



HAL
open science

Contribution à l'étude du système BAC "Biofilm Associated Cluster" chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Brahim Saffiedine

► To cite this version:

Brahim Saffiedine. Contribution à l'étude du système BAC "Biofilm Associated Cluster" chez *Pseudomonas aeruginosa*.. Chimie thérapeutique. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR018 . tel-02272748

HAL Id: tel-02272748

<https://theses.hal.science/tel-02272748v1>

Submitted on 28 Aug 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie (ED 508)
(Université de Rouen-Normandie)

Contribution à l'étude du système BAC « Biofilm Associated Cluster » chez *Pseudomonas aeruginosa*

Présentée et soutenue par
Brahim Saffiedine

Thèse soutenue publiquement le 03 Juillet 2019
devant le jury composé de

Mme Katy JEANNOT	Maître de conférences, Université de Franche Comté	Rapporteur
Mr Bertrand TOUSSAINT	Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes	Rapporteur
Mme Sylvie CHEVALIER-LAURENCY	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Examineur
Mr Damien SEYER	Maître de conférences, Université de Cergy Pontoise	Examineur
Mr Pascal COSETTE	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mr Thierry JOUENNE	Directeur de Recherche CNRS, Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Pascal COSETTE et Thierry JOUENNE,
Laboratoire « Polymères Biopolymères Surface », UMR 6270 CNRS,
Equipe « Biofilm Résistances Interactions Cellules Surfaces »

Remerciements

A mon grand-père Ibrahim Younes Saffiedine,

Merci de m'avoir transmis tes valeurs humanistes, tes idées, ta force, tes passions, ton histoire. C'est en grande partie grâce à toi que j'avance dans la vie et que je continuerai à me battre pour des causes justes.

Tu n'es plus là aujourd'hui, mais ton souvenir reste bien vivant dans mon cœur et dans ma vie. Tu as toujours été mon modèle, mon héros, et tu le resteras.

A mes parents,

Du plus loin que je me souviens, mes souvenirs à vos côtés ont toujours été heureux, joyeux, plein de rires, de tendresses et d'émotions également. Cette ambiance familiale si réconfortante, si rassurante, a rythmé ma vie.

Si j'en suis là aujourd'hui, si je suis l'adulte que je suis devenu, c'est grâce à vous. À votre générosité, votre aide, votre tendresse, votre amour. Votre regard bienveillant sur moi m'a aidé à pousser droit, à grandir comme il faut, bien enraciné dans le sol mais la tête en hauteur, pleine de rêves à réaliser.

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement le Docteur **Katy JEANNOT**, du CHRU de Besançon, et au Professeur **Bertrand TOUSSAINT** de l'Université de Grenoble Alpes, d'avoir accepté de juger ces travaux de thèse et d'en être rapporteurs. Je remercie également le Professeur **Sylvie CHEVALIER-LAURENCY** de l'Université de Rouen Normandie et le Docteur **Damien Seyer** de l'Université de Cergy Pontoise, d'être examinateurs. Je suis très reconnaissant de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail. C'est un honneur de vous compter parmi les membres de jury de cette thèse.

Je remercie également le Docteur Thierry JOUENNE et le Professeur Didier LE CERF, directeur et directeur adjoint du laboratoire PBS, de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour réaliser ces travaux.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse Pascal COSETTE d'avoir retenu ma candidature, pour m'avoir encadré durant ces trois années, pour ta disponibilité au quotidien, pour nos discussions scientifiques chaleureuses, pour m'avoir transmis ta rigueur et ta passion pour la recherche et pour m'avoir formé aux fonctions du métier de chercheur.

J'exprime mon amitié à toutes les personnes, collègues et ami(e)s, que j'ai rencontrés durant ces années passées au laboratoire. Je remercie tous les membres du laboratoire PBS et en particulier les permanents de l'équipe BRICS: Julie, Stéphane, Christophe, Pascal, Bertrand, Valérie, Laurent, Annick, Emmanuelle. Sans oublier les thésards: Charlotte G, Charlotte R, Estelle, Yushen, Brandon et LE post-doc Sébastien.

Mes profonds remerciements à la **team PC** (Amine, Clément et Clémence) qui par son dynamisme et son enthousiasme a su chasser les doutes que j'ai pu connaître au cours de ces années et m'ont permis de m'épanouir au sein du laboratoire. Merci d'avoir été là au quotidien « guys », je ne vous oublierai jamais !

Comme il ne m'est pas possible de citer toutes les personnes qui ont directement ou indirectement contribué à la réalisation de ce travail, je me permets de lancer un remerciement général à toutes celles et ceux qui se reconnaîtront dans ces lignes.

Enfin, je remercie la région Haute-Normandie et l'institut de recherche et d'innovation en biomédecine (IRIB) pour leur financement de ces trois années de thèse.

Table des matières

Listes des abréviations	1
Listes des Figures.....	3
Listes des Tableaux.....	6
Revue Bibliographique	7
I- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
I.1-Historique et taxonomie	8
I.2-Caractéristiques microbiologiques	8
I.3-Caractéristiques génomiques.....	9
I.4-Habitat	11
I.5-Les infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
II- Mode de vie sessile: biofilm	12
II.1-Adhésion à la surface bactérienne.....	13
II.2-Maturation du biofilm.....	14
II.3-La dispersion.....	14
II.4-Physiologie du biofilm.....	15
III- Résistance aux antibiotiques	17
III.1-Résistance intrinsèque	19
III.2-Résistance acquise	22
III.3-Résistance adaptative.....	22
III.4-La multi-résistance des biofilms aux antibiotiques.....	23
IV- Les facteurs de virulence.....	25
IV.1-Les facteurs de virulence membranaires	26
IV.2-Les facteurs de virulence extracellulaires.....	31
IV.3-Les facteurs de virulence associés au biofilm	38
V- Les systèmes de sécrétion chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
V.1-Système de sécrétion de type 1	41
V.2-Système de sécrétion de type 3	42
V.3-Système de sécrétion de type 6.....	42
V.4-Système de sécrétion de type 2.....	44
V.5-Système de sécrétion de type 5	45
VI- Régulation de la virulence.....	48
VI.1-Le Quorum sensing	48
VI.2-Systèmes de régulation à 2 composants	52
VI.3-Cell-surface signaling (CSS)	56
VI.4-Signaux métaboliques et stress.....	59
VII- La protéomique: un outil d'analyse des protéines à large échelle.....	65

Table des matières

VII.1-Introduction.....	65
VII.2-Préparation de l'échantillon	65
VII.3-Préfractionnement de l'échantillon	66
VII.4-Spectrométrie de masse.....	67
VII.5-La protéomique quantitative	74
VII.6-Protéomique et étude des souches bactériennes pathogènes.....	82
Présentation du sujet	87
Matériels et méthodes	92
I- Evaluation de l'impact des mutations des gènes <i>bac</i> sur le phénotype de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93
I.1-Origine de la souche bactérienne.....	93
I.2-Verification des mutants par PCR (Polymèrese Chain Reaction).....	93
I.3-Courbe de croissance.....	95
I.4-Analyse, extraction et dosage des rhamnolipides.....	95
I.5-Test d'adhésion sur tapis cellulaire	96
I.6- Quantification de la formation de biofilm.....	97
I.7-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	98
I.8-Etude de la mobilité bactérienne	98
II- Evaluation de l'impact des mutations des gènes <i>bac</i> sur le protéome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
II.1-Culture bactérienne en mode de vie planctonique et biofilm.....	100
II.2-Extraction protéique de la fraction intracellulaire.....	100
II.3-Extraction protéique de la phase extracellulaire	101
II.4-Détermination de la concentration protéique par la méthode de Bradford	102
II.5-Analyse Shotgun.....	102
III- Etudes des protéines du système BAC et études interactomiques	106
III.1-Expression des protéines recombinantes du système BAC	106
III.2-Extraction et purification de protéines recombinantes	106
III.3-Analyse de l'expression et de la purification de protéines recombinantes	108
III.4-Etudes des interactions par titration calorimétrique (ITC)	109
Résultats.....	111
I- Evaluation de l'impact des mutations des gènes <i>bac</i> sur le phénotype de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	112
I.1-Vérification des mutants par PCR.....	112
I.2-Courbe de croissance.....	112
I.3-Analyse, extraction et dosage des rhamnolipides.....	113
I.4-Test d'adhésion sur tapis cellulaire	114
I.5-Quantification de biofilm	115
I.6-Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	116

Table des matières

I.7-Etude de la mobilité bactérienne	117
I.8-Quantification de biofilm avec ajout exogène de rhamnolipides	118
I.9-Influence des rhamnolipides sur l'efficacité des antibiotiques.....	120
I.10-Influence de l'ajout de rhamnolipides sur la mobilité bactérienne.....	122
II- Evaluation de l'impact des mutations des gènes <i>bac</i> sur le protéome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	124
II.1-Fraction intracellulaire	124
Description illustrée de la stratégie d'identification	124
Traits généraux des travaux d'identification.....	125
Evaluation de la reproductibilité des échantillons	126
Analyse par composantes principales	128
Analyse par clustering hiérarchique.....	130
Analyse protéomique différentielle de la fraction intercellulaire.....	131
Etude des protéines sous-exprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC.....	133
Etude des protéines surexprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC	134
Etude des protéines différentiellement exprimées de façon équivalente dans toutes les conditions chez l'ensemble des mutants du système BAC.....	134
II.2-Fraction intracellulaire	136
Traits généraux des travaux d'identification.....	136
Evaluation de la reproductibilité des échantillons	137
Analyse par composantes principales	138
Analyse protéomique différentielle de la fraction extracellulaire	139
Facteurs de Virulence.....	139
III- Etudes des protéines du système BAC et études interactomiques	141
III.1-Purification des protéines du système BAC	141
Purification de la protéine PA3729.....	141
Purification de la protéine PA3731	145
Purification de la protéine PA3732.....	146
II.2-Etude interactomique par titrage calorimétrique isotherme (ITC).....	148
Interaction entre les rhamnolipides et PA3731	150
Interaction entre les rhamnolipides et PA3732.....	151
Interaction entre PA3731 et PA3732	152
III.3-Cristallographie	153
Discussion générale et perspectives	156
Conclusion	166
Références bibliographique	169
Annexes	208

Listes des abréviations

5-Me-PCA : 5-methylphenazine-1-carboxylate	E2D : Electrophorèse bidimensionnelle
A. baumannii : Acinetobacter baumannii	EB : Ethidium bromide
ABC : ATP-binding cassette	ECF : Facteur sigma extracytoplasmique
ACR : Acriflavine	eDNA ADN extracellulaire
ACX : Chromatographie liquide échangeuse d'anions	EPS : Polymères extracellulaires
ADN : Acide désoxyribonucléique	ERY : Erythromycin
AG : Aminoglycosides	ESI : Ionisation électrospray
AI : Auto-Inducteurs	FAS : Factor activating exoenzyme S
AprA : Protéase alcaline	FEP : Cefepime
AQUA : Absolute QUAntification	FQ : Fluoroquinolones
ATM : Aztreonam	FT-ICR : Analyseurs par résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier
AZI : Azithromycin	GAP : GTPase Activating Protein
BHL : N-butyryl-L-homosérine lactone	HCD : High Energy Collision
BL : β -lactams	HCl : Acide chlorhydrique
BPR : Ceftobiprole	HHQ : 4-hydroxy-2-heptylquinoline
CbpD Chitin-binding protein	HILIC : chromatographie liquide à interactions hydrophiles
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator	HSL : 3-oxo-C12-Homosérine lactone
CHIR : LpxC inhibitor CHIR-090	ICAT : Isotope Coded Affinity Tag,
CHL : Chloramphenicol	ICPL : Isotope-Coded Protein Label
CHX : Chlorhexidine	ID Indoles
CMI : Concentration minimale inhibitrice	IEF : Isoélectrofocalisation
COL : Colistin	IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
CP : Carbapenems	IQS 2-(2-hydroxyphényl-thiazole-4- carbaldéhyde
CRL : Cerulenin	ITC : Isothermal Titration Calorimetry
<u>CSS</u> : Cell-surface signaling	iTRAQ : Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification
CV : Crystal violet	LB : Luria-Bertani
DA Diamide	LBM : Peptide deformylase inhibitor
DHB : Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque, : Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque	LIT Trappes ioniques
DIA : Data-Independent Aquisition	LPS : Lipopolysaccharide
DMSO : Diméthylsulfoxyde	m/z : Rapport masse/charge
DOC : Sodium DeOxyChloate monohydrate	
DTT : Dithiothréitol	
E. coli : Escherichia coli	

Liste des abréviations

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation	QS : Quorum sensing
MFP : Protéine de fusion membranaire	RC : Répression catabolique
ML : Macrolides	ROS : Espèces réactives d'oxygène
MMG : Milieu Minimum Glucosé	RP-HPLC : chromatographie liquide en phase inverse
MRM : Multiple Reaction Monitoring	RR Régulateur de réponse
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem	SA : Acide sinapinique
NBD : Nucleotide Binding Domain	SCX : Chromatographie liquide échangeuse de cations
NBTI : Bacterial type II topoisomerase inhibitor NBTI5463	SDS : Sodium dodecyl sulfate
NCD : N-chloramine derivative	SDS-PAGE : Gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate
NOV : Novobiocin	Sec : General secretory
NTA : Nickel-acide nitriloacétique	SILAC : Stable Isotope Labeling by Aminoacids in cell Culture
OMS : Organisation mondiale de la santé	SOD : Superoxydes dismutases
OPG : Glucanes périplasmiques osmorégulés	SRM : Selected Reaction Monitoring
ORFs : Cadres de lecture ouverts	SST systèmes de sécrétion
OS Solvants organiques	SUL : Sulfonamides
PA : Pseudomonas aeruginosa	SWATH : Sequential Window Acquisition of all THEoretical mass spectra
PBS : Tampon Phosphate Salin	Tat : Twin arginine translocation
PCR : Polymerase Chain Reaction	TBP : Phosphate de tributyle
PDM : Pacidamycin	TC : Tetracyclines
PeI : Pellicule	TCA : Acide Trichloracétique
PLC : Phospholipase C	TCS : Systèmes de régulation à deux composants
POTRA : Polypeptide-transport-associated	TED : Tris-carboxymethyl éthylène diamine
PP : Pseudomonas putida	TGC : Tigecycline
PQS Pseudomonas Quinolone Signal	TLM : Thiolactomycin
PRM : Parallel Reaction Monitoring	TMP : Trimethoprim
PrpL : Protéase IV	TOF : Analyseurs à temps de vol
PSAQ : Protein Standard for Absolute Quantification	TPP : Tetraphenylphosphonium
Psl : Polysaccharide synthesis locus	TPS : Motif de sécrétion en N-terminal
PTS : Système des phosphotransférases	TRI : Triclosan
Q : Analyseurs quadripolaires, : Analyseurs quadripolaires	Txc : Third Xcp homolog
QAC Composants quaternaire d'ammonium	XIC : Xtracted Ion Current
QCAT : Quantification conCATemer	α-CHCA : Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique
QL Quinolones	
QqQ : Spectromètre de masse de type triple quadripôle	

Listes des Figures

Figure 1 : Image de microscopie électronique de la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Figure 2 : Annotation du génome complet de la souche de référence PAO1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Figure 3 : Biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Figure 4 : Les étapes de formation d'un biofilm.	13
Figure 5 : Schéma récapitulatif des processus menant à l'hétérogénéité intra-espèce au sein d'un biofilm microbien mono-espèce.....	16
Figure 6 : Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones et carbapénèmes chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figure 7 : Principaux facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figure 8 : Représentation schématique de la structure du flagelle	27
Figure 9 : Représentation schématique du pili de type IV.....	28
Figure 10 : Représentation schématique de la structure du LPS.....	29
Figure 11 : Structure des rhamnolipides	34
Figure 12 : Les systèmes de sécrétion chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Figure 13 : La bactérie produit de manière constitutive des AI	48
Figure 14 : La régulation par le QS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
Figure 15 : Représentation schématique des systèmes des régulations du quorum sensing chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Figure 16 : Organisation des TCS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Figure 17 : Représentation schématique des réseaux de régulation permettant la transition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de l'état planctonique à l'état biofilm	54
Figure 18 : Le système CSS ferripyoverdine de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Figure 19 : Modèles proposés pour le système CSS-PUMA3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Figure 20 : Exemples d'approches de séparation des échantillons en analyse protéomique.	66
Figure 21 : Schéma de fonctionnement du spectromètre de masse.	68
Figure 22 : Principe de l'ionisation ESI.....	69
Figure 23 : Principe des différents types de balayage MS, MS/MS et MS ⁿ	71
Figure 24 : Représentation du Q-exactive	71
Figure 25 : Représentation schématique de l'analyseur Orbitrap	73
Figure 26 : Nomenclature des ions fragments	74
Figure 27 : Méthodes de quantification basées sur la spectrométrie de masse.	75
Figure 28 : Schéma de la quantification sans marquage.....	76
Figure 29 : L'approche AMT en 2 phases	77

Figure 30 : Approches de quantification absolue utilisant des standards internes.....	80
Figure 31 : Principe des méthodes de quantification SRM, PRM et DIA.....	80
Figure 32 : Contribution de la protéomique dans la compréhension du phénotype biofilm	86
Figure 33 : Clustering hiérarchique	88
Figure 34 : Capacité de formation de biofilm par les souches PAO1, $\Delta pA3731$ et $\Delta pA3731$ complémentée	89
Figure 35 : Etude de l'infection dans un modèle murin.....	90
Figure 36 : Distribution monocistronique des gènes du système BAC	90
Figure 37 : Stratégie suivie pour l'analyse du protéome total de PAO1 et des mutants BAC cultivés en planctonique et en biofilm.....	99
Figure 38 : Résultat PCR.	112
Figure 39 : Courbe de croissance bactérienne	113
Figure 40 : Concentration en rhamnolipides dans la phase stationnaire et en mode biofilm.....	114
Figure 41 : Etude de l'adhésion bactérienne sur lignée pneumocytaire A549.....	115
Figure 42 : Capacité de formation de biofilm à l'interface solide-liquide	116
Figure 43 : Etude de la mobilité de PAO1 et des souches mutantes.....	118
Figure 44 : Influence de l'ajout exogènes de rhamnolipides sur la capacité de formation de biofilm	119
Figure 45 : Impact des rhamnolipides sur la résistance	121
Figure 46 : Impact des rhamnolipides sur la mobilité de type swarming	122
Figure 47 : Impact des rhamnolipides sur la mobilité de type swimming	123
Figure 48 : Impact des rhamnolipides sur la mobilité de type twitching	123
Figure 49 : Illustration des travaux d'identification.....	125
Figure 50 : Diagrammes de Venn des protéines identifiées pour chaque condition de croissance....	126
Figure 51 : Evaluation de l'homogénéité des répliquats de la souche sauvage en phase stationnaire .	127
Figure 52 : Analyse par composantes principales.....	129
Figure 53 : Analyse par clustering des données de l'analyse protéomique différentielle.....	130
Figure 54 : Graphiques « Volcano plots »	132
Figure 55 : Diagramme de Venn des protéines sous-exprimées entre les mutants et la souche sauvage pour chaque condition de croissance	133
Figure 56 : Diagramme de Venn des protéines surexprimées entre les mutants et la souche sauvage pour chaque condition de croissance	134
Figure 57 : Diagramme de Venn des protéines sous-exprimées et surexprimées de façon équivalente entre les mutants et la souche sauvage pour chaque condition de croissance.....	135
Figure 58 : Diagramme de Venn représentant les protéines de la fraction extracellulaire pour les différentes souches étudiées.....	136
Figure 59 : Analyse par composantes principales.....	139
Figure 60 : Résultat de la surproduction de la protéine PA3729.	141

Figure 61 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification de la protéine PA37329	142
Figure 62 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3729.....	143
Figure 63 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3729 en utilisant successivement deux colonnes de nickel (TED et NTA).	144
Figure 64 : : Analyse par SDS-Page du résultat de la surproduction de la protéine PA3731	145
Figure 65 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3731.....	146
Figure 66 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la surproduction de la protéine PA3732	147
Figure 67 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3732.....	148
Figure 68 : Prédiction des interactions entre les protéines du système BAC	149
Figure 69 : Etude de l'interaction entre les rhamnolipides et PA3731	150
Figure 70 : Etude de l'interaction entre des rhamnolipides et PA3732.....	151
Figure 71 : Etude de l'interaction entre PA3732 et PA3731	152
Figure 72 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la stabilité.....	153
Figure 73 : Cristaux de la protéine PA3732.....	154
Figure 74 : Théorie et méthode en cristallisation des macromolécules biologiques.....	155
Figure 75 : Mesure du diamètre d'une colonie de PAO1 cultivée en condition de swarming ou en condition de swimming en présence de différentes concentrations en antibiotiques.....	159
Figure 76 : Hypothèse sur l'organisation du système BAC dans la transduction d'un signal	162
Figure 77 : Hypothèse sur l'organisation du système BAC dans la sécrétion des rhamnolipides	163

Listes des Tableaux

Tableau 1: Comparaison des génomes de différentes souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Tableau 2 : Les systèmes d'efflux chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Tableau 3: Performances des principaux analyseurs de masse	70
Tableau 4 : Avantages et inconvénients des différentes approches protéomique quantitative	82
Tableau 5 : Etudes réalisées sur les biofilms illustrant la diversité des modèles de développement en mode biofilm et de leur stratégies d'analyses protéomiques	84
Tableau 6: Amorces utilisées pour la PCR.....	94
Tableau 7: Composition du milieu minimum glucosé.....	97
Tableau 8: Composition du gel SDS-PAGE 7%	103
Tableau 9: Composition du gel de résolution	108
Tableau 10: Composition du gel de concentration	108
Tableau 11 : CMI de la souche PAO1 et des souches des mutants bac vis-à-vis de différents antibiotiques.....	117
Tableau 12 : Evaluation de l'homogénéité des réplicats à partir des regressions réalisées pour l'ensemble des conditions	127
Tableau 13 : Résumé des protéines différentiellement exprimées dans chaque condition de croissance entre un mutant BAC et la souche sauvage.....	132
Tableau 14 : Protéines présentant une régulation similaire entre tous les mutants BAC et la souche sauvage, quelle que soit la condition considérée	135
Tableau 15: Coefficients de détermination obtenus à partir des calculs de régression linéaire.....	138
Tableau 16 : Résumé des protéines de la fraction extracellulaire présentant une abondance différente dans chaque condition de croissance étudiée entre un mutant BAC et la souche sauvage	139
Tableau 17 : Facteurs de virulence surexprimés à l'état biofilm	140
Tableau 18 : Paramètres thermodynamiques relatifs à l'interaction entre les rhamnolipides et les protéines PA3731 et PA3732.....	151
Tableau 19 : Recensement des facteurs des virulence retrouvés surexprimés (>2) et sous-exprimés (<0.5) chez les mutants bac.....	209

Revue Bibliographique

I- Pseudomonas aeruginosa

I.1-Historique et taxonomie

Pseudomonas aeruginosa (PA) est également connue sous le nom de bacille pyocyanique en raison du pigment pyocyanique bleu-vert (la pyocyanine) qu'elle produit. En 1862, Lucke a été le premier à associer ce pigment avec des organismes en forme de bâtonnet. Cette bactérie a été mentionnée pour la première fois dans la littérature par Schroeter en 1872. En 1882, elle a été isolée avec succès en culture pure par Carle Gessard (Hugh et Leifson., 1964). Cette bactérie appartient à la classe des gammaprotéobactéries, à l'ordre des *Pseudomonadales* et à la famille des *Pseudomonadaceae*. Cette famille renferme 10 genres dont le genre *Pseudomonas* (Moore et al., 1996). Ce genre regroupe 141 espèces dont l'espèce *aeruginosa*. PA est l'espèce type du genre *Pseudomonas* (Catalogue of life, 2018).

I.2-Caractéristiques microbiologiques

C'est une bactérie à Gram négatif qui forme des bâtonnets de 1 à 3 μm de long sur 0.5-1.0 μm de diamètre selon la souche. La plupart des souches sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou des structures de type pili (**Figure 1**). Des souches immobiles peuvent néanmoins être rencontrées (Eyquem et al., 2000; Hafiane et Ravaoarino., 2008).

PA est peu exigeante, elle se cultive très facilement sur les milieux de culture classiques. Elle est dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique ce qui lui permet de se développer même dans des milieux pauvres en nutriments. Sa température de croissance se situe entre 4°C et 45°C, avec une température optimale allant de 30 à 37°C ce qui en fait une bactérie mésophile (Ojeniyi., 1994; Eyquem et al., 2000). Elle peut croître dans une gamme de pH allant de 4,5 à 9,5. Bactérie aérobie, elle utilise l'O₂ comme accepteur d'électrons mais en absence d'O₂, elle peut le substituer par les nitrates ou les nitrites, et fermenter le pyruvate et l'arginine (Eschbach et al., 2004; Vander Wauven et al., 1984; Vasil., 1986). PA sécrète des pigments caractéristiques comme la pyoverdine (jaune-vert), sidérophore impliqué dans la capture du fer, élément indispensable à la croissance et à la prolifération bactérienne et la pyocyanine (bleu-vert) qui peut jouer le rôle d'accepteur terminal d'électrons permettant ainsi à la bactérie de croître en anaérobiose (Daly et al., 1984).

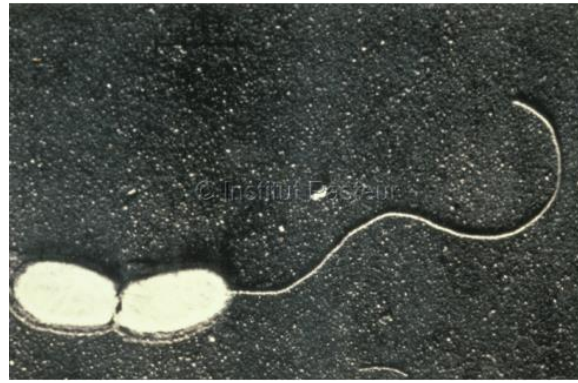


Figure 1: Image de microscopie électronique de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (<http://phototheque.pasteur.fr/index2.cgi>)

I.3-Caractéristiques génomiques

Le génome de la souche PAO1 de *PA* a été entièrement séquencé en 2000 par Stover et son équipe (Stover et al., 2000). L'annotation des gènes est disponible sur le site internet www.pseudomonas.com.

Il s'agit de l'un des plus grands génomes bactériens complètement séquencés, avec 6,26 millions de paires de bases, ce qui représente plus de 5500 gènes (5570 cadres de lecture ouverts (ORFs) annotés ou prédits) (**Figure 2**). D'autres souches de *PA* ont été depuis séquencées telles que PA14 (Lee et al., 2006), PA7 (Roy et al., 2010), LESB58 (Winstanley et al., 2009), YL84 (Chan et al., 2014).

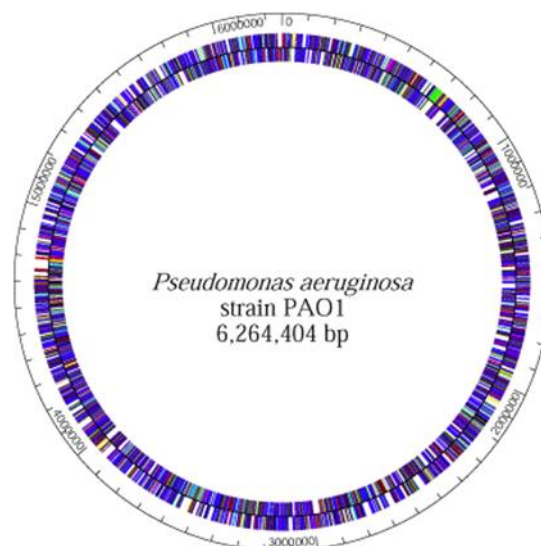


Figure 2: Annotation du génome complet de la souche de référence PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* (www.pseudomonas.com)

Revue bibliographique : Pseudomonas aeruginosa

PA contient la plus grande proportion de gènes régulateurs parmi les génomes bactériens, ce qui est en adéquation avec sa grande taille génomique et sa capacité d'adaptation à divers environnements. Elle possède également un nombre important de gènes impliqués dans le catabolisme, le transport et codant pour les systèmes d'efflux, ainsi que de nombreux systèmes dédiés au chimiotactisme (Stover et al., 2000) (**Tableau 1**). Le pourcentage de gènes impliqués dans la régulation (8,4%) est élevé par rapport aux autres bactéries (5.8% et 5.3% chez *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Bacillus subtilis* par exemple). De nombreuses études se sont intéressées à l'évolution génomique de *PA* et ont montré que les génomes de différentes souches (cliniques ou environnementales) sont hautement conservés. C'est d'ailleurs cette conservation qui permet à cette bactérie de coloniser une large gamme de niches écologiques et de causer des infections humaines (Wolfgang et al., 2003a).

Tableau 1: Comparaison des génomes de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Roy et al., 2010)

Souches	PA7	PAO1	PA14	LESB58
Taille du génome (Pb)	6 588 339	6 264 404	6 537 648	6 601 757
Contenu en G+C	66.5	66.6	66.3	66.3
Gènes codants des protéines	6286	5566	5892	5925
% de gène codants	89	89	89	88
ARNs structurels	75	77	72	81
Pseudogènes	8	5	non	34
Fonctions				
Traduction, structure et biogenèse des ribosomes	206	205	205	199
Transcription	530	516	537	501
Réplication, recombinaison et réparation de l'ADN	235	160	185	145
Division cellulaire	37	34	35	34
Modifications post-traductionnelles	215	200	210	201
Biogenèse de l'enveloppe et de la membrane externe	260	265	266	261
Mobilité cellulaire et sécrétion	152	150	154	149
Métabolisme, transport des carbohydrates	250	252	249	196
Métabolisme, transport des acides aminés	571	587	590	490
Métabolisme des lipides	245	244	248	234
Mécanisme de transduction de signal	346	337	345	337
Fonctions prédites	759	756	771	603
Fonctions inconnues	503	476	493	500

I.4-Habitat

PA est une bactérie ubiquitaire, retrouvée dans des environnements variés. Elle est souvent isolée dans les eaux (de mer, rivières, égouts, piscines ...) mais également dans les sols et sur la surface des végétaux. Elle peut aussi se retrouver dans des poussières en suspension dans l'air, et même dans les solutions antiseptiques (Terrier et al., 1992; Pirnay et al., 2009). Cette bactérie peut vivre en commensal dans le tube digestif de l'homme et des animaux. C'est un agent pathogène opportuniste capable de causer un large éventail d'infections aiguës, associées à un mode de vie planctonique des bactéries, et chroniques, liées à un mode de vie en biofilm, mettant en jeu le pronostic vital, en particulier chez les patients dont la défense immunitaire est compromise (Lazdunski, 2003; Mesaros et al., 2007).

I.5-Les infections à *Pseudomonas aeruginosa*

PA est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. Elle est l'un des principaux agents pathogènes nosocomiaux affectant les patients hospitalisés, tout en étant intrinsèquement résistant à un large éventail d'antibiotiques. La liste des infections à *PA* est longue et ne cesse de croître. Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, respiratoires, urinaires, des otites externes pouvant être mortelles chez les diabétiques. *PA* peut aussi engendrer des kératites ulcéreuses chez les porteurs de lentilles de contact, des infections de la peau, des plaies et des infections secondaires des brûlures (Lazdunski., 2003; Mesaros et al., 2007). Elle est également capable de causer des méningites et des ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (Carek et al., 2001).

De plus, de par sa grande adaptabilité métabolique et sa capacité à se développer en biofilm, *PA* a développé de nombreuses résistances aux antibiothérapies.

II- Mode de vie sessile: biofilm

On sait aujourd'hui que dans leurs habitats naturels, les bactéries adoptent deux types de modes de vie : un mode de vie planctonique, où elles se déplacent librement dans un milieu liquide, et un mode de vie sessile sous forme de biofilm. Un aspect clef des infections à *PA* est la croissance sous forme de biofilm (**Figure 3**). Les biofilms sont des communautés bactériennes, souvent hétérogènes, structurées, attachées à un support biotique ou abiotique et engluées dans une matrice extracellulaire composée de biopolymères (d'alginate, d'ADN et de protéines) (Hentzer et al., 2001; Moreau-Marquis et al., 2008). Il est admis de nos jours que les micro-organismes favorisent le plus souvent un mode de vie sessile plutôt que planctonique. Ce choix étant une stratégie de survie. En effet, en mode de vie sessile, de nombreuses bactéries pathogènes échappent au stress, à la phagocytose, à la restriction en nutriments et aux agents antimicrobiens conventionnels (Leid et al., 2009; Olsen., 2015).

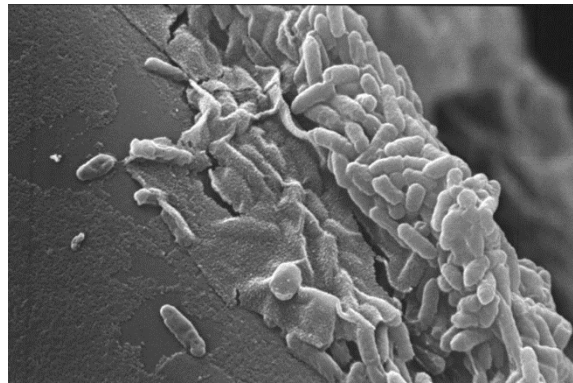


Figure 3 : *Biofilm de Pseudomonas aeruginosa formé sur de la laine de verre après 24 h observé par microscopie électronique à balayage (Benamara et al, 2014)*

La formation d'un biofilm se décompose en plusieurs étapes : une étape de reconnaissance de la surface, une étape d'adhésion des bactéries planctoniques sur un support (réversible puis irréversible), une étape de prolifération aboutissant à la formation de micro-colonies, une étape de maturation du biofilm, caractérisée par la formation de la matrice de polymère, et une étape de dispersion (Sauer et al., 2002) (**Figure 4**) au cours de laquelle des agrégats bactériens se détachent et sont capables de coloniser de nouvelles surfaces (Filloux et Vallet, 2003).

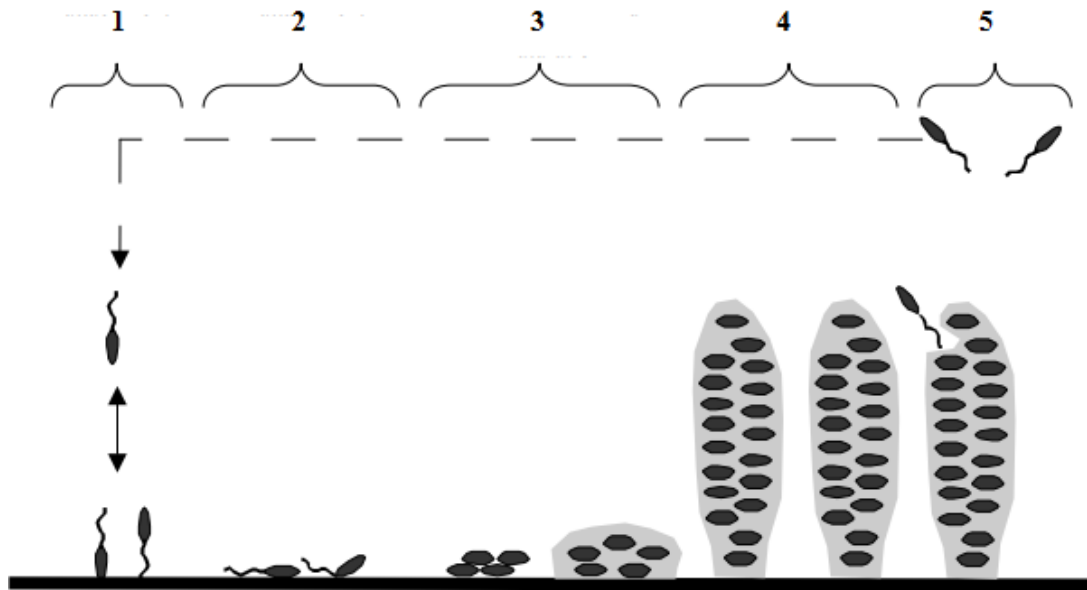


Figure 4: Les étapes de formation d'un biofilm. 1: adhésion réversible ; 2 : adhésion irréversible; 3: formation de micro-colonies; 4: maturation et formation de la matrice; 5: Dispersion (modifiée à partir de O'Toole et al., 2000 et Stoodley et al., 2002)

II.1-Adhésion à la surface bactérienne

Un film chimique de pré-conditionnement composé de protéines, de glycoprotéines et de nutriments organiques se forme sur la surface de fixation, créant ainsi une zone riche en nutriments métaboliquement favorable aux cellules bactériennes (Dang et Lovell., 2015; Dunne., 2002). Une fois la surface conditionnée, les bactéries planctoniques peuvent s'approcher de celle-ci i) de manière stochastique, ii) emmenées par un transport diffusif résultant des mouvements browniens et gravitationnels, iii) un transport passif, plus rapide, grâce au mouvement de gaz ou d'un flux dynamique de la solution aqueuse (agitation du milieu et forces d'écoulement), mais aussi iv) par un mouvement actif impliquant des appendices bactériens générateurs de mouvement (les flagelles) (Donlan., 2002; O'Toole et Kolter., 1998). Les bactéries vont ensuite interagir directement ou indirectement avec la surface grâce à leur fimbriae et leurs adhésines (Filloux and Vallet, 2003; Lejeune, 2003). Lors de cette étape, les interactions entre la cellule et la surface sont faibles et réversibles. Ces interactions sont facilitées par les forces d'attraction de Van der Waals, les interactions électrostatiques, des interactions hydrophobes... On peut également retrouver une combinaison de celles-ci, en fonction de la distance organisme-surface de fixation (Carpentier et Cerf, 1993; Vander Wauven et al., 1984; Zottola et Sasahara, 1994). A noter qu'à cette étape, les bactéries peuvent encore se détacher de cette surface et rejoindre la population planctonique (Banin et al., 2005;

Dunne., 2002). Lors de l'attachement irréversible, les bactéries doivent non seulement rester en contact avec le substrat, mais également se développer afin de produire un biofilm mature. La transition de l'adhésion réversible à irréversible est assurée par les flagelles et les pili de types IV qui permettent l'établissement d'une interaction stable et solide avec la surface (Costerton., 1999; Lejeune., 2003)

II.2-Maturation du biofilm

Une fois les bactéries attachées de manière irréversible à une surface, le processus de maturation du biofilm commence. Au cours de ce processus, la croissance et la division des premières cellules attachées et le recrutement de nouvelles bactéries planctoniques favorisent la formation de micro-colonies (Heydorn et al., 2002; Tolker-Nielsen et al., 2000). Les micro-colonies nouvellement formées vont ensuite proliférer et s'organiser en plusieurs couches cellulaires empilées les unes sur les autres (Costerton, 1999). La différenciation et le développement du biofilm dépendent principalement de l'expression de certains gènes liés au Quorum Sensing (QS, décrit plus loin dans le détail) (Davies et al., 1998). En effet, le système Las du QS induit un signal de maturation permettant la sécrétion d'exopolymères qui vont former une matrice protectrice et renforcer l'ancrage bactérien sur la surface. La matrice va alors se développer chez *PA* en une structure en forme dite de champignon sous le contrôle du système Rhl du QS (Wagner and Iglewski, 2008). Au sein de cette structure il existe des canaux aqueux et des pores par lesquels peuvent transiter l'eau, l'oxygène et les nutriments. L'ensemble est nécessaire pour maintenir la structure tridimensionnelle du biofilm (Hentzer et al., 2001).

II.3-La dispersion

Les bactéries ont développé plusieurs systèmes sensoriels leur permettant de percevoir les changements environnementaux et de jauger s'il leur est toujours bénéfiques de résider dans le biofilm ou s'il est temps de se disperser pour reprendre un mode de vie planctonique (Harmsen et al., 2010; Kaplan, 2010). Le détachement des cellules du biofilm est ainsi un phénomène complexe, faisant intervenir simultanément de nombreux mécanismes.

D'une manière générale, la dispersion du biofilm se produit en réponse à plusieurs signaux environnementaux, tels que l'appauvrissement en nutriments, et/ou l'augmentation de produits toxiques, etc... (Karatan and Watnick., 2009; O'Toole et al., 2000; Sauer et al., 2004). Les rhamnolipides, l'acide cis-2-décénoïque et certains acides aminés semblent avoir un impact sur

le détachement des bactéries du biofilm (Boles et al., 2005; Davies and Marques., 2009; Kolodkin-Gal et al., 2010). Certaines études ont également montré l'impact du pH dans la dispersion. En effet l'alcalinisation du milieu peut influencer le détachement des bactéries (Sauer et al., 2004).

Il semble que le profil protéique des bactéries en dispersion soit très semblable à celui des bactéries en mode planctonique. Ces bactéries vont sur-exprimer en particulier leur(s) flagelle(s) au détriment des pili et vont retrouver une sensibilité vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques (Sauer et al., 2004).

II.4-Physiologie du biofilm

Dans la nature, la plupart des biofilms sont poly-microbiens ; en leur sein, diverses espèces bactériennes exprimant plusieurs phénotypes peuvent être présentes. Le biofilm de la plaque dentaire et les biofilms des maladies parodontales sont peut-être les biofilms polymicrobiens les mieux décrits. Ces biofilms sont des environnements très complexes et hétérogènes caractérisés par une grande diversité physique, chimique, et biotique (Socransky et Haffajee., 2002). Dans ces biofilms, les bactéries se distribuent en fonction de leur potentiel de survie, de leur besoin et de possibles relations symbiotiques (Watnick and Kolter, 2000).

Plusieurs études ont montré que l'hétérogénéité phénotypique existe même dans un biofilm mono-espèce. Les cellules de la même espèce bactérienne peuvent en effet présenter des phénotypes différents dans un même biofilm (Socransky et Haffajee., 2002). Trois procédés ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité physiologique au sein d'un biofilm microbien mono-espèce (**Figure 5**).

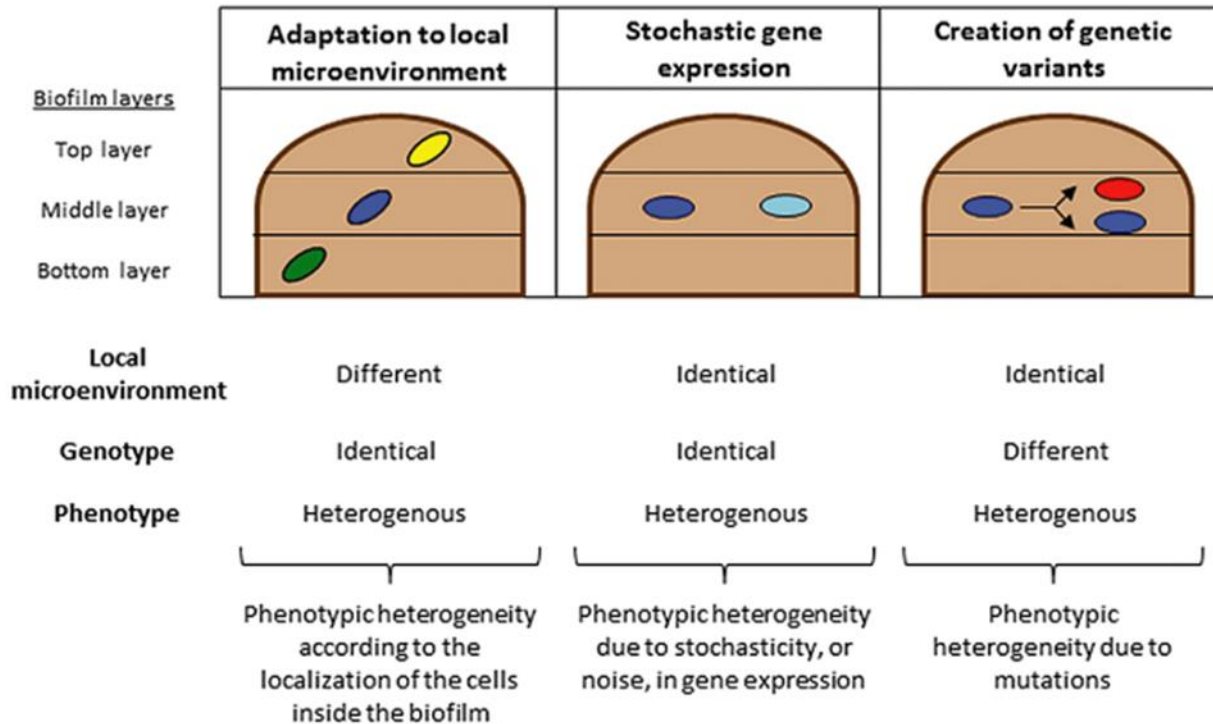


Figure 5 : Schéma récapitulatif des processus menant à l'hétérogénéité intra-espèce au sein d'un biofilm microbien mono-espèce. Cette hétérogénéité se produit suite à la réponse de chaque cellule bactérienne aux microenvironnements locaux, au basculement stochastique dans les profils d'expression génétique, ou aux mutations génétiques (Dufour et al., 2010)

En 2008, Stewart et Franklin ont proposé un modèle de la différenciation phénotypique liée aux gradients d'oxygène et de nutriments au sein d'un biofilm mono-espèce (Stewart et Franklin., 2008). Dans leur modèle, trois états physiologiques différents sont envisagés. Les cellules situées dans les couches supérieures du biofilm consomment tout l'oxygène disponible et se développent en aérobiose, tandis qu'une micro-niche anaérobie est engendrée plus en profondeur. Les régions carencées en oxygène et nutriments sont retrouvées dans les couches les plus profondes du biofilm où les cellules sont métaboliquement inactives (Stewart et Costerton., 2001).

Au sein d'une population clonale, des phénotypes alternatifs peuvent être générés spontanément. Il peut y avoir deux ou plusieurs sous-populations présentant des propriétés phénotypiques distinctes, en raison du "bruit" (ou variation stochastique) dans le profil d'expression génique. Le bruit stochastique découle des fluctuations aléatoires dans l'expression des protéines entre les cellules clonales individuelles et leurs sous-populations pour faire face aux perturbations environnementales (Veening et al., 2008).

III- Résistance aux antibiotiques

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. En 2017, l'OMS a classé *PA* dans le groupe des bactéries pathogènes les plus problématiques du point de vue de l'antibiorésistance (WHO., 2017), et pour lequel la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques et/ou de nouvelles stratégies thérapeutiques sont prioritaires.

Une des particularités de *PA* est sa capacité extraordinaire à développer une résistance à un large éventail d'agents antimicrobiens *via* divers mécanismes moléculaires souvent présents simultanément dans les isolats cliniques. De plus, cette bactérie montre une forte capacité d'acquisition de nouvelles résistances à des composés habituellement actifs. Sa résistance naturelle, beaucoup plus élevée que celle de la plupart des bacilles à Gram-négatif, comme *E. coli*, est le résultat de divers mécanismes qui souvent agissent de façon synergique: diminution de la perméabilité membranaire, efflux actif et inactivation enzymatique. L'emploi massif et répétitif des antibiotiques a également contribué à l'acquisition de nouveaux modes de résistance ce qui a engendré l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes et par conséquent une augmentation des taux de mortalité chez les personnes infectées par *PA* (Chung et al., 2011; Micek et al., 2011). Chez *PA*, tous les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été décrits. Un exemple de ces mécanismes est cité sur la **Figure 6** quant à la résistance aux fluoroquinolones et carbapénèmes.

Cette résistance peut être intrinsèque, adaptative ou acquise (Gellatly et Hancock., 2013). Des études ont décrit en détail la prévalence et la contribution de chaque mécanisme de résistance à chaque classe d'antibiotiques (Hong et al., 2015; Lister et al., 2009; Potron et al., 2015; Strateva et Yordanov., 2009).

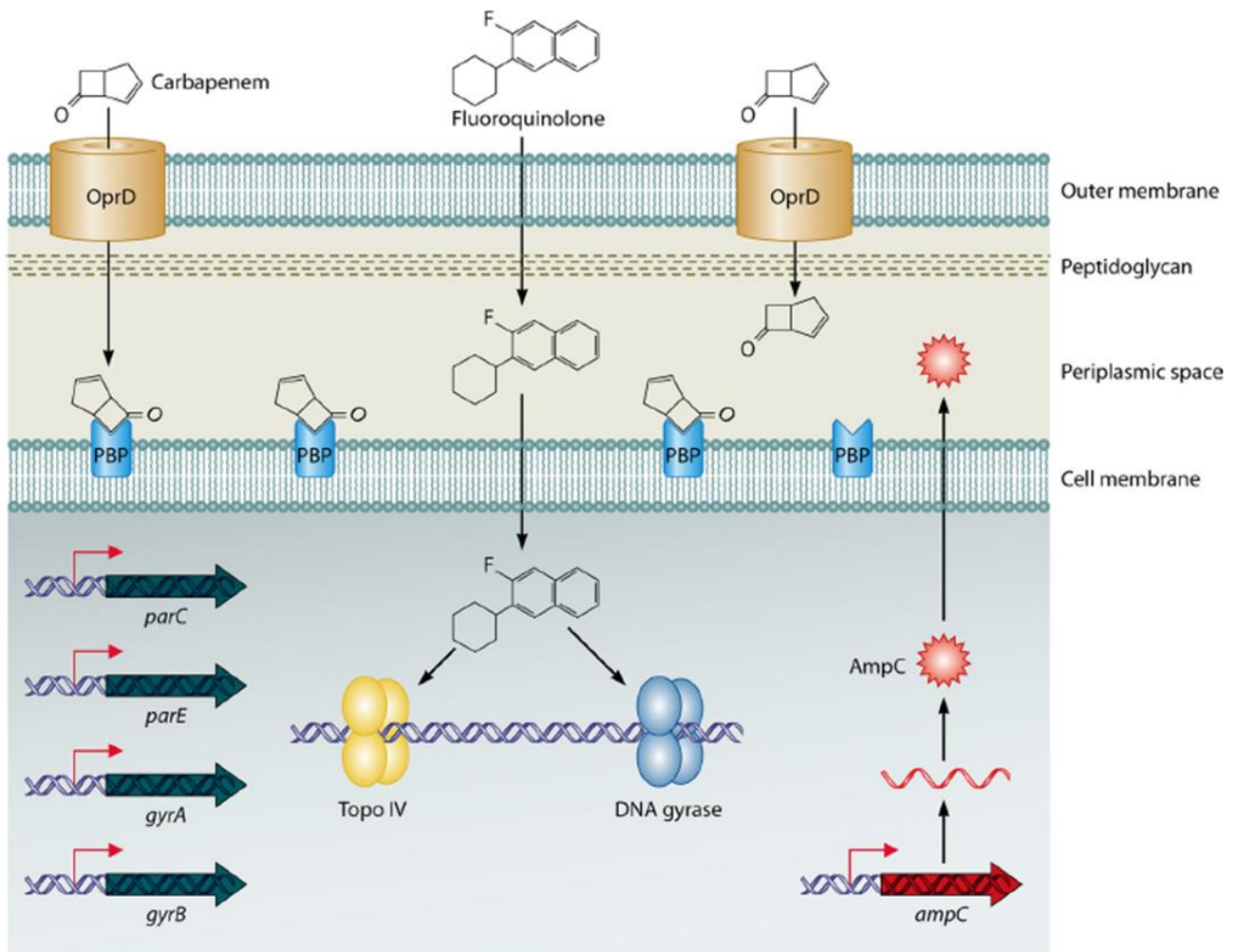


Figure 6 : Résistance aux fluoroquinolones et aux carbapénèmes impliquant des mécanismes codés par les chromosomes exprimés par *Pseudomonas aeruginosa*.

Interactions des fluoroquinolones et des carbapénèmes avec *Pseudomonas aeruginosa* sensible « de type sauvage » exprimant un taux basal d'AmpC, d'OprD et de gènes cibles de la fluoroquinolone non mutés (*gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*). Les molécules de fluoroquinolone traversent la membrane externe, le peptidoglycane, l'espace périplasmique et la membrane cytoplasmique et interagissent avec les cibles (ADN gyrase et topoisomérase IV) dans le cytoplasme. Les molécules de carbapénème passent à travers la porine OprD spécifique de la membrane externe et interagissent avec leurs PBP cibles, situés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Lister et al., 2009).

III.1-Résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque est naturelle et est conférée chez *PA* par la faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression constitutive de mécanismes d'efflux, et la production d'enzymes inactivant les antibiotiques.

Perméabilité membranaire

Si les antibiotiques utilisés contre les infections à *PA* utilisent différents mécanismes d'action, ils doivent tous, dans un premier temps, traverser la paroi cellulaire pour atteindre leur cible. La paroi de *PA* comme celle de la plupart des bacilles à Gram négatif est une structure rigide ayant pour fonction d'assurer la protection de la bactérie contre les agressions physico-chimiques du milieu extracellulaire et de maintenir la pression osmotique interne. Comme pour toutes les bactéries à Gram-négatif, la paroi bactérienne est formée par une double membrane, interne et externe. Véritable barrière de perméabilité, la membrane externe, de par sa composition en phospholipides et en lipide A, peut être considérée comme une membrane globalement très hydrophobe et peu fluide. Elle joue un rôle essentiel dans la pénétration des antibiotiques chez *PA*. Elle est 10 à 100 fois moins perméable que celle d'*E. coli* et pour de nombreux composés (Yoshimura et Nikaido., 1982). Elle empêche la pénétration de solutés hydrophobes tels que la rifampicine, l'érythromycine, la novobiocine et les détergents mais aussi des molécules hydrophiles de grandes tailles. Les antibiotiques hydrophiles de petites tailles tels que les β -lactamines et les quinolones peuvent franchir la membrane externe *via* les porines (protéines formant des canaux) (Lambert., 2002; Nikaido., 2005).

Il a été montré que cette faible perméabilité repose essentiellement sur les propriétés de la porine non spécifique OprF. Malgré son nombre élevé de copies par cellule (200 000 copies), cette porine constitue une voie de diffusion relativement inefficace pour les antibiotiques en raison de son hétérogénéité structurale et fonctionnelle (Hancock et Speert., 2000). Il semble que les larges canaux formés par OprF, par lesquels peuvent diffuser des molécules hydrophiles de grande taille, n'existent qu'en très faible quantité (fréquence < 1%), la majorité des molécules OprF formant des pores étroits (Nikaido et al., 1991).

Système d'efflux

Malgré la faible perméabilité membranaire, certains antibiotiques parviennent à franchir la membrane externe (Nikaido., 1998). Les bactéries ont donc développé d'autres mécanismes afin de diminuer la concentration intracellulaire d'antibiotiques. Il s'agit des pompes d'efflux qui correspondent à des canaux actifs permettant d'expulser les molécules nocives vers le milieu extracellulaire (Schweizer., 2003). Ces pompes d'efflux appartiennent à la famille des RND (Resistance Nodulation cell Division). Elles sont constituées d'une protéine transporteur ATP-dépendante (MexB, MexD, MexF, MexY, MexI, MexK et MexW), d'une protéine de la membrane externe (OprM, OprJ, OprN et OmpD) et d'une lipoprotéine périplasmique dite de fusion membranaire (MexA, MexC, MexE, MexX, MexJ, MexH et MexV) (Schweizer., 2003) qui relie les deux éléments précédents pour créer un canal par lequel les molécules inhibitrices sont conduites vers le milieu extérieur. Plusieurs pompes d'efflux ont été caractérisées chez PA à ce jour : MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, MexHI-OmpD et MexVW-OprM (Avrain et al., 2013). Outre les antibiotiques, ces pompes sont également capables d'exporter des colorants, des détergents, des solvants organiques, des métaux lourds et des molécules impliquées dans le quorum sensing) (**Tableau 2**) (Schweizer., 2003).

L'inactivation enzymatique

L'inactivation enzymatique est un autre mécanisme de résistance naturelle fréquemment utilisé par PA. En effet la bactérie possède la capacité de synthétiser certaines enzymes susceptibles d'inactiver les antibiotiques telles que les bêta-lactamases capables de dégrader les bêta-lactamines et les aminosides phosphotransférases, les aminoglycosides acetyltransférases, et les aminoglycosides nucleotidyltransférases qui inactivent des aminoglycosides (Lambert., 2002; Lister et al., 2009).

Tableau 2 : Les systèmes d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* (adapté de Moradali et al., 2017)

Système d'efflux	Substrats
MexAB-OprM	BL, CHIR, CHL, COL, CP, CRL, CV, EB, FQ, ID, QL, ML, NOV, OS, PDM, QS, SDS, SUL, TC, TLM, TMP, TRI
MexXY-OprM	ACR, AG, BPR, EB, FEP, FQ, LBM, ML, TC, TGC
MexCD-OprJ	AZI, BPR, CHIR, CHL, COL, CHX, FEP, FQ, NBTI, NCD, OS, PDM, QAC, QL, TC, TGC, TRI
MexEF-OprN	CHIR, CHL, DA, FQ, QL, HHQ, TC, TMP, TRI
MexGHI-OpmD	ACR, EB, FQ, TET, TPP, QS, Va^{2+} , 5-Me-PCA
MexJK-OprM	ERY, TET
MexJK-OpmH	TRI
MexMN-OprM	CHL, TLM
MexPQ-OpmE	ML, QL, TPP
MexVW/OprM	ACR, CHL, EB, ERY, FQ, QL, TC
MuxABC-OpmB	ATM, COL, ML, NOV, TET
TriABC-OpmH	TRI
CzcCBA	Cd^{2+} , Zn^{2+}

5-Me-PCA, 5-methylphenazine-1-carboxylate; ACR, acriflavine; AG, aminoglycosides; ATM, aztreonam; AZI, azithromycin, BL, β -lactams; BPR, ceftobiprole; CHIR, LpxC inhibitor CHIR-090; CHL, chloramphenicol; CHX, chlorhexidine; COL, colistin; CP, carbapenems; CRL, cerulenin; CV, crystal violet; DA, diamide; EB, ethidium bromide; ERY, erythromycin; FEP, cefepime; FQ, fluoroquinolones; HHQ, 4-hydroxy-2-heptylquinoline; ID, indoles; LBM, peptide deformylase inhibitor; ML, macrolides; NBTI, bacterial type II topoisomerase inhibitor NBTI5463; NCD, N-chloramine derivative; NOV, novobiocin; OS, organic solvents; PDM, pacidamycin; QAC, quaternary ammonium compounds; QL, quinolones; QS, quorum-sensing; SDS, sodium dodecyl sulfate; SUL, sulfonamides; TC, tetracyclines; TGC, tigecycline; TLM, thiolactomycin; TMP, trimethoprim; TPP, tetraphenylphosphonium; TRI, triclosan

III.2-Résistance acquise

La résistance acquise est développée par mutation ou acquisition de matériels génétiques étrangers tels que les plasmides, les transposons et les intégrons (Lambert., 2002; Lister et al., 2009; Mesaros et al., 2007). Ces modifications génétiques confèrent une résistance, relativement stable, à certaines classes d'antibiotiques, et peuvent être transmises à la descendance favorisant l'apparition de souches résistantes.

Certaines mutations peuvent induire la surexpression de systèmes d'efflux. Ces mutations touchent des gènes qui codent pour des protéines régulatrices du système (Masuda et al., 2000; Morita et al., 2003; Walters et al., 2003). Ainsi, des mutations au niveau des gènes *mexR*, *nfxB* ou *mexT*, conduisent à la surexpression des trois systèmes d'efflux, MexAB-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN respectivement (Adewoye et al., 2002; Cao et al., 2004; Germ et al., 1999; Saito et al., 1999).

PA est capable de développer une multirésistance *via* des mutations induisant la surproduction d'enzymes inactivatrices d'antibiotiques. La mutation spontanée du gène *ampD* est ainsi à l'origine de la surproduction spectaculaire de la β -lactamase AmpC (Langae et al., 2000). Cette mutation engendre la résistance à la ticarcilline, à la pipéracilline et à certaines céphalosporines (Livemore et al., 1987).

PA peut également acquérir une résistance en modifiant la cible de l'antibiotique. Pour inhiber l'action des quinolones, elle peut ainsi induire des mutations dans des gènes *gyrA* et *parC* qui codent pour les deux topoisomérases de type II: l'ADN gyrase et la topoisomérases IV (Akasaka et al., 2001; Jalal et al., 2000; Takenouchi et al., 1999).

III.3-Résistance adaptative

Comparée aux résistances intrinsèques et acquises, la résistance adaptative est peu comprise. Elle se produit lorsque la bactérie est confrontée à des conditions environnementales préjudiciables, notamment lors de l'exposition aux antibiotiques. Ce type de résistance repose principalement sur des altérations de l'expression des gènes, de la production de protéines ou d'altérations des cibles (Barclay et al., 1992; Fernández et al., 2011; Xiong et al., 1996). Ce mécanisme peut être impliqué dans la résistance aux β -lactamines, aux aminosides, aux polymyxines et aux fluoroquinolones (Fernández et al., 2010; Khaledi et al., 2016; Poole, 2005; Zhang et al., 2001).

Il a été constaté que lorsque les bactéries ont été en contact avec un antibiotique, elles peuvent tolérer des concentrations plus élevées de l'inhibiteur lors d'expositions ultérieures, et une résistance croisée à d'autres antibiotiques peut également se produire (Fernández et al., 2011; Fujimura et al., 2009; Mouneimné et al., 1999; Pagedar et al., 2011). En outre, ces altérations peuvent être induits par d'autres stimuli et stress, ainsi que par des mutations sur certains gènes spécifiques (Fernández et al., 2011; Karlowsky et al., 1997; Xiong et al., 1996).

III.4-La multi-résistance des biofilms aux antibiotiques

La formation de biofilm augmente considérablement la résistance aux antibiotiques. En effet, la matrice représenterait une barrière physique limitant l'accès de ces molécules au sein du biofilm. De plus, le gradient de nutriments et d'oxygène au sein du biofilm affecterait l'activité de certains antibiotiques (Stewart et Costerton., 2001). Les bactéries sessiles peuvent tolérer des concentrations en antibiotiques beaucoup plus importantes que les bactéries planctoniques (10 à 1000 fois supérieure) (Hentzer et al., 2001; Jefferson., 2004). De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer cette remarquable résistance (Stewart et Costerton, 2001). Elles pourraient être d'origine physico-chimique et/ou physiologique. L'hypothèse physico-chimique repose sur la présence de la gangue polymère susceptible de limiter la diffusion des antibiotiques au sein de la matrice d'exopolymères du biofilm qui pourrait agir comme une barrière physique et/ou chimique (Mah et al., 2003; Stewart and Costerton, 2001). Néanmoins, cette hypothèse ne peut expliquer à elle seule l'inefficacité des antibiotiques sur les biofilms. En effet, plusieurs travaux ont montré que ce phénomène était antibiotique dépendant (O'Toole et al., 2000), certaines molécules diffusant effectivement mal dans la matrice comme le céfotaxime et la vancomycine (Singh et al., 2010), d'autres diffusant facilement, comme l'ampicilline ou la ciprofloxacine (Anderl et al., 2000).

L'autre hypothèse est d'ordre physiologique et sous-entend que les bactéries au sein des biofilms développent un phénotype dit « résistant » (Drenkard et Ausubel., 2002). Ce phénotype s'exprime ainsi par l'expression spécifique de gènes comme par exemple le gène *pA1163* chez *PA* qui code une glucosyltransférase nécessaire à la synthèse de petits glucanes cycliques (Mah et al., 2003). L'expression spécifique de ce gène chez les bactéries immobilisées conduit à l'accumulation dans l'espace périplasmique de glucanes capables de fixer les aminosides comme la tobramycine, les empêchant d'atteindre leurs cibles (sous-unités 30S et 50S du ribosome). Les pompes d'efflux pourraient aussi jouer un rôle dans cette résistance. Ainsi, Zhang et Mah (Zhang et Mah., 2008) ont décrit chez *PA* une nouvelle pompe

Revue bibliographique: Résistance aux antibiotiques

d'efflux codée par les gènes *pA1874-1877*. Cette pompe semble être impliquée dans la résistance du biofilm à la ciprofloxacine, à la gentamicine et à la tobramycine.

La formation de cellules dites dormantes peut aussi expliquer la résistance aux antibiotiques. Au sein d'une population bactérienne donnée, il existe en effet une petite sous population (1%) dite « dormante » (Jayaraman., 2008; Lewis., 2010). Les bactéries dormantes sont non divisibles, métaboliquement inactives et extrêmement tolérantes à des concentrations élevées d'antibiotiques. Elles ne correspondent pas à des mutants, mais sont des variantes phénotypiques, génétiquement identiques au reste de la population bactérienne, qui se forment d'une manière stochastique dans une population clonale (Levin et Rozen., 2006). Elles sont soupçonnées être responsables du réensemencement des biofilms suite à l'arrêt du traitement d'antibiotique en milieu clinique.

IV- Les facteurs de virulence

PA est dotée d'un vaste arsenal de facteurs de virulence impliqués dans les différentes étapes du processus infectieux. Le type de facteurs utilisés ainsi que leurs taux d'expression dépendent généralement du type de processus infectieux provoqué par la bactérie ou imposé par les conditions environnementales. On distingue deux grandes familles de facteurs de virulence: les facteurs de virulence cellulaires ou associés à la membrane (flagelle, pili, lipopolysaccharide, lectine ...) et les facteurs de virulences sécrétés (exotoxines, phospholipase C, rhamnolipides, protéases, pyocyanine, pyoverdine...) (Azam et Khan., 2018) (**Figure 7**). Ces facteurs de virulence permettent la colonisation de différents types d'hôtes, la survie bactérienne et l'invasion tissulaire (Balasubramanian et al., 2013; Lazdunski., 2003; Wilson et Lyall., 2002). L'étude de ces facteurs de virulence, cibles potentielles, pourraient conduire au développement de nouveaux médicaments et/ou à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'infection à *PA* (Elamin et al., 2017).

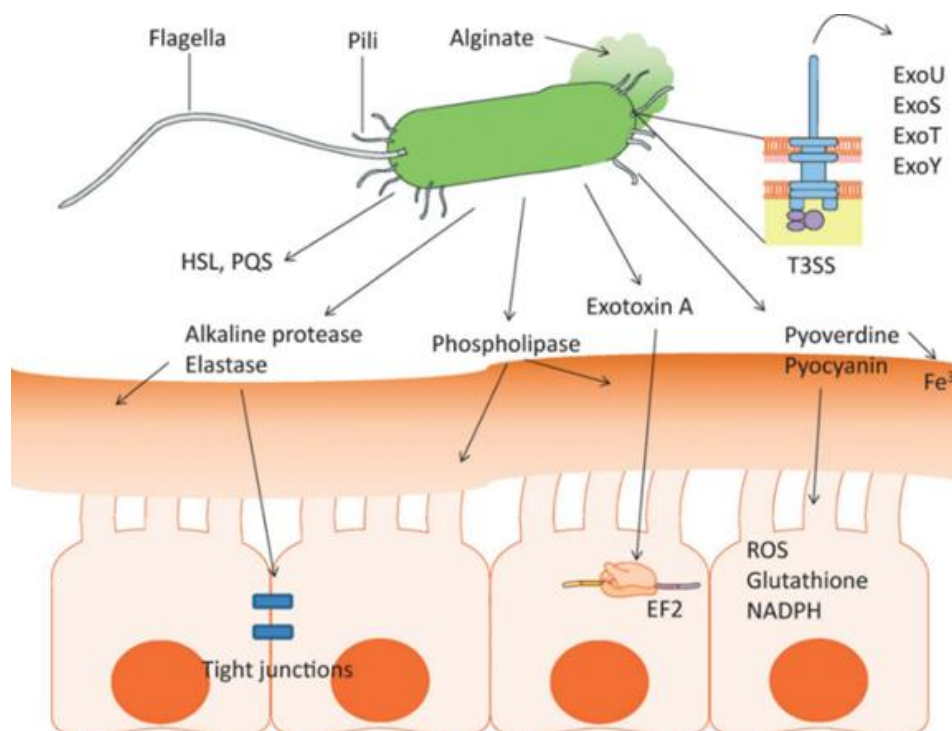


Figure 7: Principaux facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (Gellatly and Hancock, 2013)

IV.1-Les facteurs de virulence membranaires

Le flagelle

Le flagelle est une organelle multi-protéique constitué essentiellement par la sous unité FliC (la flagelline) qui présente une structure hautement conservée chez la plupart des pathogènes à Gram négatif. Bien que la flagelline soit l'unité majeure du flagelle, plus de 50 gènes sont nécessaires à sa synthèse et sa fonction. La structure du flagelle se compose de 3 parties : le filament extracellulaire permettant le mouvement, le crochet qui relie le corps basal au filament extracellulaire et le corps basal ancré dans les membranes bactériennes (Morimoto et Minamino., 2014) (**Figure 8**).

Le flagelle est responsable de la mobilité de type « swimming », mais intervient également dans la mobilité de type « swarming » (Filloux et Vallet., 2003). Il joue un rôle important dans l'adhésion aux supports biotiques et abiotiques. Il a été montré, par exemple, qu'il participe à l'adhésion aux cellules épithéliales, à l'invasion des poumons et à l'établissement d'une infection des voies respiratoires. Il est aussi responsable de l'inflammation et de la sévérité des pneumonies aiguës (Balloy et al., 2007) en causant une réponse pro-inflammatoire via le Toll-like receptor 5. Des études de mutagenèse ont démontré le rôle important du flagelle dans la pathogénicité de la bactérie. Ainsi, des mutants dépourvus du flagelle ont montré une atténuation dans leur virulence (Feldman et al., 1998; Tang et al., 1996). La mutation du gène *fliC* engendre une défaillance dans la production d'exotoxines responsables de la résistance à la protéine A du surfactant pulmonaire, une protéine qui assure l'opsonisation et la perméabilisation membranaire de la bactérie (Kuang et al., 2011). De même, il a été montré qu'il contribuait fortement à la formation du biofilm (Filloux et Vallet., 2003; O'Toole et al., 2000).

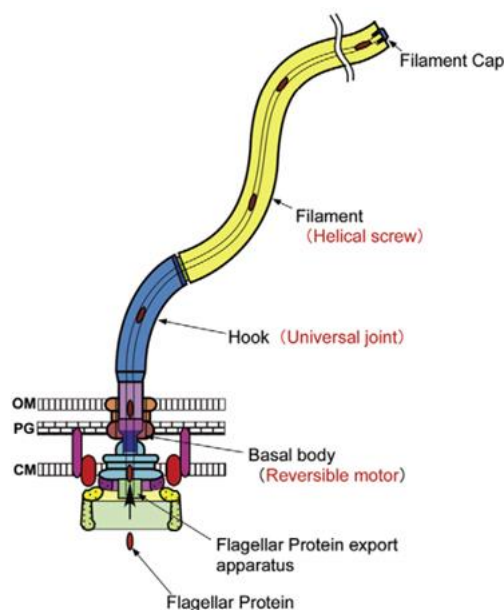


Figure 8 : Représentation schématique de la structure du flagelle (Morimoto et Minamino., 2014)

Les pili de type IV

Également appelé fimbriae, les pili de type IV sont des appendices de surface très fins (<8 nm de diamètre) présents chez de nombreuses bactéries pathogènes. Ils sont constitués d'un assemblage de monomères de piline (**Figure 9**). Cependant, leur assemblage et leur fonction mettent en jeu plus de 30 gènes (Alm et Mattick., 1997; Hahn., 1997; Strom et Lory., 1993). Ils sont impliqués dans la mobilité sur une surface semi-solide (swarming) et sur une surface solide (twitching) (Asikyan et al., 2008; Burrows., 2012) mais aussi dans la motilité, récemment identifiée, de type « walking » (Conrad et al., 2011; Gibiansky et al., 2010). Contrairement au « twitching », dans lequel la bactérie est orientée parallèlement à la surface, dans le « walking », la bactérie est orientée perpendiculairement à la surface. En mode « twitching », la bactérie, plus lente, est moins susceptible de changer la direction, tandis qu'en mode « walking », elle est plus rapide avec une faible persistance directionnelle (Burrows, 2012; Conrad et al., 2011).

Outre la mobilité, ces appendices jouent un rôle majeur dans l'initiation de la colonisation et permettent aux bactéries d'adhérer aux surfaces épithéliales de l'hôte (Gupta et al., 1994; Pier, 1985; Sheth et al., 1994). En effet, les mutations des pili engendrent une diminution importante de l'adhérence bactérienne aux pneumocytes, et les pneumonies provoquées par ces mutants sont moins sévères comparées à celles induites par la souche sauvage (Comolli et al., 1999; Farinha et al., 1994). Les pili sont aussi fortement impliqués dans la formation de biofilms. Ils

interviennent ainsi dans l'adhésion aux supports, la formation de micro-colonies et chez PA, dans le développement de la structure du biofilm en forme de champignon (Chiang et Burrows., 2003; Filloux et Vallet., 2003; O'Toole et Kolter., 1998; Wagner et Iglewski., 2008).

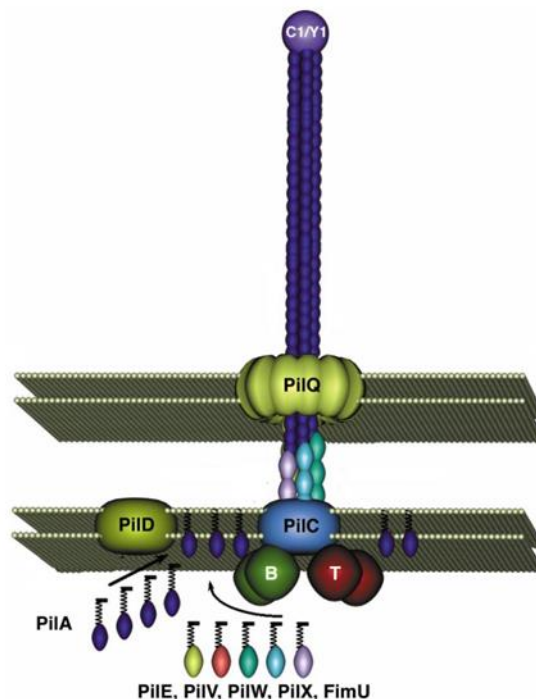


Figure 9 : Représentation schématique du pili de type IV. La fibre majeure à l'origine de la formation du pili est principalement composée de la sous-unité PiiA (Mattick., 2002)

Le lipopolysaccharide

La forte présence du lipopolysaccharide (LPS) dans la membrane externe confère à la bactérie une stabilité membranaire, une protection contre l'action de certains antibiotiques, ainsi qu'une protection contre les mécanismes de défense de l'hôte. Le LPS est considéré comme un facteur de virulence important. En effet, des mutants présentant une altération au niveau de la structure du LPS sont moins virulents que la souche sauvage (Cryz et al., 1984). Le LPS joue un rôle dans l'adhésion par le biais d'une fixation aux récepteurs TLR4 ou à la protéine CFTR (Bäckhed et al., 2003; Hajjar et al., 2002; Tang et al., 1996). La fixation à la protéine CFTR joue un rôle dans la clairance de la bactérie au sein des poumons des patients atteints de la mucoviscidose.

Le LPS est constitué de trois parties (**Figure 10**) : 1) le lipide A, partie hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la membrane externe de la bicouche lipidique, 2) une partie polysaccharidique hautement spécifique dite antigène-O, 3) la noyau oligosaccharidique reliant le lipide A et l'antigène-O (Lam et al., 2011).

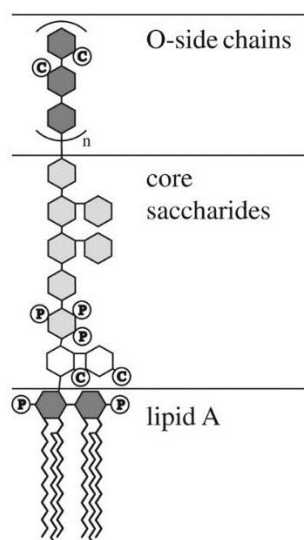


Figure 10 : Représentation schématique de la structure du LPS. P : groupement phosphate ; C : groupement carboxylate (Schneck et al., 2009)

Le lipide A est appelé également endotoxine car il joue un rôle important dans la pathogénicité. Il est responsable de la majorité des activités toxiques et immuno-modulatrices du LPS. En effet, il interagit avec les récepteurs eucaryotes tels que le TLR4 et asialo-GM1 de l'hôte et entraîne la stimulation de la réponse inflammatoire (Hajjar et al., 2002; Kipnis et al., 2006; Kopp and Medzhitov, 2003; Loppnow et al., 1989).

Le cœur oligosaccharidique, hydrophile, est constitué de chaînes polysaccharidiques. Il se subdivise en un cœur interne et un autre externe. La partie externe est impliquée dans l'internalisation de PA par les cellules épithéliales en se liant au récepteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Dans le cas de la mucoviscidose, l'absence ou le dysfonctionnement du récepteur CFTR conduit à un retard dans la réponse immunitaire des patients (Pier, 2007).

L'antigène O est une partie polysaccharidique variable qui déborde de la membrane externe. Le sérotypage et l'identification antigénique de PA est basée sur cette partie du LPS (Rocchetta et al., 1999). L'antigène O est impliqué dans la plupart des interactions entre la bactérie et son environnement ou entre la bactérie et la cellule hôte. Pendant les infections causées par PA, l'antigène O protège les bactéries de la phagocytose, de l'action de système du complément et des espèces réactives de l'oxygène (Berry et al., 2009; Dasgupta et al., 1994; King et al., 2009). La présence ou l'absence de cet antigène du noyau oligosaccharidique permet d'identifier le phénotype bactérien. Lorsque cet antigène est présent, on est en présence d'un phénotype lisse qui est considéré comme le plus virulent chez PA (Cryz et al., 1984). L'antigène O est

Revue bibliographique: Facteurs de virulence

hautement immunogène et induit une forte réponse immunitaire de l'hôte infecté. Au cours des infections chroniques, *PA* interrompt la synthèse de cet antigène.

La perte de l'antigène O réduit également la liaison ionique de la gentamicine à la surface des bactéries rendant les souches plus résistantes à cette dernière (Kadurugamuwa et al., 1993). L'antigène O intervient également dans la formation du biofilm en modifiant les propriétés de surface et donc, de ce fait, la capacité de la bactérie à adhérer aux supports (Murphy et al., 2014).

Les lectines

PA synthétise deux types de lectines : PA-IL (ou LecA) et Pa-IIL (ou LecB) pouvant lier spécifiquement le galactose et le fructose, respectivement (Imberty et al., 2004). Les deux protéines sont principalement présentes dans le cytoplasme mais ont aussi été identifiées sur la surface de la membrane externe de la bactérie (Tielker et al., 2005). Elles sont impliquées dans la reconnaissance et l'adhésion aux cellules hôtes et dans la formation de biofilms (Chemani et al., 2009; Diggle et al., 2006; Smadhi et al., 2014; Tielker et al., 2005). La PA-IL possède un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales des voies respiratoires en diminuant leur taux de croissance (Bajolet-Laudinat et al., 1994). La lectine PA-IL, quant à elle, a la capacité d'inhiber le battement ciliaire des cellules pulmonaires in vitro (Adam et al., 1997). En outre, elle intervient dans la biosynthèse des pili et dans l'activation de la protéase IV impliquée dans la virulence de *PA* (Sonawane et al., 2006).

La protéine OprF

OprF est une porine majoritaire de la membrane externe de *PA*. Cette protéine est fortement impliquée dans la virulence de *PA*. En effet, des études sur des mutants OprF ont montré une altération importante dans la capacité d'adhésion aux cellules eucaryotes, la sécrétion des exotoxines du système de sécrétion de type 3, ainsi que dans la production de certains facteurs tels que la pyocyanine, l'élastase, l'exotoxine A et les molécules du QS et du PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) (Fito-Boncompte et al., 2011; Hassett et al., 2002; Wu et al., 2005). Cette protéine a pour rôle la diffusion non spécifique de certains ions et nutriments polaires de petites tailles tels que les polysaccharides (Nestorovich et al., 2006). Elle est également impliquée dans l'adhésion aux cellules eucaryotes et dans la formation du biofilm (Azghani et al., 2002; Yoon et al., 2002).

IV.2-Les facteurs de virulence extracellulaires

Exotoxines

Exotoxine A : L'exotoxine A (ExoA), codée par le gène *toxA* (ou *exoA*), est la protéine la plus toxique sécrétée par *PA*. Ce polypeptide de 69 kDa subit un clivage de 25 résidus du côté N-terminal avant sa sécrétion, conduisant à une toxine mature de 66 kDa (sous-unités A et B) (Weldon and Pastan, 2011). La protéine est constituée de trois domaines distincts : i) le domaine I, impliqué dans la reconnaissance de la cellule hôte *via* le récepteur LRP (Low density lipoprotein Receptor-related Protein) appelé également le « CD91 » ou le « alpha 2-macroglobulin receptor », ii) le domaine II, impliqué dans sécrétion de l'ExoA dans le périplasme et dans la translocation de la toxine à partir de la vésicule eucaryote après son internalisation par endocytose (Weldon and Pastan, 2011) et iii) le domaine III qui est le domaine catalytique (Wick et al., 1990).

ExoA joue un rôle crucial dans la virulence. En effet, un mutant déficient pour cette toxine, est 20 fois moins virulent que la souche sauvage chez la souris (Miyazaki et al., 1995). Cette toxine est considérée comme la protéine la plus toxique sécrétée par *PA*, et des études ont montré une nette diminution de la virulence bactérienne après mutation de *toxA* (Lory, 1986; Miyazaki et al., 1995). ExoA inhibe les facteurs d'élongation (EF-2) provoquant ainsi un défaut de synthèse protéique qui induit la mort cellulaire (Perentesis et al., 1992; Wick et al., 1990). Elle a également un effet limitant sur la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant l'activation et la libération de certaines cytokines (Weber et al., 2016). Chez la souris, la toxicité d'ExoA de *PA* est 10 000 fois plus élevée que celle de son endotoxine (Iglewski and Kabat, 1975; Weldon and Pastan, 2011).

Exotoxines S et T (Exo S et ExoT) : Les exotoxines S et T (ExoS et ExoT) sont deux exotoxines homologues (homologie de séquence de 76%) (Liu et al., 1997). Ces deux toxines sont des protéines bi-fonctionnelles qui possèdent une activité GAP (GTPase Activating Protein) en N-terminal et une activité ADPRT (ADP-ribosyl transférase) en C-terminal (Barbieri and Sun, 2004; Goehring et al., 1999; Rocha et al., 2003).

Les cibles de l'activité GAP de ces deux exotoxines sont les petites GTPases de la famille Rho, Rac et CDC42, impliquées dans la régulation et le maintien du cytosquelette d'actine et dans la phagocytose des bactéries (Krall et al., 2000; Pederson et al., 1999).

L'activité ADPRT nécessite la présence de la protéine eucaryote soluble FAS (factor activating exoenzyme S), qui appartient à la famille des protéines 14-3-3 (Fu et al., 1993; Knight et al.,

Revue bibliographique: Facteurs de virulence

1995). Les activités ADPRT d'ExoS et d'ExoT ont des substrats différents. L'activité ADPRT d'ExoS agit préférentiellement sur les protéines des voies de signalisation de la famille Ras. Cette action provoque plusieurs effets complexes sur un certain nombre de processus cellulaires eucaryotes, y compris l'inhibition de la synthèse de l'ADN, des altérations de la morphologie et la différenciation cellulaire, la perturbation de l'adhérence cellulaire, l'inhibition de la phagocytose et l'apoptose (Fraylick et al., 2001; Ganesan et al., 1999; Henriksson et al., 2000; Rocha et al., 2003).

L'activité ADPRT d'ExoT agit sur les phosphoglycérate kinases CrkI et CrkII impliquées dans l'adhésion et la phagocytose (Liu et al., 1997; Sun and Barbieri, 2003; Sundin et al., 2001). Malgré son rôle dans la virulence de la bactérie, ExoT est considérée comme étant une cytotoxine mineure par rapport aux autres exotoxines (ExoS et ExoU). En effet, l'activité ADPRT d'ExoT représente entre 0,2 et 1% de l'activité d'ExoS (Barbieri and Sun, 2004; Shaver and Hauser, 2004). La cytotoxicité de ExoS est peut être également liée au fait qu'elle est capable de moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Epelman et al., 2000).

Exotoxine Y : L'exotoxine Y (ExoY), produit du gène *exoY*, est une adénylate cyclase de 48 kDa (Belyy et al., 2018). L'injection de l'exotoxine Y dans les cellules de l'hôte est à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc en présence d'un cofacteur des cellules de l'hôte (Elsen et al., 2014). Ceci aboutit à la désorganisation du cytosquelette d'actine, l'arrondissement de la cellule, l'inhibition de l'endocytose des bactéries et l'augmentation de la perméabilité endothéliale (Cowell et al., 2005; Kloth et al., 2018; Kroken et al., 2018).

Exotoxine U : L'exotoxine U (Exo U), produit du gène *exoU* est une phospholipase très puissante qui agit sur les membranes cellulaires conduisant à la nécrose des cellules eucaryotes ciblées (Klockgether and Tümmler, 2017; Sitkiewicz et al., 2007). Une fois dans le cytosol des cellules hôtes, ExoU va être rapidement associée à la membrane et activée par les superoxydes dismutases (SOD) eucaryotes à Zn^{2+} et Cu^{2+} (Rabin et al., 2006; Sato et al., 2003; Stirling et al., 2006). Cette protéine est l'effecteur le plus cytotoxique, sa cytotoxicité étant 100 fois plus élevée que celle d'ExoS (Allewelt et al., 2000; Lee et al., 2005). Outre son activité cytotoxique, ExoU peut induire la réponse inflammatoire de l'hôte (Cuzick et al., 2006; McMorran et al., 2003; Saliba et al., 2005). Cette toxine est également capable d'inhiber l'activation de la caspase-1 et donc la sécrétion d'IL- β 1 et IL-18 (Sutterwala et al., 2007).

Phospholipases

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires d'environ 80 kDa contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique. L'activité majeure de ces phospholipases est l'hydrolyse des liaisons phosphodiester des glycérophospholipides très abondantes dans le surfactant pulmonaire, ce qui favorise la colonisation bactérienne (Kipnis et al., 2006; Lazdunski et al., 1990; Wargo et al., 2009). Leur activité permet également la libération de certains messagers lipidiques et la libération de molécules inflammatoires (König et al., 1997; Wilson et al., 2011). A ce jour, quatre types de phospholipases sont connus: les phospholipases A, B, C et D. Celles-ci sont secrétées par la bactérie dans le milieu extracellulaire.

La plus connue et étudiée est la phospholipase C (PLC). *PA* possède trois PLC présentant des spécificités de substrat différentes (Stonehouse et al., 2002) : PlcH (Hémolytique), PlcN (Non-hémolytique), et PlcB, une phospholipase spécifique de la phosphatidyl-ethanolamine (Barker et al., 2004; Ostroff et al., 1990). PlcH est très cytotoxique. Cette dernière peut déstabiliser la réponse inflammatoire de l'hôte en empêchant une réponse oxydative des neutrophiles (Terada et al., 1999). Il a également été démontré que la mutation du gène *plcH* entraîne une diminution de la virulence de PAO1 (Kida et al., 2011; Ostroff et al., 1990). Les protéines PlcB et PlcN jouent un rôle dans la formation du biofilm. En effet, la mutation des gènes *plcB* et *plcN* entraîne l'apparition d'un phénotype dit hyper biofilm (Lewenza et al., 2017).

Les PLCs peuvent également agir de manière importante sur le chimiotactisme, la mobilité de type « twitching » et dans la persistance de l'infection pulmonaire chronique (Barker et al., 2004; Wilderman et al., 2001). Elles ont le pouvoir de dégrader les lipides et les lécithines lorsque leur action est associée à l'activité des rhamnolipides.

Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biosurfactants glycolipidiques composés d'une tête polaire hydrophile, glycosylée et d'une queue hydrophobe d'acide gras (3-hydroxyalkanoïque). Plus précisément, il existe deux grandes classes de rhamnolipides, les mono-rhamnolipides et les di-rhamnolipides, constitués respectivement par une ou deux unités rhamnose (Rahim et al., 2001) (**Figure 11**).

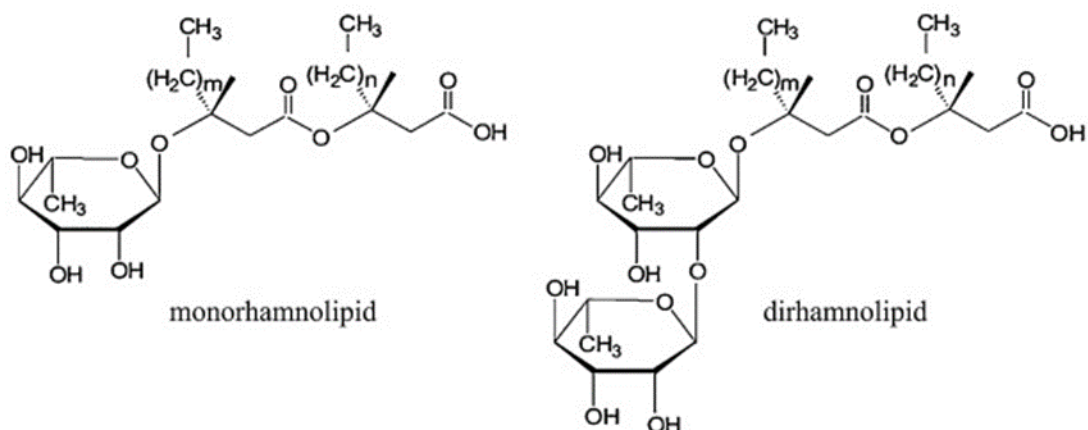


Figure 11 : Structure des rhamnolipides (Dobler et al., 2016)

PA produit vingt-huit rhamnolipides qui diffèrent en longueur de chaîne et/ou en degré de saturation de l'acide gras (Desai and Banat, 1997; Déziel et al., 1999). La biosynthèse des rhamnolipides fait intervenir deux rhamnosyltransférases, codées par les gènes *rhlB* et *rhlC*, et une protéine associée à la membrane interne RhlA. La production de rhamnolipides coïncide avec la phase stationnaire de croissance et est sous le contrôle du quorum sensing RhlR/RhlI (Dekimpe and Déziel, 2009).

Les rhamnolipides possèdent une activité antimicrobienne (Wang et al, 2005) et une activité hémolytique (Fujita et al., 1988). Les rhamnolipides contribuent donc à l'invasion du tissu pulmonaire par *PA* (Kownatzki et al., 1987). En effet, ils altèrent la structure des jonctions serrées de l'épithélium des voies respiratoires et favorisent ainsi l'invasion par *PA* (Zulianello et al., 2006). Comme le flagelle et les pili de type IV, les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type « swarming » (Caiazza et al., 2005; Zulianello et al., 2006). Plus récemment, il a été démontré que la production de rhamnolipides était fortement liée à la production du facteur de virulence LasB. En effet des études menées sur les mutants Δ LasB ont montré un défaut de synthèse des rhamnolipides. Ceci laisse supposer l'existence d'un mode de régulation entre la production de LasB et la synthèse des rhamnolipides (Yu et al., 2014). Ils participent également aux différentes étapes de formation du biofilm : formation de micro-colonies, organisation de l'architecture tridimensionnelle, et dispersion ultérieure du biofilm (Al-Tahhan et al., 2000; Boles et al., 2005; Davey et al., 2003; Pamp and Tolker-Nielsen, 2007; Wang et al., 2013). Ces biosurfactants peuvent également avoir une activité antimicrobienne contre d'autres bactéries (Bharali et al., 2013; Magalhães and Nitschke, 2013). Ils limitent en outre la phagocytose et induisent la nécrose des leucocytes polymorphonucléaires (Jensen et al., 2007).

Protéases

Les protéases sont des enzymes qui ont pour fonction l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines. Chez *PA*, on distingue deux types de protéases sécrétées: les métalloprotéases, ainsi appelées en raison de la présence dans leur site actif d'un ion métallique (LasB, LasA, protéase alcaline, aminopeptidase) et les sérine-protéases, appelées ainsi car leur site actif contient un résidu sérine (protéase IV et LasD).

Elastase LasB : Las B est une métalloprotéase à zinc, codée par le gène *lasB* (Kessler and Safrin, 1988; McIver et al., 1995). LasB détruit la matrice extracellulaire des tissus des voies respiratoires et conjonctifs en dégradant l'élastine et le collagène. Elle peut aussi engendrer une destruction des jonctions entre les cellules épithéliales (Azghani et al., 2000). Elle est capable de moduler la réponse immunitaire de l'hôte, en stimulant la réponse inflammatoire *via* l'induction de l'accumulation des neutrophiles et la production de l'interleukine IL-8 (Kon et al., 1999), mais également en évitant la phagocytose par la dégradation des protéines surfactantes, SP-A et SP-D, et des récepteurs à protéases (Alcorn and Wright, 2004; Kuang et al., 2011). LasB est aussi capable d'inactiver les immunoglobulines comme les IgA et les IgG, et des molécules du complément, telles que C1q et C3 (Heck et al., 1990; Hong and Ghebrehiwet, 1992). Des études ont montré que la production de LasB était augmentée en condition de faible oxygénation, condition retrouvée au sein d'un biofilm. De même, elle pourrait favoriser, en partie, la formation de biofilm *via* la régulation de la production des rhamnolipides (Yu et al., 2014).

Elastase LasA : LasA est une métalloprotéase à zinc de 45 kDa codée par le gène *lasA*. LasA possède une activité élastolytique plus faible que LasB. Elle est impliquée dans la protéolyse et la dégradation de l'élastine de la cellule hôte (élastolyse) (Estrellas et al., 2000; Park et al., 2001). Elle est aussi importante pour améliorer la fonction de LasB dans la dégradation de l'élastine et d'autres tissus conjonctifs (Kessler et al., 1993; Toder et al., 1994). D'autre part, LasA exerce une activité staphylolytique puissante. En effet, elle clive les liaisons peptidiques du peptidoglycane de *Staphylococcus aureus*, permettant ainsi à *PA* de prédominer lors des infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (Barequet et al., 2004, 2009; Kessler et al., 1993).

Protéase alcaline AprA : AprA est une métalloprotéase à zinc de 56 kDa codée par le gène *aprA* (Okuda et al., 1990). Son rôle dans la pathogénèse est connu dans les infections cornéennes (Guzzo et al., 1991). Elle participe également dans la physiopathologie des pneumopathies aiguës (Kipnis et al., 2006). Son activité majeure est la lyse de la fibrine et l'inhibition de sa formation (Kipnis et al., 2006). Elle dégrade également les protéines du système du complément de l'hôte (Laarman et al., 2012). De plus, AprA joue un rôle immunomodulateur très important au cours de l'infection à PA. En effet, elle dégrade plusieurs composants du système immunitaire de l'hôte, tels que les anticorps C1q et C3, ou les cytokines telles que IFN- γ et de TNF- α (Hong and Ghebrehiwet, 1992; Horvat and Parmely, 1988; Leidal et al., 2003; Parmely et al., 1990). Cette protéase interfère aussi avec la signalisation de la flagelline en empêchant l'activation de TLR5 par le clivage de monomères de flagelline et en aidant PA à éviter la détection immunitaire (Bardoel et al., 2011).

La protéine CbpD et la protéase LasD : La protéine « chitin-binding protein » (CbpD) est une protéase de 43 kDa (39kDa sans peptide signal) codée par le gène *cbpD*. CbpD peut se lier à la chitine mais n'a pas d'activité staphylolytique. La protéine CbpD sans peptide signal est clivée par l'élastase LasB au niveau du domaine C-terminal de la protéine, et ce dans le milieu extracellulaire. Le principal produit de dégradation de CbpD présente un poids moléculaire d'environ 30 kDa. Cette dernière protéine est clivée en un fragment actif de 23 kDa, nommé Las D (Folders et al., 2000). Toutefois, aucun de ces produits de dégradation ne se lie à la chitine. Contrairement à CbpD, LasD agit comme une protéase staphylolytique c'est-à-dire qu'elle participe à la dégradation de la bactérie *Staphylococcus aureus*, afin que PA puisse s'installer de manière prédominante au niveau des poumons (Park and Galloway, 1995, 1998). Elle est aussi impliquée dans la maturation de LasA (Folders et al., 2000).

Protéase IV : La protéase IV (PrpL ou « Pvds-regulated endoprotease ») est une endoprotéase de 26 kDa codée par le gène *prpL* (Traidej et al., 2003; Wilderman et al., 2001). En association avec d'autres protéases, elle joue un rôle majeur dans l'infection de la cornée.

Cette protéase est capable de dégrader un certain nombre de protéines, y compris le fibrinogène, le plasminogène, l'immunoglobuline G, des composants du complément C1q et C3. Bien que la protéase IV soit connue pour jouer un rôle dans la kératite (Matsumoto, 2004), elle est également impliquée dans l'infection pulmonaire par dégradation des protéines A, B et D du surfactant pulmonaire (Engel et al., 1998; Malloy et al., 2005). Lors d'une invasion

bactérienne, cette protéase agit en synergie avec LasB, LasA et la protéase alcaline (Matsumoto, 2004; Suter, 1994).

Pyocyanine

La pyocyanine est une phénazine de couleur bleu-vert, avec une activité oxydoréductrice très importante (Wang et al., 2010). Ce pigment a été observé dans la plupart des isolats cliniques de *PA* en phase stationnaire de croissance chez les patients atteints de mucoviscidose (Wilson et al., 1988). Il a été démontré récemment que ce pigment conduisait à une hyperplasie des cellules à gobelet et à une surproduction de mucus chez la souris, rappelant ainsi un phénotype ressemblant à celui de la mucoviscidose (Hao et al., 2012).

A ce jour, de nombreuses études ont montré l'importance de la pyocyanine dans la pathogénicité et la virulence de *PA* (Hall et al., 2016). En effet, en plus de son implication dans la production des espèces réactives d'oxygène (ROS), elle peut également inactiver la catalase des cellules épithéliales, ce qui induit un stress oxydatif dans la cellule hôte (Miller et al., 1987; Müller et al., 1989; Muller, 2002; O'Malley et al., 2003; Rada and Leto, 2009). D'autre part, la pyocyanine cible le système immunitaire. En effet, elle est capable d'induire l'apoptose des neutrophiles, d'inhiber la prolifération des lymphocytes et d'augmenter l'expression de l'IL-8 (Allen et al., 2005; Denning et al., 1998; Leidal et al., 2001; Mühlradt et al., 1986; Nutman et al., 1987) ce qui permet la survie bactérienne.

Les sidérophores

Les sidérophores sont des petites molécules qui assurent la chélation et le transport du fer à l'intérieur de la bactérie. Le complexe fer-sidérophore est capté par un récepteur spécifique à la surface de la membrane externe. Cette action permet à la bactérie de disposer d'une concentration en fer suffisante pour sa prolifération. Ces sidérophores jouent alors un rôle important dans la virulence (Meyer et al., 1996; Schalk and Guillon, 2013). En milieu carencé en fer, *PA* produit des sidérophores tels que la pyochéline et la pyoverdine (Pa, PaA et PaB) (Cox and Adams, 1985; Meyer et al., 1997). La pyoverdine, caractérisée par une couleur jaune-vert, possède une affinité pour le fer nettement plus élevée que la pyochéline (Eyquem et al., 2000; (Schalk and Guillon, 2013).

Outre son rôle dans l'acquisition de fer dans le poumon, les pyoverdines sont également impliquées dans le développement du biofilm (Haas et al., 1991; Peek et al., 2012). Elles jouent aussi le rôle de régulateur positif dans la transcription d'autres facteurs de virulence tels que l'exotoxine A (Lamont et al., 2002). La pyochéline peut être aussi impliquée dans la production

de radicaux hydroxyles cytotoxiques, contribuant ainsi à la destruction des cellules épithéliales pulmonaires (Britigan et al., 1992).

IV.3-Les facteurs de virulence associés au biofilm

Contrairement aux cellules planctoniques, les cellules en biofilm sont intégrées dans une matrice extracellulaire autoproduite qui les maintient dans cette communauté.

Cette matrice est formée de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui sont principalement des polysaccharides tels que les alginates ou les exopolysaccharides Psl (« polysaccharide synthesis locus ») ou Pel (pellicule) (Ryder et al., 2007), de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire (eDNA). Au sein du biofilm, les bactéries représentent moins de 10% de la masse sèche alors que la matrice extracellulaire peut représenter plus de 90% de celle-ci (Flemming and Wingender, 2010). La composition de la matrice dépend des conditions environnementales (pH, salinité, température), de l'âge du biofilm et de l'espèce impliquée.

L'algininate, composé de polymères répétés d'acides D-mannuroniques et d'acides L-glucuroniques liés par des liaisons β -1,4 (McCaslin et al., 2015), est l'EPS majeur produit par les souches de *PA* isolées des poumons de patients atteints de mucoviscidose (Govan and Deretic, 1996; Hentzer et al., 2001). Cette sur-expression procure à ces souches leur phénotype mucoïde caractéristique (Wozniak et al., 2003). L'algininate contribue ainsi directement à la gravité de ces infections, en protégeant les cellules microbiennes de leur opsonisation par les anticorps de l'hôte et en empêchant la diffusion des antibiotiques au sein du biofilm (Govan and Deretic, 1996). Il est impliqué dans la résistance aux antibiotiques et dans l'évasion immunitaire, en piégeant les radicaux libres libérés par les neutrophiles et les macrophages (McCaslin et al., 2015; Simpson et al., 1993; Ueno and Oda, 2014). La production d'algininate par *PA* diminue l'efférocytose (processus physiologique permettant d'éliminer les cellules en apoptose, évitant ainsi qu'elles n'entrent en nécrose) des macrophages de plus de 50 % (McCalistin et al., 2015).

Les souches non-mucoïdes forment des biofilms indépendamment de la production d'algininate. En effet, des exopolysaccharides alternatifs Psl et Pel se substituent à l'algininate chez ces souches (Mann and Wozniak, 2012; Wei and Ma, 2013).

Le polysaccharide Psl est riche en mannose et galactose (Ma et al., 2007). Ce polysaccharide permet de renforcer l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion cellule-surface, élément clé dans la formation précoce du biofilm (Ma et al., 2007). Il protège également de la phagocytose par les neutrophiles et du stress oxydatif pendant l'infection (Mishra et al., 2012).

Revue bibliographique: Facteurs de virulence

Le polysaccharide Pel est synthétisé par les produits du cluster *pel* (*PelA-F*). Il est riche en glucose, mais sa nature et sa composition exacte sont inconnues. La mutation du cluster *pel* entraîne une déficience dans la formation de pellicules chez la souche *PA14*. Pel est également nécessaire pour la formation des biofilms sur surface solide (Friedman and Kolter, 2004). La mutation de *pel* chez la souche *PAK* n'exprimant pas de pili, engendre un défaut de fixation sur support solide. Ces données suggèrent que le polysaccharide Pel joue le rôle de facteur d'adhésion pour compenser l'absence d'autres adhésines telles que les pili de type IV (Vasseur et al., 2005). Ce polysaccharide maintient également les interactions cellule-cellule dans les biofilms de la souche *PA14*, et améliore leur résistance aux antibiotiques (Colvin et al., 2011). L'eDNA est également un composant principal d'EPS de *PA*. Cet eDNA pourrait provenir de la lyse d'une sous population bactérienne au sein du biofilm mais il pourrait également être sécrété, ou libéré *via* des vésicules membranaires (Renelli et al., 2004; Wei and Ma, 2013; Yang et al., 2007). Il interviendrait dans l'adhésion intercellulaire, et dans le maintien de la structure tridimensionnelle du biofilm (Whitchurch et al., 2002; Yang et al., 2007). Il possède une activité antimicrobienne et contribue à la résistance aux peptides antimicrobiens et aux aminoglycosides (Mulcahy et al., 2008).

V- Les systèmes de sécrétion chez *Pseudomonas aeruginosa*

Pour que les micro-organismes pathogènes parviennent à infecter leurs hôtes, les facteurs de virulence doivent franchir l'enveloppe bactérienne pour se positionner à la surface de la bactérie, être sécrétés dans le milieu extracellulaire, ou transloqués directement dans le cytosol de la cellule cible (Cossart and Sansonetti, 2004; Merrell and Falkow, 2004). Pour se faire, les bactéries ont développé des nanomachines moléculaires complexes dont chacune assure la sécrétion de molécules spécifiques : les systèmes de sécrétion. Il existe des similitudes frappantes entre les systèmes de sécrétion et les pili de type IV (SST2), les flagelles (SST3), ou bien encore la queue du bactériophage (SST6) suggérant une transformation progressive des complexes macromoléculaires des enveloppes cellulaires initialement non dédiés à la sécrétion. Ces systèmes sont bien conservés chez les bactéries à Gram-négatif (Bleves et al., 2010; Desvaux et al., 2007; Filloux et al., 1990).

A ce jour, cinq systèmes de sécrétion (SST1, SST2, SST3, SST5 et SST6) ont été caractérisés chez *PA* (**Figure 12**). Le système de sécrétion de type 4 est le seul système encore non trouvé chez *PA*.

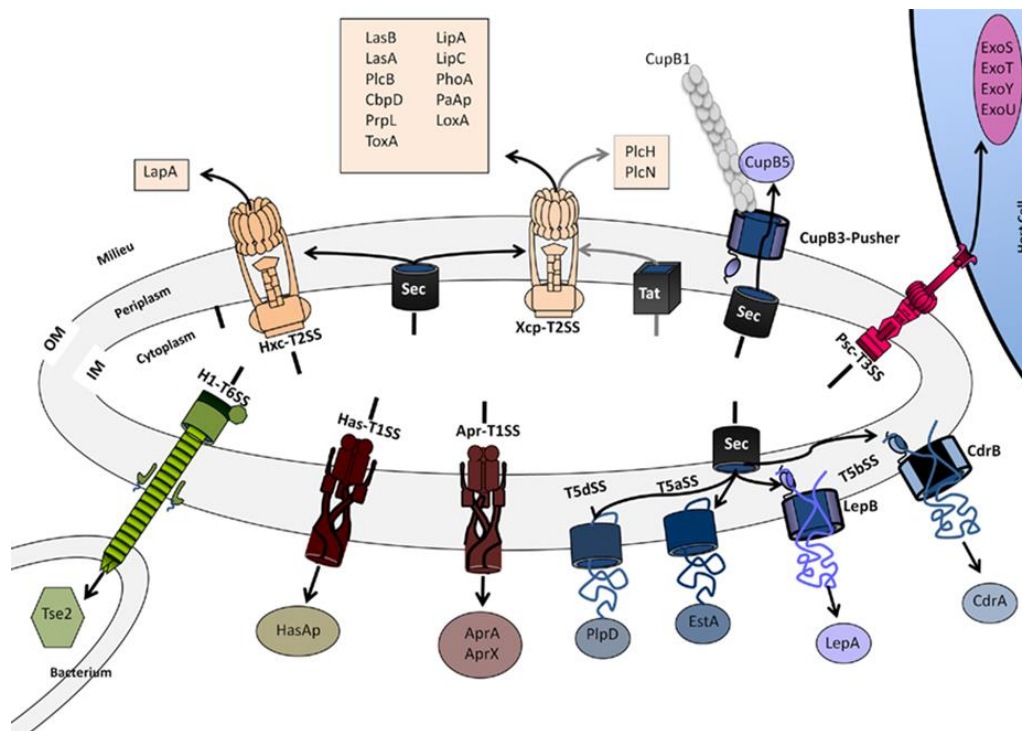


Figure 12 : Les systèmes de sécrétion chez *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux, 2011)

Certains systèmes effectuent la sécrétion en une seule étape (SST1, SST3 et SST6).

Dans ce cas, les protéines sécrétées ne portent pas de peptides signaux. En revanche, d'autres mécanismes (SST2 et SST5) assurent uniquement la sécrétion à travers la membrane externe. Ils nécessitent donc une première étape d'export des protéines dans le périplasma. Cette étape est assurée par la voie générale de sécrétion Sec (« General secretory »), ou par la voie Tat (« Twin arginine translocation »). Les protéines qui empruntent ces systèmes sont synthétisées comme des précurseurs avec un peptide signal N-terminal qui cible l'une des voies Sec ou Tat. La voie Sec prend en charge les protéines non repliées, tandis que la voie Tat assure l'export des protéines repliées (Bleves et al., 2010; Voulhoux et al., 2001).

V.1-Système de sécrétion de type 1

Le système de sécrétion de type 1 (SST1) ressemble beaucoup à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette), qui exportent de petites molécules telles que des antibiotiques et des toxines hors de la cellule bactérienne (Symmons et al., 2009). La machinerie de sécrétion de SST1 est composée de trois parties : une protéine de la membrane externe qui forme un pore en tonneau β hydrophile, un ABC transporteur (ATP Binding Cassette) inséré dans la membrane interne, qui fournit l'énergie nécessaire pour le transport, et une protéine de fusion membranaire (MFP), qui relie l'ABC transporteur à l'OMP (Delepelaire, 2004; Holland et al., 2005). Ce système permet le transport en une seule étape de nombreuses substances depuis le cytoplasme jusqu'à l'espace extracellulaire (**Figure 12**).

La plupart des protéines à sécréter possèdent une séquence "signal" en partie C-terminale faiblement conservée, qui n'est pas clivée durant la sécrétion (Duong et al., 2001; Gerlach and Hensel, 2007). Ce signal de sécrétion interagit avec le domaine NBD (Nucleotide Binding Domain) de l'ABC transporteur et provoque un changement de conformation qui conduit à l'hydrolyse de l'ATP. L'énergie résultante servira pour le passage de la protéine à sécréter *via* le SST1 (Holland et al., 2005). Il existe de nombreux transporteurs ABC connus chez *PA*. Parmi ces systèmes, les plus connus sont Apr (AprDEF) qui permet la sécrétion de la protéase alcaline AprA (Guzzo et al., 1991) et d'une protéine de fonction inconnue AprX (Duong et al., 2001) et Has (HasDEF) qui permet la sécrétion de la protéine HasAp capable de chélater l'hème (Létoffé et al., 1998; Wandersman and Delepelaire, 2004).

V.2-Système de sécrétion de type 3

Le système de sécrétion de type 3 (SST3) est une machinerie spécifique et hautement conservée chez les bactéries à Gram négatif pathogènes telles que *Yersinia* ou encore *PA*, même si chaque pathogène transporte un groupe unique de protéines (Yahr and Wolfgang, 2006)

Sous l'influence de signaux environnementaux particuliers, le SST3 va permettre à la bactérie de délivrer, en une seule étape, les molécules effectrices directement dans le cytosol des cellules cibles ((humain, plante, insecte, nématode) (Cornelis, 2002; Gerlach and Hensel, 2007). Chez *PA*, le SST3 est une arme de virulence majeure qui contribue à la cytotoxicité et aux infections aiguës (Hauser, 2009). Il assure la sécrétion de 4 exotoxines ExoS, ExoT, ExoY et ExoU. L'activation de ces effecteurs nécessite un co-facteur eucaryote des cellules hôtes (Berube et al., 2017).

Chez *PA*, 5 opérons (*pscNOPQRSTU* et *popNpcr1234DR*, *pcrGVHpopBD*, *exsCEB* et *exsDpscBCDEFGHIJKL*), situés de manière contiguë sur le chromosome, codent respectivement pour les protéines de l'appareil de sécrétion, les protéines de l'appareil de translocation et les protéines de régulation du SST3 (Laskowski et al., 2004; Yahr and Wolfgang, 2006). Il est constitué d'un corps basal, d'une aiguille de sécrétion, et d'un pore membranaire dit translocon (Galle et al., 2012).

Le corps basal est composé entre autres, de PscC et PscN. L'aiguille est formée par la polymérisation de la protéine PscF. Elle mesure 60-80 nm de long et 7 nm de large (Pastor et al., 2005). Le translocon est constitué des protéines PopB, PopD et PcrV. Ce dernier correspond à un pore protéique membranaire qui permet le transport des protéines sécrétées par l'aiguille à travers la membrane plasmique des cellules de l'hôte (Bleves et al., 2010; McCaw et al., 2002). Il peut aussi causer la mort des cellules de l'hôte en perturbant la perméabilité membranaire et induire la réponse immunitaire de l'hôte (Dacheux et al., 2001; Lee et al., 2005; Shafikhani and Engel, 2006; Vance et al., 2005).

V.3-Système de sécrétion de type 6

Le système de sécrétion de type 6 (SST6) a été décrit pour la première fois chez *Vibrio cholerae* (Pukatzki et al., 2006). Ce système d'injection permet le transfert d'effecteurs dans les cellules procaryotes et eucaryotes (Russell et al., 2014) (**Figure 12**). Il participe ainsi à la compétition inter-bactérienne et à la pathogenèse. Cette structure s'assemble sur une plate-forme appelée « base-plate » connectée au complexe membranaire. Le SST6 fonctionne comme une nano-

arbalète : lors de la contraction de la gaine, le tube interne (Hcp) est propulsé vers la cellule cible, ce qui permet la translocation des protéines effectrices. La protéine VgrG, au sommet de la structure tubulaire Hcp, agit comme un dispositif de perforation (Hachani et al., 2014; Mougous et al., 2006). Chez *PA*, trois loci, H1-SST6, H2-SST6 et H3-SST6, avec environ 15 à 20 gènes chacun codant pour les composants du SST6 ont été trouvés (Mougous et al., 2006 ; Hood et al., 2010). A ce jour, seul le fonctionnement du H1-SST6 a été clairement élucidé (Zoued et al., 2014). Il implique la protéine Fha1, l'ATPase ClpV1 et la sérine/thréonine kinase PpkA. La protéine kinase PpkA, requise pour l'assemblage du H1-SST6 (Hsu et al., 2009; Mougous et al., 2007), phosphoryle la protéine Fha1 ce qui permet la formation d'un complexe cytoplasmique Fha1-ClpV1. Ce complexe est à son tour dirigé vers le site membranaire de la machinerie H1-SST6 de *PA*.

Parmi les effecteurs de ces systèmes, on trouve les protéines VgrG et Hcp. Au sein du génome de PAO1, il a été identifié 10 gènes *vgrG* et 5 gènes *hcp* (Hachani et al., 2011). Les protéines Hcp1 et VgrG sont sécrétées par le SST6 et contribuent à la pathogénicité de *PA* (Filloux et al., 2008; Hachani et al., 2011). Ces protéines présentent une dualité de fonctions en termes d'effecteurs et/ou d'élément de structure des SST6. Elles sont dépourvus de peptide signal et nécessitent un SST6 fonctionnel pour leur libération dans le milieu extracellulaire (Hachani et al., 2011, 2014; Hood et al., 2010; Mougous et al., 2006). La protéine Hcp1 a été retrouvée dans les crachats de patients atteints de mucoviscidose colonisés par *PA* et des anticorps anti-Hcp1 ont été découverts dans un sérum CF. Ceci suggère que la sécrétion d'Hcp est aussi importante in vitro qu'in vivo (Mougous et al., 2006). Les protéines VgrG peuvent également agir comme de véritables effecteurs grâce à une extension C-terminale (ACD), trouvée uniquement dans certains protéines VgrG, appelés « VGRG évolués » (Filloux et al., 2008; Pukatzki et al., 2009). Chez *Vibrio cholerae*, l'extension C-terminale de VgrG1 est homologue au domaine ACD de sa toxine RtxA. Le domaine ACD de la RtxA intervient dans la réticulation de l'actine. En effet, lorsque le domaine ACD de la toxine est présent dans les cellules cibles, cela provoque l'effondrement du cytosquelette de l'hôte (Sheahan et al., 2004).

Ces données suggèrent un rôle potentiel en tant qu'effecteurs de ces protéines. Cependant, plusieurs éléments suggèrent que les protéines sécrétées Hcp et VgrG peuvent être considérées comme des composants structurels du SST6. En effet, La protéine Hcp1 de *PA* est homologue au domaine tubulaire de la protéine gp19 de la queue du phage T4 et forme des nanotubes (Ballister et al., 2008; Leiman et al., 2009). De plus, la région N-terminale très conservée de la protéine VgrG présente des similitudes avec les protéines gp5 et gp27, constituant le pic de la queue du bactériophage utilisé pour perforer l'enveloppe bactérienne et injecter de l'ADN dans

le cytoplasme (Kanamaru et al., 2002). Il a donc été suggéré que ce domaine VgrG se trouve à la pointe des nanotubes Hcp et contribue à la perforation de l'enveloppe cellulaire bactérienne et/ou de la membrane cellulaire de l'hôte.

Récemment, il a été montré que ce système était impliqué dans la sécrétion de trois toxines (Tse1-Tse3) qui ciblent les bactéries concurrentes. Tse1 et Tse3 sont des amidases impliquées dans la dégradation du peptidoglycane des bactéries cibles (Hachani et al., 2014; Lien and Lai, 2017). La protéine Tse2 exerce une action bactériostatique dans le cytoplasme des bactéries cibles (Hachani et al., 2014; Hood et al., 2010). La protéine Tse2 sécrétée n'a pas d'effet sur les cellules eucaryotes. Le gène *tsi2* code pour une protéine « d'immunité » ainsi la souche qui produit la toxine Tse2, se retrouve protégée contre les effets de ses propres toxines (Hood et al., 2010).

La persistance bactérienne semble également être contrôlée par le STT6. Certaines recherches ont permis d'identifier des anticorps anti-SST6 chez des patients CF chroniques (Bingle et al., 2008; Filloux et al., 2008). Ce type de système semble également jouer un rôle important dans la compétition entre bactéries au sein d'un biofilm (Gallique et al., 2017).

V-4-Système de sécrétion de type 2

Le système de sécrétion de type 2 (SST2) est conservé et retrouvé chez de nombreuses espèces bactériennes. Le SST2 travaille conjointement avec les systèmes Tat et Sec pour la sécrétion de ses protéines in fine dans le milieu extracellulaire (**Figure 12**). La majorité des substrats du SST2 portent un peptide signal clivable en N-terminal permettant, selon sa nature, aux protéines d'être prises en charge soit par le système Tat soit par le système Sec pour être acheminées dans l'espace périplasmique (Gimenez et al., 2018). Ce système, généralement utilisé par les exoprotéines, fonctionne en deux étapes. Dans un premier temps, les substrats, en fonction de la nature de leur peptide signal, sont transportés à travers la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire du système Tat ou du système Sec (Voulhoux et al., 2001). En deuxième lieu, le peptide signal est clivé dans l'espace périplasmique par une peptidase et les protéines à sécréter adoptent leur conformation tertiaire. Les substrats à transporter sont ainsi reconnus et pris en charge par le SST2. Dans tous les cas, les protéines à sécréter doivent présenter une conformation tridimensionnelle finale pour être reconnues par le SST2 afin de les transloquer à travers la membrane externe (Johnson et al., 2006).

Le SST2 est formé de 11 à 16 protéines permettant la formation d'un complexe dans la membrane externe, d'une plateforme insérée dans la membrane interne, d'un système d'hydrolyse de l'ATP et d'un pseudopilus qui traverse l'espace périplasmique.

PA possède deux T2SS majeurs qui peuvent être activés indépendamment l'un de l'autre, les systèmes Xcp (XcpP-Z et XcpA) et Hcx (HxcP-Z et XcpA) (Bally et al., 1991, 1992). Le système Xcp (Extracellular Protein) est responsable du transport de 20 protéines (Cianciotto and White, 2017) telles que les élastases LasA et LasB, les lipases LipA et LipC, la lipoxygénase LoxA, l'aminopeptidase PaAP, l'alkaline phosphatase PhoA, les phospholipases... Ces protéines sont impliquées dans divers processus cellulaires tels que la dégradation des tissus de l'hôte et la rupture des jonctions cellulaires afin de parfaire sa colonisation. Elles permettent aussi d'amplifier ou de renforcer la virulence bactérienne dans un modèle d'infection pulmonaire murin, et régulent l'expression de la pyoverdine et la motilité bactérienne. Seuls trois substrats du système Hxc sont connus : les phosphatases alcalines LapA et LapC, et PstS (Ball et al., 2012; Zaborina et al., 2008). Ces substrats permettent l'adhérence aux cellules épithéliales et la survie bactérienne lors d'une carence en phosphate (Michel et al., 2007).

Un troisième SST2 appelé Txc (TxcP - TxcZ), pour « Third Xcp homolog » a été identifié (Cadoret et al., 2014). Ce système, unique à PA7 est très proche du système Xcp. Ce SST2 permet la sécrétion de la protéine appelée chitin-binding protein E (CbpE). Cette protéine appartiendrait à la famille des N-acétylglucosamines (GlcNAc) et possède 28 % d'identité avec la protéine CbpD sécrétée par le SST2 Xcp. CbpE possède un peptide signal en position N-terminale qui permet sa reconnaissance par la machinerie de type Sec.

Un quatrième SST2 a également été identifié, nommé XphA/XqhA. Ce système formerait un complexe hybride et serait actif en interaction avec les protéines XcpR et XcpZ (Michel et al., 2007).

V.5-Système de sécrétion de type 5

Ce système a été décrit pour la première fois chez *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner et al., 1987).

C'est le système le plus simple et le plus répandu chez les bactéries à Gram-négatif.

Dans ce système, la protéine à sécréter traverse la membrane interne *via* le système Sec.

Puis, des feuilletts β de cette protéine forment un canal dans la membrane externe pour assurer son propre passage. Enfin, elle pourra rester dans la membrane externe ou être libérée dans le milieu extracellulaire après protéolyse (Desvaux et al., 2004).

Il existe deux types du SST5 : les systèmes autotransporteurs (SST5a, SST5c et SST5d) et la voie de sécrétion à deux partenaires (SST5b) (Bleves et al., 2010; Dautin and Bernstein, 2007; Desvaux et al., 2004; Ma et al., 2003; Yen et al., 2008).

Les auto-transporteurs

Les auto-transporteurs permettent une sécrétion autonome des protéines. Les protéines qui empruntent les auto-transporteurs sont caractérisées par i) un peptide signal clivable en N-terminal, destiné au ciblage du périplasma par le système Sec, ii) un domaine en C-terminal composé de feuillets- β , et entre les deux, iii) un domaine « passager » au milieu duquel se trouve l'activité catalytique de la protéine (Renn et al., 2012).

La protéine à sécréter est tout d'abord synthétisée en pré-pro-protéine qui se lie à la machinerie Sec. Le peptide signal est alors clivé libérant ainsi une pro-protéine dans le périplasma. Le domaine « passager » est ensuite clivé lors du passage à travers la membrane externe. Enfin, le domaine structuré en feuillets- β forme un canal à travers la membrane externe et permet à la protéine d'être relâchée dans le milieu extracellulaire (Desvaux et al., 2007; Gerlach and Hensel, 2007).

Le SST5a le plus connu de *PA* est la protéine EstA (Wilhelm et al., 2007). Cependant, le domaine « passager » de cette protéine n'est pas clivé et reste donc en surface de la bactérie. La protéine EstA possède une activité estérase qui est impliquée dans la formation des rhamnolipides, la mobilité bactérienne et la formation du biofilm (Wilhelm et al., 2007). Le SST5c est à ce jour très peu étudié mais présente cependant un rôle dans l'adhérence bactérienne. Le SST5d présente des similarités au SST5a, et diffère par la présence d'un domaine périplasmique appelé POTRA (« polypeptide-transport-associated ») dont la fonction est inconnue. Un exemple de SST5d retrouvé chez *PA* est la protéine PlpD dont le domaine « passager » est libéré dans le milieu extracellulaire (Salacha et al., 2010). La protéine PlpD présente une activité lipase (Banerji and Flieger, 2004; da Mata Madeira et al., 2016).

La voie de sécrétion à deux partenaires

Le SST5b, est similaire au système autotransporteurs sauf que dans ce cas, le domaine « tonneau- β » et le domaine « passager » sont traduits en deux protéines distinctes: une protéine sécrétée (TpsA) et un transporteur ancré dans la membrane externe (TpsB), respectivement (Fan et al., 2012; Jacob-Dubuisson et al., 2001, 2004).

La protéine TpsA est composée d'un peptide signal reconnu par la machinerie Sec permettant son transport du cytoplasme vers le périplasma ainsi que son repliement. Une fois la protéine

Revue bibliographique: Systèmes de sécrétion

repliée dans le périplasma, le peptide signal est clivé. La protéine mature présente un motif de sécrétion en N-terminal, appelé motif TPS. Ce motif permet le ciblage et l'interaction avec le domaine POTRA situé en N-terminal du domaine « tonneau- β » de la protéine TpsB (Simmerman et al., 2014). La protéine TpsA subit un deuxième repliement. Le domaine « passager » de la protéine TpsA est sécrété. A noter que contrairement au domaine « tonneau- β » du système auto-transporteur composé de 12 feuillets- β (Oomen et al., 2004), le domaine « tonneau- β » du système TPS est composé de 16 feuillets- β (Clantin et al., 2004). Chez *PAO1*, 5 TPS ont été identifiés PA0040-PA0041, PA0690-PA0692, PA2462-PA2463, PA4540-PA4541 (LepA-LepB) et PA4624-PA4625 (CdrA-CdrB) (Bleves et al., 2010; Ma et al., 2003). Un 6^{ème} TPS est fortement envisagé au sein du génome de *PAO1* : PA2542-PA2543. En effet, la protéine PA2542 présente certaines similitudes avec le domaine C-terminal de PA2462 et la protéine PA2543 semble être une protéine de la membrane externe. Un septième TPS a été mis en évidence : CupB5-LepB (PA4082-PA4541). La protéine LepB (TpsB) interagit également avec CupB5 (TpsA) et peut le transférer à travers la membrane externe de *PA* (Garnett et al., 2015; Ruer et al., 2008).

Plus de 700 protéines impliquées dans la cytotoxicité, l'adhésion, l'auto-agrégation, l'invasion, et la protéolyse utilisent le SST5 (Fronzes et al., 2009; Xu and Liu, 2014).

VI- Régulation de la virulence

VI.1-Le Quorum sensing

Le quorum-sensing (QS) est un système de régulation primordial dans l'expression des facteurs de virulence chez *PA*. Le QS est le mécanisme de communication cellulaire le plus étudié. C'est un mécanisme partagé par de nombreuses bactéries qui permet une adaptation coordonnée d'une population bactérienne aux changements environnementaux. Cette adaptation est médiée par des petites molécules hormonales, diffusibles au niveau de la membrane appelées Auto-Inducteurs (AI). Ces molécules sont produites de manière constitutive par chaque bactérie, par une AI synthase. La concentration de ces auto-inducteurs augmente en fonction de la densité bactérienne. Cette boucle d'auto-induction conduit à l'activation du QS chez les bactéries voisines (**Figure 13**).



Figure 13 : La bactérie produit de manière constitutive des AI (petits cercles colorés). Lorsque la densité cellulaire augmente, la concentration en AI augmente également, aboutissant à l'expression de gènes d'adaptation (Moradali et al., 2017)

Une fois que la concentration des AI a atteint un niveau seuil, ces auto-inducteurs se lient à des activateurs transcriptionnels spécifiques. Le complexe ainsi formé (auto-inducteur-activateur transcriptionnel) active ou réprime les gènes cibles. Ce complexe cible également le gène codant l'auto-inducteur, ce qui induit une amplification du système par auto-induction (Antunes et al., 2010; Balasubramanian et al., 2013; Jimenez et al., 2012; Schauder and Bassler, 2001).

Quatre systèmes de QS contrôlent l'adaptation et la virulence chez *PA* : Las, Rhl, Pqs et Iqs. En réponse à des stimuli extérieurs, chaque système synthétise des auto-inducteurs : HSL, BHL, PQS et IQS, respectivement (Moradali et al., 2017) (**Figure 14**).

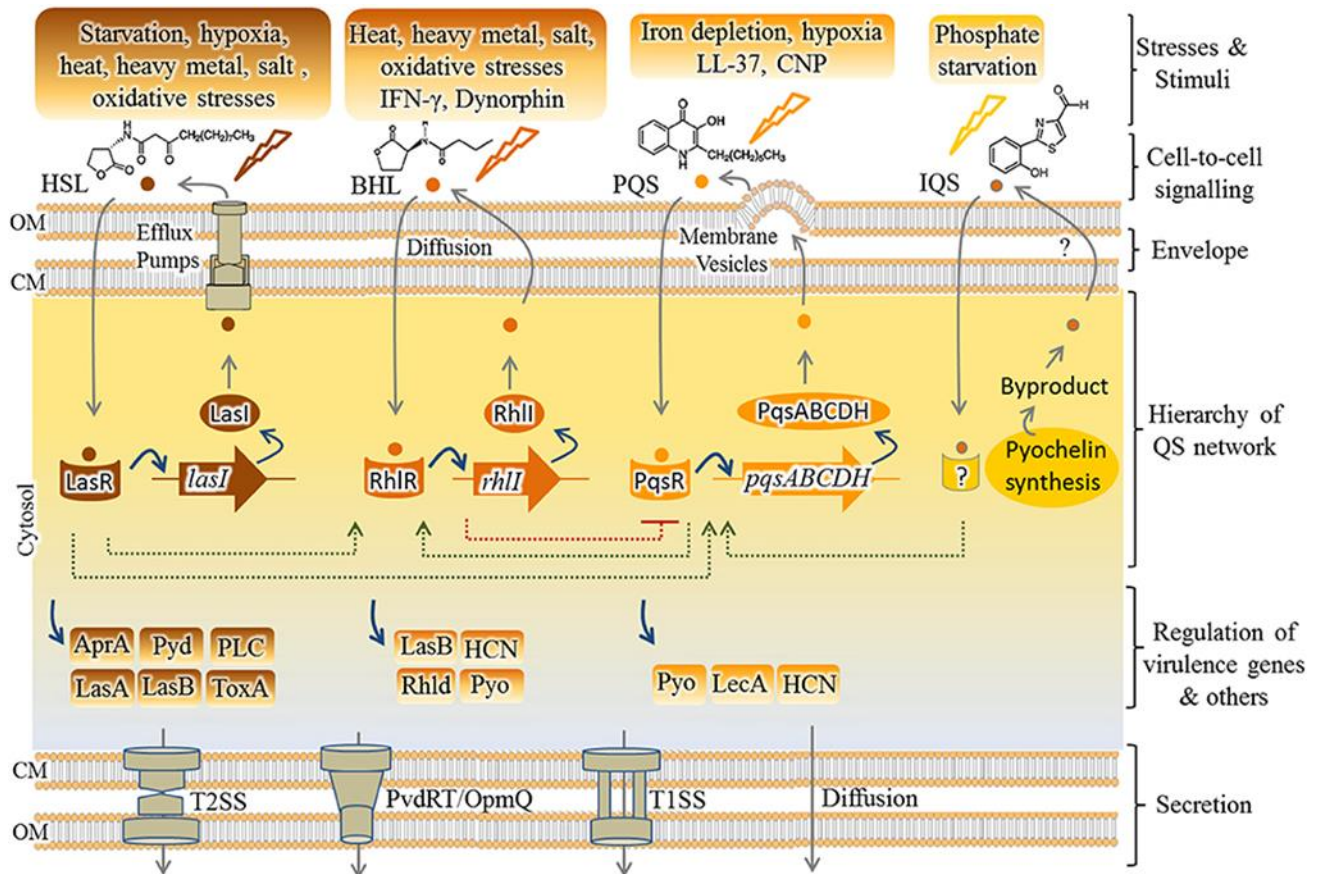


Figure 14 : La régulation par le QS chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il existe 4 voies de QS chez *Pseudomonas aeruginosa* : Las, Rhl, Pqs et IQS. En réponse à des stimuli extérieurs, chaque voie synthétise des AI : HSL, BHL, PQS et IQS. L'export et l'import de HSL, BHL et PQS sont assurés par les pompes à efflux, la diffusion libre et des vésicules membranaires, respectivement. La voie de transport de IQS est inconnue. Les auto-inducteurs activent les facteurs de transcription LasR, RhlR et PqsR. Le complexe auto-inducteur/facteur de transcription régule l'expression de l'auto-inducteur synthèses apparentés (respectivement LasI, RhlI, PqsABCDH) ainsi que d'autres gènes (Moradali et al., 2017)

Dans le système Las, l'enzyme auto-inductrice LasI contribue à la synthèse d'AI de type 3-oxo-C12-Homosérine lactone (HSL). Ces AI possèdent la propriété de traverser facilement les membranes bactériennes et constituent ainsi un véritable moyen de communication entre les bactéries. Lorsque le taux d'AI atteint un seuil critique, elles se lient à la protéine régulatrice LasR. Il se forme ainsi un complexe qui active la transcription de gènes codant pour des facteurs de virulence comme les deux élastases LasA et LasB ainsi que l'exotoxine A, ou pour des protéines de l'appareil de sécrétion de type 2 (XcpR et XcpP), couplant ainsi l'expression et l'export de certaines toxines (Filloux and Vallet, 2003; Ruimy and Andremont, 2004; Smith and Iglewski, 2003).

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

Cette activation permet d'accentuer de manière synchronisée la virulence dans toute la population bactérienne.

Le deuxième système Rhl fonctionne selon le même schéma que Las. L'enzyme auto-inductrice RhlI induit la synthèse d'un second type d'AI, la N-butyryl-L-homosérine lactone ou C4-HSL (BHL). Le complexe RhlR-BHL contrôle l'expression de l'opéron *rhlAB* nécessaire à la production de rhamnolipides et l'expression d'une série de gènes dont *lasB*, *lasA*, *aprA*, et *rhlI* (Ruimy and Andremont, 2004).

Un troisième système de QS a été identifié chez *PA* avec comme auto-inducteurs des 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone nommées PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) (Pesci et al., 1999). Le PQS est synthétisé à partir de l'acide anthranilique (anthranilate) par les produits des gènes *pqsABCD* (Bredenbruch et al., 2005; Farrow and Pesci, 2007). Lorsque la concentration extracellulaire de PQS atteint un certain seuil, cette molécule se lie à PqsR. Le complexe résultant active l'expression des opérons *phnAB* et *pqsABCDE*, augmentant la production de pyocyanine et PQS (auto-induction) (Déziel et al., 2005; Diggle et al., 2006; Wade et al., 2005). Cette quinolone peut jouer le rôle de molécule signal mais peut aussi moduler la formation du biofilm et inhiber de la prolifération des cellules T humaines IL-2 non dépendantes (Ruimy and Andremont, 2004).

Enfin, *PA* produit l'auto-inducteur IQS (2-(2-hydroxyphényl-thiazole-4-carbaldéhyde) impliqué dans le système IQS. Cette dernière voie de synthèse a été récemment découverte, et est donc moins bien caractérisée à ce jour.

On estime que plus de 10 % des gènes de *PA* et plus de 20 % du protéome bactérien exprimé sont influencés par les différents systèmes du QS (Arevalo-Ferro et al., 2005; Schuster et al., 2003; Wagner et al., 2003; Whiteley et al., 1999). Ainsi, les souches déficientes dans l'un de ces systèmes présentent une pathogénicité réduite (Pearson et al., 2000). Etonnement, les souches les plus fréquemment isolées chez des patients atteints de mucoviscidose ont un QS déficient (Karatuna and Yagci, 2010). Cette déficience pourrait servir à minimiser la production de facteurs de virulence régulés par le QS pour échapper au système immunitaire de l'hôte. De plus, il a été montré que les réponses des cellules bactériennes aux signaux du QS et le profil d'expression génique correspondant, sont hétérogènes au sein d'une communauté donnée, ce qui conduit à une amélioration des chances de survie (Grote et al., 2015). En plus de son impact sur la virulence, le QS contrôle également la différenciation du biofilm. Ainsi, les mutants $\Delta lasI$ forment des biofilms indifférenciés, plats et fins et facilement détruits sous l'action du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Davies et al., 1998). L'addition de la 3-oxo-C12-

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

HSL restaure un biofilm structuré et confirme le rôle essentiel du QS *via* LasI (Filloux and Vallet, 2003; Ruimy and Andremont, 2004).

Les systèmes du QS interagissent fortement entre eux (**Figure 15**). Le complexe LasR-3-oxo-C12-HSL active la transcription de *rhlR* et *rhlI*. De plus, les 3-oxo-C12-HSL peuvent entrer en compétition avec les C4-HSL pour le site de liaison à RhlI et pourraient ainsi agir comme des antagonistes du système Rhl. Il existe donc une hiérarchie entre systèmes Las et Rhl, le système Las régulant positivement le système Rhl (Juhás et al., 2004). Les mécanismes régulant positivement l'expression des gènes *lasR* et *rhlR* sont encore mal connus. Ils semblent faire intervenir des signaux extérieurs. Le système Las est positivement régulé par les protéines Vfr, GacA, RelA et LasR et négativement par RsmA, RsaL, MvaT et QscR. Le gène *qscR* (quorum-sensing controlled repressor) a été identifié en 2001 suite au séquençage du génome de la souche PAO1 et serait un homologue de *lasR* (Filloux and Vallet, 2003). La protéine codée par ce gène pourrait ainsi assurer le contrôle du QS empêchant son déclenchement dans des environnements ne nécessitant pas sa mise en oeuvre. Le système Rhl, de son côté, est régulé positivement par les protéines RhlR, RelA, GacA, PQS et LasR et négativement par les protéines RsmA, QscR, MvaT et RpoS.

Le système PQS interagit également avec les systèmes Las et Rhl. Il est régulé positivement par le régulateur LasR et inhibé par RhlR. Ce système intervient dans les cycles de croissance en premier lieu mais aussi dans la sécrétion de l'élastase LasB (Diggle et al., 2003).

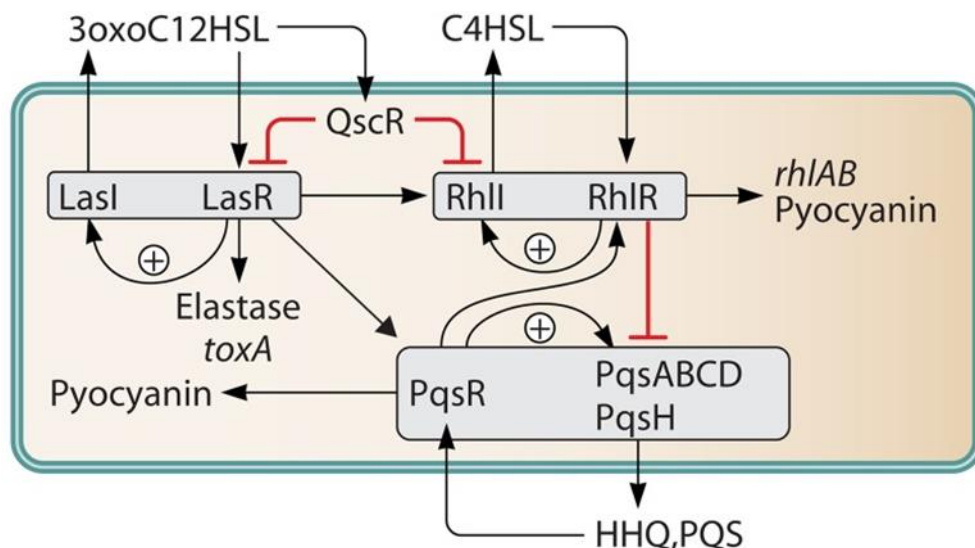


Figure 15 : Représentation schématique des systèmes des régulations du quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* (LaSarre and Federle, 2013)

VI.2-Systèmes de régulation à 2 composants

Les systèmes de régulation à deux composants (TCS) sont des mécanismes de signalisation conçus pour détecter divers stimuli et adopter une réponse physiologique adaptative rapide, grâce à la détection et la transduction de signaux extérieurs.

Dans le schéma classique de transduction du signal des TCS (**Figure 16A**), le senseur, une histidine kinase (SK) traversant la membrane interne, détecte un signal externe (telle que la liaison d'un ligand) *via* son domaine N-terminal périplasmique, ce qui provoque un changement conformationnel et une autophosphorylation au niveau d'un résidu histidine conservé du SK. Ce dernier transfère ensuite le groupement phosphate à un acide aminé aspartate conservé sur l'extrémité N-terminale du régulateur de réponse (RR) cytoplasmique, activant ainsi le domaine C-terminal du RR, souvent un domaine de liaison à l'ADN (Galperin, 2006; Gooderham and Hancock, 2009). Le RR activé procède à la modification de l'expression de gènes cibles pour provoquer une réponse au stimulus. Ce processus est réversible et la déphosphorylation du RR ramène la cellule à son état initial.

Il existe deux variantes de ce système classique : le système hybride et le système non orthodoxe (**Figures 16B et C**). Dans ces systèmes, l'HK contient un domaine récepteur C-terminal supplémentaire. Afin de phosphoryler le RR, une protéine réceptrice avec un domaine phospho-transfert (Hpt) est donc nécessaire. Dans le système non orthodoxe, l'Hpt fait partie de l'HK, tandis que le système hybride nécessite une protéine Hpt indépendante afin de phosphoryler le RR (Casino et al., 2010; Rodrigue et al., 2000; Sivaneson et al., 2011).

PA possède l'un des plus grands nombres de protéines de TCS connues chez les bactéries. Elle est équipée de 64 gènes codant pour des HK, 59 pour des RR, et 3 pour des protéines possédant un domaine Hpt (Chen et al., 2004; Rodrigue et al., 2000). Douze systèmes hybrides et 5 systèmes non orthodoxes sont connus chez cette bactérie (Rodrigue et al., 2000). Tous ces systèmes procurent à *PA* des propriétés exceptionnelles au niveau de l'adaptation, de la virulence et de la résistance aux antibiotiques.

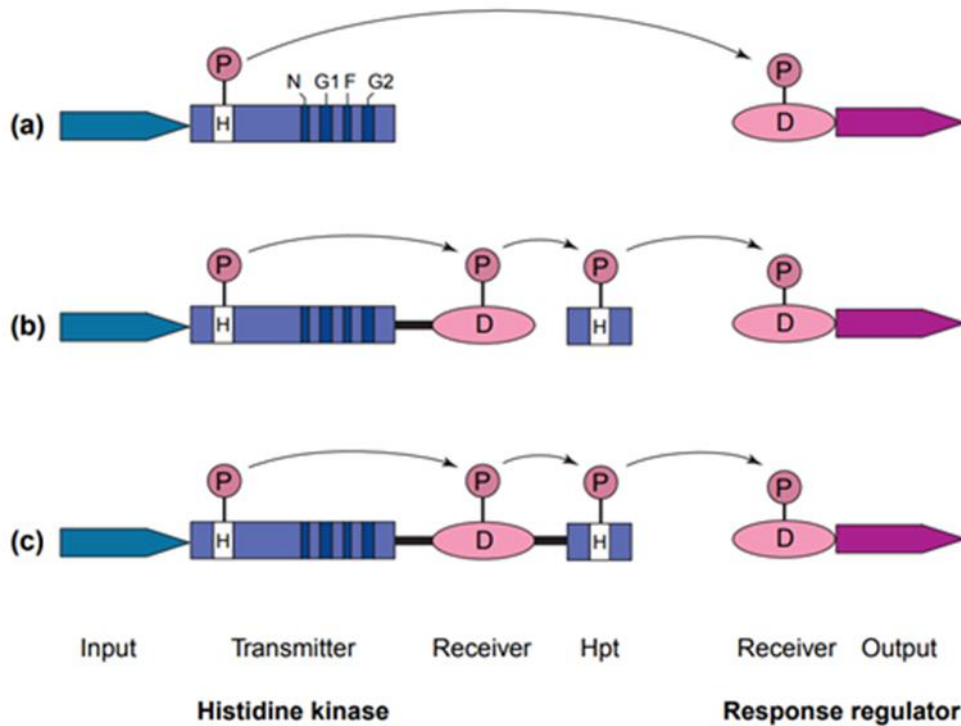


Figure 16 : Organisation des TCS chez *Pseudomonas aeruginosa* (A) Dans le TCS classique, le SK reconnaît un signal de l'environnement. Cette reconnaissance conduit à l'auto-phosphorylation du SK sur un résidu histidine conservé. Le domaine SK phosphorylé interagit avec le domaine récepteur du RR et lui transfère le groupement phosphate sur un résidu aspartate conservé. La phosphorylation du RR entraîne des changements conformationnels lui permettant ainsi de se lier à l'ADN et de réguler la transcription. (B) Dans le TCS hybride, le SK présente un domaine supplémentaire dit « receveur ». Une protéine réceptrice (Hpt) avec un domaine phospho-transfert est présente. (C) Dans un TCS non-orthodoxe, le domaine « receveur » du SK et la protéine réceptrice (Hpt) sont fusionnés (adapté de (Rodrigue et al., 2000))

Au cours d'une infection aiguë ou chronique, *PA* utilise différentes voies de régulation à deux composants pour réguler sa virulence ou la formation du biofilm.

Le système GacS-GacA représente l'une des voies de régulation de la virulence les mieux caractérisées. Les études de la pathogénicité de *PA* ont montré que GacA est un régulateur important et conservé, de la virulence (Rahme et al., 2000). Le système GacA/GacS régule la transition de la bactérie de l'état planctonique à l'état biofilm, et donc de l'infection aiguë à l'infection chronique (Balasubramanian et al., 2013; Gooderham and Hancock, 2009; Jimenez et al., 2012; Mikkelsen et al., 2011) (**Figure 17**).

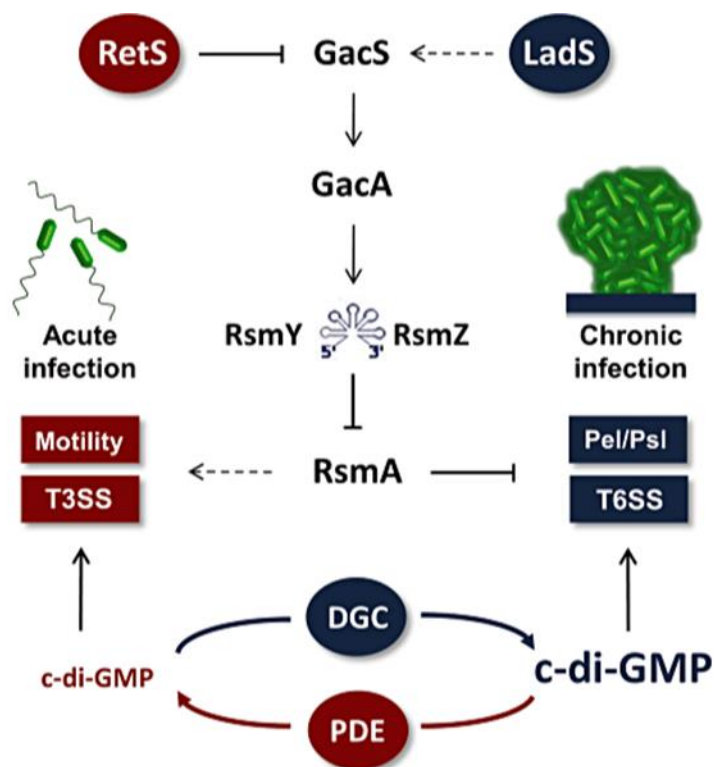


Figure 17 : Représentation schématique des réseaux de régulation permettant la transition de *Pseudomonas aeruginosa* de l'état planctonique (infection aiguë) à l'état biofilm (infection chronique). La voie *LadS/GacS/GacA* et un haut niveau de *c-di-GMP* favorisent la formation de biofilm tandis que *RetS* et un faible niveau de *c-di-GMP* favorisent le mode de vie planctonique (Moscoso et al., 2011)

Suite à la détection d'un signal extracellulaire encore inconnu (identifié comme étant des saccharides chez *Pseudomonas putida* (PP) (Dubern and Bloemberg, 2006), le senseur GacS qui est une histidine kinase membranaire s'autophosphoryle au niveau d'un résidu histidine (Heeb et Haas., 2001). Le phosphate est ensuite transféré sur GacA, qui devient activé. GacA est impliqué dans la pathogénèse chez de nombreux hôtes (Gooderham and Hancock, 2009). Une fois activée, la protéine GacA est capable de se fixer spécifiquement sur la « GacA box » en amont des gènes *rsmZ* et *rsmY* (Brencic et al., 2009). Deux petits ARNs (RsmZ et RsmY) vont inhiber la production de molécules RsmA libres ou actives dans la cellule (Burrowes et al., 2006; Goodman et al., 2004; Ventre et al., 2006). L'inactivation de cette dernière permet l'expression des opérons *pel* et *psl* et du SST6 (formation de biofilm) et la répression de gènes impliqués dans la mobilité, dans la production des facteurs de virulence, et du SST3. RsmA, exerce sa régulation négative en se fixant sur une région non traduite (un motif GCA) en 5' des ARNm, empêchant ainsi l'initiation de leur traduction (Brencic and Lory, 2009). C'est une protéine qui se fixe sur les petits ARN (Kay et al., 2006). Elle pourrait être considérée comme le principal régulateur post-transcriptionnel de PA.

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

La phosphorylation de GacS est contrôlée par deux autres HK hybrides : RetS et LadS. Contrairement à LadS, RetS empêche la phosphorylation de GacS (Coggan and Wolfgang, 2012). Les senseurs hybrides RetS et LadS sont impliqués dans la transition entre une infection chronique et une infection aiguë. Ceci d'une manière antagoniste en contrôlant l'expression des gènes de virulence et les gènes nécessaires pour la formation du biofilm tels que ceux impliqués dans la synthèse des polysaccharides (Goodman et al., 2004; Laskowski et al., 2004; Ventre et al., 2006).

La transition de la bactérie entre ces deux états est aussi influencée par le second messager c-di-GMP (Cyclic diguanylate monophosphate). Ainsi, une augmentation du niveau cytoplasmique de c-di-GMP conduit à la mise en place de nombreux facteurs nécessaires pour la formation et le maintien du biofilm, tandis qu'une diminution de sa production ou sa dégradation, augmente l'expression de la mobilité et des facteurs de virulence (Jonas et al., 2009; Tamayo et al., 2007). Le niveau intracellulaire de c-di-GMP est contrôlé par deux enzymes antagonistes : la di-guanylate cyclase (ayant un domaine GGDEF) qui est impliquée dans la synthèse du c-di-GMP et la phosphodiesterase (possédant un motif EAL) qui le dégrade (Lee et al., 2007). Les travaux de Moscoso et ses collaborateurs (2011) ont montré que le niveau de c-di-GMP est élevé chez un mutant *retS*. Ces mêmes auteurs ont souligné la nécessité des RNAs pour la régulation c-di-GMP. Ils soutiennent donc l'existence d'un lien entre RetS/GacS et le c-di-GMP en proposant que RetS contrôle le mode de vie de *PA* via le c-di-GMP (Moscoso et al., 2011).

Les TCS jouent aussi un rôle crucial dans la résistance aux antibiotiques. Parmi ces TCS, PhoP-PhoQ et PmrA-PrmB sont activés par de faibles concentrations extracellulaires en Mg^{2+} (Vadyvaloo et al., 2015). Dans ces conditions, les senseurs PhoQ et PrmB activent les RR PhoP et PrmA, respectivement. Ceci engendre une régulation positive de l'opéron *arnBCADTEF-pmrE* qui code pour une voie permettant l'addition d'un aminoarabinose au lipide A du LPS, conduisant ainsi à la modification de sa charge. Cette modification limite l'interaction du LPS avec les antibiotiques anioniques tels que la polymyxine B et les peptides antimicrobiens (McPhee et al., 2006; Moskowitz et al., 2004).

Une revue récente a permis de référencer tous les TCS (plus de 60 systèmes) actuellement connus chez *PA*, avec leur fonction. Cependant, la plupart des ligands restent encore inconnus (Francis et al., 2017).

VI.3-Cell-surface signaling (CSS)

Les systèmes Cell-surface signaling détectent les signaux provenant de l'extérieur de la cellule et les transmettent dans le cytoplasme. Ils sont le plus souvent impliqués dans la régulation de la capture de fer via des sidérophores endogènes (pyoverdine), ou exogènes (ferrichrome, ferrioxamine B et mycobactine) (Llamas et al., 2014). Les systèmes CSS sont également impliqués dans la virulence (Faure et al., 2013; Llamas et al., 2014). En effet, l'une des défenses immunitaires innées de l'hôte est la production de protéines, comme la transferrine, capables de piéger le fer, afin de réduire la quantité de fer disponible pour les agents pathogènes. En outre, durant l'infection, la production de lipocaline, une molécule de l'hôte qui se lie spécifiquement aux sidérophores bactériens et les neutralise, est également induite.

Ces systèmes de régulation sont composés d'un récepteur TonB-dépendant situé dans la membrane externe, qui détecte le stimulus extracellulaire, d'un facteur anti- sigma situé dans la membrane interne, qui permet la transduction du signal du périplasma au cytoplasme, et d'un facteur sigma extracytoplasmique (ECF). Suite à la perception du signal par le récepteur, ECF active l'ARN polymérase et dirige l'holoenzyme (facteur sigma/ARN polymérase) vers la région promotrice du ou des gène (s) cible (s) sous le contrôle du système CSS (Koebnik, 2005; Llamas et al., 2014; Quesada et al., 2016). Généralement, les gènes qui codent le récepteur sont à proximité (en amont ou en aval) de ceux qui codent le facteur sigma et le facteur antisigma (Llamas et al., 2014).

Les récepteurs TonB-dépendants sont principalement impliqués dans le transport des complexes fer-sidérophores à travers la membrane externe (Llamas et al., 2014). Le tonneau β forme un large pore, fermé par un domaine appelé bouchon. Ce domaine empêche la diffusion non spécifique de grosses molécules à travers la membrane externe. Afin de permettre le passage du substrat, il subit des changements de conformation permettant l'ouverture temporaire du pore. L'énergie nécessaire pour le transport est procurée par un complexe protéique (TonB-ExbB-ExbD) situé dans la membrane cytoplasmique. La protéine TonB interagit physiquement avec le récepteur d'où le nom de récepteurs TonB-dépendants (Ogierman and Braun, 2003). Ce domaine, qui interagit avec le facteur antisigma, détermine la spécificité de la voie de transduction, mais n'a pas d'effet sur la liaison et le transport de complexe fer-sidérophore (Koster et al., 1994; Llamas et al., 2014).

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

Certains CSS sont également impliqués dans la virulence et la formation du biofilm. Le système CSS-ferripyoverdine (Fpv) est le plus connu chez *PA*. Il est composé d'un récepteur de ferripyoverdine (FpvA), d'un facteur anti-sigma (FpvR) et de deux facteurs sigma (σ FpvI et σ PvdS) (Lamont et al., 2002) (**Figure 18**). Ce système, *via* la pyoverdine et σ PvdS, régule la production de trois facteurs de virulence sécrétés: l'exotoxine A (ExoA), la protéase IV PrpL et la protéase alcaline AprA, ainsi que la synthèse de la pyoverdine (Lamont et al., 2002). Ce même système *via* la pyoverdine et σ FpvI, régule la production du récepteur FpvA (Beare et al., 2003). Il convient de noter que ce CSS est atypique car il peut répondre à un sidérophore endogène tel que la pyoverdine, plutôt qu'à un signal externe.

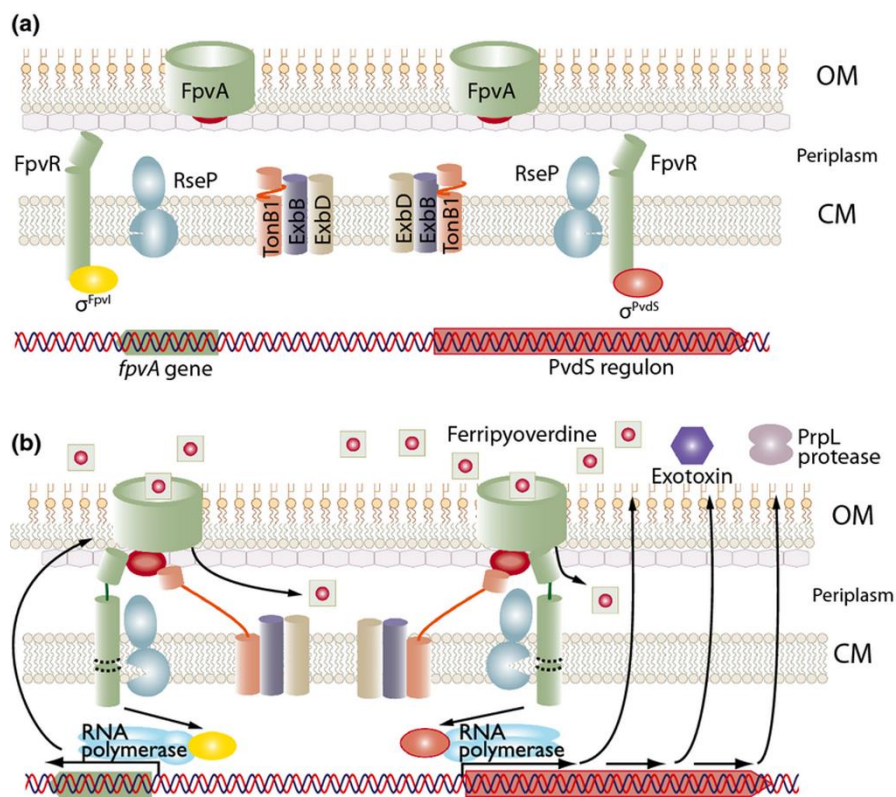


Figure 18 : Le système CSS ferripyoverdine de *Pseudomonas aeruginosa*. (a) En absence de ferripyoverdine, le facteur antisigma FpvR se lie aux facteurs sigma FpvI et PvdS, inhibant ainsi leur activité. (b) Quand la ferripyoverdine se lie au récepteur FpvA, le domaine signal (boule rouge) de ce récepteur interagit avec le facteur anti-sigma FpvR conduisant à sa protéolyse via la protéase RseP/MucP. Les facteurs sigma FpvI et PvdS libérés permettent la régulation des gènes codant la pyoverdine, l'exotoxine A et la protéase PrpL (Llamas et al., 2014)

Bien que la plupart des systèmes CSS de *PA* soient impliqués dans la régulation de la capture de fer, Llamas et ses collaborateurs (2009) ont caractérisé un système, appelé PUMA3, dédié à la régulation de la virulence (Llamas et al., 2009). Comparativement aux autres récepteurs

CSS, le système CSS-PUMA3, également appelé Vre, est composé d'un récepteur atypique VreA, d'un facteur antisigma VreR et d'un facteur sigma $\sigma VreI$ (**Figure 19**).

Le facteur sigma $\sigma VreI$ régule l'expression des gènes codant pour des protéines sécrétées comme par exemple la phosphatase alcaline) et des composants du SST2 (Hxc) et du SST5 (TPS) (Llamas et al., 2009). Bien que le rôle de tous les gènes régulés par $\sigma VreI$ dans la virulence de *PA* n'ait pas encore été bien établi, il a été montré que la surexpression de $\sigma VreI$ augmente la virulence de *PA* chez les embryons de poisson zèbre (Llamas et al., 2009). En outre, les sérums de la plupart des patients infectés par *PA* contiennent des anticorps dirigés contre les protéines codées par les gènes régulés par $\sigma VreI$ (Llamas et al., 2009), indiquant que les produits du régulon $\sigma VreI$ sont exprimés in vivo pendant l'infection. Le mécanisme d'action de ce CSS est encore mal compris, et deux modèles sont actuellement proposés dans la littérature (Llamas et al., 2014) (**Figure 19**).

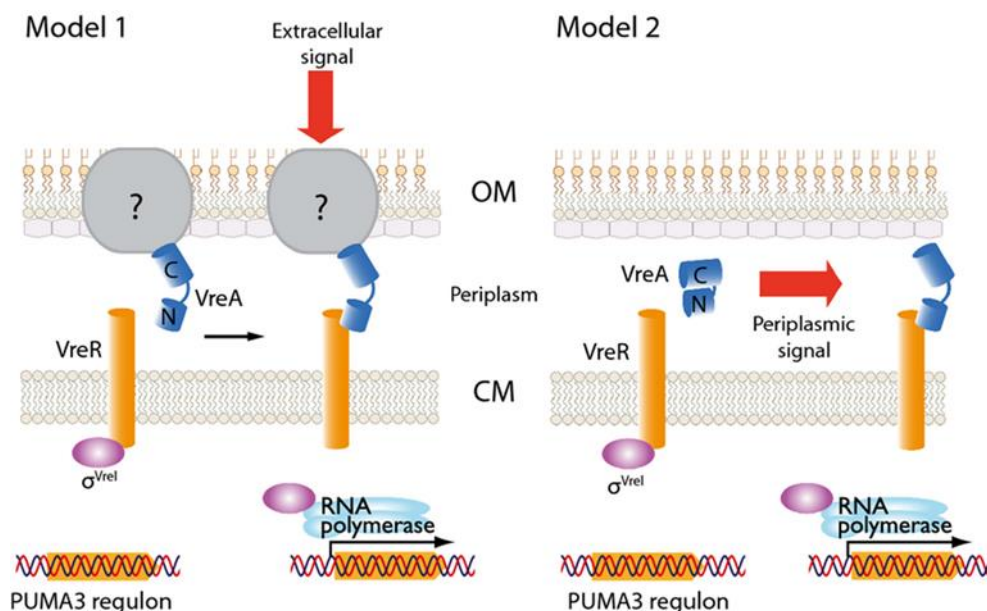


Figure 19 : Modèles proposés pour le système CSS-PUMA3 de *Pseudomonas aeruginosa*. Le récepteur VreA devrait être formé par deux domaines indiqués par N (N-terminal) et C (C-terminal). Par homologie avec les récepteurs CSS, le domaine N de VreA est susceptible d'interagir avec le domaine périplasmique du facteur anti-sigma VreR. Le domaine C de VreA pourrait interagir avec un (des) récepteur (s) de membrane externe inconnu (modèle 1) ou bien avec son domaine N (modèle 2). Le signal inducteur inconnu est transmis par le VreR au cytoplasme où il se traduit par l'activation de $\sigma VreI$. Une fois activé, $\sigma VreI$ permet la transcription du régulon PUMA3 qui comprend un SST2 et un SST5 (TCS) (Llamas et al., 2014)

VI.4-Signaux métaboliques et stress

Répression catabolique (RC)

La répression catabolique (RC) est un phénomène mis en place lorsque des bactéries sont cultivées en présence de plusieurs sources de carbone. Elle est l'un des mécanismes les plus conservés chez les microorganismes. Elle les protège d'un gaspillage d'énergie en leur évitant de synthétiser des protéines superflues dans des conditions données.

La RC est un mécanisme de régulation global ayant un impact majeur sur la physiologie bactérienne. Non seulement elle intervient dans l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des sources de carbone inorganique, mais elle affecte aussi l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus variés. En particulier, il a clairement été établi, chez plusieurs espèces bactériennes pathogènes, que RC et virulence étaient étroitement liées.

Actuellement, les facteurs les plus connus pour être impliqués dans la RC chez *Pseudomonas* sont la protéine Crc, le cytochrome *o* ubiquinol oxydase et le système des phosphotransférases PTS (Rojo, 2010).

La protéine Crc a été initialement décrite chez *PA* comme étant une protéine entraînant la répression, induite par le succinate, de plusieurs gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du glucose et du mannitol, et dans l'inhibition de la production de l'amidase (MacGregor et al., 1991, 1996; Wolff et al., 1991). De même, il a été montré que cette protéine participait également à l'inhibition de plusieurs gènes cataboliques, y compris les gènes *bkd* nécessaires à l'assimilation des acides aminés à chaîne ramifiée chez *PA* et *PP* (Hester et al., 2000a, 2000b), les gènes chromosomiques de *PP* nécessaires à l'assimilation du benzoate, du 4-hydroxybenzoate et du 4-hydroxyphénylpyruvate (Morales et al., 2004) et les gènes de dégradation de l'alcane et du phénol de l'espèce *Pseudomonas EST1001* (Putrins et al., 2007). Une étude a montré que l'inactivation du gène *crc* modifie l'expression d'au moins 134 gènes (Moreno et al., 2009). La plupart d'entre eux sont impliqués dans le transport et l'assimilation d'acides aminés ou de sucres. Le Crc exerce, indirectement, une influence importante sur d'autres aspects. Par exemple, chez *PA*, l'inactivation du gène *crc* altère la formation de pili de type IV, ce qui inhibe à son tour la motilité et la formation de biofilm (O'Toole et al., 2000). Une étude visant à identifier les gènes impliqués dans la RC chez *PP* ont conduit à l'isolement de plusieurs mutants susceptibles d'atténuer l'inhibition exercée par le succinate sur l'induction de la voie de dégradation du phénol et de l'alcane chez *PP* (Dinamarca et al., 2002; Petruschka

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

et al., 2001). La plupart des mutants isolés appartiennent au cluster de gène *cyoABCDE* qui code pour la cytochrome *o* ubiquinol oxydase (Cyo). Cette protéine est une oxydase terminale de la chaîne de transport d'électrons qui jouerait un rôle important dans les cellules en croissance sous un apport suffisant en O₂. L'inactivation de la Cyo oxydase affecte non seulement l'induction des voies de dégradation de l'alcane ou du phénol, mais modifie également les niveaux d'ARNm de plus de 100 gènes dans des cellules à croissance exponentielle dans un milieu riche (Morales et al., 2006). La plupart des gènes affectés par Cyo correspondent à des porines, à des transporteurs d'acides organiques, de composés aromatiques ou d'autres substrats, à divers régulateurs de transcription et à des composants de la chaîne de transport d'électrons, y compris des oxydases terminales qui se substituent à Cyo lorsque cette dernière est absente.

L'expression des gènes codant pour la Cyo oxydase varie considérablement en fonction des conditions de croissance. En effet, cette expression est élevée lorsque les cellules se développent de manière exponentielle dans un milieu riche sous un apport suffisant en O₂ et diminue considérablement lorsque la concentration en oxygène est limitante ou lorsque les cellules entrent en phase stationnaire de croissance (Dinamarca et al., 2002; Morales et al., 2006). L'expression des gènes *cyo* dépend également de la source de carbone utilisée; elle est beaucoup plus élevée lorsque les cellules se développent en présence de substrats induisant une réponse RC (succinate) que lorsque les cellules assimilent le citrate par exemple (Dinamarca et al., 2003).

Le système de transport de sucre le plus connu est le système des phosphotransférases (PTS). Il présente la particularité de transporter et phosphoryler de façon concomitante un certain nombre d'hydrates de carbone. Il est composé de plusieurs phosphotransférases : l'enzyme I (EI), la protéine HPr (histidine-containing protein), et plusieurs complexes multi-protéiques formant les enzymes II (EII). Les protéines EI et HPr sont solubles et impliquées dans l'incorporation de la plupart des substrats du PTS. En revanche, les EII, constituées de protéines cytoplasmiques (EIIA et EIIB) et transmembranaires (EIIC et éventuellement EIID), sont habituellement spécifiques d'un substrat donné ou d'un petit groupe de sucres étroitement apparentés. La première étape du transport et de la phosphorylation concomitante d'un sucrePTS est l'autophosphorylation d'EI à partir d'un donneur de phosphate très riche en énergie, le phosphoénolpyruvate (ou PEP) (Postma et al., 1993). L'EI phosphorylée (P~EI) transfère ensuite son groupement phosphate à HPr. P~HPr transmet à son tour son phosphate à une EIIA, qui phosphoryle l'EIIB correspondante. Lors de la dernière étape, P~EIIB transfère

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

son groupement phosphate à l'hydrate de carbone complexé et transporté par l'EIIC. Dans des conditions physiologiques, cette réaction est pratiquement irréversible, la phosphorylation de l'hydrate de carbone diminuant probablement l'affinité de ce dernier pour l'EIIC afin d'être libéré dans le cytoplasme.

Outre sa capacité à métaboliser les sucres, le système PTS contrôlerait également la formation du biofilm chez les bactéries. En effet, des études réalisées sur des mutants du système PTS chez *Streptococcus gordonii*, ont montré une altération de la capacité de ces derniers à former un biofilm (Loo et al., 2003). De plus, il a été montré que le système PTS favorise la formation de biofilm en stimulant la transcription des gènes *vps*, qui codent pour la synthèse d'exopolysaccharides nécessaire à la formation de biofilm, *via* une enzyme nommée Mlc (making large colonies) (Pickering et al., 2014).

Il a également été montré que le complexe AMPc-Vfr est impliqué dans la RC. L'AMPc est un messenger secondaire impliqué dans de nombreuses voies de transduction du signal chez *PA*. Il est synthétisé par une adénylate cyclase (CyaB) associée à la membrane. Vfr est un homologue de la protéine CRP d'*E. coli* (cAMP receptor protein). L'AMPc agit comme un régulateur allostérique de la protéine Vfr (Albus et al., 1997; Beatson et al., 2002; Wolfgang et al., 2003b). Cette dernière est un régulateur transcriptionnel qui se lie à une séquence spécifique de régulation située en amont des gènes. En effet, de nombreuses études démontrent le rôle de Vfr dans le contrôle des gènes impliqués dans le SST3, dans le QS et dans la production de nombreux facteurs de virulence (Albus et al., 1997; Beatson et al., 2002; Dasgupta et al., 2006; Davinic et al., 2009; Ferrell et al., 2008; Fox et al., 2008; West et al., 1994).

Le domaine catalytique de l'enzyme CyaB semble être régulé par du carbone inorganique, tel que les ions bicarbonates (Linder and Schultz, 2003). En détectant les ions HCO_3^- , CyaB permet aux bactéries de répondre aux variations de la concentration en carbone inorganique. Ceci en modulant la concentration intracellulaire d'AMPc (Yahr and Wolfgang, 2006). Par ailleurs, des concentrations faibles du Ca^{2+} et élevées de NaCl augmentent l'activation de l'AMPc.

Fer

De nombreux agents pathogènes ont développé des mécanismes d'acquisition du fer (Poole and McKay, 2003; Vasil and Ochsner, 1999). Ces mécanismes incluent la production de sidérophores. Ces sidérophores, tels que la pyoverdine chez *PA*, sont des moyens importants

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

mais pas exclusifs pour acquérir le fer chez leur hôtes (Martin et al., 2011). Les niveaux de fer tendent également à être plus élevés dans les voies respiratoires des patients CF infectés par rapport aux voies respiratoires saines (Stites et al., 1998, 1999).

La présence de fer ferreux a des implications sur la production des facteurs de virulence, tels que les phénazines et sur la formation de biofilms (Hunter et al., 2013) *via* l'activation de la protéine Fur (Banin et al., 2005). La quantité en fer doit être optimale car un excès de fer ($[] > 100 \mu\text{M}$) peut avoir un effet limitant sur la formation du biofilm (Musk et al., 2005) alors qu'une carence en fer favorise la motilité bactérienne de type « twitching » *via* le C4-HSL du quorum sensing (Patriquin et al., 2008).

Lipides

Plusieurs études ont montré que les lipides constituent une source importante de carbone pour *PA*. De nombreuses lipases sécrétées coupent les chaînes d'acides gras lors de l'infection, qui peuvent ensuite être internalisées et oxydées sous forme de sources de carbone (Kang et al., 2010; Son et al., 2007; Wargo et al., 2009). Il a été montré qu'une mutation sur la phospholipase C, provoquait des infections moins graves (Wargo et al., 2011). De même, une augmentation de l'adhésion en présence de phosphorylcholine, un produit de dégradation généré par la phospholipase C sur la phosphatidylcholine est observé (Krieg et al., 1988). La choline semble également jouer un rôle dans la virulence chez *PA*. Il a été démontré qu'elle induit l'activité de la phospholipase C (Lucchesi et al., 1989; Shortridge et al., 1992).

De plus, plusieurs synthétases d'acides gras (Fads) ont été identifiées comme impliquées dans le métabolisme des acides gras lors de l'infection. La capacité à cataboliser les acides gras semble être importante dans la virulence de la bactérie. En effet, la capacité des mutants de ces Fads à causer des infections est réduite chez un modèle murin (Kang et al., 2010).

Un dernier exemple de lipides impliqués dans la pathogénicité de *PA* est le produit de dégradation de la sphingomyéline, le céramide. La présence de *PA* stimule la libération de céramide, ce qui favorise la formation de radeaux lipidiques riches en céramides essentiels à l'internalisation de *PA*, et à la réponse de la cellule hôte (Grassmé et al., 2003).

Osmolarité

L'osmolarité du milieu semble contribuer au phénomène de formation du biofilm. Chez *PA*, les conditions de forte osmolarité semblent inhiber la formation du biofilm (Lequette et al., 2007). La faible osmolarité quant à elle, aurait l'effet inverse. En effet, dans ces conditions, les

Revue bibliographique: Régulation de la virulence

bactéries produisent des OPG (Glucanes périplasmiques osmorégulés) qui influent sur la formation de micro-colonies et l'architecture finale du biofilm. Les études sur les mutants des gènes *opgG* et *opgH* ont confirmé un retard dans l'adhésion bactérienne ainsi qu'un défaut de maturation du biofilm.

Anaérobiose

Chez *PA*, en anaérobiose, le régulateur global ANR est le senseur de la concentration en oxygène. Il induit l'expression d'une gamme de gènes cibles, y compris l'induction microaérobie du SST3 *via* la protéine RsmA (O'Callaghan et al., 2011). Des faibles concentrations en oxygène induisent le SST3 de *PA* par la modulation des petits ARNs rsmZ et rsmY.

La présence d'oxygène semble contribuer de manière assez importante à la formation du biofilm bactérien. Il a été démontré que le biofilm formé en absence d'oxygène (anaérobie) chez *PA* était plus dense comparé au biofilm formé en aérobie. Chez les patients CF infectés par *PA*, une surproduction d'alginate nécessaire à la formation de biofilm ainsi qu'une surexpression de la porine OprF ont été observées (Worlitzsch et al., 2002; Yoon et al., 2002). En effet, le mucus présent dans les poumons constitue un environnement anaérobie qui semble favoriser l'adhésion des bactéries au tissu et l'apparition du phénotype mucoïde. Pour se multiplier dans ces conditions, la bactérie utilise le nitrate NO^3^- ou le nitrite NO^2^- présent dans le milieu comme accepteur d'électrons (Yoon et al., 2011).

ADN

L'ADN est l'un des principaux composant de la matrice extracellulaire du biofilm de *PA*. Bien que l'on sache que *PA* libère de l'ADN pour la formation de biofilm (Allesen-Holm et al., 2006; Palmer and Whiteley, 2015), une grande partie de l'ADN présent dans le crachat de patients CF infectés a été attribuée aux cellules de l'hôte (Lethem et al., 1990). Une étude de Walker et ses collaborateurs a montré que la présence d'ADN neutrophile et d'actine F (fibrillaire) améliore la formation de biofilm (Walker et al., 2005). Les biofilms contenant une quantité plus importante d'ADN sont plus résistants aux peptides antimicrobiens et aux aminosides (Chiang et al., 2013; Mulcahy et al., 2008).

L'ADN sécrété par les neutrophiles sous la forme de pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs, neutrophil extracellular traps) peut également séquestrer les protéases dérivées des

neutrophiles. Il a été soutenu que le traitement à la DNase libère ces protéases. Ainsi, comme l'ADN de la matrice extracellulaire du biofilm, ce type d'ADN protège *PA* dans les poumons de patients CF infectés (Dubois et al., 2012).

Acides aminés

Des travaux ont montré que les acides aminés aromatiques constituent à la fois une source importante de carbone et d'énergie, mais qu'ils induisent également une production de facteurs de virulence importante et cela de manière dépendante au QS (Palmer et al., 2005, 2007). En effet, le tryptophane améliore la production de PQS en servant de source d'anthranilate pour la biosynthèse de PQS (Farrow and Pesci, 2007). Les acides aminés aromatiques peuvent servir de signaux métaboliques pour la production de PQS (Palmer et al., 2005). Une accumulation de PQS, généralement observée dans le crachat de patients CF infectés, a été abolie lorsque ces acides aminés aromatiques ont été remplacés par des quantités équimolaires de sérine (Palmer et al., 2007).

Plusieurs autres acides aminés ont été identifiés comme des signaux de la pathogénicité chez *PA*. Il a été démontré que les acides aminés étaient responsables divers phénotypes spécifiques de l'infection CF, tels que la différenciation de la morphologie des colonies, des modifications de la structure des LPS et une surexpression de l'OprF (Sriramulu et al., 2005). De même, une étude réalisée par Bernier et ses collaborateurs a montré que les acides aminés tels que l'arginine, l'ornithine, l'isoleucine, la leucine, la valine, la phénylalanine et la tyrosine favorisaient la formation de biofilm (Bernier et al., 2011). Parmi ces acides aminés, l'arginine inhibe également la mobilité de type « swarming », suggérant qu'il possède un pouvoir nutritionnel important pour promouvoir le mode de vie sessile (Bernier et al., 2011). L'alanine est également considéré comme une source privilégiée de carbone dans le crachat de patients CF (Palmer et al., 2007). Les gènes du catabolisme de la leucine sont surproduits dans les isolats cliniques de *PA* provenant d'individus atteints de mucoviscidose (Rau et al., 2010). Bien que la leucine ne soit pas une source de carbone privilégiée (Palmer and Whiteley, 2015), elle a été retrouvée présente à des niveaux élevés ce qui suggère qu'une meilleure croissance en présence de leucine pourrait jouer un rôle sur le maintien des infections à *PA* (Palmer and Whiteley, 2015).

VII- La protéomique: un outil d'analyse des protéines à large échelle

VII.1-Introduction

L'analyse protéomique consiste à étudier un protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'un organisme vivant, d'un tissu, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire à un moment donné. Elle permet d'appréhender deux aspects principaux: i) l'aspect descriptif, une identification exhaustive des protéines (un inventaire) à un instant donné, et ii) l'aspect quantitatif, une analyse différentielle de l'abondance des protéines entre deux ou plusieurs conditions données (Becnel and McKenna, 2012).

Dans sa version la plus moderne, l'approche protéomique permet donc d'identifier et de quantifier les protéines, mais aussi de déterminer leur localisation, les interactions protéines-protéines ainsi que les modifications co- ou post-traductionnelles, en fonction des conditions physiologiques et expérimentales (Pérez-Llarena and Bou, 2016; Silva et al., 2013).

Pour ce faire, l'analyse protéomique se décompose en différentes étapes principales : i) la préparation de l'échantillon, ii) l'analyse par spectrométrie de masse, et iii) le traitement des données MS par des logiciels d'identification et de quantification (Larance and Lamond, 2015).

VII.2-Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon constitue une étape essentielle de toute analyse protéomique. Elle doit être effectuée dans des conditions de travail contrôlées de façon à minimiser les contaminations par d'autres échantillons, ou émanant d'autres compartiments cellulaires. La solubilisation des protéines est aussi capitale, en éliminant les liaisons entre elles (liaisons ioniques, hydrogène, hydrophobes et ponts disulfure) ou avec d'autres molécules biologiques comme les lipides et les acides nucléiques.

Lors de l'extraction des protéines, de nombreuses protéases, kinases, acétyltransférase, déacétylases, méthyltransférases... sont souvent actives. Afin de limiter l'action de ces enzymes, l'échantillon doit être préparé à basse température (à 4°C) et des inhibiteurs d'enzymes à large spectre et spécifiques doivent être ajoutés (Thingholm et al., 2009; Yang et al., 2014).

Une autre difficulté non négligeable lors de l'analyse d'un protéome est la nature même des échantillons étudiés, à savoir leur complexité. Ainsi, des techniques de séparation sont

généralement mises en place aux niveaux protéiques et/ou peptidiques afin de rendre l'échantillon moins complexe.

VII.3-Préfractionnement de l'échantillon

Initialement, l'électrophorèse bidimensionnelle (E2D) était la méthode la plus largement répandue pour la séparation des protéines. Par la suite, de nouvelles méthodes, basées sur le préfractionnement et l'enrichissement en solution, sont apparues (**Figure 20**).

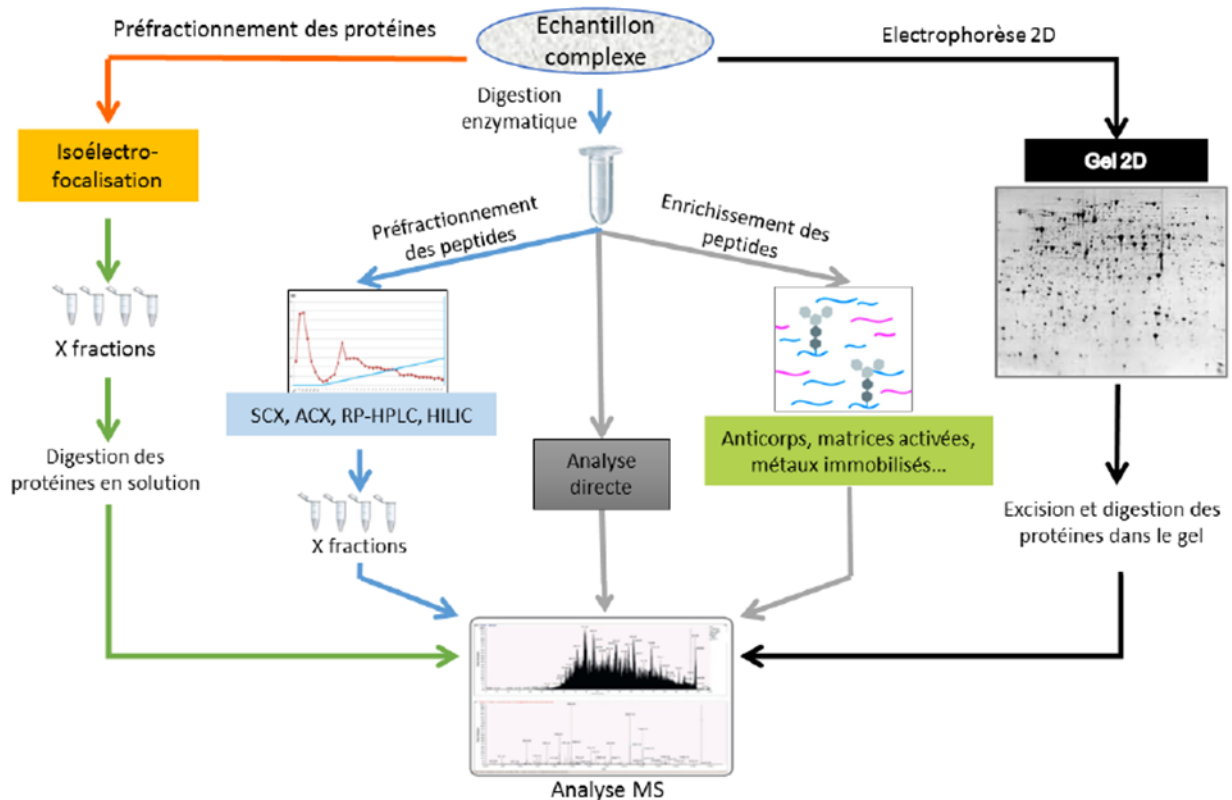


Figure 20 : Exemples d'approches de séparation des échantillons en analyse protéomique. SCX et WCX: Chromatographie liquide échangeuse de cations ; SAX et WAX: Chromatographie liquide échangeuse d'anions ; RP-HPLC : chromatographie liquide en phase inverse ; HILIC : chromatographie liquide à interactions hydrophiles

Nous détaillerons ci-dessous l'électrophorèse bidimensionnelle et le préfractionnement des protéines par focalisation isoélectrique en milieu liquide.

L'électrophorèse bi-dimensionnelle (E2D)

Développée en 1970 par Kenrick et Margolis (Kenrick and Margolis, 1970), cette technique sépare, dans un premier temps, les protéines d'un extrait biologique en fonction de leur charge par isoélectrofocalisation (IEF) dans un gel de polyacrylamide (bandelette) jusqu'à atteindre

une valeur de pH égale à leur point isoélectrique (pI). Dans un second temps, les protéines sont séparées en fonction de leurs masses moléculaires (SDS-PAGE). Après la migration et la fixation des protéines, les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent (O'Farrell, 1975). Une fois les protéines révélées, les spots d'intérêt sont excisés pour une digestion enzymatique, généralement à la trypsine. Les mélanges peptidiques obtenus sont ensuite analysés par MS pour identifier la protéine étudiée.

L'E2D permet de comparer de nombreuses conditions et de représenter les protéines présentes à un instant donné, dans une condition donnée. Cependant, elle présente certains inconvénients comme i) les protéines présentant des propriétés physico-chimiques particulières (très basiques, très acides, très hydrophobes, de haut poids moléculaire) peuvent être perdues lors de la séparation ou encore ii) les glycoprotéines et les lipoprotéines migrent difficilement dans les bandelettes ou dans les gels de polyacrylamide (Rabilloud and Lelong, 2011), de façon non exhaustive.

Afin de supplanter ces inconvénients, de nouvelles méthodes de séparation sans utilisation d'un gel de polyacrylamide (gel-free) ont été développées (Macek and Mijakovic, 2011). On distingue 2 stratégies principales: soit l'échantillon complexe est préfractionné au niveau protéique, soit l'échantillon est préalablement digéré puis les peptides sont séparés en phase liquide (**Figure 20**).

Préfractionnement des protéines par IEF en phase liquide

Les protéines peuvent être séparées en phase liquide en fonction de leur pI. Comparée à l'IEF sur gel, l'IEF en phase liquide offre l'avantage d'être facilement combinée avec d'autres méthodes préparatoires complémentaires (Bier, 1998; Li et al., 2005). Actuellement, plusieurs instruments commerciaux ont été développés comme le Rotofor et le microRotofor (Bio-Rad), le RF3 (pour Recycling Free Flow Focusing ; Rainin Instr. Co), et le IsoelectrIQ2 (Proteome Systems).

VII.4-Spectrométrie de masse

Avant l'apparition de la spectrométrie de masse, les protéines étaient essentiellement séquencées et identifiées par des méthodes de séquençage chimique (dégradation d'Edman) ou enzymatique (aminopeptidases et carboxypeptidases). Le processus d'identification était lent, onéreux et parfois inadéquat. En effet, le séquençage d'Edman est inefficace ou difficile à mettre en œuvre pour des protéines modifiées en N-terminal (Wellner et al., 1990).

A la fin des années 1990, les innovations au niveau des sources d'ionisation a permis à la MS de devenir la méthode incontournable pour l'étude des biomolécules. Les échantillons complexes en faible quantité étaient analysables et ce, dans un temps beaucoup plus court. Le principe de la MS réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées suivant leur rapport masse/charge (m/z). Cette analyse est réalisée à travers un processus séquentiel (**Figure 21**). Tout d'abord, les molécules sont ionisées dans la source. Les ions sont ensuite séparés en phase gazeuse dans l'analyseur selon leurs rapports m/z puis détectés (Hernandez et al., 2006; Vachet and Glish, 1996).

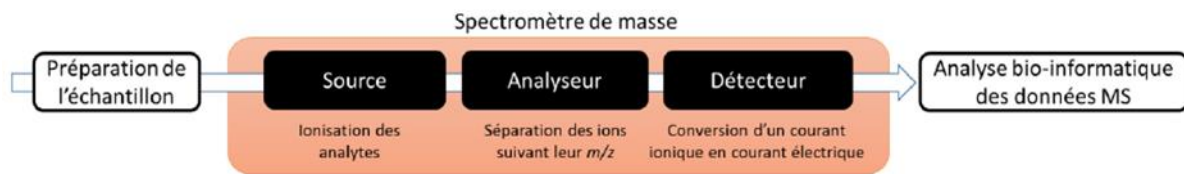


Figure 21 : Schéma de fonctionnement du spectromètre de masse

Les sources d'ionisation

Plusieurs méthodes d'ionisation existent en fonction de la nature de la molécule. En analyse protéomique, les ionisations MALDI et ESI sont les plus couramment utilisées.

Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation (MALDI) : Introduit initialement en 1988 (Karas and Hillenkamp, 1988; Tanaka et al., 1988), l'ionisation MALDI est une méthode d'ionisation douce utilisant un faisceau laser pulsé ayant généralement une longueur d'onde dans le domaine des UV. L'échantillon est d'abord mélangé avec une matrice organique en large excès puis le mélange matrice/échantillon est co-cristallisé sur une surface métallique. Le faisceau laser excite et ionise la matrice par absorption des photons. Cela entraîne la dissociation des cristaux de matrice renfermant l'échantillon. Cette dernière transfère une partie de l'énergie du laser aux analytes pour former des ions monochargés en phase gazeuse (Clark et al., 2013; Salih et al., 1998). La matrice, de nature organique, a plusieurs rôles : absorber l'énergie du laser (photosensible) et protéger l'échantillon du faisceau laser incident (Lewis et al., 2006). Plusieurs matrices sont utilisées en protéomique: i) l'acide sinapinique (SA) pour les protéines, ii) l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA) pour les peptides, et iii) l'acide 2,5-Dihydroxybenzoïque (DHB) pour les peptides, les oligosaccharides, les glycoprotéines, les lipides (Kussmann et al., 1997).

Ionisation électrospray (ESI) : L'ionisation ESI est produite par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide sortant avec un faible débit de la pointe d'un tube capillaire (ou aiguille) du système chromatographique (Dole et al., 1968; Fenn et al., 1989). L'éluat va former un cône dynamique à la pointe du capillaire, appelé le cône de Taylor, et se disperser sous forme des gouttelettes sous l'effet du champ électrique (Figure 22). Par la suite, les gouttelettes formées, au contact avec un gaz chauffé, vont s'évaporer progressivement jusqu'à ce qu'elles deviennent instables. Sous l'effet des forces de répulsion coulombiennes, ces gouttelettes vont exploser (F.R.S, 1882). Au final, des ions désolvatés après évaporation totale du solvant seront obtenus (Ho et al., 2003). Les ions générés sont principalement multichargés donnant ainsi un avantage pour analyser des molécules de masse plus importante puisque leur m/z reste relativement faible (Wilm, 2011).

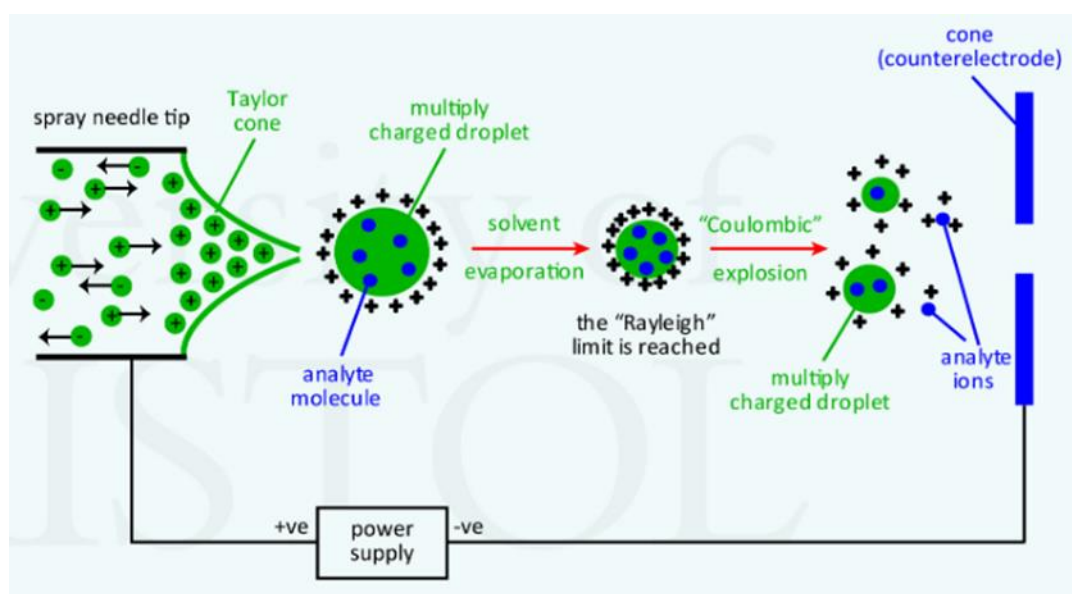


Figure 22 : Principe de l'ionisation ESI (www.bris.ac.uk)

La sensibilité de l'ionisation ESI a été améliorée en miniaturisant la source, on parle ainsi de source nano-spray. Cette dernière (nano-ESI) forme des gouttelettes plus petites en utilisant un débit d'échantillon beaucoup plus faible (en général de l'ordre de quelques centaines de nL/min). Ces sources donnent la possibilité d'étudier des molécules en faible quantité avec une grande sensibilité comme l'exige la protéomique (Wilm and Mann, 1996).

Les analyseurs

L'analyseur de masse a pour rôle de séparer les ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z . Plusieurs types d'analyseurs sont utilisés en protéomique sont : i) les analyseurs quadripolaires (Q), ii) les analyseurs à temps de vol (TOF pour Time Of Flight), iii) les trappes

ioniques (LIT), iv) les analyseurs par résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FT-ICR) et v) l'analyseur Orbitrap (Han et al., 2008). Ces analyseurs ont des caractéristiques différentes, résumées dans le **Tableau 3**. La diversité de ces analyseurs est une vraie richesse pour les analyses protéomiques.

Leurs performances sont évaluées grâce à plusieurs caractéristiques (Edmond de Hoffmann, 2005) telles que :

- La gamme de masse des rapports m/z mesurables.
- La vitesse de balayage de la gamme de masse.
- La transmission des ions (rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et ceux entrant dans l'analyseur).
- La précision sur la masse (la différence de masse observable entre le m/z théorique et le m/z mesuré de l'ion analysé).
- La résolution de l'analyseur (la capacité à distinguer des ions de m/z proches).
- La sensibilité ou le seuil de détection.

Tableau 3: Performances des principaux analyseurs de masse (Holčapek et al., 2012)

Analyseur	Résolution	Précision (ppm)	Gamme de masse
Triple quadripôle	7500 (m/z 508)	5	10-3000
Q-TOF	22,500 (m/z 956)	< 1	20-16,000
Orbitrap	100,000 (m/z 200)	< 2	50-4000
Q-exactive	140,000 (m/z 200)	< 1	50-4000
Q-ICR (Résonance Cyclotronique Ionique)	2500,000 (m/z 400)	< 0,25	100-10,000

Un autre atout de la MS est la possibilité de réaliser des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La MS/MS consiste à coupler plusieurs analyseurs entre eux afin d'obtenir des appareils dits hybrides. L'utilisation de la (MS/MS) permet de mesurer la masse de l'ion d'intérêt appelé aussi ion précurseur ou encore ion parent, mais également la masse des ions fils, obtenus après fragmentation de cet ion parent. Une telle analyse se déroule en trois étapes : i) un premier analyseur sélectionne un ou plusieurs ions précurseurs (parents) avec un certain rapport m/z, ii) l'ion précurseur est ensuite fragmenté dans une cellule de collision, iii) enfin, un deuxième analyseur consiste à mesurer les rapports m/z des ions fragments (fils) (**Figure 23**). L'intérêt de la spectrométrie de masse en tandem réside dans la possibilité de confirmer

l'identité de l'ion parent par l'intermédiaire des ions fils, de le quantifier de façon précise et d'augmenter ainsi la sensibilité de détection.

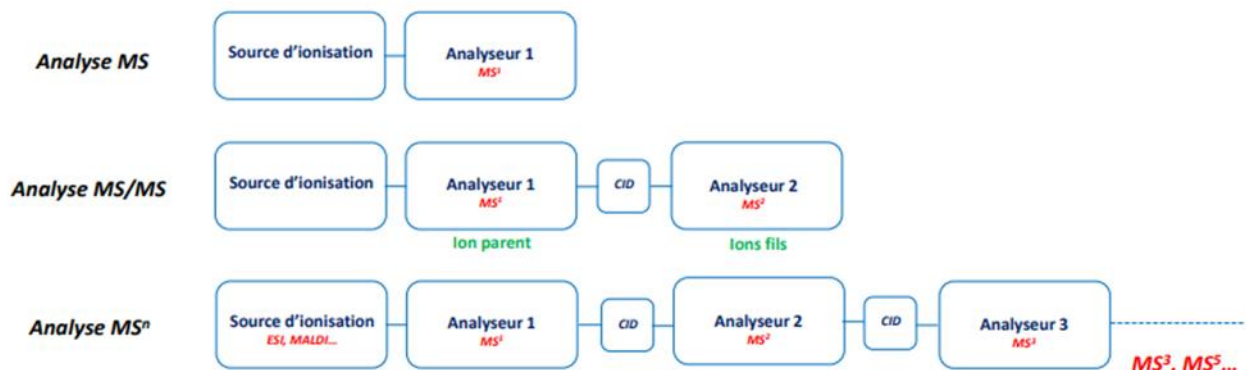


Figure 23 : Principe des différents types de balayage MS, MS/MS et MS^n

Nous détaillerons dans cette partie l'analyse en tandem par l'association quadripôle orbitrap présent dans l'instrument Q-exactive distribué par Thermo Scientific.

Le Q-exactive: Ce type de spectromètre combine les performances d'un analyseur quadripolaire utilisé pour sélectionner les ions parents, et d'un second analyseur orbitrap qui assure une détection à très haute résolution avec une excellente précision (**Figure 24**).

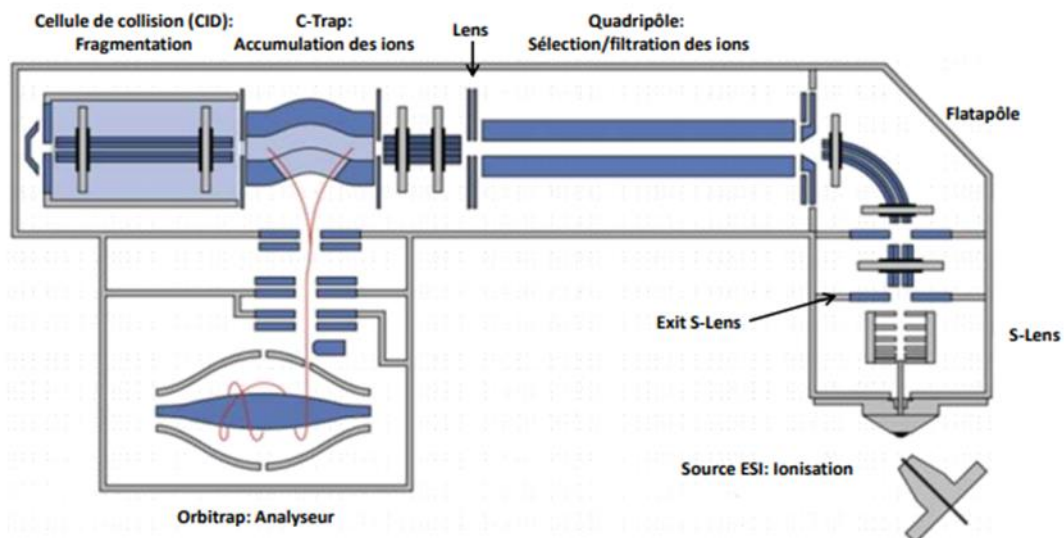


Figure 24 : Représentation du Q-exactive (d'après Thermo Fisher)

Les ions multi-protonés générés à pression atmosphérique par une source ESI, sont dirigés vers le capillaire de transfert chauffé (275 °C, dans le cas de notre étude) connecté à une série de lentilles (S-lens). Ces lentilles constituent le point d'entrée des ions vers le système et vont

permettre ainsi d'accélérer, de focaliser et de transmettre les ions jusqu'au flatapôle via une lentille de sortie « Exit S-Lens ». Le processus de désolvatation se poursuit tout au long de ce déplacement par collision avec le gaz résiduel. Le flatapôle est constitué de quatre barreaux plats avec un espacement de 2 mm entre les barreaux. La courbure de ses barreaux (90 °C) favorise l'élimination des composés neutres. Les ions sont ensuite focalisés et transmis via une lentille vers le premier analyseur, quadripôle. Celui-ci va permettre de sélectionner un ou plusieurs ions précurseurs dans la gamme de masse désirée, généralement en protéomique entre 200 à 2000 m/z pour un « Full-scan » (Détection de tous les ions dans la gamme m/z de l'analyseur). Les ions précurseurs sont ensuite accumulés dans le piège à ions « C-Trap » ou fragmentés dans la cellule de collision (High Energy Collision, HCD), avant d'être analysés dans l'orbitrap. Les ions parents entrent en collision avec les molécules de gaz (azote), entraînant une rupture des liaisons chimiques résultant de la formation d'ions fils. L'énergie de collision appliquée est généralement comprise entre 20 et 50 eV pour la fragmentation des peptides. Avant leur détection dans l'orbitrap, les ions fragments ainsi formés sont à nouveau transmis et accélérés vers la « C-Trap », en appliquant une différence de potentiel (Michalski et al., 2011). Ainsi et contrairement au triple quadripôle qui fonctionne de manière continue, les ions sont accumulés dans la C-Trap avant leur analyse par l'orbitrap qui donne accès à la masse exacte des composés d'intérêt. Le Q-exactive est caractérisé par une précision sur la masse mesurée inférieure à 1 ppm (**Tableau 3**), ce qui lui permet de différencier deux ions avec un m/z très proches (par exemple : 400,04965 et 400,04930 (0,00035 Da). L'orbitrap a été développé dans les années 2000 par Alexander Makarov (Makarov, 2000). Il est constitué d'une électrode externe creuse à l'intérieur de laquelle est placée coaxialement une électrode interne centrale en forme de fuseau. Les ions sont injectés en paquet tangentiellement à l'électrode interne au moyen d'interstices situés sur l'électrode externe. Un champ électrostatique quadripolaire est maintenu entre les deux électrodes permettant de piéger les ions autour de l'électrode centrale. Chaque ion entrant dans ce piège aura à la fois un mouvement circulaire autour de l'électrode, ainsi qu'un mouvement axial le long de cette électrode (**Figure 25**).

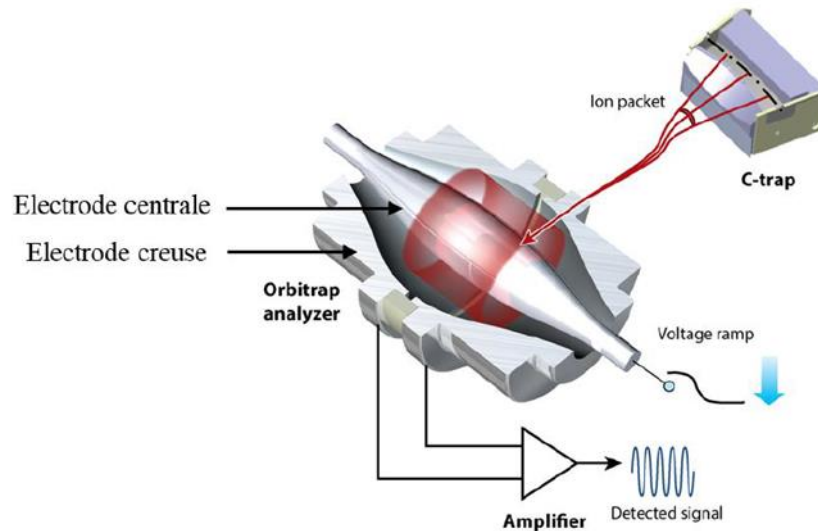


Figure 25 : Représentation schématique de l'analyseur Orbitrap (Eliuk and Makarov, 2015)

Les oscillations axiales des ions avec une fréquence f , dépendent particulièrement du rapport m/z (Hu et al., 2005; Makarov et al., 2009). Les courants induits par les oscillations des ions entre les deux électrodes, sont ensuite amplifiés et convertis par transformée de Fourier. Il en résulte alors la masse et l'intensité des ions, formant ainsi un spectre de masse (Hu et al., 2005; Makarov et al., 2009; Scigelova and Makarov, 2006). L'orbitrap a contribué à l'essor du domaine de la protéomique. En effet, cette technologie a révolutionné l'analyse par spectrométrie de masse et s'est imposée très rapidement pour l'analyse des macromolécules biologiques. En grande partie grâce à ses performances techniques, un tel analyseur permet d'atteindre une résolution d'environ 100 000 ($m/z= 200$) et une précision sur la mesure de masse inférieure à 2 ppm (Scigelova and Makarov, 2006). Le tableau 5 résume les principales caractéristiques techniques des analyseurs de masse utilisés actuellement en protéomique.

Interprétation des analyses de protéines par spectrométrie en tandem

La spectrométrie de masse tandem (MS/MS) appliquée à l'analyse des peptides issus de la digestion enzymatique des protéines, permet d'avoir des informations sur la séquence des acides aminés. Les fragmentations des peptides sont principalement effectuées à basse énergie en analyse protéomique. Différentes théories existent pour expliquer la fragmentation des peptides (théorie du proton mobile, par exemple). Nous ne discuterons pas ici de ces théories. Ces fragmentations semblent relativement aléatoires et pas séquentielles. Cependant, certains sites de fragmentation peuvent être privilégiés par rapport à d'autres sites. Ceci se traduit par l'observation de signal ionique avec une abondance plus importante. Généralement, la

fragmentation a lieu au niveau de la liaison peptidique. Proposée par Roepstorff et Fohlman (1984) puis complétée par Biemann (1988), une nomenclature précise a été attribuée aux ions fils d'un peptide analysé par MS/MS. Ainsi, si une charge positive est retenue sur le côté N-terminal, les ions fils sont notés a, b ou c. Si la charge est conservée sur le côté C-terminal, les ions sont appelés x, y ou z (**Figure 26**). L'indice numérique indique le nombre de résidus dans le fragment (Biemann, 1988; Roepstorff and Fohlman, 1984).

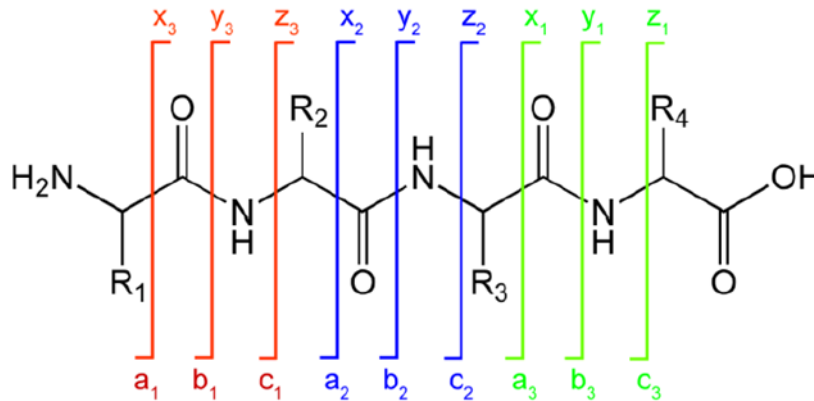


Figure 26 : Nomenclature des ions fragments (Roepstorff and Fohlman, 1984)

Ainsi, en analysant les différences de masse entre les différents ions détectés sur le spectre MS/MS, il est alors possible de retrouver, en se référant à une banque de données, la séquence en acides aminés et donc de déduire la séquence du peptide analysé.

VII.5-La protéomique quantitative

La quantification des protéines consiste à comparer l'abondance des protéines exprimées dans différentes conditions afin de comprendre les mécanismes moléculaires associés (Ong and Mann, 2005). Dans le contexte bactérien, la protéomique quantitative permet, par exemple, d'étudier la réponse de la bactérie après un traitement par un antibiotique, lors d'un processus d'infection, comparer des souches présentant des profils spécifiques ou encore appréhender le processus de développement d'un biofilm (Pérez-Llarena and Bou, 2016).

Historiquement, les premières approches de quantification étaient basées sur la séparation des échantillons protéiques par électrophorèse bidimensionnelle (E2D). La taille et l'intensité des spots protéiques étaient par la suite comparées entre les gels 2D (Brauner et al., 2014). Ces méthodes ont connu une avancée importante avec la mise au point de la technique DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) (Unlü et al., 1997). Dans cette approche, les échantillons sont marqués par des fluorophores (comme par exemple les cyanines 2, 3 et 5) puis mélangés.

Les protéines peuvent alors être séparées sur un même gel 2D (pour éliminer les biais induits par les différences de migrations d'un gel à l'autre). La comparaison de la fluorescence des différentes cyanines pour chaque spot permet de sélectionner puis d'exciser les spots présentant une abondance différente pour une identification par MS (Unlü et al., 1997).

Plus récemment, des approches de quantification basées uniquement sur l'analyse MS ont été développées. On distingue la quantification relative et la quantification absolue (**Figure 27**). La quantification relative compare les niveaux d'une protéine spécifique dans différents échantillons et les résultats sont exprimés en tant que rapport de variation relative de l'abondance des protéines entre conditions (« Fold change »). La quantification absolue consiste à déterminer la quantité exacte d'une protéine dans l'échantillon (ex : en ng/ml ou $\mu\text{mol/ml}$) (Elliott et al., 2009). Aujourd'hui, dans la littérature en protéomique quantitative, les méthodes relatives sont les plus nombreuses.

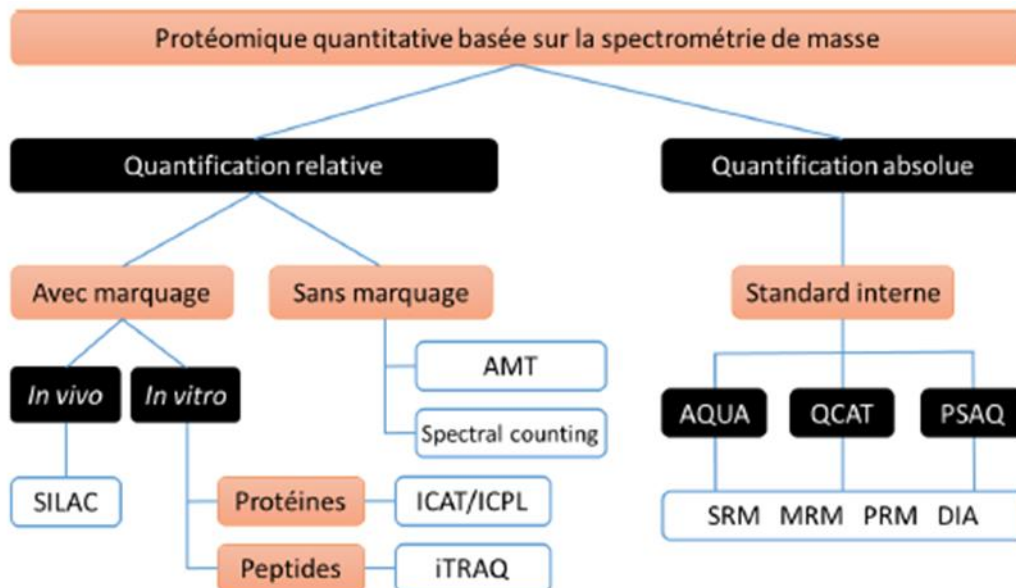


Figure 27 : Méthodes de quantification basées sur la spectrométrie de masse

Quantification relative

Du point de vue méthodologique, ces aspects de quantification relative peuvent être divisés en 2 sous-parties, la première méthode qui n'implique pas de marquage, couramment appelée « *label-free* » et la seconde avec un marquage à l'aide d'isotopes stables.

Quantification sans marquage « label-free » : La quantification label-free consiste à comparer la quantité relative des peptides résultants d'une protéolyse globale entre deux ou plusieurs échantillons. Un avantage intéressant est que cette technique ne consomme que de faibles

quantités d'échantillons. De plus, cette méthode ne nécessite pas une préparation très laborieuse de l'échantillon, et permet de comparer un nombre « illimité » d'échantillons, abstraction faite des potentielles difficultés de traitement bioinformatique. Lors de sa mise en œuvre, après extraction de l'échantillon étudié, les protéines sont digérées puis analysées par LC-MS/MS. La quantification relative peut alors s'effectuer de différentes façons, soit par « accurate mass and time » (AMT), soit par « spectral counting » (**Figure 28**) et décrites plus en détails ci-dessous.

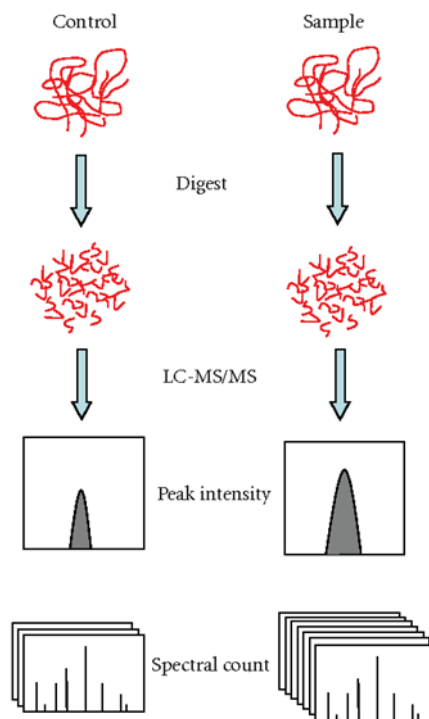


Figure 28 : Schéma de la quantification sans marquage. Les différents échantillons sont soumis à une analyse LC-MS/MS individuelle. La quantification est basée sur la comparaison de l'aire du pic chromatographique du même peptide (AMT) ou du nombre de spectres ayant permis d'identifier la même protéine (« spectral counting »)

- La méthode spectral counting

Le principe de la méthode spectral counting repose sur le fait qu'une protéine abondante va générer un nombre important de peptides eux aussi très abondants, et par conséquent conduire à l'acquisition d'un nombre important de spectres MS/MS pour les peptides de cette protéine. Cette méthode est utilisée pour comparer l'abondance d'une même protéine dans plusieurs conditions. Certaines limitations existent comme les protéines de faible abondance qui produisent un nombre limité de peptides identifiables, ou encore les isoformes générant des peptides identiques. On ne quantifie alors de façon fiable que les protéines « les plus abondantes

» d'une condition. Les petits changements en abondance des protéines ne sont donc pas mesurables (ou fiable) par spectral counting (Old et al., 2005).

- La méthode AMT

La stratégie AMT également nommée « peptide peak intensity measurement », est une méthode de quantification qui se déroule en deux phases. Elle consiste dans un premier temps, à identifier les protéines d'un mélange complexe préalablement séparées par différentes techniques de fractionnement et, dans un deuxième temps, à quantifier les protéines à partir des intensités des signaux MS des peptides générés par digestion trypsique des protéines des échantillons à comparer (**Figure 29**).

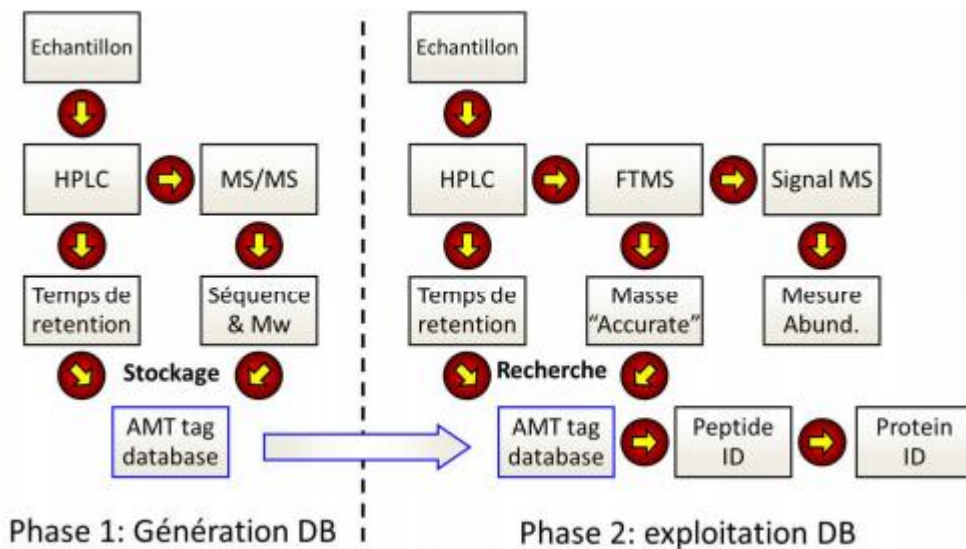


Figure 29 : L'approche AMT en 2 phases : i) construction d'une base de données, ii) quantification et identification des peptides

Durant la première phase, on caractérise de la manière la plus exhaustive possible le protéome de l'échantillon d'intérêt (cellules, fluides biologiques ou tissus). Pour ce faire, on utilise des techniques de préfractionnement de l'échantillon au niveau protéique, tel que le gel SDS-PAGE et/ou peptidique tel qu'un fractionnement IEF-OFFGEL. Les peptides générés par la digestion trypsique des protéines sont séparés sur une colonne de chromatographie liquide et séquencés par une méthode de spectrométrie de masse en tandem. Le préfractionnement des protéines ou des peptides implique plusieurs analyses pour un même échantillon. L'ensemble des informations issues de ces analyses protéomiques sont stockées dans une base de données nommée « base AMT ». Dans cette « base AMT », les peptides sont définis par i) leur séquence en acides aminés, ii) leur masse théorique calculée à partir de leur séquence en acides aminés

et iii) leur temps de rétention chromatographique. Un couple masse théorique - temps de rétention étant nommé AMT tags.

Durant la deuxième phase, les peptides (et donc in fine les protéines) issus des différentes conditions à comparer, sont quantifiés à partir de l'intensité de leurs signaux MS. En spectrométrie de masse, on mesure sur le détecteur des courants ioniques. Dans une matrice de complexité similaire (un même type d'échantillons biologiques), il est possible de mesurer le courant ionique ou le signal MS d'un ion peptidique en particulier nommé XIC (Xtracted Ion Current) ; le XIC étant corrélé à l'abondance du peptide (Ong and Mann, 2005). Cette méthode de quantification consiste donc à extraire le signal MS pour chaque peptide. Cependant, cette seconde phase de quantification des peptides nécessite une grande précision dans les valeurs m/z ainsi qu'une très bonne reproductibilité de mesure des RT. Ainsi, la comparaison est dépendante de la préparation des échantillons (matrice, dessalage...), du système chromatographique (usure de la colonne, de la pré-colonne), de la sensibilité et de l'étalonnage du spectromètre de masse. L'écart entre ces variables est plus prononcé lors de l'exécution des projets sur une large période (Schulze and Usadel, 2010). Cependant, les avancées techniques réalisées que ce soit en matière d'analyseurs, de chromatographie et de logiciels de traitement des résultats (intégration des modules statistiques adaptés et d'outils spécifiques pour aligner les chromatogrammes) ont permis d'améliorer la qualité des résultats proposés par la méthode AMT (Wasinger et al., 2013).

L'information pertinente au terme de l'analyse quantitative repose sur la masse (précise) des peptides, leur temps de rétention chromatographique et leurs intensités dans un échantillon donné. La précision de mesure de masse et le temps de rétention chromatographique contrôlé permettent d'obtenir la séquence en acide aminés de ces peptides en alignant les masses mesurées et les masses théoriques contenues dans la base de données ainsi que les temps de rétention chromatographiques expérimentaux et ceux définis dans la base de donnée.

Quantification par marquage: Lors du marquage par des isotopes stables, les peptides marqués présentent une structure chimique identique par rapport à leurs homologues non marqués, mais leurs masses diffèrent. Cette différence de masse est détectée par MS, et la quantification est réalisée par comparaison de l'intensité du signal de ces deux formes peptidiques (Ong and Mann, 2005). Les marqueurs isotopiques peuvent être introduits à différents niveaux (**Figure 27**): i) *in vivo* par marquage métabolique en ajoutant dans le milieu de culture des acides aminés marqués (SILAC, Stable Isotope Labeling by Aminoacids in cell

Culture) (Mann, 2006), ii) *in vitro* par des méthodes chimiques (ICAT: Isotope Coded Affinity Tag, et ICPL : Isotope-Coded Protein Label) ou iii) par marquage lors d'un traitement enzymatique (protéolyse avec marquage H₂O¹⁸) (Bantscheff et al., 2007).

La méthode iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification) basée sur un marquage chimique isobarique peut être également utilisée pour quantifier les peptides dans plusieurs échantillons (jusqu'à 8 conditions) en une seule analyse (Wiese et al., 2007). Brièvement, chaque échantillon est mis en réaction avec un marqueur spécifique. Les marqueurs ont la même masse intacte mais génèrent après fragmentation différents ions rapporteurs ayant des écarts de masse de 1 Da. Ainsi, des peptides identiques, issus de différentes conditions peuvent être sélectionnés pour la fragmentation en tant qu'un seul ion précurseur. Leur abondance relative est comparée lors de l'analyse MS/MS, car leur fragmentation génère des ions rapporteurs distincts (Linke et al., 2013).

Pour ces méthodes avec marquage, les échantillons issus de différentes conditions d'étude sont mélangés puis analysés par analyse nanoLC-MS/MS. La quantification est réalisée en une seule analyse à travers la comparaison des intensités des peptides marqués et non marqués issus des différentes conditions. Cependant, ces méthodes présentent également quelques limitations. Elles demandent en particulier une préparation relativement longue et délicate, leur coût est assez élevé, et le marquage peut être partiel.

La Quantification absolue

Afin de déterminer précisément la quantité d'une protéine dans un échantillon (comme peut le proposer un test ELISA), la quantification absolue nécessite l'utilisation d'un standard interne marqué qui peut être : un peptide isolé (approche AQUA: Absolute QUAntification), une série de peptides constituant une protéine chimérique (approche QCAT : Quantification conCATemer), ou d'une protéine entière standard (approche PSAQ : Protein Standard for Absolute Quantification) (**Figure 30**). Cet étalon est alors ajouté en quantité connue dans l'échantillon à analyser par MS. Il a été démontré que la nature de l'étalon interne n'influçait pas la quantification mais pouvait néanmoins dans certains cas limiter l'utilisation de la méthode de fractionnement (Havlis and Shevchenko, 2004).



Figure 30 : Approches de quantification absolue utilisant des standards internes (Brun et al., 2007)

Méthode SRM: Les méthodes d'acquisition MS spécifiques ont aussi été développées et reposent principalement sur des approches de type Selected Reaction Monitoring (SRM), Parallel Reaction Monitoring (PRM) et Data-Independent Acquisition (DIA) (**Figure 31**). Ces méthodes ne sont accessibles que sur des spectromètres de masse spécifiques.

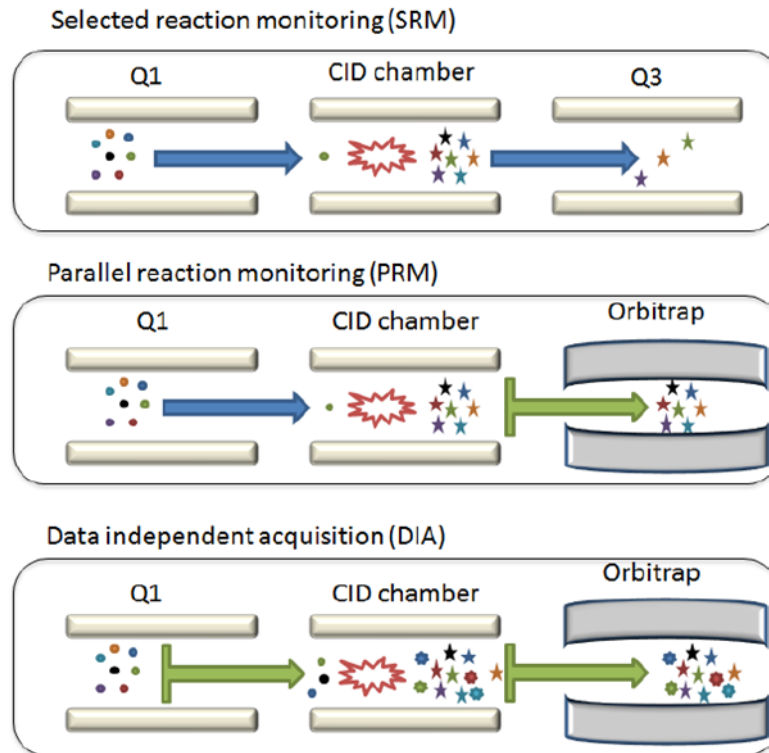


Figure 31 : Principe des méthodes de quantification SRM, PRM et DIA. En SRM, un ion fragment est sélectionné pour un ion peptidique précurseur unique et son intensité utilisée pour la quantification. En PRM, un ion précurseur unique est sectionné et permet de générer le profil de fragmentation complet qui va être utilisé pour la quantification. Dans la méthode DIA, de multiples ions précurseurs sont fragmentés simultanément et les ions fragments sont mesurés (Nouri-Nigjeh et al., 2015)

L'une des méthodes de spectrométrie de masse mise au point pour quantifier les protéines/peptides de manière absolue est la méthode SRM. Ce type d'analyse nécessite un spectromètre de masse de type triple quadripôle (QqQ) et de connaître préalablement les peptides/protéines à quantifier. Généralement, cette approche intervient après une analyse à large échelle effectuée par label-free. Dans la méthode SRM, il faut connaître le rapport m/z du père et le rapport m/z d'un des ions fils. L'ion précurseur de m/z connu est sélectionné dans le premier quadripôle (Q1), puis fragmenté dans le second quadripôle (Q2). Le quadripôle Q3 est programmé pour ne laisser passer que le rapport m/z correspondant au fils recherché. Le couple m/z de l'ion précurseur et m/z de l'ion fils est appelé transition (Lange et al., 2008; Zhao and Brasier, 2013). On peut augmenter la spécificité analytique *via* l'analyse de plusieurs transitions, appelée Multiple Reaction Monitoring (MRM). Le temps de rétention ajoute un critère supplémentaire de spécificité (Lange et al., 2008).

La méthode de quantification SRM/MRM présente quelques points faibles. En effet, une analyse label-free est généralement réalisée préalablement sur un appareil de haute résolution et de haute précision de mesure (par exemple avec un analyseur de type orbitrap). Or, l'analyse SRM/MRM est effectuée avec un spectromètre de masse QqQ dont la précision de sélection est relativement faible (Ronsein et al., 2015). De plus, les ions fils générés ainsi que leurs intensités ne sont pas similaires entre les deux systèmes.

Les méthodes PRM et DIA: Récemment, les méthodes PRM et DIA ont été développées sur les spectromètres de masse de type Q-Exacte (couplage d'un quadripôle à un Orbitrap) ou Q-TOF, et permettent de s'affranchir des limites des méthodes SRM/MRM. A l'inverse de la quantification SRM, les méthodes PRM et DIA ne nécessitent pas de connaître précisément une transition. En plus, l'acquisition des spectres MS/MS se fait avec des analyseurs de hautes résolution, sensibilité et précision. La méthode PRM repose sur le suivi simultané de plusieurs ions fils issus d'un peptide cible (**Figure 31**). Brièvement, l'ion précurseur d'intérêt est isolé puis fragmenté dans la cellule de collision. Les ions fils sont ensuite analysés par l'analyseur Orbitrap (Peterson et al., 2012).

Dans la méthode DIA, également appelée SWATH (pour Sequential Window Acquisition of all THEoretical mass spectra), des fenêtres successives de faible gamme de rapport m/z sont sélectionnées (ex : m/z 500-550) et les ions précurseurs de cette fenêtre sont fragmentés en même temps, puis les ions fils sont analysés par l'Orbitrap (Held et al., 2013). Les données MS sont analysées *via* des outils bio-informatiques adaptés et très performants. La quantification est faite par la mesure des intensités ou l'aire des ions fils obtenus.

Afin de les comparer, le **Tableau 4** ci-dessous résume les avantages et les inconvénients des techniques de quantification utilisées en protéomique.

Tableau 4 : *Avantages et inconvénients des différentes approches protéomique quantitatives (Tiwari and Tiwari, 2014)*

Proteomic Tools	Merits	Demerits	References
GEL-BASED METHODS			
2DE	(1) Simplistic (2) Robust (3) Suitable for MS analysis	(1) Involve large amount of sample (2) Low throughput (3) Poor recovery of hydrophobic proteins (4) High inter-gel variability	Klose, 1975; O'farrell, 1975; Meleady, 2011; Rabilloud and Lelong, 2011
2D-DIGE	(1) Multiplexing (2) Better quantitation (3) Minimized gel to gel variation	(1) Expensive Cy dyes (2) Poor recovery of hydrophobic proteins (3) Difficulty in separation of low molecular weight	Unlu et al., 1997; Yan et al., 2002; Knowles et al., 2003; Timms and Cramer, 2008; Chen et al., 2010
GEL-FREE METHODS			
SILAC	(1) High throughput (2) Robust (3) Sensitive and simple	(1) Suitable only for tissue culture models (2) Costly reagents (3) Not applicable to tissue sample	Ong et al., 2002; Ong and Mann, 2005; Elliott et al., 2009
ICAT	(1) Selectively isolates peptide (2) Compatible with any amount of protein (3) Complexity of the peptide mixture is reduced	(1) Cannot identify proteins with less than 8 cysteines (2) Size of ICAT label is large (≈ 500 Da) (3) Post-translational modification information is frequently lost	Gygi et al., 1999; Gygi and Aebersold, 2000; Toyo'oka, 2012
iTRAQ	(1) Applicable to versatile samples (2) Multiplexing (3) Better quantitation	(1) Involve high amount of sample (2) Incomplete labeling (3) Expensive reagents	Ross et al., 2004; Desouza et al., 2009
Label-free	(1) Involve less amount of sample (2) Higher proteome coverage (3) Avoid labeling	(1) High throughput instrumentation (2) Not suitable for low abundant proteins (3) Incomplete digestion may introduce error (4) Multiplexed analysis is not possible in one experiment	Mirza and Olivier, 2008; Zhu et al., 2010
SRM	(1) Highly sensitive, quantitatively accurate and highly reproducible (2) Protein detection is relatively rapid and straightforward (3) Enable the detection of low (>10 ng/ml) abundance proteins (4) Quantification of post-translational modification	(1) Limited broad scale application because of difficulty of generating high-quality SRM assay. (2) Sensitivity is not comparable to immunological assays (3) Detection and quantification of low abundance proteins (i.e., ~ 10 ng/ml or less)	Elschenbroich and Kislinger, 2011; Hossain et al., 2011

VII.6-Protéomique et étude des souches bactériennes pathogènes

Chez les bactéries à Gram négatif, *PA* est l'un des organismes le plus étudié en protéomique (Nigaud et al., 2010; Park et al., 2014). La bactérie *E. coli* est également une des bactéries qui a souvent fait l'objet de recherches en protéomique, en particulier sous la forme biofilm. Par une approche d'électrophorèse bidimensionnelle, Collet et ses collaborateurs ont démontré que RpoS, le régulateur principal de la phase stationnaire de croissance, joue également un rôle dans l'expression des gènes d'*E. coli* en biofilm (Collet et al., 2008).

Dans le cas de *Legionella pneumophila*, il a été démontré que les biofilms jouaient un rôle dans la survie ainsi que dans l'apparition d'épidémies de légionellose (Abdel-Nour et al., 2013; Murga et al., 2001; Rogers et al., 1994). Les études protéomiques sur cette bactérie ont montré qu'à basse température, les facteurs de virulence (par exemple, MIP, la protéine induite par les macrophages, ou les protéases sécrétées) sont en grande partie réprimés chez les cellules adhérentes. En revanche, d'autres protéines telles qu'une lipoprotéine associée au peptidoglycane, ou encore de nombreuses protéines hypothétiques, qui semblent être uniques au genre de la *legionella*, sont sur-exprimées (Khemiri et al., 2014).

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*), a fait également l'objet de plusieurs études car ce germe est capable de survivre dans l'environnement hospitalier. Cette persistance peut être expliquée par sa capacité à adhérer et s'encapsuler sur des surfaces biotiques et abiotiques. Bien que l'attention se soit concentrée sur les biofilms formés sur des surfaces solides (Espinal et al., 2012; Tomaras et al., 2003). *A. baumannii* forme également des pellicules épaisses à l'interface air-liquide (Marti et al., 2011). Les protéomes de ces deux types de biofilms ont également été caractérisés par électrophorèse bidimensionnelle (Chopra et al., 2013; Marti et al., 2011; Siroy et al., 2006). Ces études ont montré que plusieurs protéines de la membrane externe impliquées dans la résistance au carbapénème, dont CarO et OprD, voient leur expression altérée chez les bactéries sessiles (Gayoso et al., 2014).

Implication de la protéomique dans l'étude du biofilm microbien

Ce n'est que 20 ans après les travaux de Costerton et ses collaborateurs sur les biofilms dans les années 80, et 5 ans après la création du terme protéome (Wasinger et al., 1995), que les premières études visant à examiner l'influence de l'état sessile sur le protéome bactérien ont commencé à émerger (Oosthuizen et al., 2002; Steyn et al., 2001). Toutes ces études ont montré que le mode de croissance en biofilm conduit à un protéome bactérien spécifique par rapport au mode de croissance planctonique (Steyn et al., 2001; Trémoulet et al., 2002; Vilain and Brözel, 2006; Vilain et al., 2004a).

Pour comparer les données obtenues dans les différentes études de biofilms, il serait d'une importance majeure d'établir un modèle de laboratoire standard. Cependant, la littérature met en évidence la diversité des modèles utilisés et l'absence d'un modèle standard (**Tableau 5**). Hors, les études ont démontré que le phénotype biofilm dépend fortement du type et de la nature de la surface colonisée (Deng et al., 2004; Lazazzera, 2005; Schlisselberg and Yaron, 2013; Vilain and Brözel, 2006; Vilain et al., 2004a).

Une autre question concerne le choix du contrôle planctonique. La majorité des études ont choisi les cellules planctoniques en phase stationnaire de croissance comme référence (Guina et al., 2003; Kalmokoff et al., 2006; Stoodley et al., 2002; Trémoulet et al., 2002; Yoon et al., 2002). D'autres études ont montré que les profils protéiques des biofilms étaient plus proches du protéome des organismes planctoniques en phase de croissance exponentielle (Mikkelsen et al., 2007). Cependant, Vilain et Brozel ont montré que les bactéries dans les biofilms matures présentent un profil protéique spécifique qui est statistiquement différent des profils connus des deux phases planctoniques: exponentielles et stationnaires (Vilain et al., 2006).

Tableau 5 : Etudes réalisées sur les biofilms illustrant la diversité des modèles de développement en mode biofilm et de leur stratégies d'analyses protéomiques (Khemiri et al., 2016)

Souches Bactériennes	Mode planctonique	Biofilms	Supports	Méthodes d'analyses	Références
<i>Aggregatibacter</i>		42 h	Plaques 24 puits	SDS-PAGE, LC MS/MS	(Zijne et al., 2012)
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	24 h	24 h	Pyrite	Shotgun	(Vera et al., 2013)
<i>Bacillus cereus</i>	2, 18 h	2, 18 h	Laine de verre	2D-E, microscopie	(Oosthuizen et al., 2002)
<i>Bacillus cereus</i>	Expo, transit, stat	24 h	Laine de verre	2D-E, microscopie	(Vilain & Brozel, 2006)
<i>Bordetella pertussis</i>	Expo, stat	Expo, stat	Billes de propylène	2D-E, MALDI-TOF, FTIR	(Serra et al., 2008)
<i>Bacillus subtilis</i>	18 h	18 h	Laine de verre	2D-E, microscopie	(Oosthuizen et al., 2001)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Stat (24 h)	24 h	Acier inoxydable, fibre de verre, nitrocellulose	2D-E, Q-TOF	(Kalmokoff et al., 2006)
<i>Campylobacter jejuni</i>	20 h	72h	Plaque 24 puits en polystyrène	iTRAQ, LC MS/MS	(Asakura et al., 2007)
<i>E. coli</i>	Expo, stat	12 h 36 h	Agar	N-terminal microsequencing	(Perrot et al., 2001)
<i>E. coli</i>	7 jours	7 jours	Fibre de verre	2D-E, MALDI-TOF, microscopie	(Trémoulet et al., 2002)
<i>E. coli</i>	16 h	16 h	Hydrogel synthétique	2D-E, LC MS/MS	(Orme et al., 2006)
<i>Nitrosomonas europaea</i>	3 semaines	1, 2 semaines	Interface air-liquide	2D-E, MALDI-TOF	(Schmidt et al., 2004)
<i>P. aeruginosa</i>	Stat	18 h, 48 h	Agar	2D-E, MALDI-TOF	(Vilain et al., 2004a)
<i>P. aeruginosa</i>	24 h	24 h	Support en polystyrène	2D-E, MALDI-TOF	(Yoon et al., 2002)
<i>P. aeruginosa</i>	Stat	Stat	Voies respiratoires CF	ICAT	(Guina et al., 2003)
<i>P. putida</i>	1, 4, 6 h	4, 6, 12, 24 h	Silicone/Chemostat	2D-E, Edman dégradation	(Sauer & Camper, 2001)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8, 48 h	8, 48 h	Membranes de dialyses NADIR	2D-E	(Resch et al., 2006)
<i>Staphylococcus aureus</i>	18 h	48 h	Feuilles de valve cardiaque	2D-E, Q-TRAP	(Benard et al., 2009)
<i>Streptococcus pneumonia</i>		3, 6, 9 jours	Culture continue en verre	2D-E, MALDI-TOF, microscopie	(Allegrucci et al., 2006)
<i>X. axonopodis</i>	Début de phase stat	7 jours	Plaques en PVC	2D-DIGE, qRT-PCR	(Zimaro et al., 2013)
<i>Yersinia ruckeri</i>	48 h	48 h	Agar	2D-E, LC MS/MS	(Coquet et al., 2005)

Etudes protéomiques lors des différentes étapes de formation de biofilm

Bien qu'il soit admis que le développement du biofilm suit une série d'événements, l'évolution du protéome bactérien au cours du développement du biofilm a été peu caractérisée (**Figure 32**).

Sauer et ses collaborateurs ont étudié les changements physiologiques chez *PP* et *PA* après fixation sur une surface et au cours des différentes étapes de croissance du biofilm (Sauer and Camper, 2001; Sauer et al., 2002). Ces études ont montré que les bactéries subissent des changements importants dans l'expression génique dès le contact avec la surface, et affichent plusieurs phénotypes au cours des cinq étapes de développement du biofilm. Chez *PA*, la différence moyenne entre les protéomes des cinq étapes de développement a été montrée proche de 35%, ce qui correspond à environ 525 protéines différenciellement exprimées (Sauer et al., 2002). En 2006, Allegrucci et al ont montré que 54% des protéines de *Streptococcus pneumoniae* sont produites en permanence pendant la croissance du biofilm. Au total en comparant l'état planctonique et biofilm mature, 700 protéines spécifiques au biofilm ont ainsi été identifiées (Allegrucci et al., 2006). Dans une revue récente, Khemiri et ses collaborateurs résument les principales protéines impliquées dans la différenciation du biofilm au cours des différents stades de développement (Khemiri et al., 2016).

Malgré ces nombreuses investigations, plusieurs protéines spécifiques du biofilm sont de fonctions inconnues ou hypothétiques. Dans une étude récente, les protéomes de *Desulfovibrio vulgaris* et *Vibrio parahaemolyticus* cultivées en biofilm et en culture planctonique ont montré que la majorité des protéines accumulées par les cellules du biofilm sont hypothétiques (Clark et al., 2012; Dharmaprakash et al., 2014). Même chez une espèce comme *PA*, qui possède un génome très bien annoté, la caractérisation du protéome total en biofilm en utilisant la spectrométrie de masse de haute performance a mis en évidence l'accumulation très importante de plusieurs protéines hypothétiques qui pourraient jouer un rôle important dans la structure et le développement du biofilm (Park et al., 2014).

	Mobility, SOS	QS, Iron, Secretion, TCSs, σ factors, stress, ROS	Active/passive dispersal
Monospecies: aerobic conditions			
Gram-positive	Flagellin, Proteases, Fibrinogen-binding proteins, surface antigens, peptidoglycan synthesis	Quorum sensing, Iron uptake	Nitrogen and carbon metabolism, Stress response
Gram-negative	SOS, Flagellin, Pilin, Fimbriae, Curli, Adhesin, Efflux pumps systems OprF	Iron metabolism, Iron acquisition and uptake Ubiquinone biosynthesis	NlpE, Roc, Envz, OmpR, Cpx, WmpR, BrfAB, DegSU, RpoN, RpoS, BfiSR, BfmSR, MifSR, PhoBR, AmrS, AlgU
			Carbon storage
			
Monospecies : anaerobic conditions	Mobility, Chemotaxis Adhesion, Alginate	Iron metabolism	Amino acid utilization Fatty acid biosynthesis
Multispecies biofilm synergistic /antagonistic behavior	LPS, exotoxin A, high affinity iron-binding siderophore pyoverdine	Iron acquisition Iron/haem transport Iron-binding siderophores	Mdh, pyruvate ferredoxin oxidoreductase, electron transfer flavoprotein, SucC, TrxB, AhpC ...
			Oxidative Stress Cytochromes Iron oxidation Carbon fixation, Vitamins biosynthesis,

Figure 32 : Aperçu de la contribution de la protéomique dans la compréhension du phénotype biofilm (Khemiri et al., 2016)

Présentation du sujet
de thèse

Ces travaux se situent dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire depuis maintenant plusieurs années par différents doctorants Sébastien Vilain (2003), Damien Seyer (2006) puis Camille Macé (2008) et Mohamed Amine Ben Mlouka (2014).

Le développement sous la forme de biofilm joue un rôle essentiel dans la pathogénicité chez *Pseudomonas aeruginosa*. Au cours de la dernière décennie, les mécanismes impliqués dans la formation du biofilm ont été de plus en plus étudiés. Ces travaux ont mis en lumière différents acteurs moléculaires recrutés dans ce processus. Les gènes du flagelle, des pili de type IV (O'Toole et al, 1998), des Cup fimbria (Vallet et al., 2001) et les gènes *pel* (Vasseur et al., 2005) sont les plus fréquemment cités parmi ceux impliqués à différents stades de la formation de biofilm.

En utilisant une approche protéomique différentielle et ses interprétations statistiques, l'existence d'un protéome spécifique chez *PA* organisée en biofilm a été démontré (Vilain et al., 2004b) (**Figure 33**). Lors de ces travaux, une quarantaine de protéines spécifiquement accumulées par les bactéries adhérentes ont été identifiées.

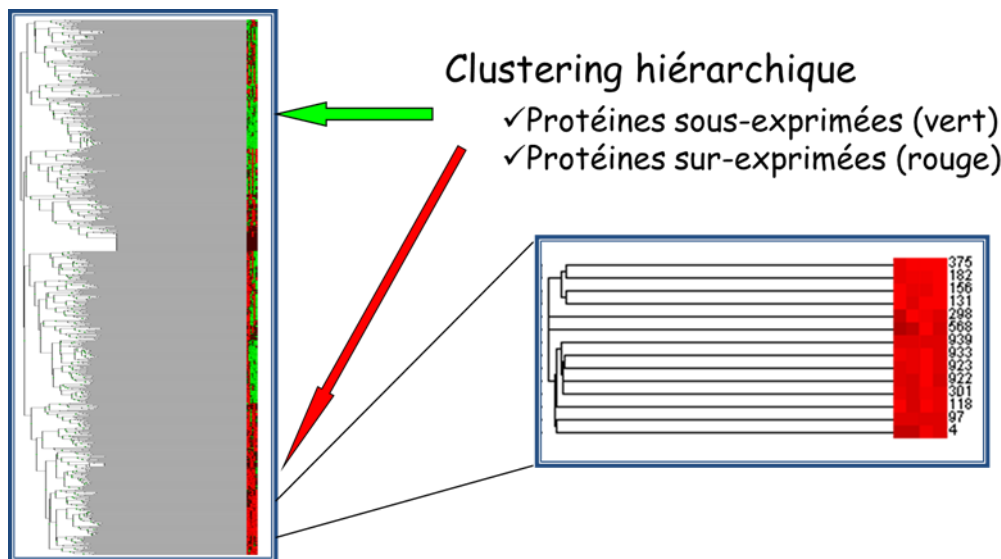


Figure 33 : Clustering hiérarchique faisant apparaître i) en vert, les protéines sous-exprimées et ii) en rouge, les protéines surexprimées en condition biofilm par rapport à la condition planctonique

Au cours de ses travaux de recherches doctorales, Damien Seyer a étudié l'importance de ces protéines dans le phénotype « biofilm » par l'étude de mutants, couplée à une batterie de tests phénotypiques. Cette étude a permis de discriminer plusieurs mutants présentant des phénotypes intéressants sur différents aspects, dont le mutant du gène *pa3731*.

Plusieurs études utilisant des différentes méthodologies indépendantes (Cristal Violet, « biofilm ring test », ...) ont permis de démontrer que le gène *pa3731* est impliqué dans la formation de biofilm. En effet, la souche mutée $\Delta pa3731$ voit sa capacité à adhérer à un support abiotique (surfaces en polystyrène) (**Figure 34A**) et biotique (lignée pneumocytaire A549) (**Figure 34B**) diminuée (Macé et al., 2008).

Cette inhibition de la formation de biofilm est accompagnée par une diminution de la production de rhamnolipides et de la mobilité de type « swarming » (Macé et al., 2008). Ces biosurfactants tels que les rhamnolipides favorisent la propagation des bactéries sur des surfaces semi-solides (Caiazza et al., 2005). De même, la mobilité de type « swarming » est fortement impliquée dans le développement de biofilms (O'Toole and Kolter, 1998), ainsi que dans l'adhésion sur les cellules de mammifères et dans la virulence (Kanmani et al., 2011; Mireles et al., 2001; Rivardo et al., 2009; Walencka et al., 2008).

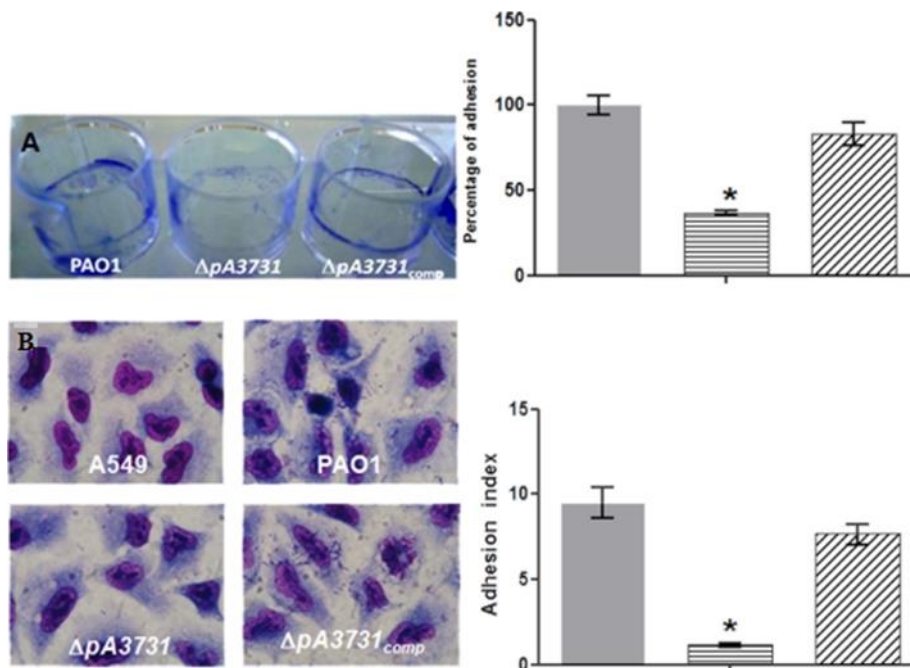


Figure 34 : Capacité de formation de biofilm par les souches PAO1, $\Delta pa3731$ et $\Delta pa3731$ complémentée. (A) Test au Cristal Violet; (B) Adhérence à des cellules pneumocytaires A549

En outre, il a été observé dans un modèle murin, après 2 jours d'infection, que la souche mutante était associée à une diminution de la colonisation des poumons et des lésions épithéliales aiguës des poumons (**Figure 35**) après injection des souches par voie intratrachéale (Macé et al., 2008).

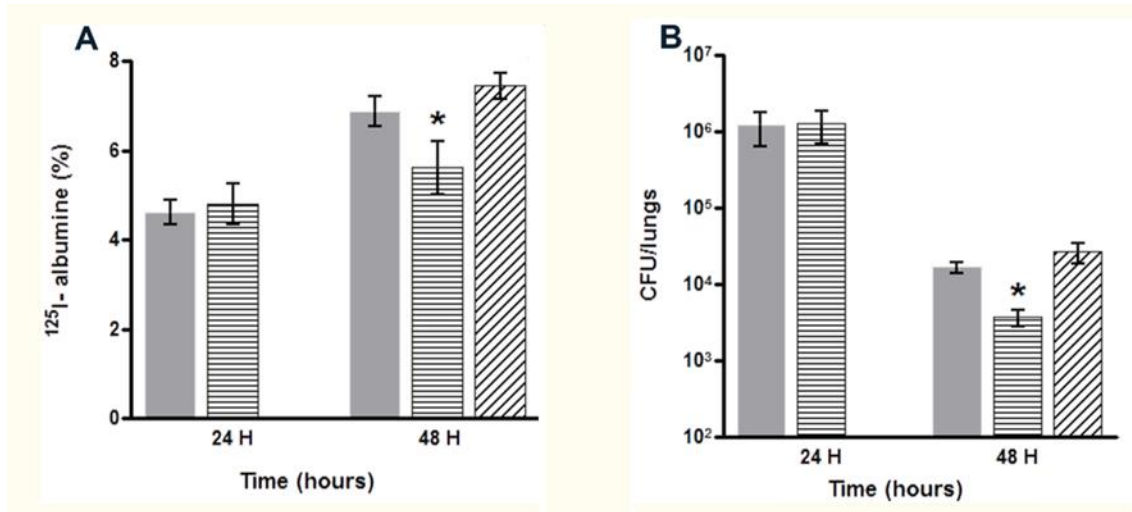


Figure 35 : Etude de l'infection dans un modèle murin. (A) Perméabilité de la barrière capillaire alvéolaire et (B) Clairance bactérienne des poumons après 24h et 48h d'infection

L'importance du gène *pa3731* dans l'adhésion bactérienne et la virulence ont conduit Macé et ses collaborateurs à s'intéresser à l'environnement génique de celui-ci. Il en ressort que ce gène appartient à un cluster de 4 gènes (*pa3729-pa3732*) codant pour des protéines dont la fonction précise reste inconnue à ce jour (Figure 36).

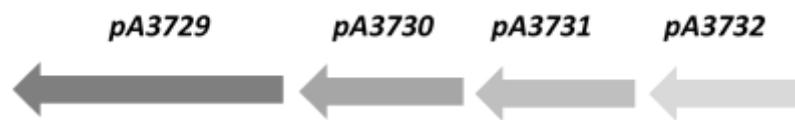


Figure 36 : Distribution monocistronique des gènes du système BAC

Afin de déterminer la localisation cellulaire des différentes protéines de ce système, Amine Ben Mlouka a réalisé au cours de sa thèse des études protéomiques sur les différents compartiments de *PA* (cytoplasme, membrane interne, périplasma, membrane externe, fraction sécrétée). Il apparaît que la protéine PA3729 serait localisée dans la membrane externe. PA3731 présente la particularité d'être retrouvée dans quasiment toutes les fractions cellulaires. Cette protéine serait ainsi capable de transiter entre les différents compartiments à l'instar de certaines protéines chaperons, comme par exemple GroEL (Goulhen et al., 1998). La protéine PA3732 est quant à elle retrouvée majoritairement au niveau du périplasma et de la membrane externe. En revanche, pour des raisons indéterminées (faible niveau d'abondance, faible taille de la protéine, hydrophobicité...), la protéine PA3730 n'a pas été retrouvée. La meilleure information disponible reste pour le moment sa prédiction bioinformatique qui propose une localisation au niveau de la membrane interne.

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans la continuité de l'étude de ce système protéique, baptisé BAC pour Biofilm Associated Cluster (Macé et al., 2008). Différents aspects ont été investigués, comme l'étude de mutants sous un angle phénotypique ou moléculaire, ainsi que des études biochimiques structurales pour améliorer la compréhension de ce système.

Ainsi dans un premier temps, différents tests phénotypiques ont été réalisés sur des souches de *PA* mutées sur un des gènes du système ; quantification de la formation de biofilm sur des supports biotique (lignée pneumocytaire A549) et abiotique (surfaces en polystyrène), la détermination de la CMI contre différents antibiotiques, la quantification de rhamnolipides produits et ou encore des études de la mobilité bactérienne.

L'impact de l'ajout exogène de rhamnolipides a également été évalué sur la capacité de la bactérie et des souches mutantes à former des biofilms sur support abiotique, sur la résistance à différentes classes d'antibiotiques et sur la mobilité.

Par la suite, nous avons réalisé une analyse protéomique quantitative en utilisant une approche « label free » afin de déterminer les protéines différentiellement exprimées entre la souche sauvage et les souches mutées dans différentes conditions de croissance, à savoir en phase planctonique (phase exponentielle et stationnaire) et en phase biofilm. Cette étude a été réalisée sur les extraits protéiques bactériens et sur la fraction extracellulaire (sécrétome) de la bactérie. La dernière partie de ces travaux a été consacrée à l'étude des protéines du système après leur surproduction et leur purification. Nous avons étudié dans un premier temps, les interactions des différentes protéines de ce système entre elles et avec les rhamnolipides par titration calorimétrique isotherme (ITC : Isothermal Titration Calorimetry). En parallèle, nous avons essayé de purifier les protéines en quantité plus importante afin de réaliser leur caractérisation structurale par cristallographie.

Matériels et méthodes

I- Evaluation de l'impact des mutations des gènes *bac* sur le phénotype de *Pseudomonas aeruginosa*

I.1-Origine de la souche bactérienne

La souche bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* utilisée est la souche *PAO1*. Cette souche nous a été fournie ainsi que les différents mutants du système « BAC » par l'équipe du Professeur Colin Manoil du laboratoire Manoil Lab à Washington.

Les mutations sont réalisées par l'insertion d'un transposon de type ISlacZ/hah qui dérive du transposon Tn5 IS 50 L, qui possède une cassette de résistance à la tétracycline (60 µg/mL) et dont la taille est de 6,16 kpb. Ce transposon permet donc de désactiver chaque gène ciblé et la cassette de résistance permet la sélection du mutant pendant la culture bactérienne (Jacobs et al., 2003)

Toutes les bactéries sont stockées à -80 °C dans des aliquots de 1 mL en présence de 30 % (v/v) de glycérol.

I.2-Verification des mutants par PCR (Polymérase Chain Reaction)

Choix des amorces

Pour chaque mutant, un couple d'amorces a été utilisé, une amorce en amont du gène appelé Ma et une amorce en aval appelé Mb. Ces amorces ont été choisies selon leur pourcentage de GC (qui ne doit pas dépasser les 50 %), leur température de fusion (Tm) et la position du transposon (**Tableau 6**).

Extraction de l'ADN

Une pré-culture, en présence ou en absence de tétracycline (60 µg/mL) est effectuée dans un milieu de culture Luria-Bertani (LB, Difco), à partir d'une colonie isolée sur milieu gélosé (LB Agar, Difco), et incubée à 37 °C sur la nuit, sous agitation orbitale (140 rpm). Un mL de suspension bactérienne est récupéré et chauffé à 95 °C pendant 15 min. Une centrifugation est ensuite réalisée pendant 10 min à 1300 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contenant l'ADN bactérien est récupéré pour la PCR.

Tableau 6: Amorces utilisées pour la PCR

	Amorces (5'→3')	Tm (°C)	% GC	Position sur le gène	Taille
<i>ΔpA3729</i>	Ma : ATGGATATGACGTCGTTGATG	62.3	42.8	1	21
	Mb : ATCTCTCGATGTTTCGCCTTG	64.0	50.0	1854	20
<i>ΔpA3730</i>	Ma : CCGTGCTGTTCAGCTTTCTTCTGA	59.2	50.0	38	24
	Mb : AGCAGCCACAACCTGGACGAAGTAA	60.4	50.0	281	24
<i>ΔpA3731</i>	Ma : GTGCTGCACGAAATCGAAAC	55.1	55.0	103	20
	Mb : TTGACCGTATCCACCTGTTGCTTG	59.1	50.0	425	24
<i>ΔpA3732</i>	Ma : GCTCATTGGAGAAGGAGGAAGAC	57.6	50.0	447	24
	Mb : TTTCAGGTAGCCGGCGTAGACTT	59.9	52.2	432	23

Amplification de l'ADN

Pour cette étape, nous avons utilisé pour chaque mutant le couple d'amorces décrit dans le **Tableau 6**. Chaque couple d'amorces a été utilisé pour le mutant correspondant et pour la souche sauvage PAO1 qui a servi de contrôle.

Après récupération de l'ADN bactérien chez chaque mutant, un mélange PCR (mix) est préparé : deux µL de solution d'ADN sont mélangés à un mix PCR contenant 1,6 µL de DMSO 60 % (Sigma Aldrich), 1,5 µL de chacune des amorces utilisées à 10 µM, 25 µL de ReadyMix contenant les dNTPs, le cofacteur MgCl₂, l'ADN polymérase (Taq polymérase, Sigma Aldrich) et de l'eau stérile pour un volume final de 50 µL. Vingt µL de chaque mélange sont placés dans un microtube Eppendorf puis déposés dans un thermocycleur (Mastercycler, Eppendorf). L'ADN est amplifié en utilisant les paramètres suivants :

- 1- Dénaturation initiale : 5 min à 95 °C ;
- 2- Dénaturation : 30 s à 95 °C ;
- 3- Hybridation : 1 min à 57 °C ;
- 4- Elongation : 75 °C à 1 kb par min ;
- 5- Elongation finale : 75 °C pendant 5 min.

Les étapes 2 et 4 sont répétées 30 fois.

Electrophorèse sur gel d'agarose

Migration électrophorétique : Deux μL d'ADN ainsi amplifiés sont déposés sur le gel d'agarose à 1 % avec 2 μL de tampon de charge (Nucleic acid sample loading buffer 5x ; Biorad). Un mélange de marqueurs de masse moléculaire est également déposé (Amersham). L'échantillon va ainsi migrer sous l'influence d'un champ électrique (150 Volts) dans du tampon TBE (acide borique 5,5 g/L, tris base 10,8 g/L et EDTA 0,37 g/L).

Révélation : A la fin de la migration, le gel est coloré par un bain de 30 min dans une solution de SYBR GREEN (20 μL / 200 mL de TBE ; Amersham) et les images sont numérisées à l'aide d'un fluoroimager ProXpress (Perkin-Elmer). La révélation se fait en illuminant le gel par le dessus pendant 15 ms à une longueur d'onde d'excitation de 480/30 nm, et une lecture en émission à 530/30 nm.

I.3-Courbe de croissance

Une pré-culture est effectuée pendant une nuit dans le milieu de culture LB (Difco) à 37 °C en présence ou absence de tétracycline à 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La pré-culture est utilisée pour inoculer 50 mL du même milieu à une concentration bactérienne de 10^6 UFC/mL. La culture est incubée à 37 °C sous agitation vigoureuse pendant 48 h.

Les mesures de turbidité sont effectuées par spectrophotométrie (spectrophotomètre Cary 100BIO, Varian) toutes les heures pendant 12 h puis à 24 h et 48 h. Cette série de mesures est effectuée 3 fois pour chaque souche. Les valeurs correspondantes sont exportées vers le logiciel GraphPad Prism V5 afin de déterminer le temps de génération de chacune des souches.

I.4-Analyse, extraction et dosage des rhamnolipides

Une pré-culture de 12 h est effectuée dans le milieu de culture LB (Difco) à 37 °C en présence ou absence de tétracycline à 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La culture,ensemencée à l'aide de cette pré-culture, est ensuite réalisée dans 50 mL de milieu LB. Après 24 h de croissance (phase stationnaire 24 h) et en culture biofilm, après 48 h d'incubation (biofilm 48 h), la culture est centrifugée à 3200 g, à température ambiante pendant 5 min afin de récupérer la fraction extracellulaire et d'éliminer les bactéries et les débris cellulaires. Quatre mL de surnageant sont alors récupérés après une filtration sur membrane (0,1 μm ; Millipore) et le pH est ajusté à $2,3 \pm 0,2$. Un volume identique d'acétate d'éthyle est ensuite ajouté aux échantillons. Les échantillons ainsi préparés sont ensuite homogénéisés, puis centrifugés pendant 20 s à 100 g pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. La phase supérieure contenant l'acétate d'éthyle est prélevée. Cette

Matériels et Méthodes : Etudes phénotypiques

extraction est répétée 3 fois. Les fractions d'acétate d'éthyle collectées sont combinées et évaporées.

Après extraction, les rhamnolipides secs sont repris dans 4 mL du chloroforme et mélangés avec 400 µl de bleu de méthylène (pH $8,6 \pm 0,2$). Ils sont ensuite vortexés et incubés à température ambiante pendant 15 min pour permettre la séparation des phases organique (phase du complexe chloroforme / bleu de méthylène) et aqueuse (bleu de méthylène en excès). Un mL de la phase chloroforme contenant les rhamnolipides est alors prélevé et acidifié avec 500 µl d'HCl 0,2 M. Les phases sont ensuite séparées, après agitation au vortex pendant 20 s, puis centrifugation 1 min à 100 g pour bien séparer les deux phases. Deux cents µl de la phase acide contenant les rhamnolipides complexés au bleu de méthylène sont prélevés et déposés dans une microplaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à 638 nm. La concentration en rhamnolipides est déterminée grâce à l'élaboration d'une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de rhamnolipides à 2,5 mg/mL (R95Md, Sigma Aldrich) en utilisant les concentrations suivantes : 0, 5, 10, 20, 50, 100 et 250 µg/mL. Cette expérience est réalisée à 3 reprises.

I.5-Test d'adhésion sur tapis cellulaire

Les tests d'adhésion sont réalisés avec la lignée cellulaire pneumocytaire humaine A549 (ATCC CCL 165) suivant le protocole décrit par Di Martino et ses collaborateurs (Di Martino et al., 2002). Pour cela, une monocouche de cellules épithéliales est cultivée à 37 °C dans un milieu HAM F12 (Eurobio, les Ulis, France) contenant 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, supplémenté avec de la L-glutamine (2 mM) et 2 % de solution d'antibiotiques (200 U de pénicilline et 50 mg de streptomycine par litre), sur des plaques de culture tissulaire 24 puits Falcon (Becton, Dickinson Labware, Oxnard, CA). Quand elles ont atteint la confluence, les cellules sont lavées avec du PBS (pH 7,2) et incubées pendant 3 h à 37 °C en présence de 10^6 UFC/ml de bactéries. Après 5 lavages avec du PBS, les cellules sont fixées avec du méthanol, colorées avec une solution de Giemsa à 0,4% diluée au 1/5^{ème} (Sigma-Aldrich), et examinées au microscope. Un indice d'adhésion, représentant la moyenne du nombre de bactéries par pneumocyte, est ensuite déterminé (sur un champ d'analyse de 100 cellules). L'adhésion est considérée positive si l'indice d'adhésion est supérieur à 1. Cette expérience est réalisée trois fois.

I.6- Quantification de la formation de biofilm

Après une pré-culture, les cultures bactériennes sont réalisées en Milieu Minimum Glucosé (MMG) (**Tableau 7**) en présence ou absence de tétracycline (60 µg/mL) dans des plaques de 96 puits à 37°C, sans agitation, pendant 6 h, 12 h, 24 h ou 48 h d'incubation. Des aliquots de 200 µL de ces cultures sont distribués dans les puits de ces plaques. Après incubation, les puits sont d'abord vidés délicatement afin d'éliminer les cellules planctoniques. Ils sont ensuite rincés 3 fois avec le tampon Phosphate Buffer Saline (PBS, Sigma Aldrich) à 0.1 M afin d'éliminer la totalité des bactéries non adhérentes. Le biofilm est coloré par la suite au Crystal Violet à 0,5 % pendant 20 min sous agitation à température ambiante. Trois nouveaux rinçages au PBS sont effectués pour retirer le colorant en excès. Les biofilms sont décolorés pendant 20 min et sous agitation avec de l'éthanol à 96 %. L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm en utilisant un lecteur de plaques (Victor3, PerkinElmer). Ces expériences sont réalisées six fois pour chacune des souches.

De même, l'influence des rhamnolipides sur la formation du biofilm a été étudiée. Pour cela, différentes concentrations de rhamnolipides (0, 5, 10, 20 et 50 µg/ml) ont été ajoutées dans le milieu de culture.

Tableau 7: *Composition du milieu minimum glucosé*

Composants	Concentration (g/L)
Tris-HCl	14,97
Tris-NH ₂	0,6
NH ₄ Cl	0,5
CaCl ₂	0,05
MgSO ₄	0,05
MnSO ₄	0,005
FeSO ₄	0,005
Glucose	15
Extrait de levure	2

I.7-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis des antibiotiques tels que la tobramycine (Sigma Aldrich), la ciprofloxacine (Sigma Aldrich), l'imipénème (Sigma Aldrich) et la ceftazidime (Sigma Aldrich), a été déterminée par la méthode standard de microdilution sur milieu liquide (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987). Les souches sont incubées en milieu LB (Difco) à 37 °C avec une concentration initiale de 10⁶ UFC/mL pendant 24 h et sous une faible agitation. Les solutions de tobramycine, de cyprofloxacine, d'imipénème et de ceftazidime sont utilisées à une concentration mère de 1 mg/mL et le volume a été ajusté pour chaque concentration ciblée. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant le trouble bactérien. L'absence de croissance a été confirmée par la mesure de l'absorbance à 545 nm.

Pour étudier l'effet des rhamnolipides sur l'efficacité des antibiotiques, différentes concentrations de rhamnolipides (0, 5, 10, 20 et 50, 100, 250 et 500 µg/ml) ont été ajoutées dans le milieu de culture en présence de tobramycine, cyprofloxacine, imipénème ou ceftazidime (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 et 32 µg/mL). Des aliquots de 200 µl de ces cultures ont été distribués dans des puits des microplaques. Après 24 h d'incubation à 37 °C sous une faible agitation, les CMI ont été déterminées par la mesure d'absorbance à 545 nm (Victor3, PerkinElmer). Ces expériences sont réalisées trois fois pour chacune des souches.

I.8-Etude de la mobilité bactérienne

Des boîtes de gélose contenant 20 mL de LB agar (Difco) à des concentrations variables (0,3 % pour le Swimming, 0,6 % pour le Swarming et 1,5 % pour le Twitching) sont utilisées pour étudier les différents types de mobilité. Ces boîtes sont ensuiteensemencées par piqûre centrale à partir d'une suspension de *PA* à 10⁶ UFC/mL. Après 24 h d'incubation à 37 °C, la zone de mobilité est mesurée en cm. Ces expériences sont réalisées trois fois pour chacune des souches.

Sur ces mesures de mobilité, l'impact de la présence de rhamnolipides a également été évalué. Pour cela des concentrations variables en rhamnolipides (0, 5, 10, et 20 µg/ml) ont été ajoutés aux conditions décrites ci-dessus.

II- Evaluation de l'impact des mutations des gènes *bac* sur le protéome de *Pseudomonas aeruginosa*

Dans le but d'analyser le protéome total de *PA* et des souches du système « BAC » cultivée en mode de vie planctonique (phase exponentielle et stationnaire) et en biofilm à l'interface solide-liquide (biofilm sur la laine de verre), nous avons utilisé la méthode de spectrométrie de masse dite « Label Free » (Figure 37).

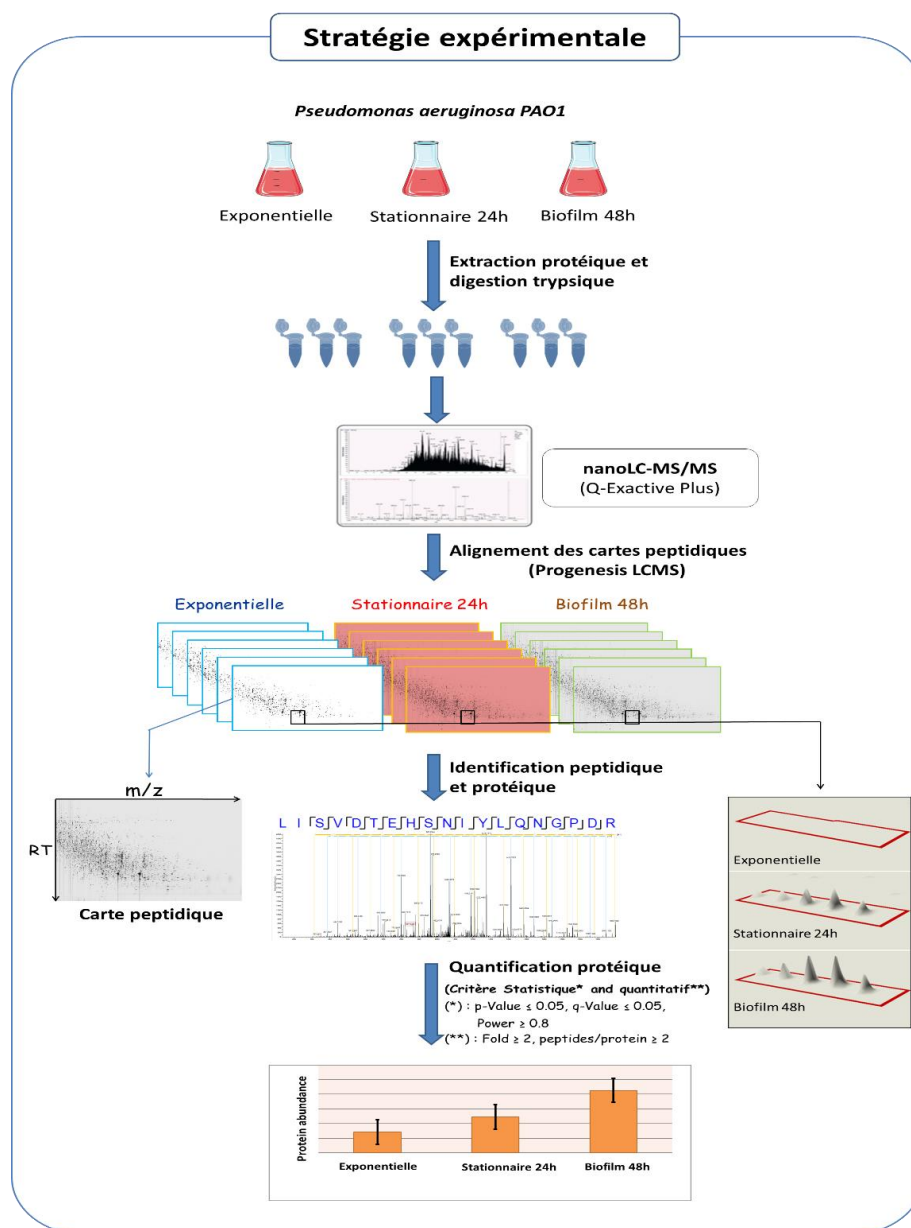


Figure 37 : Stratégie suivie pour l'analyse du protéome total de PAO1 et des mutants BAC cultivés en planctonique et en biofilm

II.1-Culture bactérienne en mode de vie planctonique et biofilm

Des pré-cultures sont effectuées dans un milieu de culture LB (Difco) sous agitation orbitale (140 rpm) (New Brunswick Scientific) pendant 16 h à 37 °C à partir d'une colonie isolée sur milieu gélosé (LB Agar, Difco). Spécifiquement pour les mutants, de la tétracycline à 60 µg/mL est ajoutée. Les pré-cultures sont utilisées ensuite pour ensemercer 3 types de cultures dans un milieu MMG à une concentration bactérienne initiale de 10⁶ UFC/mL. Il s'agit de cultures en mode de vie planctonique (phase exponentielle et phase stationnaire à 24 h de croissance) et en mode biofilm à l'interface solide-liquide (48 h de croissance).

Pour les bactéries cultivées en biofilm à l'interface solide-liquide, la laine de verre a été choisie comme support en raison de son grand rapport surface/volume (50 g de la laine de verre, de 15 microns de diamètre, offrent une surface de colonisation de 6,5 m²) ce qui facilite l'échange de nutriments et d'oxygène. Dans ces conditions, *PA* forme un biofilm épais, présentant une structure tridimensionnelle (Steyn et al., 2001; Vilain et al., 2004). Les bactéries en biofilm sur la laine de verre ont été incubées à 37 °C pendant 48 h sous une légère agitation orbitale (40 rpm), afin d'éviter la formation d'une pellicule.

En parallèle, des cultures de 24 h en mode planctonique ont été réalisées dans des conditions similaires, sans laine de verre, et avec une agitation vigoureuse (140 rpm). Chaque culture est réalisée trois fois afin d'obtenir trois échantillons biologiques par conditions, c'est-à-dire:

i) planctonique phase exponentielle ($DO_{545nm} = 0.5$), ii) planctonique phase stationnaire 24h et iii) biofilm 48h.

II.2-Extraction protéique de la fraction intracellulaire

Les cellules bactériennes, après croissance en mode planctonique sont récupérées par une centrifugation (2 700 g, 10 min) à 4 °C et le surnageant est gardé pour l'étude des protéines extracellulaires (Cf. Matériels et méthodes II.3). Le culot bactérien est lavé 3 fois avec du tampon Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) afin d'éliminer les éventuels résidus du milieu de culture. Les cellules sont ensuite reprises dans un tampon de lyse dédié (urée 7 M, thiourée 2 M, TBP 2 mM, DTT 20 mM, C7BzO 0,5 %, CHAPS 2 %).

Dans le cas des biofilms, la laine de verre est récupérée et lavée trois fois avec du tampon Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) afin d'éliminer les bactéries qui ne font pas spécifiquement parties du biofilm (liaison par affinité ou croissance planctonique). Le milieu de culture est également récolté pour l'étude des protéines extracellulaires (Cf. Matériels et méthodes II.4). Les cellules

formant le biofilm sont ensuite détachées de la laine de verre par agitation vigoureuse en présence de billes de verre (3 mm de diamètre) dans 1 L de tampon Tris-HCl (20 mM, pH 7,4). Puis les cellules sont récupérées par centrifugation selon les mêmes paramètres appliqués précédemment et reprises dans le même tampon de lyse.

Chaque culot bactérien est ensuite congelé sur la nuit, à une température de -20 °C, afin de faciliter la lyse des cellules. Les membranes bactériennes sont ensuite lysées sur un bain de glace par six cycles de sonication pendant 6 minutes, à une amplitude de 24 % (pulse 3 sec ON, 1 sec OFF) (Vibrocell™ 75115, Bioblock Scientific). Une centrifugation est ensuite effectuée à 10 000 g, pendant 30 min à 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contient ainsi le protéome total (protéines membranaires et cytoplasmiques). Ce surnageant contenant les protéines est dosé (Cf. Matériels et Methodes II.4), aliquotés (par fraction de 25 µg) et stocké à -20 °C.

II.3-Extraction protéique de la phase extracellulaire

Le surnageant de culture (Cf. Matériels et méthodes II.2) est d'abord filtré (Nalgène) à l'aide des filtres de 0,22 µm de taille de pore (GSWP 47 nm, Millipore) afin d'éliminer les bactéries résiduelles.

Dans un premier temps, nous avons tenté de lyophiliser le surnageant filtré (Christ Alpha 2-4 LD plus, BioBlock Scientific) afin de réduire le volume à précipiter. Beaucoup de protéines étaient hélas perdues lors de cette étape et les spectres obtenus en spectrométrie de masse étaient de qualité médiocre. Nous avons également tenté de concentrer les protéines à l'aide de Centricon Plus 70 (Merck Millipore), mais là aussi les identifications par spectrométrie de masse étaient de qualité insuffisante. Nous nous sommes alors tournés vers la précipitation des protéines extracellulaires par la méthode DOC/TCA (DOC: sodium DeOxyChloate monohydrate, TCA: Acide Trichloracétique).

Dans cette dernière approche, pour un volume d'échantillon donné, il est ajouté 20 % d'une solution de TCA à 50 % et 10 % d'une solution DOC à 1 %. Le mélange est vortexé, puis incubé à 4 °C pendant 15 min. L'échantillon est alors centrifugé (10000 g pendant 20 min). Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec un volume équivalent d'acétone, pendant 15 min à 4 °C. L'échantillon est centrifugé (10000 g pendant 20 min). Enfin le surnageant est éliminé et le culot contenant les protéines est re-suspendu dans le tampon de lyse. Pour promouvoir la solubilisation dans le tampon de lyse, les protéines peuvent être mises dans un bain à ultrasons pendant 15 à 30 s. Les protéines présentes dans ces échantillons sont ensuite dosées (Cf. Matériels et méthodes II.4) et conservées à -20 °C.

II.4-Détermination de la concentration protéique par la méthode de Bradford

Les concentrations en protéines dans les fractions intracellulaires et extracellulaires ont été déterminées en utilisant la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976). Cette méthode est basée sur la complexation du bleu de Coomassie G250 avec différents acides aminés basiques et aromatiques principalement la lysine K ; l'arginine R, l'histidine H, la tyrosine Y ; le tryptophane W ; la phénylalanine F. Sous forme libre, le réactif est de couleur pourpre et sa longueur d'onde maximale d'absorption est de 465 nm. Sous forme complexé, le pic d'absorption maximale se retrouve à une longueur d'onde de 595 nm, en ligne avec le développement d'une coloration bleue. Pour ce dosage, 20 µL d'échantillon sont dilués dans 980 µL de réactif de Bradford (Bio-Rad Protein Assay®) puis incubés à température ambiante, pendant 30 min à l'abri de la lumière. L'absorbance de la solution est ensuite mesurée à 595 nm avec le lecteur Victor 3 (Perkin Elmer) et la concentration protéique (exprimée en mg/mL) est estimée par comparaison à une gamme étalon (de 0 à 2 mg/mL), en utilisant la BSA (l'albumine issue de Sérum Bovin, BSA, Sigma Aldrich) comme référence.

II.5-Analyse Shotgun

Pour cette analyse, un volume d'échantillon correspondant à 25 µg de protéines est ajouté à du tampon de Laemmli (Tris-HCl 62 mM pH 6,8, glycérol 10 %, bleu de bromophénol 0,02 %, β mercaptoethanol 5 %, SDS 2 %). Après chauffage à 95 °C pendant 5 min, l'échantillon ainsi préparé est déposé sur un gel de concentration SDS-PAGE (gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate) contenant 7 % d'acrylamide (**Tableau 8**) dans le but de piéger l'ensemble des protéines dans un volume minimum de matrice « gel ». La migration des protéines s'effectue dans le tampon électrophorétique Tris-Glycine (Tris HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH = 8,3), sous un courant de 10 mA pendant 30 min.

Le gel est ensuite coloré pendant 1 min au bleu de Coomassie G250 (0,5 g / 400 mL) dilué dans une solution contenant 50 % d'éthanol, 40 % d'eau et 10 % d'acide acétique, afin de fixer les protéines dans le gel. Ce gel est ensuite décoloré dans cette même solution (sans bleu de Coomassie) jusqu'à la disparition complète de la couleur bleue et l'apparition d'une bande protéique bien distincte. Pour chaque échantillon, la bande contenant les protéines est ensuite découpée puis rincée trois fois avec de l'eau MilliQ.

Par la suite, ces bandes sont placées 10 min dans un bain de dithiothréitol à 10 mM (DTT, BioRad) puis 10 min dans un bain d'iodoacétamide à 25 mM (BioRad) à l'abri de la lumière.

Matériels et Méthodes : Etudes protéomiques

Lors de cette étape, le DTT va réduire les ponts disulfures (S-S) et l'iodoacétamide va alkyler les cystéines de façon irréversible pour empêcher la reformation de ces ponts disulfures.

Les bandes sont ensuite rincées dans plusieurs bains successifs d'acétonitrile pur pour les conditionner avant une étape de protéolyse à l'aide de la trypsine (0,1 µg/µL dans une solution d'acide trifluoroacétique : TFA, à 0,1%) qui s'effectue avec un ratio enzyme/protéine de 1/20 (m/m), sur la nuit, à 37 °C, sous agitation orbitale (140 rpm). Les peptides issus de cette protéolyse sont extraits du gel par plusieurs lavages dans une solution spécifique (ACN/H₂O/TFA : 49,5 % / 49,5 % / 1 %). Ces extraits peptidiques sont alors mis à sec par passage au speedvac (ThermoFisher) pour être finalement conservés à -20 °C en attendant l'analyse par spectrométrie de masse.

Tableau 8: *Composition du gel SDS-PAGE 7% pour la méthode label free*

Produits	Volume (mL)
Acrylamide/Bis-acrylamide 30%	9,3
Tris pH 6,8	5
Eau milli Q	25,05
SDS 20%	0,2
TEMED	0,04
Persulfate d'ammonium	0,4

Analyse par spectrométrie de masse

Le Q-Exactive plus utilisé pour ces travaux est un spectromètre de masse constitué d'un quadripôle couplé à un analyseur orbitrap (Q-Exactive plus, Thermo Scientific) équipé d'une source nano electrospray (ESI). Les peptides sont solubilisés dans une solution d'acide formique (AF) à 0,1 % (v/v). Les peptides sont séparés sur une colonne PepMap TM RSLC C18 (Thermo Scientific). Les phases mobiles sont composées respectivement : solution d'acide formique à 0,1 % (v/v) (solution A) et solution avec un mélange ACN 80% / H₂O 20 % / AF 0,1 % (v/v) (solution B). Pour notre analyse, le gradient utilisé pour l'élution des mélanges peptidiques est le suivant : 0-84 min : 2-35 % de B ; 84-94 min : 35-90 % de B ; 94-99 min : 90 % de B ; 100-120 min : 2 % de B. Le débit de phase mobile est de 300 nL/min. La

Matériels et Méthodes : Etudes protéomiques

température de la colonne est fixée à 40 °C. La tension de spray est fixée aux alentours de 1,6 kV, valeur nécessaire à l'obtention d'un spray stable et la température du capillaire est de 275 °C. La gamme de détection de rapport m/z est 400-1800. La résolution est fixée à 70 000 en MS, et à 17500 en MS/MS. Au fur et à mesure du gradient chromatographique, après chaque cycle de balayage MS, les 10 ions les plus intenses sont sélectionnés puis fragmentés. L'analyse est réalisée avec une fragmentation en mode HCD, avec l'azote utilisé comme gaz de collision. L'ensemble des spectres obtenus est enregistré sous le format « .raw » et utilisé par les logiciels Proteome Discoverer (Thermo Scientific) et Progenesis LC-MS (Waters) afin respectivement d'identifier et de quantifier les protéines présentes dans les échantillons.

Analyse quantitative différentielle entre la souche sauvage PAO1 et les mutants BAC

Pour permettre ces comparaisons, trois réplicats ont été obtenus par condition de culture (phase exponentielle, stationnaire 24 h et biofilm 48 h) et par souche d'étude (PAO1 et les différents mutants du système BAC) dans les conditions décrites précédemment.

Lors de ces analyses, la détection de l'ensemble des pics issus des balayages MS permet de générer une carte peptidique à deux dimensions représentant deux coordonnées spécifiques de chaque peptide : le temps de rétention et le rapport m/z (carte 2D LC-MS). Il s'ensuit une étape d'alignement des spots présents sur l'ensemble des cartes 2D pour la fraction intracellulaire d'une part et la fraction extracellulaire d'autre part.

Afin de sélectionner les ions peptidiques présentant une abondance significativement différente entre les échantillons, un test statistique est réalisé par analyse de la variance (ANOVA) avec les abondances normalisées de l'ensemble des pics. Les peptides associés à des valeurs statistiques pertinentes (p -value et q -value inférieures à 0,05 ainsi qu'une valeur de puissance statistique de l'analyse (power) supérieure à 0,8) ont été retenus et leurs abondances normalisées ont été utilisées pour effectuer une analyse en composante principale (ACP).

Par la suite, les spectres MS/MS, permettant d'annoter les séquences des ions peptidiques sélectionnés ont été exportés vers le moteur de recherche MASCOT (Matrix Science; version 2.2) pour identifier les peptides correspondants, en comparant les rapports m/z expérimentaux aux rapports m/z théoriques obtenues *in silico* à partir de la banque de données *Pseudomonas PAO1*. Lors de cette recherche, plusieurs paramètres spécifiques sont pris en compte : un clivage tryptique manquant est autorisé, et les modifications variables concernant la carbamidométhylation des cystéines (résultant de l'étape de réduction et d'alkylation des ponts disulfures) et l'oxydation des méthionines (événement très fréquemment observé). Les erreurs

Matériels et Méthodes : Etudes protéomiques

de masse tolérées sur les ions peptidiques précurseurs et les ions fragments sont de 5 ppm et 0,05 Da, respectivement. Les résultats de ces travaux d'identification sont ensuite importés dans le logiciel Progenesis. Les peptides avec un score d'identification supérieur à 20 ont été conservés (seuil de confiance pour les travaux d'identification, basé sur un calcul de probabilité). Comme cela est couramment admis dans la littérature, seules les protéines identifiées avec au minimum 2 peptides sont pris en considération dans l'analyse différentielle. Pour chaque condition de culture, l'abondance totale de chaque protéine a été calculée en additionnant les abondances de tous les peptides retenus. A ce stade, une nouvelle analyse statistique est entreprise au niveau des protéines. Afin de ne garder uniquement que les protéines présentant une abondance différentielle significative, de nouveaux filtres statistiques sont appliqués ($p\text{-value} < 0,05$, $q\text{-value} < 0,05$, $\text{power} > 0,8$ et $\text{fold change} \geq 2$).

Toutes les données obtenues ont été présentées graphiquement soit directement à l'aide du logiciel Progenesis, soit à l'aide du logiciel GraphPad PRISM (RITME Scientific Solutions).

III- Etudes des protéines du système BAC et études interactomiques

III.1-Expression des protéines recombinantes du système BAC

Les gènes du système BAC ont été clonés dans *E. coli* BL21 λ (DE3) (pLysS) avec une étiquette 6-histidine et un site de clivage à la thrombine.

Le plasmide contient une cassette de résistance à la carbénicilline et un récepteur à l'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) de manière à induire la transcription des différents gènes de ce système. Cette construction a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Virginie Molle (UMR 5235, Montpellier).

Les clones positifs sont sélectionnés sur boîte LB (Luria-Bertani) contenant de la carbénicilline à 100 $\mu\text{g/mL}$ (concentration finale). Un clone isolé sur boîte a été utilisé pour ensemercer une pré-culture de 100 mL de LB additionnée de carbénicilline (100 $\mu\text{g/mL}$). La pré-culture, incubée à 37 °C sous agitation à 200 rpm pendant une nuit, est utilisée pour ensemercer un litre de milieu additionné de carbénicilline à une concentration finale de 100 $\mu\text{g/mL}$, à une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,05$.

L'expression de la protéine recombinante par les cellules d'*E. coli*, est induite par l'IPTG (concentration finale 1 mM) lorsque la culture bactérienne atteint une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ à 0,8. L'induction a été réalisée à 37 °C, selon la souche, pendant au moins 3 h, alors que pour les tests d'expression à 4 °C, l'induction a été faite pendant 15 h. Après cette phase d'induction, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 5000 g à 4 °C pendant 20 min ; le culot bactérien a alors été lavé à l'eau puis congelé à -20 °C.

III.2-Extraction et purification de protéines recombinantes

Extrait cellulaire brut

Pour préparer les extraits cellulaires, contenant les protéines recombinantes solubles, les cellules issues d'un litre de culture ont été récupérées après induction par une étape de centrifugation. Ce culot a été ensuite incubé avec 1 mg/mL de lysozyme pendant 30 min à 4 °C dans un tampon dédié (tampon A : Tris-HCl 20 mM / NaCl 150 mM à pH = 7,4). La suspension cellulaire est ensuite lysée par sonication à l'aide d'un sonicateur (cycle 0,5, amplitude 70 %, 3 fois 3 min), et la fraction soluble a été séparée par centrifugation à 10 000 g pendant 20 min.

Purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité

Toutes les protéines du système BAC exprimées dans cette étude possèdent des étiquettes 6xHis à leur extrémité N-terminale pour faciliter leur purification en utilisant la chromatographie d'affinité. Ici, nous avons opté pour l'utilisation d'ions métallique Ni²⁺ pour la purification. L'ion Ni²⁺ est immobilisé soit par le TED (tris-carboxyméthyl éthylène diamine), soit par le NTA (nickel-acide nitriloacétique) sur un gel de silice (colonne Hitrap, Amersham Biosciences, volume = 1 mL).

Deux types de purification ont été testés, la purification en conditions natives et la purification en conditions dénaturantes. La différence entre ces deux conditions réside principalement sur l'addition d'urée (6 M) pour la purification en condition dénaturante. L'urée participe notamment à la solubilisation des corps d'inclusion.

En conditions natives : Les culots bactériens ont été suspendus dans le tampon A dans lequel du lysozyme a été ajouté à 1 mg/mL. Ce tampon permet à la fois la lyse des cellules, l'équilibration et le lavage de la colonne d'affinité.

Durant la lyse, la paroi a été cassée par sonication (cycle 0,5, amplitude 70 % pour 3 fois 3 min). On réalise ensuite une centrifugation à 10 000 g à 4 °C pendant 20 minutes. On obtient un surnageant avec la protéine sous forme soluble et un culot contenant, entre autres, les protéines insolubles se trouvant dans les corps d'inclusion.

Le surnageant ainsi obtenu a été ensuite chargé sur une colonne de nickel ou incubé avec 1 mL de résine cobalt pendant 3 h à 4 °C, puis une étape de lavage est réalisée avec le même tampon de lyse, contenant de l'imidazole à une concentration de 20 mM dans le but d'éliminer les contaminants protéiques qui pourraient se lier de manière non spécifique. Après cette étape de lavage, les protéines recombinantes ciblées sont éluées avec le même tampon, mais contenant cette fois 500 mM d'imidazole. L'imidazole en grande concentration va alors entrer en compétition avec l'histidine des étiquettes protéiques et permettre la libération des protéines d'intérêt.

En conditions dénaturantes : Le culot bactérien obtenu suite à la centrifugation de l'extrait brut est solubilisé dans le tampon A contenant de l'agent dénaturant (urée 6 M), puis centrifugé (5000 g pendant 20 min) pour solubiliser les protéines présentes dans les débris cellulaires. La purification a été réalisée de la même façon que celle décrite pour les protéines solubles. La

seule modification est que tous les tampons utilisés pour la purification de protéines en conditions dénaturantes contiennent en plus de l'urée 6 M.

III.3-Analyse de l'expression et de la purification de protéines recombinantes

L'électrophorèse SDS-Page permet de séparer des protéines en fonction de leur masse moléculaire. En se liant aux protéines, le SDS dénature les protéines et leur confère une charge nette négative. Ceci permet sa migration dans la matrice de polyacrylamide sous l'application d'un champ électrique, et la séparation des protéines s'effectue en fonction uniquement de leur masse moléculaire.

Les gels SDS page sont constitués d'un gel de résolution (à 10, 12,5 ou 15%) (**Tableau 9**) et d'un gel de concentration (à 5%) (**Tableau 10**). Les échantillons protéiques sont repris dans du Laemmli puis chauffés 10 min à 100 °C avant d'être déposés sur l'une des pistes de ces gels.

Tableau 9: *Composition du gel de résolution*

	10 %	12.5 %	15 %
Acrylamide/Bis-acrylamide 30 %	2,0 mL	2,5 mL	3,0 mL
Tris pH 8,8	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Eau milli Q	2,5 mL	2,0 mL	1,5 mL
SDS 20 %	30 µL	30 µL	30 µL
TEMED	3 µL	3 µL	3 µL
Persulfate d'ammonium 10 %	30 µL	30 µL	30 µL

Tableau 10: *Composition du gel de concentration*

Produits	Volume (mL)
Acrylamide/Bis-acrylamide 30 %	0,3
Tris pH 6,8	0,5
Eau milli Q	1,2
SDS 20 %	0,0125
TEMED	0,002
Persulfate d'ammonium	0,0125

Matériels et Méthodes : Etudes interatomiques

Après centrifugation pendant 10 s à 2000 g, 20 μ L d'échantillon sont déposés dans les puits. Trois μ L d'un mélange de marqueurs de poids moléculaire (Biorad®) sont aussi déposés sur le gel. La migration se fait en condition de refroidissement à une tension et puissance maximales et sous une intensité de 10 mA puis de 20 mA/gel (cuves Protean II xi ; Biorad). Le tampon de migration utilisé est composé de 72 g de glycine, 15 g de tris base et 5 g de SDS pour un volume de 5 litres.

Après migration, les gels sont récupérés et incubés 45 min sous agitation dans un bain de fixation contenant 30 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique. Un rinçage à l'éthanol (solution à 10 %) et 2 lavages à l'eau distillée sont effectués pendant 5 min sous agitation. Un bain de sensibilisation avec 0,02 % de thiosulfate de sodium est effectué pendant 1 min et suivi d'un rinçage rapide à l'eau. Les gels sont ensuite incubés avec une solution d'argent à 0,1% pendant 20 min à l'abri de la lumière. La révélation s'effectue finalement par une solution contenant du formaldéhyde (3,7 %), du carbonate de sodium (12 g/L), et du thiosulfate de sodium (0,08 %). Un bain d'arrêt est ensuite réalisé par une solution d'acide acétique 1 % pendant 5min.

III.4-Etudes des interactions par titration calorimétrique (ITC)

Cette technique permet d'établir les paramètres thermodynamiques (notamment la mesure du K_a , la mesure de l'enthalpie d'interaction ou encore la détermination de la stœchiométrie) d'une interaction entre deux molécules.

Pour cela, les biomolécules doivent être préalablement solubilisées dans les mêmes conditions, par exemple dans du tampon Tris-HCl 20 mM / NaCl 150 mM, pH = 8. Les deux biomolécules sont mises en contact, l'une étant placée dans la cuve du microcalorimètre VP-ITC (Microcal) et la seconde dans la seringue. Les données obtenues sont ensuite traitées avec le logiciel ITC Analysis® à l'aide d'un module spécifique fourni par la société Microcal. Les pics sont intégrés un à un après établissement de la ligne de base pour tracer la courbe de la variation d'énergie en fonction du rapport entre les concentrations de biomolécules.

Interaction rhamnolipides-protéines

Une solution de protéines (PA3731 ou PA3732) à une concentration de 0,01 mM est placée dans la cuve (185 μ L) et une solution de rhamnolipides à une concentration de 1,7 mM dans la seringue d'injection. L'analyse est réalisée à 25 °C avec 30 injections de 10 μ L espacées de 240 s. Le tampon utilisé est le Tris-HCl 20 mM / NaCl 150 mM, pH = 8. Celui-ci est également utilisé comme blanc de référence.

Interaction PA3731-PA3732

Dans ces essais, l'analyse est réalisée à 25°C avec 30 injections de 10 µL espacées de 240 s. Pour PA3731, la protéine est placée dans la cuve à une concentration de 0,001 mM (185 µL) et la protéine PA3732 dans la seringue d'injection à une concentration de 0,01 mM. Le tampon est identique : Tris-HCl 20 mM / NaCl 150 mM, pH = 8. Ce tampon est également utilisé comme blanc de référence.

Résultats

I- Evaluation de l'impact des mutations des gènes *bac* sur le phénotype de *Pseudomonas aeruginosa*

I.1-Vérification des mutants par PCR

Afin de vérifier la bonne insertion du transposon chez les souches mutantes $\Delta pA3729$, $\Delta pA3730$, $\Delta pA3731$ et $\Delta pA3732$, nous avons réalisé une PCR avec les différents jeux d'amorces ma et mb.

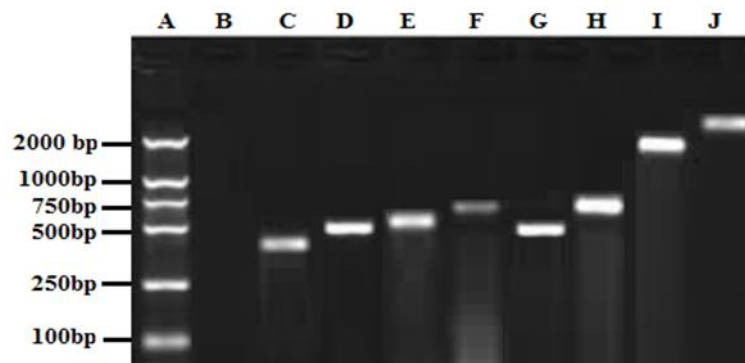


Figure 38 : Résultat PCR. A: Marqueurs de taille (Kb) ; B : eau ; C : *pA3732*; D: $\Delta pA3732$; E: *pA3731* ; F: $\Delta pA3731$; G: *pA3730* ; H: $\Delta pA3730$; I: *pA3729* ; J: $\Delta pA3729$

Sur le gel d'agarose présenté ci-dessus (**Figure 1**), des différences au niveau de la migration des bandes obtenues ont été observées pour un même gène selon qu'il est muté ou non. Ainsi, la taille est plus importante chez le mutant que chez le sauvage. Cette modification de migration électrophorétique s'explique par l'insertion du transposon ISlacZ/hah avec sa cassette de résistance à la tétracycline chez les souches mutantes.

Ces observations nous permettent de confirmer la bonne insertion du transposon et de valider la réalisation de nos mutants.

I.2-Courbe de croissance

Les courbes de croissance ont été réalisées sur les 5 souches (souche sauvage et mutants). Il est, en effet, important de vérifier que la croissance bactérienne n'est pas très altérée entre le sauvage et les mutants, et que les phénotypes observés lors de nos différentes expérimentations sont dus à la mutation des gènes et non à un retard de croissance.

Les résultats montrent que les mutants produisent autant de biomasse que la souche sauvage. De même, on constate que les temps de génération de la souche sauvage et des mutants sont très similaires (**Figure 2**). Le temps de génération moyen a été calculé et correspond à 52 ± 5 min.

Il semblerait ainsi que les différentes mutations ont un impact négligeable sur la croissance bactérienne.

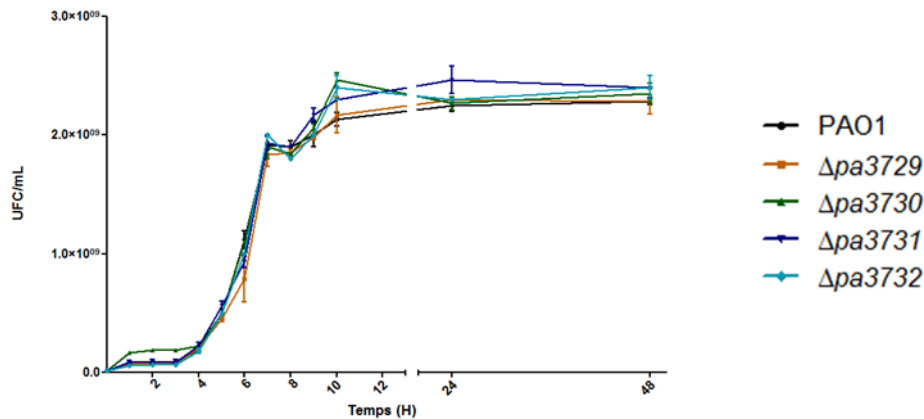


Figure 39 : Courbe de croissance bactérienne

I.3-Analyse, extraction et dosage des rhamnolipides

Lors de l'étape d'adhésion, les bactéries conditionnent la surface à coloniser en sécrétant des biosurfactants, dont les rhamnolipides. Nous avons donc dosé pour l'ensemble des souches étudiées la production de rhamnolipides d'une part en phase planctonique après 24 h de culture et d'autre part en phase biofilm après 48 h de croissance à l'état immobilisé.

Ces résultats montrent une baisse significative de la production en rhamnolipides chez l'ensemble des mutants en comparaison avec la souche sauvage (**Figure 3**). En effet, il a été observé, en phase stationnaire 24 h, une diminution allant de 32% à 64% pour les différents mutants du système BAC. En phase biofilm, la diminution est significative mais moins importante qu'en phase stationnaire, allant de 23% à 32% chez les différents mutants.

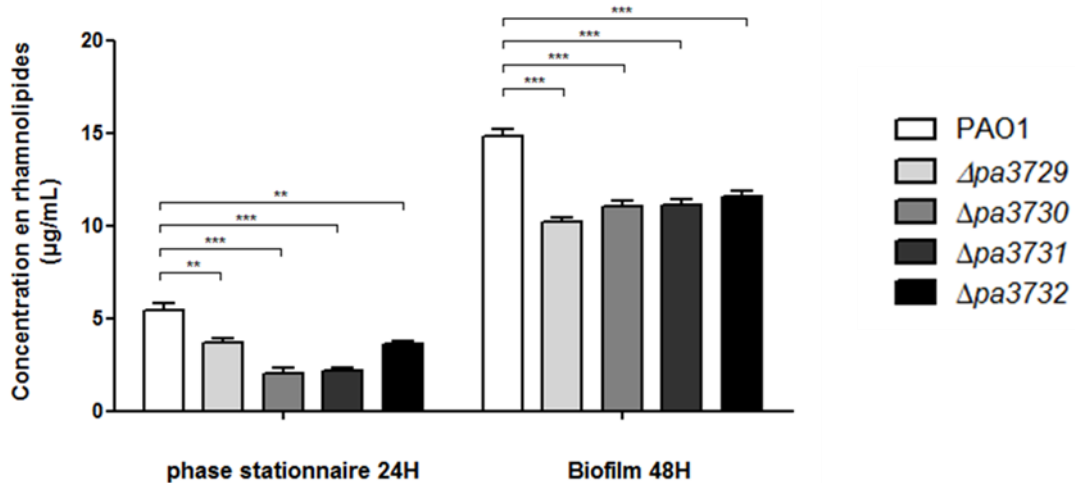


Figure 40 : Concentration en rhamnolipides ($\mu\text{g/mL}$) dans la phase stationnaire après 24 h et en mode biofilm 48 h chez chacune des souches bactériennes. Test statistique: two way ANOVA (Dunnnett's multiple comparison test): **: p value < 0,05; ***: p value < 0,001

I.4-Test d'adhésion sur tapis cellulaire

Nous avons étudié l'effet des différentes mutations sur l'adhésion à un support biotique à savoir un tapis cellulaire de la lignée pneumocytaire A549 (**Figure 4**).

Nous observons que les mutants $\Delta pa3730$, $\Delta pa3731$ et $\Delta pa3732$ voient leur capacité d'adhésion statistiquement diminuée. L'indice d'adhésion pour la souche sauvage est de 10 bactéries/cellule alors que chez les mutants $\Delta pa3730$, $\Delta pa3731$ et $\Delta pa3732$, l'indice est d'environ 6 bactéries/cellules. Contrairement aux autres mutants, la capacité d'adhésion de $\Delta pa3729$ n'est pas statistiquement altérée.

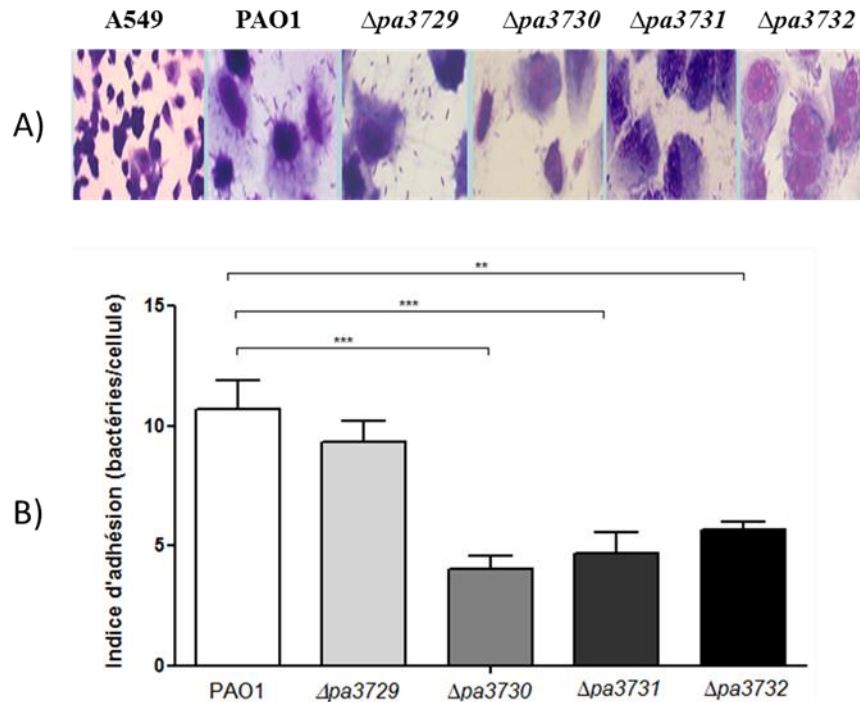


Figure 41 : Etude de l'adhésion bactérienne sur lignée pneumocytaire A549. A) Les cellules sont observées en microscopie confocale. Les cellules et bactéries sont colorées avec du Giemsa 20%, A 549 correspond au contrôle sans bactéries. B) Histogramme donnant l'indice d'adhésion pour chacune des souches. Test statistique: one way ANOVA (Dunnett's test): **: p value < 0,05; ***: p value < 0,001

I.5-Quantification de biofilm

Dans un second temps, l'effet des différentes mutations sur l'adhésion à un support abiotique a été étudié. La quantité de biofilm formé est alors mesurée par un test au cristal violet sur plaque 24 puits en polystyrène. Les mesures ont été réalisées à 6 h, 12 h, 24 h et 48 h (**Figure 5**).

Aucune différence significative n'est observée entre la souche $\Delta pa3729$ et la souche sauvage PAO1 quel que soit le temps de croissance étudié. En revanche, à 6 h de croissance, on observe une forte diminution de la formation de biofilm (de 35 à 39 %) chez les mutants $\Delta pa3730$, $\Delta pa3731$ et $\Delta pa3732$ par rapport à la souche sauvage. A 12 h, cette diminution est moins marquée pour les mutants $\Delta pa3730$ et $\Delta pa3731$. En effet, elle passe à 12 et 14 %, respectivement. Pour le mutant $\Delta pa3732$, on observe un phénotype semblable au sauvage.

Entre 12 h et 24 h de culture, une diminution significative de la densité bactérienne globale est observée pour toutes les souches étudiées y compris le sauvage. Un retour au phénotype sauvage est également constaté chez tous les mutants du système après 24 h de culture.

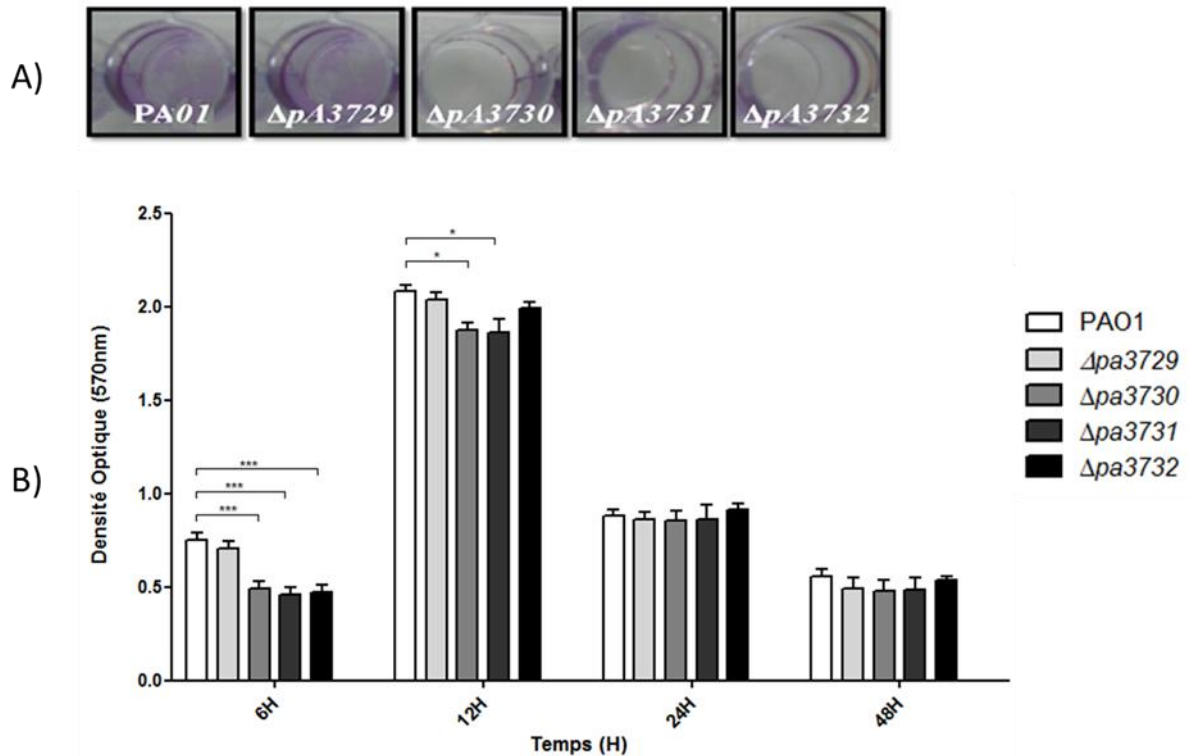


Figure 42 : Capacité de formation de biofilm à l'interface solide-liquide des 5 souches utilisées lors de cette étude. A) Photographie des biofilms formés à l'interface solide-liquide après 6 h de culture (coloration au Cristal Violet). B) Histogramme représentant la quantité de biomasse formée aux différents temps étudiés. Test statistique: two way ANOVA (Dunnett's multiple comparison test): *: p value < 0.05; ***: p value < 0.001

Entre 12 h et 24 h, une diminution de la biomasse est observée. Celle-ci peut correspondre à une mort cellulaire du entre autres à un manque de nutriments et une faible oxygénation des bactéries en fonction du temps sur plaques 24 puits.

I.6-Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Des tests de CMI vis-à-vis de différentes classes d'antibiotiques ont été réalisés par la méthode de micro-dilutions chez les différentes souches (**Tableau 1**).

Tableau 11 : CMI de la souche PAO1 et des souches des mutants bac vis-à-vis de différents antibiotiques

Antibiotique	PAO1	$\Delta pA3729$	$\Delta pA3730$	$\Delta pA3731$	$\Delta pA3732$
Tobramycine ($\mu\text{g/mL}$)	2	8	8	8	4
Chloramphénicol ($\mu\text{g/mL}$)	32	0.5	0.75	1	0.75
Imipénème ($\mu\text{g/mL}$)	16	1	0.25	0.5	0.5
Ciprofloxacine ($\mu\text{g/mL}$)	32	0.25	0.5	0.75	0.5
Ceftazidime ($\mu\text{g/mL}$)	4	4	4	4	4

- Effet sur l'action de la tobramycine : les résultats montrent que les 4 mutants du système « BAC » présentent une résistance plus importante que la souche sauvage. En effet, une CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$ est observée pour la souche sauvage tandis qu'une CMI de 8 $\mu\text{g/mL}$ est observée pour les mutants $\Delta pA3729$, $\Delta pA3730$ et $\Delta pA3731$ et une CMI de 4 $\mu\text{g/mL}$ pour le mutant $\Delta pA3732$.

- Effet sur l'action du chloramphénicol : les résultats sont inversés pour cet antibiotique. Les mutants présentent en effet, une sensibilité accrue par rapport à la souche sauvage. La CMI est de 32 $\mu\text{g/mL}$ pour PAO1 alors qu'elle est inférieure ou égale à 1 $\mu\text{g/mL}$ pour les mutants BAC.

- Effet sur l'action de la ciprofloxacine: le même comportement a été observé pour la ciprofloxacine et le chloramphénicol. La CMI est de 32 $\mu\text{g/mL}$ pour la souche sauvage PAO1 tandis qu'elle est comprise entre 0,25 et 0,75 $\mu\text{g/mL}$ pour les mutants.

- Effet sur l'action l'imipénème : le même constat est observé. La CMI pour PAO1 est de 16 $\mu\text{g/mL}$ alors que celle des mutants est inférieure ou égale à 1 $\mu\text{g/mL}$.

- Effet sur l'action de la ceftazidime: les résultats n'ont pas montré de différences significatives sur cet antibiotique de la famille des céphalosporines.

I.7-Etude de la mobilité bactérienne

Selon les situations, *Pseudomonas aeruginosa* peut se déplacer en utilisant 3 modes de transport:

- Le swimming nécessitant le flagelle,
- Le twitching dépendant des pili de type IV,
- Le swarming *via* le flagelle et les pili de type IV.

Ces systèmes de déplacement jouent un rôle majeur dans la formation de biofilm et dans la virulence. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact des mutations sur les trois modes de déplacement.

On observe, une diminution significative de la mobilité de type swarming chez les mutants $\Delta paA3730$, $\Delta paA3731$ et $\Delta paA3732$ par rapport à la souche sauvage (**Figure 6A**). PAO1 présente un diamètre de $3,0 \pm 0,2$ cm tandis que le diamètre des mutants $\Delta paA3730$, $\Delta paA3731$ et $\Delta paA3732$ est de $1,0 \pm 0,3$ cm, $1,5 \pm 0,4$ cm et $1,1 \pm 0,4$ cm respectivement. Pour le mutant $\Delta paA3729$, aucune différence n'a été observée.

A côté de cela, aucun impact significatif des mutations n'a été observé sur l'ensemble des souches étudiées pour le swimming et le twitching (**Figures 6B et 6C**).

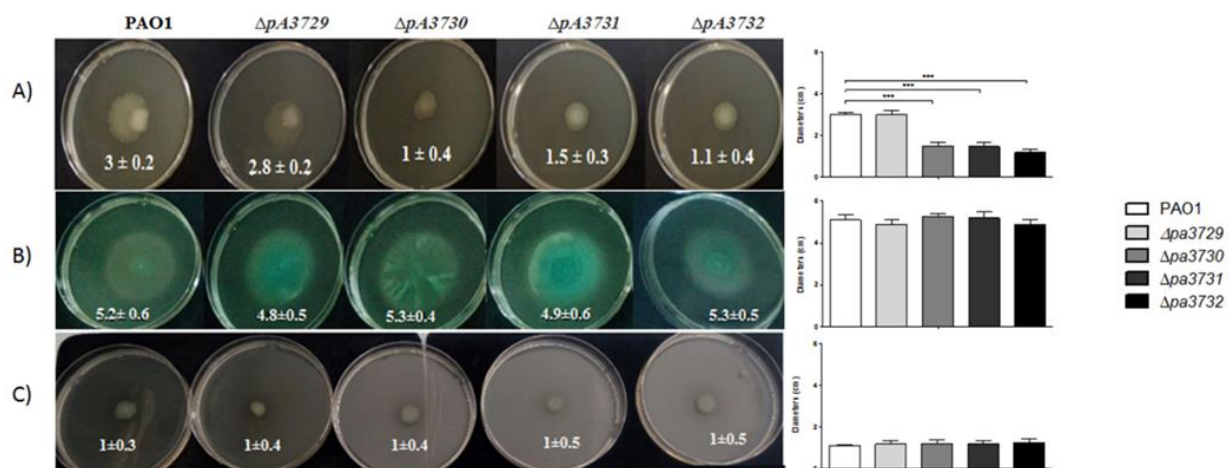


Figure 43 : Etude de la mobilité de PAO1 et des souches mutantes. Les souches bactériennes ont été inoculées avec une aiguille au fond d'une boîte LB agar telle que décrite dans la partie Matériels et Méthodes selon les types de mobilité étudiée. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. A: Swarming; B: Swimming; C: Twitching. Test statistique : one way ANOVA : ***: p value < 0,001

I.8-Quantification de biofilm avec ajout exogène de rhamnolipides

Plusieurs études ont porté sur le rôle de la production de biosurfactants dans la formation de biofilms chez différents microorganismes (Kanmani et al., 2011; Mireles et al., 2001; Rivardo et al., 2009; Walencka et al., 2008). Dans ce travail, l'effet d'un ajout exogène de rhamnolipides sur la formation de biofilm a été étudié chez PA à différents stades de maturation (6 h, 12 h, 24 h et 48 h) pour la souche sauvage PAO1 ainsi que pour les différents mutants.

Résultats : Etudes phénotypiques

Les histogrammes montrent qu'après 6 h de culture, une augmentation significative de la production de biofilm est observée pour l'ensemble des souches étudiées lorsque la concentration en rhamnolipides est supérieure à 20 $\mu\text{g/mL}$ (**Figure 7**). Un résultat similaire est observé après une culture de 12 h. Après 24 h de culture, le phénomène est inversé. En effet, une forte dose de rhamnolipides ($> 20 \mu\text{g/mL}$) induit une diminution significative de la formation de biofilm pour l'ensemble des souches. Après 48 h de culture, aucune différence significative n'est observée quelle que soit la concentration en rhamnolipides utilisée.

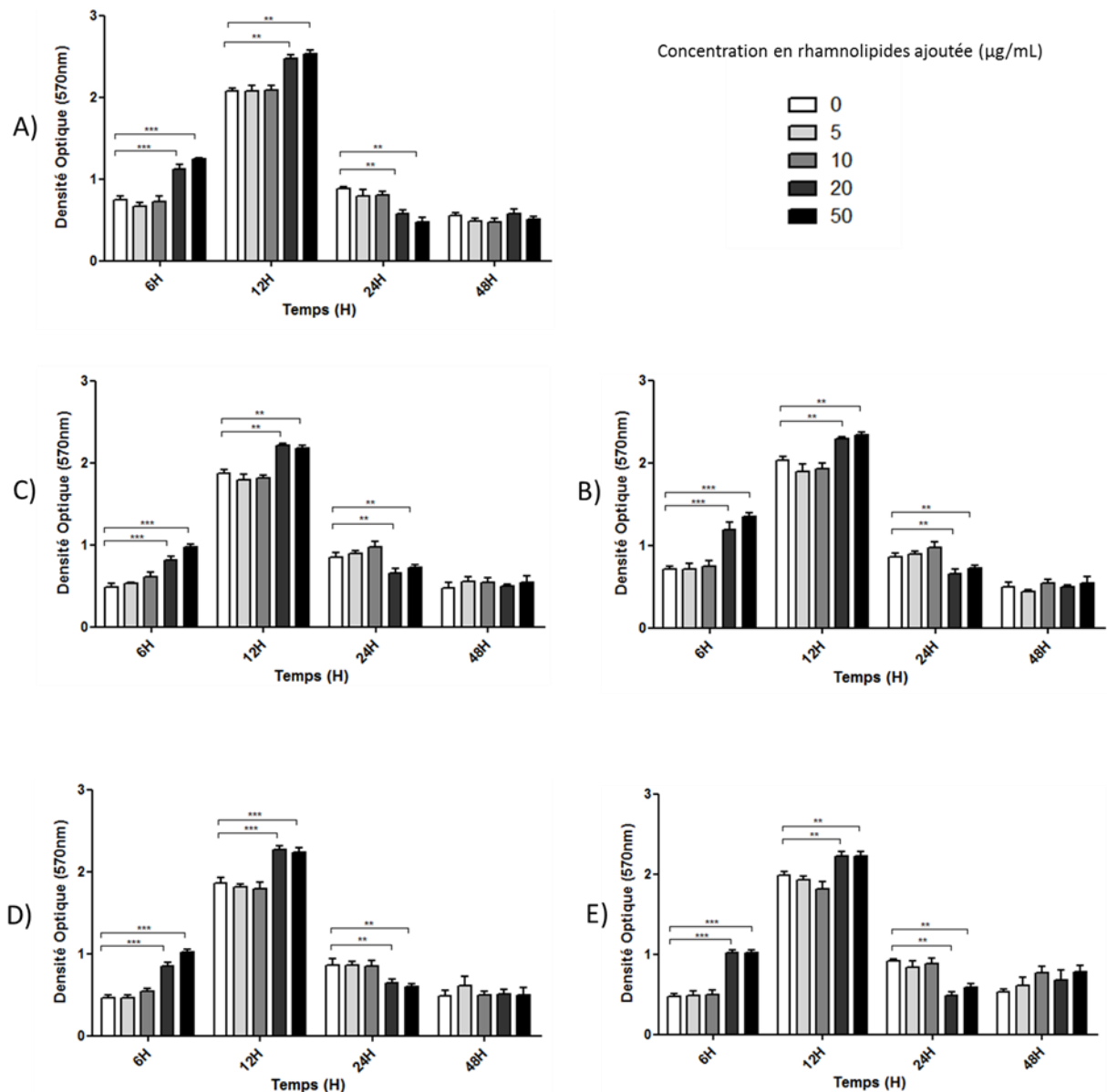


Figure 44 : Influence de l'ajout exogène de rhamnolipides sur la capacité de formation de biofilm à l'interface solide-liquide des 5 souches utilisées lors de cette étude. A) PAO1 ; B) $\Delta pA3729$; C) $\Delta pA3730$; D) $\Delta pA3731$; E) $\Delta pA3732$. Test statistique: two way annova (Dunnet's multiple comparison test: *: p value < 0.05 ; ***: p value < 0.001)

I.9-Influence des rhamnolipides sur l'efficacité des antibiotiques

Ben Mlouka et ses collaborateurs (Ben Mlouka, 2014) ont mis en évidence que le mutant $\Delta pA3731$ présentait une sensibilité accrue à la tobramycine ainsi qu'une déficience dans la production de rhamnolipides.

Notre but a donc été de déterminer s'il existait une modification de l'efficacité des différents antibiotiques à savoir la tobramycine, le chloramphénicol, la ciprofloxacine, l'imipénème et la ceftazidime, suite à l'ajout de rhamnolipides. **(Figure 8)**.

Ces expériences montrent que l'ajout exogène de rhamnolipides a un impact sur l'ensemble des souches étudiées à partir d'une concentration de 20 $\mu\text{g/mL}$. En effet, une augmentation de la CMI dépendante de la concentration en rhamnolipides a été mise en évidence. Ces résultats démontrent que les rhamnolipides sont directement ou indirectement impliqués dans la résistance de la bactérie face à ces différentes familles d'antibiotiques.

Résultats : Etudes phénotypiques

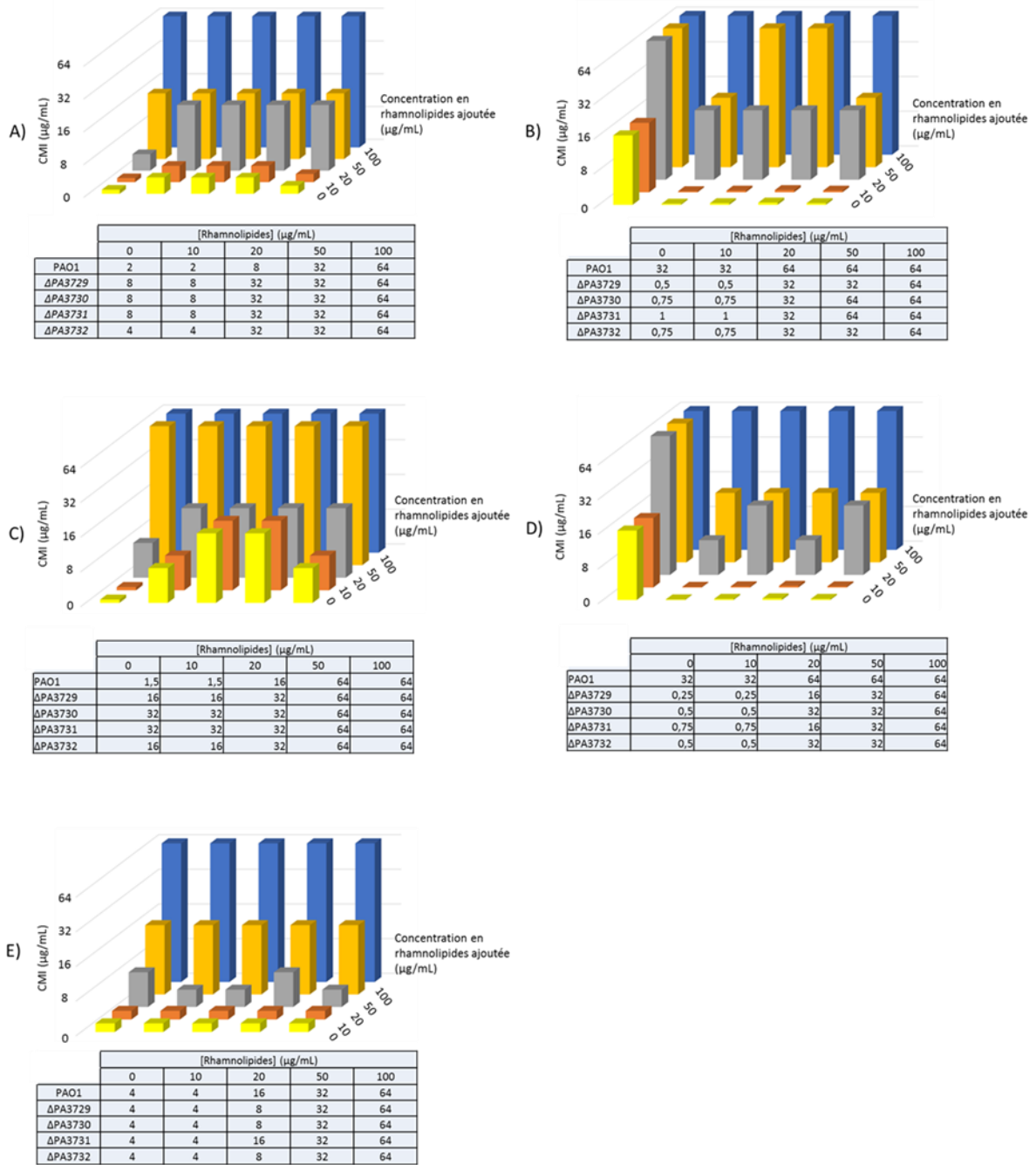


Figure 45 : Impact des rhamnolipides sur la résistance de PAO1 et des souches mutées vis-à-vis de A) Tobramycine ; B) Chloramphénicol ; C) Imipénème ; D) Cyprofloxacin ; E) Ceftazidime

I.10-Influence de l'ajout de rhamnolipides sur la mobilité bactérienne

De nombreuses bactéries produisent des molécules pour activer leur mobilité (Kearns 2010; Partridge et Harshey 2013), et pour favoriser leur interaction avec la surface. Une étude sur l'impact de l'ajout de rhamnolipides sur les différents types de mobilité précédemment étudiés a également été réalisée.

-Le Swarming (**Figure 9**)

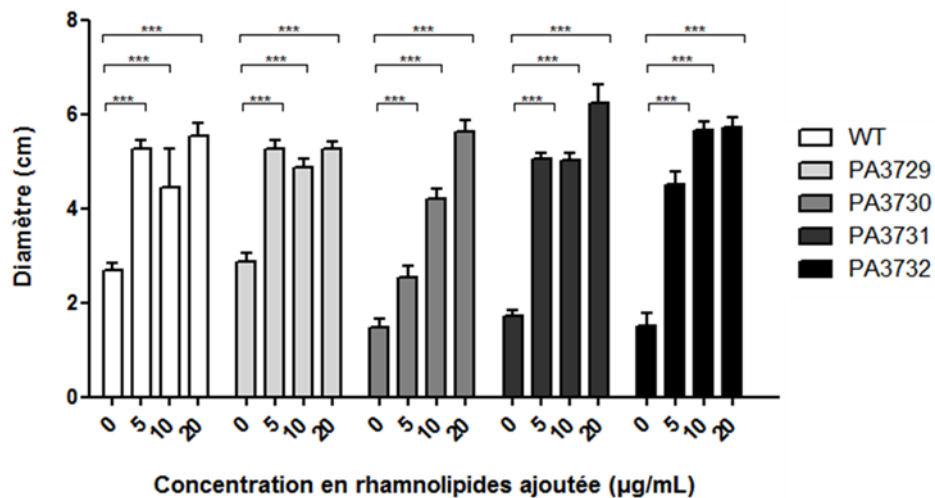


Figure 46 : Impact des rhamnolipides sur la mobilité de type swarming chez PAO1 et les souches mutantes bac . Test statistique: one way ANNOVA (Dunnett's test): ***: p value < 0,001

Cette étude montre que les rhamnolipides influent fortement sur la mobilité de type swarming quelle que soit la souche, et ce, de manière significative. En effet, plus la concentration en rhamnolipides est importante, plus le diamètre mesuré est important, traduisant ainsi une mobilité accrue de la souche étudiée.

-Le Swimming (Figure 10)

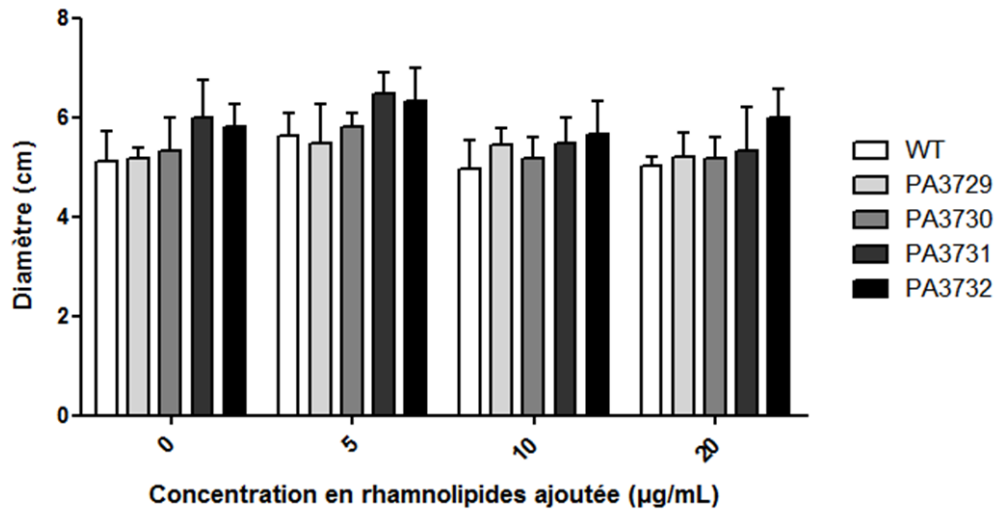


Figure 47: Impact des rhamnolipides sur la mobilité de type swimming chez PAO1 et les souches mutantes bac

Concernant ce type de mobilité, l'impact des rhamnolipides n'est pas significatif quelle que soit la souche étudiée.

-Le Twitching (Figure 11)

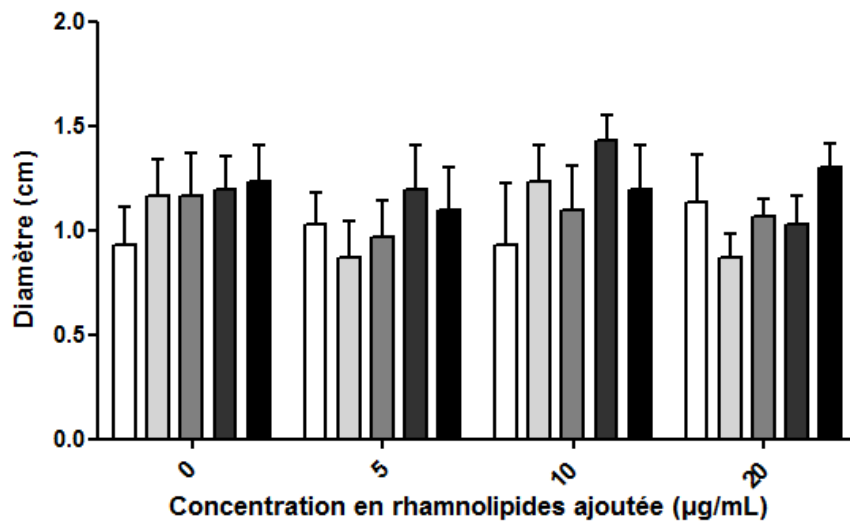


Figure 48: Impact des rhamnolipides sur la mobilité de type twitching chez PAO1 et les souches mutantes

II- Evaluation de l'impact des mutations des gènes *bac* sur le protéome de *Pseudomonas aeruginosa*

Nous avons pris le parti de scinder ces travaux d'analyse protéomique en 2 sous-chapitres : le premier qui traitera de la fraction intracellulaire et le second qui se focalisera sur la fraction sécrétée

II.1-Fraction intracellulaire

Description illustrée de la stratégie d'identification

Dans un premier temps, l'analyse par spectrométrie de masse LC-MSMS (Q-Exactive) a permis d'obtenir un chromatogramme représentant le courant ionique total tout le long du gradient chromatographique (**Figure 49A**). Ce chromatogramme montre la présence de peptides issus de la protéolyse globale de nos échantillons, avec des intensités différentes, entre la 10^{ème} et la 90^{ème} minute du gradient chromatographique. Tout au long de la séquence, des spectres MS vont être obtenus, et pour chaque spectre MS, les 10 ions peptidiques les plus intenses vont être isolés puis fragmentés pour obtenir des spectres MS/MS. Un exemple typique de spectre MS/MS est présenté sur la **Figure 49B** pour un peptide qui a été sélectionné autour de 16,5 min (flèche verte sur le chromatogramme). Après l'analyse, les fichiers de données regroupant l'ensemble des spectres MS/MS caractérisés vont être soumis pour une requête d'interrogation contre une banque de données spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*. Dans notre cas, l'outil d'identification est le logiciel Mascot (Matrix Science) qui est intégré dans une suite logiciel plus complète : Proteome Discoverer (Thermo Scientific). Celui-ci va confronter les spectres expérimentaux obtenus à une banque de spectres théoriques de notre organisme d'intérêt et permettre de remonter aux séquences peptidiques. Dans notre exemple, le spectre MS/MS proposé permet d'annoter la séquence peptidique « *GIATSGNDAGDNGNR* » (**Figure 49B**). Dans un troisième temps, l'ensemble des peptides caractérisés va être compilé afin de les associer aux protéines correspondantes. L'ensemble des peptides d'une même protéine va alors aboutir à un score d'identification relié notamment au recouvrement de la protéine. Dans notre exemple, le peptide identifié appartient à la protéine OprO (Surligné en rouge). De plus, l'ensemble des peptides identifiés pour cette protéine

permet d'aboutir à un taux de recouvrement de 82,42% (**Figure 49C**). Ce scénario s'applique pour l'ensemble des protéines identifiées.

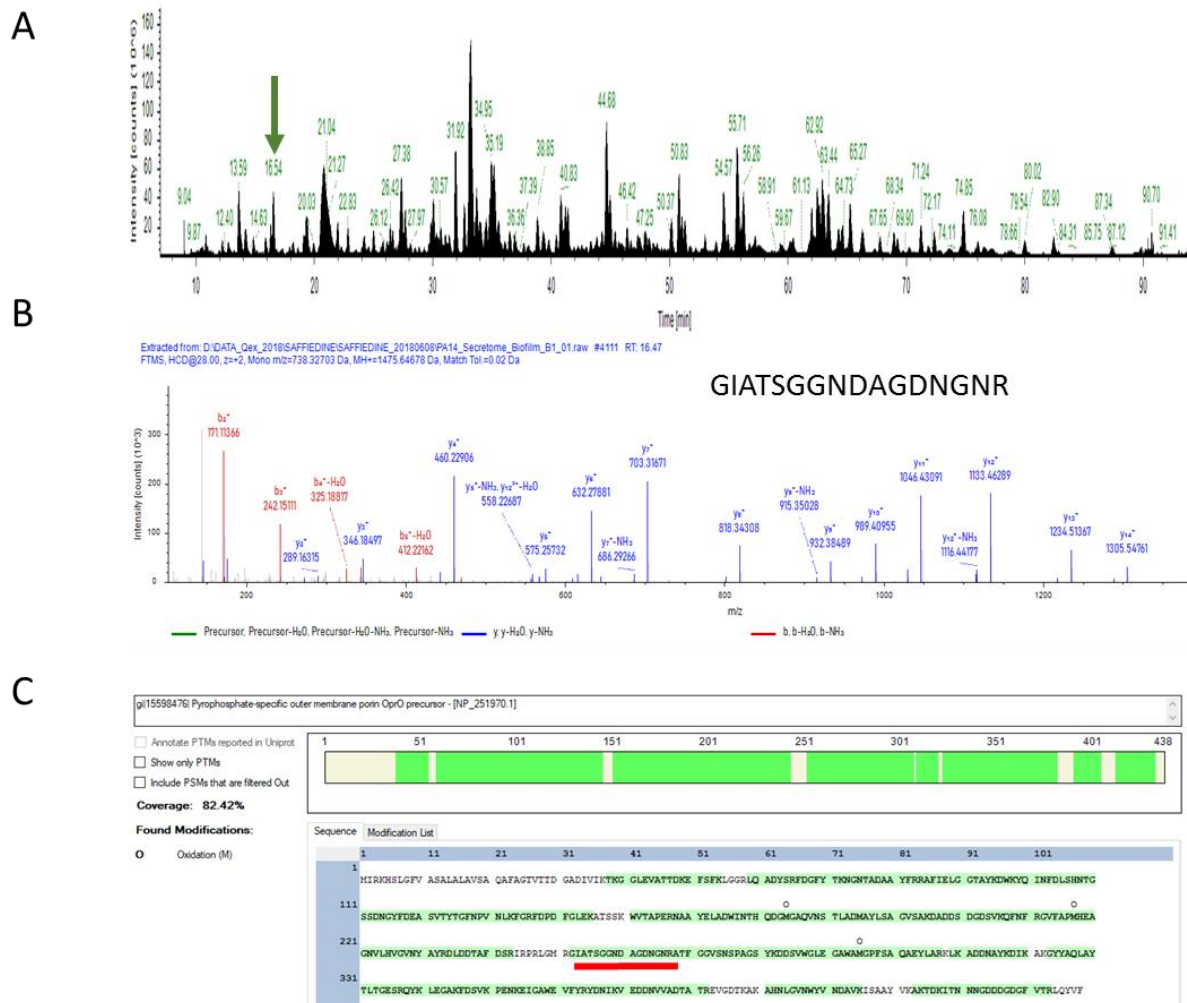


Figure 49 : Illustration des travaux d'identification. A) Chromatogramme du courant ionique total. B) Exemple de spectre de fragmentation avec la séquence annotée. C) Visualisation du taux de couverture de la protéine identifiée (porine OprO)

Traits généraux des travaux d'identification

A partir de ces travaux d'identification, nous avons collecté la liste de protéines identifiées dans chaque réplicats biologique de chacune des conditions étudiées soit au total plus de 2000 protéines, ce qui correspond à environ 40 % du protéome total théorique. Pour chaque condition, nous avons filtré les protéines qui étaient présentes au minimum dans 2 des 3 réplicats. Les listes ainsi obtenues ont permis de représenter les diagrammes de Venn mettant en avant les protéines partagées entre les différents échantillons (**Figure 50**).

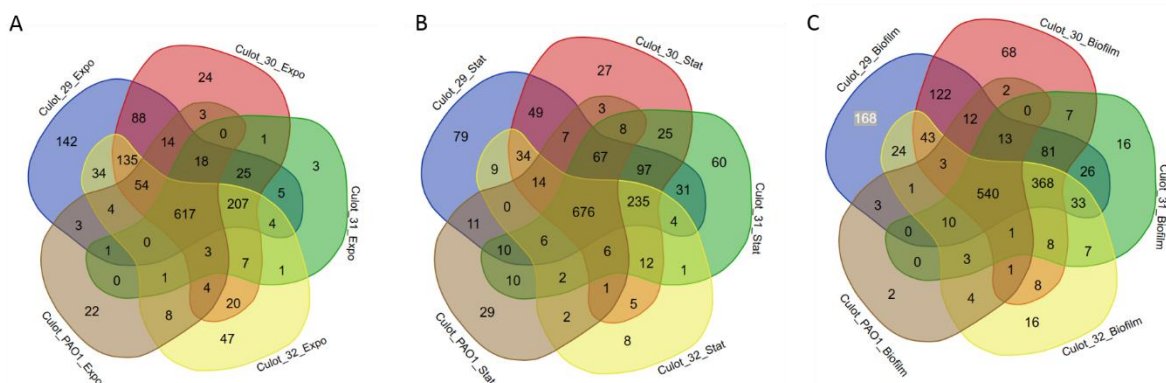


Figure 50 : Diagrammes de Venn des protéines identifiées pour chaque condition de croissance étudiée. A) Phase exponentielle ; B) Phase stationnaire ; C) Biofilm

Ces diagrammes montrent qu'une population très importante de protéines est commune à tous les échantillons d'un même mode de croissance : 617 protéines en phase exponentielle, 676 protéines en phase stationnaire et 540 protéines en mode biofilm.

A un autre niveau, il est également intéressant de voir les spécificités en termes d'identification de l'ensemble des mutants comparés à la souche sauvage. Dans cette situation, un peu plus de 200 protéines sont recensées en mode planctonique (phase exponentielle et phase stationnaire). Ce nombre est très significativement augmenté en mode biofilm avec plus de 350 protéines spécifiquement identifiées dans ce mode de croissance, ce qui semble indiquer, au moins sur le plan qualitatif, que la mutation des gènes *bac* présente un impact plus important en biofilm.

Evaluation de la reproductibilité des échantillons

Dans un premier temps, nous avons utilisés les données issues de l'analyse quantitative (qui seront décrites et discutées plus en détail plus tard) pour évaluer la reproductibilité des réplicats. Dans un premier temps, les trois réplicats biologiques de chaque souche dans chaque condition de croissance ont été soumis à des calculs de régression linéaire. Afin d'obtenir les coefficients de détermination (R^2), les \log_{10} des abondances des protéines (valeurs normalisées) issues des 3 réplicats biologiques de chaque souche et de chaque condition ont été utilisées. Ce coefficient de détermination est une mesure de la qualité d'une régression linéaire. Notons qu'une valeur proche de 1 témoigne d'une forte reproductibilité.

A titre d'exemple, la **Figure 51** permet d'apprécier la forte reproductibilité entre les différents réplicats de la souche sauvage cultivée en mode planctonique et collectées en phase stationnaire. En effet, les coefficients de détermination sont de 0,9352, 0,8702 et 0,9050.

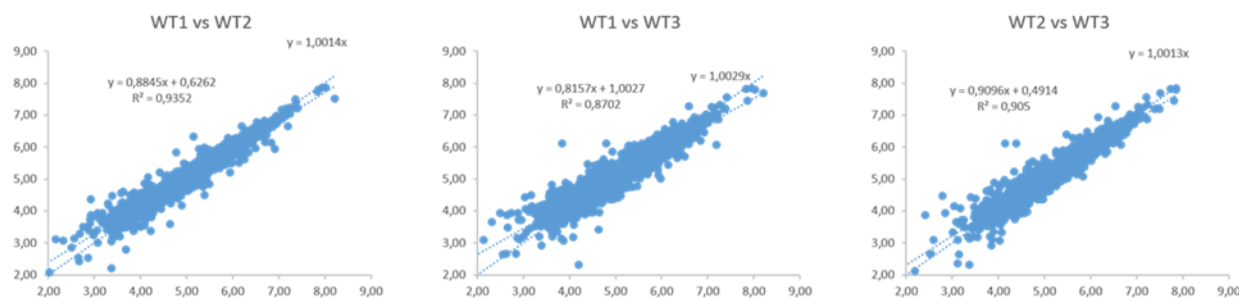


Figure 51 : Evaluation de l'homogénéité des réplicats de la souche sauvage en phase stationnaire

Cette observation est très similaire pour l'ensemble des mutants et pour l'ensemble des conditions étudiées. Les scores de corrélations sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Evaluation de l'homogénéité des réplicats à partir des régressions réalisées pour l'ensemble des conditions

Phase Stationnaire

	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
PAO1	0,9352	0,8702	0,9050
$\Delta pA3729$	0,8820	0,8598	0,9004
$\Delta pA3730$	0,9516	0,9097	0,9554
$\Delta pA3731$	0,9570	0,9457	0,9399
$\Delta pA3732$	0,9160	0,9343	0,9202

Phase Exponentielle

	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
PAO1	0,9063	0,8940	0,8611
$\Delta pA3729$	0,9747	0,9224	0,9255
$\Delta pA3730$	0,9777	0,9728	0,9686
$\Delta pA3731$	0,9655	0,9487	0,9574
$\Delta pA3732$	0,9482	0,9352	0,9218

Phase Biofilm

	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
PAO1	0,9296	0,8925	0,8712
$\Delta pA3729$	0,9626	0,9719	0,9455
$\Delta pA3730$	0,9801	0,9618	0,9802
$\Delta pA3731$	0,9644	0,9748	0,9846
$\Delta pA3732$	0,9665	0,9545	0,9845

Ainsi, on peut voir que pour toutes les situations étudiées, la reproductibilité est tout à fait satisfaisante, ce qui constitue également un gage de crédit pour les analyses quantitatives différentielles présentées ultérieurement.

Analyse par composantes principales

Des analyses par composantes principales (ACP) ont été réalisées à partir de l'ensemble des données expérimentales afin d'évaluer les analogies ou différences statistiques entre les cinq profils de protéines liés aux différentes souches dans chaque condition. Au niveau statistique, l'ACP consiste à transformer des variables liées entre elles ("corrélées") en nouvelles variables dé-corrélées les unes des autres : les composantes principales. Cette analyse a été réalisée pour chaque condition de culture : phases exponentielle et stationnaire et biofilm.

Pour chaque ACP, différentes composantes principales (PC) ont été extraites pour chaque condition. Nous ne discuterons ici que des deux premières PCs qui expliquent au moins 15 % de la variance. Selon la condition de culture étudiée, les deux premières PCs de l'analyse permettent d'expliquer entre 45 et 60 % de la variance totale des données (**Figure 52**).

Dans le cas des cellules en phase exponentielle et en biofilm, la PC1 (31,2 % et 31,9 %, respectivement) oppose la souche sauvage aux mutants Δbac (**Figures 52A et C**). En phase stationnaire, la PC1 distingue la souche mutante $\Delta pA3732$ des autres souches (39,1 %) et la souche sauvage n'est séparée des mutants que dans la seconde composante (PC2, 21,2 %) (**Figure 52B**). En phase exponentielle, la PC2 (15,9 %) discrimine surtout les mutants $\Delta pA3729$ et $\Delta pA3732$ et en mode biofilm, c'est cette fois les mutants $\Delta pA3729$ et $\Delta pA3730$ qui sont séparés des mutants $\Delta pA3731$ et $\Delta pA3732$ dans cette composante (23,2 %).

De plus, le bon regroupement des répliquats biologiques pour chaque souche, quelles que soient les conditions d'incubation, confirme la bonne reproductibilité expérimentale déjà évoquée à l'aise des calculs de régression.

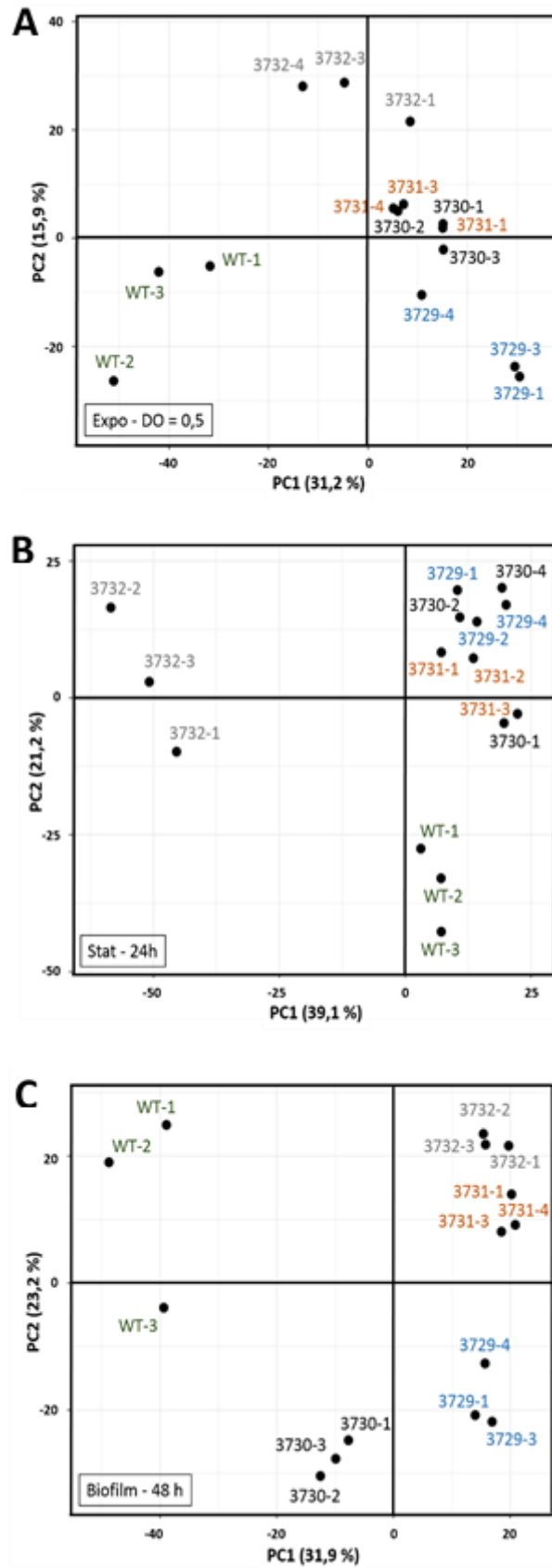


Figure 52 : Analyse par composantes principales. A) Phase exponentielle ; B) Phase stationnaire et C) Biofilm

Analyse par clustering hiérarchique

Cela offre un autre mode de visualisation des données du point de vue statistique. C'est un traitement qui est très souvent utilisé pour traiter les données haut-débit. Dans cette représentation, les lignes représentent les abondances des protéines et les colonnes les conditions.

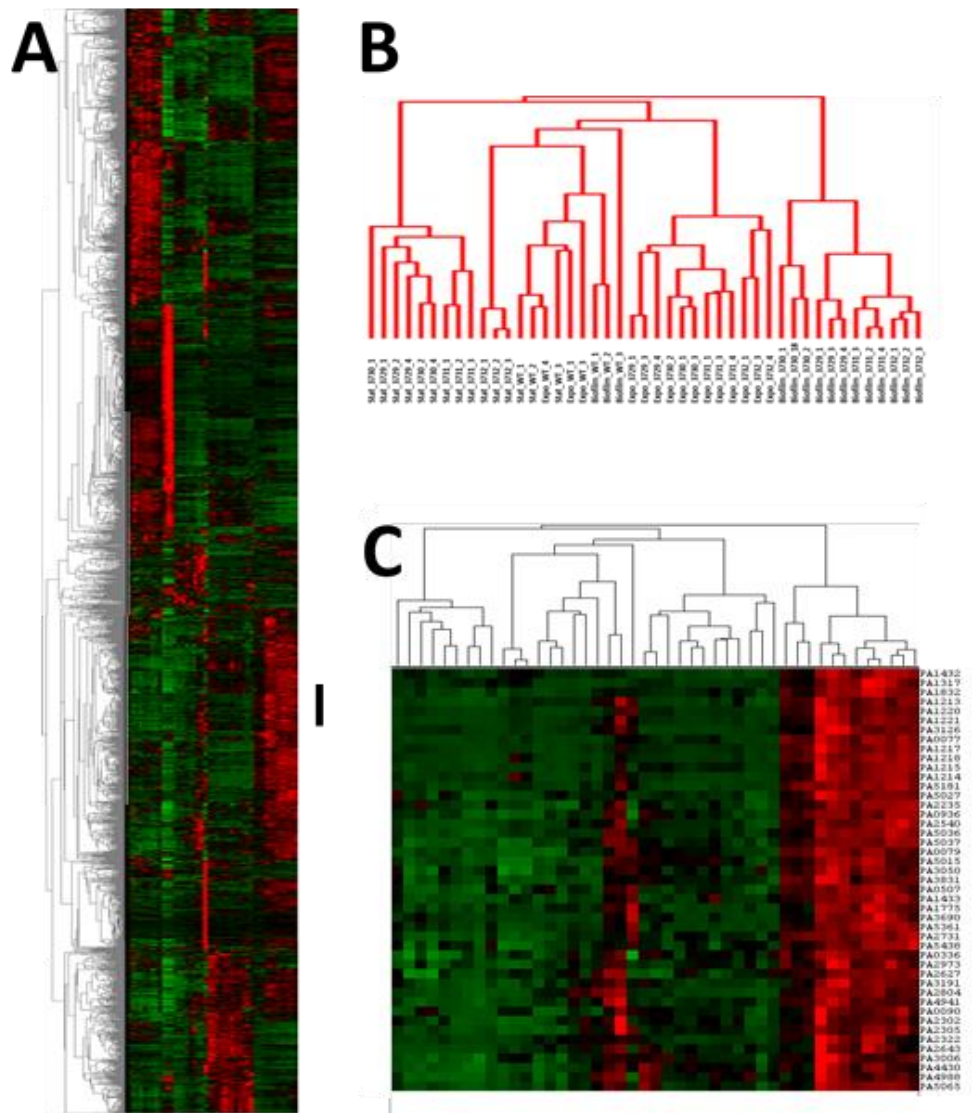


Figure 53 : Analyse par clustering des données de l'analyse protéomique différentielle. A) Analyse cluster et Treeview des 2186 protéines identifiées. Les rangées représentent les valeurs quantitatives d'abondance des protéines. Ces valeurs d'abondance dans les rangées ont été regroupées en fonction de leurs similitudes dans le motif d'expression dans chaque colonne représentant les conditions expérimentales (souches et modes de croissance). B) Ces similitudes entre les colonnes sont représentées à l'aide d'un dendrogramme. C) Zoom sur une région correspondant à une accumulation des protéines en croissance biofilm

Analyse protéomique différentielle de la fraction intercellulaire

Une stratégie d'analyse quantitative « label free » a été utilisée pour comparer les protéomes intracellulaires des mutants du système BAC avec celui de la souche sauvage PAO1, ceci à partir des abondances normalisées des différentes protéines identifiées en spectrométrie de masse. Les abondances des protéines sont calculées à partir des valeurs cumulées des abondances (courants ioniques spécifiques) associées à chacun des peptides identifiés pour une protéine donnée. Par ailleurs, l'objectif de la normalisation est de déterminer un facteur de mise à l'échelle global. Pour mettre en œuvre cette normalisation, nous sélectionnons d'abord une analyse comme référence. Ensuite, pour chaque ion peptidique, est calculé un ratio d'abondance quantitatif entre l'analyse en cours de normalisation et l'analyse de référence. L'idée de base est qu'un grand nombre de protéines (et donc d'ions peptidiques) ne changeront pas d'abondance au cours de l'expérience et que le rapport d'abondance quantitatif devrait être égal à 1. En raison de variations techniques expérimentales, le rapport réel ne sera pas 1. Le rapport de normalisation sera estimé en calculant une distribution robuste de tous les ratios et en déterminant un facteur d'échelle global.

Pour l'analyse différentielle, seules les protéines pour lesquelles le ratio d'abondance était au moins de 2 ont été retenues. De plus, des tests statistiques (p -value < 0.05) ont été réalisés pour filtrer les différences significatives des abondances protéiques entre les différentes souches dans la condition étudiée.

Pour représenter graphiquement les données quantitatives obtenues suite à l'application de ces filtres, des représentations graphiques spécifiques : des « volcano plots » reportant les valeurs $-\log_{10}$ (p -value) vs. \log_2 (ratio entre mutant BAC et PAO1), ont été construites. La première « volcano plot » est commentée ci-dessous pour illustrer l'interprétation (**Figure 53**, $\Delta PA3729$ vs WT). Les points à gauche de la ligne verticale jaune de gauche indiquent des ratios mutant BAC/PAO1 inférieurs ou égaux à 2, tandis que les points situés à droite de la ligne verticale de droite indiquent des ratios mutant BAC/PAO1 supérieurs ou égaux. Si les points sont au-dessus de la ligne horizontale jaune, les différences sont statistiquement pertinentes (p -value < 0.05).

Cela nous permet de déterminer les nombres de protéines présentant une abondance différentielle. Pour chaque comparaison entre un mutant *bac* et la souche sauvage, le nombre de protéines sous-exprimées chez les mutants est indiqué en vert et le nombre les protéines surexprimées est présenté en rouge.

Résultats : Etudes protéomiques

Notons que le résultat obtenu en comparant le mutant $\Delta pA3732$ et la souche sauvage dans cette condition confirment qu'il existe une différence importante chez ce mutant par rapport aux autres mutants du système BAC et de la souche sauvage PAO1 dans cette condition de croissance. Cette variabilité peut notamment s'expliquer par un nombre plus important de protéines sous exprimés, par comparaison aux autres mutants du système BAC.

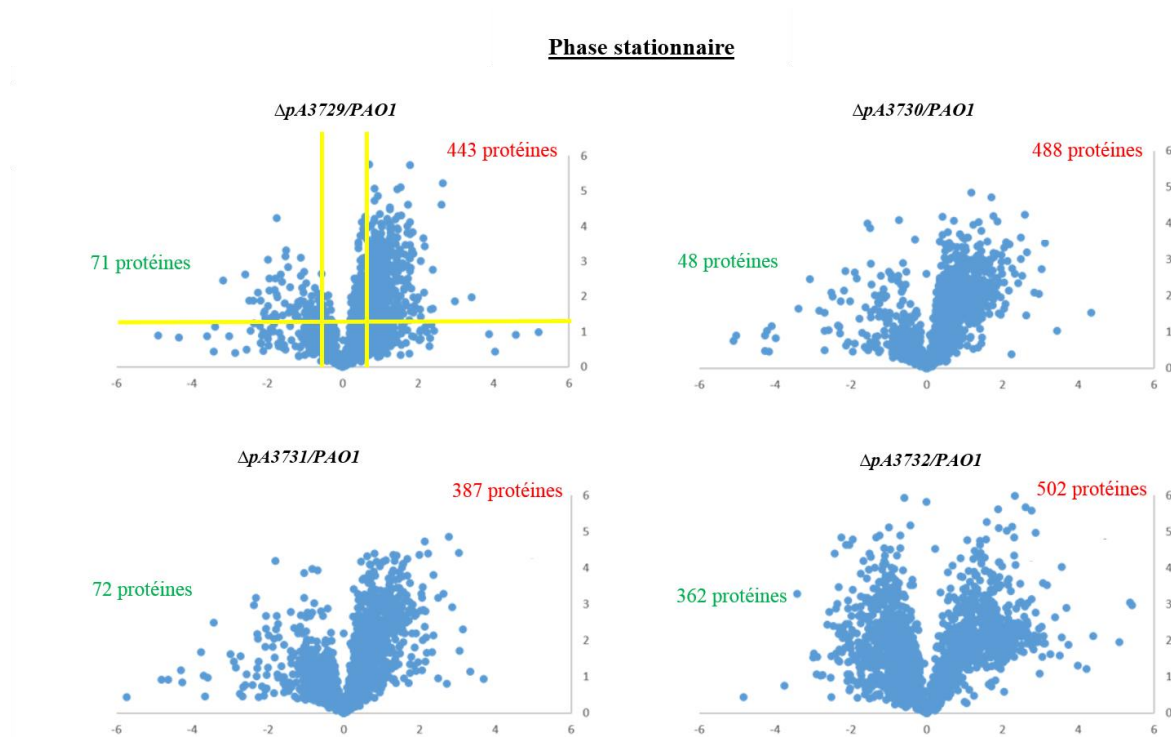


Figure 54 : Graphiques « Volcano plots » permettant de visualiser les protéines présentant une abondance différente entre les souches étudiées, en phase stationnaire

Pour avoir une vue globale, l'ensemble des nombres des protéines sous-exprimées et surexprimées de façon significative pour chacune des conditions est regroupé dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Résumé des protéines différentiellement exprimées dans chaque condition de croissance entre un mutant BAC et la souche sauvage

	Phase Exponentielle		Phase Stationnaire		Biofilm	
	Ratio < 0.5	Ratio > 2	Ratio < 0.5	Ratio > 2	Ratio < 0.5	Ratio > 2
$\Delta pA3729$ vs PAO1	75	381	71	443	36	328
$\Delta pA3730$ vs PAO1	74	291	48	488	53	211
$\Delta pA3731$ vs PAO1	96	237	72	387	42	299
$\Delta pA3732$ vs PAO1	84	144	362	502	41	284

Etude des protéines sous-exprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC

Nous avons choisi de faire un focus spécifique sur les protéines retrouvées sous exprimées dans l'ensemble des souches mutées du système BAC par rapport à la souche sauvage pour chaque condition. Les résultats sont regroupés sous la forme d'un diagramme de Venn (**Figure 55**).

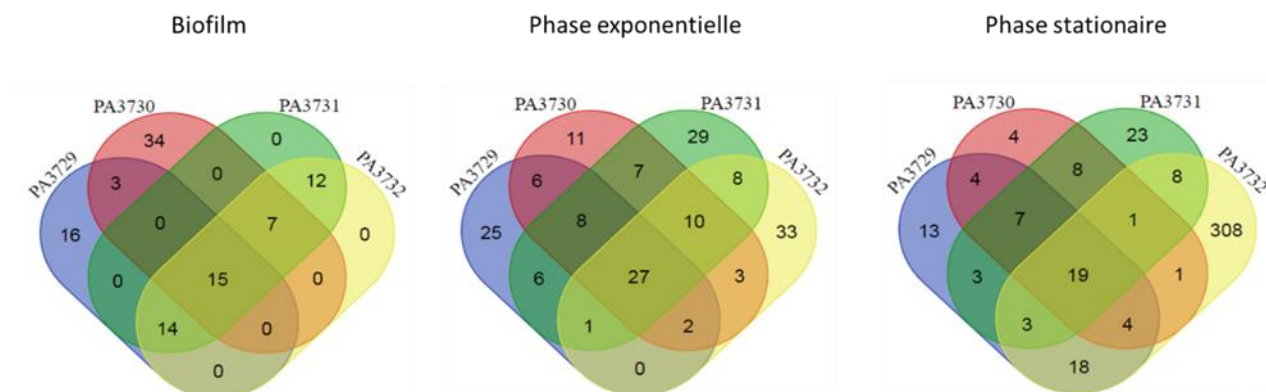


Figure 55 : Diagramme de Venn des protéines sous-exprimées entre les mutants et la souche sauvage pour chaque condition de croissance

En phase exponentielle, au total 176 protéines sous-exprimées dans l'un ou l'autre des mutants du système BAC par rapport à la souche sauvage PAO1 ont été observées. Parmi ces protéines, on retrouve 27 spécifiquement sous exprimés chez l'ensemble des mutants du système BAC.

En phase stationnaire, le nombre total de protéines sous-exprimées dans l'un ou l'autre des mutants du système BAC par rapport à la souche sauvage PAO1 est très nettement supérieur (424 protéines), avec une sous-expression particulièrement plus marquée chez le mutant $\Delta pa3732$. Parmi ces protéines, on retrouve 19 protéines spécifiquement sous-exprimés chez l'ensemble des mutants du système BAC.

En phase biofilm, 101 protéines sont sous-exprimées dans l'un ou l'autre des mutants du système BAC par rapport à la souche sauvage PAO1. Parmi ces protéines, on retrouve 15 protéines spécifiquement sous exprimés chez l'ensemble des mutants du système BAC.

Etude des protéines surexprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC

Par la suite et de manière similaire, nous avons recherché les protéines retrouvées cette fois surexprimées dans l'ensemble des souches mutées du système BAC par rapport à la souche sauvage.

Les résultats ont été également regroupés sous la forme d'un diagramme de Venn (**Figure 56**).

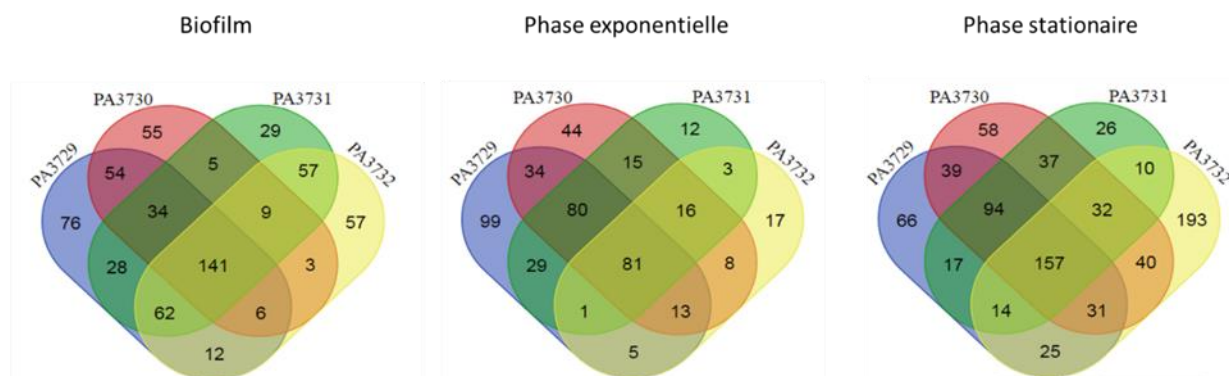


Figure 56 : Diagramme de Venn des protéines surexprimées entre les mutants et la souche sauvage pour chaque condition de croissance

En phase exponentielle, parmi les 457 protéines surexprimées dans l'un ou l'autre des mutants, on retrouve 81 protéines spécifiquement surexprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC.

En phase stationnaire, 839 protéines sont surexprimées dans l'un ou l'autre des mutants, parmi lesquelles, 157 protéines sont spécifiquement surexprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC.

En phase biofilm, 628 protéines sont surexprimées dans l'un ou l'autre des mutants du système BAC par rapport à la souche sauvage PAO1. Parmi ces protéines, on retrouve 141 protéines spécifiquement surexprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC.

Etude des protéines différemment exprimées de façon équivalente dans toutes les conditions chez l'ensemble des mutants du système BAC

Nous avons ensuite sélectionné les protéines retrouvées sous-exprimées et surexprimées dans l'ensemble des souches mutées du système BAC par rapport à la souche sauvage pour toutes les conditions. Les résultats sont regroupés sous la forme d'un nouveau diagramme de Venn (**Figure 57**).

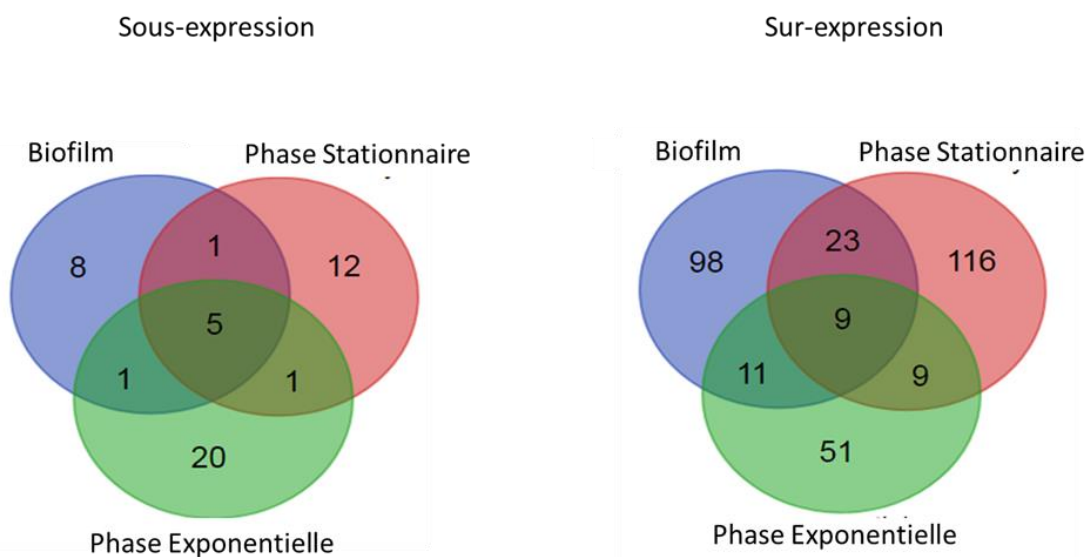


Figure 57 : Diagramme de Venn des protéines sous-exprimées (partie gauche) et surexprimées (partie droite) de façon équivalente entre les mutants et la souche sauvage pour chaque condition de croissance

Le **Tableau 14** regroupe l'ensemble des protéines retrouvées sous-exprimées et surexprimées chez l'ensemble des mutants du système BAC par rapport à la souche sauvage dans toutes les conditions.

Tableau 14 : Protéines présentant une régulation similaire (surexpression ou sous-expression) entre tous les mutants BAC et la souche sauvage, quelle que soit la condition considérée

	Nom	Identifiant	Nombre de peptides
Sur expression			
	Outer membrane porin OprD precursor	PA0958	6
	Peptidy-prolyl cis-trans isomerase B	PA1793	11
	Trigger factor	PA1800	33
	UDP-2-acetamido-3-amino-2,3 dideoxy-d-glucuronic acid N -acetyltransferase WbpD	PA3156	3
	MexL	PA3678	2
	Ferredoxin [2Fe-2S]	PA3809	2
	Probable iron-binding protein IscU	PA3813	8
	50S ribosomal protein L7/L12	PA4271	11
	Probable ribosomal protein L25	PA4671	12
Sous expression			
	MexS	PA2491	11
	MexT	PA2492	3
	MexE precursor	PA2493	3
	Outer membrane protein OprN precursor	PA2495	14
	Probable glutathione S-transferase	PA2813	7

II.2-Fraction extracellulaire

Les pathogènes ont mis en place des systèmes de contrôle fins de la synthèse de leurs facteurs de virulence de manière à pouvoir infecter efficacement leur hôte. Ainsi, lorsque les bactéries sont en quantité suffisamment importante pour arriver à conduire une attaque brusque et forte des cellules de l'hôte, les bactéries synthétisent massivement leurs facteurs de virulence permettant une invasion de l'hôte. Cette étape a lieu généralement durant la phase stationnaire de croissance mais aussi dans un mode de vie sessile durant laquelle la bactérie est plus résistante à un environnement défavorable.

Dans cette partie, nous avons voulu voir l'impact de la mutation des gènes du système BAC sur la production de facteurs de virulence de la bactérie en mode planctonique en phase stationnaire et aussi en mode de croissance biofilm. Pour cela, une analyse protéomique du sécrétome a été conduite. Nous avons pour cela isolé la fraction extracellulaire comme cela a été décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

Traits généraux des travaux d'identification

A partir des travaux d'identification (Cf II-1 pour la méthodologie), nous avons collecté la liste de protéines identifiées dans chaque réplicats biologique des différentes souches pour chacune des conditions étudiées, soit au total environ 1500 protéines. Pour chaque condition, nous avons filtré les protéines qui étaient présentes au minimum dans 2 des 3 réplicats. Les listes ainsi obtenues ont permis de représenter les diagrammes de Venn mettant en avant les protéines partagées entre les différents échantillons (**Figure 58**).

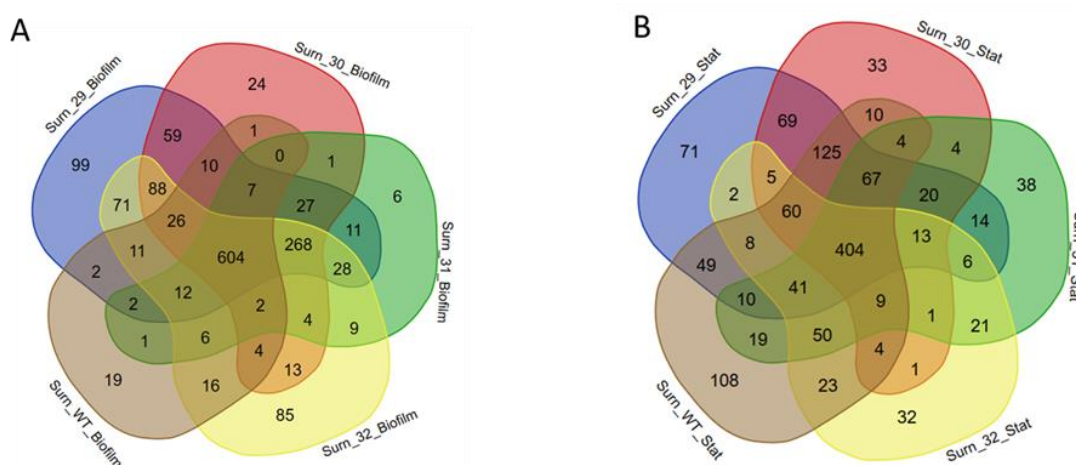


Figure 58 : Diagramme de Venn représentant les protéines de la fraction extracellulaire pour les différentes souches étudiées A) en mode biofilm et B) en phase stationnaire

Ces diagrammes montrent qu'une population très importante de protéines est commune à tous les échantillons d'un même mode de croissance, 404 protéines communes en phase stationnaire et 604 protéines communes en mode biofilm. Entre ces 2 conditions de croissance, il est important de noter que l'on retrouve environ 200 protéines communes en moins en phase stationnaire par rapport au biofilm.

Comme observé lors de l'étude de la phase intracellulaire, plus de 250 protéines sont recensées comme étant spécifiques en termes d'identification dans l'ensemble des mutants comparés à la souche sauvage en mode biofilm. Cette observation n'est pas retrouvée en phase stationnaire, ce qui indique que les mutations sur le système BAC ont une incidence beaucoup plus marquée en mode biofilm.

Evaluation de la reproductibilité des échantillons

De la même façon que pour l'analyse de la fraction intracellulaire, nous avons par la suite utilisé les données issues de l'analyse quantitative pour évaluer la reproductibilité des réplicats. A partir des calculs de régression linéaire, les coefficients de détermination (R^2) ont été déterminés ; calculs basés sur les \log_{10} des abondances normalisées des protéines issues des 3 réplicats biologiques de chaque pour dans chacune condition étudiée.

On observe un coefficient de détermination très voisin entre les trois réplicats indépendants des différentes souches dans les différentes conditions d'études. Ceci témoigne là encore d'une reproductibilité toute à fait satisfaisante de nos échantillons (**Tableau 15**).

Néanmoins, en mode biofilm, ces coefficients sont plus proches de l'unité qu'en phase stationnaire. Cela est révélateur d'une variabilité un peu plus importante en phase stationnaire. L'impact est une distribution plus large des valeurs d'abondance mesurées, qui va en conséquence augmenter les écart-types associés à chacune des valeurs quantitatives.

Tableau 15: Coefficients de détermination obtenus à partir des calculs de régression linéaire

Phase Stationnaire

	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
PAO1	0.8953	0.8534	0.8742
$\Delta pA3729$	0.8735	0.8442	0.8180
$\Delta pA3730$	0.8747	0.8665	0.9072
$\Delta pA3731$	0.8236	0.8925	0.8746
$\Delta pA3732$	0.9547	0.9160	0.9108

Phase Biofilm

	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
PAO1	0.9057	0.8847	0.8683
$\Delta pA3729$	0.9477	0.9321	0.9339
$\Delta pA3730$	0.9474	0.9397	0.9469
$\Delta pA3731$	0.8991	0.9489	0.9448
$\Delta pA3732$	0.9845	0.9252	0.9453

Analyse par composantes principales

Des analyses par composantes principales (ACP) ont été réalisées à partir de l'ensemble des données expérimentales afin d'évaluer les analogies ou différences statistiques entre les cinq profils de protéines liés aux différentes souches dans chaque condition.

Comme précédemment, seules les deux premières PCs ont été présentées. Selon la condition de culture étudiée, les deux premières PCs de l'analyse permettent d'expliquer entre 50 et 56 % de la variance totale des données (**Figure 59**).

Dans le cas des cellules en phase stationnaire, la PC1 (33,4 %) oppose la souche sauvage et les mutants *pA3729* et *pA3730* aux mutants *pA3731* et *pA3732* (**Figures 59A**). En phase biofilm, la PC1 discrimine principalement la souche sauvage du mutant *pA3729* (**Figure 59B**). Dans cette analyse, la PC2 est plus compliquée à expliquer.

De plus, le bon regroupement des réplicats biologiques pour chaque souche, quelles que soient les conditions de croissance, confirme la bonne reproductibilité expérimentale déjà évoquée lors des calculs de régression.

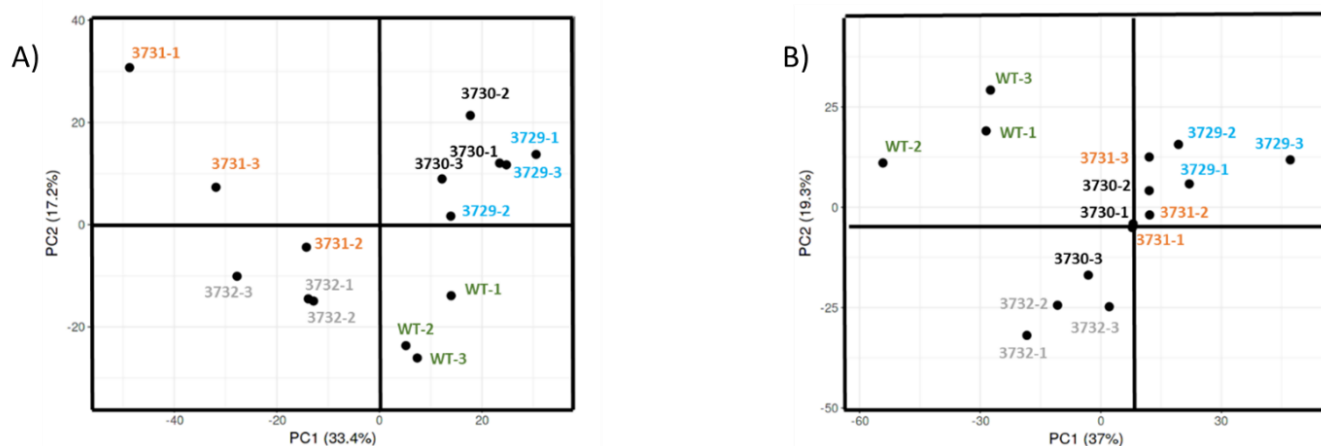


Figure 59 : Analyse par composantes principales. A) Phase stationnaire et B) Biofilm

Analyse protéomique différentielle de la fraction extracellulaire

Pour avoir une vue globale, l'ensemble des nombres des protéines sous-exprimées et surexprimées de façon significative pour chacune des conditions est regroupé dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 : Résumé des protéines de la fraction extracellulaire présentant une abondance différente dans chaque condition de croissance étudiée entre un mutant BAC et la souche sauvage.

	Phase Stationnaire		Biofilm	
	Ratio < 0.5	Ratio > 2	Ratio < 0.5	Ratio > 2
$\Delta pA3729$ vs PAO1	165	126	99	372
$\Delta pA3730$ vs PAO1	228	150	109	271
$\Delta pA3731$ vs PAO1	147	214	50	294
$\Delta pA3732$ vs PAO1	244	248	64	236

Facteurs de virulence

Par la suite de l'analyse de cette fraction, nous avons choisi de nous focaliser sur l'impact des mutations sur les facteurs de virulence. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur la base de données présente sur le site www.pseudomonas.com qui recense 427 facteurs de virulence. Les résultats sont représentés sous la forme d'un tableau (**Annexe 1**).

Sur l'ensemble de ces facteurs de virulence, on retrouve en croissance biofilm 68 protéines

Résultats : Etudes protéomiques

surexprimées et 7 protéines sous-exprimées chez au moins un des mutants dans les fractions extracellulaires. En phase stationnaire, on observe cette fois 43 protéines surexprimées et 23 protéines sous-exprimées. Même si ces nombres apparaissent peu différents, il est important de noter qu'en biofilm, ces surexpressions sont le plus souvent observées chez plusieurs mutants pour une même protéine alors qu'en phase stationnaire elles sont beaucoup plus ponctuelles. Ce comportement est plutôt inversé si on considère cette fois la sous-expression.

Un élément marquant de ces analyses est la forte représentation de protéines surexprimées à l'état biofilm et qui sont concentrées sur 3 voies fonctionnelles majeures : les facteurs de virulence associés au Quorum Sensing, à la mobilité bactérienne liée au flagelle et également au système de sécrétion de type 6 (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Facteurs de virulence surexprimés à l'état biofilm (■ protéines associées au système de sécrétion de type 6 ; ■ protéines associées au quorum sensing ; ■ protéines associées au flagelle).

Accession	Description	ratio 29/WT	ratio 30/WT	ratio 31/WT	ratio 32/WT
PA0079	TssK1	4,55	3,48	3,64	2,39
PA0081	Fha1	14,64	10,28	9,59	
PA0084	TssC1		3,56	3,74	2,95
PA0090	ClpV1	15,11	10,11	11,13	
PA0996	PqsA	5,33	4,31	2,93	2,81
PA0998	PqsC	2,21			
PA1092	flagellin type B				2,08
PA1097	transcriptional regulator FleQ	3,61	2,85	3,25	2,49
PA1102	flagellar motor switch protein FlIG	2,76			
PA1130	rhamnosyltransferase 2	14,27	8,06	7,31	7,32
PA1430	transcriptional regulator LasR	2,66			
PA1432	autoinducer synthesis protein LasI	2,73	2,06	2,40	
PA1454	flagellar synthesis regulator FleN				6,33
PA1657	HsiB2	4,22	2,00	4,34	
PA1658	HsiC2	11,52	8,90	7,79	
PA1665	Fha2		48,95		
PA1871	LasA protease precursor				14,32
PA1900	probable phenazine biosynthesis protein	4,00	3,08	3,02	2,83
PA1901	phenazine biosynthesis protein PhzC	14,34	12,75	7,97	8,24
PA1902	phenazine biosynthesis protein PhzD	4,45	3,59	2,11	2,94
PA1903	phenazine biosynthesis protein PhzE	6,23	5,01	3,42	3,98
PA1904	probable phenazine biosynthesis protein	3,17	2,96	2,76	3,08
PA2363	HsiJ3	67,71	50,96	63,39	
PA2365	HsiB3				2,21
PA2366	HsiC3	9,40	7,81	5,59	7,07
PA3476	autoinducer synthesis protein RhII	24,22	17,88	5,13	
PA3477	transcriptional regulator RhIR	3,95	2,80	2,64	
PA3478	rhamnosyltransferase chain B	12,08	6,49	7,55	5,28
PA3479	rhamnosyltransferase chain A	14,20	8,26	7,31	6,55
PA4209	probable phenazine-specific methyltransferase		3,53		2,23

III- Etudes des protéines du système BAC et études interactomiques

Toutes les protéines dans cette étude possèdent des étiquette 6xHis à leur extrémité N-terminale pour faciliter leur purification en utilisant la chromatographie d'affinité au Ni²⁺. Quel que soit le type de purification utilisés (condition native ou dénaturante), le compétiteur utilisé est l'imidazole à une concentration de 500mM.

III.1-Purification des protéines du système BAC

Purification de la protéine PA3729

Expression et purification en conditions natives : L'expression de la protéine PA3729 suite à une induction par l'IPTG a été analysée par SDS-PAGE 10 % (**Figure 60**).

On peut observer, à partir du gel SDS-PAGE, que la protéine PA3729 (environ 76 kDa) est présente dans la fraction soluble en très faibles quantités (piste 2) et la plus grande partie de la protéine est restée dans le culot, constitué entre autres des corps d'inclusions (piste 3). Après excision et analyse par spectrométrie de masse, on a pu démontrer que cette bande protéique correspond bien à la protéine PA3729.

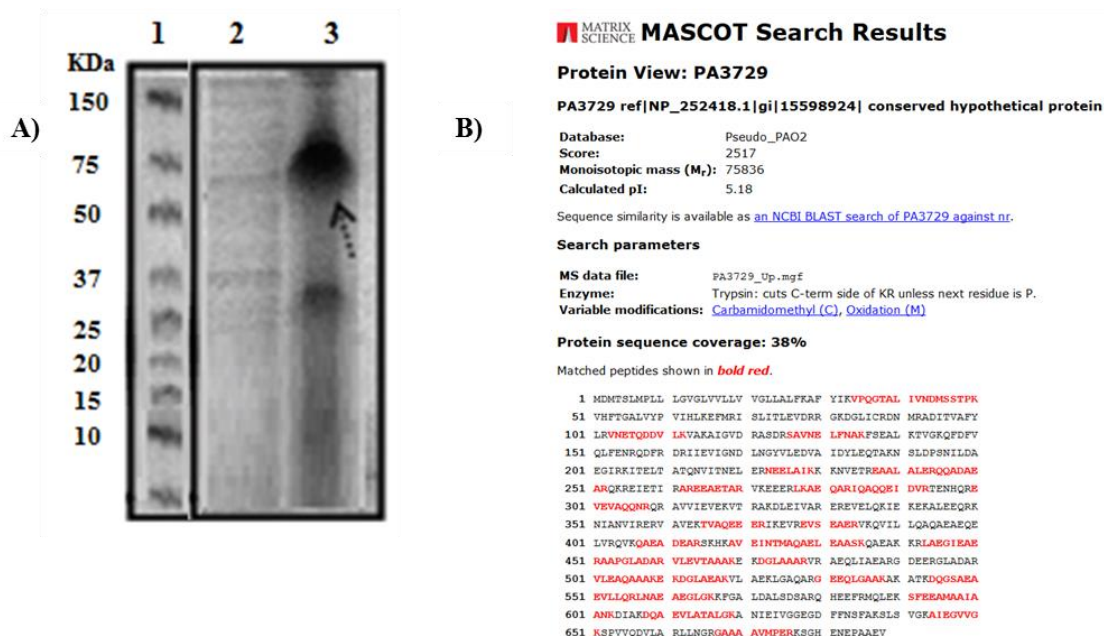


Figure 60 : Résultat de la surproduction de la protéine PA3729. A) Analyse SDS-PAGE. Piste 1: Marqueurs de poids moléculaire, Piste 2: Protéines solubles, Piste 3: Corps d'inclusion. B) Confirmation de l'identité de la protéine PA3729 par spectrométrie de masse

Résultats : Etudes interactomiques

D'après les travaux précédents (Ben Mlouka et al., 2014), cette protéine se situerait dans la membrane externe de la bactérie, ce qui pourrait rendre difficile son obtention dans la fraction soluble, et conduirait par conséquent à son accumulation, en grande partie, dans les corps d'inclusion, ce qui correspond à notre observation.

Par ailleurs, une analyse LC-MS a été réalisée sur la bande protéique pour confirmer l'identité de cette protéine. Il s'agit bien de la protéine PA3729 qui a été identifiée avec une vingtaine de peptides, un score d'identification supérieur à 2500 (score très élevé) et un taux de couverture de 38 %.

Purification en conditions dénaturantes : La plus grande fraction de la protéine PA3729 étant retrouvée dans les corps d'inclusion, une purification en conditions dénaturantes a donc été entreprise.

Le résultat de cette purification a été analysé par SDS-PAGE 10 % (**Figure 61**).

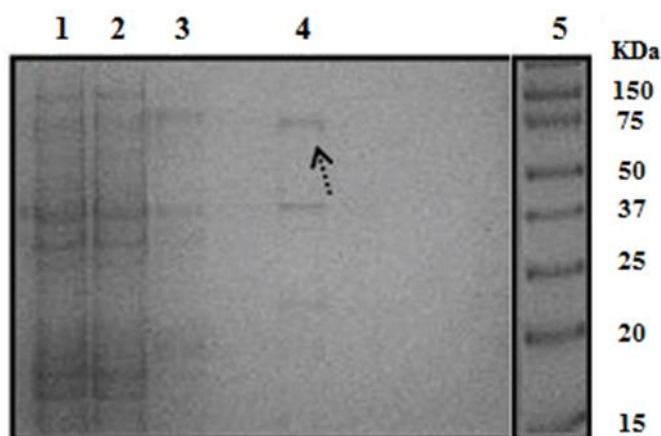


Figure 61 : Analyse par SDS-PAGE 10 % du résultat de la purification de la protéine PA37329 par chromatographie d'affinité dans des conditions dénaturantes, à partir d'une culture cellulaire d'un litre. La bande protéique à 76 kDa correspond à la protéine PA3729. Piste 1: fraction soluble dans 6 M d'urée ; Piste 2: fraction non liée ; Piste 3: fraction de lavage sans urée; Piste 4: fraction élué

La protéine PA3729 a bien été purifiée dans ces conditions (**Figure 61**), mais en présence d'une concentration d'urée égale à 6 M, elle se retrouve dénaturée. Une étape d'élimination de l'urée pour la renaturer est donc nécessaire, pour qu'on puisse la caractériser structuralement par cristallographie et étudier sa possible interaction avec les autres protéines du système BAC.

Toutefois, vu la présence d'une fraction de la protéine PA3729 dans la partie native soluble, et les difficultés et contraintes que l'on pourrait avoir dans les tests de renaturation de la protéine à partir d'une concentration initiale d'urée de 6M, d'autres systèmes et conditions, beaucoup

plus rapides et efficaces, ont été testés pour la purification de la protéine native contenant dans la fraction soluble non dénaturée, avant d'envisager de tester la renaturation de la protéine.

Optimisation de la purification en conditions natives : Dans un premier temps, au regard de la très faible quantité de la protéine PA3729 retrouvée dans la fraction soluble, il a été choisi d'augmenter la quantité initiale de culture cellulaire.

Les protéines ont ainsi été obtenues à partir de 5 L de culture après induction, et ont été purifiées dans les mêmes conditions natives que précédemment. Le résultat de cette purification a été analysé à partir des profils électrophorétiques ci-dessous (**Figure 62**).

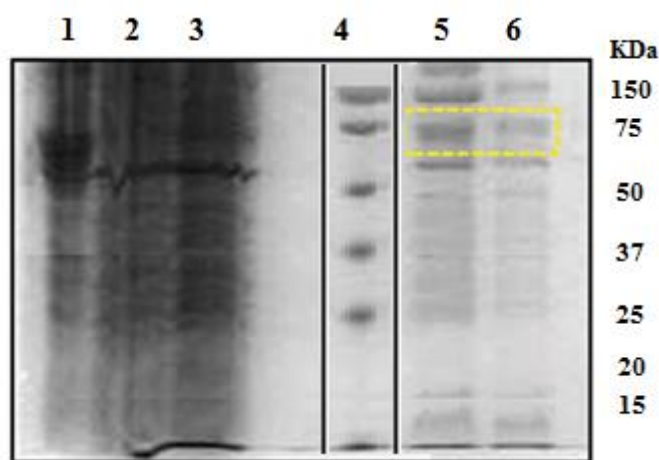


Figure 62 : Analyse par SDS-PAGE (10 %) du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3729 à partir d'une culture de cinq litre. Une bande protéique d'environ 76 kDa qui correspond à la protéine PA3729 est observée dans l'éluât final (pistes 6 et 7). Piste 1: fraction insoluble ; Piste 2: fraction soluble ; Piste 3: fraction non liée ; Piste 4: fraction de lavage ; Piste 5: marqueur de masse moléculaire ; Piste 6: première fraction éluée ; et Piste 7: deuxième fraction éluée. Le cadre jaune indique la protéine PA3729

Dans ces conditions, nous avons réussi à avoir une fraction plus riche en protéine PA3729 que lors de la précédente tentative, mais la pureté de l'échantillon n'était toutefois pas suffisante. Pour tenter de résoudre cette problématique, d'autres étapes d'optimisation ont donc été envisagées.

Afin d'améliorer cette pureté, une purification par chromatographie d'affinité en deux étapes a été réalisée, en utilisant successivement et alternativement deux types de colonnes de nickel : Ni-TED et Ni-NTA. La différence entre ces deux colonnes est le ligand utilisé et de façon corrélée le nombre de liaisons libres pour interagir avec l'étiquette 6xHis : une liaison pour la

colonne Ni-TED, et trois liaisons pour la colonne Ni-NTA. Il est important de mentionner qu'après la première élution, les échantillons ont été dialysés contre le même tampon d'élution mais sans imidazole avant de faire la deuxième purification.

Comparée à une purification en une seule étape, en sortie de la seconde colonne (qu'elle soit de type Ni-TED ou Ni-NTA), la pureté de l'échantillon n'a pas été vraiment améliorée (**Figure 63**).

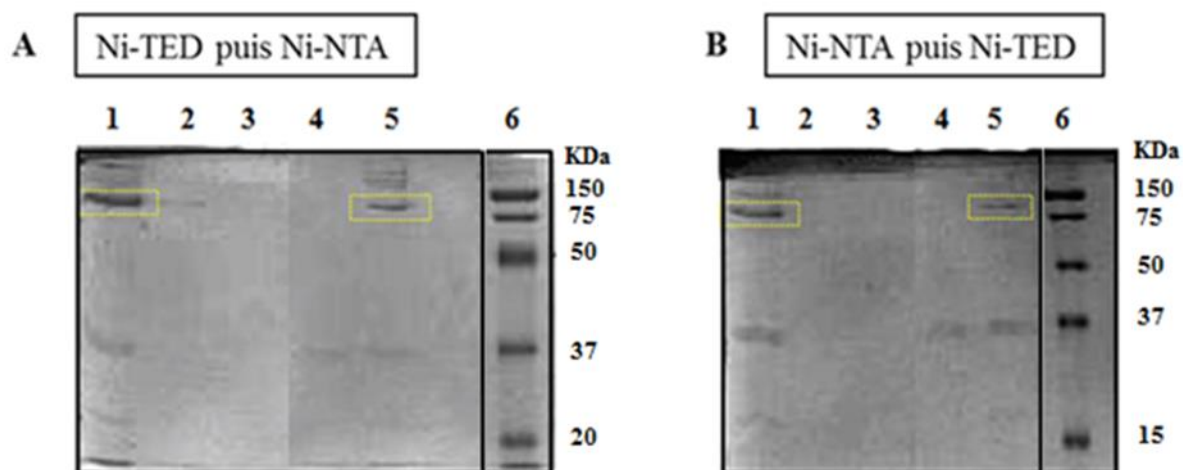


Figure 63 : Analyse par SDS-PAGE du résultat de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3729 en utilisant successivement deux colonnes de nickel (TED et NTA). A : Ni-TED puis Ni-NTA et B : Ni-NTA puis Ni-TED. Piste 1: éluat issue de la première colonne après dialyse ; Piste 2: fraction non liée de la deuxième colonne ; piste 3: fraction de lavage de la deuxième colonne ; Pistes 4 et 5: fractions d'élution ; Piste 6: marqueur de masse moléculaire. Le cadre jaune indique la protéine PA3729

Dans les conditions dites natives, le rendement et la pureté de l'échantillon purifié étaient très faibles, et cela quelles que soit les conditions d'optimisation utilisées. Nous avons donc envisagé de renaturer cette protéine suite à la dénaturation en présence d'urée 6M par différentes méthodes :

- la dialyse en diminuant progressivement la concentration de l'urée ajoutée au tampon A jusqu'à ce qu'elle soit nulle et en vérifiant son élimination par conductimétrie.
- renaturation directement dans la colonne lors de la purification en effectuant plusieurs lavages en présence du tampon A et une concentration de plus en plus faible en urée.
- en diluant la protéine au 1/100^{ème} dans du tampon A goutte par goutte sous agitation.

Malheureusement, pour l'instant, ces différentes approches ne se sont pas avérées efficaces. En effet, une grosse perte de matériel ainsi qu'une précipitation quasi-instantanée de l'échantillon ont été observées lors de ces essais.

Purification de la protéine PA3731

Expression et purification en conditions natives : L'expression de la protéine PA3731 suite à une induction par l'IPTG a été analysée par SDS-PAGE 12.5 % (**Figure 64**).

On peut observer, à partir du gel SDS-PAGE, que la protéine PA3731 (environ 30 kDa), est, elle aussi présente dans la fraction soluble en très faibles quantités (Piste 2). La majeure partie de la protéine se retrouve dans le culot, constitué principalement de corps d'inclusions (Piste 3). Après excision et analyse par spectrométrie de masse, on a pu démontrer que cette bande correspond bien à la protéine PA3731. Cette protéine est aussi identifiée sans ambiguïté avec des scores très importants et notamment un taux de couverture de 75 %.

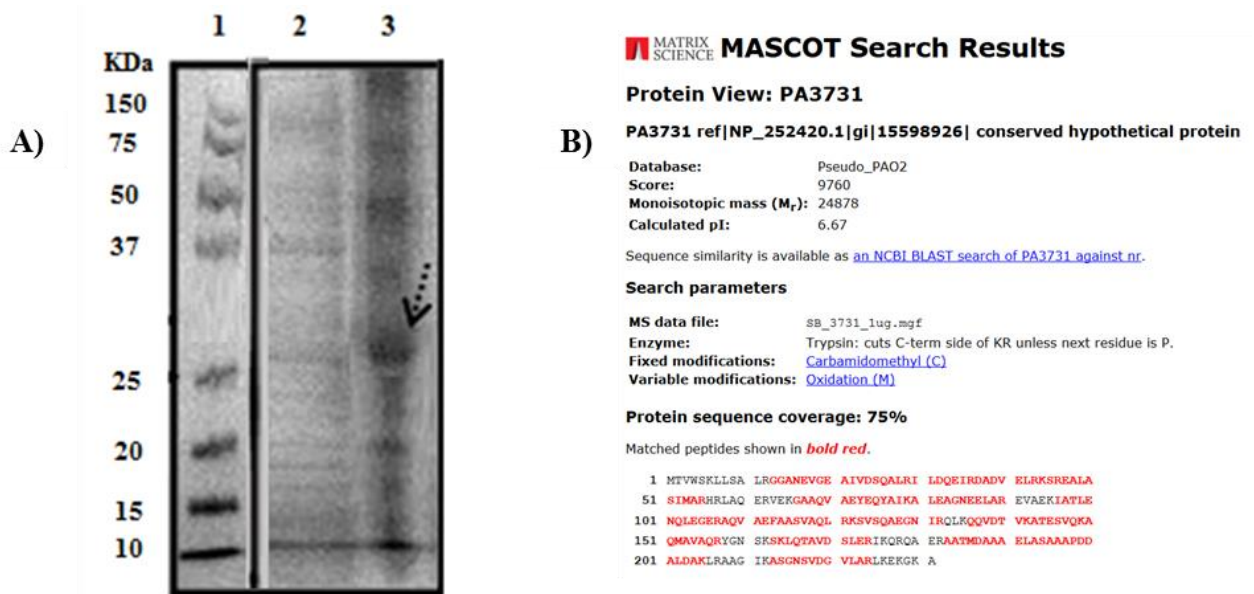


Figure 64 : Analyse par SDS-Page 12.5 % du résultat de la surproduction de la protéine PA3731. A) Piste 1: Marqueurs de poids moléculaire, Piste 2: Protéines solubles, Piste 3: Corps d'inclusion. B) Confirmation de l'identité de la protéine PA3731 par spectrométrie de masse

Optimisation de la purification en conditions natives : Tout comme pour la protéine PA3729, nous avons augmenté le volume de culture (5 L) afin d'accroître le recouvrement en termes de quantité de protéines. Après induction, la purification a eu lieu dans les mêmes conditions natives que précédemment et le résultat de cette purification a été analysé par SDS-PAGE 12.5 % (**Figure 65**).

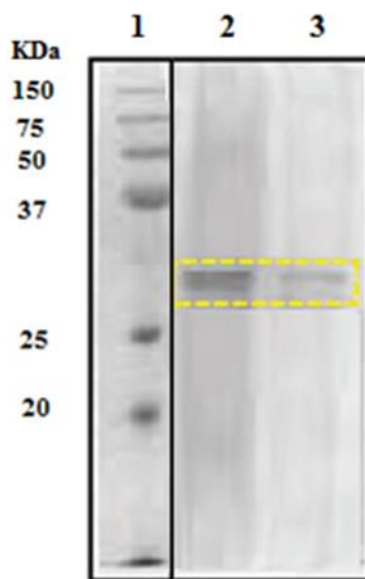


Figure 65 : Analyse par SDS-PAGE (12.5 %) du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3731 à partir d'une culture de cinq litre. Une bande protéique d'environ 30 kDa qui correspond à la protéine PA3731 est observable dans l'éluât final (piste 2 et 3). Piste 1: Marqueurs de masse moléculaire ; Piste 2: Première fraction éluee ; piste 3: Deuxième fraction éluee. Le cadre jaune indique la protéine PA3731

Dans ces conditions et contrairement à ce qui a été observé avec la protéine PA3729, on arrive à avoir une fraction enrichie en protéine PA3731 après purification, avec une bonne pureté. On obtient au final, à partir 5 L de culture, une concentration en protéine PA3731 de 200 µg/mL. Cette concentration est intéressante pour permettre certaines expériences, mais elle doit encore optimisée pour notamment les essais de cristallogénèse.

Purification de la protéine PA3732

Expression et purification en conditions natives : L'expression de la protéine PA3732 suite à une induction par l'IPTG a été analysée par SDS-PAGE, avec un gel de séparation à 15 %, tenant compte de la taille modeste de la protéine (**Figure 66**).

Nous pouvons observer, à partir du gel SDS-PAGE, que la protéine PA3732 (environ 20 kDa), se trouve en grande quantité dans la fraction soluble (Piste 2). Cette protéine est également observée dans les corps d'inclusion en quantité moindre (Piste 3). Après excision et analyse par spectrométrie de masse, on a pu démontrer que cette bande correspond bien à PA3732.

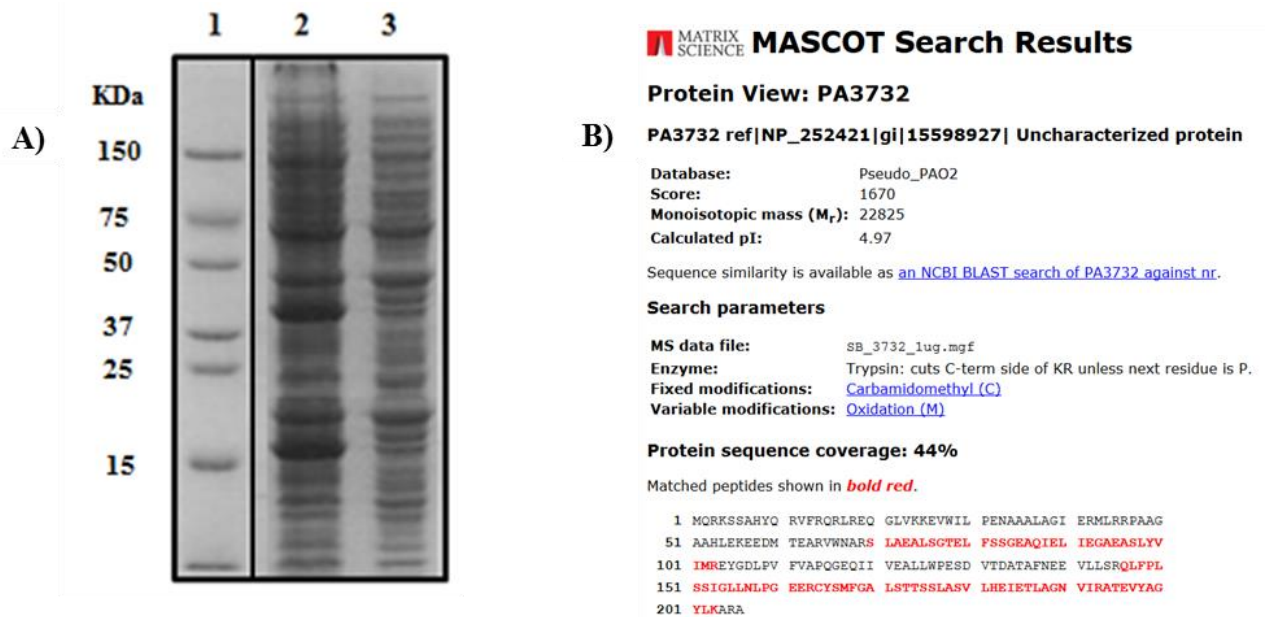


Figure 66 : Analyse par SDS-PAGE (15 %) du résultat de la surproduction de la protéine PA3732. A) Piste 1: Marqueurs de poids moléculaire, Piste 2: Protéines solubles, Piste 3: Corps d'inclusion. B) Confirmation de l'identité de la protéine PA3732 par spectrométrie de masse

Purification en conditions natives : Après induction, les protéines obtenues à partir de 1 L de culture, ont été purifiées dans les mêmes conditions natives que celles décrites précédemment. Le résultat de cette purification a été analysé par SDS-PAGE 15 % (**Figure 67**). On obtient, en partant de 1 L de culture, une concentration en protéine PA3732 de 1 mg/mL.

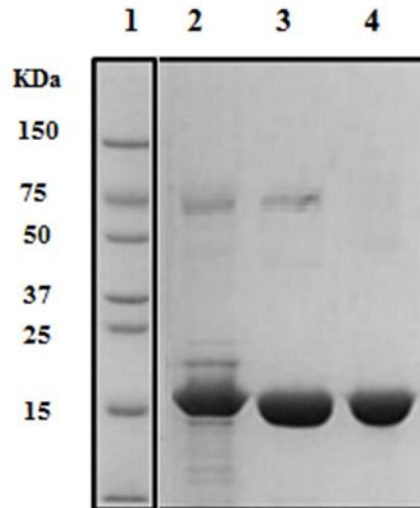


Figure 67 : Analyse par SDS-PAGE (15 %) du résultat de l'optimisation de la purification dans des conditions natives de la protéine PA3732 à partir d'une culture d'un litre. Une bande protéique d'environ 20 kDa qui correspond à la protéine PA3732 est observable dans l'éluât final (piste 2 et 3). Piste 1: marqueur de masse moléculaire ; Piste 2: Première fraction éluée ; Piste 3: Deuxième fraction éluée ; Piste 4: Troisième fraction éluée

On peut noter la présence de la protéine PA3732 purifiée avec une intensité importante et aussi avec une pureté tout à fait satisfaisante dans la dernière fraction éluée.

II.2-Etude interactomique par titrage calorimétrique isotherme (ITC)

Afin d'étudier l'hypothèse avancée quant à l'organisation du système protéique BAC, nous avons entrepris des études d'interaction entre les différents partenaires.

De façon préalable, des analyses bioinformatiques suggèrent en effet de fortes interactions entre certaines de ces protéines en particulier entre PA3729 et PA3730 (score de 0.958) et entre PA3731 et PA3732 (score de 0.971) (**Figure 68**).

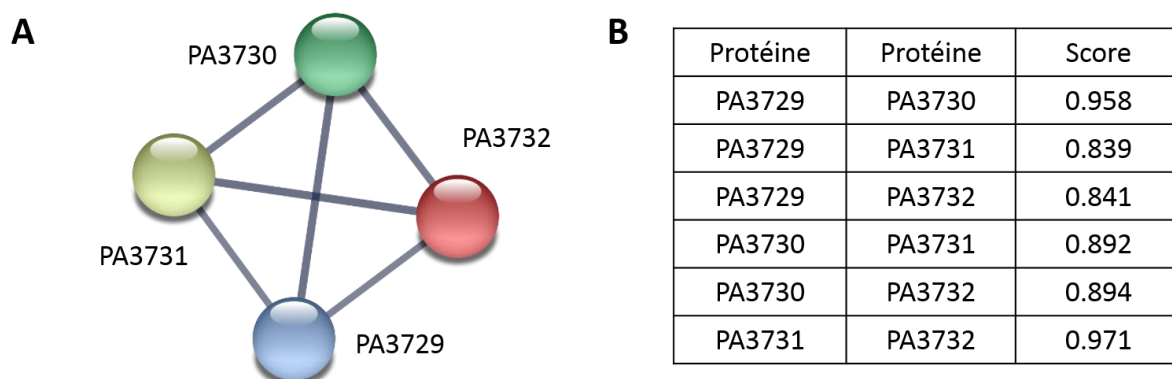


Figure 68 : Prédiction des interactions entre les protéines du système BAC.

(A) : Interactions prédites entre les protéines BAC (B) : Scores attribués à chaque interaction entre les partenaires à l'aide de l'outil STRING (<http://string-db.org/>)

Les protéines PA3731 et PA3732 ayant pu être extraites dans des conditions non dénaturantes et à de bonnes concentrations, cela en fait les premiers candidats intéressants pour des études interatomiques entre elles, mais aussi avec des rhamnolipides.

Pour ces études, nous avons choisi le titrage micro-calorimétrique isotherme (ITC). Cette approche est utilisée dans les études quantitatives d'une grande variété d'interactions biomoléculaires. Elle repose sur une mesure directe de la chaleur libérée ou absorbée durant un événement de liaison entre les biomolécules étudiées. Lorsque cette liaison s'effectue, la chaleur est absorbée ou libérée. Cette action est mesurée par un calorimètre hypersensible au cours d'une titration graduelle du ligand dans la cellule d'échantillonnage contenant la biomolécule étudiée.

La superficie de chaque pic est ensuite intégrée et tracée en fonction du rapport ligand/protéine. L'isotherme qui en résulte peut-être ajustée à un modèle de liaison permettant de déduire l'affinité. Le rapport molaire pris au centre de l'isotherme de liaison donne la stœchiométrie de la réaction.

Dans un premier temps, nous avons étudié la potentielle interaction entre les rhamnolipides et les protéines PA3731 et PA3732.

Lors de l'injection d'une solution de rhamnolipides à 1,7 mM (injection de 10 µL espacées de 240 s) dans une solution de protéine à 0,01 mM (185 µL), les pics observés sont révélateurs d'un phénomène endothermique (**Figures 69A et 70A**). Les données acquises lors des expériences ont été tracées (**Figures 69B et 70B**). Au fur et à mesure de l'ajout rhamnolipides

(augmentation de la concentration), la chaleur d'interaction par mole de rhamnolipides ajoutés tend vers zéro.

Interaction entre les rhamnolipides et PA3731

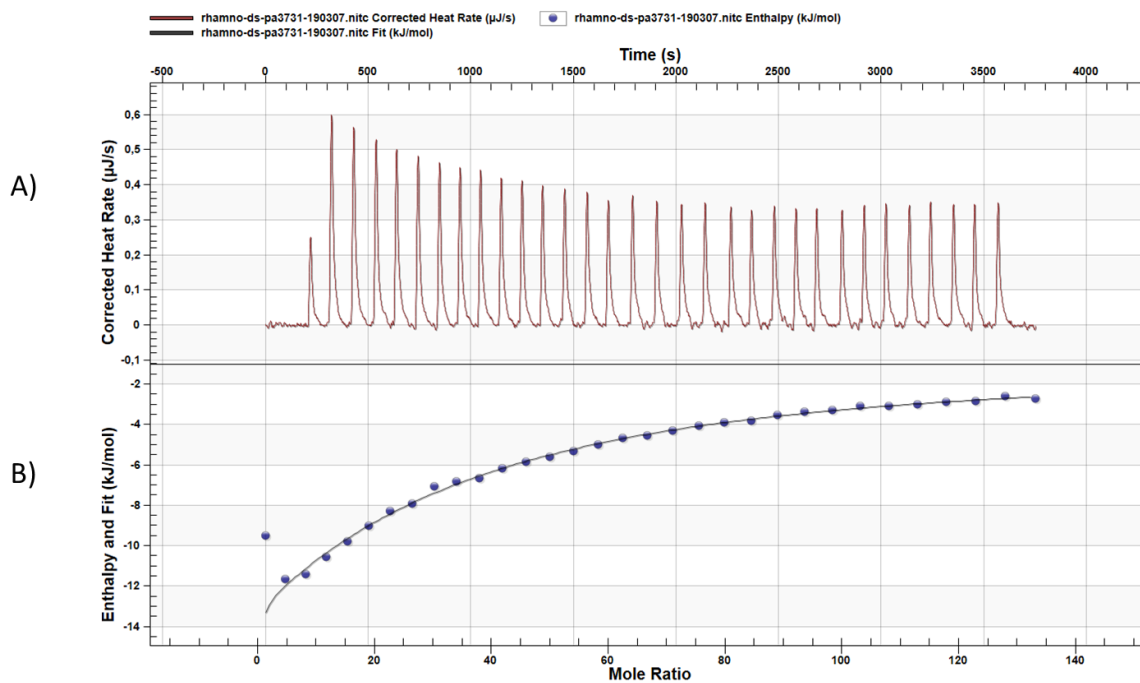


Figure 69 : *Etude de l'interaction entre les rhamnolipides et PA3731. A: Graphique représentant le flux de chaleur obtenu par l'injection d'une solution de rhamnolipides dans une solution de PA3731 à 25 °C. B: Chaleurs d'injection par mole de rhamnolipides injectés en fonction du rapport molaire rhamnolipide / PA3731 dans la cellule du calorimètre*

Interaction entre les rhamnolipides et PA3732

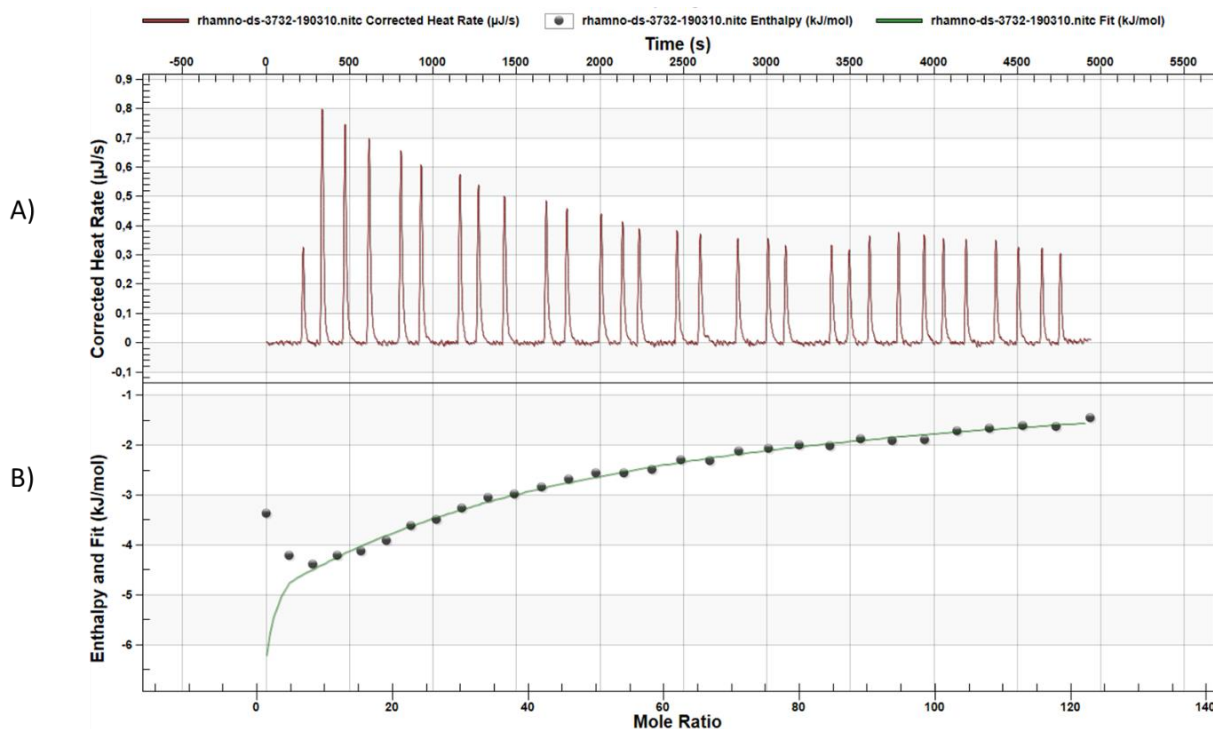


Figure 70 : Etude de l'interaction entre des rhamnolipides et PA3732. A : Graphique représentant le flux de chaleur obtenu par l'injection d'une solution de rhamnolipides dans une solution de PA3732 à 25 °C. B : Chaleurs d'injection par mole de rhamnolipides injectés en fonction du rapport molaire rhamnolipide / PA3732 dans la cellule du calorimètre

Les données calorimétriques expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel NanoAnalyze. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 17**.

Tableau 18 : Paramètres thermodynamiques relatifs à l'interaction entre les rhamnolipides et les protéines PA3731 et PA3732, mesurés par ITC à 25°C

	n	Ka (M ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)
PA3731	[10-14]	7,3 E2	-84	-223
PA3732	[5-10]	1,2 E3	-62	-155

Le nombre de molécules de rhamnolipides liées par mole de protéine (n), l'enthalpie de liaison (ΔH) et l'entropie de liaison (ΔS) sont assez proches dans les deux cas.

Interaction entre PA3731 et PA3732

Les données relatives à la mesure de cette interaction sont présentées ci-dessous.

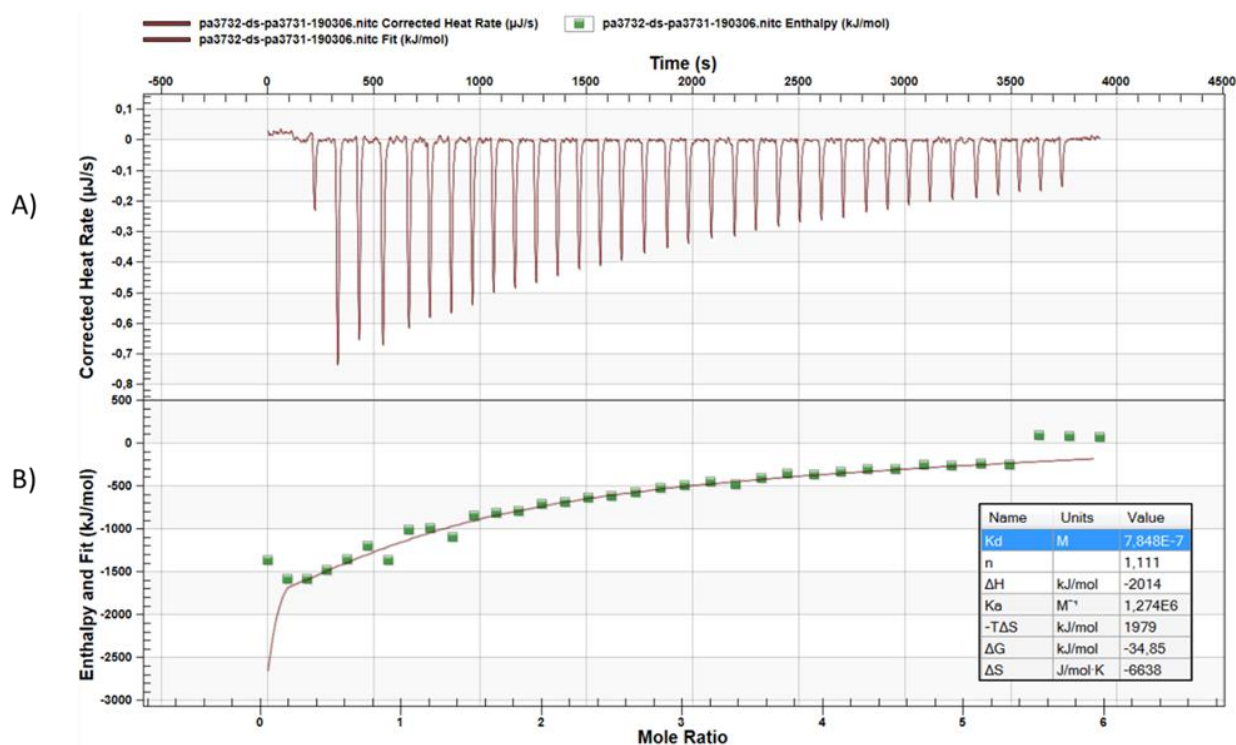


Figure 71 : Etude de l'interaction entre PA3732 (0,01 mM) et PA3731 (0,001 mM). A: Diagramme représentant les flux de chaleur brute obtenus lors des injections successives d'une solution de PA3732 dans une solution de PA3731 à 25 °C. B: Chaleurs d'interaction par mole de PA3732 injectée en fonction du rapport molaire PA3732 / PA3731 dans la cellule du microcalorimètre

Dans ce cas, la réaction est exothermique, avec les pics générés qui sont orientés vers le bas. Le rapport molaire entre PA3731 et PA3732 augmente progressivement au fur et à mesure de la série d'injections. La protéine dans la cellule est progressivement saturée, le nombre de liaisons avec le ligand diminue et la variation de chaleur décroît jusqu'à ce que finalement, la réaction soit arrivée à la saturation.

Les données expérimentales obtenues à l'issue du traitement informatisé montrent une forte constante d'affinité entre ces deux protéines ($K_a=1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) démontrant ainsi les fortes capacités de ces 2 protéines à interagir, et confirmant ainsi les interactions prédites avec l'outil STRING (Figure 71).

III.3-Cristallographie

La protéine PA3732 a pu être extraite dans des conditions non dénaturantes et à des concentrations relativement élevées, ce qui en fait un premier candidat intéressant pour les expériences de cristallogénèse. Il est important de noter que d'après les travaux de compartimentation réalisés au laboratoire, cette protéine est retrouvée dans la membrane externe et dans le secrétome (Ben Mlouka, 2014).

Le défi principal des études structurales de protéines par cristallographie aux rayons X réside dans l'obtention de cristaux à fort pouvoir diffractant à partir d'échantillons purs et homogènes.

Pour cela, des étapes préliminaires doivent être réalisées afin de déterminer si des analyses par cristallographie peuvent être réalisées sur cette protéine. Ainsi, sa stabilité dans le temps et aussi à différentes températures ont été étudiées.

Les gels natifs à 15 % nous permettent de voir que la protéine PA3732 est très stable dans le temps (après une semaine) et à différentes températures (-20°C, 4°C et 25°C) (**Figure 72**).

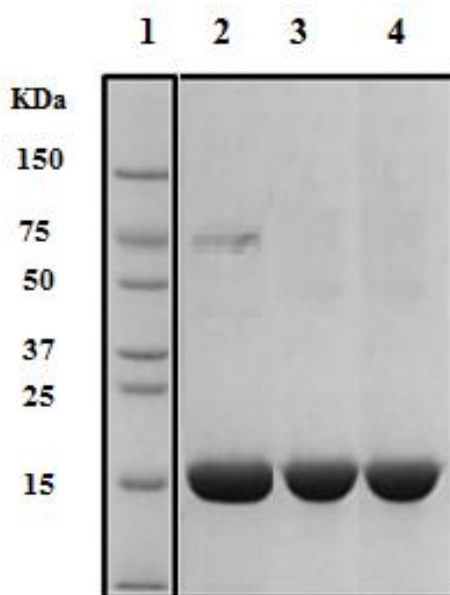


Figure 72 : Analyse par SDS-PAGE (15 %) du résultat de la stabilité après une semaine de stockage à différentes températures de la protéine PA3732. Piste 1: Marqueurs de poids moléculaire, Piste 2: Température ambiante ; Piste 3: 4°C ; Piste 4 : -20°C

Résultats : Etudes interactomiques

Les essais de cristallisation ont été réalisés par l'équipe du Dr Isabelle Broutin (Université Paris Descartes) avec qui nous collaborons, et des cristaux ont été obtenus dans plusieurs conditions. Ces conditions ont ensuite été optimisées en modifiant différents paramètres tels que la concentration en protéine et en agents précipitants.

Plusieurs cristaux issus des différentes conditions ont été montés et analysés sur la ligne de lumière PX1 du synchrotron SOLEIL localisé à Gif sur Yvette (**Figure 73**). Le plus beau cristal (manuelle-25-07-18-A4) nous a permis d'obtenir un jeu de données complet à 3.4 Å de résolution avec comme paramètres de maille $a=68.45$ Å ; $b=68.45$ Å ; $c=281.09$ Å ; $\alpha=90^\circ$; $\beta=90^\circ$ et $\gamma=90^\circ$. Ce résultat est très encourageant, surtout que les cristaux sont très difficiles à monter. Ils sont apparus dans 2M NaCl après plusieurs mois d'équilibration en milieu fermé. Dès qu'on ouvre, la goutte s'évapore et des cristaux de sel apparaissent immédiatement. Il faudra donc essayer de diminuer la concentration en sel pour éviter ce phénomène. Cela va nécessiter d'augmenter la concentration en protéine afin de rester dans la zone de cristallisation (**Figure 74**). Néanmoins, la protéine est très soluble. Les cristaux en 2M NaCl ont été obtenus à une concentration en protéine de l'ordre de 20 mg/ml. Il va donc falloir atteindre des valeurs au moins trois fois plus importantes ce qui va nécessiter de produire la protéine en très grande quantité. Nous espérons que cela permettra d'obtenir un jeu de données à plus haute résolution.

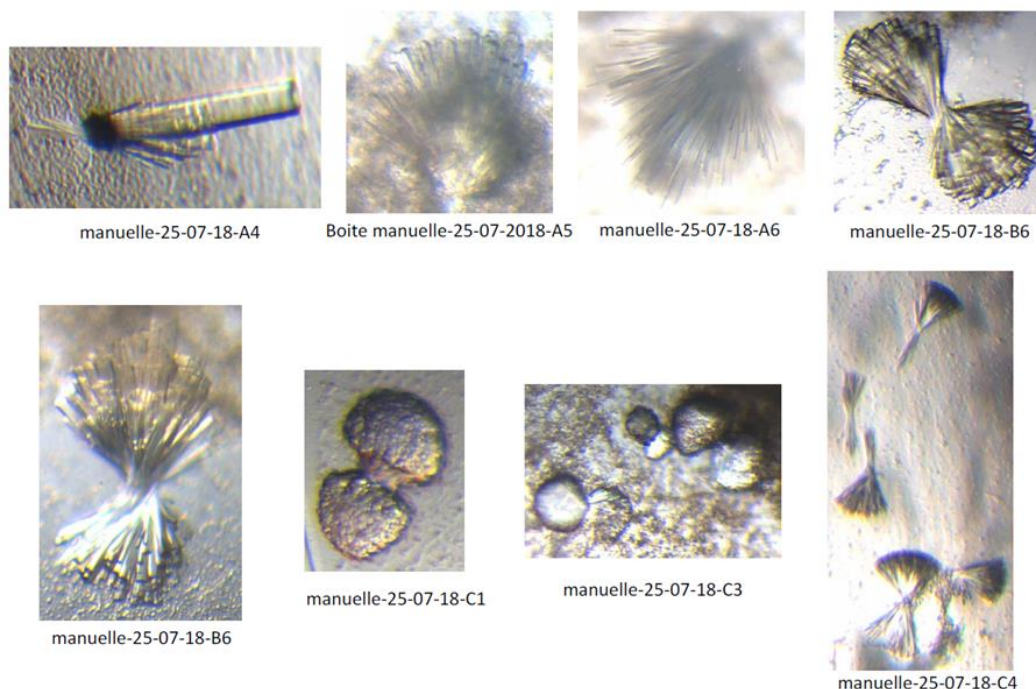


Figure 73 : Cristaux de la protéine PA3732 obtenus après optimisation manuelle

Cependant des essais de résolution de la structure ont été réalisés sur le jeu obtenu à 3,4Å de résolution mais sans succès à ce jour. En effet, la lumière est une onde et l'intensité des taches enregistrées dépend de l'état de phase du faisceau incident au moment de l'interaction avec les plans du cristal. Cette information sur la phase est indispensable pour résoudre une structure. Il existe deux méthodes de phasage, soit par remplacement moléculaire soit par utilisation de dérivés lourds diffractant plus fortement les rayons X du fait de leur nombre plus important d'électrons. Les plus utilisés sont les suivants : platine, or, uranium, sélénium, lanthanides. La première méthode est basée sur l'utilisation d'une structure de protéine connue et proche de la protéine d'étude. Dans notre cas, aucune protéine ne propose de correspondance importante. Un modèle a été construit sur la base de structures de protéines de séquence proche mais le pourcentage d'homologie est faible et ce modèle n'a pas été suffisant pour obtenir des phases exploitables.

Il va donc falloir utiliser la deuxième méthode. Pour ce faire, de nouveaux cristaux devront être obtenus et enregistrés en introduisant un des atomes lourds listés au-dessus. Il est également possible de produire la protéine dans un milieu de culture enrichi en sélénométhionine et appauvri en méthionine afin d'incorporer des atomes de sélénium directement sur la protéine. Cette technique est très utilisée, mais le taux d'expression de la protéine modifiée est parfois inférieur à celui de la protéine native. Toutes les approches sont donc envisagées pour la suite de cette étude.

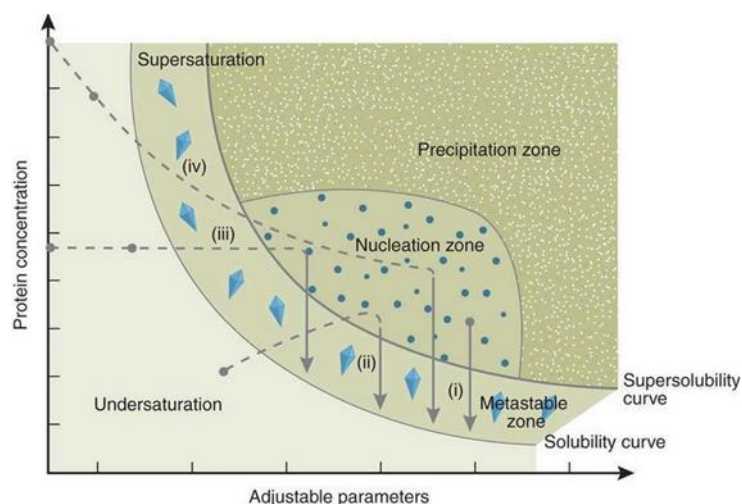


Figure 74 : Théorie et méthode en cristallisation des macromolécules biologiques. La cristallisation est un phénomène impliquant une transition de phase entre l'état en solution et celui cristallin de la protéine. Cette transition est obtenue en variant 2 paramètres à savoir la quantité de protéine et l'agent cristallisant dans le but de franchir la courbe de solubilité de la molécule pour l'amener à cristalliser en évitant sa précipitation. La méthode généralement utilisée est la diffusion de phase vapeur

Discussion générale **et Perspectives**

Pseudomonas aeruginosa (*PA*), autrement connue sous le nom de bacille pyocyanique est une bactérie à Gram négatif qui se développe dans un spectre de températures comprises entre +4°C et +41°C. C'est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans l'environnement, les sols humides et les milieux aquatiques. Elle est aussi présente chez l'homme soit en participant à la flore commensale du tube digestif soit comme organisme saprophyte au niveau de cavités naturelles telles que les conduits auditifs externes ou le tractus génital. Cette bactérie est capable de profiter de l'affaiblissement du système immunitaire de l'hôte pour l'infecter (Landry et al., 2006). On parle alors de pathogène opportuniste. Elle est également fortement impliquée dans les infections pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose. En effet, *PA* est présente chez environ 70% des malades (Mah et al., 2003).

Une des spécificités de *PA* est sa forte capacité à se développer sous la forme de biofilm (Mah et al., 2003; Stewart and Costerton, 2001). Les bactéries vont adhérer dans un premier temps à une surface puis produire, lors d'une phase de maturation, une matrice d'exopolymères (des alginates majoritairement). Cette matrice va jouer le rôle d'une barrière physique contre les cellules immunitaires de l'hôte et vis-à-vis des antibiotiques, créer des micro-environnements en son sein, conférant ainsi à la bactérie un phénotype particulièrement résistant.

A ce jour, un nombre relativement limité de systèmes moléculaires ont été décrits comme impliqués spécifiquement dans la formation de biofilm. Ceci est aussi relié au caractère relativement récent des investigations menées sur les biofilms bactériens.

Dans ce contexte d'infection, *PA* est capable de déployer un large éventail de facteurs de virulence (exotoxines, élastases, phospholipases...).

Au sein de notre laboratoire, une analyse protéomique différentielle a permis de démontrer, en 2004, par une analyse en composante principale, l'existence un protéome spécifique quand la bactérie se développe en mode biofilm. Cette étude a ainsi permis d'identifier une quarantaine de protéines spécifiquement accumulées lorsque les bactéries adhèrent à une surface (Vilain et al., 2004b). Des études phénotypiques réalisées sur des bactéries mutées sur les gènes codant certaines de ces protéines ont permis d'identifier un clone muté sur le gène *pA3731*. Ce clone présentait un phénotype intéressant puisqu'incapable de former un biofilm en plaque 96 puits, présentant une virulence atténuée, une plus grande résistance à la tobramycine et une mobilité de type swarming fortement altérée, associée à une forte diminution de la production de rhamnolipides (Macé et al., 2008).

Discussion générale et perspectives

Des recherches bioinformatiques ont montré que le gène *pA3731* appartient à un cluster de 4 gènes allant de *pA3729* à *pA3732*, gènes qui pourraient être impliqués dans l'élaboration et/ou la régulation d'un même système protéique. Cette hypothèse a constitué le point de départ de ce travail de thèse.

Les études phénotypiques réalisées sur les 4 mutants Δbac confirment les observations faites sur le mutant $\Delta pA3731$ par Camille Macé (Macé et al., 2008). Ainsi, nous avons confirmé une augmentation de la résistance aux aminosides chez ces clones, associée avec une plus forte sensibilité au chloramphénicol, à la ciprofloxacine et à l'imipénème.

De même, nous observons une baisse significative de la production de rhamnolipides, qui conduit à une diminution de la mobilité de type swarming, sauf pour le mutant $\Delta pA3729$.

Ce comportement particulier du mutant $\Delta pA3729$ est retrouvé au niveau de l'adhésion bactérienne puisque hormis ce clone, les autres mutants Δbac voient leur capacité à adhérer sur des support biotique et abiotique. Fait intéressant, la complémentation du milieu de culture après 12h d'incubation, par des concentrations croissantes de rhamnolipides exogènes restaurent la capacité des mutants à former un biofilm, confirmant i) le rôle des rhamnolipides dans l'établissement du biofilm, ii) la spatiotemporalité de leur action. L'addition exogène de ces biosurfactants inhibe les phases initiales de l'adhésion (Nickzad and Déziel, 2014; Pamp and Tolker-Nielsen, 2007), et iii) que le phénotype observé chez les mutants est bien dû à leur faible production de rhamnolipides.

Overhage et ses collaborateurs (Overhage et al., 2008) ont également montré une relation étroite entre la capacité des bactéries à se déplacer *via* le swarming et leur sensibilité à la ciprofloxacine (**Figure 75**).

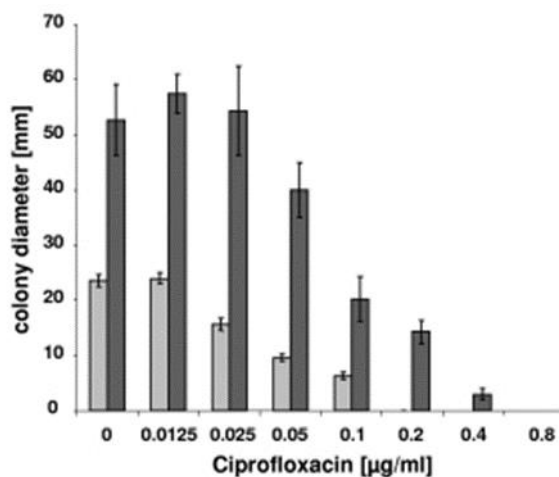


Figure 75 : *Mesure du diamètre d'une colonie de PAO1 cultivée en condition de swarming (gris foncé) ou en condition de swimming (gris clair) en présence de différentes concentrations en antibiotiques*

Nous résultats viennent donc confirmer cette observation. Le swarming est donc un mécanisme complexe qui confère aux bactéries un avantage dans les processus de colonisation (Overhagde et al 2008) et de résistance aux inhibiteurs.

La protéine PA3729 étant prédite comme localisée dans la membrane externe, on peut expliquer l'absence de phénotype particulier chez le mutant par un possible recrutement d'une autre protéine de la membrane externe, à l'instar de ce qui a été décrit par exemple pour la pompe d'efflux MexJK-OprM (Chuanchuen et al., 2005) où OpmH peut se substituer à OprM, OprM pouvant être aussi mobilisée par d'autres pompes comme MexJK, MexMN, MexVW ou MexXY (Lister et al., 2009).

Les études protéomiques réalisées ensuite sur ces mutants sont venues confirmer l'incidence de chacune des mutations sur le protéome bactérien, ainsi que l'importance des conditions de culture sur cette incidence. Ces études ont également permis d'identifier 157 protéines dont la quantité est simultanément altérée chez les quatre mutants dans au moins une condition expérimentale. Parmi celles-ci, quarante protéines présentent le même comportement chez les 4 mutants et dans les trois conditions expérimentales. C'est en mode biofilm et en phase stationnaire que le nombre de ces protéines présentant le même comportement est le plus grand. Cette observation confirme l'implication du système BAC dans le mode de vie biofilm, et met en évidence des similarités entre les physiologies des bactéries sessiles et en phase stationnaire de croissance, ce qui a déjà été observé (Singh et al., 2017).

Quelles que soient les conditions de culture, c'est-à-dire planctonique (phases exponentielle et stationnaire) et biofilm, tous les mutants Δbac sous-expriment MexS et MexT et la pompe d'efflux MexEF-OprN. La sous-expression de MexE et OprN est en accord avec l'hyper-susceptibilité des mutants au chloramphénicol et à la ciprofloxacine (Juarez et al., 2018). Cette régulation négative de la pompe MexEF-OprN peut être expliquée ici par la sous-expression de MexT. Nous avons également observé une baisse de la quantité de MexS chez les mutants. Initialement décrite comme un répresseur de *mexT* (Jin et al., 2011), l'inactivation de *mexS* a été associée à la sur-expression de la pompe MexEF-OprN (Sobel et al., 2005). Cependant, Kohler et ses collaborateurs (Köhler et al., 1999) ont montré que les expressions de MexS et MexEF-OprN sont concomitantes, en accord donc avec nos observations. En outre, chez la souche PAO1, la fonctionnalité de MexS fait l'objet d'un débat. Pour certains, MexS est fonctionnel (Jin et al., 2011), pour d'autre non (Maseda et al., 2000). En effet, MexS de PAO1 diffère de celle de PA14 par la substitution d'une asparagine en position 249 par un aspartate (Jin et al., 2011).

Une hypersensibilité aux aminosides et aux β -lactamines est observée chez les mutants *nfxc* (Li et al., 2000). Elle a été attribuée respectivement à une faible expression des pompes MexXY-OprM et MexAB-OprM (Li et al., 2000). Les mutants Δbac présentent bien ici une résistance à la tobramycine, qui est indépendante de l'expression de la pompe MexXY-OprM, puisque ni OprM, ni MexX ni MexY, voient leurs quantités modifiées chez ces souches. Ceci suggère que ce phénotype est médié par un autre mécanisme qu'il reste à caractériser. Ce dernier pourrait impliquer la glutathione S-transferase (PA2813) qui est sous-exprimée chez les mutants *bac*. Les Glutathione transférases bactériennes sont en effet impliquées dans la détoxification de nombreuses molécules toxiques dont les agents antibactériens (Allocati et al., 2009). Ces protéines catalysent la conjugaison de l'atome de soufre du glutathion à une grande variété de composés électrophiles d'origine endobiotique et xénobiotique. Elles sont également impliquées dans la liaison intracellulaire et le transport de composés hydrophobes. Elles semblent aussi jouer un rôle important dans la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes et pourraient avoir une implication dans l'élimination des hydroperoxydes organiques. Il a été montré chez *Proteus mirabilis* que son inactivation induit une sensibilité au chloramphénicol (Perito et al., 1996).

Le fait qu'aucune modification de la susceptibilité à la ceftazidime ne soit observée chez les mutants *bac* est en accord avec l'absence d'altération de l'expression de la pompe MexAB-OprM.

De même, l'accumulation de la porine OprD chez les quatre mutants explique leur hypersensibilité à l'imipénème, l'altération qualitative ou quantitative de la porine OprD étant la principale cause de la résistance de *PA* aux carbapénèmes (Castanheira et al., 2014).

L'ensemble de observations phénotypiques nous conduisent à attribuer aux mutants Δbac un phénotype que l'on pourrait dénommer *nfxC* négatif, accompagné d'une déficience dans la production de rhamnolipides comme les mutants *nfxC* (Köhler et al., 2001).

La question concerne maintenant la fonction de ce système BAC, dont les quatre protéines sont de fonction inconnue. Alors que PA3729 est prédite comme localisée dans la membrane externe, PA3730 et PA3732 seraient des protéines de la membrane cytoplasmique. Quant à PA3731, sa structure est prédite avec un énorme domaine hélicoïdal (88% de la protéine) (<http://www.predictprotein.org>), ce qui est très rare chez les procaryotes (Dworkin et al., 2000). La séquence de cette protéine de 29,5 kDa, affiche un motif très proche des protéines constituant la famille des PspA/IM30 qui possèdent 4 domaines en hélice alpha. Le système Psp est conservé chez de nombreuses bactéries Gram négatif. Il fait partie de ces systèmes de réponse aux stress extra-cytoplasmiques. Tout comme pour les systèmes Psp, nous avons trouvé en amont du gène *pA3732*, en position -24 et -12, un site de fixation au facteur de transcription σ^{54} (RpoN). Par contre, contrairement aux systèmes *psp* qui sont tous pluricistroniques, le cluster *pA3729-pA3732* est mono-cistronique. De plus, contrairement à la protéine PspA d'*E. coli*, la protéine PA3731 n'est pas accumulée lors d'un choc chaud (Macé et al., 2008).

Le système Psp peut être induit par une multitude de stress. Parmi ceux-ci, nous pouvons noter une induction par un bactériophage filamenteux, un choc de température, un blocage de la machinerie de sécrétion Sec et Tat, et une inhibition de la synthèse des lipides (Darwin, 2005; Kobayashi et al., 2007). Cette induction du système provoque une dissipation de la force protomotrice (PMF) qui pourrait jouer le rôle de signal d'induction de la réponse Psp. Plusieurs rôles physiologiques ont été attribués au système Psp: la survie en phase stationnaire et dans les conditions de pH basique (pH 9). En absence de PspA, les cellules meurent plus rapidement

dans ces conditions. Néanmoins, il semble qu'il ne soit pas impliqué, contrairement au système Bac, dans la formation de biofilm (Beloin et al., 2004).

PspB et PspC seraient des senseurs de stress extra-cytoplasmiques (Darwin, 2005). La protéine PspA est distribuée entre le cytoplasme et la membrane interne (Elderkin et al., 2005) et contrôle négativement l'opéron *psp*. L'expression de PspA est sous le contrôle de RpoN dont on connaît déjà le rôle dans la formation des biofilms (Thomson et Bonomo, 2005). La protéine PspA a également été localisée chez *Pseudomonas fluorescens* dans un cluster de gènes codant pour un système de sécrétion de la lipase par des transporteurs ABC (Kawai et al., 1999).

Une hypothèse serait que le système BAC soit un système de transduction de signal ou de sécrétion, impliquant donc quatre protéines ; BAC A (PA3732), BAC B (PA3731), BAC C (PA3730) et BAC D (PA 3729).

La protéine de la membrane externe BAC D pourrait être impliquée dans la transduction du signal vers les 2 protéines membranaires à savoir BAC C et BAC A qui interagiraient, elles-mêmes, avec BAC B. Le signal serait transféré à partir de la membrane externe vers les protéines de la membrane interne qui vont alors interagir avec PA3731. (**Figure 76**).

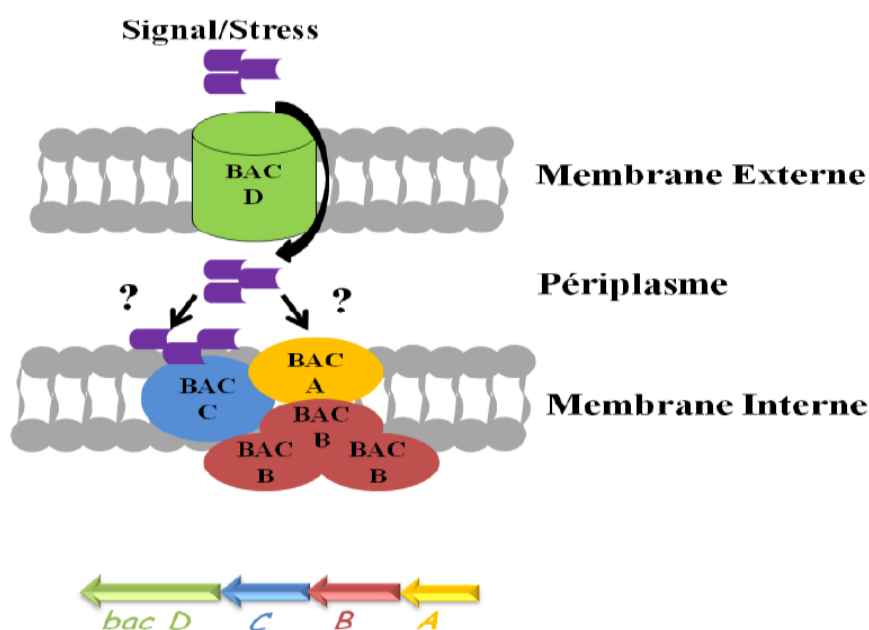


Figure 76 : Hypothèse sur l'organisation du système BAC dans la transduction d'un signal de stress

Ce système pourrait aussi être également un système de sécrétion des rhamnolipides. La synthèse et la sécrétion des rhamnolipides étant à ce jour mal connues, on peut imaginer que comme pour les cardiolipides, l'assemblage ait lieu au niveau de la membrane interne avant un transfert vers le milieu extracellulaire (Huijbregts et al., 1996). Une fois synthétisés, les

rhamnolipides ou cardiolipides sont transportés vers la membrane externe. Certaines études ont montré que le système de transport des phospholipides, tels que les cardiolipides, est un mécanisme de transport proche des mécanismes impliqués dans le transport des protéines et des LPS. Ce mécanisme impliquerait deux protéines chaperonnes qui assurent le transfert des phospholipides entre les deux membranes par le biais de protéines membranaires et périplasmiques (Tai and Kaplan, 1985).

Dans cette hypothèse, on peut imaginer une organisation moléculaire suivante :

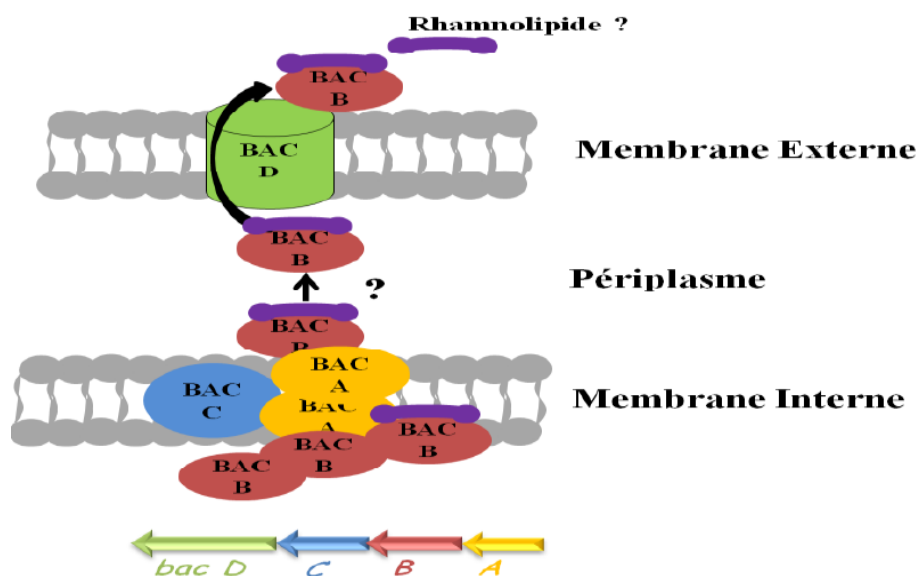


Figure 77 : Hypothèse sur l'organisation du système BAC dans la sécrétion des rhamnolipides

A noter qu'Amine Ben Mlouka, au cours de sa thèse (Ben Mlouka, 2014), a observé que la protéine BAC B est la seule protéine du système BAC qui est présente en quantité importante dans tous les compartiments cellulaires. Ceci renforce l'hypothèse que BAC B pourrait jouer un rôle de protéine chaperonne.

Nos études interactomiques par analyses ITC ont permis renforcer ces hypothèses, en mettant en évidence une forte interaction entre BAC B et BAC A. De même, nous avons montré une forte interaction entre BAC B et les rhamnolipides, ce qui renforce l'hypothèse concernant le rôle de ce système dans la sécrétion de ces biosurfactants. Des expériences futures réalisées sur l'ensemble des protéines BAC devraient nous permettre de confirmer ou pas ces prédictions de modèles. De même des essais de cristallographie en cours devraient nous permettre d'apporter quelques informations sur la structure des protéines BAC en particulier dans un premier temps de BAC A dont les premiers cristaux ont été obtenus.

Discussion générale et perspectives

Des résultats contradictoires sont observés quelquefois dans les analyse protéomiques des extraits extracellulaires, et les phénotypes observés. Ainsi, nous observons dans ces extraits une accumulation des protéines impliquées dans le QS (systèmes Las et Rhl) chez les mutants *bac* par rapport à la souche sauvage. Cette observation est en totale contradiction avec le phénotype « biofilm négatif » de ces mutants, le QS étant connu comme fortement impliqué dans la formation du biofilm. De même, nous observons l'accumulation des protéines codées par les clusters des gènes *pA0079-pA0090* et *pA2363-pA2366*. Les protéines correspondantes sont impliquées dans la structure du système de sécrétion de type 6, système connu pour être un acteur majeur de ce mode de vie sessile (Gallique et al., 2017; Mougous et al., 2006).

Une accumulation des protéines RelA (PA0934) et SpoT (PA5338) est aussi observée. Or, ces protéines régulent positivement les protéines du QS et des clones mutés sur les gènes correspondant ne forment pas de biofilm (Vogt et al., 2011).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces divergences.

Une première hypothèse serait de supposer que ces protéines seraient mal repliées chez les mutants et évacuées hors de la cellule par des vésicules de la membrane externe (« outer membrane vesicles » OVMs) (Kulp and Kuehn, 2010; Manning and Kuehn, 2011). Comme beaucoup de bactéries Gram négatif, *PA* libère en effet des OVMs (Beveridge, 1999; Hoekstra et al., 1976), nanoparticules sphériques d'un diamètre compris entre 10 à 300 nm. L'une des fonctions des OVMs la mieux étudiée est le transport intercellulaire de facteurs de virulence et autres molécules dans les cellules de l'hôte. Ces OMVs ont également été identifiées comme une voie de réponse au stress environnemental. De même, certaines conditions de stress affectant l'enveloppe cellulaire peuvent entraîner l'accumulation d'agrégats de protéines endommagées ou mal repliées dans le périplasme des bactéries Gram négatif qui sont évacuer hors de la cellule par ces OMVs (McBroom et al., 2006).

Une autre hypothèse serait que les protéines sécrétées pourraient être modifiées post traductionnellement.

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) permettent aux cellules de réguler leur métabolisme et leur physiologie, et de répondre rapidement aux changements environnementaux (Deutscher et al., 2014; Mijakovic et al., 2016). Bien qu'elles ne soient pas aussi bien étudiées chez les procaryotes que chez les eucaryotes, il est maintenant admis que

les micro-organismes sont capables de modifier leurs protéines avec une vaste gamme de modifications jouant un rôle important dans la virulence et la physiologie (métabolisme, adaptation, résistance aux antibiotiques...) (Cain et al., 2014). Les MPTs interviennent dans l'adaptation et la survie, via la réponse aux stimuli environnementaux (Hentchel and Escalante-Semerena, 2015; Mijakovic et al., 2016). Les MPTs des protéines de surface jouent également un rôle crucial dans les interactions hôte-pathogène (Wu et al., 2008). De plus, lors de l'infection, les bactéries utilisent des modifications (phosphorylation, glycosylation, adénynylation, N-acétylation et O-acétylation) pour affecter la stabilité et l'activité des protéines de l'hôte (GTPases, MAP kinases...) afin d'assurer leur survie (Ribet and Cossart, 2010; Trosky et al., 2007).

Nous observons chez les mutants Δbac une accumulation de la flagelline de type B (FliC), ce qui semble contradictoire avec l'absence de swarming et la faible capacité à adhérer chez ces souches. Il est possible que FliC bien qu'accumulée ne porte pas les modifications nécessaires, cette protéine pouvant être phosphorylée, N ϵ -acétylée et succinylée (Gaviard et al., 2018; Ouidir et al., 2015; Ravichandran et al., 2009). Cependant, l'absence de phosphorylation sur T27 et S28 dans un domaine conservé N-terminal de FliC n'affecte pas le swimming chez PAO1 (Suriyanarayanan et al., 2016).

L'étude des modifications post-traductionnelles chez ces protéines extraites du milieu extracellulaire et cellulaires devraient permettre de lever ces questionnements dans un futur proche.

Enfin, les tests d'adhésion ont été réalisées en plaque 24 puits après 6 h de culture alors que les analyses protéomiques ont été effectuées à partir de biofilms formés sur de la laine de verre. Cette différence de mode de culture peut expliquer les résultats obtenus. On sait qu'en effet que la nature du support influe sur le protéome « biofilm » (Vilain et al., 2004b). En outre, on peut penser que les biofilms âgés de 48 h sont matures (Rasamiravaka et al., 2015), alors qu'à 6 h, nous sommes encore dans les phases précoces de la formation du biofilm. Cette différence dans la phase de formation du biofilm pourrait expliquer l'accumulation des molécules du QS observées par la protéomique. Il serait donc intéressant de reproduire nos analyses protéomiques sur des biofilms de 6 h formés en plaques 96 puits.

Conclusion

Les présents travaux avaient pour objectif une meilleure caractérisation du système protéique BAC, impliquant les protéines codées par le cluster des gènes *pA3729-pA3732*. L'objectif était en particulier d'évaluer l'implication de ce système dans la formation de biofilm, la sécrétion de rhamnolipides, la mobilité et la résistance de la bactérie aux antibiotiques.

Dans un premier temps, des tests phénotypiques réalisés sur les souches mutantes ont permis de confirmer le rôle du système BAC dans la formation de biofilm, dans la production de rhamnolipides, dans la mobilité de type swarming et dans la résistance bactérienne (augmentation de la résistance aux aminosides chez ces clones, associée avec une plus forte sensibilité au chloramphénicol, à la ciprofloxacine et à l'imipénème).

De même, il a été confirmé le rôle des rhamnolipides dans l'établissement du biofilm et dans la mobilité de type swarming. Leur implication a également été observée dans la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Les études protéomiques réalisées ensuite sur ces mutants ont montré une régulation négative de la pompe MexEF-OprN. La sous-expression de cette pompe est en accord avec l'hyper-susceptibilité des mutants au chloramphénicol et à la ciprofloxacine.

De même, ces études ont mis en évidence l'implication du système BAC dans la régulation du Quorum Sensing.

Des analyses bioinformatiques approfondies suggèrent en outre qu'il existe de fortes interactions entre certaines de ces protéines. Pour initier les études d'interatomiques, la première étape consiste à surproduire et purifier les protéines. Nous avons été en mesure de purifier les protéines PA3731 et PA3732 en grande quantité et avec une pureté satisfaisante, ce qui en a fait des premiers candidats pour des études de calorimétrie. Il a été observé une forte interaction entre ces deux protéines. Par ailleurs, la mise en présence de ces protéines avec des rhamnolipides a également montré une interaction importante entre ces molécules.

Les résultats observés en protéomique et interatomique suggèrent que le système BAC pourrait être un nouveau système de sécrétion, non encore caractérisé, impliqué dans le transport de facteurs de virulence (type rhamnolipides) vers le milieu extérieur.

Enfin, cette étude apporte quelques éléments de réponse sur la fonction du système BAC mais pose aussi beaucoup de questions, en particulier sur les mécanismes moléculaires impliqués, le mode de régulation du système, Les études protéomiques ont également fourni un grand nombre de données. L'analyse présentée ici à proposer un focus sur les protéines différentiellement exprimées chez les mutants Δbac par rapport à la souche sauvage. Nous pourrions envisager d'autres approches comparatives qui pourraient lever le voile sur certains questionnements.

Références **bibliographiques**

Références bibliographiques

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E., and Guyard, C. (2013). Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 21660–21675.
- Adam, E.C., Mitchell, B.S., Schumacher, D.U., Grant, G., and Schumacher, U. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 2102–2104.
- Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R., and Poole, K. (2002). The MexR Repressor of the mexAB-oprM Multidrug Efflux Operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of Mutations Compromising Activity. *J Bacteriol* 184, 4308–4312.
- Akasaka, T., Tanaka, M., Yamaguchi, A., and Sato, K. (2001). Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2263–2268.
- Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E., and Iglewski, B.H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179, 3928–3935.
- Alcorn, J.F., and Wright, J.R. (2004). Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J. Biol. Chem.* 279, 30871–30879.
- Allegrucci, M., Hu, F.Z., Shen, K., Hayes, J., Ehrlich, G.D., Post, J.C., and Sauer, K. (2006). Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J. Bacteriol.* 188, 2325–2335.
- Allen, L., Dockrell, D.H., Pattery, T., Lee, D.G., Cornelis, P., Hellewell, P.G., and Whyte, M.K.B. (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J. Immunol.* 174, 3643–3649.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* 59, 1114–1128.
- Allewelt, M., Coleman, F.T., Grout, M., Priebe, G.P., and Pier, G.B. (2000). Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect. Immun.* 68, 3998–4004.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., and Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J.* 276, 58–75.
- Alm, R.A., and Mattick, J.S. (1997). Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 192, 89–98.
- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., and Maier, R.M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3262–3268.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., and Stewart, P.S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1818–1824.
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C., and Finlay, B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology (Reading, Engl.)* 156, 2271–2282.
- Arevalo-Ferro, C., Reil, G., Görg, A., Eberl, L., and Riedel, K. (2005). Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 87–114.

Références bibliographiques

- Asikyan, M.L., Kus, J.V., and Burrows, L.L. (2008). Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190, 7022–7034.
- Avrain, L., Mertens, P., and Van Bambeke, F. (2013). RND efflux pumps in *P. aeruginosa*: an underestimated resistance mechanism. *Clinical Laboratory International* 26/28.
- Azam, M.W., and Khan, A.U. (2018). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov. Today*.
- Azghani, A.O., Miller, E.J., and Peterson, B.T. (2000). Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung* 178, 261–269.
- 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. *Microbial Pathogenesis* 33, 109–114.
- Bäckhed, F., Normark, S., Schweda, E.K.H., Oscarson, S., and Richter-Dahlfors, A. (2003). Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect.* 5, 1057–1063.
- Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J.M., Madoulet, C., Plotkowski, M.C., Chippaux, C., and Puchelle, E. (1994). Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect. Immun.* 62, 4481–4487.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., and Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–20.
- Ball, G., Viarre, V., Garvis, S., Voulhoux, R., and Filloux, A. (2012). Type II-dependent secretion of a *Pseudomonas aeruginosa* DING protein. *Res. Microbiol.* 163, 457–469.
- Ballister, E.R., Lai, A.H., Zuckermann, R.N., Cheng, Y., and Mougous, J.D. (2008). In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3733–3738.
- Balloy, V., Verma, A., Kuravi, S., Si-Tahar, M., Chignard, M., and Ramphal, R. (2007). The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 196, 289–296.
- Bally, M., Ball, G., Badere, A., and Lazdunski, A. (1991). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the *xcpA* gene encodes an integral inner membrane protein homologous to *Klebsiella pneumoniae* secretion function protein PulO. *J. Bacteriol.* 173, 479–486.
- Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., and Tommassen, J. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven *xcp* genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol. Microbiol.* 6, 1121–1131.
- Banerji, S., and Flieger, A. (2004). Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 522–525.
- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11076–11081.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., and Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 389, 1017–1031.
- Barbieri, J.T., and Sun, J. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152, 79–92.

Références bibliographiques

- Barclay, M.L., Begg, E.J., and Chambers, S.T. (1992). Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1951–1957.
- Bardoel, B.W., van der Ent, S., Pel, M.J.C., Tommassen, J., Pieterse, C.M.J., van Kessel, K.P.M., and van Strijp, J.A.G. (2011). *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog.* 7, e1002206.
- Barequet, I.S., Ben Simon, G.J., Safrin, M., Ohman, D.E., and Kessler, E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* LasA protease in treatment of experimental staphylococcal keratitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1681–1687.
- Barequet, I.S., Habot-Wilner, Z., Mann, O., Safrin, M., Ohman, D.E., Kessler, E., and Rosner, M. (2009). Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* staphylolysin (LasA protease) in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endophthalmitis in a rat model. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 247, 913–917.
- Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., and Vasil, M.L. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol. Microbiol.* 53, 1089–1098.
- Beare, P.A., For, R.J., Martin, L.W., and 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., and Mattick, J.S. (2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184, 3605–3613.
- Becnel, L.B., and McKenna, N.J. (2012). Minireview: progress and challenges in proteomics data management, sharing, and integration. *Mol Endocrinol* 26, 1660–1674.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., et al. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51, 659–674.
- Belyy, A., Santecchia, I., Renault, L., Bourigault, B., Ladant, D., and Mechold, U. (2018). The extreme C-terminus of the *Pseudomonas aeruginosa* effector ExoY is crucial for binding to its eukaryotic activator, F-actin. *J. Biol. Chem.*
- Bernier, S.P., Ha, D.-G., Khan, W., Merritt, J.H., and O’Toole, G.A. (2011). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res. Microbiol.* 162, 680–688.
- Berry, M.C., McGhee, G.C., Zhao, Y., and Sundin, G.W. (2009). Effect of a waaL mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 80–87.
- Berube, B.J., Murphy, K.R., Torhan, M.C., Bowlin, N.O., Williams, J.D., Bowlin, T.L., Moir, D.T., and Hauser, A.R. (2017). Impact of Type III Secretion Effectors and of Phenoxycetamide Inhibitors of Type III Secretion on Abscess Formation in a Mouse Model of *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
- Beveridge, T.J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181, 4725–4733.
- Bharali, P., Saikia, J.P., Ray, A., and Konwar, B.K. (2013). Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: a novel chemotaxis and antibacterial agent. *Colloids Surf B Biointerfaces* 103, 502–509.

- Biemann, K. (1988). Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry* 16, 99–111.
- Bier, M. (1998). Recycling isoelectric focusing and isotachopheresis. *ELECTROPHORESIS* 19, 1057–1063.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 3–8.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 534–543.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* 57, 1210–1223.
- Boulette, M.L., Baynham, P.J., Jorth, P.A., Kukavica-Ibrulj, I., Longoria, A., Barrera, K., Levesque, R.C., and Whiteley, M. (2009). Characterization of alanine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and its importance for proliferation in vivo. *J. Bacteriol.* 191, 6329–6334.
- Brauner, J.M., Groemer, T.W., Stroebel, A., Grosse-Holz, S., Oberstein, T., Wiltfang, J., Kornhuber, J., and Maler, J.M. (2014). Spot quantification in two dimensional gel electrophoresis image analysis: comparison of different approaches and presentation of a novel compound fitting algorithm. *BMC Bioinformatics* 15, 181.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R., and Häussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J. Bacteriol.* 187, 3630–3635.
- Brenic, A., and Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.* 72, 612–632.
- Brenic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and 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.
- Britigan, B.E., Roeder, T.L., Rasmussen, G.T., Shasby, D.M., McCormick, M.L., and Cox, C.D. (1992). Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *J. Clin. Invest.* 90, 2187–2196.
- Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F., and Garin, J. (2007). Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 6, 2139–2149.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., and O'Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology (Reading, Engl.)* 152, 405–418.
- Burrows, L.L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annual Review of Microbiology* 66, 493–520.
- Cadoret, F., Ball, G., Douzi, B., and Voulhoux, R. (2014). Txc, a new type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA7, is regulated by the TtsS/TtsR two-component system and directs specific secretion of the CbpE chitin-binding protein. *J. Bacteriol.* 196, 2376–2386.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q., and O'Toole, G.A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 7351–7361.

Références bibliographiques

- Cain, J.A., Solis, N., and Cordwell, S.J. (2014). Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics* 97, 265–286.
- Cao, L., Srikumar, R., and Poole, K. (2004). MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol. Microbiol.* 53, 1423–1436.
- Carek, P.J., Dickerson, L.M., and Sack, J.L. (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* 63, 2413–2420.
- Carpentier, B., and Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 499–511.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 763–771.
- Castanheira, M., Mills, J.C., Farrell, D.J., and Jones, R.N. (2014). Mutation-driven β -lactam resistance mechanisms among contemporary ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6844–6850.
- Chan, K.-G., Yin, W.-F., and Lim, Y.L. (2014). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain YL84, a Quorum-Sensing Strain Isolated from Compost. *Genome Announc* 2.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B.P., and Faure, K. (2009). Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect. Immun.* 77, 2065–2075.
- Chen, Y.-T., Chang, H.Y., Lu, C.L., and Peng, H.-L. (2004). Evolutionary analysis of the two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Mol. Evol.* 59, 725–737.
- Chiang, P., and Burrows, L.L. (2003). Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185, 2374–2378.
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Nielsen, T.E., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2013). Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2352–2361.
- Chopra, S., Ramkissoon, K., and Anderson, D.C. (2013). A systematic quantitative proteomic examination of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteomics* 84, 17–39.
- Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., and Schweizer, H.P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2133–2136.
- Chung, D.R., Song, J.-H., Kim, S.H., Thamlikitkul, V., Huang, S.-G., Wang, H., So, T.M.-K., Yasin, R.M.D., Hsueh, P.-R., Carlos, C.C., et al. (2011). High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 1409–1417.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2004). The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6194–6199.
- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., and Wolk, D.M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 547–603.
- Clark, M.E., He, Z., Redding, A.M., Joachimiak, M.P., Keasling, J.D., Zhou, J.Z., Arkin, A.P., Mukhopadhyay, A., and Fields, M.W. (2012). Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio*

Références bibliographiques

- vulgaris biofilms: carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state. *BMC Genomics* 13, 138.
- Coggan, K.A., and 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.
- Collet, A., Cosette, P., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Rihouey, C., Lerouge, P., Junter, G.-A., and Jouenne, T. (2008). Impact of rpoS deletion on the proteome of *Escherichia coli* grown planktonically and as biofilm. *J. Proteome Res.* 7, 4659–4669.
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., and Parsek, M.R. (2011). The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens* 7, e1001264.
- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., and Engel, J.N. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect. Immun.* 67, 3625–3630.
- Conrad, J.C., Gibiansky, M.L., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., Stopka, W.G., Zelasko, D.C., Shrout, J.D., and Wong, G.C.L. (2011). Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophys. J.* 100, 1608–1616.
- Cornelis, G.R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop “type III” weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 742–752.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304, 242–248.
- Costerton, J.W. (1999). Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217–221; discussion 237-239.
- Cowell, B.A., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2005). Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 71–76.
- Cox, C.D., and Adams, P. (1985). Siderophore activity of pyoverdinin for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 48, 130–138.
- Cryz, S.J., Pitt, T.L., Fürer, E., and Germanier, R. (1984). Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 44, 508–513.
- Cuzick, A., Stirling, F.R., Lindsay, S.L., and Evans, T.J. (2006). The type III pseudomonas exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production. *Infect Immun* 74, 4104–4113.
- Dacheux, D., Attree, I., and Toussaint, B. (2001). Expression of ExsA in trans Confers Type III Secretion System-Dependent Cytotoxicity on Noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates. *Infect Immun* 69, 538–542.
- Daly, J.A., Boshard, R., and Matsen, J.M. (1984). Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 19, 742–743.
- Dang, H., and Lovell, C.R. (2015). Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 91–138.
- Darwin, A.J. (2005). The phage-shock-protein response. *Mol. Microbiol.* 57, 621–628.

Références bibliographiques

- Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G.W., and Yahr, T.L. (2006). Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca²⁺ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect. Immun.* 74, 3334–3341.
- Dasgupta, T., de Kievit, T.R., Masoud, H., Altman, E., Richards, J.C., Sadovskaya, I., Speert, D.P., and Lam, J.S. (1994). Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. *Infect. Immun.* 62, 809–817.
- Dautin, N., and Bernstein, H.D. (2007). Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 89–112.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., and O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 185, 1027–1036.
- Davies, D.G., and Marques, C.N.H. (2009). A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J Bacteriol* 191, 1393–1403.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.
- Davinic, M., Carty, N.L., Colmer-Hamood, J.A., San Francisco, M., and Hamood, A.N. (2009). Role of Vfr in regulating exotoxin A production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 155, 2265–2273.
- Dekimpe, V., and Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology (Reading, Engl.)* 155, 712–723.
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 149–161.
- Deng, D.M., Buijs, M.J., and ten Cate, J.M. (2004). The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur. J. Oral Sci.* 112, 42–47.
- Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L., and Britigan, B.E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 5777–5784.
- Desai, J.D., and Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64.
- Desvaux, M., Parham, N.J., and Henderson, I.R. (2004). Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* 6, 111–124.
- Desvaux, M., Scott-Tucker, A., Turner, S.M., Cooper, L.M., Huber, D., Nataro, J.P., and Henderson, I.R. (2007). A conserved extended signal peptide region directs posttranslational protein translocation via a novel mechanism. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 59–70.
- Deutscher, J., Aké, F.M.D., Derkaoui, M., Zébré, A.C., Cao, T.N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., and Joyet, P. (2014). The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 231–256.
- Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A., and Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta* 1440, 244–252.

Références bibliographiques

- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., and Rahme, L.G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.* 55, 998–1014.
- Dharmaparakash, A., Mutt, E., Jaleel, A., Ramanathan, S., and Thomas, S. (2014). Proteome profile of a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* SC192 strain in the planktonic and biofilm condition. *Biofouling* 30, 729–739.
- Di Martino, P., Gagnière, H., Berry, H., and Bret, L. (2002). Antibiotic resistance and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* strains from mechanically ventilated patients with pneumonia in intensive care units: comparison with imipenem-resistant extra-respiratory tract isolates from uninfected patients. *Microbes and Infection* 4, 613–620.
- Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Cámara, M., and Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* 50, 29–43.
- Diggle, S.P., Cornelis, P., Williams, P., and Cámara, M. (2006). 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 83–91.
- Dinamarca, M.A., Ruiz-Manzano, A., and Rojo, F. (2002). Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J. Bacteriol.* 184, 3785–3793.
- Dinamarca, M.A., Aranda-Olmedo, I., Puyet, A., and Rojo, F. (2003). Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: evidence from continuous cultures. *J. Bacteriol.* 185, 4772–4778.
- Dobler, L., Vilela, L.F., Almeida, R.V., and Neves, B.C. (2016). Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *N Biotechnol* 33, 123–135.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., and Alice, M.B. (1968). Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* 49, 2240–2249.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect. Dis.* 8, 881–890.
- Drenkard, E., and Ausubel, F.M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740–743.
- Dubern, J.-F., and Bloemberg, G.V. (2006). Influence of environmental conditions on putisolvins I and II production in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *FEMS Microbiol Lett* 263, 169–175.
- Dubois, A.V., Gauthier, A., Bréa, D., Varaigne, F., Diot, P., Gauthier, F., and Attucci, S. (2012). Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47, 80–86.
- Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155–166.
- Duong, F., Bonnet, E., Géli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., and Filloux, A. (2001). The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262, 147–153.
- Dworkin, J., Jovanovic, G., and Model, P. (2000). The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. *J. Bacteriol.* 182, 311–319.

Références bibliographiques

- Elamin, A.A., Steinicke, S., Oehlmann, W., Braun, Y., Wanas, H., Shuralev, E.A., Huck, C., Maringer, M., Rohde, M., and Singh, M. (2017). Novel drug targets in cell wall biosynthesis exploited by gene disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 12, e0186801.
- Elderkin, S., Bordes, P., Jones, S., Rappas, M., and Buck, M. (2005). Molecular Determinants for PspA-Mediated Repression of the AAA Transcriptional Activator PspF. *J Bacteriol* 187, 3238–3248.
- Eliuk, S., and Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 8, 61–80.
- Elliott, M.H., Smith, D.S., Parker, C.E., and Borchers, C. (2009). Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom* 44, 1637–1660.
- Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Couté, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.-F., Maurin, M., and Attrée, I. (2014). A Type III Secretion Negative Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Employs a Two-Partner Secreted Exolysin to Induce Hemorrhagic Pneumonia. *Cell Host & Microbe* 15, 164–176.
- Engel, L.S., Hill, J.M., Caballero, A.R., Green, L.C., and O’Callaghan, R.J. (1998). Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 273, 16792–16797.
- Epelman, S., Bruno, T.F., Neely, G.G., Woods, D.E., and Mody, C.H. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S Induces Transcriptional Expression of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. *Infect Immun* 68, 4811–4814.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D., and Schobert, M. (2004). Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J. Bacteriol.* 186, 4596–4604.
- Espinal, P., Martí, S., and Vila, J. (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. Hosp. Infect.* 80, 56–60.
- Estrellas, P.S., Alionte, L.G., and Hobden, J.A. (2000). A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr. Eye Res.* 20, 157–165.
- Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F., and Müller, M. (2012). Two-partner Secretion of Gram-negative Bacteria A SINGLE β -BARREL PROTEIN ENABLES TRANSPORT ACROSS THE OUTER MEMBRANE. *J. Biol. Chem.* 287, 2591–2599.
- Farinha, M.A., Conway, B.D., Glasier, L.M., Ellert, N.W., Irvin, R.T., Sherburne, R., and Paranchych, W. (1994). Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice. *Infect. Immun.* 62, 4118–4123.
- Farrow, J.M., and Pesci, E.C. (2007). Two Distinct Pathways Supply Anthranilate as a Precursor of the *Pseudomonas* Quinolone Signal. *Journal of Bacteriology* 189, 3425–3433.
- Faure, L.M., Llamas, M.A., Bastiaansen, K.C., de Bentzmann, S., and Bigot, S. (2013). Phosphate starvation relayed by PhoB activates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *σvrel* ECF factor and its target genes. *Microbiology (Reading, Engl.)* 159, 1315–1327.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., and Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 66, 43–51.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.

Références bibliographiques

- Fernández, L., Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I., and 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.
- Fernández, L., Breidenstein, E.B.M., and Hancock, R.E.W. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist. Updat.* 14, 1–21.
- Ferrell, E., Carty, N.L., Colmer-Hamood, J.A., Hamood, A.N., and West, S.E.H. (2008). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* ptxR by Vfr. *Microbiology (Reading, Engl.)* 154, 431–439.
- Filloux, A. (2011). Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front Microbiol* 2, 155.
- Filloux, A., and Vallet, I. (2003). [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris)* 19, 77–83.
- Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J., and Lazdunski, A. (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *EMBO J.* 9, 4323–4329.
- Filloux, A., Hachani, A., and Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology (Reading, Engl.)* 154, 1570–1583.
- Fito-Boncompte, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., Bazire, A., Madi, A., Connil, N., Véron, W., et al. (2011). Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect. Immun.* 79, 1176–1186.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
- Folders, J., Tommassen, J., van Loon, L.C., and Bitter, W. (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 1257–1263.
- Fox, A., Haas, D., Reimann, C., Heeb, S., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2008). Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from spontaneous mutations in the vfr global regulatory gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1902–1908.
- Francis, V.I., Stevenson, E.C., and Porter, S.L. (2017). Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364.
- Fraylick, J.E., La Rocque, J.R., Vincent, T.S., and Olson, J.C. (2001). Independent and coordinate effects of ADP-ribosyltransferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Infect. Immun.* 69, 5318–5328.
- Friedman, L., and Kolter, R. (2004). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51, 675–690.
- Fronzes, R., Christie, P.J., and Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 703–714.
- F.R.S, L.R. (1882). XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 14, 184–186.
- Fu, H., Coburn, J., and Collier, R.J. (1993). The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2320–2324.

Références bibliographiques

- Fujimura, T., Anan, N., Sugimori, G., Watanabe, T., Jinushi, Y., Yoshida, I., and Yamano, Y. (2009). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan to doripenem and other antipseudomonal agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 523–528.
- Fujita, K., Akino, T., and Yoshioka, H. (1988). Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 56, 1385–1387.
- Galle, M., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2012). Structure and Function of the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci* 13, 831–842.
- Gallique, M., Bouteiller, M., and Merieau, A. (2017). The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? *Front Microbiol* 8.
- Galperin, M.Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* 188, 4169–4182.
- Ganesan, A.K., Mende-Mueller, L., Selzer, J., and Barbieri, J.T. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S, a Double ADP-ribosyltransferase, Resembles Vertebrate Mono-ADP-ribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 274, 9503–9508.
- Garnett, J.A., Muhl, D., Douse, C.H., Hui, K., Busch, A., Omisore, A., Yang, Y., Simpson, P., Marchant, J., Waksman, G., et al. (2015). Structure-function analysis reveals that the *Pseudomonas aeruginosa* Tps4 two-partner secretion system is involved in CupB5 translocation. *Protein Sci.* 24, 670–687.
- Gaviard, C., Broutin, I., Cosette, P., Dé, E., Jouenne, T., and Hardouin, J. (2018). Lysine Succinylation and Acetylation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Proteome Res.* 17, 2449–2459.
- Gayoso, C.M., Mateos, J., Méndez, J.A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., Martínez de Ilarduya, O., and Bou, G. (2014). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* 13, 460–476.
- Gellatly, S.L., and Hancock, R.E.W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67, 159–173.
- Gerlach, R.G., and Hensel, M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 401–415.
- Germ, M., Yoshihara, E., Yoneyama, H., and Nakae, T. (1999). Interplay between the efflux pump and the outer membrane permeability barrier in fluorescent dye accumulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 452–455.
- Gibiansky, M.L., Conrad, J.C., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., Stopka, W.G., Zelasko, D.C., Shrout, J.D., and Wong, G.C.L. (2010). Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. *Science* 330, 197.
- Gimenez, M.R., Chandra, G., Overvelt, P.V., Voulhoux, R., Bleves, S., and Ize, B. (2018). Genome wide identification and experimental validation of *Pseudomonas aeruginosa* Tat substrates. *Scientific Reports* 8, 11950.
- Goehring, U.M., Schmidt, G., Pederson, K.J., Aktories, K., and Barbieri, J.T. (1999). The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 274, 36369–36372.
- 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.

Références bibliographiques

- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., and Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell* 7, 745–754.
- Govan, J.R., and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539–574.
- Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kürthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* 9, 322–330.
- Grote, J., Krysciak, D., and Streit, W.R. (2015). Phenotypic Heterogeneity, a Phenomenon That May Explain Why Quorum Sensing Does Not Always Result in Truly Homogenous Cell Behavior. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5280–5289.
- Guina, T., Purvine, S.O., Yi, E.C., Eng, J., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Miller, S.I. (2003). Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2771–2776.
- Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinick, S., and Hazlett, L.D. (1994). Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* 62, 4572–4579.
- Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A., and Murgier, M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* 173, 5290–5297.
- Haas, B., Kraut, J., Marks, J., Zanker, S.C., and Castignetti, D. (1991). Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 59, 3997–4000.
- Hachani, A., Lossi, N.S., Hamilton, A., Jones, C., Bleves, S., Albesa-Jové, D., and Filloux, A. (2011). Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: secretion and multimerization of VgrG proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 12317–12327.
- Hachani, A., Allsopp, L.P., Oduko, Y., and Filloux, A. (2014). The VgrG Proteins Are “à la Carte” Delivery Systems for Bacterial Type VI Effectors. *J Biol Chem* 289, 17872–17884.
- Hafiane, A., and Ravaoarinoro, M. (2008). [Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients]. *Med Mal Infect* 38, 238–247.
- Hahn, H.P. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* 192, 99–108.
- Hajjar, A.M., Ernst, R.K., Tsai, J.H., Wilson, C.B., and Miller, S.I. (2002). Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* 3, 354–359.
- 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., et al. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)* 8.
- Han, H., Xia, Y., Yang, M., and McLuckey, S.A. (2008). Rapidly Alternating Transmission Mode Electron Transfer Dissociation and Collisional Activation for the Characterization of Polypeptide Ions. *Anal Chem* 80, 3492–3497.
- Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Updat.* 3, 247–255.

Références bibliographiques

- Hao, Y., Kuang, Z., Walling, B.E., Bhatia, S., Sivaguru, M., Chen, Y., Gaskins, H.R., and Lau, G.W. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin causes airway goblet cell hyperplasia and metaplasia and mucus hypersecretion by inactivating the transcriptional factor FoxA2. *Cell. Microbiol.* 14, 401–415.
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J., and Tolker-Nielsen, T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 253–268.
- Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S.V., Rowe, J.J., Yoon, S.S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., 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.
- Hauser, A.R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 654–665.
- Havlis, J., and Shevchenko, A. (2004). Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 3029–3036.
- Heck, L.W., Alarcon, P.G., Kulhavy, R.M., Morihara, K., Russell, M.W., and Mestecky, J.F. (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Immunol.* 144, 2253–2257.
- Held, J.M., Schilling, B., D'Souza, A.K., Srinivasan, T., Behring, J.B., Sorensen, D.J., Benz, C.C., and Gibson, B.W. (2013). Label-Free Quantitation and Mapping of the ErbB2 Tumor Receptor by Multiple Protease Digestion with Data-Dependent (MS1) and Data-Independent (MS2) Acquisitions. *Int J Proteomics* 2013, 791985.
- Henriksson, M.L., Rosqvist, R., Telepnev, M., Wolf-Watz, H., and Hallberg, B. (2000). Ras effector pathway activation by epidermal growth factor is inhibited in vivo by exoenzyme S ADP-ribosylation of Ras. *Biochem. J.* 347 Pt 1, 217–222.
- Hentchel, K.L., and Escalante-Semerena, J.C. (2015). Acylation of Biomolecules in Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 321–346.
- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., and Parsek, M.R. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 183, 5395–5401.
- Hernandez, P., Müller, M., and Appel, R.D. (2006). Automated protein identification by tandem mass spectrometry: issues and strategies. *Mass Spectrom Rev* 25, 235–254.
- Hester, K.L., Madhusudhan, K.T., and Sokatch, J.R. (2000a). Catabolite Repression Control by Crc in 2xYT Medium Is Mediated by Posttranscriptional Regulation of bkdR Expression in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 182, 1150–1153.
- Hester, K.L., Lehman, J., Najar, F., Song, L., Roe, B.A., MacGregor, C.H., Hager, P.W., Phibbs, P.V., and Sokatch, J.R. (2000b). Crc Is Involved in Catabolite Repression Control of the bkd Operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 1144–1149.
- Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Molin, S. (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2008–2017.
- Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Cheung, R.C.K., Law, L.K., Lit, L.C.W., Ng, K.F., Suen, M.W.M., and Tai, H.L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 24, 3–12.

Références bibliographiques

- Hoekstra, D., van der Laan, J.W., de Leij, L., and Witholt, B. (1976). Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455, 889–899.
- Holčapek, M., Jirásko, R., and Lisa, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A* 1259, 3–15.
- Holland, I.B., Schmitt, L., and Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol. Membr. Biol.* 22, 29–39.
- Hong, Y.Q., and Ghebrehiwet, B. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62, 133–138.
- Hong, D.J., Bae, I.K., Jang, I.-H., Jeong, S.H., Kang, H.-K., and Lee, K. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 47, 81–97.
- Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R.S., Silverman, J.M., Ohlson, B.B., Hicks, K.G., Plemel, R.L., et al. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7, 25–37.
- Horvat, R.T., and Parmely, M.J. (1988). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. *Infect Immun* 56, 2925–2932.
- Hsu, F., Schwarz, S., and Mougous, J.D. (2009). TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 72, 1111–1125.
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., and Cooks, R.G. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 430–443.
- HUGH, R., and LEIFSON, E. (1964). The proposed Neotype Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* (Schroeter 1872) *Migula* 1900. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 14, 69–84.
- Hunter, R.C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B.L., Samad, T., Malfroot, A., Cornelis, P., and Newman, D.K. (2013). Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. *MBio* 4.
- Iglewski, B.H., and Kabat, D. (1975). NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2284–2288.
- Imberty, A., wimmerová, M., Mitchell, E.P., and Gilboa-Garber, N. (2004). Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* 6, 221–228.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Antoine, R. (2001). Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* 40, 306–313.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 235–257.
- Jacobs, M.A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., et al. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14339–14344.

Références bibliographiques

- Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N., and Wretling, B. (2000). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 710–712.
- Jayaraman, R. (2008). Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J. Biosci.* 33, 795–805.
- Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 163–173.
- Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., et al. (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 1329–1338.
- Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 46–65.
- Jin, Y., Yang, H., Qiao, M., and Jin, S. (2011). MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 193, 399–410.
- Johnson, T.L., Abendroth, J., Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2006). Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 175–186.
- Jonas, K., Melefors, O., and Römling, U. (2009). Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol* 4, 341–358.
- Juarez, P., Broutin, I., Bordi, C., Plésiat, P., and Llanes, C. (2018). Constitutive Activation of MexT by Amino Acid Substitutions Results in MexEF-OprN Overproduction in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B., Jordan, D., Lauber, J., Salunkhe, P., Limpert, A.S., von Götz, F., Steinmetz, I., Eberl, L., et al. (2004). Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150, 831–841.
- Kadurugamuwa, J.L., Lam, J.S., and Beveridge, T.J. (1993). Interaction of gentamicin with the A band and B band lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and its possible lethal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 715–721.
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T.-L., Foss, M., Lau, P.C., Sanders, G., Austin, J., Kelly, J., and Szymanski, C.M. (2006). Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 188, 4312–4320.
- Kanamaru, S., Leiman, P.G., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., and Rossmann, M.G. (2002). Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* 415, 553–557.
- Kang, Y., Zarzycki-Siek, J., Walton, C.B., Norris, M.H., and Hoang, T.T. (2010). Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 5, e13557.
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresour. Technol.* 102, 4827–4833.
- Kaplan, J.B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* 89, 205–218.

- Karas, Michael., and Hillenkamp, Franz. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301.
- Karatan, E., and Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 310–347.
- Karatuna, O., and Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1770–1775.
- Karlowsky, J.A., Hoban, D.J., Zelenitsky, S.A., and Zhanel, G.G. (1997). Altered *denA* and *anr* gene expression in aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 371–376.
- Kawai, E., Idei, A., Kumura, H., Shimazaki, K., Akatsuka, H., and Omori, K. (1999). The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. *Biochim. Biophys. Acta* 1446, 377–382.
- Kay, E., Humair, B., Déneraud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., and Haas, D. (2006). Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 188, 6026–6033.
- Kenrick, K.G., and Margolis, J. (1970). Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal. Biochem.* 33, 204–207.
- Kessler, E., and Safrin, M. (1988). Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Bacteriol* 170, 5241–5247.
- Kessler, E., Safrin, M., Olson, J.C., and Ohman, D.E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J. Biol. Chem.* 268, 7503–7508.
- Khaledi, A., Schniederjans, M., Pohl, S., Rainer, R., Bodenhofer, U., Xia, B., Klawonn, F., Bruchmann, S., Preusse, M., Eckweiler, D., et al. (2016). Transcriptome Profiling of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4722–4733.
- Khemiri, A., Lecheheb, S.A., Chi Song, P.C., Jouenne, T., and Cosette, P. (2014). Proteomic regulation during *Legionella pneumophila* biofilm development: decrease of virulence factors and enhancement of response to oxidative stress. *J Water Health* 12, 242–253.
- Khemiri, A., Jouenne, T., and Cosette, P. (2016). Proteomics dedicated to biofilmology: What have we learned from a decade of research? *Med Microbiol Immunol* 205, 1–19.
- Kida, Y., Shimizu, T., and Kuwano, K. (2011). Cooperation between LepA and PlcH Contributes to the In Vivo Virulence and Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. *Infect Immun* 79, 211–219.
- King, J.D., Kocíncová, D., Westman, E.L., and Lam, J.S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun* 15, 261–312.
- Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36, 78–91.
- Klockgether, J., and Tümmler, B. (2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Res* 6.
- Kloth, C., Schirmer, B., Munder, A., Stelzer, T., Rothschuh, J., and Seifert, R. (2018). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* ExoY in an Acute Mouse Lung Infection Model. *Toxins (Basel)* 10.

Références bibliographiques

- Knight, D.A., Finck-Barbançon, V., Kulich, S.M., and Barbieri, J.T. (1995). Functional domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* 63, 3182–3186.
- Kobayashi, R., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2007). *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol. Microbiol.* 66, 100–109.
- Koebnik, R. (2005). TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends in Microbiology* 13, 343–347.
- Köhler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., and Pechère, J.-C. (1999). Characterization of MexT, the Regulator of the MexE-MexF-OprN Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 6300–6305.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechère, J.C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182, 5990–5996.
- Köhler, T., van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M., and Pechere, J.-C. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN Multidrug Efflux System Affects Cell-to-Cell Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183, 5213–5222.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., and Losick, R. (2010). D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328, 627–629.
- Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M., and Gejyo, F. (1999). The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 25, 313–321.
- König, B., Vasil, M.L., and König, W. (1997). Role of hemolytic and nonhemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* for inflammatory mediator release from human granulocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112, 115–124.
- Kopp, E., and Medzhitov, R. (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 396–401.
- Koster, M., van Klompenburg, W., Bitter, W., Leong, J., and Weisbeek, P. (1994). Role for the outer membrane ferric siderophore receptor PupB in signal transduction across the bacterial cell envelope. *EMBO J* 13, 2805–2813.
- Kownatzki, R., Tümmler, B., and Döring, G. (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1, 1026–1027.
- Krall, R., Schmidt, G., Aktories, K., and Barbieri, J.T. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect. Immun.* 68, 6066–6068.
- Krieg, D.P., Bass, J.A., and Mattingly, S.J. (1988). Phosphorylcholine stimulates capsule formation of phosphate-limited mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 56, 864–873.
- Kroken, A.R., Chen, C.K., Evans, D.J., Yahr, T.L., and Fleiszig, S.M.J. (2018). The Impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* Internalization by Epithelial Cells Is Independent of fleQ and Correlates with Bistability of Type Three Secretion System Gene Expression. *MBio* 9.
- Kuang, Z., Hao, Y., Hwang, S., Zhang, S., Kim, E., Akinbi, H.T., Schurr, M.J., Irvin, R.T., Hassett, D.J., and Lau, G.W. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* flagellum confers resistance to pulmonary surfactant protein-A by impacting the production of exoproteases through quorum-sensing. *Mol. Microbiol.* 79, 1220–1235.

Références bibliographiques

- Kulp, A., and Kuehn, M.J. (2010). Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annual Review of Microbiology* 64, 163–184.
- Kussmann, M., Lässig, U., Stürmer, C.A., Przybylski, M., and Roepstorff, P. (1997). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of the neural cell adhesion protein neurolin purified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or acidic precipitation. *J Mass Spectrom* 32, 483–493.
- Laarman, A.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F.J., van Strijp, J.A.G., and Rooijackers, S.H.M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J. Immunol.* 188, 386–393.
- Lam, J.S., Taylor, V.L., Islam, S.T., Hao, Y., and Kocíncová, D. (2011). Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol* 2, 118.
- Lambert, P.A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 95, 22–26.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7072–7077.
- Landry, R.M., An, D., Hupp, J.T., Singh, P.K., and Parsek, M.R. (2006). Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* 59, 142–151.
- Langaee, T.Y., Gagnon, L., and Huletsky, A. (2000). Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 583–589.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., and Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 4, 222.
- Larance, M., and Lamond, A.I. (2015). Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 269–280.
- LaSarre, B., and Federle, M.J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 73–111.
- Laskowski, M.A., Osborn, E., and Kazmierczak, B.I. (2004). A novel sensor kinase–response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 54, 1090–1103.
- Lazazzera, B.A. (2005). Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 222–227.
- Lazdunski, A. (2003). [*Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22, 523–526.
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M., and Murgier, M. (1990). Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 72, 147–156.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., et al. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7, R90.

Références bibliographiques

- Lee, V.T., Smith, R.S., Tümmler, B., and Lory, S. (2005). Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect. Immun.* 73, 1695–1705.
- 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.
- Leid, J.G., Kerr, M., Selgado, C., Johnson, C., Moreno, G., Smith, A., Shirtliff, M.E., O’Toole, G.A., and Cope, E.K. (2009). Flagellum-mediated biofilm defense mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* against host-derived lactoferrin. *Infect. Immun.* 77, 4559–4566.
- Leidal, K.G., Munson, K.L., and Denning, G.M. (2001). Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 186–195.
- Leidal, K.G., Munson, K.L., Johnson, M.C., and Denning, G.M. (2003). Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, 307–318.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., and Mekalanos, J.J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4154–4159.
- Lejeune, P. (2003). Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol.* 11, 179–184.
- Lequette, Y., Rollet, E., Delangle, A., Greenberg, E.P., and Bohin, J.-P. (2007). Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the *opgGH* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 3255–3263.
- Lethem, M.I., James, S.L., Marriott, C., and Burke, J.F. (1990). The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *Eur. Respir. J.* 3, 19–23.
- Létoffé, S., Redeker, V., and Wandersman, C. (1998). Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol. Microbiol.* 28, 1223–1234.
- Levin, B.R., and Rozen, D.E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 556–562.
- Lewenza, S., Charron-Mazenod, L., Afroj, S., and van Tilburg Bernardes, E. (2017). Hyperbiofilm phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* defective for the PlcB and PlcN secreted phospholipases. *Can. J. Microbiol.* 63, 780–787.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
- Lewis, J.K., Wei, J., and Siuzdak, G. (2006). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (American Cancer Society), p.
- Li, R.-X., Zhou, H., Li, S.-J., Sheng, Q.-H., Xia, Q.-C., and Zeng, R. (2005). Prefractionation of proteome by liquid isoelectric focusing prior to two-dimensional liquid chromatography mass spectrometric identification. *J. Proteome Res.* 4, 1256–1264.
- Li, X.Z., Barré, N., and Poole, K. (2000). Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 885–893.

- Lien, Y.-W., and Lai, E.-M. (2017). Type VI Secretion Effectors: Methodologies and Biology. *Front Cell Infect Microbiol* 7.
- Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2003). The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell. Signal.* 15, 1081–1089.
- Linke, D., Hung, C.-W., Cassidy, L., and Tholey, A. (2013). Optimized Fragmentation Conditions for iTRAQ-labeled Phosphopeptides. *J. Proteome Res.* 12, 2755–2763.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Liu, S., Yahr, T.L., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. (1997). Biochemical relationships between the 53-kilodalton (Exo53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 1609–1613.
- Livemore, D.M., Chau, P.Y., Wong, A.I.W., and Leung, Y.K. (1987). β -Lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 20, 313–321.
- Llamas, M.A., Sar, A. van der, Chu, B.C.H., Sparrius, M., Vogel, H.J., and Bitter, W. (2009). A Novel Extracytoplasmic Function (ECF) Sigma Factor Regulates Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens* 5, e1000572.
- Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., and Lamont, I.L. (2014). Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 569–597.
- Loo, C.Y., Mitrakul, K., Voss, I.B., Hughes, C.V., and Ganeshkumar, N. (2003). Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 185, 6241–6254.
- Loppnow, H., Brade, H., Dürribaum, I., Dinarello, C.A., Kusumoto, S., Rietschel, E.T., and Flad, H.D. (1989). IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. *J. Immunol.* 142, 3229–3238.
- Lory, S. (1986). Effect of iron on accumulation of exotoxin A-specific mRNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 168, 1451–1456.
- Lucchesi, G.I., Lisa, T.A., and Domenech, C.E. (1989). Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Microbiol. Lett.* 57, 335–338.
- Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M.R., and Wozniak, D.J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* Psl Is a Galactose- and Mannose-Rich Exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 189, 8353–8356.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M., and Saier, M.H. (2003). Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta* 1611, 223–233.
- Macé, C., Seyer, D., Chemani, C., Cosette, P., Di-Martino, P., Guery, B., Filloux, A., Fontaine, M., Molle, V., Junter, G.-A., et al. (2008). Identification of Biofilm-Associated Cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* Involved in Biofilm Formation and Virulence. *PLoS One* 3.
- Macek, B., and Mijakovic, I. (2011). Site-specific analysis of bacterial phosphoproteomes. *Proteomics* 11, 3002–3011.
- MacGregor, C.H., Wolff, J.A., Arora, S.K., and Phibbs, P.V. (1991). Cloning of a catabolite repression control (crc) gene from *Pseudomonas aeruginosa*, expression of the gene in *Escherichia coli*, and identification of the gene product in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 173, 7204–7212.

Références bibliographiques

- MacGregor, C.H., Arora, S.K., Hager, P.W., Dail, M.B., and Phibbs, P.V. (1996). The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* pyrE-crc-rph region and the purification of the crc gene product. *J. Bacteriol.* 178, 5627–5635.
- Magalhães, L., and Nitschke, M. (2013). Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29, 138–142.
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., and O’Toole, G.A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306–310.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 72, 1156–1162.
- Makarov, A., Denisov, E., and Lange, O. (2009). Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 1391–1396.
- Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A.W., Thibodeaux, B.A., O’Callaghan, R.J., and Wright, J.R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 288, L409–418.
- Mann, M. (2006). Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 952–958.
- Mann, E.E., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 893–916.
- Manning, A.J., and Kuehn, M.J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology* 11, 258.
- Marti, S., Chabane, Y.N., Alexandre, S., Coquet, L., Vila, J., Jouenne, T., and Dé, E. (2011). Growth of *Acinetobacter baumannii* in Pellicle Enhanced the Expression of Potential Virulence Factors. *PLOS ONE* 6, e26030.
- Martin, L.W., Reid, D.W., Sharples, K.J., and Lamont, I.L. (2011). *Pseudomonas* siderophores in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Biometals* 24, 1059–1067.
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., and Nakae, T. (2000). Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 192, 107–112.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. (2000). Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3322–3327.
- da Mata Madeira, P.V., Zouhir, S., Basso, P., Neves, D., Laubier, A., Salacha, R., Bleves, S., Faudry, E., Contreras-Martel, C., and Dessen, A. (2016). Structural Basis of Lipid Targeting and Destruction by the Type V Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 428, 1790–1803.
- Matsumoto, K. (2004). Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol. Chem.* 385, 1007–1016.
- Mattick, J.S. (2002). Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology* 56, 289–314.
- McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., and Kuehn, M.J. (2006). Outer Membrane Vesicle Production by *Escherichia coli* Is Independent of Membrane Instability. *Journal of Bacteriology* 188, 5385–5392.

Références bibliographiques

- McCaslin, C.A., Petrusca, D.N., Poirier, C., Serban, K.A., Anderson, G.G., and Petrache, I. (2015). Impact of alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* on alveolar macrophage apoptotic cell clearance. *J Cyst Fibros* 14, 70–77.
- McCaw, M.L., Lykken, G.L., Singh, P.K., and Yahr, T.L. (2002). ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol. Microbiol.* 46, 1123–1133.
- McIver, K.S., Kessler, E., Olson, J.C., and Ohman, D.E. (1995). The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone required for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 18, 877–889.
- McMorran, B., Town, L., Costelloe, E., Palmer, J., Engel, J., Hume, D., and Wainwright, B. (2003). Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect. Immun.* 71, 6035–6044.
- McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S.L., and 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.
- Merrell, D.S., and Falkow, S. (2004). Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature* 430, 250–256.
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., et al. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 560–578.
- Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., and Holder, I.A. (1996). Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 64, 518–523.
- Meyer, J.M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1997). Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology (Reading, Engl.)* 143 (Pt 1), 35–43.
- Micek, S.T., Welch, E.C., Khan, J., Pervez, M., Doherty, J.A., Reichley, R.M., Hoppe-Bauer, J., Dunne, W.M., and Kollef, M.H. (2011). Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with Gram-negative bacteremia. *J Hosp Med* 6, 405–410.
- Michel, G.P.F., Durand, E., and Filloux, A. (2007). XphA/XqhA, a Novel GspCD Subunit for Type II Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 189, 3776–3783.
- Mijakovic, I., Grangeasse, C., and Turgay, K. (2016). Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 398–417.
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K.S., and Welch, M. (2007). Interrelationships between Colonies, Biofilms, and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 2411–2416.
- 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.
- Miller, K.M., Dearborn, D.G., and Sorensen, R.U. (1987). In vitro effect of synthetic pyocyanine on neutrophil superoxide production. *Infect. Immun.* 55, 559–563.
- Mireles, J.R., Toguchi, A., and Harshey, R.M. (2001). *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183, 5848–5854.

Références bibliographiques

- Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., Schlesinger, L.S., and 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.
- Miyazaki, S., Matsumoto, T., Tateda, K., Ohno, A., and Yamaguchi, K. (1995). Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J. Med. Microbiol.* 43, 169–175.
- Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E.C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Van De Peer, Y., De Wachter, R., and Timmis, K.N. (1996). The Determination and Comparison of the 16S rRNA Gene Sequences of Species of the Genus *Pseudomonas* (sensu stricto and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 478–492.
- Moradali, M.F., Ghods, S., and Rehm, B.H.A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martínez, J.L., and Rojo, F. (2004). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J. Bacteriol.* 186, 1337–1344.
- Morales, G., Ugidos, A., and Rojo, F. (2006). Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and cbb3-1 terminal oxidases. *Environ. Microbiol.* 8, 1764–1774.
- Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A., and O’Toole, G.A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther* 21, 595–599.
- Moreno, R., Martínez-Gomariz, M., Yuste, L., Gil, C., and Rojo, F. (2009). 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.
- Morimoto, Y.V., and Minamino, T. (2014). Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* 4, 217–234.
- Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T., and Tsuchiya, T. (2003). Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 991–994.
- 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.
- Moskowitz, S.M., Ernst, R.K., and 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.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordoñez, C.L., Lory, S., et al. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526–1530.
- Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L., and Mekalanos, J.J. (2007). Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Cell Biol.* 9, 797–803.
- Mouneimné, H., Robert, J., Jarlier, V., and Cambau, E. (1999). Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 62–66.

- Mühlradt, P.F., Tsai, H., and Conrardt, P. (1986). Effects of pyocyanine, a blue pigment from *Pseudomonas aeruginosa*, on separate steps of T cell activation: interleukin 2 (IL 2) production, IL 2 receptor formation, proliferation and induction of cytolytic activity. *Eur. J. Immunol.* 16, 434–440.
- Mulcahy, H., O’Callaghan, J., O’Grady, E.P., Maciá, M.D., Borrell, N., Gómez, C., Casey, P.G., Hill, C., Adams, C., Gahan, C.G.M., et al. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect. Immun.* 76, 632–638.
- Muller, M. (2002). Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1527–1533.
- Müller, P.K., Krohn, K., and Mühlradt, P.F. (1989). Effects of pyocyanine, a phenazine dye from *Pseudomonas aeruginosa*, on oxidative burst and bacterial killing in human neutrophils. *Infect. Immun.* 57, 2591–2596.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., and Donlan, R.M. (2001). Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147, 3121–3126.
- Murphy, K., Park, A.J., Hao, Y., Brewer, D., Lam, J.S., and Khursigara, C.M. (2014). Influence of O Polysaccharides on Biofilm Development and Outer Membrane Vesicle Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 196, 1306–1317.
- Musk, D.J., Banko, D.A., and Hergenrother, P.J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* 12, 789–796.
- 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.
- Nickzad, A., and Déziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development – an approach for control? *Letters in Applied Microbiology* 58, 447–453.
- Nigaud, Y., Cosette, P., Collet, A., Song, P.C.T., Vaudry, D., Vaudry, H., Junter, G.-A., and Jouenne, T. (2010). Biofilm-induced modifications in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 957–966.
- Nikaido, H. (1998). Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.* 27 Suppl 1, S32–41.
- Nikaido, H. (2005). Restoring permeability barrier function to outer membrane. *Chem. Biol.* 12, 507–509.
- Nikaido, H., Nikaido, K., and Harayama, S. (1991). Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 266, 770–779.
- Nouri-Nigjeh, E., Chen, R., and Pan, S. (2015). Targeted Proteomics in Translational and Clinical Studies. *Recent Advances in Proteomics Research*.
- Nutman, J., Berger, M., Chase, P.A., Dearborn, D.G., Miller, K.M., Waller, R.L., and Sorensen, R.U. (1987). Studies on the mechanism of T cell inhibition by the *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigment pyocyanine. *The Journal of Immunology* 138, 3481–3487.
- O’Callaghan, J., Reen, F.J., Adams, C., and O’Gara, F. (2011). Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs rsmZ and rsmY. *Microbiology (Reading, Engl.)* 157, 3417–3428.

Références bibliographiques

- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Ogierman, M., and Braun, V. (2003). Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box. *J. Bacteriol.* 185, 1870–1885.
- Ojieniyi, B. (1994). Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS Suppl.* 46, 1–44.
- Okuda, K., Morihara, K., Atsumi, Y., Takeuchi, H., Kawamoto, S., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Fukushima, J. (1990). Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455. *Infect. Immun.* 58, 4083–4088.
- Old, W.M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K.G., Mendoza, A., Sevinsky, J.R., Resing, K.A., and Ahn, N.G. (2005). Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1487–1502.
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 877–886.
- O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Rasmussen, G.T., Abdalla, M.Y., Denning, G.M., and Britigan, B.E. (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285, L1077–1086.
- Ong, S.-E., and Mann, M. (2005). Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* 1, 252–262.
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004). Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* 23, 1257–1266.
- Oosthuizen, M.C., Steyn, B., Theron, J., Cosette, P., Lindsay, D., Von Holy, A., and Brözel, V.S. (2002). Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2770–2780.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 172, 5915–5923.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295–304.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- Ouidir, T., Cosette, P., Jouenne, T., and Hardouin, J. (2015). Proteomic profiling of lysine acetylation in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the diversity of acetylated proteins. *Proteomics* 15, 2152–2157.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., and Hancock, R.E.W. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 190, 2671–2679.
- Pagedar, A., Singh, J., and Batish, V.K. (2011). Efflux mediated adaptive and cross resistance to ciprofloxacin and benzalkonium chloride in *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin. *J. Basic Microbiol.* 51, 289–295.
- Palmer, G.C., and Whiteley, M. (2015). Metabolism and Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in the Lungs of Individuals with Cystic Fibrosis. *Microbiology Spectrum* 3.

Références bibliographiques

- Palmer, K.L., Mashburn, L.M., Singh, P.K., and Whiteley, M. (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J. Bacteriol.* 187, 5267–5277.
- Palmer, K.L., Aye, L.M., and Whiteley, M. (2007). Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J. Bacteriol.* 189, 8079–8087.
- Pamp, S.J., and Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 2531–2539.
- Park, S., and Galloway, D.R. (1995). Purification and characterization of LasD: a second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 16, 263–270.
- Park, S., and Galloway, D.R. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* LasD Processes the Inactive LasA Precursor to the Active Protease Form. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357, 8–12.
- Park, A.J., Murphy, K., Krieger, J.R., Brewer, D., Taylor, P., Habash, M., and Khursigara, C.M. (2014). A temporal examination of the planktonic and biofilm proteome of whole cell *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 using quantitative mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 13, 1095–1105.
- Park, P.W., Pier, G.B., Hinkes, M.T., and Bernfield, M. (2001). Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* 411, 98–102.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R., and Zhou, W.W. (1990). Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 58, 3009–3014.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. (2005). PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 95–101.
- Patriquin, G.M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E.P., and Poole, K. (2008). Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190, 662–671.
- Pearson, J.P., Feldman, M., Iglewski, B.H., and Prince, A. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* 68, 4331–4334.
- Pederson, K.J., Vallis, A.J., Aktories, K., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. (1999). The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 32, 393–401.
- Peek, M.E., Bhatnagar, A., McCarty, N.A., and Zughaier, S.M. (2012). Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012, 843509.
- Perentesis, J.P., Miller, S.P., and Bodley, J.W. (1992). Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *Biofactors* 3, 173–184.
- Pérez-Llarena, F.J., and Bou, G. (2016). Proteomics As a Tool for Studying Bacterial Virulence and Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol* 7, 410.
- Perito, B., Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Dragani, B., Polsinelli, M., Aceto, A., and Di Ilio, C. (1996). Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* 318 (Pt 1), 157–162.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., and Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11229–11234.

Références bibliographiques

- Peterson, A.C., Russell, J.D., Bailey, D.J., Westphall, M.S., and Coon, J.J. (2012). Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 11, 1475–1488.
- Petruschka, L., Burchhardt, G., Müller, C., Weihe, C., and Herrmann, H. (2001). The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol. Genet. Genomics* 266, 199–206.
- Pickering, B.S., Lopilato, J.E., Smith, D.R., and Watnick, P.I. (2014). The Transcription Factor Mlc Promotes *Vibrio cholerae* Biofilm Formation through Repression of Phosphotransferase System Components. *J Bacteriol* 196, 2423–2430.
- Pier, G.B. (1985). Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* 151, 575–580.
- Pier, G.B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 277–295.
- Pirnay, J.-P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Van Eldere, J., Deschaght, P., Vaneechoutte, M., Jennes, S., Pitt, T., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS ONE* 4, e7740.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325, 458–462.
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 479–487.
- Poole, K., and McKay, G.A. (2003). Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* 8, d661–686.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543–594.
- Potron, A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* 45, 568–585.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1528–1533.
- Pukatzki, S., McAuley, S.B., and Miyata, S.T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 11–17.
- Putrins, M., Tover, A., Tegova, R., Saks, U., and Kivisaar, M. (2007). Study of factors which negatively affect expression of the phenol degradation operon pheBA in *Pseudomonas putida*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 1860–1871.
- Quesada, J.M., Otero-Asman, J.R., Bastiaansen, K.C., Civantos, C., and Llamas, M.A. (2016). The Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Regulator σ VreI Is Modulated by the Anti- σ Factor VreR and the Transcription Factor PhoB. *Front Microbiol* 7.
- Rabilloud, T., and Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics* 74, 1829–1841.

Références bibliographiques

- Rabin, S.D.P., Veessenmeyer, J.L., Bieging, K.T., and Hauser, A.R. (2006). A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells. *Infect. Immun.* 74, 2552–2561.
- Rada, B., and Leto, T.L. (2009). Redox warfare between airway epithelial cells and *Pseudomonas*: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol. Res.* 43, 198–209.
- Rahim, R., Ochsner, U.A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S., and Soberón-Chávez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40, 708–718.
- Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M.W., Tsongalis, J., et al. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8815–8821.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms.
- Rau, M.H., Hansen, S.K., Johansen, H.K., Thomsen, L.E., Workman, C.T., Nielsen, K.F., Jelsbak, L., Høiby, N., Yang, L., and Molin, S. (2010). Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environ. Microbiol.* 12, 1643–1658.
- Ravichandran, A., Sugiyama, N., Tomita, M., Swarup, S., and Ishihama, Y. (2009). Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. *Proteomics* 9, 2764–2775.
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., and Beveridge, T.J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 2161–2169.
- Renn, J.P., Junker, M., Besingi, R.N., Braselmann, E., and Clark, P.L. (2012). ATP-independent control of autotransporter virulence protein transport via the folding properties of the secreted protein. *Chem Biol* 19, 287–296.
- Ribet, D., and Cossart, P. (2010). Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Lett.* 584, 2748–2758.
- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., and Martinotti, M.G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 541–553.
- Rocchetta, H.L., Burrows, L.L., and Lam, J.S. (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 523–553.
- Rocha, C.L., Coburn, J., Rucks, E.A., and Olson, J.C. (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S as a Bifunctional Enzyme in J774A.1 Macrophages. *Infect Immun* 71, 5296–5305.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., and Foglino, M. (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* 8, 498–504.
- Roepstorff, P., and Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601.

Références bibliographiques

- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., and Keevil, C.W. (1994). Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl Environ Microbiol* 60, 1842–1851.
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* 34, 658–684.
- Ronsein, G.E., Pamir, N., von Haller, P.D., Kim, D.S., Oda, M.N., Jarvik, G.P., Vaisar, T., and Heinecke, J.W. (2015). Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *J Proteomics* 113, 388–399.
- Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., et al. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE* 5, e8842.
- Ruer, S., Ball, G., Filloux, A., and de Bentzmann, S. (2008). The ‘P-usher’, a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. *EMBO J* 27, 2669–2680.
- Ruimy, R., and Andremont, A. (2004). Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation* 13, 176–184.
- Russell, A.B., Wexler, A.G., Harding, B.N., Whitney, J.C., Bohn, A.J., Goo, Y.A., Tran, B.Q., Barry, N.A., Zheng, H., Peterson, S.B., et al. (2014). A type VI secretion-related pathway in *Bacteroidetes* mediates interbacterial antagonism. *Cell Host Microbe* 16, 227–236.
- Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D.J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 644–648.
- Saito, K., Yoneyama, H., and Nakae, T. (1999). nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, 67–72.
- Salacha, R., Kovacić, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., and Bleves, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.* 12, 1498–1512.
- Saliba, A.M., Nascimento, D.O., Silva, M.C.A., Assis, M.C., Gayer, C.R.M., Raymond, B., Coelho, M.G.P., Marques, E.A., Touqui, L., Albano, R.M., et al. (2005). Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cell. Microbiol.* 7, 1811–1822.
- Salih, B., Masselon, C., and Zenobi, R. (1998). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of noncovalent protein-transition metal ion complexes. *J Mass Spectrom* 33, 994–1002.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., et al. (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* 22, 2959–2969.
- Sauer, K., and Camper, A.K. (2001). Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth. *Journal of Bacteriology* 183, 6579–6589.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140–1154.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L. a. H., Davies, D.G., and Gilbert, P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* 186, 7312–7326.

Références bibliographiques

- Schalk, I.J., and Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environ. Microbiol.* 15, 1661–1673.
- Schauder, S., and Bassler, B.L. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev.* 15, 1468–1480.
- Schlisselberg, D.B., and Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella Typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiol.* 35, 65–72.
- Schneck, E., Papp-Szabo, E., Quinn, B.E., Konovalov, O.V., Beveridge, T.J., Pink, D.A., and Tanaka, M. (2009). Calcium ions induce collapse of charged O-side chains of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of The Royal Society Interface* 6, S671–S678.
- Schulze, W.X., and Usadel, B. (2010). Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annu Rev Plant Biol* 61, 491–516.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185, 2066–2079.
- Schweizer, H.P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* 2, 48–62.
- Scigelova, M., and Makarov, A. (2006). Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2, 16–21.
- Shafikhani, S.H., and Engel, J. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15605–15610.
- Shaver, C.M., and Hauser, A.R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect. Immun.* 72, 6969–6977.
- Sheahan, K.-L., Cordero, C.L., and Fullner Satchell, K.J. (2004). Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9798–9803.
- Sheth, H.B., Lee, K.K., Wong, W.Y., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Hodges, R.S., Paranchych, W., and Irvin, R.T. (1994). The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2. *Mol. Microbiol.* 11, 715–723.
- Shortridge, V.D., Lazdunski, A., and Vasil, M.L. (1992). Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 6, 863–871.
- Silva, A.M.N., Vitorino, R., Domingues, M.R.M., Spickett, C.M., and Domingues, P. (2013). Post-translational modifications and mass spectrometry detection. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 925–941.
- Simmerman, R.F., Dave, A.M., and Bruce, B.D. (2014). Structure and function of POTRA domains of Omp85/TPS superfamily. *Int Rev Cell Mol Biol* 308, 1–34.
- Simpson, J.A., Smith, S.E., and Dean, R.T. (1993). Alginate may accumulate in cystic fibrosis lung because the enzymatic and free radical capacities of phagocytic cells are inadequate for its degradation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30, 1021–1034.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., and Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1955–1958.

Références bibliographiques

- Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., and Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J* 11, 53–62.
- Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaître-Guillier, C., Vallenet, D., Van Dorsselaer, A., Boyer-Mariotte, S., Jouenne, T., and Dé, E. (2006). Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J. Proteome Res.* 5, 3385–3398.
- Sitkiewicz, I., Stockbauer, K.E., and Musser, J.M. (2007). Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol.* 15, 63–69.
- Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., and Filloux, A. (2011). Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol Microbiol* 79, 1353–1366.
- Smadhi, M., Bentzmann, S. de, Imberty, A., Gingras, M., Abderrahim, R., and Goekjian, P.G. (2014). Expeditive synthesis of trithiotriazine-cored glycoclusters and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 10, 1981–1990.
- Smith, R.S., and Iglewski, B.H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 56–60.
- Sobel, M.L., Neshat, S., and 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.
- Socransky, S.S., and Haffajee, A.D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000 28, 12–55.
- Son, M.S., Matthews, W.J., Kang, Y., Nguyen, D.T., and Hoang, T.T. (2007). In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 75, 5313–5324.
- Sonawane, A., Jyot, J., and Ramphal, R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* LecB Is Involved in Pilus Biogenesis and Protease IV Activity but Not in Adhesion to Respiratory Mucins. *Infect Immun* 74, 7035–7039.
- Sriramulu, D.D., Lünsdorf, H., Lam, J.S., and Römling, U. (2005). Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* 54, 667–676.
- Stewart, P.S., and Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
- Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 199–210.
- Steyn, B., Oosthuizen, M.C., MacDonald, R., Theron, J., and Brözel, V.S. (2001). The use of glass wool as an attachment surface for studying phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 1, 871–879.
- Stirling, F.R., Cuzick, A., Kelly, S.M., Oxley, D., and Evans, T.J. (2006). Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell. Microbiol.* 8, 1294–1309.
- Stites, S.W., Walters, B., O'Brien-Ladner, A.R., Bailey, K., and Wesselius, L.J. (1998). Increased iron and ferritin content of sputum from patients with cystic fibrosis or chronic bronchitis. *Chest* 114, 814–819.

Références bibliographiques

- Stites, S.W., Plautz, M.W., Bailey, K., O'Brien-Ladner, A.R., and Wesselius, L.J. (1999). Increased concentrations of iron and isoferritins in the lower respiratory tract of patients with stable cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 796–801.
- Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.E., Hankin, J.A., Murphy, R.C., Chen, W., Lim, K.B., Hackett, M., Vasil, A.I., et al. (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol. Microbiol.* 46, 661–676.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- 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., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Strateva, T., and Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* 58, 1133–1148.
- Strom, M.S., and Lory, S. (1993). Structure-Function and Biogenesis of the Type Iv Pili. *Annual Review of Microbiology* 47, 565–596.
- Sun, J., and Barbieri, J.T. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 32794–32800.
- Sundin, C., Henriksson, M.L., Hallberg, B., Forsberg, A., and Frithz-Lindsten, E. (2001). Exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* elicits cytotoxicity without interfering with Ras signal transduction. *Cell. Microbiol.* 3, 237–246.
- Suriyanarayanan, T., Periasamy, S., Lin, M.-H., Ishihama, Y., and Swarup, S. (2016). Flagellin FliC Phosphorylation Affects Type 2 Protease Secretion and Biofilm Dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PLoS ONE* 11, e0164155.
- Suter, S. (1994). The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, S118-122.
- Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I., and Flavell, R.A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.* 204, 3235–3245.
- Symmons, M.F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7173–7178.
- Tai, S.P., and Kaplan, S. (1985). Intracellular localization of phospholipid transfer activity in *Rhodopseudomonas sphaeroides* and a possible role in membrane biogenesis. *J. Bacteriol.* 164, 181–186.
- Takenouchi, T., Sakagawa, E., and Sugawara, M. (1999). Detection of *gyrA* Mutations among 335 *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated in Japan and Their Susceptibilities to Fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 406–409.
- Tamayo, R., Pratt, J.T., and Camilli, A. (2007). Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 131–148.
- Tanaka, T., Yamada, Y., and Ikehara, M. (1988). Polymer support synthesis of oligodeoxyribonucleotide with an aminoethyl or aminohexyl group at the 5' end by the phosphite-triester approach. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1386–1392.

Références bibliographiques

- Tang, H.B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B.H., Goldberg, J.B., and Prince, A. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* 64, 37–43.
- Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.* 67, 2371–2376.
- Thingholm, T.E., Jensen, O.N., and Larsen, M.R. (2009). Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 9, 1451–1468.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., and Jaeger, K.-E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 1313–1323.
- Tiwari, V., and Tiwari, M. (2014). Quantitative proteomics to study carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 5, 512.
- Toder, D.S., Ferrell, S.J., Nezezon, J.L., Rust, L., and Iglewski, B.H. (1994). *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect. Immun.* 62, 1320–1327.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., and Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 6482–6489.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., and Actis, L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 3473–3484.
- Traidej, M., Marquart, M.E., Caballero, A.R., Thibodeaux, B.A., and O’Callaghan, R.J. (2003). Identification of the Active Site Residues of *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV IMPORTANCE OF ENZYME ACTIVITY IN AUTOPROCESSING AND ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* 278, 2549–2553.
- Trémoulet, F., Duché, O., Namane, A., Martinie, B., and Labadie, J.-C. (2002). A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiol. Lett.* 215, 7–14.
- Trosky, J.E., Li, Y., Mukherjee, S., Keitany, G., Ball, H., and Orth, K. (2007). VopA inhibits ATP binding by acetylating the catalytic loop of MAPK kinases. *J. Biol. Chem.* 282, 34299–34305.
- Ueno, M., and Oda, T. (2014). Biological activities of alginate. *Adv Food Nutr Res* 72, 95–112.
- Unlü, M., Morgan, M.E., and Minden, J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071–2077.
- Vachet, R.W., and Glish, G.L. (1996). Effects of heavy gases on the tandem mass spectra of peptide ions in the quadrupole ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom* 7, 1194–1202.
- Vadyvaloo, V., Viall, A.K., Jarrett, C.O., Hinz, A.K., Sturdevant, D.E., and Joseph Hinnebusch, B. (2015). Role of the PhoP–PhoQ gene regulatory system in adaptation of *Yersinia pestis* to environmental stress in the flea digestive tract. *Microbiology* 161, 1198–1210.
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6911–6916.

Références bibliographiques

- Vance, R.E., Rietsch, A., and Mekalanos, J.J. (2005). Role of the Type III Secreted Exoenzymes S, T, and Y in Systemic Spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 In Vivo. *Infect Immun* 73, 1706–1713.
- Vander Wauven, C., Piérard, A., Kley-Raymann, M., and Haas, D. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J. Bacteriol.* 160, 928–934.
- Vasil, M.L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 108, 800–805.
- Vasil, M.L., and Ochsner, U.A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.* 34, 399–413.
- Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S., and Filloux, A. (2005). The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 985–997.
- Veening, J.-W., Smits, W.K., and Kuipers, O.P. (2008). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 193–210.
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., and Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 171–176.
- Vilain, S., and Brözel, V.S. (2006). Multivariate Approach to Comparing Whole-Cell Proteomes of *Bacillus cereus* Indicates a Biofilm-Specific Proteome. *J. Proteome Res.* 5, 1924–1930.
- Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G.A., and Jouenne, T. (2004a). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Anal Biochem* 329, 120–130.
- Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G.-A., and Jouenne, T. (2004b). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Anal. Biochem.* 329, 120–130.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M.B., and Brözel, V.S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4970–4977.
- Vogt, J., Lozo, L., Koster, E.H.W., and De Houwer, J. (2011). On the role of goal relevance in emotional attention: Disgust evokes early attention to cleanliness. *Cognition & Emotion* 25, 466–477.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* 20, 6735–6741.
- Wade, D.S., Calfee, M.W., Rocha, E.R., Ling, E.A., Engstrom, E., Coleman, J.P., and Pesci, E.C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 4372–4380.
- Wagner, V.E., and Iglewski, B.H. (2008). *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 35, 124–134.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., and Iglewski, B.H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185, 2080–2095.

Références bibliographiques

- Walenska, E., Rózalska, S., Sadowska, B., and Rózalska, B. (2008). The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol. (Praha)* 53, 61–66.
- Walker, T.S., Tomlin, K.L., Worthen, G.S., Poch, K.R., Lieber, J.G., Saavedra, M.T., Fessler, M.B., Malcolm, K.C., Vasil, M.L., and Nick, J.A. (2005). Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* 73, 3693–3701.
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., and Stewart, P.S. (2003). Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317–323.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 611–647.
- Wang, J., Yu, B., Tian, D., and Ni, M. (2013). Rhamnolipid but not motility is associated with the initiation of biofilm seeding dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA17. *J. Biosci.* 38, 149–156.
- Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., Li, H., Xie, L., Zhao, W., Yao, Y., et al. (2010). Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* 327, 1004–1007.
- Wargo, M.J., Ho, T.C., Gross, M.J., Whittaker, L.A., and Hogan, D.A. (2009). GbdR regulates *Pseudomonas aeruginosa* *plcH* and *pchP* transcription in response to choline catabolites. *Infect Immun* 77, 1103–1111.
- Wargo, M.J., Gross, M.J., Rajamani, S., Allard, J.L., Lundblad, L.K.A., Allen, G.B., Vasil, M.L., Leclair, L.W., and Hogan, D.A. (2011). Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 345–354.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., and Humphery-Smith, I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090–1094.
- Wasinger, V.C., Zeng, M., and Yau, Y. (2013). Current Status and Advances in Quantitative Proteomic Mass Spectrometry. *International Journal of Proteomics* 2013, 1–12.
- Watnick, P., and Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–2679.
- Weber, A., Zimmermann, C., Mausberg, A.K., Dehmel, T., Kieseier, B.C., Hartung, H.-P., and Hofstetter, H.H. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* and Its Bacterial Components Influence the Cytokine Response in Thymocytes and Splenocytes. *Infect Immun* 84, 1413–1423.
- Wei, Q., and Ma, L.Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 14, 20983–21005.
- Weldon, J.E., and Pastan, I. (2011). A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS J.* 278, 4683–4700.
- Wellner, D., Panneerselvam, C., and Horecker, B.L. (1990). Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal amino acids: N-acetylserine or N-acetylthreonine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1947–1949.
- West, S.E., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148, 81–86.

Références bibliographiques

- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487.
- Whiteley, M., Lee, K.M., and Greenberg, E.P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 96, 13904–13909.
- Wick, M.J., Hamood, A.N., and Iglewski, B.H. (1990). Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol. Microbiol.* 4, 527–535.
- Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E., and Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7, 340–350.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Johnson, Z., Wilson, M.J., Cunliffe, H.E., Lamont, I.L., and Vasil, M.L. (2001). Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 69, 5385–5394.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., and Jaeger, K.-E. (2007). The Autotransporter Esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation. *J Bacteriol* 189, 6695–6703.
- Wilm, M. (2011). Principles of electrospray ionization. *Mol. Cell Proteomics* 10, M111.009407.
- Wilm, M., and Mann, M. (1996). Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.* 68, 1–8.
- Wilson, R., and Lyall, K. (2002). Simultaneous determination by GC-MS of epoxy and hydroxy FA as their methoxy derivatives. *Lipids* 37, 917–924.
- Wilson, B.A., Salyers, A.A., Whitt, D.D., and Winkler, M.E. (2011). *Bacterial Pathogenesis* (American Society of Microbiology).
- Wilson, R., Sykes, D.A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G.W., and Cole, P.J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* 56, 2515–2517.
- Winstanley, C., Langille, M.G.I., Fothergill, J.L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F., Thomson, N.R., Winsor, G.L., Quail, M.A., Lennard, N., et al. (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* 19, 12–23.
- Wolff, J.A., MacGregor, C.H., Eisenberg, R.C., and Phibbs, P.V. (1991). Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* 173, 4700–4706.
- Wolfgang, M.C., Kulasekara, B.R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C.G., and Lory, S. (2003a). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8484–8489.
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., and Lory, S. (2003b). Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev. Cell* 4, 253–263.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., et al. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* 109, 317–325.
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O’Toole, G.A., and 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.

- Wu, H.-J., Wang, A.H.-J., and Jennings, M.P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 12, 93–101.
- Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J.E., Patel, N., Musch, M.W., Chang, E.B., Fu, Y.-X., et al. (2005). Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 309, 774–777.
- Xiong, Y.Q., Caillon, J., Drugeon, H., Potel, G., and Baron, D. (1996). Influence of pH on adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and their postantibiotic effects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 35–39.
- Xu, L., and Liu, Y. (2014). Protein secretion systems in bacterial pathogens. *Frontiers in Biology* 9, 437–447.
- Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2006). Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 62, 631–640.
- Yang, C., Zhong, X., and Li, L. (2014). Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry-based phosphoproteomics. *ELECTROPHORESIS* 35, 3418–3429.
- Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 1318–1328.
- Yen, Y.T., Kostakioti, M., Henderson, I.R., and Stathopoulos, C. (2008). Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol.* 16, 370–379.
- Yoon, M.Y., Lee, K.-M., Park, Y., and Yoon, S.S. (2011). Contribution of Cell Elongation to the Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* during Anaerobic Respiration. *PLOS ONE* 6, e16105.
- 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., et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* 3, 593–603.
- Yoshimura, F., and Nikaido, H. (1982). Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* 152, 636–642.
- Yu, H., He, X., Xie, W., Xiong, J., Sheng, H., Guo, S., Huang, C., Zhang, D., and Zhang, K. (2014). Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. *Can. J. Microbiol.* 60, 227–235.
- Zaborina, O., Holbrook, C., Chen, Y., Long, J., Zaborin, A., Morozova, I., Fernandez, H., Wang, Y., Turner, J.R., and Alverdy, J.C. (2008). Structure–Function Aspects of PstS in Multi-Drug–Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 4.
- Zhang, L., and Mah, T.-F. (2008). Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. *J Bacteriol* 190, 4447–4452.
- Zhang, L., Li, X.Z., and Poole, K. (2001). Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 549–552.
- Zhao, Y., and Brasier, A.R. (2013). Applications of selected reaction monitoring (SRM)-mass spectrometry (MS) for quantitative measurement of signaling pathways. *Methods* 61, 313–322.
- Zottola, E.A., and Sasahara, K.C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry--should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.* 23, 125–148.

Références bibliographiques

Zoued, A., Brunet, Y.R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., and Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1664–1673.

Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S., and Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74, 3134–3147.

Annexes

Tableau 19 : Recensement des facteurs de virulence retrouvés surexprimés (>2) et sous-exprimés (<0.5) chez les mutants bac

Accession	Description	Phase Biofilm				Phase Stationnaire			
		ratio 29/WT	ratio 30/WT	ratio 31/WT	ratio 32/WT	ratio 29/WT	ratio 30/WT	ratio 31/WT	ratio 32/WT
PA0041	probable hemagglutinin						26,27		
PA0077	IcmF1						0,47		0,31
PA0079	TssK1	4,55	3,48	3,64	2,39				
PA0081	Fha1	14,64	10,28	9,59					
PA0082	TssA1					2,29			
PA0084	TssC1		3,56	3,74	2,95				
PA0090	ClpV1	15,11	10,11	11,13					
PA0395	twitching motility protein PilT		2,32	2,68	3,27				
PA0408	twitching motility protein PilG						0,35	3,57	
PA0409	twitching motility protein PilH								9,79
PA0411	twitching motility protein PilJ	2,20						5,47	
PA0413	component of chemotactic signal transduction system	3,34		2,19		0,17	0,25	0,14	0,16
PA0552	phosphoglycerate kinase						0,20		
PA0652	transcriptional regulator Vfr							2,76	
PA0766	serine protease MucD precursor	0,28	0,25						
PA0934	GTP pyrophosphokinase RelA	4,62	3,46	2,90	2,41				
PA0996	PqsA	5,33	4,31	2,93	2,81				
PA0998	PqsC	2,21							
PA1092	flagellin type B				2,08		2,24		
PA1094	flagellar capping protein FliD					5,00	5,78		
PA1095	hypothetical protein								
PA1097	transcriptional regulator FleQ	3,61	2,85	3,25	2,49				2,53
PA1099	two-component response regulator	9,02	7,84	7,68	4,49				
PA1102	flagellar motor switch protein FliG	2,76							
PA1130	rhamnosyltransferase 2	14,27	8,06	7,31	7,32	4,15	6,55		
PA1248	Alkaline protease secretion outer membrane protein AprF precursor	2,69				5,56	3,13		3,41
PA1249	alkaline metalloproteinase precursor				4,16	3,60			
PA1430	transcriptional regulator LasR	2,66						0,36	0,32
PA1432	autoinducer synthesis protein LasI	2,73	2,06	2,40					2,18
PA1444	flagellar motor switch protein FliN							3,34	3,75
PA1454	flagellar synthesis regulator FleN				6,33			15,70	9,74
PA1455	sigma factor FliA							3,09	
PA1596	heat shock protein HtpG	2,66	2,33	2,11					

Accession	Description	Phase Biofilm				Phase Stationnaire			
		ratio 29/WT	ratio 30/WT	ratio 31/WT	ratio 32/WT	ratio 29/WT	ratio 30/WT	ratio 31/WT	ratio 32/WT
PA1657	HsiB2	4,22	2,00	4,34				5,83	
PA1658	HsiC2	11,52	8,90	7,79			0,28		
PA1665	Fha2		48,95						
PA1803	Lon protease					0,48	0,44	0,37	0,36
PA1863	molybdate-binding periplasmic protein precursor ModA							0,11	0,09
PA1871	LasA protease precursor				14,32				
PA1900	probable phenazine biosynthesis protein	4,00	3,08	3,02	2,83			9,51	5,22
PA1901	phenazine biosynthesis protein PhzC	14,34	12,75	7,97	8,24				
PA1902	phenazine biosynthesis protein PhzD	4,45	3,59	2,11	2,94	4,94	6,05		
PA1903	phenazine biosynthesis protein PhzE	6,23	5,01	3,42	3,98				
PA1904	probable phenazine biosynthesis protein	3,17	2,96	2,76	3,08				
PA2023	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase				0,28				
PA2194	hydrogen cyanide synthase HcnB		3,32	2,60	2,35				
PA2195	hydrogen cyanide synthase HcnC	21,78	15,23	10,56	7,67				
PA2363	HsiJ3	67,71	50,96	63,39					
PA2365	HsiB3				2,21				
PA2366	HsiC3	9,40	7,81	5,59	7,07				
PA2378	probable aldehyde dehydrogenase				4,34				
PA2528	MuxA		0,46		0,42				
PA2572	probable two-component response regulator	2,51						2,31	
PA2573	probable chemotaxis transducer	8,34	3,29	6,29	4,20			36,53	12,26
PA2639	NADH dehydrogenase I chain C,D				2,28	2,66	3,60		
PA2876	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	2,71	2,22	2,06		0,48	0,23		
PA2950	proton motive force protein, PMF	2,20							
PA3115	Motility protein FimV		0,49						
PA3141	nucleotide sugar epimerase/dehydratase WbpM	3,05	2,26	2,22					
PA3146	probable NAD-dependent epimerase/dehydratase WbpK				3,62				
PA3147	probable glycosyl transferase WbpJ	5,25					0,19	0,06	0,03
PA3149	probable glycosyltransferase WbpH	6,15	4,29	4,67					
PA3152	glutamine amidotransferase HisH2	3,27	2,50	2,18					
PA3155	UDP-2-acetamido-2-dideoxy-d-ribo-hex-3-uluronic acid transaminase, wbpE								0,41
PA3158	UDP-2-acetamido-2-deoxy-d-glucuronic acid 3-dehydrogenase, WbpB	3,95	2,70	2,89				2,35	2,48
PA3159	UDP-N-acetyl-d-glucosamine 6-Dehydrogenase							2,36	3,01
PA3286	hypothetical protein							0,42	0,39

Accession	Description	Phase Biofilm				Phase Stationnaire			
		ratio 29/WT	ratio 30/WT	ratio 31/WT	ratio 32/WT	ratio 29/WT	ratio 30/WT	ratio 31/WT	ratio 32/WT
PA3319	non-hemolytic phospholipase C precursor				3,26	3,55			
PA3352	FlgN								7,84
PA3466	probable ATP-dependent RNA helicase							5,78	
PA3476	autoinducer synthesis protein RhII	24,22	17,88	5,13					
PA3477	transcriptional regulator RhIR	3,95	2,80	2,64					
PA3478	rhamnosyltransferase chain B	12,08	6,49	7,55	5,28		4,66	5,65	
PA3479	rhamnosyltransferase chain A	14,20	8,26	7,31	6,55				
PA3526	MotY	0,46							
PA3724	elastase LasB					14,92	12,82		
PA3735	threonine synthase	2,08							
PA3763	phosphoribosylformylglycinamide synthase							0,18	0,30
PA3831	leucine aminopeptidase								0,46
PA4175	protease IV				4,01	9,72	6,37		
PA4197	BfiS		42,36	19,41					
PA4209	probable phenazine-specific methyltransferase		3,53		2,23				
PA4216	probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase								2,42
PA4217	flavin-containing monooxygenase		2,50	2,04	2,09				
PA4525	type 4 fimbrial precursor PilA				3,70	4,74	3,50		0,45
PA4526	type 4 fimbrial biogenesis protein PilB	3,97		2,69					
PA4547	two-component response regulator PilR	7,47	5,29	5,36	3,54				2,53
PA4554	type 4 fimbrial biogenesis protein PilY1						4,72		
PA4556	type 4 fimbrial biogenesis protein PilE				4,88	8,27	12,93	7,686111068	
PA4564	conserved hypothetical protein	0,26	0,26	0,34	0,16	0,48	0,49		
PA4854	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	3,42	2,55	2,76	2,03				
PA4855	phosphoribosylamine--glycine ligase	3,00	2,31	2,64					
PA4856	RetS (Regulator of Exopolysaccharide and Type III Secretion)	4,70	3,41	3,38			0,16	0,04	0,09
PA4944	Hfq	0,30	0,45	0,38					
PA4944	Hfq					0,40	0,35	0,22	0,32
PA4953	chemotaxis protein MotB			4,51					
PA5044	type 4 fimbrial biogenesis protein PilM					0,42	0,35		
PA5112	esterase EstA							2,32	2,68
PA5134	carboxyl-terminal processing protease, CtpA					0,24	0,41		
PA5253	alginate regulatory protein AlgP							8,77	
PA5261	alginate biosynthesis regulatory protein AlgR	2,08						4,89	2,85
PA5312	Aldehyde dehydrogenase								0,44
PA5338	guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase spot	3,88	3,28	2,79	4,37				
PA5344	OxyR					0,47	0,38		
PA5427	alcohol dehydrogenase						0,16		

Liste des communications réalisées

Communication orale nationale :

- Brahim Saffiedine, Thierry Jouenne and Pascal Cosette. Characterization of a new system « BAC » involved in biofilm formation and rhamnolipides secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Journée de l'école doctorale 2018, Le Havre, 21 Juin 2018.

Communication affichée internationale

- Brahim Saffiedine, Thierry Jouenne and Pascal Cosette. Characterization of a new system « BAC » involved in biofilm formation and rhamnolipides secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Congrès SMMAP (Spéctrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique) 2017, Marne la Vallée, du 3 au 5 Octobre 2017.

Communications affichées nationales

- Brahim Saffiedine, Thierry Jouenne and Pascal Cosette. Caractérisation d'un nouveau système BAC impliqué dans la formation de biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs 2016, Villeneuve d'Ascq, 9 et 10 Juin 2016.
- Brahim Saffiedine, Thierry Jouenne and Pascal Cosette. Caractérisation d'un nouveau système BAC impliqué dans la formation de biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Journée de l'école doctorale 2016, Caen, 13 Juin 2016.
- Brahim Saffiedine, Thierry Jouenne and Pascal Cosette. Caractérisation d'un nouveau système BAC impliqué dans la formation de biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Journée de l'école doctorale 2017, Rouen, 22 Juin 2017
- Brahim Saffiedine, Thierry Jouenne and Pascal Cosette. Characterization of a new system « BAC » involved in biofilm formation and rhamnolipides secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Ecole thématique « Biofilm bactérien », Merville-Franceville, du 9 au 13 Octobre 2017.