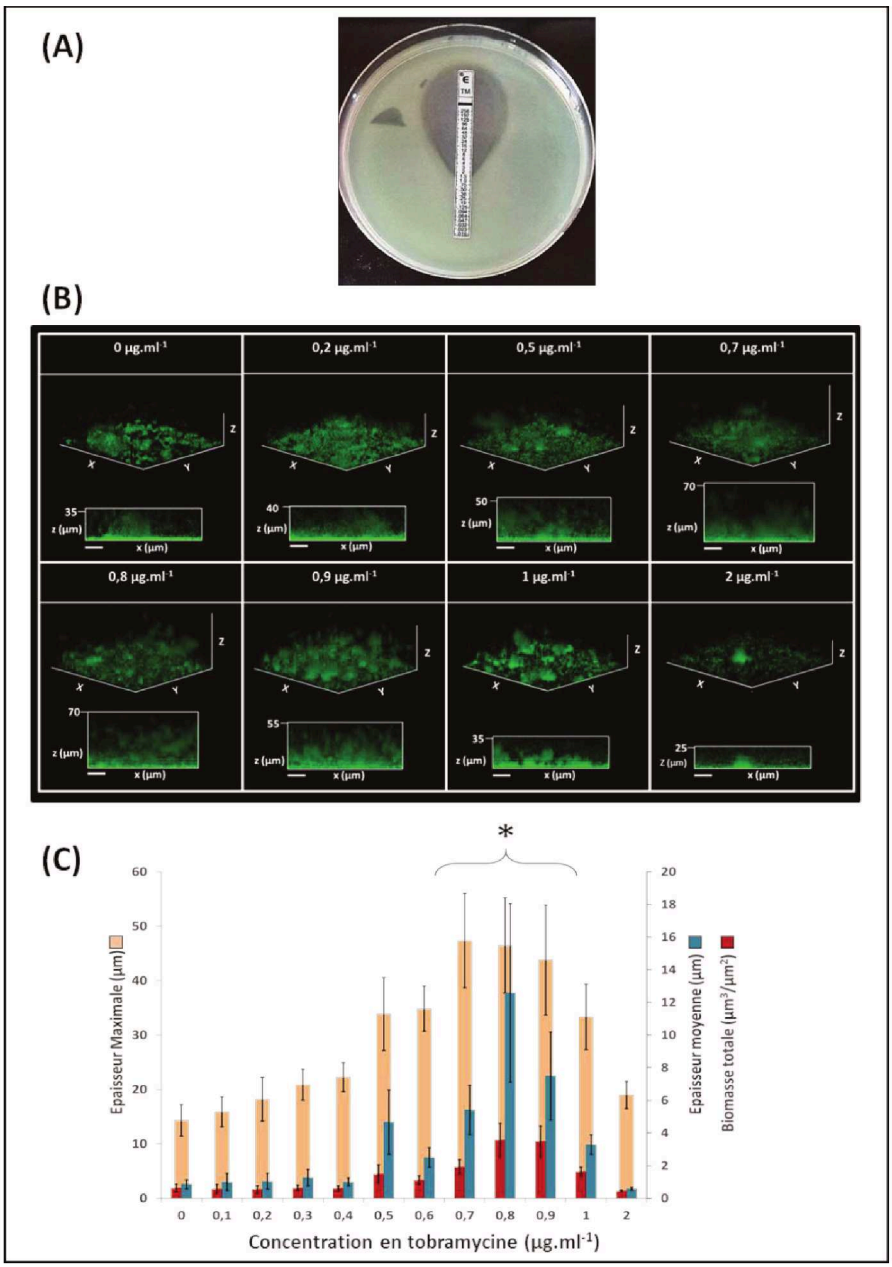


Figure 26. Effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* H103. (A) Concentration minimale de tobramycine inhibant la croissance de H103. (B) Images de microscopie confocale à balayage laser des biofilms âgés de 24 heures en fonction de la concentration en tobramycine. En haut : vues en 3 dimensions selon les axes x, y et z ; en bas : coupe transversale. La barre blanche représente 20 µm. (C) Analyse COMSTAT des images de microscopie. Les barres d'erreur représentent les SEM et sont le résultat de l'analyse de 9 vues.

1- Effet de la tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* H103

L'augmentation de la formation de biofilm de *P. aeruginosa* par des concentrations sub-inhibitrices d'aminoglycosides dont la tobramycine a été principalement observé par des techniques colorimétriques basées sur la coloration au cristal violet (Hoffman *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2013). Dans cette étude nous avons choisi d'observer ce phénotype par microscopie confocale à balayage laser dans le but de déterminer plus précisément l'architecture du biofilm et de quantifier la biomasse ainsi que les épaisseurs moyenne et maximale.

Afin de déterminer la gamme de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine à utiliser, nous avons dans un premier temps recherché la concentration minimale inhibitrice de tobramycine chez *P. aeruginosa* H103 cultivée en milieu solide LB. Pour cela des bandelettes E-test de tobramycine ont été déposées sur des géloses LB inoculées avec les bactéries selon les recommandations du fournisseur. Après 24h à 37°C nous avons observé que *P. aeruginosa* H103 n'était pas capable de croitre à des concentrations supérieures à 2 $\mu g.ml^{-1}$ (Figure 26A). Afin d'observer l'effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm, nous avons donc choisis d'exposer cette souche à des concentrations comprises entre 0 et 2 $\mu g.ml^{-1}$.

La souche *P. aeruginosa* H103 a été cultivée en plaques à fond en verre en condition statique pendant 24h, en présence de différentes concentrations de tobramycine. Comme le montre la figure 26B, H103 est capable de développer un biofilm classique avec des formes de type « champignons » en LB, présentant une distribution hétérogène des microcolonies qui atteignent jusqu'à 35 µm d'épaisseur. En présence de tobramycine, le biofilm augmente graduellement d'épaisseur jusqu'à une concentration de 0,8 $\mu g.ml^{-1}$ au-delà de laquelle il diminue. La morphologie du biofilm est également altérée par la tobramycine puisque les structures des biofilms formés par H103 en tobramycine sont plus nombreuses et plus grandes qu'en absence d'antibiotique. Afin de quantifier ces observations, une analyse COMSTAT a été réalisée sur 9 vues pour chaque condition (Figure 26C). Ce traitement informatique des images de microscopie a confirmé que la formation de biofilm augmente graduellement jusqu'à atteindre un pic d'induction à la concentration

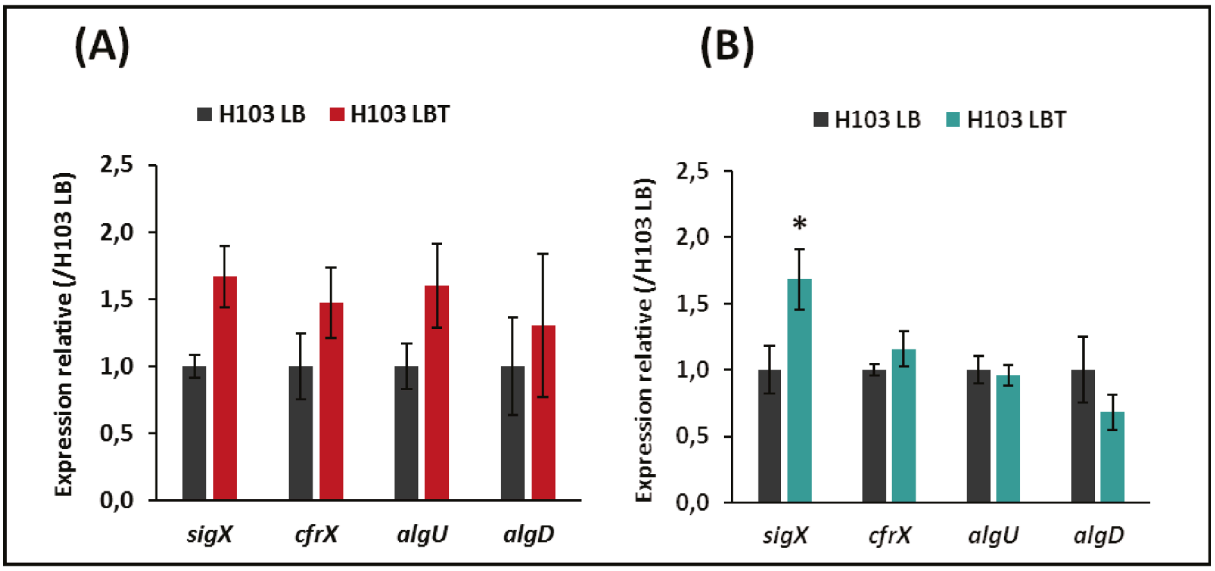


Figure 27. Effet de la tobramycine (0,8 µg.ml^{-1}) sur l'expression des gènes codant les facteurs sigma ECF SigX, AlgU et leurs cibles chez H103 cultivée en biofilm pendant 24 heures. (A) Analyse qRT-PCR réalisée à partir du lot d'ARNs N°1. (B) Analyse qRT-PCR réalisée à partir du lot d'ARNs N°2. Chaque analyse a été réalisée sur 3 réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent les SEM.

de 0,8 µg.ml^{-1} de tobramycine. A cette concentration, la biomasse et l'épaisseur moyenne du biofilm sont environ 6 et 14 fois plus élevés respectivement que lorsque le biofilm est cultivé en LB. Au-delà de 0,8 µg.ml^{-1} de tobramycine, ces paramètres chutent fortement, et sont relativement proches de ceux du LB.

L'ensemble de ces résultats confirme l'augmentation de la formation de biofilm en réponse aux aminoglycosides, précédemment décrite dans la littérature (Gotoh *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, 2005), et montre des modifications de l'architecture du biofilm en termes de biomasse et d'épaisseur.

La concentration de 0,8 µg.ml^{-1} de tobramycine étant la concentration en LB induisant les plus fortes modifications sur le biofilm, elle a donc été choisie pour la suite de l'étude et sera notée LBT.

2- Effet d'une concentration sub-inhibitrice de tobramycine sur l'expression et l'activité des facteurs sigma ECF AlgU et SigX

Puisque la membrane externe est la première structure en contact direct avec l'antibiotique, nous avons émis l'hypothèse que cette interaction pouvait entrainer un stress pariétal conduisant à l'activité des facteurs sigma ECF AlgU et SigX. Pour tester l'implication de ces ECF, des expériences de qRT-PCR sur les ARNs totaux extraits de biofilms cultivés en LB ou en LBT ont été réalisées. Comme le montre la figure 27, deux expériences de qRT-PCR correspondant à deux lots d'extractions d'ARNs indépendantes (effectuées chacune sur trois réplicats biologiques indépendants) ont été réalisées. La première (Figure 27A) montre que l'expression d'*algU* est augmentée d'un facteur 1,6 tandis que celle d'*algD*, la cible directe d'AlgU, ne semble pas affectée par un traitement à la tobramycine. Au contraire *sigX* et *cfrX* sont environ 1,7 et 1,5 fois plus exprimés respectivement en réponse à la tobramycine. Bien que ces taux d'expression semblent relativement faibles, l'expression de *sigX* varie généralement d'un facteur 1,7 à 2 suggérant que ce facteur sigma ECF est finement régulé (Boechat *et al.*, 2013; Bouffartigues *et al.*, 2012). Cependant, l'analyse statistique de ces données à l'aide du logiciel Data Assist ne nous a pas permis d'obtenir des résultats significatifs, c'est-à-dire une *p* value inférieure à 0,05. Le biofilm étant une communauté complexe et fortement hétérogène, dans laquelle les cellules ne sont pas toutes dans le même état physiologique, il n'est pas anormal de voir des variations de l'expression des

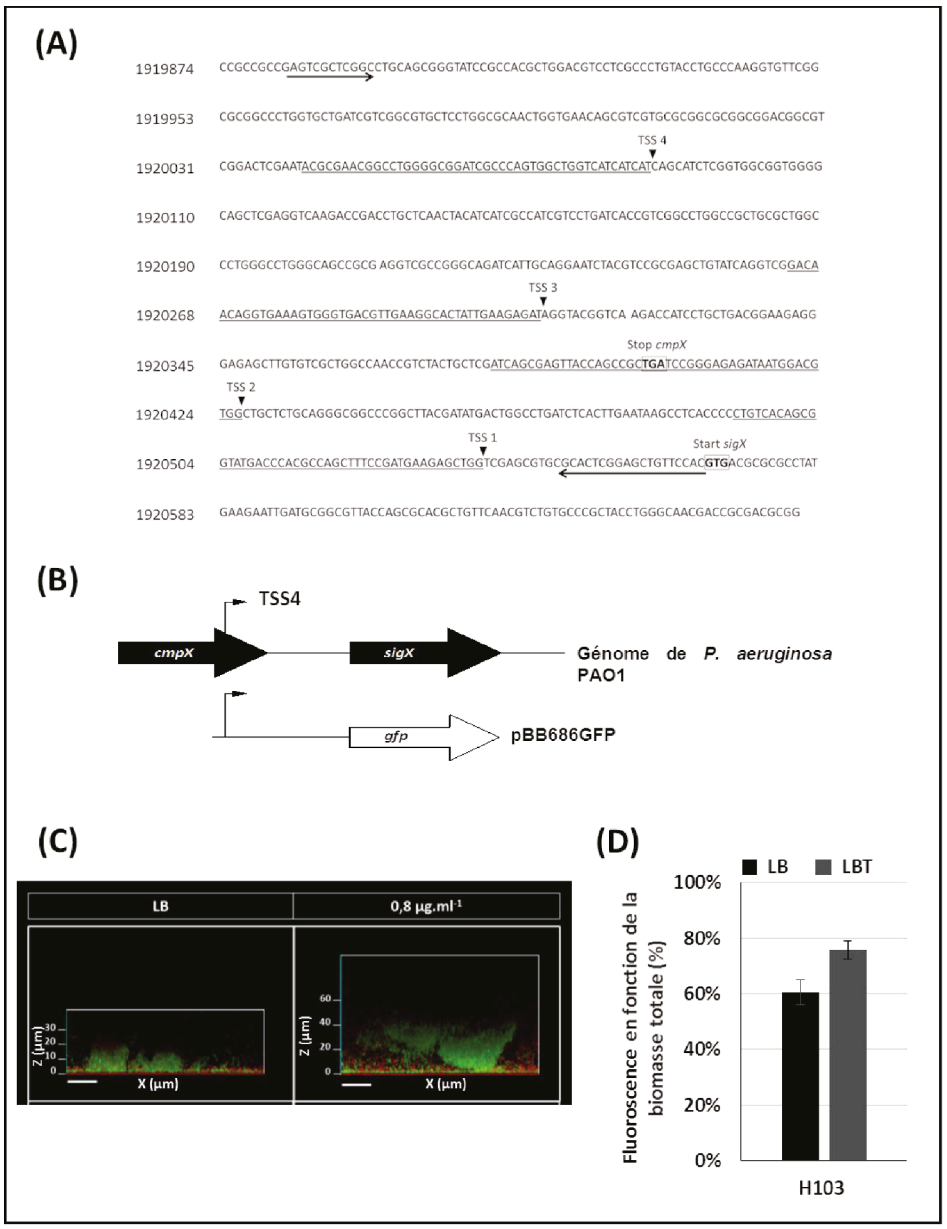


Figure 28. Analyse *in situ* de l'expression de *sigX* chez *P. aeruginosa* H103 cultivée en biofilm en présence ou en absence de tobramycine. (A) Cartographie de la région promotrice de *sigX*. Les sites de début de transcription (TSS) identifiés sont indiqués par une flèche verticale. Les différents promoteurs sont soulignés. Les flèches horizontales représentent la position des amorces utilisées pour l'amplification du fragment de 686 pb. (B) Représentation schématique du système rapporteur pBB686GFP contenant la région promotrice de *sigX* (686 pb) fusionnée à une GFP instable. (C) Images de microscopie confocale à balayage laser de l'activité de la région promotrice de *sigX* (vert) dans les biofilms âgés de 24 heures cultivés en LB ou en LBT. La barre blanche représente 20 µm. Les cellules ont été marquées par la sonde fluorescente route Syto 62 red fluor. (D) Analyse COMSTAT des images de microscopie. Les barres d'erreur représentent les SEM.

gènes au sein d'un même échantillon (Serra et Hengge, 2014; Stewart et Franklin, 2008). Afin de confirmer ces résultats, nous avons donc choisi d'augmenter le nombre d'échantillons et de réaliser un second lot d'extraction d'ARNs à partir de 3 cultures indépendantes. Comme le montre la figure 27B, nous avons observé lors de cette deuxième analyse, que l'expression d'*algD* n'est pas altérée par un traitement à la tobramycine. En revanche, contrairement à la première expérience, l'expression d'*algU* et de *cfrX* n'est plus modifiée par la présence de tobramycine. Même si ces résultats restent à conforter en multipliant le nombre d'échantillons analysés, cette deuxième analyse a permis de confirmer de manière significative, la surexpression d'un facteur 1,7 de l'expression du gène *sigX* suggérant que SigX pourrait être impliqué dans la réponse de *P. aeruginosa* à la tobramycine dans nos conditions, au contraire d'AlgU. Du fait de la non répétabilité de nos résultats de qRT-PCR, ces résultats seront considérés comme préliminaires dans la suite de cette étude.

La région promotrice de 686 pb du gène *sigX*, contenant au moins 4 sites d'initiation de transcription (Figure 28A), a été fusionnée au gène *gfp* (*asv*), codant un variant instable de la GFP, dans le vecteur pBBGFP, conduisant au vecteur pBB686GFP (Figure 28B). Après transformation de *P. aeruginosa* avec le vecteur vide pBBGFP ou le vecteur pBB686GFP, les souches ont été cultivées en biofilm pendant 24h en milieu LB ou LBT puis observées en microscopie confocale à balayage laser. Aucune fluorescence significative n'a été détectée pour les souches de *P. aeruginosa* transformées avec le vecteur vide pBBGFP. En revanche, chez les souches transformées avec le vecteur pBB686GFP, le gène rapporteur est plus exprimé en présence de tobramycine (Figure 28C), confirmant que l'activité de la région promotrice de *sigX* est plus active et suggérant que *sigX* est plus exprimé dans les biofilms de *P. aeruginosa* en réponse à la tobramycine. L'analyse COMSTAT des images de microscopie a permis de confirmer ce résultat (Figure 28D). De manière intéressante, il apparait que la fluorescence est principalement détectée dans les structures tridimensionnelles plutôt qu'à la base du biofilm.

3- Effet de la mutation de *sigX* sur la formation de biofilm en réponse à la tobramycine.

Afin de comprendre l'implication de SigX dans ce phénotype, nous avons ensuite étudié l'effet de la mutation de *sigX* sur la formation de biofilm en présence

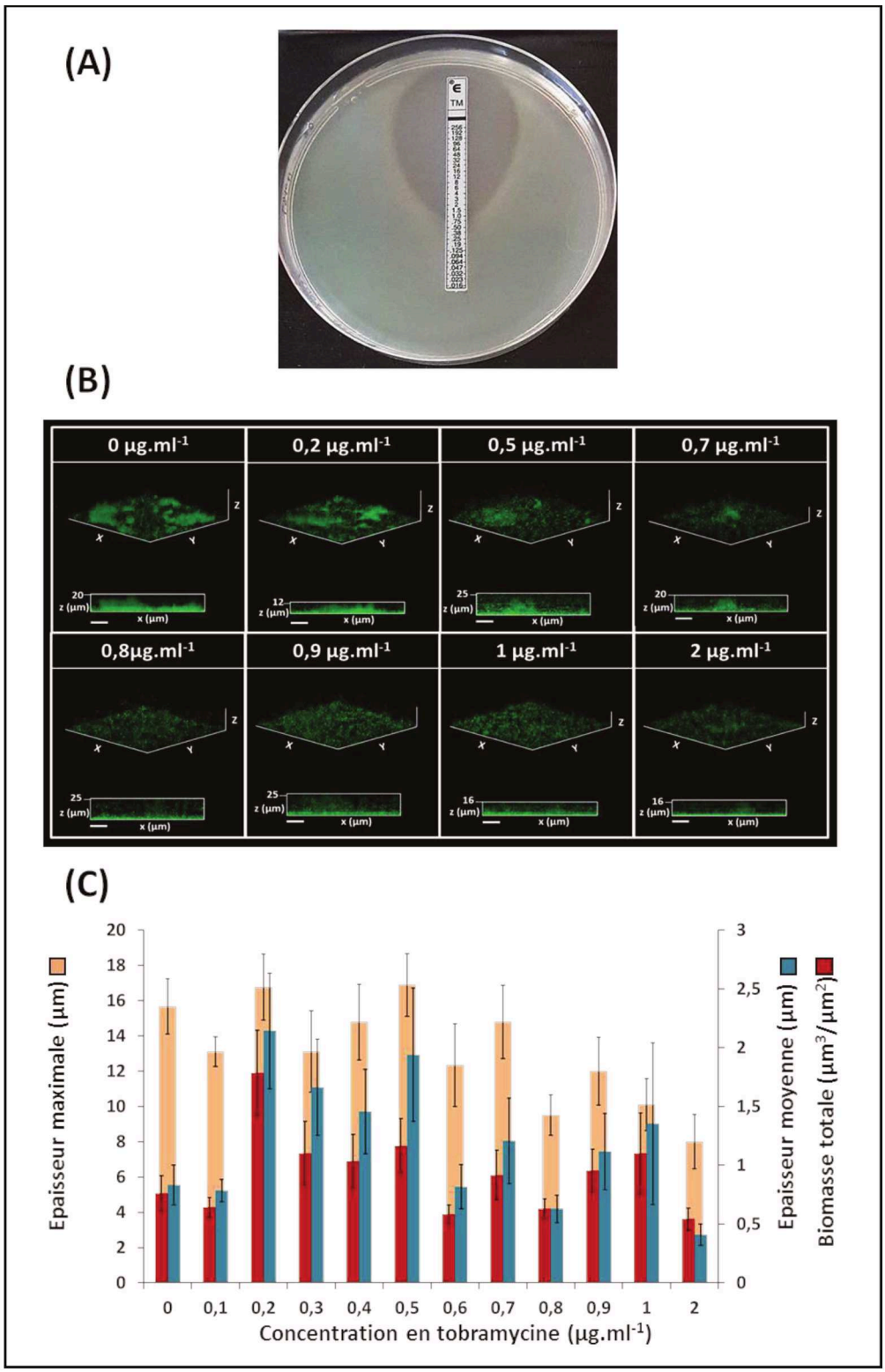


Figure 29. Effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAOSX. (A) Concentration minimale de tobramycine inhibant la croissance de PAOSX. (B) Images de microscopie confocale à balayage laser des biofilms âgés de 24 heures en fonction de la concentration en tobramycine. En haut : vues en 3 dimensions selon les axes x, y et z ; en bas : coupe transversale. La barre blanche représente 20 µm. (C) Analyse COMSTAT des images de microscopie. Les barres d'erreur représentent les SEM.

de tobramycine. Dans un premier temps nous avons déterminé la concentration minimale de tobramycine inhibant la croissance de la souche PAOSX, mutant de *P. aeruginosa* H103 incapable de produire SigX. Par la méthode des E-test, nous avons pu constater que la souche PAOSX est légèrement plus sensible à la tobramycine que la souche H103 puisqu'aucune croissance n'est observée au-delà de 1,5 $\mu g.ml^{-1}$ (Figure 29A). La formation de biofilm a ensuite été observée dans les mêmes conditions que *P. aeruginosa* H103. Comme le montre la figure 29B, le biofilm formé par PAOSX en milieu LB possède une architecture semblable à celle du biofilm formé par H103. L'analyse COMSTAT a également montré que les épaisseurs moyenne et maximale, ainsi que les biovolumes sont assez similaires à ce qui est observé chez H103 dans ces conditions (Figure 29C). Cependant, l'ajout de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine, ne conduit pas à une augmentation significative de la formation de biofilm, aussi bien en termes d'épaisseur qu'en termes de biovolume (figure 29C). La complémentation de la mutation de *sigX* par l'intégration d'une copie du gène *sigX* dans le chromosome de PAOSX, entraine une restauration de l'effet de la tobramycine à la fois sur la production de biofilm (Figure 30A) et sur son architecture (Figure 30B). De plus, comme c'est le cas pour la souche H103, la concentration de 0,8 $\mu g.ml^{-1}$ de tobramycine provoque l'effet le plus important sur la formation de biofilm. L'ensemble de ces résultats montre l'implication de SigX dans l'augmentation de la formation de biofilm en réponse à la tobramycine.

4- Effet de la tobramycine sur le taux de c-di-GMP

La formation de biofilm ayant été associée à un fort taux intracellulaire de c-di-GMP (Wolska *et al*., 2016), nous avons ensuite choisi d'étudier la production de c-di-GMP dans les biofilms âgés de 24 heures. Trois gènes (PA1180, PA2072 et *gcbA*), dont les produits sont impliqués dans le métabolisme du c-di-GMP, ont été associés au régulon de SigX (Blanka *et al*., 2014). Nous avons donc dans un premier temps analysé par qRT-PCR, l'expression de ces gènes à partir des deux lots d'ARNs extraits des biofilms cultivés en LB ou en LBT. Nous avons pu observer sur ces deux lots que la tobramycine n'entraine aucun effet sur l'expression de ces gènes chez la souche H103 (figure 31A). Ces résultats restants malgré tout préliminaires, nous avons ensuite évalué le taux global de c-di-GMP chez *P. aeruginosa* H103 grâce au système rapporteur P*cdrA-gfp*, dans lequel le gène *gfp* a été fusionné à la région promotrice

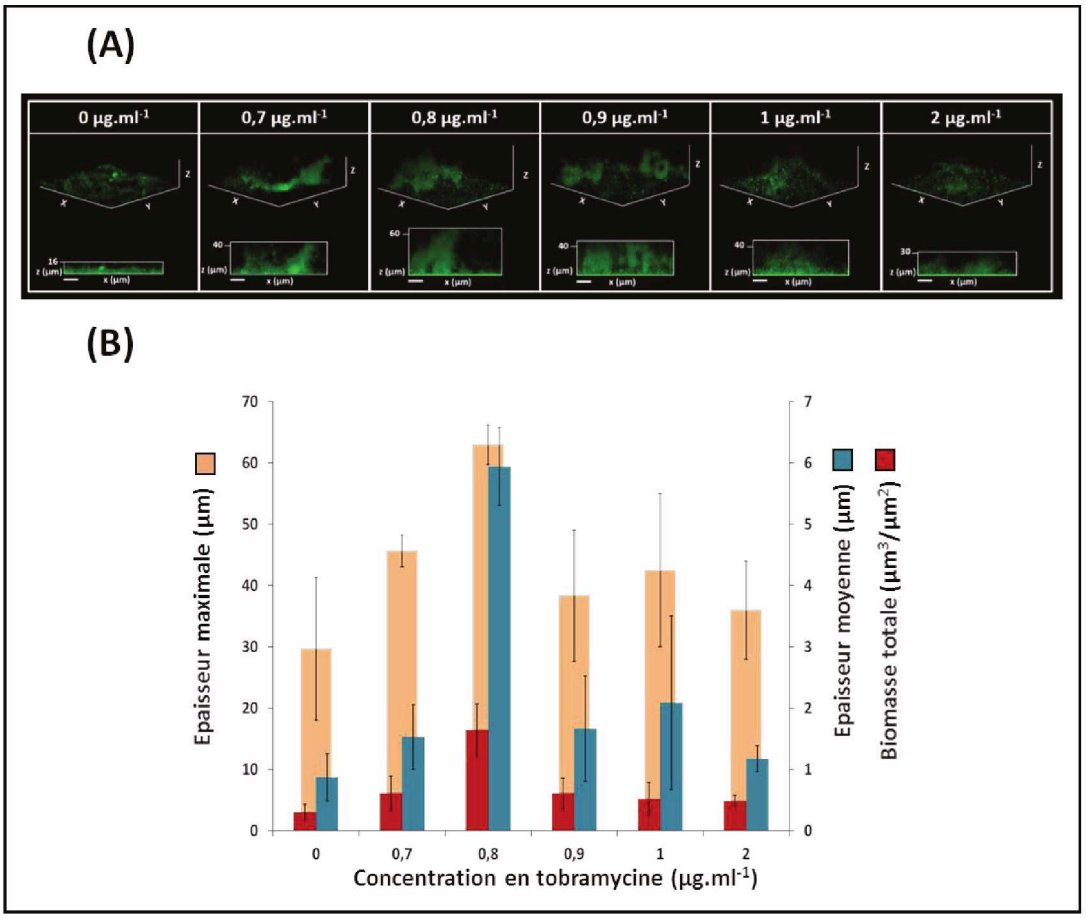


Figure 30. Effet de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAOSX+. (A) Images de microscopie confocale à balayage laser des biofilms âgés de 24 heures en fonction de la concentration en tobramycine. En haut : vues en 3 dimensions selon les axes x, y et z ; en bas : coupe transversale. La barre blanche représente 20 µm. (B) Analyse COMSTAT des images de microscopie. Les barres d'erreur représentent les SEM.

dépendante du c-di-GMP du gène *cdrA* (Rybtke *et al*., 2012). La figure 31B montre que l'activité du promoteur *cdrA* est assez similaire lorsque H103 est cultivée en LB ou en LBT, un résultat confirmé par l'analyse COMSTAT des images de microscopie (Figure 31C). La quantification du c-di-GMP, extrait à partir des biofilms de *P. aeruginosa* H103, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a confirmé que le taux de c-di-GMP ne semble pas altéré par la tobramycine (Figure 31D). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le c-di-GMP n'est pas majoritairement impliqué dans l'augmentation du biofilm en réponse à la tobramycine, dans nos conditions expérimentales.

5- Effet de la tobramycine sur la matrice du biofilm

Il est établi que la composition de la matrice exocellulaire joue un rôle important dans la stabilité du biofilm et la protection des cellules contre les stress environnementaux. Chez les souches non mucoïdes telles que PAO1, Pel et Psl sont deux exopolysaccharides clés maintenant la structure du biofilm. Comme le montre la figure 32A, dans les deux analyses de qRT-PCR, l'expression de *pel* et *psl* n'est pas modifiée lorsque *P. aeruginosa* est traitée avec la tobramycine. Ces données, bien que préliminaires, sont en accord avec le fait que des taux similaires de c-di-GMP ont été observés dans les deux conditions, puisque l'expression des gènes *pel* et *psl* est stimulée par de forts taux de c-di-GMP.

Un autre élément important de la matrice du biofilm est l'ADN extracellulaire (ADNe). Afin d'observer l'effet de la tobramycine sur le taux d'ADNe *in situ*, les cellules des biofilms âgés de 24 heures ont été marquées par le Syto 9, une sonde fluorescente verte, et l'ADNe a été marqué par le DDAO, une sonde fluorescente rouge ne pénétrant pas les membranes cellulaires, puis observés en microscopie confocale. La figure 32B montre que la coloration rouge semble plus intense lorsque *P. aeruginosa* H103 est cultivé en LBT en comparaison au LB, suggérant que la teneur en ADN extracellulaire est plus importante en présence de tobramycine. En LB, l'ADNe semble être localisé à l'intérieur du biofilm donnant ainsi une coloration jaune due à la superposition des deux sondes. En LBT, la fluorescence rouge est visible à l'extrémité des structures tridimensionnelles suggérant que l'ADNe pourrait être impliqué dans la modification de l'architecture du biofilm en réponse à la tobramycine. En revanche, chez la souche PAOSX, l'intensité de la fluorescence rouge et la localisation semblent

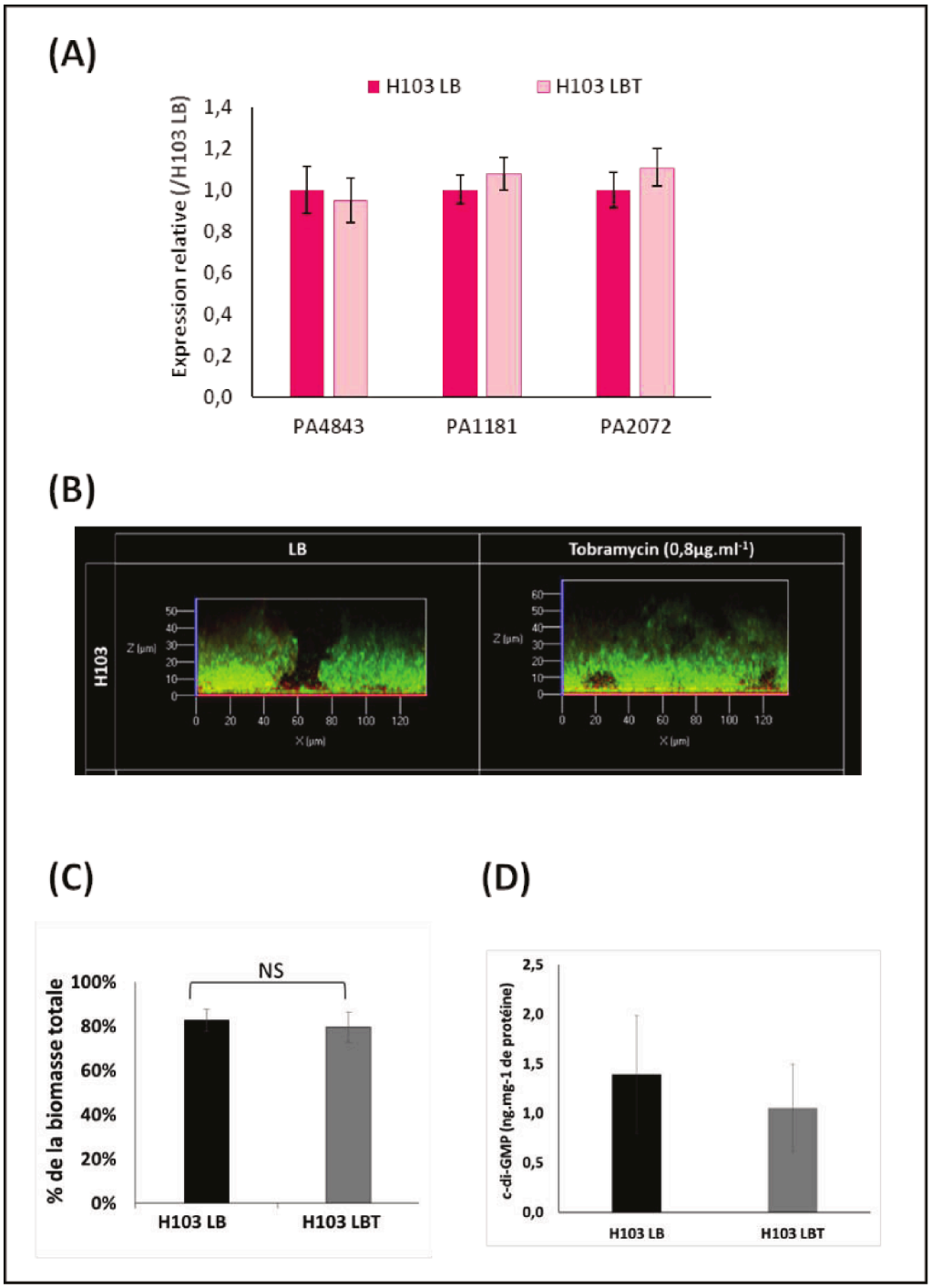


Figure 31. Effet de la tobramycine sur le taux intracellulaire de c-di-GMP chez H103 cultivée en biofilm pendant 24 heures. (A) Variation de l'expression des gènes codant pour les diguanylates cyclases PA4843, PA1181 et PA2072 chez H103 en LBT en comparaison au LB. Les analyses qRT-PCR ont été réalisées sur les 2 lots d'ARNs (B) Images de microscopie confocale à balayage laser de l'activité de la région promotrice de *cdrA* dans des biofilms âgés de 24 heures cultivés en LB et en LBT. La barre blanche représente 20 µm. (C) Analyse COMSTAT des cellules exprimant *cdrA* en fonction de la biomasse totale. (D) Quantification du c-di-GMP dans les biofilms âgés de 24 heures cultivés en LB et en LBT. Les barres d'erreur représentent les SEM.

peu varier entre la condition LB et la condition LBT. L'ADNe peut être produit par lyse cellulaire, par la mort cellulaire induite par l'action de prophages, ou par la production et la lyse de vésicules membranaires. Afin d'analyser le taux de lyse cellulaire nous avons réalisé un marquage fluorescent des biofilms de *P. aeruginosa* H103 et PAOSX grâce au kit Live-Dead. L'analyse COMSTAT des images de microscopie confocale a révélé que les biofilm formés par H103 en LB ou en LBT contiennent environ 31 et 39% de cellules mortes respectivement, ce qui correspond à une augmentation de 25% de mort cellulaire lorsque les bactéries sont exposées à la tobramycine (figure 32C). Pour la souche PAOSX, une faible augmentation de la mort cellulaire a été observée (13%) puisque 37% des bactéries sont mortes dans les biofilms cultivés en LB contre 42% en LBT.

6- Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress pariétal

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires liant SigX à l'augmentation de la formation de biofilm et à la production d'ADNe, nous avions l'intention d'analyser l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe et la production d'ADNe à partir des deux séries d'extraction d'ARNs (N°1 et N°2) précédemment citées. Différentes cibles, qui ont été impliquées dans la production d'ADNe, ou dans la réponse à des perturbations de la structure pariétale ont été testées (Table 9). Cependant comme c'était le cas pour l'expression de *sigX*, d'*algU* et de leurs cibles respectives, de nombreuses incohérences observées entre les deux analyses ne nous ont pas permis de conclure quant à l'implication de ces gènes dans nos conditions de biofilm. En effet, nous avons pu observer par exemple, que l'expression de *pmrA* est augmentée d'un facteur 2 dans l'extrait N°1 chez H103 cultivée en LBT tandis qu'elle n'est pas affectée dans l'extrait N°2. Ce gène est également surexprimé chez PAOSX en LB et en LBT dans l'extrait N°1 tandis qu'il est sous exprimé dans l'extrait N°2. Ces différences entre les deux extraits sont notamment plus marquées chez la souche PAOSX. Nous avons pu observer que dans les conditions LB et LBT l'expression des gènes cibles est généralement augmentée dans l'extrait N°1 et diminuée dans l'extrait N°2 (table 9). Puisque l'expression de ces gènes varie parfois considérablement entre ces deux extraits, l'analyse statistique sur l'ensemble des échantillons ne nous a pas permis d'obtenir des résultats significatifs ni de conclure sur une éventuelle implication de SigX dans l'expression de ces gènes.

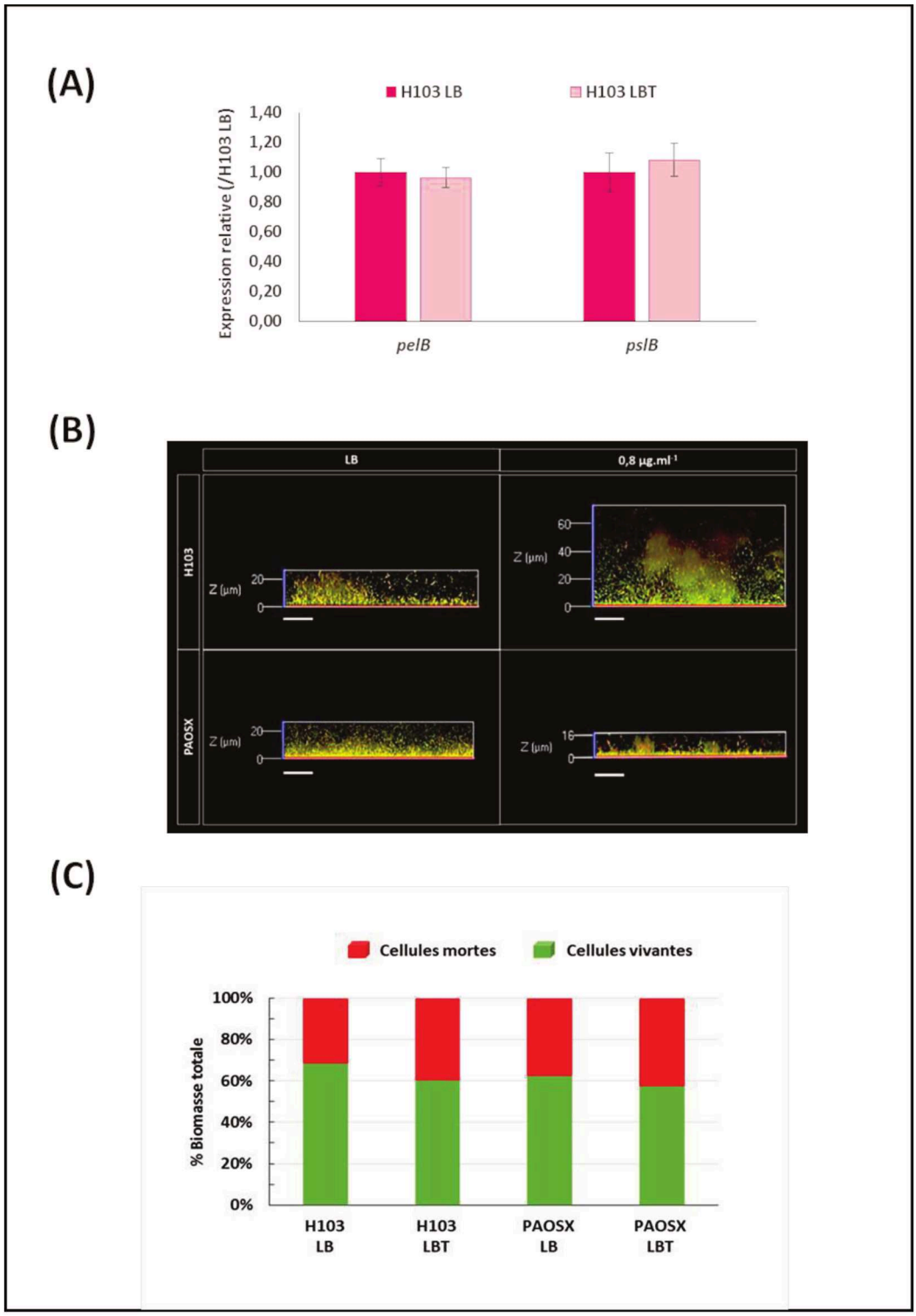


Figure 32. Effet de la tobramycine sur la composition de la matrice des biofilms de H103 et PAOSX. (A) Variation de l'expression des gènes codant pour les exopolysaccharides Pel et Psl chez H103 en LBT en comparaison au LB. Les analyses qRT-PCR ont été réalisées sur les 2 lots d'ARNs (B) Images de microscopie confocale à balayage laser de la production d'ADNe dans des biofilms de H103 et PAOSX âgés de 24 heures cultivés en LB et en LBT. La barre blanche représente 20 µm. (C) Analyse COMSTAT de la viabilité des cellules H103 et PAOSX dans les biofilms agés de 24 heures.

Afin de déterminer si les produits de ces gènes sont impliqués dans l'augmentation de la formation de biofilm en réponse à la tobramycine, des analyses supplémentaires, en augmentant le nombre d'échantillons, devront être effectuées.

		H103 LBT Biofilm			PAOSX LB biofilm			PAOSX LBT Biofilm		
Nombre PA	Gène	N°1	N°2	N°1+N°2	N°1	N°2	N°1+N°2	N°1	N°2	N°1+N°2
PA0996	*pqsA*	0,94 ± 0,14	1,06 ± 0,22	1,05 ± 0,62	1,61 ± 0,24 *	0,51 ± 0,15	0,57 ± 0,31	12,50 ± 2,33 *	0,84 ± 0,15	1,46 ± 0,62
PA1179	*phoP*	1,60 ± 0,25	1,45 ± 0,42	1,47 ± 0,73	5,59 ± 1,27 *	0,85 ± 0,25	1,52 ± 0,55	86,67 ± 14,73 *	1,70 ± 0,70	13,64 ± 6,71
PA1687	*speE*	1,40 ± 0,06	0,94 ± 0,04	0,99 ± 0,46	1,32 ± 0,20	0,44 ± 0,02 *	0,54 ± 0,22	4,12 ± 0,71 *	0,59 ± 0,03 *	0,98 ± 0,32
PA2818	*arr*	2,13 ± 0,14 *	1,00 ± 0,07	1,30 ± 0,29	1,69 ± 0,16 *	0,66 ± 0,12	0,93 ± 0,20	1,29 ± 0,12	0,55 ± 0,06 *	0,75 ± 0,17
PA3552	*arnB*	0,90 ± 0,26	0,71 ± 0,25	0,71 ± 0,47	10,00 ± 2,49	0,99 ± 0,37	1,32 ± 0,72	359,35 ± 20,64 *	0,56 ± 0,28	13,36 ± 8,47
PA4776	*pmrA*	1,94 ± 0,23 *	1,05 ± 0,20	1,12 ± 0,60	3,10 ± 0,63 *	0,47 ± 0,08 *	0,66 ± 0,29	53,23 ± 8,66 *	0,77 ± 0,09	4,41 ± 2,20

Table 9. Variation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe et la production d'ADNe chez H103 et PAOSX cultivée en biofilm en LB ou LBT. L'analyse qRT-PCR a été réalisée à partir des deux lots d'ARNs. Les résultats ont été normalisés sur la souche H103 cultivée en LB. *p. value < 0,05

L'enveloppe cellulaire est une structure dynamique qui au-delà de sa fonction principale de barrière rigide, est également le lieu de réactions enzymatiques, d'échanges nutritifs et d'informations avec le milieu extérieur. Ces fonctions cruciales pour la survie de la cellule nécessitent un contrôle fin des fonctions membranaires, et plus particulièrement le maintien de son intégrité et de son homéostasie en réponse à des stress environnementaux. Chez *P. aeruginosa*, la réponse au stress pariétal est principalement dirigée par le facteur sigma ECF AlgU. Cependant plusieurs études ont suggéré l'implication d'un second facteur sigma dans la réponse au stress de l'enveloppe, SigX (Blanka *et al.*, 2014; Boechat *et al.*, 2013; Bouffartigues *et al.*, 2012; Crabbé *et al.*, 2010; Wood et Ohman, 2009).

Lorsque ces travaux de thèse ont débuté, SigX n'était que peu connu. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de la thèse de Gwendolyne Gicquel et font suite aux études initiées au LMSM portant sur le régulon de SigX et son implication dans l'expression du gène *oprF* codant la porine majoritaire de *P. aeruginosa*. Bien que cette étude ait montré que la mutation de *sigX* entraine la dérégulation de 307 gènes, aucune cible directe n'avait pu être identifiée.

Dans ce contexte, l'objectif majeur de ces travaux de thèse était de préciser les fonctions cellulaires de SigX.

Implication de SigX dans l'homéostasie pariétale

Le facteur sigma ECF SigX possède 49% de similarité de séquence avec le facteur sigma ECF SigW de *Bacillus subtilis*. Chez *B. subtilis*, SigW est impliqué dans le contrôle de la fluidité membranaire et est activé en réponse à un choc alcalin, un stress osmotique et en présence d'antibiotiques affectant la paroi cellulaire (Höper *et al.*, 2006; Kingston *et al.,* 2011; Wiegert *et al.,* 2001). Au début de ces travaux, SigX n'était connu que pour son implication dans la transcription d'*oprF* codant la porine majoritaire de *P. aeruginosa,* et pour être exprimé en réponse à une exposition de la bactérie à la D-cyclosérine ainsi qu'à de fortes concentrations de sucroses (Bouffartigues *et al.*, 2012; Brinkman *et al.*, 1999; Wood et Ohman, 2009). Ces données nous ont conduits à l'hypothèse que SigX pourrait, comme AlgU, appartenir à la classe des facteurs sigma ECF de type RpoE, ces ECF répondant à des altérations de la structure pariétale.

Nous avons dans un premier temps étudié l'impact de la mutation du gène *sigX* sur la composition protéique de la membrane externe. L'analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse MALDI-TOF a montré que la mutation de *sigX* entraine une sous production de 8 porines majoritaires, dont 4 sont impliquées dans l'acquisition du fer (FpvA, PvdS, PhuR, ChtA), la porine majoritaire OprF, et 3 porines spécifiques (OprD, OprE et OprQ), suggérant l'implication de SigX dans le contrôle de la composition et de l'homéostasie membranaires ainsi que dans la perméabilité.

De manière intéressante nous avons également pu observer que la différence de croissance entre la souche H103 et la souche PAOSX en milieu LB est abolie en milieu minimum M9 contenant du glucose comme seule source de carbone suggérant un défaut de perméabilité vis-à-vis de certains composés chez le mutant *sigX*. Le LB est un milieu riche non défini dans lequel les peptides de petite taille et les acides aminés constituent la source majoritaire de carbone. Nous avons émis l'hypothèse que l'altération de la croissance du mutant *sigX* observée en LB pourrait être liée à une altération des voies métaboliques.

Nous avons donc entreprit d'étudier au niveau transcriptomique et protéomique l'effet de la mutation de *sigX* chez *P. aeruginosa* cultivée en LB. L'analyse transcriptomique a révélé que la mutation de *sigX* entraine la dérégulation de 762 gènes dont 339 sont sous exprimés et 423 sont surexprimés indiquant qu'en LB, SigX affecte principalement de façon indirecte l'expression d'environ 15% du génome de P. *aeruginosa*. Parmi ces gènes on retrouve majoritairement des gènes codant des transporteurs de petites molécules (11,2%), des protéines membranaires (9,6%), et des gènes impliqués dans le métabolisme central (9,6%) et la biosynthèse des acides gras (6,3%). En accord avec les données de la littérature, cette analyse a permis de mettre en évidence l'implication de SigX dans la modulation de la composition protéique et la perméabilité des membranes ainsi que dans la fluidité membranaire. En effet, l'analyse transcriptomique d'un mutant *sigX* de *P. aeruginosa* PAO1 cultivée en milieu minimum M9, a révélé que la mutation de *sigX* affecte principalement l'expression de gènes codant pour des facteurs secrétés, des systèmes de secrétions ou d'export, des protéines membranaires ainsi que des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (Gicquel *et al.,* 2013). Chez *P. aeruginosa* PA14 cultivée en milieu riche de faible osmolarité, il a été montré que SigX intervient majoritairement

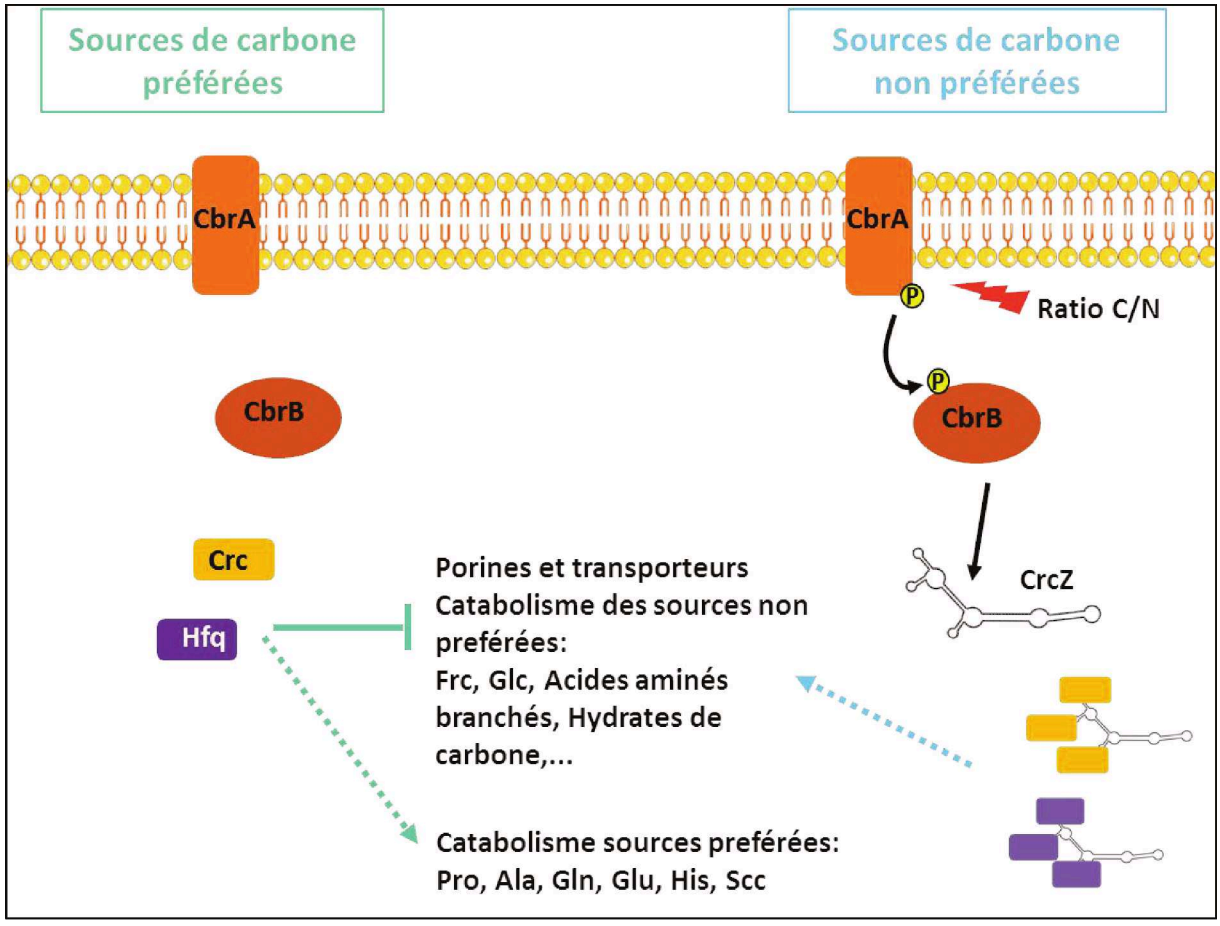


Figure 33. Représentation schématique du contrôle de l'utilisation des sources de carbone et d'azote par le système à deux composants CbrAB chez *P. aeruginosa*. En présence de sources de carbone préférentiellement utilisées par la bactérie, les protéines Crc et Hfq, libres dans la cellule, inhibent au niveau post transcriptionnel les gènes impliqués dans le transport et le catabolisme de sources non préférées. En présence de sources non préférées, le système CbrAB est activé par un déséquilibre de la balance carbone/azote et permet la production d'un ARNsnc CrcZ. La séquestration de Crc et Hfq par CrcZ entraine la levée de l'inhibition sur les gènes impliqués dans le transport et le catabolisme des sources de carbone non préférées.

dans la régulation de gènes impliqués dans la production de facteurs secrétés, d'enzymes de la biosynthèse des acides gras, et dans l'adaptation et la protection de la bactérie (Blanka *et al.,* 2014). Enfin, la surexpression de *sigX* chez *P. aeruginosa* PA14 cultivée en LB entraine la surproduction de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acides gras à courte chaines, conduisant à une modification de la fluidité des membranes (Boechat *et al*., 2013). De manière intéressante, l'ensemble de ces études réalisées dans des conditions de culture différentes et chez deux espèces de *P. aeruginosa*, mettent en évidence l'implication de SigX dans la régulation de la fluidité membranaire renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle SigX serait un second facteur sigma ECF de type RpoE, activés en réponse à un stress de l'enveloppe et régulant l'expression de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité pariétale.

Nous avons pu observer que l'expression de nombreux gènes appartenant aux régulons des protéines régulatrices Crc et Hfq, impliquées dans le métabolisme du carbone et de l'azote, est affectée chez le mutant *sigX*. Crc et Hfq sont des régulateurs post-transcriptionnels impliqués dans la répression catabolique, un mécanisme permettant aux bactéries d'adapter leur métabolisme en fonction des sources de carbone et d'énergie disponibles dans l'environnement. Ces régulateurs agissent en se fixant aux ARNs messagers inhibant ou favorisant la production d'enzymes impliquées dans le métabolisme central.

Nous avons également observé que la mutation de *sigX* entraine une augmentation de l'activité d'un système à deux composants, le système CbrAB. Ce système constitué d'un senseur histidine kinase (CbrA) et d'un régulateur de réponse (CbrB), contrôle l'utilisation de différentes sources de carbone et d'azote tel que les acides aminés ou les polyamines (Nishijyo *et al*., 2001). CbrAB lorsqu'il est activé, régule positivement l'expression d'un ARNnc, CrcZ capable de lier les protéines régulatrices Crc et Hfq inhibant ainsi leur activité (Figure 33). Bien que les signaux conduisant à l'activité du système CbrAB n'aient pas été identifiés, il a été suggéré que CbrAB serait activé par des signaux internes à la cellule et notamment par un déséquilibre du ratio carbone/azote. De manière intéressante, il a été montré chez *P. putida* que ce système est nécessaire pour la croissance à basse température et que l'expression de *crcZ* est augmentée lorsque la bactérie est exposée à un choc froid, une condition entrainant une diminution de la fluidité membranaire (Fonseca *et al.,*

2013; Reva *et al.*, 2006). Chez PAOSX, l'expression de *crcZ* est augmentée d'un facteur 2 et la supplémentation du milieu LB avec le polysorbate 80 a conduit chez la souche PAOSX, à la restauration de la croissance et de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme central, tel que *crc*, *crcZ* ou *hutG*. Le polysorbate 80 étant un détergent, il pourrait agir sur l'enveloppe cellulaire en fluidifiant les membranes. Ces résultats suggèrent que les différences métaboliques observées entre les souches PAOSX et H103 seraient principalement liées à un défaut d'import (transport de nutriments à l'intérieur de la cellule) nécessitant alors d'adapter les voies métaboliques via le système CbrAB. Les membranes biologiques sont des structures dynamiques dans lesquelles les lipides et les protéines interagissent. Il est admis que la composition lipidique des membranes, notamment la longueur des chaines acylées affecte à la fois l'intégration et la conformation des protéines membranaires mais également l'activité de certains transporteurs. Les membranes sont des bicouches lipidiques constituées d'une zone hydrophobe formée par les chaines acylées des lipides et délimitée par les têtes polaires des phospholipides. L'un des paramètres important pour l'intégration des protéines dans les membranes, est l'épaisseur de cette zone hydrophobe, déterminée par la longueur des chaines acylées. En effet, afin que la protéine se replie et s'intègre correctement dans la membrane, l'épaisseur de la zone hydrophobe de la bicouche lipidique environnant la protéine doit être en adéquation avec l'épaisseur de la région hydrophobe des protéines (Lee, 2004, 2003). D'autre part, il a également été suggéré que l'épaisseur de la bicouche lipidique affecte fortement l'activité de nombreuses protéines membranaires. Chez *E. coli*, il a été montré que l'activité de la protéine membranaire diacylglycérol kinase qui catalyse la conversion ATP-dépendante du diacylglycérol en acide phosphatidique est dépendante de la longueur des chaines d'acides gras avec une activité importante en présence de chaine oléique (C :18Δ9), et une activité abolie ou diminuée en présence de chaine plus courtes ou plus longues (Pilot *et al.*, 2001). Chez *P. aeruginosa*, l'activité du système de transport sodium-dépendant LIV-II, impliqué dans le transport d'acides aminés ramifiés tel que la leucine, l'isoleucine et la valine a été étudiée en fonction de la composition en acide gras des membranes. Cette étude a révélé que l'activité de ce transporteur est principalement modulée par la longueur des chaines d'acides gras des molécules de phosphatidylcholine (PC) car l'activité est plus importante lorsque la PC possède 16 et 18 carbones et plus faible lorsqu'elle contient 14 ou 22 carbones (Uratani *et al.*, 1987).

Implication de SigX dans la réponse à un stress pariétal

Afin de préciser les fonctions cellulaires de SigX nous avons recherché les conditions environnementales conduisant à son activité. Des études menées au laboratoire ont montré que de fortes concentrations de sucrose entrainent une surexpression des gènes *oprF* et *sigX* suggérant que dans cette condition l'activité de SigX est augmentée (Bouffartigues *et al.*, 2012). Nous avons donc étudié l'effet d'une forte concentration de sucrose sur la physiologie de *P. aeruginosa* H103 et de son mutant isogénique PAOSX. Nous avons observé que l'addition de sucrose dans le milieu LB entraine une augmentation de la production de pellicule à l'interface air-liquide chez la souche sauvage H103, un phénotype aboli chez le mutant *sigX* et restauré chez la souche complémentée, suggérant que SigX est impliqué dans la formation de biofilm en réponse à de fortes concentrations de sucrose. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénotype, nous avons étudié l'effet du sucrose sur l'expression des gènes *pel* et *psl* codant les polysaccharides majoritaires de la matrice des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1. Nous avons observé que l'augmentation de la formation de biofilm chez H103 en réponse à une forte concentration de sucrose est en partie liée à la surexpression de *pel* tandis que *psl* n'est pas affecté. Chez PAOSX l'expression de *pel* est partiellement diminuée suggérant que SigX intervient de façon indirecte dans l'expression de ce gène. Le c-di-GMP étant impliqué dans la transition entre un mode de vie planctonique et sessile et dans la régulation positive des gènes *pel* et *psl*, nous avons supposé que ce métabolite secondaire pourrait intervenir dans l'augmentation de la production de pellicule en présence de sucrose. Nous avons observé que le taux intracellulaire de c-di-GMP est augmenté lorsque la souche H103 est cultivée en présence de sucrose. En revanche, chez PAOSX, ce taux reste similaire en LB et en présence de sucrose confirmant l'implication de SigX dans l'augmentation de la production de pellicule. Le c-di-GMP est synthétisé par des enzymes ayant une activité diguanylate cyclase et dégradé par des phosphodiestérases. En accord avec la littérature nous avons montré que SigX est impliqué dans l'expression du gène PA4843 codant une diguanylate cyclase (Blanka *et al.*, 2014; Gicquel *et al.,* 2013). L'expression de PA4843 est augmentée respectivement d'un facteur 3,5 et d'un facteur 1,5 chez H103 et PAOSX cultivée en présence de sucrose, suggérant que SigX n'intervient que partiellement dans l'expression de ce gène et la production de c-di-GMP. Chez *P. aeruginosa* PA14

il a été montré que la mutation de *sigX* entraine une augmentation du taux de c-di-GMP et de la formation de biofilm, en comparaison avec la souche sauvage, en présence de 120 mM de NaCl ou 240 mM de sucrose dans le milieu de culture. En revanche à faible (8mM NaCl) ou forte (500mM NaCl) osmolarité, le taux de c-di-GMP est similaire entre la souche sauvage PA14 et le mutant *sigX* (Blanka *et al.*, 2014). Dans nos conditions le taux de c-di-GMP de *P. aeruginos*a H103 n'est pas affecté par la mutation de *sigX* en présence de 171mM de NaCl ou de 342 mM de sucrose, une condition dans laquelle la production de c-di-GMP est augmentée chez la souche sauvage H103. La régulation de la production de c-di-GMP est un mécanisme complexe largement dépendant des conditions environnementales telles que la température et la disponibilité de l'oxygène (Schmidt *et al.,* 2016; Townsley et Yildiz, 2015). L'oxygénation étant différente entre nos conditions de culture (ratio 1/10) et celles de Blanka *et al.* (ratio 1/5), il est possible que les différences observées soient liées à la disponibilité de l'oxygène. Bien que l'ensemble de ces résultats confirment le rôle de SigX dans le métabolisme du c-di-GMP, les différences observées entre notre étude et celle menée par Blanka *et al.* suggèrent que la régulation du taux de c-di-GMP par SigX est fortement dépendante des conditions environnementales. D'autre part, une comparaison des génomes de PA14 et PAO1 a révélé que des gènes codant des protéines homologues chez ces souches, peuvent cependant avoir des importances différentes, certains gènes étant essentiels au fitness d'une souche et pas de l'autre (Turner *et al*., 2015).

Le sucrose n'étant pas un composé métabolisé par *P. aeruginosa*, il est peu probable que ce composé soit utilisé comme source de carbohydrates pour la production de la matrice. Nous avons montré que la croissance de *P. aeruginosa* en présence de fortes concentrations de sucrose ainsi que l'absence d'OprF entrainent une altération de l'enveloppe pariétale (Bouffartigues *et al*., 2012). Nous avons donc supposé que l'augmentation de la formation de biofilm observée en présence de fortes concentrations de sucrose pourrait être due à un stress de l'enveloppe conduisant à l'activité des facteurs sigma AlgU et SigX.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de la mutation d'*oprF* sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa*. Nous avons observé que, comme pour le sucrose, l'absence d'OprF conduit à l'augmentation de la formation de biofilm liée à l'augmentation du taux de c-di-GMP et à la surexpression de *pel*. De manière

intéressante, en accord avec nos résultats précédents, l'expression de *psl* n'est pas affectée. Bien que l'expression de *pel* et *psl* soit positivement régulée par le c-di-GMP, nos résultats suggèrent que dans ces deux conditions, de fortes concentrations de sucrose et l'absence d'OprF, l'augmentation du c-di-GMP affecte uniquement la production de Pel. Dans la littérature il est décrit que la mutation du gène *wspR* codant la diguanylate cyclase WspR affecte spécifiquement la synthèse de Pel mais pas celle de Psl (Huangyutitham *et al.*, 2013). Dans cette étude il est suggéré que la faible diminution du taux de c-di-GMP due à la mutation de *wspR* pourrait ne pas affecter les phénotypes dominants, comme c'est le cas pour la production de Psl, principalement responsable de l'adhésion et de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1. Il est également suggéré que les différences observées sur l'expression des gènes *pel* et *psl* pourraient être dues à une différence de l'affinité des récepteurs pour le c-di-GMP. En effet, il a été montré que certains récepteurs possèdent pour le c-di-GMP, une affinité de l'ordre du nanomolaire tandis que d'autres ont une affinité de l'ordre du micromolaire (Christen *et al.*, 2010; Pultz *et al.*, 2012). C'est le cas des protéines PelD et FleQ, impliquées dans la régulation de l'expression de *pel*, dont l'affinité pour le c-di-GMP est de 1,9 µM et entre 15 et 25 µM respectivement (Hickman et Harwood, 2008; Whitney *et al.*, 2012). Nous pouvons alors supposer, que l'augmentation du taux intracellulaire de c-di-GMP observée chez le mutant *oprF* ou en présence de fortes concentrations de sucrose conduit à l'activation des protéines PelD et FleQ sans affecter l'activité des récepteurs de haute affinité, qui à ces concentrations seraient déjà saturés. Cependant nous avons pu observer que le c-di-GMP n'est, dans nos conditions, qu'en partie responsable de l'augmentation de la production de Pel puisque la dégradation du c-di-GMP ne restaure que partiellement l'expression de *pelB*. Le système Gac/Rsm est un système de régulation complexe, faisant intervenir des senseurs histidine kinase et des composants accessoires, impliqué dans la transition entre les modes de vie planctonique et sessile. Lorsqu'il est activé ce système stimule la production de Pel et Psl via la répression de l'activité de RsmA par les sncARNs RsmZ et RsmY. Nous avons observé que la mutation d'*oprF* entraine une augmentation de l'expression de *rsmZ* tandis que l'expression de *rsmY* n'est pas altérée. De manière intéressante la réduction du taux de c-di-GMP conduit à restaurer l'expression de *rsmZ* à un niveau similaire à celui observé chez la souche sauvage. Il est décrit dans la littérature que la transition entre une infection aigue et une infection chronique, contrôlée entre autre par le système Gac/Rsm, est dépendante de l'activité

de la diguanylate cyclase WspR. En retour, la régulation de cette transition par le c-di-GMP *via* l'activité de WspR nécessite la présence des sncARNs RsmY et RsmZ (Moscoso *et al.*, 2011). Le contrôle indépendant de la production de RsmY et RsmZ a été observé dans de nombreuses études : ainsi il a été montré que le régulateur PhoP, du système à deux composants PhoPQ est impliqué dans l'expression de *rsmZ* (Mulcahy et Lewenza, 2011). Le système à deux composants BfiSR contrôle négativement la production de RsmZ tandis que la protéine HptB régule négativement RsmY (Bordi *et al.,* 2010; Petrova et Sauer, 2010; Valentini *et al.,* 2016). Il a également été montré que la mutation du gène *lptA* codant une enzyme impliqué dans la biosynthèse des phospholipides entraine une altération de la fluidité membranaire et conduit à une augmentation de l'expression de *rsmZ* uniquement (Baysse *et al.*, 2005; Baysse et O'Gara, 2007).

En accord avec les résultats obtenus au laboratoire, nous avons montré que l'absence d'OprF entraine une altération de la structure pariétale et conduit à l'augmentation de l'expression et de l'activité des facteurs sigma ECF AlgU et SigX. Puisque SigX semble être impliqué dans le métabolisme du c-di-GMP, nous avons évalué l'expression des gènes PA4843, PA1181 et PA2072 codant des protéines possédant les domaines fonctionnels des diguanylates cyclases et ayant été identifiées comme appartenant au régulon de SigX chez *P. aeruginosa* PA14 (Blanka *et al.*, 2014; Gicquel *et al.*, 2013). En accord avec la littérature, nous avons observé que ces gènes sont sous exprimés chez la souche PAOSX incapable de produire SigX. En absence d'OprF, l'expression des gènes PA1181 et PA4843 est augmentée d'un facteur 2,9 et 2,1 respectivement suggérant que ces protéines pourraient être impliquées dans l'augmentation du taux de c-di-GMP chez le mutant *oprF*.

Ensembles, ces résultats renforcent l'hypothèse que des altérations de l'enveloppe cellulaire pourraient être un signal conduisant à la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* via une modulation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme du c-di-GMP. Une étude récente a montré qu'une mutation du gène *accB* codant une enzyme de la biosynthèse des acides gras entraine une modification de la fluidité membranaire et une augmentation du taux de c-di-GMP via l'activation constitutive de WspR (Blanka *et al.,* 2015). Puisque le gène *accB* a été identifié comme étant sous le contrôle de SigX (Boechat *et al.*, 2013), il serait intéressant d'étudier l'expression et l'activité de WspR dans des conditions activant cet ECF. En accord

avec l'hypothèse d'un lien entre une perturbation de la membrane et la transition vers un mode de vie en biofilm, Townsley *et al.* ont montré qu'une diminution de la température de croissance chez *Vibrio cholerae*, entrainait une modification de la fluidité membranaire et une augmentation de la production de c-di-GMP. De manière intéressante ces auteurs ont également montré que la température altère la production de c-di-GMP de façon similaire chez *P. aeruginosa* (Townsley et Yildiz, 2015).

Il est décrit dans la littérature qu'une exposition de *P. aeruginosa* à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques (aminoglycosides, quinolones, tétracycline) entraine une augmentation de la formation de biofilm (Gotoh *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2006). Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénotype ne sont pas connus. L'enveloppe cellulaire étant la première structure en contact avec l'antibiotique nous avons émis l'hypothèse que l'interaction de l'antibiotique avec la membrane externe pourrait entrainer un stress de l'enveloppe et conduire à l'activité de SigX.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de concentrations subinhibitrices de tobramycine sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* H103 et PAOSX. Nous avons observé qu'après 24 heures, la formation de biofilm augmente en termes de biomasse et d'épaisseur chez la souche H103 en présence de concentrations subinhibitrices de tobramycine. En revanche l'effet de la tobramycine est abolit chez le mutant *sigX* et restauré chez la souche complémentée suggérant l'implication de SigX dans ce phénotype. L'observation en microscopie confocale de l'expression de *sigX* au sein des biofilms, grâce à la fusion transcriptionnelle entre la région promotrice de *sigX* et un le gène codant une GFP, a revélé que *sigX* est plus exprimé lorsque les bactéries sont cultivées en présence de tobramycine. De manière intéressante, l'activité de la région promotrice de *sigX* est principalement détectée dans les structures tridimensionnelles plutôt qu'à la base du biofilm. Ce résultat est conforté par une autre étude, réalisée par Stewart *et al.*, qui ont montré que chez *P. aeruginosa* PAO1 cultivée en biofilm pendant 72 heures puis exposées à 10 µg.ml-1 de tobramycine pendant 12 heures, l'expression de *cfrX*, une cible directe de SigX est augmentée d'un facteur 4 (Stewart *et al.*, 2015)..

De manière intéressante, nous avons observé que l'augmentation de la formation de biofilm en réponse à la tobramycine ne semble pas liée à une

augmentation du taux de c-di-GMP chez H103. En effet, le dosage indirect via le système rapporteur cdrA-gfp et la quantification du c-di-GMP par chromatographie liquide ont révélé que le taux de c-di-GMP est similaire entre les conditions LB et LBT chez la souche sauvage H103. Bien que la formation de biofilm soit généralement associée à un taux élevé de c-di-GMP, il est décrit dans la littérature qu'en concentrations sub-létales, la tobramycine augmente la formation de biofilm de *P. aeruginosa* via l'activité de la phosphodiestérase Arr (Aminoglycosides response regulator), suggérant que dans cette condition la formation de biofilm est liée à une diminution du taux de c-di-GMP (Hoffman *et al.*, 2005). Jones *et al.* ont également montré qu'en présence de concentrations subinhibitrices de kanamycine une condition dans laquelle la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAK est augmentée, le taux de c-di-GMP n'est pas affecté (Jones *et al.*, 2013). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'induction du biofilm par la tobramycine n'est pas dépendante d'une élévation du taux de c-di-GMP.

L'observation des biofilms en microscopie confocale a révélé que le taux d'ADN extracellulaire augmente lorsque H103 est cultivée en présence de tobramycine. Au contraire chez le mutant *sigX*, le taux d'ADNe ne semble pas varier entre la condition LB et LBT. L'ADN extracellulaire est un composant majeur de la matrice des biofilms et peut être produit par la lyse d'une partie de la population, l'action de prophage ou la libération de vésicules membranaires. Nous avons observé qu'en LB, 31 et 37% des cellules de H103 et PAOSX, respectivement sont mortes, ce qui suggère que PAOSX pourrait être plus fragile que la souche sauvage. De manière intéressante, la tobramycine entraine une augmentation de la lyse cellulaire chez H103, un effet qui est moins important dans le mutant *sigX*. En effet, la mort cellulaire augmente d'environ 25% lorsque la souche H103 est cultivée en présence de tobramycine et d'environ 13% chez le mutant *sigX* suggérant que l'absence de SigX diminue l'effet de la tobramycine sur la lyse des cellules. Ces données suggèrent que l'effet de la tobramycine sur l'augmentation du biofilm pourrait être lié, en partie tout du moins, à la lyse des cellules, entrainant la libération d'ADNe. Chez *Staphylococcus aureus*, la présence de faibles concentrations de β-lactames entraine une augmentation de la formation de biofilm due à une augmentation de la production d'ADNe. Chez cette souche, l'ADNe est produit par la lyse des cellules via l'activité d'une autolysine, AltA dont l'expression est sous le contrôle positif du facteur sigma alternatif

SigB (Kaplan *et al.*, 2012). Chez *S. aureus* Sigma B est activé en réponse à un choc thermique, un choc alcalin ou l'addition de NaCl et régule des gènes impliqués dans l'homéostasie de la paroi, le transport membranaire ou le métabolisme intermédiaire (Pané-Farré *et al.*, 2006).

Afin d'analyser l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe et la production d'ADNe, deux expériences de qRT-PCR ont été réalisées sur deux lots d'ARNs indépendants. Cependant, ces études ont généré des résultats très différents sur les gènes analysés et ne nous ont pas permis de conclure quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénotype. En revanche une tendance à été observée sur ces deux analyses, celle de l'augmentation de l'expression de *sigX*. Des extractions complémentaires d'ARNs à partir de biofilms devront être multipliées afin de dégager une tendance générale de l'expression des gènes cibles, dans le but d'identifier un ou plusieurs mécanismes moléculaires.

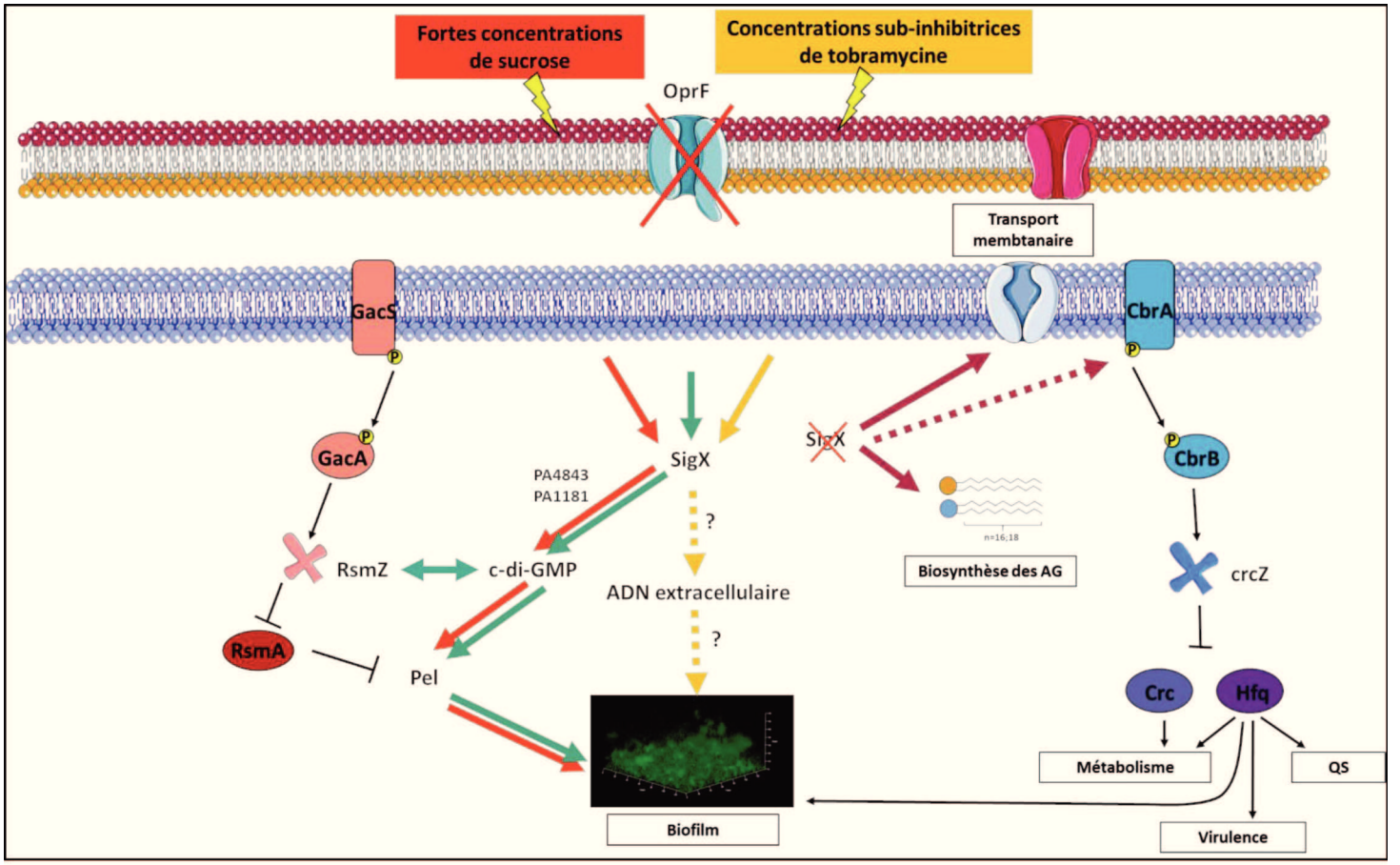
Ensembles, ces résultats suggèrent que la formation de biofilm en réponse à une exposition à de faibles concentrations de tobramycine requiert l'activité du facteur sigma ECF SigX. Cependant les mécanismes moléculaires restent à découvrir et des analyses complémentaires devront être effectuées afin de déterminer si l'absence d'induction du biofilm chez le mutant *sigX* est un effet direct lié à l'activité de SigX ou un effet indirect lié à la modification de la fluidité membranaire. En effet on peut également supposer que la rigidification de la membrane en absence de SigX réduit l'entrée de l'antibiotique dans la cellule empêchant ainsi l'action de la tobramycine sur la formation de biofilm. D'autre part, il est admis que l'ADNe peut être produit par la libération puis la lyse de vésicules membranaires. Chez *P. aeruginosa* la libération de vésicules est majoritairement liée à la production de PQS et peut être augmentée lorsque la bactérie est exposée à la D-cyclosérine, la polymyxine B ou en présence de péroxyde d'hydrogène, des conditions altérant la paroi cellulaire et conduisant à l'activité d'AlgU (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Macdonald and Kuehn, 2013). Cependant il a été montré qu'en réponse à un stress, ni l'activité d'AlgU, ni la production de PQS ne peut expliquer l'augmentation de la libération de vésicules. L'expression de *sigX* étant également augmentée en réponse à une exposition à la D-cyclosérine (Wood and Ohman, 2012), il serait intéressant d'analyser la production de vésicules chez la souche sauvage H103 et son mutant isogénique *sigX* en réponse à la tobramycine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Pathogène opportuniste de l'Homme, *P. aeruginosa* est responsable de nombreuses infections des voies pulmonaires et urinaires chez des patients immunodéprimés. Largement étudié pour son implication dans la sévérité des symptômes liés à la mucoviscidose, le « bacille pyocyanique » constitue un enjeu majeur en termes de sécurité sanitaire puisqu'il représente après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* la 3ème cause d'infections nosocomiales en France. La persistance de *P. aeruginosa* notamment dans le cadre médical, est largement due à sa grande capacité à s'adapter et à se développer en communauté organisée au sein de biofilm. Le génome de *P. aeruginosa* contient de nombreux gènes codant des systèmes de régulation dont la majorité est impliquée dans des mécanismes de perception-transduction de signaux, conférant à la bactérie son fort pouvoir d'adaptation. Parmi ces systèmes on trouve les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF). Chez les germes à gram négatif, les ECF sont majoritairement classés en deux catégories : les ECF de type FecI qui sont associés à des systèmes de signalisation de surface et répondent principalement à une carence en fer et les ECF de type RpoE qui répondent à un stress de l'enveloppe. *Pseudomonas aeruginosa* possède 19 ECF dont 13 sont de type FecI et AlgU est de type RpoE. SigX est l'un de ces ECFs, mais n'avait que peu été étudié lorsque j'ai débuté ma thèse.

Les ECF de type RpoE sont des homologues du facteur sigma RpoE d'*E. coli* impliqués dans la réponse au stress de l'enveloppe. Ces facteurs sigma régulent l'expression de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité pariétale ainsi que l'expression de leur propre gène. Ils sont généralement libérés après dégradation de leur facteur antisigma par des protéases en réponse à la présence de protéines mal repliées ou tronquées dans l'enveloppe cellulaire.

Lors de ces travaux de thèse nous avons montré que SigX est impliqué dans le contrôle de la composition et de la fluidité membranaire ainsi que dans la perméabilité et qu'il est activé en réponse à des conditions altérant la structure pariétale (Figure 34). Ces résultats en accord avec la littérature suggèrent que SigX, comme AlgU appartient aux facteurs sigma ECF de type RpoE. Cependant, les mécanismes moléculaires conduisant à l'activité de SigX restent à découvrir puisqu'aucun facteur anti-sigma n'a été identifié à ce jour. Le gène *cfrX*, cible directe de SigX, code une protéine hypothétique et est organisé en opéron avec le gène *cmpX,* codant une


Fortes concentrations de sucrose
Concentrations sub-inhibitrices de tobramycine
OprF
Transport membtanaire
GacS
CbrA
GacA
SigX
SigX
CbrB
PA4843
PA1181
?
RsmZ
c-di-GMP
ADN extracellulaire
Biosynthèse des AG
crcZ
RsmA
Pel
?
Crc
Hfq
Métabolisme
QS
Biofilm
Virulence

protéine de membrane interne possédant un domaine fonctionnel caractéristique des canaux mécanosensibles. L'opéron *cfrX-cmpX* est localisé en amont de sigX, une organisation génomique fortement conservée chez les souches de Pseudomonas. Les gènes codant les ECF type RpoE et leur facteur anti-sigma respectif étant généralement organisés en opéron, il serait intéressant d'étudier la fonction de CfrX et CmpX afin de déterminer si les produits de ces gènes pourraient être impliqués dans le contrôle de l'activité de SigX.

Lors de cette étude, nous avons également pu mettre en évidence un lien entre une perturbation membranaire et la formation de biofilm impliquant au moins partiellement SigX et suggérant que ce facteur sigma pourrait jouer un rôle dans la transition entre les modes de vie planctonique et sessile (Figure 34). Cependant, les mécanismes moléculaires impliquant SigX restent à éclaircir. La réponse au stress de l'enveloppe comme la régulation de la formation de biofilm est un mécanisme complexe faisant intervenir de nombreux systèmes de perception-transduction de signaux parfois interconnectés. De plus il a été montré que chez *P. aeruginosa* PA14, le régulon de SigX contient au moins 15 gènes co-régulés par AlgU (Schulz *et al.,* 2015). AlgU étant également impliqué dans la réponse au stress de l'enveloppe et la formation de biofilm il apparait nécessaire d'étudier indépendamment l'implication de ces deux ECF sur la physiologie de *P. aeruginosa*.

Valorisation scientifique :

Communications orales :

O1. 17ième Journée de l'EdNBISE, Le Havre, 10 avril 2014
Is SigX a new cell wall stress responsive ECF sigma factor in Pseudomonas aeruginosa?
R. Duchesne, E. Bouffartigues , O. Maillot, M. G. J. Feuilloley, N. Orange, S. Chevalier.

O2. 4th Molecular Microbiology Meeting / Vienne, Autriche, le 18 septembre 2015
The absence of the Pseudomonas aeruginosa OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level.
R. Duchesne, E. Bouffartigues , J. A. Moscoso, T. Rosay, O. Maillot, G. Brenner-Weiss, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilloley, J. Overhage, A. Filloux and S. Chevalier.

O3. Journée du Grand Réseau de Recherche « Sécurité Sanitaire », Evreux, le 1er décembre 2015.
Rôle du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX chez le pathogène opportuniste de l'Homme *Pseudomonas aeruginosa*.
R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M. G. J. Feuilloley, N. Orange, Sylvie Chevalier.

O4. 17ème Colloque des Jeunes Chercheurs travaillant sur la mucoviscidose, Institut Pasteur, Paris, le 9 février 2016.
Rôle du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX chez le pathogène opportuniste de l'Homme *Pseudomonas aeruginosa*.
R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M. G. J. Feuilloley, N. Orange, Sylvie Chevalier.

Communications affichées :

P1. Participation au 10ème Congrès national de la SFM, Institut Pasteur, Paris, France, du 31 mars au 1er avril 2014 et au Young Microbiologists Symposium, Dundee, Scotland, les 2 et 3 juin 2014
Is SigX a new cell wall stress responsive ECF sigma factor ?
R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier.

P2. Participation au 16ème Colloque national Vaincre la Mucoviscidose, Institut Pasteur, Paris, France, le 17 février 2015
Contribution du facteur sigma de réponse au stress de l'enveloppe SigX à la formation du biofilm suite à un traitement par la tobramycine en concentration sublétales.
R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier.

P3. Participation au Gordon Research Conference Microbial stress response, Mount hollyoke College, South hadley, MA , United States, du 17 au 22 juillet 2016
The ECF sigma factor SigX, role in biofilm formation and cell wall stress in *Pseudomonas aeruginosa*.
R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M. G. J. Feuilloley, N. Orange, S. Chevalier.

Communications affichées en tant que co-auteur :

P4. The ExtraCytoplasmic Function sigma factor SigX is involved in P. aeruginosa response to a cold shock.

E. Bouffartigues, I. SI Hadj Mohand, **R. Duchesne**, O. Maillot, N. Orange, MGJ. Feuilloley, S. Chevalier
3ème journée IRIB, Caugé, France 20 Juin 2014.

P5. The absence of OprF increased biofilm formation through modulation of the c-di-GMP level in Pseudomonas aeruginosa.
E. Bouffartigues, JA. Moscoso, **R. Duchesne**, L. Fito-Boncompte, G. Gicquel, O. Maillot, M. Benard, A. Bazire, P. Lerouge, A. Dufour, N. Orange, MGJ. Feuilloley, A. Filloux, S. Chevalier
3ème journée IRIB, Caugé, France 20 Juin 2014.
New Approaches and Concepts in Microbiology, EMBO symposia, EMBL Heidelberg, Germany. 11-14th October 2015
ASM Pseudomonas 2015, Washington, USA. 8-12th September 2015.

P6. Insight into the mechanism controlling the activity of the extracytoplasmic function sigma factor SigX in Pseudomonas aeruginosa.
E. Bouffartigues, I. SI Hadj Mohand, **R. Duchesne**, O. Maillot, N. Orange, MGJ. Feuilloley, S. Chevalier
11ème Congrès de la SFM, Paris, France, 23-24 Mars 2015.

Is SigX a new cell wall stress responsive ECF sigma factor in *Pseudomonas aeruginosa*?

Rachel Duchesne, Emeline Bouffartigues, Olivier Maillot, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange and Sylvie Chevalier

•*Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironnement* (LMSM) EA4312

•Univ. Rouen, UFR ST & IUT Evreux, 55 rue Saint Germain 27000 Evreux

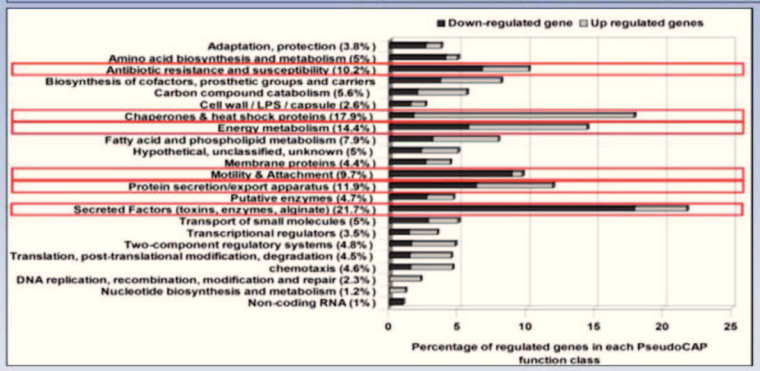
•*www.lmsm.fr*

Introduction:

Extracytoplasmic function sigma factors (ECF) are transcriptional regulators, which have been classified into 43 phylogenetically distinct groups[1]. Of those, the two predominant groups are the iron-sensitive FecI-like sigma factors and the cell envelope stress response RpoE-like sigma factor[2]. In *P. aeruginosa* genome, 19 ECFs sigma factors have been predicted, among which 13 belong to the FecI-like group and AlgU is the only known RpoE-like ECF sigma factor[3]. SigX has been previously involved in transcription of *oprF* that encodes the major outer membrane porin OprF, which is essential for virulence and maintaining of the cell wall structure[4,5,6]. This study aims at getting further insights into the functions of SigX and into the signals leading to its activation. To this end, transcriptomic, proteomic and phenotypic studies were achieved on cells grown in M9 media, as well as activity assays in many environmental conditions.

Results:

A *sigX* deletion mutant (PAOSX) led to altered expression of 307 genes in *P. aeruginosa*



The 6 major functional classes of SigX-regulated genes

- Antibiotic resistance/ susceptibility
- Chaperones and heat shock proteins
- Energy metabolism
- Motility and attachment
- Protein secretion/ export apparatus
- Secreted factors

153 genes

Major classes:
"Secreted factors"
"Motility and attachment"

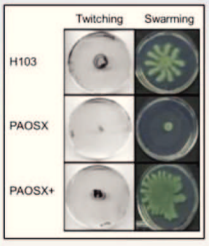
154 genes

Major class:
" Chaperones and heat shock proteins"

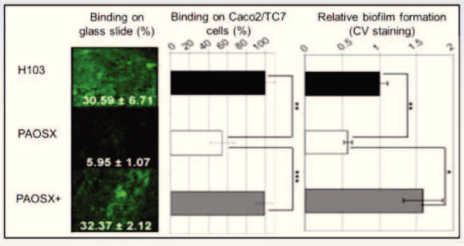
Stress ?

Functional classes were determined using the *Pseudomonas* Genome Project website (www.pseudomonas.com; Winsor *et al.*, 2011). Fold change ≥2, *P*-value ≤0.05 as determined by Empirical Bayes.

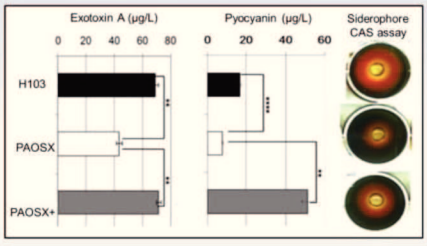
Motility



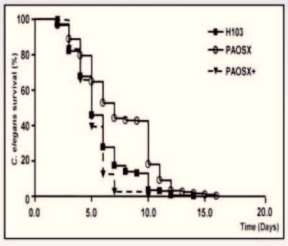
Adhesion and Biofilm formation



Virulence factors and Siderophores



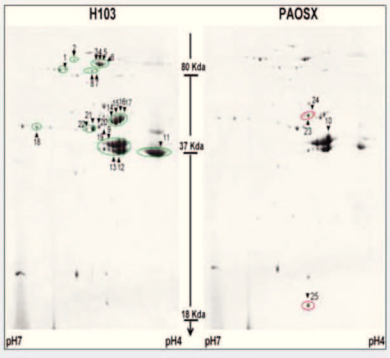
Virulence on *C. elegans*



Published in Gicquel *et al.*, 2013. PloS One

The *sigX* mutant is affected in outer membrane composition

2D gel electrophoresis and MALDI-TOF-TOF analysis



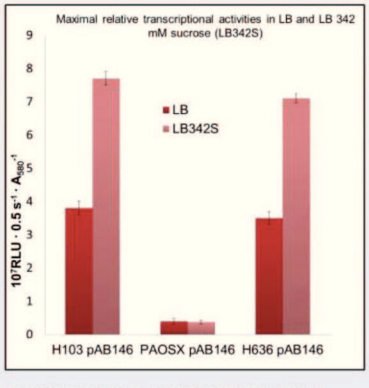
OprB: glucose specific porin (23,24)
PagL: Lipid A 3-O-deacylase (25)

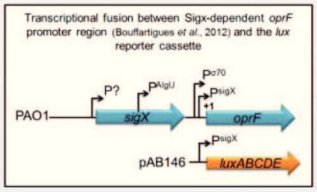
4 gated channels involved in iron and hem uptake (1-8)
OprF: major outer membrane protein (9-13)
OprD: Basic amino acid specific porin (14-17)
OprE: Anaerobically induced outer membrane porin (18)
OprQ: non specific porin (19-22)

Cell wall stress?

Published in Duchesne *et al.*, 2013. J. Proteomics

Signals that activate SigX





oprF is a target of SigX and the mutation of *oprF* causes the disruption of outer membrane (Bouffartigues *et al.*, 2012) . pAB146 that contains the SigX-dependent *oprF* promoter region, is a reporter of SigX activity. Sucrose, a compound that is not metabolized by *P. aeruginosa* leads to activate SigX.

Cell wall stress ?

Published in Duchesne *et al.*, 2013. J. Proteomics

Conclusion:

We have shown that a *sigX* deletion led to altered transcription of 307 genes, among which 9 encoding master regulators, suggesting that SigX stands atop of the hierarchy of a large regulatory network. SigX is involved in virulence since it is required for adhesion and biofilm formation, as well as for production of several virulence factors and siderophores. The absence of SigX led to reduce the presence of several outer membrane channels, as well as increasing the transcription of chaperon encoding genes, suggesting than the *sigX* mutant encountered a cell wall stress. Finally, we show that SigX was activated in two conditions that disturb *P. aeruginosa* envelope, suggesting that SigX may be, in addition to AlgU, a second cell wall stress responding sigma factor. Identification of the mechanisms that regulate *sigX* expression has now been undertaken in order to get further insights about the SigX functions in *P. aeruginosa*.

References
[1] Staron *et al.*, 2009
[2] Bastiaansen *et al.*, 2010
[3] Potvin *et al.*, 2008
[4] Brinkman *et al.*, 1999
[5] Bouffartigues *et al.*, 2012
[6] Fito-Boncompte *et al.*, 2011

Supported by

Contribution du facteur sigma de réponse aux stress de l'enveloppe SigX à la formation du biofilm suite à un traitement par la tobramycine en concentration sub-létale

Rachel Duchesne, Emeline Bouffartigues, Olivier Maillot, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange et Sylvie Chevalier

•*Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement* (LMSM) EA4312

•Univ. Rouen, UFR ST & IUT Evreux, 55 rue Saint Germain 27000 Evreux

•*www.lmsm.fr*

INTRODUCTION:

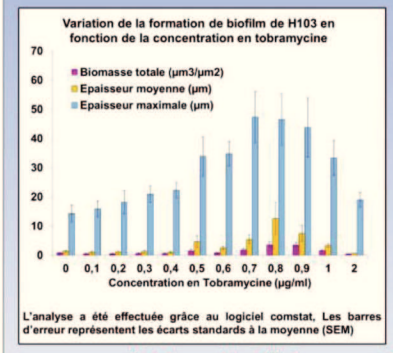
Lors d'infections chroniques, *P. aeruginosa* s'organise en biofilm, structure dans laquelle les cellules sont protégées par une épaisse matrice exocellulaire, jouant le rôle de barrière contre l'action du système immunitaire de l'hôte et des antimicrobiens. La faible diffusion des antibiotiques à travers la matrice crée un gradient de concentration exposant les cellules en profondeur du biofilm à des concentrations sub-létales d'antibiotiques. L'exposition de *P. aeruginosa* à des concentrations sub-létales de différents antibiotiques se traduit par une augmentation de la formation de biofilm[1,2]. Ces données suggèrent une non-spécificité apparente des antibiotiques.

Nous émettons l'hypothèse que l'entrée des antibiotiques dans la cellule pourrait provoquer une perturbation physique de l'enveloppe bactérienne. Si tel est le cas, le mécanisme moléculaire conduisant à ce phénotype pourrait être lié à l'augmentation de l'activité des facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF) AlgU et SigX, tous 2 impliqués dans la formation de biofilm[3-5].

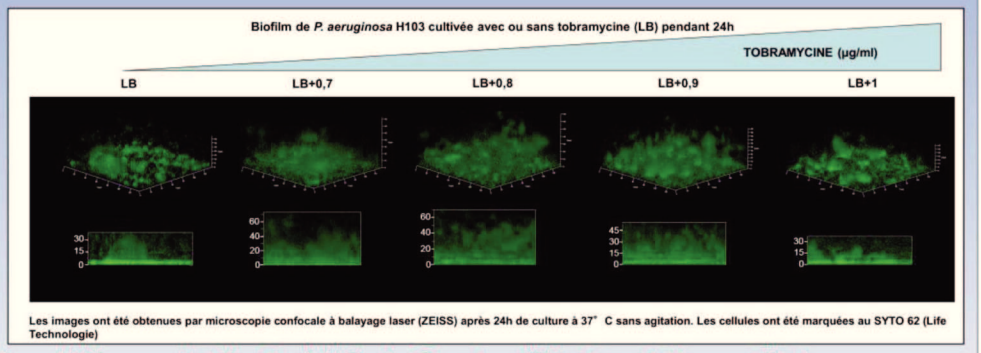
L'objectif principal de cette étude est d'évaluer si une perturbation de la membrane induite par une exposition de la bactérie à la tobramycine, peut être un signal conduisant à l'activation de SigX et à l'augmentation de la formation de biofilm.

RESULTATS:

EFFET DE LA CONCENTRATION EN TOBRAMYCINE SUR LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* H103



L'analyse a été effectuée grâce au logiciel comstat, Les barres d'erreur représentent les écarts standards à la moyenne (SEM)

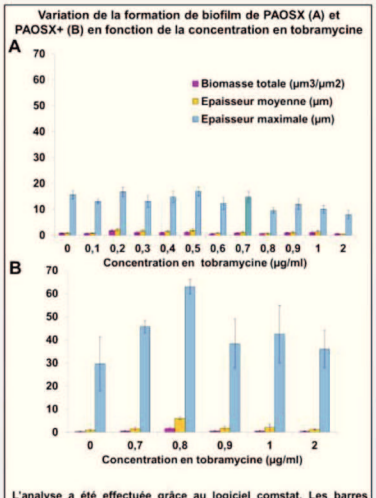


Les images ont été obtenues par microscopie confocale à balayage laser (ZEISS) après 24h de culture à 37° C sans agitation. Les cellules ont été marquées au SYTO 62 (Life Technologie)

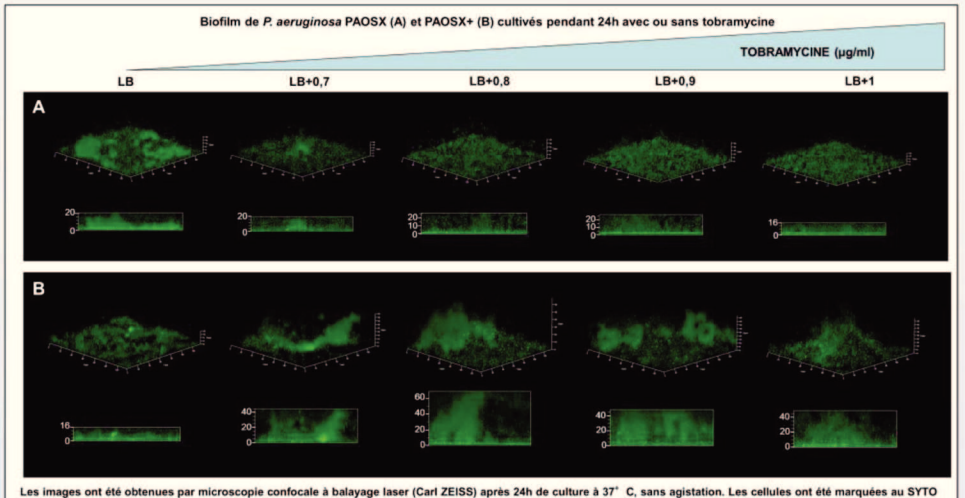
La tobramycine, utilisée en concentrations sub-létales, augmente la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* H103 en termes de biomasse et d'épaisseur.

IMPLICATION DE SigX DANS L'AUGMENTATION DE LA FORMATION DE BIOFILM PAR LA TOBRAMYCINE

Pour tester l'implication du facteur sigma SigX, les souches PAOSX et PAOSX+ ont été utilisées. PAOSX est un mutant de *P. aeruginosa* H103, incapable de produire le facteur sigma SigX. La souche PAOSX+ correspond à la souche mutée PAOSX complémentée sur le chromosome par une copie du gène *sigX*.



L'analyse a été effectuée grâce au logiciel comstat, Les barres d'erreur représentent les écarts standards à la moyenne (SEM)



Les images ont été obtenues par microscopie confocale à balayage laser (Carl ZEISS) après 24h de culture à 37° C, sans agistation. Les cellules ont été marquées au SYTO 62 (Life technologie)

L'effet de la tobramycine sur le biofilm est annulé dans le mutant *sigX* (PAOSX) et restauré dans la souche complementée (PAOSX+).

CONCLUSIONS:

Le traitement à la tobramycine modifie l'architecture du biofilm en termes de biomasse et d'épaisseur, un phénotype qui est lié à l'activité du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX. L'expression et l'activité de SigX sera prochainement suivie au cours de l'induction du biofilm par la tobramycine via l'utilisation de fusions transcriptionnelles en cours de construction.

Récemment, il a été démontré que SigX est impliqué dans le métabolisme du c-di-GMP[3,4], un métabolite secondaire dont le taux intra cellulaire régule la formation de biofilm. Le c-di-GMP étant également lié à la réponse aux aminoglycosides, plus spécifiquement à la capacité des cellules à former un biofilm en présence de tobramycine[6] , des expériences de dosage du c-di-GMP chez la souche sauvage H103 et le mutant *sigX* PAOSX après exposition à des concentrations sub-létales de tobramycine sont en cours.

References
[1]Morita et al., 2014
[2]Jones et al., 2013
[3]Blanka et al., 2014
[4]Bouffartigues et al., 2014
[5]Wood & Ohman, 2006
[6]Hoffman et al., 2005

Supported by

Pseudomonas aeruginosa ECF sigma factor SigX: role in biofilm formation in response to sub-inhibitory concentrations of tobramycin

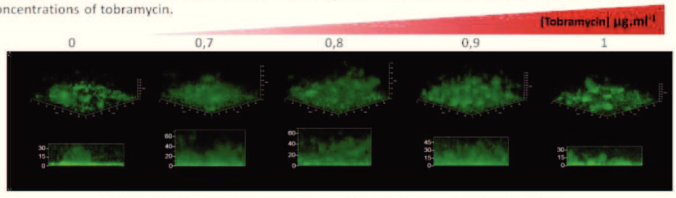
Rachel Duchesne, Emeline Bouffartigues, Manuella Catel-Ferreira, Olivier Maillot, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange and Sylvie Chevalier
Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment (LMSM) EA4312, University of Rouen, France
www.lmsm-lab.fr

Introduction:

During chronic infections, *Pseudomonas aeruginosa* adopts a multicellular lifestyle called biofilm. In this structure cells are embedded in an extracellular matrix, which acts at least partly as a shield, protecting bacteria from the host immune system as well as antimicrobial compounds. Low antibiotic diffusion throughout the matrix creates a concentration gradient, leading bacteria to be exposed to sub-lethal concentrations, which have been previously shown to induce biofilm formation through a yet unknown molecular mechanism[1,2]. This latter seems to be at least partly unspecific. We hypothesized that the entry of low concentrated antibiotics may disturb *P. aeruginosa* envelop, which in turn may induce a stress response. In *P. aeruginosa*, the cell wall stress response is mainly triggered by the well known sigma factor AlgU, to which SigX may contribute. This latter extracytoplasmic sigma factor emerged indeed very recently as a potential new cell wall stress-responsive ECF sigma factor in *P. aeruginosa*[3,4,5].

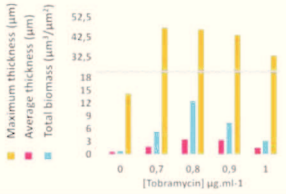
I- Effect of sub-inhibitory concentrations of tobramycin on biofilm formation

P. aeruginosa H103 biofilm formation after 24 hours of growth in LB or LB supplemented with sub-inhibitory concentrations of tobramycin.



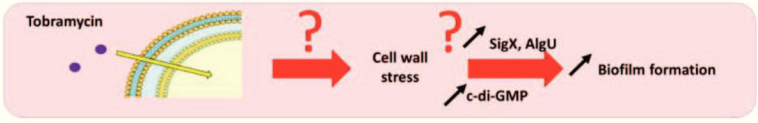
Confocal laser scanning microscopy imaging. Cells were stained with syto 62 red fluor

Computer analysis of microscopy images using COMSTAT software



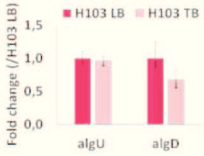
Tobramycin used in sub-inhibitory concentrations increases biofilm formation in terms of biomass and thickness in *P. aeruginosa* H103

Hypothesis

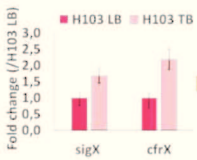


II- Involvement of SigX sigma factors in biofilm increase in response to tobramycin

Expression and activity of SigX and AlgU ECF sigma factors in H103 24-hours biofilms grown in LB or LB+0,8µg.ml^{-1} of tobramycin (TB) ; *cfrX* and *algD* genes are SigX and AlgU targets respectively

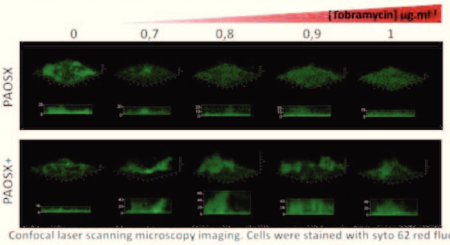


AlgU is not involved



SigX is involved

Biofilm formation of a sigX mutant strain, PAOSX and the complemented strain PAOSX+ after 24 hours of growth in LB or LB supplemented with sub-inhibitory concentrations of tobramycin.



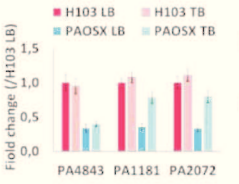
Confocal laser scanning microscopy imaging. Cells were stained with syto 62 red fluor

The effect of tobramycin is abolished in the *sigX* mutant strain, but restored in the complemented strain.

This phenotype in linked to SigX activity

III- Effect of tobramycin on c-di-GMP level in 24-hours grown biofilms

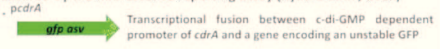
Expression of genes belonging to SigX regulon that encode enzymes involved in c-di-GMP metabolism. Total RNA were extracted from 24-hours grown biofilms of wild type and mutant strains.



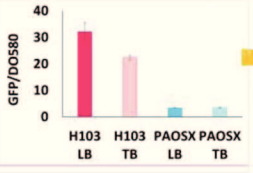
No effect of tobramycin on the three genes expression in H103.

PA1181 and PA2072 expression is 2 fold higher in PAOSX grown in presence of tobramycin rather than in LB

c-di-GMP levels measured by the fluorescence reporting assay (Rybtke et *al.*, 2012)



Transcriptional fusion between c-di-GMP dependent promoter of *cdrA* and a gene encoding an unstable GFP



C-di-GMP level is not affected by tobramycin after 24 hours of growth in biofilm lifestyle

Conclusion:

Tobramycin used in sub-inhibitory concentrations led to increase biofilm production, to modify its architecture, and to activate SigX in both the wildtype and complemented strains, but not in a *sigX* mutant, showing that SigX may be activated by sub-inhibitory concentrations of tobramycin. However, mechanisms by which biofilm production is increased remain to be discovered. Indeed, when observed at 24 hours of growth, c-di-GMP seems not to be involved in this phenotype. Analysis of c-di-GMP levels at earlier stages of biofilm development could bring further insights on the mechanism involved in this phenotype. A proteomic study on H103 and PAOSX biofilms grown in presence or in absence of tobramycin is currently underway;

References: [1]Morita *et al.*, 2014; [2]Jones *et al.*, 2013; [3]Boechat *et al.*, 2013; [4]Duchesne *et al.*, 2013; [5]Bouffartigues *et al.*, 2015

Supported by:

The ExtraCytoplasmic Function sigma factor SigX is involved in *P. aeruginosa* response to a cold shock.

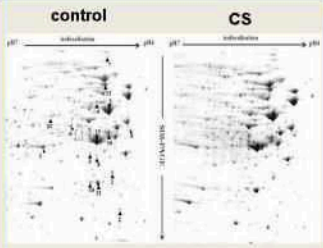
Emeline Bouffartigues, Ishac Si Hadj Mohand, Rachel Duchesne, Olivier Maillot, Nicole Orange, Marc Feuilloley, Sylvie Chevalier.

[1]*Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement* (LMSM) EA4312
Univ. Rouen, UFR ST & IUT Evreux, 55 rue Saint Germain 27000 Evreux
www.lmsm.fr

Introduction

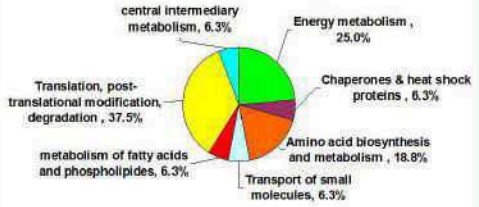
Pseudomonas aeruginosa **is well known to be a human opportunistic pathogen able to adapt to many environments. This ability is due at least partly to a large number of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. In *P. aeruginosa* genome, 19 ECFs sigma factors have been predicted, among which 13 belong to the FecI-like group, and one, AlgU, is well known as an RpoE-like ECF sigma factor. If until 2013 little was known about SigX, this ECF emerged very recently as a potential new cell wall stress-responsive ECF sigma factor in *P. aeruginosa*. However, the signals leading to its activation remain to be discovered. Through a strategy based on proteomics and qRT-PCR experiments, we have characterized a new condition leading to SigX activity.**

Effect of a cold shock (CS) on *P. aeruginosa proteome*



P. aeruginosa H103 was grown in LB at 37°C to exponential growth phase, then exposed for 30 min at 4°C (CF condition) or 37°C (control). Total proteins were extracted and separated by 2D-GEL.

2D gels were analysed by densitometry, and 16 proteins, whose expression was significantly altered, were identified by Mass Spectroscopy (MALDI-TOF) and classified relatively to their functional category.



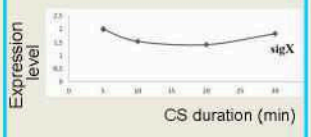
o **Metabolic adaptation:**
Overproduction of proteins involved in β-oxydation of fatty acids and amino acids degradation that generate ATP, NADPH and acetyl-coA.
The CS response is a costly consuming process.
o **Translation process:**
Overexpression of proteins involved in translation or in the mRNA stability.
The CS stimulates translation.
o **Membrane composition:**
Overexpression of AccA, underexpression of oprD.
The CS modulates the membrane composition.

Some of these proteins were previously shown to belong to the SigX regulon

Two transcriptional regulators seem to have a key role in *P. aeruginosa* cold shock response : SigX and PsrA.

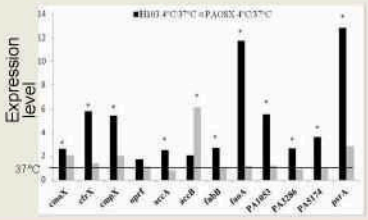
Effect of a cold shock on SigX expression and activity

The *sigX* mRNA expression was followed by RT-qPCR. Its expression was up-regulated immediately after the CS.



The SigX expression is increased after a CS.

To monitor SigX activity, the expression of 12 SigX putative targets was assayed by qRT-PCR.
o 4 genes were located in the proximal environment of *sigX*
o 8 genes are involved in *P. aeruginosa* fatty acid metabolism.



The expression of most of these targets was upregulated after a CS in a SigX-dependent manner

Conclusions and perspectives

In this study, we have shown that the ECF sigma factor SigX has a key role in the cold shock adaptation of *P. aeruginosa*. In addition sigX mRNA expression and SigX activity were increased in response to a cold shock. Interestingly, expression of *sigX* as well as several genes involved in cold shock adaptation, was down regulated in response to high pressure in *P. putida*. High pressure was known to increase the membrane fluidity. In addition SigX has been shown to be more expressed in other environmental conditions, such as microgravity; hypo-osmolarity; D-cycloserine treatment, high sucrose concentration.

Taken together these data suggest that SigX could be activated in response to membrane distorsions.

The absence of OprF increased biofilm formation through modulation of the c-di-GMP level in Pseudomonas aeruginosa.

Emeline Bouffartigues[1], Joana A. Moscoso[2], Rachel Duchesne[1], Laurène Fito-Boncompte[1], Gwendoline Gicquel[1], Olivier Maillot[1], Magalie Bénard[3], Alexis Bazire[4], Patrice Lerouge[5], Alain Dufour[4], Nicole Orange[1] Marc Feuilloley[1], Alain Filloux[2] and Sylvie Chevalier[1]

[1]Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA4312, Univ Rouen et IUT Evreux

[2]Centre for Molecular Microbiology and Infection, Division of Cell and Molecular Biology, Imperial College, London (UK).

[3]Cell Imaging Platform of Normandy (Primacen), IRIB, Faculty of Sciences , University of Rouen (France).

[4] Laboratory of Marine Biotechnology and Chemistry, EA 3884, South Britain University, IUEM, Lorient (France).

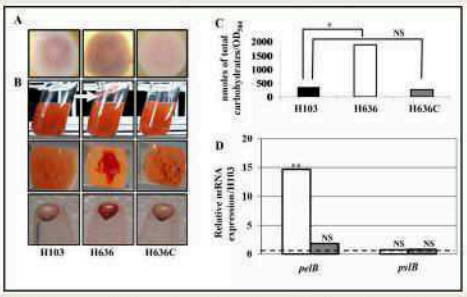
[5] Glyco MeV Laboratory, University of Rouen, Normandie University (France).

Introduction

Pseudomonas aeruginosa **is well known to be a human opportunistic pathogen able to adapt to many environmental conditions. The first cellular structure in contact with the environment is the outer membrane. In *Pseudomonas* genus, OprF is the major outer membrane protein. It is an aspecific porin allowing the diffusion of several types of small polar molecules. OprF is also a pleiotropic protein involved in other numerous cellular functions, as adhesion on biotic or abiotic surfaces, cell wall resistance and virulence of *P. aeruginosa*. Through a multiphenotypic study, we show here that the lack of OprF increased biofilm formation through modulation of the c-di-GMP level.**

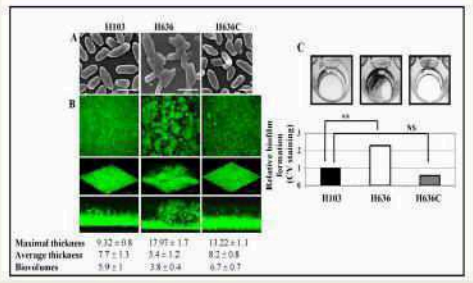
The lack of OprF affects biofilm-related phenotypes

The lack of OprF(H636 strain) led to increase exopolysaccharide (EPS) production



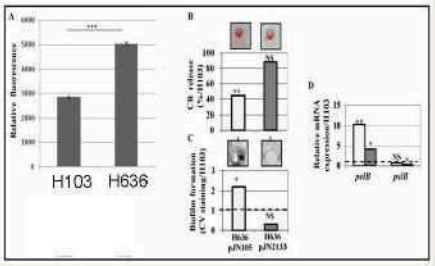
(A) Colony morphology observed on Congo Red containing LB agar plates
(B)H103, H636 and H636C were grown in LB containing Congo Red for 24 h at 37°C
- Top images: A slime production is indicated by a grey arrow in case of H636
- Middle images: Congo Red colored aggregates were observed at the bottom of the cultures
- Bottom images: Congo Red binding of pelleted cells (10^9)
(C) Cell-associated carbohydrates were quantified by gas chromatography.
(D) Relative *pel* and *psl* mRNA expression in H636 (white bars) and H636C (grey bars) relatively to H103 (dashed black line).
Each experiment was performed at least three times. For quantitative assay, statistics were done by unpaired *t* test. *$p<0.05$, **$p<0.01$, NS not significant.

The lack of OprF led to increase biofilm formation.



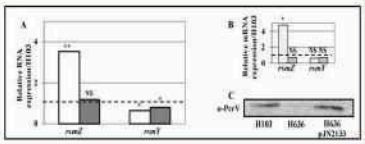
(A) Scanning electron micrograph images of H103, H636 and H636C (enlargement: 4 500 x; white bars represent 2 µm).
(B) Biofilms of H103, H636 and H636C grown in flow cells for 24 h and examined by CLSM. Top images, top views (x, y-plane); intermediate images, cross section views; bottom images, 3D-modelizations (x, y, z,- axes). Maximal, average thicknesses (in µm), and biovolumes (in µm3/µm2) were determined by COMSTAT analyses. The averages and standard deviations were calculated from 10 samples.
(C) Microtiter grown biofilm formed by H103, H636 and H636C. Biofilms were quantified by measuring absorbance at 595 nm after crystal violet staining. At least six assays were performed for each strain. Statistics were achieved by unpaired *t* test. **p<0.01, NS not significant.

The c-di-GMP level is increased in the oprF mutant.



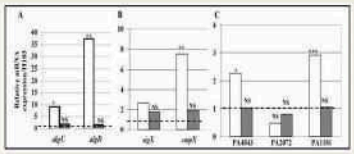
c-di-GMP level evaluation using the *cdrA-gfp* reporter fusion (Rybtke et al., 2010) harbored by H103 (black bar) and H636 oprF mutant (white bar).
(B) Exopolysaccharide production by H636 harboring pJN105 (dotted white bar) or pJN2133 (grey bar), using the Congo red release assay. H103 EPS production has been fixed at 100%.
(C) Biofilms formed by H636 relatively to H103 harboring pJN105 (dotted white bar) or pJN2133 (grey bar), were quantified by cristal violet staining.
(D) qRT-PCR assays on pelB and pslB expression in H636 harboring pJN105 (dotted white bars) or pJN2133 (grey bars) relatively to H103.
(B), (C), (D): Results are given as the ratio H636/H103. Dashed black line: H103 biofilm production (C) or pel and psl expression (D) were fixed at 1.
Each experiment was performed at least three times. Statistics were achieved by unpaired t test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, NS not significant.

The lack of OprF leads to increase *rsmZ* expression through modulation of the c-di-GMP level.



(A) Relative mRNA expression of the small non coding RNAs *rsmZ* and *rsmY* in H636 mutant (white bars) and *oprF* complemented mutant strain H636C (grey bars), relatively to H103 (dashed black line).
(B) Relative mRNA expression of *rsmZ* and *rsmY* in H636 *oprF* mutant strain harboring pJN105 (dotted white bars) or pJN2133 (grey bars) relatively to H103 (dashed black line).
(C) Western blot analyses of T3SS α-PcrV in *P. aeruginosa* H103, H636 and H636 harboring pJN2133.
Each experiment was performed at least three times. Statistics were done by unpaired t test. *p<0.05, **p<0.01, NS not significant.

The ECF sigma factor SigX is active in the *oprF* mutant.



Relative mRNA expression of *algU*, *algD* (A), *sigX* and *cmpX* (B), and of the three putative SigX-dependent diguanylate cyclases encoding genes (C) in *P. aeruginosa* H636 (white bars) and H636C (grey bars) relatively to H103 (dashed black line).
Each experiment was performed at least three times. Statistics were achieved by unpaired t test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, NS not significant

Conclusions

We have shown that the absence of OprF led to increase biofilm formation and EPS production. This phenotype was associated to *pel*, but not *psl* overexpression. Accordingly, the c-di-GMP pool level was elevated. By artificially decreasing the c-di-GMP level, we observed that both the biofilm formation and the *pel* expression were restored in the *oprF* mutant. In addition we observed that PA4843 and PA1181 expression, encoding diguanylate cyclases, was strongly increased in the *oprF* mutant at least partly through enhanced activity of the extracytoplasmic function sigma factor SigX. Finally, expression of *rsmZ*, but not *rsmY* was increased in the *oprF* mutant through c-di-GMP level alteration.

Insights into the mechanism controlling the activity of the extracytoplasmic function sigma factor SigX in *Pseudomonas aeruginosa*.

***Emeline Bouffartigues**, Ishac Si Hadj Mohand, Rachel Duchesne, Olivier Maillot, Nicole Orange, Marc Feuilloley, Sylvie Chevalier.*

Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA4312

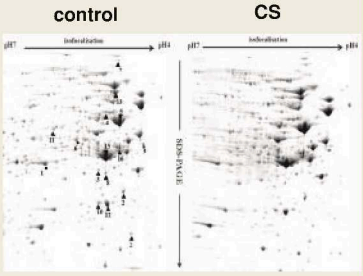
Univ. Rouen, UFR ST & IUT Evreux, 55 rue Saint Germain 27000 Evreux

www.lmsm.fr

Introduction

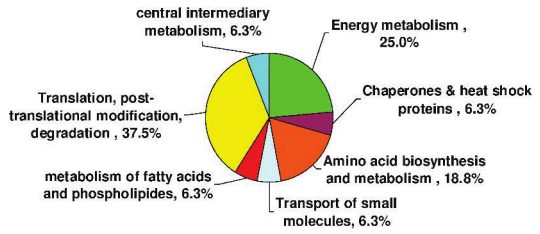
Pseudomonas aeruginosa **is a human opportunistic pathogen able to adapt to many environments. This capacity is due at least partly to a large number of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. 19 ECFs have been predicted, among which 13 belong to the FecI-like group, and one, AlgU, to the RpoE-like group (Llamas *et al.*, 2014). If until 2013 little was known about SigX, this ECF emerged very recently as a potential new cell wall stress-responsive ECF sigma factor in *P. aeruginosa*. However, signals and molecular mechanisms leading to its activation remain to be discovered.**

Effect of a cold shock (CS) on *P. aeruginosa proteome*



P. aeruginosa H103 was grown in LB at 37°C to exponential growth phase, then exposed for 30 min at 4°C (CF condition) or 37°C (control). Total proteins were extracted and separated by 2D-GEL.

2D gels were analysed by densitometry, and 16 proteins, whose expression was significantly altered, were identified by Mass Spectroscopy (MALDI-TOF) and classified relatively to their functional category.



o **Metabolic adaptation:**
↗ β-oxydation of fatty acids and amino acids degradation : production of ATP, NADPH and acetyl-coA. ➡ CS: costly consuming process.

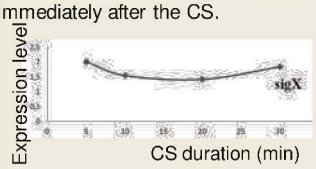
o **Translation process:**
↗ Translation or mRNA stability.
➡ CS stimulates translation.

o **Membrane composition:**
↗ AccA, ↘ OprD
➡ CS modulates membrane composition.

➡ **Some of these proteins were previously shown to belong to the SigX regulon**

Effect of a CS on SigX expression and activity

The *sigX* mRNA expression was followed by RT-qPCR. Its expression was up-regulated immediately after the CS.

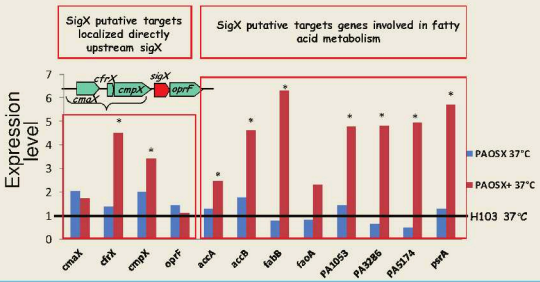


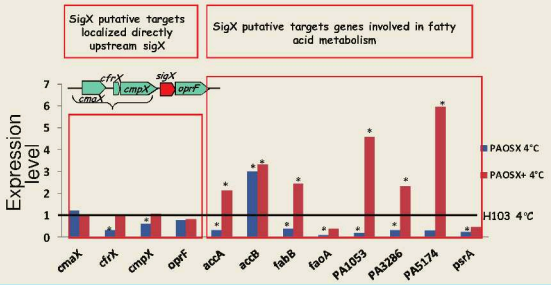
SigX expression is increased after a CS

To monitor SigX activity, the expression of 12 SigX putative targets was assayed by qRT-PCR.

o 4 genes are located in the proximal environment of *sigX*

o 8 genes are involved in *P. aeruginosa* fatty acid metabolism.

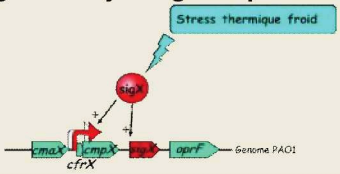




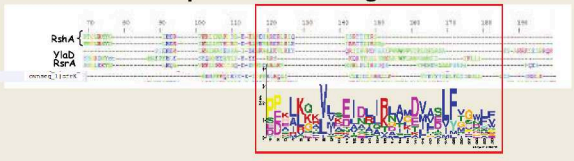
➡ **The expression of most of these targets was upregulated after a CS in a SigX-dependent manner**

What is the functional relationship between SigX and the neighbouring operon *cmax-cfrX-cmpX*?

cfrX is regulated by a SigX–dependent promoter



CfrX contains a putative anti-sigma domain.



Is the SigX-dependent promoter of *cfrX* it activated in the *cfrX* mutant?

Conclusions and perspectives

We show here that SigX has a key role in the CS response of *P. aeruginosa*, a condition in which its expression and activity are increased. CS is known to alter membrane fluidity, and SigX is involved in fatty acids synthesis gene expression (Boechat *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014). Of note, expression of *sigX* and of several genes involved in the CS response were downregulated in response to high pressure in *P. putida* (follonier *et al.*,2013), a condition that is known to increase membrane fluidity. Taken together these data suggest that SigX could be activated in response to membrane distorsions via a molecular mechanism involving CfrX and CmpX. This question is currently addressed is our laboratory.

Rachel Duchesne

28 ans

Française

rachel.duchesne0@gmail.com

06.78.60.42.27

20 bis rue de la roseraie

27700 Bernières sur seine

Current

Permis B

PhD in Biology

Education

2017 — **PhD in Microbiology**

University of Rouen, Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment (LMSM), EA4312

Thesis title: Role of the Extracytoplasmic function sigma factor SigX in biofilm formation and response to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa*

2013 — **Master in Biosciences option Microbiology**

University of Rouen, Mont Saint Aignan

Master 2, 6 month internship: Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment EA4312

Contribution to ECF sigma factor SigX regulon identification in *Pseudomonas aeruginosa*

Master 1, 4 month internship: Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment EA4312

Involvement of the ECF sigma factor SigX in outer membrane homeostasis in Pseudomonas aeruginosa

2011 — **Licence in Biochemistry and Molecular Biology**

University of Rouen, Mont Saint Aignan

6 week internship: Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment EA4312

Contribution to the study of type VI secretion system of *Pseudomonas fluorescens*

Skills

Technical

Physiology: Biofim formation, antibiotic susceptibility,

Proteomic: Protein extraction, 1D and 2D electrophoresis, Cellular fractionning

Molecular biology: DNA and RNA extraction and purification, PCR, q-RT-PCR, cloning, transcriptional fusion, protein-DNA interactions (EMSA, affinity chromatography, MST), c-di-GMP extraction.

Confocal laser scanning microscopy

Mass spectrometry MALDI-TOF/TOF

Computer

Office: Adobe illustrator, Photoshop

Microscopy: Zen, Image J

Mass specrometry: Flex control, Flex analysis

Proteomic: PDQuest, Quantity one

Genomic: Primer express, Primer 3 plus, clone manager, 7500 software, Data assist, Blast, MEME suite, Qgene

Statistic: Comstat, Matlab, Past

Rachel Duchesne

rachel.duchesne0@gmail.com

06.78.60.42.27

Publications

A proteomic approach of SigX function in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane composition. Duchesne R, Bouffartigues E, Oxaran V, Bénard M, Feuilloley MG, Orange N, Chevalier S. *Journal of Proteomics*, 2013 Dec.; 94:451-9

Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX. Bouffartigues E, Duchesne R, Bazire A, Simon M, Maillot O, Dufour A, Feuilloley M, Orange N, Chevalier S. *FEMS Microbiology Letters*, 2014 Jul;356(2):193-200

The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. E. Bouffartigues, J. Moscoso, R. Duchesne, T. Rosay, L. Fito-boncompte, G. Gicquel, O. Maillot, M. Bénard, A. Bazire, G. Brenner-Weiss, O. Lesouhaitier, P. Lerouge, A. Dufour, N. Orange, M.G.J. Feuilloley, A. Filloux, S. Chevalier. *Frontiers in Microbiology,* 2015 Jun 23;6:630.

Subinhibitory concentration of Tobramycin increased biofilm formation through SigX activity. R. Duchesne, E. Bouffartigues, M. Catel-Ferreira, O. Maillot, G. Brenner-Weiss, M. G. J. Feuilloley, N. Orange, P. Cornelis and S. Chevalier.
Writting

The absence of SigX sigma factor results in dysregulation of the Crc/Hfq/CbrAB networks in *Pseudomonas aeruginosa* and reduced membrane fluidity. R. Duchesne, M. Fléchard, E. Bouffartigues, G. Gicquel, J. Hardouin, M. Catel-Fereira, O. Maillot, N. Orange, M. G. J. Feuilloley, É. Déziel, P. Cornelis and S. Chevalier.

Writting

Talks

"Is SigX a new cell wall stress responsive ECF sigma factor?" R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier. 17èmes Journées de l'école doctorale EdNBISE, Le Havre, 10/04/2014

"The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level." R. Duchesne, E. Bouffartigues , J. A. Moscoso, T. Rosay, O. Maillot, G. Brenner-Weiss, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilloley, J. Overhage, A. Filloux and S. Chevalier. 4th Molecular Microbiology Meeting / Vienna, Austria, 18/09/2015

"Rôle du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX chez le pathogène opportuniste de l'Homme *Pseudomonas aeruginosa*." Rachel Duchesne, Emeline Bouffartigues, Olivier Maillot, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange et Sylvie Chevalier. Journée du Grand Réseau de Recherche « Sécurité Sanitaire », Evreux, 01/12/ 2015.

"Rôle du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX chez le pathogène opportuniste de l'Homme *Pseudomonas aeruginosa*." Rachel Duchesne, Emeline Bouffartigues, Olivier Maillot, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange et Sylvie Chevalier. 17ème Colloque des Jeunes Chercheurs travaillant sur la mucoviscidose, Institut Pasteur, Paris, 09/02/2016.

Rachel Duchesne

rachel.duchesne0@gmail.com

06.78.60.42.27

Poster presentations

"**Is SigX a new cell wall stress responsive ECF sigma factor?**" R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier. 10ème Congrès national de la SFM, Institut Pasteur, Paris, France 31/03-01/04 2014

"**Is SigX a new cell wall stress responsive ECF sigma factor?**" R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier. Young Microbiologists Symposium , Dundee, Scotland, 02/06-03/06 2014

"The extracytoplasmic Function Sigma Factor SigX is involved in *P. aeruginosa* response to a cold shock." Bouffartigues E., SI Hadj Mohand I., Duchesne R., Maillot O., Orange N., Feuilloley M.G.J., Chevalier S. 3ème journée IRIB, Caugé, France, 20/06/2014.

"The absence of OprF increased biofilm formation through modulation of the c-di-GMP level in *Pseudomonas aeruginosa*." Bouffartigues E., Moscoso J. A., Duchesne R., Fito-Boncompte L., Gicquel G., Maillot O., Benard M., Bazire A., Lerouge P., Dufour A., Orange N., Feuilloley M.G.J, Filloux A., Chevalier S. 3ème journée IRIB, Caugé, France, 20/06/2014.

"**Contribution du facteur sigma de réponse au stress de l'enveloppe SigX à la formation du biofilm suite à un traitement par la tobramycine en concentration sublétales.**" R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier. 16ème Colloque national Vaincre la Mucoviscidose, Institut Pasteur, Paris, France, 17 février 2015

"Contribution du facteur sigma de réponse au stress de l'enveloppe SigX à la formation du biofilm suite à un traitement par la tobramycine en concentration sublétales." R. Duchesne, E. Bouffartigues, O. Maillot, M.G.J. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier. 18ème Journées de l'école doctorale EdNBISE, Rouen, France, 26/03-27/03 2015

"Insight into the mechanism controlling the activity of the extracytoplasmic function sigma factor SigX in *Pseudomonas aeruginosa*." Bouffartigues E., SI Hadj Mohand I., Duchesne R., Maillot O., Orange N., Feuilloley M.G.J., Chevalier S. 11ème Congrès de la SFM, Paris, France, 23-24 Mars 2015

"The ECF sigma factor SigX, role in biofilm formation and cell wall stress in *Pseudomonas aeruginosa*."Rachel Duchesne, Emeline Bouffartigues, Olivier Maillot, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange and Sylvie Chevalier. Gordon Research Conference Microbial stress response, Mount hollyoke College, South hadley, MA , United States, 17/07-22/07 2016

Referees contact details

Pr. Sylvie Chevalier
02 35 14 00 00
sylvie.chevalier@univ-rouen.fr
LMSM EA4312,
55 rue saint germain, 27000 Evreux

Dr. Julien Verdon
05 49 45 36 93
julien.verdon@univ-poitiers.fr
Laboratoire EBI, UMR CNRS 7267,
6 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers

Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., Baysse, C., 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. Microbiol. Read. Engl. 148, 2371–2381. doi:10.1099/00221287-148-8-2371

Ainsaar, K., Mumm, K., Ilves, H., Hõrak, R., 2014. The ColRS signal transduction system responds to the excess of external zinc, iron, manganese, and cadmium. BMC Microbiol. 14, 162. doi:10.1186/1471-2180-14-162

Aires, J.R., Köhler, T., Nikaido, H., Plésiat, P., 1999. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2624–2628.

Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E., Iglewski, B.H., 1997. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 179, 3928–3935.

Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Mol. Microbiol. 59, 1114–1128. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x

Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjørn, S.P., Givskov, M., Molin, S., 1998. New Unstable Variants of Green Fluorescent Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2240–2246.

Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. Nat. Rev. Microbiol. 12, 465–478. doi:10.1038/nrmicro3270

Arts, I.S., Gennaris, A., Collet, J.-F., 2015. Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. FEBS Lett. 589, 1559–1568. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.057

Azghani, A.O., Idell, S., Bains, M., Hancock, R.E.W., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. Microb. Pathog. 33, 109–114. doi:10.1006/mpat.2002.0514

Babić, F., Venturi, V., Maravić-Vlahoviček, G., 2010. Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhlI/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate. BMC Infect. Dis. 10, 148. doi:10.1186/1471-2334-10-148

Balasubramanian, D., Kumari, H., Jaric, M., Fernandez, M., Turner, K.H., Dove, S.L., Narasimhan, G., Lory, S., Mathee, K., 2014. Deep sequencing analyses

expands the *Pseudomonas aeruginosa* AmpR regulon to include small RNA-mediated regulation of iron acquisition, heat shock and oxidative stress response. Nucleic Acids Res. 42, 979–998. doi:10.1093/nar/gkt942

Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., Mathee, K., 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acids Res. 41, 1–20. doi:10.1093/nar/gks1039

Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R., Harwood, C.S., 2012. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. Nucleic Acids Res. 40, 7207–7218. doi:10.1093/nar/gks384

Barchinger, S.E., Ades, S.E., 2013. Regulated proteolysis: control of the *Escherichia coli* σ(E)-dependent cell envelope stress response. Subcell. Biochem. 66, 129–160. doi:10.1007/978-94-007-5940-4_6

Baysse, C., Cullinane, M., Dénervaud, V., Burrowes, E., Dow, J.M., Morrissey, J.P., Tam, L., Trevors, J.T., O'Gara, F., 2005. Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. Microbiol. Read. Engl. 151, 2529–2542. doi:10.1099/mic.0.28185-0

Baysse, C., O'Gara, F., 2007. Role of Membrane Structure During Stress Signalling and Adaptation in *Pseudomonas*, in: Ramos, J.-L., Filloux, A. (Eds.), Pseudomonas. Springer Netherlands, pp. 193–224.

Beare, P.A., For, R.J., Martin, L.W., Lamont, I.L., 2003. Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. Mol. Microbiol. 47, 195–207.

Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., Mattick, J.S., 2002. Differential Regulation of Twitching Motility and Elastase Production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 184, 3605–3613. doi:10.1128/JB.184.13.3605-3613.2002

Beveridge, T.J., 1999. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. J. Bacteriol. 181, 4725–4733.

Beveridge, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L., Li, Z., 1997. Interactions between biofilms and the environment. FEMS Microbiol. Rev. 20, 291–303.

Billings, N., Ramirez Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., Ribbeck, K., 2013. The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-

Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS Pathog. 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003526

Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Fiandaca, M.J., Pedersen, J., Hansen, C.R., Andersen, C.B., Pressler, T., Givskov, M., Høiby, N., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. Pediatr. Pulmonol. 44, 547–558. doi:10.1002/ppul.21011

Blanka, A., Düvel, J., Dötsch, A., Klinkert, B., Abraham, W.-R., Kaever, V., Ritter, C., Narberhaus, F., Häussler, S., 2015. Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition. Sci. Signal. 8, ra36. doi:10.1126/scisignal.2005943

Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., Casilag, F., Düvel, J., Abraham, W.-R., Kaever, V., Häussler, S., 2014. Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. J. Bacteriol. 196, 345–356. doi:10.1128/JB.01034-13

Boechat, A.L., Kaihami, G.H., Politi, M.J., Lépine, F., Baldini, R.L., 2013. A Novel Role for an ECF Sigma Factor in Fatty Acid Biosynthesis and Membrane Fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE 8. doi:10.1371/journal.pone.0084775

Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A., Filloux, A., 2010. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Mol. Microbiol. 76, 1427–1443. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x

Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. Mol. Microbiol. 75, 827–842. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x

Boucher, J.C., Yu, H., Mudd, M.H., Deretic, V., 1997. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. Infect. Immun. 65, 3838–3846.

Boucher, R.C., 2007. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. J. Intern. Med. 261, 5–16. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01744.x

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Hancock, R.E.W., Dufour, A., Chevalier, S., 2012. Transcription of the *oprF* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent Mainly on the SigX Sigma Factor and Is Sucrose Induced. J. Bacteriol. 194, 4301–4311. doi:10.1128/JB.00509-12

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Fito-Boncompte, L., Taupin, L., 2011. The Major Outer Membrane Protein Oprf is Required for Rhamnolipid Production in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. Parasitol. 2. doi:10.4172/2155-9597.1000118

Branski, L.K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M.G., Sanford, A.P., Herndon, D.N., 2009. Emerging Infections in Burns. Surg. Infect. 10, 389–397. doi:10.1089/sur.2009.024

Braun, V., Endriß, F., 2007. Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. BioMetals 20, 219–231. doi:10.1007/s10534-006-9072-5

Braun, V., Mahren, S., Ogierman, M., 2003. Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. Curr. Opin. Microbiol. 6, 173–180. doi:10.1016/S1369-5274(03)00022-5

Brencic, A., Lory, S., 2009. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. Mol. Microbiol. 72, 612–632. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., Lory, S., 2009. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. Mol. Microbiol. 73, 434–445. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x

Brinkman, F.S.L., Bains, M., Hancock, R.E.W., 2000. The Amino Terminus of *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Protein OprF Forms Channels in Lipid Bilayer Membranes: Correlation with a Three-Dimensional Model. J. Bacteriol. 182, 5251–5255.

Brinkman, F.S.L., Schoofs, G., Hancock, R.E.W., De Mot, R., 1999. Influence of a Putative ECF Sigma Factor on Expression of the Major Outer Membrane Protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. J. Bacteriol. 181, 4746–4754.

Bucior, I., Pielage, J.F., Engel, J.N., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. PLoS Pathog. 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002616

Bush, K., Bradford, P.A., 2016. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6, a025247. doi:10.1101/cshperspect.a025247

Byrd, M.S., Pang, B., Mishra, M., Swords, W.E., Wozniak, D.J., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Exopolysaccharide Psl Facilitates Surface Adherence and NF-κB Activation in A549 Cells. mBio 1. doi:10.1128/mBio.00140-10

Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., Lam, J.S., Wozniak, D.J., 2009. Genetic and Biochemical Analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl Exopolysaccharide Reveal Overlapping Roles for Polysaccharide Synthesis Enzymes in Psl and LPS Production. Mol. Microbiol. 73, 622–638. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x

Caille, O., Rossier, C., Perron, K., 2007. A Copper-Activated Two-Component System Interacts with Zinc and Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 189, 4561–4568. doi:10.1128/JB.00095-07

Cao, B., Christophersen, L., Kolpen, M., Jensen, P.Ø., Sneppen, K., Høiby, N., Moser, C., Sams, T., 2016. Diffusion Retardation by Binding of Tobramycin in an Alginate Biofilm Model. PLoS ONE 11. doi:10.1371/journal.pone.0153616

Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.-C., Lloubes, R., 2002. Pal Lipoprotein of Plays a Major Role in Outer Membrane Integrity. J. Bacteriol. 184, 754–759. doi:10.1128/JB.184.3.754-759.2002

Cezairliyan, B.O., Sauer, R.T., 2009. Control of *Pseudomonas aeruginosa* AlgW protease cleavage of MucA by peptide signals and MucB. Mol. Microbiol. 72, 368–379. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06654.x

Chand, N.S., Clatworthy, A.E., Hung, D.T., 2012. The two-component sensor KinB acts as a phosphatase to regulate *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. J. Bacteriol. 194, 6537–6547. doi:10.1128/JB.01168-12

Chang, W.-S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X., Halverson, L.J., 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated

microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. J. Bacteriol. 189, 8290–8299. doi:10.1128/JB.00727-07

Chen, L., Duan, K., 2016. A PhoPQ-Regulated ABC Transporter System Exports Tetracycline in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 3016–3024. doi:10.1128/AAC.02986-15

Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Nielsen, T.E., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2013. Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2352–2361. doi:10.1128/AAC.00001-13

Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., Jenal, U., 2006. Allosteric Control of Cyclic di-GMP Signaling. J. Biol. Chem. 281, 32015–32024. doi:10.1074/jbc.M603589200

Christen, M., Kulasekara, H.D., Christen, B., Kulasekara, B.R., Hoffman, L.R., Miller, S.I., 2010. Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. Science 328, 1295–1297. doi:10.1126/science.1188658

Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., Schweizer, H.P., 2005. Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 2133–2136. doi:10.1128/AAC.49.5.2133-2136.2005

Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., Schweizer, H.P., 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. J. Bacteriol. 184, 5036–5044.

Chuanchuen, R., Wannaprasat, W., Schweizer, H.P., 2008. Functional characterization of MexXY and OpmG in aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 39, 115–122.

Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., 2012. Global regulatory pathways and cross-talk control *pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. Curr. Issues Mol. Biol. 14, 47–70.

Colvin, K.M., Alnabelseya, N., Baker, P., Whitney, J.C., Howell, P.L., Parsek, M.R., 2013. PelA Deacetylase Activity Is Required for Pel Polysaccharide Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 195, 2329–2339. doi:10.1128/JB.02150-12

Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., Parsek, M.R., 2011. The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. PLOS Pathog 7, e1001264. doi:10.1371/journal.ppat.1001264

Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. Environ. Microbiol. 14. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x

Coulon, C., Vinogradov, E., Filloux, A., Sadovskaya, I., 2010. Chemical Analysis of Cellular and Extracellular Carbohydrates of a Biofilm-Forming Strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14. PLoS ONE 5. doi:10.1371/journal.pone.0014220

Couto, N., Schooling, S.R., Dutcher, J.R., Barber, J., 2015. Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. J. Proteome Res. 14, 4207–4222. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00312

Cox, C.D., Nakayama, Y., Nomura, T., Martinac, B., 2015. The evolutionary "tinkering" of MscS-like channels: generation of structural and functional diversity. Pflugers Arch. 467, 3–13. doi:10.1007/s00424-014-1522-2

Crabbé, A., Ledesma, M.A., Nickerson, C.A., 2014. Mimicking the host and its microenvironment in vitro for studying mucosal infections by *Pseudomonas aeruginosa*. Pathog. Dis. 71, 1–19. doi:10.1111/2049-632X.12180

Crabbé, A., Pycke, B., Van Houdt, R., Monsieurs, P., Nickerson, C., Leys, N., Cornelis, P., 2010. Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves AlgU regulation. Environ. Microbiol. 12, 1545–1564. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02184.x

Croda-García, G., Grosso-Becerra, V., Gonzalez-Valdez, A., Servín-González, L., Soberón-Chávez, G., 2011. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. Microbiol. Read. Engl. 157, 2545–2555. doi:10.1099/mic.0.050161-0

Damron, F.H., Owings, J.P., Okkotsu, Y., Varga, J.J., Schurr, J.R., Goldberg, J.B., Schurr, M.J., Yu, H.D., 2012. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* regulon

controlled by the sensor kinase KinB and sigma factor RpoN. J. Bacteriol. 194, 1317–1330. doi:10.1128/JB.06105-11

Damron, F.H., Qiu, D., Yu, H.D., 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor kinase KinB negatively controls alginate production through AlgW-dependent MucA proteolysis. J. Bacteriol. 191, 2285–2295. doi:10.1128/JB.01490-08

Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 185, 1027–1036.

Davinic, M., Carty, N.L., Colmer-Hamood, J.A., San Francisco, M., Hamood, A.N., 2009. Role of Vfr in regulating exotoxin A production by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 155, 2265–2273. doi:10.1099/mic.0.028373-0

De Mot, R., Proost, P., Van Damme, J., Vanderleyden, J., 1992. Homology of the root adhesin of *Pseudomonas fluorescens* OE 28.3 with porin F of P. aeruginosa and P. syringae. Mol. Gen. Genet. MGG 231, 489–493.

Deretic, V., Schurr, M.J., Boucher, J.C., Martin, D.W., 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. J. Bacteriol. 176, 2773–2780.

Dieppois, G., Ducret, V., Caille, O., Perron, K., 2012. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PloS One 7, e38148. doi:10.1371/journal.pone.0038148

Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P., Winzer, K., 2006. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 8, 1095–1104. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.001001.x

Dong, Y.-H., Zhang, X.-F., Soo, H.-M.L., Greenberg, E.P., Zhang, L.-H., 2005. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 56, 1287–1301. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04612.x

Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167–193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

Draper, L.A., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2015. Lantibiotic Resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 79, 171–191. doi:10.1128/MMBR.00051-14

Driscoll, J.A., Brody, S.L., Kollef, M.H., 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs 67, 351–368.

Duchêne, M., Schweizer, A., Lottspeich, F., Krauss, G., Marget, M., Vogel, K., von Specht, B.U., Domdey, H., 1988. Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene. J. Bacteriol. 170, 155–162.

El-Mahallawy, H.A., Hassan, S.S., El-Wakil, M., Moneer, M.M., 2016. Bacteremia due to ESKAPE pathogens: An emerging problem in cancer patients. J. Egypt. Natl. Cancer Inst. 28, 157–162. doi:10.1016/j.jnci.2016.05.002

Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., Saravolatz, L.D., 2005. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. Clin. Infect. Dis. 40, 1333–1341. doi:10.1086/429323

Fernández, L., Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I., Hancock, R.E.W., 2010. Adaptive Resistance to the “Last Hope” Antibiotics Polymyxin B and Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by the Novel Two-Component Regulatory System ParR-ParS. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 3372–3382. doi:10.1128/AAC.00242-10

Fernández, L., Jenssen, H., Bains, M., Wiegand, I., Gooderham, W.J., Hancock, R.E.W., 2012. The Two-Component System CprRS Senses Cationic Peptides and Triggers Adaptive Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Independently of ParRS. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 6212–6222. doi:10.1128/AAC.01530-12

Firoved, A.M., Boucher, J.C., Deretic, V., 2002. Global Genomic Analysis of AlgU (σE)-Dependent Promoters (Sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and Implications for Inflammatory Processes in Cystic Fibrosis. J. Bacteriol. 184, 1057–1064. doi:10.1128/jb.184.4.1057-1064.2002

Fito-Boncompte, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., Bazire, A., Madi, A., Connil, N., Véron, W., Taupin, L., Toussaint, B., Cornelis, P., Wei, Q., Shioya, K., Déziel, E., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Dufour, A., Chevalier, S., 2011. Full Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprF. Infect. Immun. 79, 1176–1186. doi:10.1128/IAI.00850-10

Fong, J.N.C., Yildiz, F.H., 2015. Biofilm Matrix Proteins. Microbiol. Spectr. 3. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014

Fonseca, P., Moreno, R., Rojo, F., 2013. *Pseudomonas putida* growing at low temperature shows increased levels of CrcZ and CrcY sRNAs, leading to reduced Crc-dependent catabolite repression. Environ. Microbiol. 15, 24–35. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02708.x

Fraud, S., Campigotto, A.J., Chen, Z., Poole, K., 2008. MexCD-OprJ Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement in Chlorhexidine Resistance and Induction by Membrane-Damaging Agents Dependent upon the AlgU Stress Response Sigma Factor. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 4478–4482. doi:10.1128/AAC.01072-08

Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Klem, E.R., Fehr, A.R., Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2010. In vitro and in vivo characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase CpdA, required for cAMP homeostasis and virulence factor regulation. J. Bacteriol. 192, 2779–2790. doi:10.1128/JB.00168-10

Fulcher, N.B., Holliday, P.M., Klem, E., Cann, M.J., Wolfgang, M.C., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp Chemosensory System Regulates Intracellular cAMP Levels by Modulating Adenylate Cyclase Activity. Mol. Microbiol. 76, 889–904. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07135.x

Funken, H., Bartels, K.-M., Wilhelm, S., Brocker, M., Bott, M., Bains, M., Hancock, R.E.W., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., 2012. Specific Association of Lectin LecB with the Surface of *Pseudomonas aeruginosa*: Role of Outer Membrane Protein OprF. PLoS ONE 7. doi:10.1371/journal.pone.0046857

Gellatly, S.L., Needham, B., Madera, L., Trent, M.S., Hancock, R.E.W., 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ Two-Component Regulatory System Is Induced upon Interaction with Epithelial Cells and Controls Cytotoxicity and Inflammation. Infect. Immun. 80, 3122–3131. doi:10.1128/IAI.00382-12

Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., 2011. Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture ▽. Appl. Environ. Microbiol. 77, 5238–5246. doi:10.1128/AEM.00637-11

Ghafoor, A., Jordens, Z., Rehm, B.H.A., 2013. Role of PelF in Pel Polysaccharide Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 79, 2968–2978. doi:10.1128/AEM.03666-12

Ghanbari, A., Dehghany, J., Schwebs, T., Müsken, M., Häussler, S., Meyer-Hermann, M., 2016. Inoculation density and nutrient level determine the formation of

mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Sci. Rep. 6. doi:10.1038/srep32097

Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., Connil, N., Bazire, A., Maillot, O., Bénard, M., Cornelis, P., Hancock, R.E.W., Dufour, A., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Déziel, E., Chevalier, S., 2013. The Extra-Cytoplasmic Function Sigma Factor SigX Modulates Biofilm and Virulence-Related Properties in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE 8. doi:10.1371/journal.pone.0080407

Gilbert, K.B., Kim, T.H., Gupta, R., Greenberg, E.P., Schuster, M., 2009. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. Mol. Microbiol. 73, 1072–1085. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06832.x

Goetz, D.M., Singh, S., 2016. Respiratory System Disease. Pediatr. Clin. North Am. 63, 637–659. doi:10.1016/j.pcl.2016.04.007

Goh, E.-B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G., Davies, J., 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 17025–17030. doi:10.1073/pnas.252607699

Gooderham, W.J., Gellatly, S.L., Sanschagrin, F., McPhee, J.B., Bains, M., Cosseau, C., Levesque, R.C., Hancock, R.E.W., 2009. The sensor kinase PhoQ mediates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Read. Engl. 155, 699–711. doi:10.1099/mic.0.024554-0

Gooderham, W.J., Hancock, R.E.W., 2009. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Rev. 33, 279–294. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x

Gotoh, H., Zhang, Y., Dallo, S.F., Hong, S., Kasaraneni, N., Weitao, T., 2008. *Pseudomonas aeruginosa*, under DNA replication inhibition, tends to form biofilms via Arr. Res. Microbiol. 159, 294–302. doi:10.1016/j.resmic.2008.02.002

Gotoh, N., Wakebe, H., Yoshihara, E., Nakae, T., Nishino, T., 1989. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. J. Bacteriol. 171, 983–990.

Gutu, A.D., Sgambati, N., Strasbourger, P., Brannon, M.K., Jacobs, M.A., Haugen, E., Kaul, R.K., Johansen, H.K., Høiby, N., Moskowitz, S.M., 2013. Polymyxin

Resistance of *Pseudomonas aeruginosa phoQ* Mutants Is Dependent on Additional Two-Component Regulatory Systems. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2204–2215. doi:10.1128/AAC.02353-12

Ha, D.-G., O'Toole, G.A., 2015. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. Microbiol. Spectr. 3. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014

Hagiwara, D., Yamashino, T., Mizuno, T., 2004. A Genome-wide view of the *Escherichia coli* BasS-BasR two-component system implicated in iron-responses. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 1758–1767. doi:10.1271/bbb.68.1758

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A.V., Davey, A.K., Chess-Williams, R., Kiefel, M.J., Arora, D., Grant, G.D., 2016. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Toxins 8. doi:10.3390/toxins8080236

Hancock, R.E., Benz, R., 1986. Demonstration and chemical modification of a specific phosphate binding site in the phosphate-starvation-inducible outer membrane porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta 860, 699–707.

Hancock, R.E.W., 1984. Alterations in Outer Membrane Permeability. Annu. Rev. Microbiol. 38, 237–264. doi:10.1146/annurev.mi.38.100184.001321

Hancock, R.E.W., Brinkman, F.S.L., 2002. Function of Pseudomonas Porins in Uptake and Efflux. Annu. Rev. Microbiol. 56, 17–38. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160310

Hancock, R.E.W., Chapple, D.S., 1999. Peptide Antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1317–1323.

Hassan, K.A., Jackson, S.M., Penesyan, A., Patching, S.G., Tetu, S.G., Eijkelkamp, B.A., Brown, M.H., Henderson, P.J.F., Paulsen, I.T., 2013. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 20254–20259. doi:10.1073/pnas.1317052110

Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lymar, S.V., Rowe, J.J., Sun Yoon, S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., Hwang, S.-H., McDermott, T.R., Ochsner, U.A., 2002. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. Adv.

Drug Deliv. Rev., Current concepts on the Pathophysiology and Drug Development in Cystic Fibrosis 54, 1425–1443. doi:10.1016/S0169-409X(02)00152-7

Hassett, D.J., Sutton, M.D., Schurr, M.J., Herr, A.B., Caldwell, C.C., Matu, J.O., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. Trends Microbiol. 17, 130–138. doi:10.1016/j.tim.2008.12.003

Hay, I.D., Wang, Y., Moradali, M.F., Rehman, Z.U., Rehm, B.H.A., 2014. Genetics and regulation of bacterial alginate production. Environ. Microbiol. 16, 2997–3011. doi:10.1111/1462-2920.12389

Hemery, G., Chevalier, S., Bellon-Fontaine, M.-N., Haras, D., Orange, N., 2006. Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34, 49–54. doi:10.1007/s10295-006-0160-x

Hengge, R., 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 7, 263–273. doi:10.1038/nrmicro2109

Hickman, J.W., Harwood, C.S., 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. Mol. Microbiol. 69, 376–389. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x

Hickman, J.W., Tifrea, D.F., Harwood, C.S., 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 14422–14427. doi:10.1073/pnas.0507170102

Hinz, A., Lee, S., Jacoby, K., Manoil, C., 2011. Membrane Proteases and Aminoglycoside Antibiotic Resistance ▽. J. Bacteriol. 193, 4790–4797. doi:10.1128/JB.05133-11

Hoboth, C., Hoffmann, R., Eichner, A., Henke, C., Schmoldt, S., Imhof, A., Heesemann, J., Hogardt, M., 2009. Dynamics of Adaptive Microevolution of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. J. Infect. Dis. 200, 118–130. doi:10.1086/599360

Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S.I., 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature 436, 1171–1175. doi:10.1038/nature03912

Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z., Moser, C., Jensen, P.Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Bjarnsholt, T., 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. Int. J. Oral Sci. 3, 55–65. doi:10.4248/IJOS11026

Höper, D., Bernhardt, J., Hecker, M., 2006. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. Proteomics 6, 1550–1562. doi:10.1002/pmic.200500197

Hu, Y.-H., Wang, H.-L., Zhang, M., Sun, L., 2009. Molecular analysis of the copper-responsive CopRSCD of a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. J. Microbiol. Seoul Korea 47, 277–286. doi:10.1007/s12275-008-0278-9

Huangyutitham, V., Güvener, Z.T., Harwood, C.S., 2013. Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. mBio 4, e00242-213. doi:10.1128/mBio.00242-13

Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A.N., Wozniak, D.J., Romeo, T., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. Mol. Microbiol. 78, 158–172. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x

Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M.R., Wozniak, D.J., 2004. Identification of psl, a Locus Encoding a Potential Exopolysaccharide That Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm Formation. J. Bacteriol. 186, 4466–4475. doi:10.1128/JB.186.14.4466-4475.2004

Jaouen, T., Dé, E., Chevalier, S., Orange, N., 2004. Pore Size Dependence on Growth Temperature Is a Common Characteristic of the Major Outer Membrane Protein OprF in Psychrotrophic and Mesophilic *Pseudomonas* Species. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6665–6669. doi:10.1128/AEM.70.11.6665-6669.2004

Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., Secor, P.R., Tseng, B.S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D.J., Howell, P.L., Parsek, M.R., 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 11353–11358. doi:10.1073/pnas.1503058112

Jones, A.K., Fulcher, N.B., Balzer, G.J., Urbanowski, M.L., Pritchett, C.L., Schurr, M.J., Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2010. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through *mucA* mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. J. Bacteriol. 192, 5709–5717. doi:10.1128/JB.00526-10

Jones, C., Allsopp, L., Horlick, J., Kulasekara, H., Filloux, A., 2013. Subinhibitory Concentration of Kanamycin Induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI Secretion System. PLoS ONE 8. doi:10.1371/journal.pone.0081132

Jones, C.J., Ryder, C.R., Mann, E.E., Wozniak, D.J., 2013. AmrZ Modulates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture by Directly Repressing Transcription of the *psl* Operon. J. Bacteriol. 195, 1637–1644. doi:10.1128/JB.02190-12

Joo, H.-S., Otto, M., 2012. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chem. Biol. 19, 1503–1513. doi:10.1016/j.chembiol.2012.10.022

Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J., 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. J. Bacteriol. 177, 3998–4008.

Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W., Horswill, A.R., 2012. Low Levels of β-Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus.* mBio 3. doi:10.1128/mBio.00198-12

Khalifa, A.B.H., Moissenet, D., Thien, H.V., Khedher, M., 2011. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. Ann. Biol. Clin. (Paris) 69, 393–403. doi:10.1684/abc.2011.0589

King, J.D., Kocíncová, D., Westman, E.L., Lam, J.S., 2009. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Innate Immun. 15, 261–312. doi:10.1177/1753425909106436

Kingston, A.W., Subramanian, C., Rock, C.O., Helmann, J.D., 2011. A σW-dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity. Mol. Microbiol. 81, 69–79. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07679.x

Kivistik, P.A., Kivi, R., Kivisaar, M., Hõrak, R., 2009. Identification of ColR binding consensus and prediction of regulon of ColRS two-component system. BMC Mol. Biol. 10, 46. doi:10.1186/1471-2199-10-46

Kivistik, P.A., Putrinš, M., Püvi, K., Ilves, H., Kivisaar, M., Hõrak, R., 2006. The ColRS Two-Component System Regulates Membrane Functions and Protects *Pseudomonas putida* against Phenol. J. Bacteriol. 188, 8109–8117. doi:10.1128/JB.01262-06

Knirel, Y.A., Bystrova, O.V., Kocharova, N.A., Zähringer, U., Pier, G.B., 2006. Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Endotoxin Res. 12, 324–336. doi:10.1179/096805106X118906

Koebnik, R., 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? Trends Microbiol. 13, 343–347. doi:10.1016/j.tim.2005.06.005

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat. Rev. Microbiol. 8, 423–435. doi:10.1038/nrmicro2333

Köhler, T., Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., Pechère, J.C., 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 23, 345–354.

Kondakova, T., D'Heygère, F., Feuilloley, M.J., Orange, N., Heipieper, H.J., Duclairoir Poc, C., 2015. Glycerophospholipid synthesis and functions in *Pseudomonas*. Chem. Phys. Lipids 190, 27–42. doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.06.006

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven Hill, D., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M., Peterson, K.M., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166, 175–176. doi:10.1016/0378-1119(95)00584-1

Kovacs-Simon, A., Titball, R.W., Michell, S.L., 2011. Lipoproteins of Bacterial Pathogens. Infect. Immun. 79, 548–561. doi:10.1128/IAI.00682-10

Krahn, T., Gilmour, C., Tilak, J., Fraud, S., Kerr, N., Lau, C.H.-F., Poole, K., 2012. Determinants of Intrinsic Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 5591–5602. doi:10.1128/AAC.01446-12

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6. doi:10.1101/cshperspect.a027029

Kreamer, N.N., Costa, F., Newman, D.K., 2015. The ferrous iron-responsive BqsRS two-component system activates genes that promote cationic stress tolerance. mBio 6, e02549. doi:10.1128/mBio.02549-14

Kulkarni, H.M., Jagannadham, M.V., 2014. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. Microbiol. Read. Engl. 160, 2109–2121. doi:10.1099/mic.0.079400-0

Kumar, A., Ting, Y.-P., 2016. Streptomycin favors biofilm formation by altering cell surface properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 8843–8853. doi:10.1007/s00253-016-7793-0

Kwon, D.H., Lu, C.-D., 2006. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1615–1622. doi:10.1128/AAC.50.5.1615-1622.2006

Lau, C.H.-F., Fraud, S., Jones, M., Peterson, S.N., Poole, K., 2013. Mutational Activation of the AmgRS Two-Component System in Aminoglycoside-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2243–2251. doi:10.1128/AAC.00170-13

Lau, C.H.-F., Krahn, T., Gilmour, C., Mullen, E., Poole, K., 2015. AmgRS-mediated envelope stress-inducible expression of the *mexXY* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. MicrobiologyOpen 4, 121–135. doi:10.1002/mbo3.226

Lee, A.G., 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Lipid-Protein Interactions 1666, 62–87. doi:10.1016/j.bbamem.2004.05.012

Lee, A.G., 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. Biochim. Biophys. Acta 1612, 1–40.

Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., Zhang, L.-H., 2013. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. Nat. Chem. Biol. 9, 339–343. doi:10.1038/nchembio.1225

Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell 6, 26–41. doi:10.1007/s13238-014-0100-x

Lee, S., Hinz, A., Bauerle, E., Angermeyer, A., Juhaszova, K., Kaneko, Y., Singh, P.K., Manoil, C., 2009. Targeting a bacterial stress response to enhance antibiotic action. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 14570–14575. doi:10.1073/pnas.0903619106

Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S., 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. Mol. Microbiol. 65, 1474–1484. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x

Lewenza, S., Gardy, J.L., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W., 2005. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* exported proteins using a consensus computational strategy combined with a laboratory-based PhoA fusion screen. Genome Res. 15, 321–329. doi:10.1101/gr.3257305

Lewenza, S., 2013. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. Front. Microbiol. 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00021

Li, R., Withers, R.T., Dai, J., Ruan, J., Li, W., Dai, Y., An, W., Yu, D., Wei, H., Xia, M., Tian, C., Yu, H.D., Qiu, D., 2016. Truncated type IV pilin PilA(108) activates the intramembrane protease AlgW to cleave MucA and PilA(108) itself in vitro. Arch. Microbiol. doi:10.1007/s00203-016-1248-y

Li, X.Z., Nikaido, H., Poole, K., 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1948–1953.

Li, X.-Z., Plésiat, P., Nikaido, H., 2015. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 28, 337–418. doi:10.1128/CMR.00117-14

Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K., Frankenberg-Dinkel, N., 2013. NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. J. Bacteriol. 195, 3531–3542. doi:10.1128/JB.01156-12

Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., Martinez, J.L., 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 19484–19489. doi:10.1073/pnas.0608949103

Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., Lamont, I.L., 2014. Cell-surface signaling in Pseudomonas: stress responses, iron transport, and pathogenicity. FEMS Microbiol. Rev. 38, 569–597. doi:10.1111/1574-6976.12078

Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Ratledge, C., Bitter, W., 2008. Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. Mol. Microbiol. 67, 458–472. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06061.x

Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., Buttner, M.J., 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 7573–7577.

Los, D.A., Murata, N., 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Lipid-Protein Interactions 1666, 142–157. doi:10.1016/j.bbamem.2004.08.002

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. PLoS Pathog. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000354

Macdonald, I.A., Kuehn, M.J., 2013. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 195, 2971–2981. doi:10.1128/JB.02267-12

Macfarlane, E.L.A., Kwasnicka, A., Ochs, M.M., Hancock, R.E.W., 1999. PhoP–PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. Mol. Microbiol. 34, 305–316. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01600.x

Magro, M., Fasolato, L., Bonaiuto, E., Andreani, N.A., Baratella, D., Corraducci, V., Miotto, G., Cardazzo, B., Vianello, F., 2016. Enlightening mineral iron sensing in *Pseudomonas fluorescens* by surface active maghemite nanoparticles: Involvement of the OprF porin. Biochim. Biophys. Acta. doi:10.1016/j.bbagen.2016.05.007

Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature 426, 306–310. doi:10.1038/nature02122

Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., de Mendoza, D., 2004. Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors. J. Bacteriol. 186, 6681–6688. doi:10.1128/JB.186.20.6681-6688.2004

Martin, D.W., Holloway, B.W., Deretic, V., 1993. Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor. J. Bacteriol. 175, 1153–1164.

Mascher, T., Helmann, J.D., Unden, G., 2006. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 910–938. doi:10.1128/MMBR.00020-06

Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K., Whiteley, M., 2008. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. Mol. Microbiol. 69, 491–502.

Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P.W., Campbell, J.I., Jensen, P., Johnsen, A.H., Givskov, M., Ohman, D.E., Molin, S., Høiby, N., Kharazmi, A., 1999. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. Microbiol. Read. Engl. 145 (Pt 6), 1349–1357. doi:10.1099/13500872-145-6-1349

McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W., 2006. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg2+-Induced Gene Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 188, 3995–4006. doi:10.1128/JB.00053-06

McPhee, J.B., Lewenza, S., Hancock, R.E.W., 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 50, 205–217. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x

Miller, A.K., Brannon, M.K., Stevens, L., Johansen, H.K., Selgrade, S.E., Miller, S.I., Høiby, N., Moskowitz, S.M., 2011. PhoQ Mutations Promote Lipid A Modification and Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Found in Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients▽. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 5761–5769. doi:10.1128/AAC.05391-11

Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., Schweizer, H.P., 2007. Identification and Characterization of TriABC-OpmH, a Triclosan Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Requiring Two Membrane Fusion Proteins. J. Bacteriol. 189, 7600–7609. doi:10.1128/JB.00850-07

Mima, T., Kohira, N., Li, Y., Sekiya, H., Ogawa, W., Kuroda, T., Tsuchiya, T., 2009. Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Read. Engl. 155, 3509–3517. doi:10.1099/mic.0.031260-0

Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T., 2005. Gene Cloning and Properties of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Immunol. 49, 999–1002. doi:10.1111/j.1348-0421.2005.tb03696.x

Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., Schlesinger, L.S., Wozniak, D.J., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. Cell. Microbiol. 14, 95–106. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01704.x

Mishra, M., Ressler, A., Schlesinger, L.S., Wozniak, D.J., 2015. Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 83, 3006–3014. doi:10.1128/IAI.00081-15

Mittal, R., Grati, M., Yan, D., Liu, X.Z., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* Activates PKC-Alpha to Invade Middle Ear Epithelial Cells. Front. Microbiol. 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00255

Mittal, R., Grati, M. 'hamed, Gerring, R., Blackwelder, P., Yan, D., Li, J.-D., Liu, X.Z., 2014. In vitro interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with human middle ear epithelial cells. PloS One 9, e91885. doi:10.1371/journal.pone.0091885

Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S.-H., Hassett, D.J., Sauer, K., 2006. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 188, 7335–7343. doi:10.1128/JB.00599-06

Moscoso, J.A., 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. Environ. Microbiol. 13, 3128–3138. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x

Moskowitz, S.M., Ernst, R.K., Miller, S.I., 2004. PmrAB, a Two-Component Regulatory System of *Pseudomonas aeruginosa* That Modulates Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and Addition of Aminoarabinose to Lipid A. J. Bacteriol. 186, 575–579. doi:10.1128/JB.186.2.575-579.2004

Moya, B., Dötsch, A., Juan, C., Blázquez, J., Zamorano, L., Haussler, S., Oliver, A., 2009. β-Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. PLoS Pathog. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000353

Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S., 2008. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS Pathog. 4. doi:10.1371/journal.ppat.1000213

Mulcahy, H., Lewenza, S., 2011. Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. PloS One 6, e23307. doi:10.1371/journal.pone.0023307

Muller, C., Plésiat, P., Jeannot, K., 2011. A Two-Component Regulatory System Interconnects Resistance to Polymyxins, Aminoglycosides, Fluoroquinolones, and β-Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 1211–1221. doi:10.1128/AAC.01252-10

Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W.J., 2012. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 76, 46–65. doi:10.1128/MMBR.05007-11

Navare, A.T., Chavez, J.D., Zheng, C., Weisbrod, C.R., Eng, J.K., Siehnel, R., Singh, P.K., Manoil, C., Bruce, J.E., 2015. Probing the protein interaction network of *Pseudomonas aeruginosa* cells by chemical cross-linking mass spectrometry. Struct. Lond. Engl. 1993 23, 762–773. doi:10.1016/j.str.2015.01.022

Nestorovich, E.M., Sugawara, E., Nikaido, H., Bezrukov, S.M., 2006. *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprF: Properties of the Channel. J. Biol. Chem. 281, 16230–16237. doi:10.1074/jbc.M600650200

Nishijyo, T., Haas, D., Itoh, Y., 2001. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 40, 917–931.

Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., Buchanan, S.K., 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. Annu. Rev. Microbiol. 64, 43–60. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134247

Nowicki, E.M., O'Brien, J.P., Brodbelt, J.S., Trent, M.S., 2015. Extracellular zinc induces phosphoethanolamine addition to *Pseudomonas aeruginosa* lipid A via the ColRS two-component system. Mol. Microbiol. 97, 166–178. doi:10.1111/mmi.13018

O'Connor, J.R., Kuwada, N.J., Huangyutitham, V., Wiggins, P.A., Harwood, C.S., 2012. Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. Mol. Microbiol. 86, 720–729. doi:10.1111/mmi.12013

Oglesby, L.L., Jain, S., Ohman, D.E., 2008. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. Microbiol. Read. Engl. 154, 1605–1615. doi:10.1099/mic.0.2007/015305-0

Overhage, J., Schemionek, M., Webb, J.S., Rehm, B.H.A., 2005. Expression of the psl Operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms: PslA Performs an Essential Function in Biofilm Formation. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4407–4413. doi:10.1128/AEM.71.8.4407-4413.2005

Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T., 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 189, 2531–2539. doi:10.1128/JB.01515-06

Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., Hecker, M., 2006. The sigmaB regulon in Staphylococcus aureus and its regulation. Int. J. Med. Microbiol. IJMM 296, 237–258. doi:10.1016/j.ijmm.2005.11.011

Parsek, M.R., Singh, P.K., 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. 57, 677–701. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090720

Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.-L., Köhler, T., 2004. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 279, 8761–8768. doi:10.1074/jbc.M312080200

Petrova, O.E., Cherny, K.E., Sauer, K., 2015. The Diguanylate Cyclase GcbA Facilitates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Dispersion by Activating BdlA. J. Bacteriol. 197, 174–187. doi:10.1128/JB.02244-14

Petrova, O.E., Sauer, K., 2012. Dispersion by *Pseudomonas aeruginosa* requires an unusual posttranslational modification of BdlA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 16690–16695. doi:10.1073/pnas.1207832109

Petrova, O.E., Sauer, K., 2010. The Novel Two-Component Regulatory System BfiSR Regulates Biofilm Development by Controlling the Small RNA *rsmZ* through CafA. J. Bacteriol. 192, 5275–5288. doi:10.1128/JB.00387-10

Pfeifer, Y., Cullik, A., Witte, W., 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int. J. Med. Microbiol. IJMM 300, 371–379. doi:10.1016/j.ijmm.2010.04.005

Pier, G.B., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. Int. J. Med.

Microbiol., Special issue: Lipopolysaccharide 297, 277–295. doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.012

Pilot, J.D., East, J.M., Lee, A.G., 2001. Effects of Bilayer Thickness on the Activity of Diacylglycerol Kinase of *Escherichia coli*. Biochemistry (Mosc.) 40, 8188–8195. doi:10.1021/bi0103258

Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X.Z., Nishino, T., 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 21, 713–724.

Pultz, I.S., Christen, M., Don Kulasekara, H., Kennard, A., Kulasekara, B., Miller, S.I., 2012. The response threshold of Salmonella PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. Mol. Microbiol. 86, 1424–1440. doi:10.1111/mmi.12066

Purssell, A., Fruci, M., Mikalauskas, A., Gilmour, C., Poole, K., 2015. EsrC, an envelope stress-regulated repressor of the *mexCD-oprJ* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 17, 186–198. doi:10.1111/1462-2920.12602

Qiu, D., Eisinger, V.M., Head, N.E., Pier, G.B., Yu, H.D., 2008. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Read. Engl. 154, 2119–2130. doi:10.1099/mic.0.2008/017368-0

Qiu, D., Eisinger, V.M., Rowen, D.W., Yu, H.D., 2007. Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 8107–8112. doi:10.1073/pnas.0702660104

Quinn, P.J., Chapman, D., 1980. The dynamics of membrane structure. CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 1–117.

Ramachandran, G., 2014. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. Virulence 5, 213–218. doi:10.4161/viru.27024

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M., 2015. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. BioMed Res. Int. 2015. doi:10.1155/2015/759348

Rawling, E.G., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W., 1998. Roles of the Carboxy-Terminal Half of *Pseudomonas aeruginosa* Major Outer Membrane Protein

OprF in Cell Shape, Growth in Low-Osmolarity Medium, and Peptidoglycan Association. J. Bacteriol. 180, 3556–3562.

Rebière-Huët, J., Guérillon, J., Pimenta, A.L., Martino, P.D., Orange, N., Hulen, C., 2002. Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin-binding proteins. FEMS Microbiol. Lett. 215, 121–126. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11380.x

Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J., Cornelis, P., 2010. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 156, 2597–2607. doi:10.1099/mic.0.040659-0

Reva, O.N., Weinel, C., Weinel, M., Böhm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J.D., Tümmler, B., 2006. Functional Genomics of Stress Response in *Pseudomonas putida* KT2440. J. Bacteriol. 188, 4079–4092. doi:10.1128/JB.00101-06

Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2. doi:10.1101/cshperspect.a012427

Ryan, R.P., Dow, J.M., 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. Microbiol. Read. Engl. 154, 1845–1858. doi:10.1099/mic.0.2008/017871-0

Rybtke, M., Berthelsen, J., Yang, L., Høiby, N., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2015a. The LapG protein plays a role in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by controlling the presence of the CdrA adhesin on the cell surface. MicrobiologyOpen 4, 917–930. doi:10.1002/mbo3.301

Rybtke, M., Hultqvist, L.D., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2015b. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. J. Mol. Biol. 427, 3628–3645. doi:10.1016/j.jmb.2015.08.016

Rybtke, M.T., Borlee, B.R., Murakami, K., Irie, Y., Hentzer, M., Nielsen, T.E., Givskov, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., 2012. Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5060–5069. doi:10.1128/AEM.00414-12

Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D.J., 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr. Opin. Microbiol. 10, 644–648. doi:10.1016/j.mib.2007.09.010

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, K., Filloux, A., 2010. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB*

gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated beta-(1->3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology 20, 895–904. doi:10.1093/glycob/cwq047

Sakuragi, Y., Kolter, R., 2007. Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 189, 5383–5386. doi:10.1128/JB.00137-07

Schertzer, J.W., Whiteley, M., 2012. A Bilayer-Couple Model of Bacterial Outer Membrane Vesicle Biogenesis. mBio 3. doi:10.1128/mBio.00297-11

Schmidt, A., Hammerbacher, A.S., Bastian, M., Nieken, K.J., Klockgether, J., Merighi, M., Lapouge, K., Poschgan, C., Kölle, J., Acharya, K.R., Ulrich, M., Tümmler, B., Unden, G., Kaever, V., Lory, S., Haas, D., Schwarz, S., Döring, G., 2016. Oxygen-dependent regulation of c-di-GMP synthesis by SadC controls alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 18, 3390–3402. doi:10.1111/1462-2920.13208

Schnider-Keel, U., Lejbølle, K.B., Baehler, E., Haas, D., Keel, C., 2001. The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5683–5693. doi:10.1128/AEM.67.12.5683-5693.2001

Schooling, S.R., Beveridge, T.J., 2006. Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms. J. Bacteriol. 188, 5945–5957. doi:10.1128/JB.00257-06

Schooling, S.R., Hubley, A., Beveridge, T.J., 2009. Interactions of DNA with Biofilm-Derived Membrane Vesicles. J. Bacteriol. 191, 4097–4102. doi:10.1128/JB.00717-08

Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., Hornischer, K., Bruchmann, S., Düvel, J., Häussler, S., 2015. Elucidation of Sigma Factor-Associated Networks in *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Modular Architecture with Limited and Function-Specific Crosstalk. PLoS Pathog. 11. doi:10.1371/journal.ppat.1004744

Schurr, M.J., Deretic, V., 1997. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: co-ordinate regulation of heat-shock response and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 24, 411–420.

Schurr, M.J., Yu, H., Boucher, J.C., Hibler, N.S., Deretic, V., 1995. Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (sigma E) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 177, 5670–5679.

Schwechheimer, C., Kuehn, M.J., 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nat. Rev. Microbiol. 13, 605–619. doi:10.1038/nrmicro3525

Scoffield, J., Silo-Suh, L., 2016. Glycerol metabolism promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 62, 704–710. doi:10.1139/cjm-2016-0119

Serra, D.O., Hengge, R., 2014. Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. Environ. Microbiol. 16, 1455–1471. doi:10.1111/1462-2920.12483

Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., Mann, M., 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 14440–14445.

Shivaji, S., Prakash, J.S.S., 2010. How do bacteria sense and respond to low temperature? Arch. Microbiol. 192, 85–95. doi:10.1007/s00203-009-0539-y

Siehnel, R.J., Egli, C., Hancock, R.E., 1992. Polyphosphate-selective porin OprO of *Pseudomonas aeruginosa*: expression, purification and sequence. Mol. Microbiol. 6, 2319–2326.

Smith, R.S., Wolfgang, M.C., Lory, S., 2004. An Adenylate Cyclase-Controlled Signaling Network Regulates *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in a Mouse Model of Acute Pneumonia. Infect. Immun. 72, 1677–1684. doi:10.1128/IAI.72.3.1677-1684.2004

Sobel, M.L., Neshat, S., Poole, K., 2005. Mutations in PA2491 (mexS) promote MexT-dependent mexEF-oprN expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 187, 1246–1253. doi:10.1128/JB.187.4.1246-1253.2005

Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E.P., Bläsi, U., 2006. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum

sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 59, 1542–1558. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05032.x

Spangler, C., Böhm, A., Jenal, U., Seifert, R., Kaever, V., 2010. A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. J. Microbiol. Methods 81, 226–231. doi:10.1016/j.mimet.2010.03.020

Spoering, A.L., Gilmore, M.S., 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Curr. Opin. Microbiol. 9, 133–137. doi:10.1016/j.mib.2006.02.004

Sriramulu, D.D., Lünsdorf, H., Lam, J.S., Römling, U., 2005. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. J. Med. Microbiol. 54, 667–676. doi:10.1099/jmm.0.45969-0

Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., Mascher, T., 2009. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. Mol. Microbiol. 74, 557–581. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06870.x

Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 6, 199–210. doi:10.1038/nrmicro1838

Stewart, P.S., Franklin, M.J., Williamson, K.S., Folsom, J.P., Boegli, L., James, G.A., 2015. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 3838–3847. doi:10.1128/AAC.00433-15

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959–964. doi:10.1038/35023079

Strehmel, J., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Brenner-Weiss, G., Overhage, J., 2015. Sensor kinase PA4398 modulates swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Appl. Environ. Microbiol. 81, 1274–1285. doi:10.1128/AEM.02832-14

Sugawara, E., Nestorovich, E.M., Bezrukov, S.M., Nikaido, H., 2006. *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprF Exists in Two Different Conformations. J. Biol. Chem. 281, 16220–16229. doi:10.1074/jbc.M600680200

Tamber, S., Ochs, M.M., Hancock, R.E.W., 2006. Role of the Novel OprD Family of Porins in Nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 188, 45–54. doi:10.1128/JB.188.1.45-54.2006

Tiddens, H.A.W.M., Bos, A.C., Mouton, J.W., Devadason, S., Janssens, H.M., 2014. Inhaled antibiotics: dry or wet? Eur. Respir. J. 44, 1308–1318. doi:10.1183/09031936.00090314

Townsley, L., Yildiz, F.H., 2015. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in Vibrio cholerae. Environ. Microbiol. 17, 4290–4305. doi:10.1111/1462-2920.12799

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N., 2015. Environmental factors that shape biofilm formation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80, 7–12. doi:10.1080/09168451.2015.1058701

Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., Eberl, L., 2012. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. J. Proteome Res. 11, 4906–4915. doi:10.1021/pr300395j

Tsitsopoulos, P.P., Iosifidis, E., Antachopoulos, C., Anestis, D.M., Karantani, E., Karyoti, A., Papaevangelou, G., Kyriazidis, E., Roilides, E., Tsonidis, C., 2016. Nosocomial bloodstream infections in neurosurgery: a 10-year analysis in a center with high antimicrobial drug-resistance prevalence. Acta Neurochir. (Wien) 158, 1647–1654. doi:10.1007/s00701-016-2890-5

Turner, K.H., Wessel, A.K., Palmer, G.C., Murray, J.L., Whiteley, M., 2015. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 4110–4115. doi:10.1073/pnas.1419677112

Uratani, Y., Wakayama, N., Hoshino, T., 1987. Effect of lipid acyl chain length on activity of sodium-dependent leucine transport system in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 262, 16914–16919.

Valentini, M., Laventie, B.-J., Moscoso, J., Jenal, U., Filloux, A., 2016. The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility. PLoS Genet. 12, e1006354. doi:10.1371/journal.pgen.1006354

Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S., Filloux, A., 2005. The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. Microbiol. Read. Engl. 151, 985–997. doi:10.1099/mic.0.27410-0

Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol. Rev. 32, 149–167. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x

Wałaszek, M., Kosiarska, A., Gniadek, A., Kołpa, M., Wolak, Z., Dobroś, W., Siadek, J., 2016. The risk factors for hospital-acquired pneumonia in the Intensive Care Unit. Przegląd Epidemiol. 70, 15–20, 107–110.

Wang, D., Seeve, C., Pierson, L.S., Pierson, E.A., 2013. Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Genomics 14, 618. doi:10.1186/1471-2164-14-618

Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhang, L., Guo, Y., Yu, S., Wozniak, D.J., Ma, L.Z., 2015. The exopolysaccharide Psl–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. Rep. 7, 330–340. doi:10.1111/1758-2229.12252

Wang, Y., Hay, I.D., Rehman, Z.U., Rehm, B.H.A., 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 7253–7265. doi:10.1007/s00253-015-6591-4

Webber, M.A., Piddock, L.J.V., 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother. 51, 9–11. doi:10.1093/jac/dkg050

Wei, Q., Ma, L.Z., 2013. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. 14, 20983–21005. doi:10.3390/ijms141020983

West, S.E., Sample, A.K., Runyen-Janecky, L.J., 1994. The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. J. Bacteriol. 176, 7532–7542.

Whitney, J.C., Colvin, K.M., Marmont, L.S., Robinson, H., Parsek, M.R., Howell, P.L., 2012. Structure of the Cytoplasmic Region of PelD, a Degenerate Diguanylate Cyclase Receptor That Regulates Exopolysaccharide Production in

Pseudomonas aeruginosa. J. Biol. Chem. 287, 23582–23593. doi:10.1074/jbc.M112.375378

Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S., Schumann, W., 2001. Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon. Mol. Microbiol. 41, 59–71.

Wilson, D.N., 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. Nat. Rev. Microbiol. 12, 35–48. doi:10.1038/nrmicro3155

Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., Lewenza, S., 2015. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 544–553. doi:10.1128/AAC.01650-15

Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., Lory, S., 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. Dev. Cell 4, 253–263.

Wolska, K.I., Grudniak, A.M., Rudnicka, Z., Markowska, K., 2016a. Genetic control of bacterial biofilms. J. Appl. Genet. 57, 225–238. doi:10.1007/s13353-015-0309-2

Wolska, K.I., Grudniak, A.M., Rudnicka, Z., Markowska, K., 2016b. Genetic control of bacterial biofilms. J. Appl. Genet. 57, 225–238. doi:10.1007/s13353-015-0309-2

Wood, L.F., Leech, A.J., Ohman, D.E., 2006. Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. Mol. Microbiol. 62, 412–426. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05390.x

Wood, L.F., Ohman, D.E., 2012. Identification of genes in the σ^{22} regulon of *Pseudomonas aeruginosa* required for cell envelope homeostasis in either the planktonic or the sessile mode of growth. mBio 3. doi:10.1128/mBio.00094-12

Wood, L.F., Ohman, D.E., 2009. Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 72, 183–201. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06635.x

Woodruff, W.A., Hancock, R.E., 1989. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. J. Bacteriol. 171, 3304–3309.

Woodruff, W.A., Hancock, R.E., 1988. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after in vitro and in vivo insertion mutagenesis of the cloned gene. J. Bacteriol. 170, 2592–2598.

Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A., Parsek, M.R., 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 7907–7912. doi:10.1073/pnas.1231792100

Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J.E., Patel, N., Musch, M.W., Chang, E.B., Fu, Y.-X., Jacobs, M.A., Nishimura, M.I., Hancock, R.E.W., Turner, J.R., Alverdy, J.C., 2005. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. Science 309, 774–777. doi:10.1126/science.1112422

Wu, X., Held, K., Zheng, C., Staudinger, B.J., Chavez, J.D., Weisbrod, C.R., Eng, J.K., Singh, P.K., Manoil, C., Bruce, J.E., 2015. Dynamic Proteome Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Tobramycin Antibiotic Treatment. Mol. Cell. Proteomics MCP 14, 2126–2137. doi:10.1074/mcp.M115.050161

Yoon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Allen, H.L., DeKievit, T.R., Gardner, P.R., Schwab, U., Rowe, J.J., Iglewski, B.H., McDermott, T.R., Mason, R.P., Wozniak, D.J., Hancock, R.E.W., Parsek, M.R., Noah, T.L., Boucher, R.C., Hassett, D.J., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis. Dev. Cell 3, 593–603. doi:10.1016/S1534-5807(02)00295-2

Yu, H., Schurr, M.J., Deretic, V., 1995. Functional equivalence of *Escherichia coli* sigma E and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: E. coli *rpoE* restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants of P. aeruginosa. J. Bacteriol. 177, 3259–3268.

Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Mulet, X., Blázquez, J., Oliver, A., 2014. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC Two-Component System Plays a Major Role in the Response to β-Lactams, Fitness, Biofilm Growth, and Global Regulation. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 5084–5095. doi:10.1128/AAC.02556-14

Zeng, X., Lin, J., 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Front. Microbiol. 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00128

Zhang, L., Fritsch, M., Hammond, L., Landreville, R., Slatculescu, C., Colavita, A., Mah, T.-F., 2013. Identification of Genes Involved in *Pseudomonas aeruginosa*

Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. PLoS ONE 8. doi:10.1371/journal.pone.0061625

Zhu, K., Choi, K.-H., Schweizer, H.P., Rock, C.O., Zhang, Y.-M., 2006. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 60, 260–273. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05088.x

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste de l'Homme responsable de nombreuses infections des voies pulmonaires et urinaires chez des patients immunodéprimés. Largement étudié pour son implication dans la sévérité des symptômes liés à la mucoviscidose, le « bacille pyocyanique » constitue un enjeu majeur en termes de sécurité sanitaire puisqu'il représente après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* la 3ème cause d'infections nosocomiales en France (*INVS*, Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales en France, 2012). La persistance de *P. aeruginosa* notamment dans le cadre médical, est largement due à sa grande capacité à s'adapter et à se développer en communauté organisée au sein de biofilm. Le génome de *P. aeruginosa* contient de nombreux gènes codant des systèmes de régulation dont la majorité est impliquée dans des mécanismes de perception-transduction de signaux, conférant à la bactérie son fort pouvoir d'adaptation. Parmi ces systèmes, les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF), des sous unités transitoires de l'ARN polymérase, jouent un rôle fondamental dans la résistance et l'adaptation aux stress. SigX est un facteur sigma ECF, impliqué dans la virulence et la formation de biofilms, ainsi que dans la production des acides gras à courte chaine.

Au cours de cette étude, les fonctions cellulaires de SigX ont été précisées, Nous avons montré que SigX joue un rôle important dans la composition, la fluidité et la perméabilité membranaires, et par conséquent dans le métabolisme de la cellule. L'activation de SigX en réponse à des conditions entrainant un stress de l'enveloppe, telles que la perte de la porine majoritaire OprF, la présence d'une concentration de sucrose dans le milieu de culture ou d'une concentration sub-inhibitrice de tobramycine, suggère que cet ECF, comme AlgU, pourrait appartenir à la classe des ECF de type RpoE. De manière remarquable, certaines altérations de l'enveloppe pourraient induire la formation de biofilm, un phénotype impliquant au moins partiellement SigX. Il conviendra à présent de caractériser les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation de SigX et de préciser le rôle de ce facteur sigma dans la formation de biofilm.

Mots clés : SigX, stress de l'enveloppe, Facteurs sigma ECF, Biofilm, *P. aeruginosa*

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a major opportunistic pathogen causing many infectious diseases in immunocompromised patients. Widely studied because of its involvement in lung infections of cystic fibrosis suffering patients, this bacterium is a major public health challenge. *P. aeruginosa* persistence is largely due to its ability to adopt a multicellular lifestyle called biofilm. *P. aeruginosa* genome encodes numerous genes predicted to be involved in signal transduction allowing this bacterium to adapt to many environments. Among these systems, the extracytoplasmic function sigma factors, which are transitory subunits of the RNA polymerase, are of major importance for stress resistance and adaptation. SigX is an ECF sigma factor that has been involved in virulence, biofilm formation and in short chain fatty acids biosynthesis.

This work led to precise the cellular functions of SigX. We have shown that SigX is of major importance for membrane homeostasis, including composition, fluidity and permeability. As a consequence, SigX was shown to be involved in *P. aeruginosa* metabolism. SigX activity is enhanced in conditions leading to a cell wall stress, as the lack of the major outer membrane porin OprF, high concentrations of sucrose or sublethal concentration of tobramycin, suggesting that this ECF, as AlgU, is a new cell wall stress responsive sigma factor. Remarkably,some alterations could induce biofilm formation, a phenotype involving at least partially SigX. The molecular mechanisms leading to SigX activity should now be deciphered and the role of this ECF in biofilm formation should be precised.

Keywords: SigX, cell wall stress, ECF sigma factors, Biofilm, *P. aeruginosa*