

Approche métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative de Pseudomonas aeruginosa au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose Oriane Moyne

► To cite this version:

Oriane Moyne. Approche métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative de Pseudomonas aeruginosa au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose. Pneumologie et système respiratoire. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT: 2019GREAS003. tel-02402547

HAL Id: tel-02402547 https://theses.hal.science/tel-02402547

Submitted on 10 Dec 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.

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Oriane MOYNE

Thèse dirigée par **M. le Professeur Bertrand TOUSSAINT** et codirigée par **M. le Dr. Dominique J. BICOUT**

Préparée au sein du Laboratoire TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525, équipes TheREx et EPSP Dans l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et

Dans l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Approche métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose

Thèse soutenue publiquement le **29 mars 2019**, devant le jury composé de :

M. le Pr. Christophe PISON

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (PU-PH), Clinique de Pneumologie, CHU Grenoble-Alpes, Président et Examinateur

Mme le Dr. Anne DOLEANS-JORDHEIM

Maître de Conférence Universitaire - Praticien Hospitalier (MCU-PH), Université Claude Bernard Lyon 1, Hospices Civils de Lyon, Rapporteur

M. le Pr. Thierry JOUENNE
Directeur de Recherche, UMR CNRS 6270, Université de Rouen, Rapporteur
Mme le Dr. Florence CASTELLI
Ingénieur-Chercheur, CEA Paris-Saclay, Examinateur
M. le Dr. Julien BOCCARD
Chercheur, Université de Genève (Suisse), Invité
M. le Pr. Bertrand TOUSSAINT
PU-PH, Université Grenoble Alpes, CHU Grenoble-Alpes, Directeur de thèse
M. le Dr. Dominique J. BICOUT
Chercheur, Université Grenoble Alpes, VetAgroSup Lyon, Co-directeur de thèse
Mme le Dr. Audrey LE GOUELLEC
MCU-PH, Université Grenoble Alpes, CHU Grenoble-Alpes, Co-encadrante
M. le Pr. Max MAURIN
PU-PH, Université Grenoble Alpes, Laboratoire de Bactériologie, CHU Grenoble-Alpes, Co-encadrant



REMERCIEMENTS

Tellement de personnes ont contribué à la réalisation de ce travail !

Je voudrais en premier lieu remercier les patients du CHU Grenoble-Alpes, qui ont accepté que leurs données et leurs échantillons soient utilisés pour cette étude. Je remercie également le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, l'école doctorale EDISCE et l'association Vaincre la Mucoviscidose qui ont participé au financement de cette thèse.

Mes sincères remerciements à Mme le Pr. Anne Doléans-Jordheim et M. le Pr. Thierry Jouenne pour me faire l'honneur de juger ce manuscrit, ainsi qu'à Mme le Dr. Florence Castelli et M. le Dr. Julien Boccard pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail. Un grand merci à M. le Pr. Christophe Pison de nous faire l'honneur de présider ce jury.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à mes (nombreux) encadrants. À M. le Dr. Dominique Bicout, pour m'avoir le premier initié à la science des données, pour m'avoir aiguillée vers ce projet et pour ses idées brillantes qui ont largement contribué à la qualité de ce travail. À Mr le Pr. Max Maurin, pour son aide dans la construction de la banque de souches et ses précieuses connaissances en bactériologie et résistance antibiotique. À M le Pr. Bertrand Toussaint, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour sa bienveillance, ainsi que pour toutes ces belles discussions (philosophico-) scientifiques, parfois stratosphériques, à l'odeur de fraise des bois. Merci également de m'avoir mis dans les pieds du Dr. Audrey Le Gouellec, qui m'a courageusement encadrée au quotidien tout au long de cette thèse. Audrey, merci de ton aide pour m'avoir ré-appris à me servir d'une pipette, pour ta patience quand je m'obstine à ne pas comprendre qu'on présente D'ABORD les résultats, PUIS on discute. Merci pour cette belle équipe qu'on a formé et pour tous ces beaux moments passés au labo et au bout du monde. Sans toi cette expérience n'aurait clairement pas été la même.

Le travail présenté dans cette thèse est le fruit de nombreuses collaborations. Je tiens donc à remercier chaleureusement M le Pr. Benoit Cournoyer et Mme Laurence Marjolet, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire tout un été, et pour leur aide dans le génotypage de notre banque. Merci également Florence Castelli, François Fenaille, Patricia Lamourette et Simon Tellier pour leur expertise en métabolomique et pour la réalisation des analyses HPLC-HRMS. Remerciements sincères également à Mme le Dr. Florence Fauvelle, pour son expertise en RMN du solide. Mes remerciements vont également à M le Dr. Eric Faudry et M le presque-Dr. Tuan Dung Ngo pour

leur aide dans l'évaluation du niveau de méchanceté de nos bactéries. Merci également à M le Dr. Julien Boccard pour les conseils en approches multi-tableaux, faire des statistiques à 4 mains fut une expérience particulièrement stimulante. Merci à nos cliniciens préférés, les Dr. Elodie Meynet et Boubou Camara, pour votre engagement et votre passion.

Merci enfin à tous les DIRAMiens d'un jour ou de toujours, qui ont partagé et fait vivre ces réunions-réflexions du vendredi. Aux stagiaires, Claire Léger et Sarah Huot-Marchand, pour leur travail et leur enthousiasme ; à notre doyenne, Wisia Chroboczek, pour son expérience et son humour ; à Vivien, David, Caroline... Merci enfin à toi Dalil, pour ta curiosité et ton enthousiasme, pour avoir eu le courage de lire TOUTE cette thèse et pour donner une belle suite à ce projet.

La place manque, j'aurai dû m'en douter... Un immense merci à l'ensemble des équipes TheREx et EPSP, aux anciens APCuriens et aux nouveaux GREPIens, pour faire vivre ce 8^{ème} étage et animer les pauses repas. Des remerciements particuliers à Nadia, pour réussir à mener toutes ces missions impossibles quotidiennes sans jamais perdre sourire et bienveillance. Merci à mes compagnons de bureaux, chamarrée Béa, douce Yan, chaleureuse Hélène, rayonnante Marie-Claire. Merci à toi doux-costaud Toto, d'être toujours là pour les confidences et pour faire le rigolo.

Cette période fut intense à bien des niveaux. Merci à tous ceux qui, sur le plan personnel, m'ont permis de rester debout. Merci aux copains, Agnès, Bertrand, Emilie, Etienne, Benjamin, Sylvain, Lucie, Popo, Lolo, Marie... et à tous ceux qui sont là, quand ça va et quand ça va pas. À ma famille, pour leur présence et pour s'être assurés (un peu trop) que je ne meure jamais de faim. Merci également d'avoir toujours cru en moi.

À vous, Alban et Papa, merci de constituer ce noyau solide. Qu'il va être dur de partir loin de vous. Vous m'êtes si chers, je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez.

À toi Julien. Toi qui me connais mieux que personne et qui est quand même toujours là. Toi qui me fais rire, illumine mes journées et repousse la noirceur de la nuit. Merci de m'accompagner au bout du monde, merci pour tout l'amour que tu me donnes, merci d'être toi.

Maman. Si tu savais comme j'ai redouté de t'écrire ces mots qui ne te parviendront jamais. Je te connais, tu aurais été tellement fière de me voir aujourd'hui que c'en aurait été embarrassant. Tu me manques terriblement. Au revoir et merci, d'avoir fait de moi la personne que je suis.

À la mémoire de Catherine Audin,

« It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but the one most responsive to change. »

« Les espèces qui survivent ne sont pas les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements. »

Charles Darwin, 1859.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Liste des tableaux	_14
Liste des figures	_15
Préambule	_20
1. Le concept d'évolution adaptative	21
1.1. Les grands moteurs de l'évolution adaptative : génome, environnement, métabolisme	21
2. Différents moyens d'étude de l'évolution adaptative grâce aux sciences « -omiques	» 26
2.2. Approches post-génomiques et multi-omiques	2' 28
2.3. La métabolomique	29
3. Etudier l'évolution adaptative au laboratoire	34
3.1. Évolution adaptative bactérienne <i>in vitro</i>	34
3.2. Évolution adaptative bactérienne <i>in situ</i>	35
Introduction	_ 38
1. La Mucoviscidose	39
1.1. Epidémiologie	39
1.2. Bases moléculaires de la maladie	40
1.3. Complications extra-pulmonaires	42
1.4. Complications respiratoires	43
1.5. Infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la mucoviscidose	49
1.6. Prise en charge de la pathologie respiratoire associée à la mucoviscidose	51
2. Pseudomonas aeruginosa	54
2.1. Un bacille versatile	54
2.2. Pathogénicité	54
3. Adaptation de Pseudomonas aeruginosa à l'environnement pulmonaire	
mucoviscidosique	62
3.1. L'environnement pulmonaire mucoviscidosique	62
3.2. Diversification clonale au sein des micro-habitats	63

3.3. Evolution parallèle des clones vers des phénotypes adaptés au poumon mucoviscidosique	63
3.4. Bases moléculaires de l'adaptation de Pseudomonas aeruginosa à l'environnement pulmonaire	
mucoviscidosique	66
4. Éléments de statistiques multivariées	_72
4.1. Méthodes non supervisées	73
4.2. Méthodes supervisées	76
Problématique	_79
Objectifs	_82
Organigramme	_83
Partie I	_ 86
Constitution d'une banque de lignées clonales évolutives de P. aerugin infectant des patients adultes atteints de mucoviscidose	osa _86
Introduction	_87
Matériels et Méthodes	_89
1. Milieux et cultures bactériennes	_ 89
2. Souches de référence	91
3. Sélection des patients	91
4. Isolats cliniques de <i>P. aeruginosa</i>	91
5. Système de numérotation des isolats	92
6. Génotypage par macrorestriction génomique et électrophorèse en champ pulsé (PFGE)	93
7. Définition des clones, complexes clonaux et lignées clonales évolutives	94
8. Constitution de la banque finale	95
9. Conservation des isolats	95
Résultats	_96
1. Sélection des patients et Constitution de la Master Cell Bank	96
2. Génotypage PFGE et constitution de la Final Cell Bank	97
Discussion et conclusions	101
Partie II	104

Caractérisations phénotypiques des isolats cliniques évolutifs de P. aeruginosa

Introduction	105
Matériels et Méthodes	107
1. Patients et données cliniques	_ 107
2. Souches de Pseudomonas aeruginosa	_107
3. Caractérisations de phénotypes bactériens	_ 108
4. Analyses statistiques	_ 113
Résultats	115
1. Clinicomes	_ 115
2. Caractérisation des phénotypes bactériens	_ 119
3. Analyse multivariée des phénotypes de virulence et antibiorésistance	_132
4. Associations entre génotypes bactériens, phénotypes et clinique	_135
5. Associations entre phénotypes bactériens et sévérité de l'atteinte respiratoire du patient infecté	_136
6. Évolution adaptative des phénotypes de <i>P. a.</i> au cours des infections pulmonaires chroniques	_138
Discussion	149
	450
Caractérisation métabolique de la banque de lignées clonales évolutives a	e P.
aeruginosa par métabolomique non ciblée HPLC-HRMS	156
Introduction	_156
Matériels et Méthodes	163
1. Relations CFU/DO	163
2. Préparation des échantillons	 163
3. Analyse HPLC-HRMS	
4. Traitement des données	_ 166
5. Annotation et identification des métabolites	_ 166 _ 167
6. Analyses statistiques multivariées	_ 166 _ 167 _ 168
Résultats et Discussions	_ 166 _ 167 _ 168 _ 168
	_ 166 _ 167 _ 168 _ 168 _ 169
1. Acquisition des empreintes métaboliques bactériennes par analyse métabolomique non ciblée	_ 166 _ 167 _ 168 _ 168 _ 169 _ 169
 Acquisition des empreintes métaboliques bactériennes par analyse métabolomique non ciblée Détermination de profils métaboliques d'isolats cliniques de <i>P. a.</i> 	_ 166 _ 167 _ 168 _ 168 _ 169 _ 169 _ 188
 Acquisition des empreintes métaboliques bactériennes par analyse métabolomique non ciblée Détermination de profils métaboliques d'isolats cliniques de <i>P. a</i>	_ 166 _ 167 _ 168 _ 168 _ 169 _ 169 _ 188 _ 193
 Acquisition des empreintes métaboliques bactériennes par analyse métabolomique non ciblée Détermination de profils métaboliques d'isolats cliniques de <i>P. a.</i> Evolution adaptative du métabolisme de <i>P. a.</i> au cours de la colonisation pulmonaire chronique Conclusions 	_ 166 _ 167 _ 168 _ 168 _ 169 _ 169 _ 188 _ 193 _ 201
 Acquisition des empreintes métaboliques bactériennes par analyse métabolomique non ciblée Détermination de profils métaboliques d'isolats cliniques de <i>P. a.</i> Evolution adaptative du métabolisme de <i>P. a.</i> au cours de la colonisation pulmonaire chronique Conclusions 	166 167 168 168 169 169 188 193 201

Intégration multi-échelle des données cliniques, phénotypiques et métabolomiques d'une banque de lignées clonales évolutives de P. a. responsables d'infections pulmonaire chronique chez des patients atteints de *mucoviscidose* ______204 Introduction 205 Matériels et Méthodes 207 Résultats et discussions _____ 208 1. Recherche d'associations entre métabotypes bactériens, phénotypes et atteinte respiratoire du patient infecté _____210 2. Analyse des modifications intra-hôte du métabolisme bactérien pour la recherche de mécanismes d'acquisition de phénotypes d'intérêt clinique ______220 Conclusions et perspectives _____ 229 1. Implication de la voie de la putrescine dans la virulence et l'adaptation de P. a. à son hôte _____ 229 2. Implication du recyclage du peptidoglycane dans l'acquisition de phénotypes de résistance aux Bêtalactamines _____ 233 3. Vers le développement de biomarqueurs utilisables en clinique ?_____ 234 Partie V 236 Etude préclinique de l'impact de l'infection à P. a. sur son hôte par métabolomique non ciblée (article) _____ 236 Conclusions générales et perspectives _____ 250 Références bibliographiques_____ 258 _____276 Annexes Script XCMS et CAMERA ______277 1. 2. Figures supplémentaires 281 Valorisation du travail de thèse ______284 Liste des communications 285

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition des milieux de culture LB. PIA et MH 89
Tableau 2. Composition du milieu SCEM2 (adaptée de ²²⁶) 90
Tableau 2. Composition du mineu Sei M2 (adaptee de) 50
Tableau 3. Souches bactériennes de référence utilisées pour la constitution de la banque 91
Tableau 4. Souches de références de <i>P. a.</i> utilisées pour les expériences de phénotypage de la banque de
souches108
Tableau 5. Regroupement des antibiotiques testés par familles, en fonction de leur mode d'action109
Tableau 6. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes exoS, exoT, exoU et groEL
112
Tableau 7. Tests statistiques utilisés pour mesurer l'association entre deux variables 113
Tableau 8. Liste des 10 métabolites les plus significativement associés à l'appartenance aux trois
métabotypes d'isolats cliniques de P. a. issus de colonisation chronique chez des patients adultes atteints
de mucoviscidose192
Tableau 9. Liste des 10 métabolites les plus fortement associés à l'appartenance aux différents groupes
d'évolution métabolique intra-hôte de P. a. issus de la colonisation pulmonaire chronique chez des patients
atteints de mucoviscidose 200
Tableau 10. Liste des 10 métabolites les plus fortement associés à l'appartenance aux trois métabotypes
d'isolats cliniques de P. a. issus de colonisation chronique chez des patients adultes atteints de
mucoviscidose216
Tableau 11. Liste des métabolites significativement associés aux voies d'adaptation intra-hôte des
signatures métaboliques et des phénotypes de résistance antibiotiques présentés Figure 53224
Tableau 12. Résultats des modèles de régression logistique pour prédire l'acquisition de résistance aux
Bêta-lactamines entre les isolats précoces et tardifs des lignées évolutives 227

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Signaux intrinsèques influençant l'expression des phénotypes	22
Figure 2. Proposition du métabolisme comme un moteur majeur des processus évolutifs.	26
Figure 3. Sources de variation biologique pouvant contribuer à des phénotypes observables (trad	luit de ⁵²). 31
Figure 4. Classification traditionnelle des mutations du gène cftr selon leurs conséquence phénotypes cellulaires ¹⁰⁶	s sur les 41
Figure 5. Les défauts de clairance mucociliaire dans les voies respiratoires dus à la mucoviscido des opportunités de colonisations microbiennes (adapté de ⁹⁶) Figure 6.Prévalence des pathogènes respiratoires de la mucoviscidose les plus fréquents en fonctio	ose créent 43 on de l'âge 45
Figure 7. Cycle par lequel l'infection pulmonaire par une bactérie opportuniste (ici, P. a.) cond inflammation chronique non résolue et à l'apparition progressive de lésions pulmonaires irrévers les patients atteints de mucoviscidose ¹¹³ .	luit à une ibles chez 46
Figure 8. Représentation schématique du processus d'évolution de l'état de santé d'un patient a mucoviscidose, depuis l'enrôlement, au travers de plusieurs examens cliniques annuels, et jusqu'à	atteint de son décès 47
Figure 9. Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion trouvés chez la s référence PAO1 de P. a. ¹⁷⁵ .	ouche de 56
Figure 10. Représentation schématique du cycle de vie planctonique et biofilm de P. a. en trois é	étapes ¹⁸⁶ . 58
Figure 11. Représentation schématique de l'évolution adaptative de P. a. (microévolution) au o	cours des
infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose (traduit de ¹⁴⁶).	65
Figure 12. Représentations en deux dimensions de fruits pour illustrer le concept de dimensionnelle (extrait de ²³⁶).	réduction 74
Figure 13. La mesure des niveaux des métabolites bactériens intracellulaires offre une pris instantanée des activités métaboliques de la cellule.	e de vue 81
Figure 14. Illustration du système de numérotation des isolats cliniques de P. a. (exemple du Pa	itient 10). 93
Figure 15. Résumé des principales étapes de constitution de la banque finale (FCB).	95
Figure 16. Séries temporelles des prélèvements de P. a. réalisés à partir des expectorations des 38	8 patients
correspondant aux critères d'inclusion	96
Figure 17. Classification ascendante hiérarchique des pulsotypes des 122 isolats bactériens géno	typés par
PFGE (distances de Hamming, méthode d'agglomération Ward)	98
Figure 18. Séries temporelles des prélèvements des isolats sélectionnés pour la banque finale (FC	B)100
Figure 19. Aspect typique de cultures d'isolats de la FCB présentant des caractères pigmenté (en mucoïde (en bas).	n haut) et 110

Figure 20. Modélisation de la fonction respiratoire des 32 patients de la cohorte sur la période 2010-2015.
117
Figure 21. Pourcentage d'isolats résistants observés pour chaque antibiotique119
Figure 22. Classification Ascendante Hiérarchique double des antibiotiques (en colonnes) et des isolats (en
lignes)121
Figure 23. Courbes de croissance et temps de génération en milieu SCFM2 des isolats précoce et tardif
prélevés chez chaque patient123
Figure 24. Observation de la rétraction cellulaire due au stress induit par l'infection sur A549 par analyse
des images en contraste de phase125
Figure 25. Cinétique de cytotoxicité induite par l'infection sur cellules J774 (A) et A549 (B) par les isolats
prélevé de manière précoce (en rouge) et tardive (en bleu) chez les patients de la cohorte127
Figure 26. Résultat représentatif de la détection des gènes codant pour les exotoxines ExoS, ExoT et ExoU
du SST3 de P. a128
Figure 27. Modélisation du niveau de virulence des isolats : Résultat de l'analyse HCPC des mesures de
mucoïdie, production de pigments, vitesse de croissance, cytotoxicité sur J774 et A549 et stress induit par
l'infection sur A549131
Figure 28. Modélisation du potentiel pathogène des isolats : Résultat de l'analyse HCPC réalisée sur les
mesures des phénotypes associés à la virulence et à la résistance aux bêta-lactamines, aminosides et
fluoroquinolones (FQ)134
Figure 29. Représentation des indicateurs cliniques de la santé respiratoire (en vert) dans l'espace formé
par les CP1 et 2 de l'ACM réalisée sur les phénotypes associés à la virulence (en rouge)137
Figure 30. Evolution intra-hôte des phénotypes de résistance aux antibiotiques chez 33 lignées clonales
évolutives de P. a. responsables d'infections pulmonaires chroniques de patients atteints de mucoviscidose.
144
Figure 31. Evolution intra-hôte des phénotypes de virulence chez 33 lignées clonales évolutives de P. a.
responsables d'infections pulmonaires chroniques de patients atteints de mucoviscidose146
Figure 32. Principe de la spectrométrie de masse couplée à une méthode de chromatographie158
Figure 33. Flux analytique général d'une étude métabolomique non ciblée158
Figure 34. Procédure expérimentale de la préparation des extraits métaboliques de P. a. pour l'analyse
métabolomique LC-MS (figure issue de ²⁸⁵)165
Figure 35.Relations CFU/DO des isolats de la banque (échelle logarithmique)170
Figure 36. Résumé des étapes d'acquisition et pré-traitement des données HPLC-HRMS172
Figure 37. Absence de dérive du signal due à l'encrassement de l'appareil au cours de l'acquisition (« effet
batch »)173
Figure 38. Intensité ionique totale dans les échantillons pour chaque type d'échantillon Blanc, Contrôle
Qualité (QC/facteurs de dilution), extraits bactériens de P. a. (Biologique)174
Figure 39. Intensité ionique totale calculée après normalisation PQN dans les échantillons dans les extraits
métaboliques intracellulaires d'isolats cliniques de P. a176

Figure 40. Intensité ionique totale en fonction du volume de reprise des extraits bactériens dans les
échantillons biologiques178
Figure 41. Intensité ionique totale en fonction du volume de reprise des extraits secs théoriques, calculés
d'après les mesures de D0595 des cultures bactériennes179
Figure 42. Graphiques des individus de l'ACP sur les données HILIC et C18 non normalisées181
Figure 43. Intensité ionique totale calculée après normalisation PQN dans les échantillons dans les extraits
métaboliques intracellulaires d'isolats cliniques de P. a183
Figure 44. Détection des échantillons aberrants par analyse HCPC sur les résultats d'une ACP sur les
analyses C18 (A) et HILIC (B)186
Figure 45. Résumé des données obtenues suite aux différentes étapes de traitement des spectres
HPLC/HRMS acquis par les deux méthodes analytiques HILIC et C18187
Figure 46. Trois profils métaboliques distincts d'isolats cliniques de P. a. identifiés par analyse HPLC-HRMS. 191
Figure 47. Modifications intra-hôte du profil métabolique des clones entre isolats précoces et tardifs
représentant les 33 lignées évolutives de la FCB195
Figure 48. Distribution des degrés de Polarité métabolomiques, représentatifs des modifications de
l'intensité de 272 métabolites entre les isolats précoce et tardifs représentant l'évolution adaptative de 33
lignées clonales de P. a. responsables de la colonisation chronique chez des patients atteints de
mucoviscidose197
Figure 49. Identification de plusieurs voies d'adaptation intra-hôte distinctes de clones de P. a. responsables
d'infection pulmonaire chronique chez des patients adultes atteints de mucoviscidose199
Figure 50. Représentation schématique de l'intégration multi-échelle des caractérisations phénotypiques,
métabolomiques et cliniques d'une banque d'isolats cliniques de P. a. responsables d'infection pulmonaire
chronique chez des patients atteints de mucoviscidose209
Figure 51. Trois profils métaboliques distincts d'isolats cliniques de P. a. identifiés par analyse HCPC sur une sélection de métabolites d'expression variable au sein de la banque.
Figure 52. Associations entre les niveaux de putrescine et spermidine et l'expression de phénotypes de
virulence par les isolats de la banque.
Figure 53. Identification de 3 voies d'adaptation intra-hôte des signatures métaboliques et des phénotypes
de résistance antibiotiques au cours de l'infection pulmonaire chronique par P. a. 223
Figure 54. La métabolomique par RMN HRMAS révèle des modifications de la composition métabolomique
des poumons de souris suite à l'infection par P. a. et permet d'évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement
et de discriminer la sévérité de l'infection (adapté de ⁷¹).
Figure S1. Groupes de profils métaboliques des isolats cliniques de P. a. détectés sur les données HPLC-
HRMS suite aux analyses C18 (A) et HILIC (B).
Figure S2. Trois profils métaboliques distincts d'isolats cliniques de P. a. identifiés par analyse HPLC-HRMS.
282

PREAMBULE

1. LE CONCEPT D'EVOLUTION ADAPTATIVE

Depuis l'apparition des premières formes de vie il y a plus de 3,5 milliards d'années ¹, les organismes doivent évoluer et s'adapter aux variations de leur environnement pour assurer la survie de leur espèce. Génération après génération, les populations sont façonnées par la **sélection naturelle** des individus les plus **adaptés** à leur environnement, qui transmettront aux générations futures les caractéristiques leur conférant un avantage. C'est **l'évolution adaptative**, décrite par Charles Darwin dès 1859 dans le célèbre ouvrage *De l'Origine des espèces* ².

1.1. LES GRANDS MOTEURS DE L'EVOLUTION ADAPTATIVE : GENOME, ENVIRONNEMENT, METABOLISME

La sélection naturelle est guidée en premier lieu par les **phénotypes**, ou les **fonctions** exprimées par un organisme ou une cellule, en interaction avec son **environnement**². Ces phénotypes résultent de l'intégration simultanée de **signaux intrinsèques et extrinsèques**, en provenance du génome et de l'environnement.

1.1.1. Signaux intrinsèques : exécution de l'information génétique

Suivant le **dogme central de la biologie** établi par Crick en 1970, les signaux intrinsèques sont le résultat d'étapes successives de régulation et d'utilisation de l'information contenue dans les gènes. À la base de tout, nous trouvons l'ADN génomique, présent dans toutes les cellules vivantes, où toutes ces informations nécessaires à la vie sont codées et stockées. Selon les conditions dans lesquelles la cellule se trouve, une partie de cette information est traitée et transcrite, puis traduite, en ARN messager (ARNm) puis en protéines. Certaines de ces protéines ont un rôle d'enzyme et agissent comme catalyseurs des réactions chimiques constituant le métabolisme, qui comprend l'ensemble des réactions chimiques nécessaires aux fonctions vitales de la cellule et conditionne les phénotypes (Figure 1) ³.



Figure 1. Signaux intrinsèques influençant l'expression des phénotypes.

L'information nécessaire aux fonctions vitales d'un organisme est stockée sous forme de gènes sur le support ADN. Ces informations sont ensuite traitées et régulées à différents niveaux d'organisation biologique : ARN messager, protéines, enzymes, métabolisme... avant leur exécution finale en phénotypes.

Depuis la fin des années 1960, il est communément admis que l'évolution des espèces est guidée par l'accumulation sur le génome de mutations aléatoires, qui seront ou non sélectionnées au fil des générations si elles confèrent un avantage adaptatif aux individus. Ainsi, une mutation génétique affecte en aval la transcription des gènes en ARNm et leur traduction en protéines, ou modifie la séquence primaire de la protéine. Certaines de ces variations protéiques peuvent moduler en partie l'activité enzymatique, et influencent par conséquent le métabolisme et les phénotypes exprimés par l'organisme. D'après les travaux de Kimura en 1969, la sélection naturelle est ainsi guidée par l'expression de phénotypes découlant directement de l'exécution de l'information génétique. La survenue de mutations sur l'ADN est considérée comme aléatoire et a parfois, par un heureux hasard, un impact bénéfique dans l'interaction de l'individu avec son environnement ⁴.

Cette théorie du **déterminisme génétique** est aujourd'hui remise en question ⁵. Plaçant l'ADN comme seul moteur des processus évolutifs, elle suggère que les phénotypes, ou fonctions exprimées par l'individu, résultent uniquement de l'intégration des signaux intrinsèques dont la source réside dans le code même de son génome. En réalité, ces phénotypes peuvent également être directement influencés par l'**environnement** extérieur, tout comme notre couleur de peau résulte à la fois de l'information héréditaire codée dans nos gènes et de notre exposition aux rayons du soleil.

1.1.2. Signaux extrinsèques : en provenance de l'environnement

Ces signaux extrinsèques dépendent des conditions environnementales et peuvent modifier l'expression des gènes à différents niveaux de régulation biologique.

Les **modifications épigénétiques** consistent en des modifications de l'activité des gènes, survenant sans modifications de la séquence d'ADN. Elles sont médiées par des modifications biochimiques, comme l'ajout de groupements méthyle sur certaines zones de l'ADN, ou la modification chimique des protéines permettant son repliement, les histones ⁶. Ces mécanismes épigénétiques peuvent être induits par l'environnement et modifient les phénotypes exprimés par une cellule ou un organisme ⁷. Ils permettent notamment de contrôler la différenciation des types cellulaires durant l'embryogénèse chez l'homme, ou la régulation des facteurs de virulence chez la bactérie ^{8,9}.

De nombreuses études ont démontré la capacité de ces modifications épigénétiques, tout comme les mutations génétiques, à se transmettre aux générations suivantes ^{10–13}. Un des exemples les plus célèbres de transmission épigénétique supposée concerne les habitants de la ville d'Överkalix en Suède, dans laquelle a été mise en évidence une association significative entre une diminution de la mortalité cardiovasculaire ou liée au diabète et le fait que les parents ou grands-parents aient traversé une période de famine ^{10–12}. Difficile à prouver dans une telle étude, le caractère épigénétique probable de cette transmission de caractères est cependant largement argumenté ¹⁰. Chez la souris, il a par ailleurs été clairement démontré que l'introduction d'un phytoestrogène dans l'alimentation de la mère pendant la grossesse induit une hyperméthylation de certains gènes chez sa descendance, diminuant ainsi le risque d'obésité tout en assombrissant la couleur de la fourrure. Ces résultats prouvent le potentiel de transmission de certaines modifications de l'épigénome aux générations suivantes ¹³.

Un autre élément important est la possibilité que ce type de modifications induites par l'environnement pourrait par la suite se traduire en mutations et s'implanter dans les gènes au fil des générations. En ce sens, il a été démontré que la méthylation de certaines zones du génome procaryote de *Neisseria meningitidis* pourrait favoriser l'apparition de mutations sur ces mêmes zones, et ainsi diriger partiellement l'évolution génomique ¹⁴. Selon Jonathan Weitzman, directeur du Centre épigénétique et destin cellulaire (Université Paris-Diderot-CNRS), l'épigénome, « bien plus dynamique » que le génome, « pourrait permettre aux

individus d'explorer rapidement une adaptation à une modification de l'environnement, sans pour autant graver ce changement adaptatif dans le génome » ¹⁵.

Des recherches récentes soulignent également l'importance potentielle de la **plasticité physiologique** des individus en réponse à des modifications de leur environnement dans l'évolution de leur espèce. Ainsi, il a été démontré sur une espèce de poisson capable de respirer de l'air et de ramper en dehors de l'eau, qu'une modification importante de son environnement (placer l'animal dans des conditions de vie terrestres) induit des modifications physiologiques importantes : pour apprendre à mieux marcher sur la terre ferme, le poisson a modifié son anatomie squelettique, et ce en l'absence de toute sélection génique. Les auteurs suggèrent ainsi que ces modifications phénotypiques induites par l'environnement pourraient être un moteur majeur de l'évolution des espèces. Faisant le parallèle entre les résultats de leur expérience et les modifications squelettiques observées au cours de l'évolution des premiers tétrapodes, ils proposent d'intégrer la plasticité physiologique comme un moteur majeur des processus évolutifs d'adaptation ¹⁶.

Ces résultats soulignent l'importance des facteurs épigénétiques et autres régulations postgénomiques dans les processus d'évolution, puisqu'ils peuvent, tout comme l'ADN, être à la fois un support de l'hérédité et un moteur de l'adaptation. Nait ainsi l'hypothèse selon laquelle des modifications génomiques pourraient intervenir après l'adaptation phénotypique due à la plasticité de la réponse individuelle aux changements environnementaux ¹⁶.

Pourtant, les variations environnementales seules ne suffisent pas non plus à expliquer l'extrême diversité du vivant, qui avait déjà frappé Charles Darwin lors de son voyage aux îles Galapagos². Il paraît donc indispensable de prendre en compte l'ensemble de ces signaux intrinsèques et extrinsèques comme des moteurs potentiels de l'évolution adaptative des populations. La réponse des organismes à des changements environnementaux peut en effet modifier l'expression des phénotypes au même titre que les mutations accumulées sur le génome, et peut également diriger la sélection naturelle des individus les mieux adaptés.

1.1.3. Au carrefour des signaux intrinsèques et extrinsèques : le métabolisme

Les phénotypes exprimés par un organisme ne sauraient l'être sans une machinerie adaptée, capable d'intégrer l'ensemble des signaux intrinsèques et extrinsèques et de les traduire en

l'expression d'une fonction. Cette machinerie, le métabolisme, est constituée d'une multitude de réactions chimiques modulables et interconnectées : les voies métaboliques. Les molécules impliquées dans ces voies, les métabolites, peuvent provenir de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule, plaçant ainsi le métabolisme au carrefour des signaux venus de l'environnement et des produits d'expression des gènes ¹⁷.

A la fois centrale énergétique et usine de production de la cellule, il détermine comment l'énergie sera produite ou consommée par la dégradation (catabolisme) ou la synthèse (anabolisme) de molécules. Par là-même, le métabolisme est à la base d'une grande part des fonctionnalités d'une cellule ou d'un organisme et contrôle l'expression des phénotypes. Hautement adaptable, il est à l'origine de la plasticité de la réponse aux conditions environnementales, tout en restant suffisamment stable pour permettre l'exécution des fonctions de base nécessaires à la vie ¹⁸.

Au plus proche des phénotypes, le métabolisme se positionne également comme un moteur majeur de l'évolution adaptative des espèces. Pour illustrer ce rôle, nous pouvons citer l'exemple de la persistance de la lactase chez l'homme, qui permet aux adultes de continuer à digérer le lactose. Cette adaptation métabolique récente semble être apparue en réponse à des modifications du régime alimentaire humain : suite au développement récent de l'élevage à l'échelle de l'humanité, les apports nutritionnels en lactose ont considérablement augmenté, entraînant une pression sélective forte sur la région du génome encodant la lactase ¹⁹. Cette sélection positive de voies métaboliques, encodée dans les gènes en réponse à des modifications des conditions environnementales, démontre la position centrale du métabolisme dans les processus adaptatifs ^{20–22}.

Point de convergence des signaux intrinsèques et extrinsèques et situé au plus proche des phénotypes, le métabolisme contrôle les fonctions exprimées par un organisme. Il se place ainsi à la fois comme un moteur et comme une signature de la sélection naturelle des phénotypes les plus adaptés (Figure 2).



Figure 2. Proposition du métabolisme comme un moteur majeur des processus évolutifs. Le métabolisme intègre l'ensemble des signaux en provenance du génome et de l'environnement, et conditionne l'expression des phénotypes. Si ces phénotypes confèrent un avantage adaptatif aux individus, ils seront sélectionnés et encodés dans le génome pour être transmis aux générations suivantes.

2. DIFFERENTS MOYENS D'ETUDE DE L'EVOLUTION ADAPTATIVE GRACE AUX SCIENCES « -OMIQUES »

L'avènement des techniques de biologie à haut débit, dites « -omiques », offre de nouvelles perspectives pour étudier l'évolution adaptative à l'échelle des populations. Bien loin de la biologie traditionnelle, ces approches ont pour principe d'étudier un objet biologique dans sa globalité, et sans *a priori*. Ainsi, l'étude de l'ensemble des gènes, transcrits, protéines ou métabolites d'un système biologique donnera les disciplines de la **génomique**, **transcriptomique**, **protéomique** ou **métabolomique**, respectivement. Des approches systémiques ou intégratives, combinant différents niveaux d'information, voient le jour, et visent à mieux comprendre les processus physiologiques et pathologiques.

Ces progrès technologiques donnent lieu à une véritable révolution des sciences biologiques, et la conception même des recherches en est modifiée. Contrairement à la biologie traditionnelle, dans laquelle on cherche à répondre à une question scientifique en validant une hypothèse précise, ces nouvelles sciences –omiques sont les outils pour des approches holistiques ne nécessitant pas d'hypothèse préconçue. Offrant une vue plus globale et donc moins biaisée des modifications moléculaires survenant entre différents états d'un système biologique, elles ouvrent la voie à un potentiel de découvertes inédit ^{23–26}. La plus grande nouveauté de ces approches à haut débit est certainement la quantité d'informations obtenues pour chaque analyse. L'élucidation du génome, du transcriptome ou du métabolome d'une simple bactérie produit des milliers de variables, et leur nombre continue à croître avec les développements technologiques permettant une couverture toujours plus complète de l'objet étudié. L'essor de ces technologies de pointe nécessite donc le développement d'outils informatiques et statistiques toujours plus sophistiqués, afin de repousser les limites dues à la qualité, au stockage ou à l'analyse des données ²⁷.

Le choix des méthodes d'analyse à mettre en place est un élément central de la conception d'une étude « –omique ». Dans cette section, nous nous intéresserons à plusieurs de ces approches et à leur intérêt potentiel pour étudier l'évolution adaptative des populations, notamment bactériennes.

2.1. LA GENOMIQUE

Depuis les années 1950, les découvertes successives de la structure en double hélice de l'ADN, de son rôle de support de l'information nécessaire aux fonctions cellulaires et de son caractère héréditaire ont posé les fondements de la génétique contemporaine ^{3,4,28,29}. L'ADN a pour rôle le stockage et la transmission de l'information biologique sous forme de gènes, encodée dans les séquences de nucléotides. Le **code génétique** définit « l'**arbre des possibles** », à savoir toutes les fonctions que la cellule pourra potentiellement exprimer. Par la séquence des gènes présents, il détermine en effet l'ensemble des protéines qui pourront être synthétisées par une cellule dans des conditions données ³. Dès la fin des années 1970, les premières méthodes de séquençage voient le jour, permettant l'élucidation du génome de plusieurs organismes ^{30,31}. Au début des années 2000, le *Human Genome Project* marque le début de l' « **ère génomique** », qui place le génome au cœur de nombreuses considérations scientifiques et sociétales ^{32–35}.

Une des caractéristiques du génome pour l'étude des organismes vivants est qu'il est relativement constant. Il est quasiment identique au sein de toutes les cellules d'un organisme, ce qui permet par exemple le dépistage de maladies d'origine génétique à partir de prélèvements effectués à distance des organes touchés (la mucoviscidose, maladie de manifestations essentiellement pulmonaires, peut ainsi être diagnostiquée par une simple prise de sang) ³⁶. Stable dans le temps et peu dépendant des conditions environnementales, il permet également d'étudier les gènes de populations anciennes, y compris longtemps après le décès de l'organisme. C'est ainsi que des chercheurs ont pu reconstituer le génome de mammouths, à partir d'échantillons de dents ou de peau retrouvés plus de 4000 ans après la disparition de l'espèce ³⁷. Ces caractéristiques ont fait de la génomique un outil puissant de l'étude de l'évolution des populations eucaryotes et procaryotes durant ces dernières décennies ^{38–43}.

Malgré tous ses avantages, la science génomique a elle aussi ses limites. La principale d'entre elles est que parmi toute l'information contenue dans un génome, seule une faible proportion sera *in fine* fonctionnelle. En effet, même en ne considérant que les parties « codantes » de l'ADN, la plus grande partie des gènes ne seront pas exprimés, leur activité étant inhibée lors des processus de régulation de l'expression génique, qui peuvent eux-mêmes être influencés par les conditions environnementales ⁷. De plus, des phénomènes de compensation physiologique peuvent rendre muettes certaines mutations d'un point de vue phénotypique ⁴⁴. Ainsi, les données obtenues à la suite d'un séquençage génomique ne contiennent pas toute l'information relative au fonctionnement d'une cellule, et la faible proportion d'information pertinente pour l'étude de l'adaptation est vite « noyée » dans le bruit de fond produit par des changements aléatoires non exprimés dans les conditions étudiées ⁴. Cela se traduit par la grande difficulté, dans certains cas, à corréler adaptations génétiques et phénotypiques, comme cela a été décrit dans l'étude de l'évolution adaptative *in situ* de la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa (P. a.)* ⁴².

2.2. APPROCHES POST-GENOMIQUES ET MULTI-OMIQUES

Dès le début des années 2000, l'intérêt a grandi autour des **approches post-génomiques** afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'adaptation, à un degré d'information de plus en plus fonctionnel. En 2001, plusieurs études de génomique fonctionnelle, basées sur l'utilisation de micropuces à ARNm permettant de mesurer l'expression de dizaines de gènes en parallèle, avaient déjà été appliquées à l'étude de l'évolution des populations ⁴⁵. Dans les années qui suivirent, les avancées technologiques continues ont permis d'étudier les propriétés des organismes à différents niveaux de régulation et avec une couverture toujours plus complète de l'objet biologique étudié ^{46–48}. Avec pour objectif d'obtenir un angle de vue

toujours plus fonctionnel des processus biologiques, les approches **épigénétiques**, **transcriptomiques**, **protéomiques** se sont développées, chacune cherchant à révéler le système étudié sous un jour nouveau, plus proche des phénotypes réellement exprimés ⁴⁹. La protéomique permet ainsi de révéler l'ensemble des protéines produites par l'organisme, en intégrant l'ensemble des modifications pré- et post-traductionnelles. Révolutionnée à la fin des années 1980 par les développements techniques de la spectrométrie de masse et des méthodes de séparation telles que la chromatographie liquide, elle permet l'observation fonctionnelle du système étudié ⁵⁰. Les modifications post-transcriptionnelles pouvant avoir un rôle capital dans la physiologie et la pathogénicité bactérienne, l'approche protéomique a révélé sa pertinence pour l'étude des pathogènes comme *P. a.* ⁵¹.

La plus récente de ces approches post-génomiques est la **métabolomique**. Bénéficiant des progrès technologiques apportés notamment par la protéomique, elle est aujourd'hui considérée aujourd'hui comme la fenêtre d'observation la plus proche du phénotype ⁵². Elle sera développée en détail dans la section suivante.

Des approches systémiques, cherchant à combiner ces différents niveaux d'information dans une vue globale, se généralisent à leur tour ^{48,53}. Bien que ces nouveaux domaines génèrent de grands espoirs, l'intégration de ces différents niveaux d'information biologique constitue aujourd'hui encore un défi de taille, et il est aujourd'hui fortement recommandé de préférer sacrifier le nombre de couches -omiques au profit du nombre d'échantillons et de réplicats, et de la précision de la méthode utilisée ^{54–56}.

2.3. LA METABOLOMIQUE

2.3.1. PRINCIPE : UNE PRISE DE VUE INSTANTANEE DU METABOLISME PAR LA MESURE DES NIVEAUX DE METABOLITES

La **métabolomique** consiste à identifier et quantifier les petites molécules organiques de moins d'1,5 kDa, présentes dans un échantillon biologique : les **métabolites** (sucres, acides aminés, acides gras, nucléotides...). C'est Linus Pauling, Prix Nobel de chimie et Prix Nobel de la paix, qui publie la première étude de métabolomique de l'urine de patient en 1971 ⁵⁷. Les termes métabolome et métabolomique sont quant à eux formellement définis pour la première fois par Stephen G. Oliver en 1998 ⁵⁸.

Les métabolites peuvent provenir de l'intérieur de la cellule, lorsqu'ils sont les produits de réactions enzymatiques, mais également de l'extérieur de l'organisme (nutrition, exposition, xénobiotiques...), et pourront alors être utilisées comme substrats réactionnels ou impliquées dans des processus de toxicité cellulaire ⁵⁹. Ils peuvent être les substrats ou produits des réactions du métabolisme, qui assure toutes les fonctions essentielles d'une cellule, comme la production et le stockage d'énergie, la synthèse de biomolécules ou l'apoptose ⁶⁰. Nouvellenée des discipline « -omiques », la métabolomique bénéficie dans son interprétation de la richesse des connaissances accumulées depuis des décennies de recherche en biochimie ⁶¹. Par analogie avec les termes « génome », « transcriptome » et « protéome », le **métabolome** est obtenu par la cartographie globale et complète des métabolites présents à un instant donné dans un système biologique ^{49,58}.

2.3.2. Les metabolites : signatures du metabolisme, au plus proche des phenotypes

Tout comme les autres sciences –omiques, la métabolomique peut s'appliquer aussi bien à l'étude d'un système simple qu'à des entités beaucoup plus complexes, et ce dans de nombreux domaines. Ainsi, étudier les métabolites présents dans une culture bactérienne peut servir à identifier de nouvelles molécules antibiotiques ou à comprendre des phénomènes de virulence ^{62–65}, de même que mesurer les métabolites présents dans l'urine des travailleurs permet le suivi de l'exposition aux agents toxiques ⁶⁶. La méta-métabolomique appliquée aux communautés microbiennes complexes permet quant à elle de mesurer les interactions entre les différentes espèces et leur environnement, qu'il s'agisse d'habitats océaniques ou du système digestif humain ^{67–69}.

L'avantage principal de la métabolomique sur ses prédécesseurs –omiques est qu'elle fournit un outil permettant de mesurer directement l'activité métabolique du système. Tandis que les gènes et les protéines sont soumis à des régulations épigénétiques ou posttraductionnelles, les métabolites sont les signatures directes du métabolisme et intègrent ainsi l'ensemble des influences internes et externes pouvant modifier le phénotype ^{24 18}.

Par ailleurs, le métabolisme étant un processus dynamique, il est également modulable, et peut dans certains cas compenser l'effet d'une mutation, la rendant silencieuse d'un point de vue phénotypique. Dans ce cas, les mutants sont phénotypiquement similaires aux non mutants, mais la manière d'exprimer leur phénotype (les réactions métaboliques engagées) est différente, et les concentrations des différents métabolites dans la cellule aussi ⁴⁴. Ainsi, observer un organisme sous l'angle de la métabolomique permet d'intégrer l'ensemble des variabilités génétiques et environnementales, ainsi que tous les niveaux de régulation post-génomiques (Figure 3) ⁵².



Figure 3. Sources de variation biologique pouvant contribuer à des phénotypes observables (traduit de ⁵²).

La métabolomique offre ainsi une lecture au plus proche du phénotype, et peut être utilisée efficacement pour le criblage de nouvelles molécules thérapeutiques, pour la découverte de biomarqueurs ou pour l'étude de processus physiologiques ou pathologiques fondamentaux 70,71 18.

2.3.3. LES METABOLITES : DES MOLECULES BIOACTIVES QUI INFLUENCENT LES PHENOTYPES

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les métabolites constituent des signatures fidèles du métabolisme et peuvent ainsi servir de biomarqueurs fiables de phénotypes pertinents. Mais pour beaucoup, ce sont aussi des **molécules actives**, pouvant elles-mêmes **moduler les voies métaboliques** de manière directe (substrats réactionnels) ou indirecte (activations, inactivations de gènes ou d'enzymes), et **influencer l'expression des phénotypes**. Ainsi, le criblage de métabolites bioactifs peut permettre de développer des stratégies de modification volontaire de phénotypes par l'induction ou la suppression de fonctions biologiques, avec des applications multiples, notamment dans le domaine médical ⁷².

Les **métabolites endogènes** peuvent agir à l'intérieur de la cellule à différents niveaux de régulation biologique. Pour citer quelques exemples, les interactions entre métabolites endogènes et protéines peuvent initier des cascades de réaction et ainsi favoriser la réponse cellulaire ⁷³. C'est ainsi que les diphényléthers polybromés (PBDE) peuvent modifier l'affinité entre hormones thyroïdiennes et protéines du sérum, car leurs produits de métabolisation sont chimiquement proches des ligands naturels de ces protéines ⁷⁴. Un autre exemple démontre l'effet direct du niveau du métabolite S-adenosyl-méthionine sur la méthylation des histones au sein de cellules souches embryonnaires humaines naïves, montrant ainsi que le niveau de certains métabolites peut avoir un impact direct sur le paysage épigénétique de cellules souches et guider leur différenciation lors du développement ⁷⁵. Ainsi, si l'importance de l'information génétique transmise en aval sur l'expression protéique reste indiscutée, l'influence vers l'amont des endométabolites sur les gènes, les transcrits ou les protéines est de plus en plus documentée.

Les métabolites sécrétés par une cellule ou une bactérie peuvent également interagir activement avec leur environnement. C'est ainsi par exemple que les bactéries du microbiote participent à l'acidification du pH des voies digestives, par la production d'acides gras à chaînes courtes durant la fermentation des glucides alimentaires ⁶⁰. A l'inverse, des métabolites présents à l'extérieur de la cellule peuvent impacter son métabolisme et par conséquent son expression phénotypique. Parmi les nombreux exemples documentés à ce jour, on pourra notamment citer le cas des **immunométabolites**, molécules capables d'induire une polarisation de la réponse immune. C'est ainsi que l'environnement nutritionnel des cellules T, notamment les concentrations en sucres, lipides et acides aminés, module la réponse de l'organisme durant les infections, les cancers et les maladies auto-immunes ⁷⁶. Ces modifications des conditions extracellulaires peuvent par ailleurs être provoquées par d'autres organismes symbiotiques ou infectieux. On explique ainsi qu'une modification du régime alimentaire peut, en modifiant les espèces majoritaires du microbiote intestinal, modifier également l'immunité systémique et l'inflammation chez l'hôte 77,78. De même, l'acide kynurénique, issu du catabolisme du tryptophane, peut être un médiateur précoce du recrutement des leucocytes, agissant en déclenchant l'activation des neutrophiles ^{79,80}. Dans le cadre infectieux, il a été démontré que la bactérie pathogène P. a. a le potentiel d'échapper à la réponse immunitaire innée en produisant des catabolites du tryptophane lui permettant d'interférer avec les défenses de l'hôte ^{81,82}.

En résumé, les métabolites se positionnent au centre du dialogue entre l'organisme et son environnement, à la fois signaux et signatures des activités métaboliques. Par opposition avec la génomique, la majeure partie de l'information obtenue dans une étude métabolomique est fonctionnelle : on sort de « l'arbre des possibles », on observe « ce qui est fait » ⁸³. La métabolomique offre ainsi un point de vue unique, au plus proche des phénotypes. Elle facilite la découverte de métabolites bioactifs ou de biomarqueurs, et s'impose depuis ces dernières années comme un **outil puissant pour l'étude de l'évolution adaptative des populations animales, végétales ou bactériennes** ^{84–87}.

La **métabolomique**, dernière-née des disciplines -omiques, consiste en une prise de vue instantanée du contenu en **métabolites** d'un système biologique.

Les métabolites sont eux-mêmes la signature du métabolisme, qui intègre l'ensemble des facteurs internes et externes pouvant influencer l'expression des phénotypes.

La métabolomique vient ainsi compléter le panel des outils –omiques existants, et permet ainsi **une vision holistique, au plus proche du phénotype** du système biologique étudié. **Elle constitue un point de vue particulièrement pertinent pour l'étude des processus d'évolution adaptative.**

3. ETUDIER L'EVOLUTION ADAPTATIVE AU LABORATOIRE

3.1. ÉVOLUTION ADAPTATIVE BACTERIENNE IN VITRO

Le règne bactérien offre un cadre idéal pour étudier ces processus adaptatifs *via* des expériences d'évolution en laboratoire. En effet, les bactéries peuvent être cultivées dans des conditions contrôlées, et leur temps de génération relativement court permet d'obtenir rapidement plusieurs générations successives de l'organisme étudié. Des représentants de ces différentes générations peuvent ensuite être conservées à froid et « réactivés » à volonté, permettant ainsi la conduite d'expériences sur différentes générations bactériennes en simultané ⁸⁸.

Faisant figure de référence, une expérience initiée en 1988 en collaboration avec une équipe grenobloise, a consisté à mettre en culture 12 clones d'une souche de référence d'*Escherichia Coli*, dans 12 flasques différentes contenant toutes un milieu de culture minimum additionné de glucose. Depuis ce jour, les cultures sont quotidiennement relancées dans de nouvelles flasques, et des échantillons représentatifs des populations évoluées sont congelés et conservés toutes les 500 générations. Cette expérience modèle a permis d'éclaircir de nombreux mécanismes évolutifs dans un cadre simplifié, sur plus de 50 000 générations bactériennes aujourd'hui ⁸⁹.

Une expérience d'évolution en laboratoire plus récente a consisté à étudier l'influence du métabolisme sur les comportements sociaux chez *P. a.*. Après avoir inactivé génétiquement un gène de régulation métabolique clé (*cbrA*), les auteurs ont synthétisé une souche mutante incapable de contrôler la sécrétion de rhamnolipides. Ces molécules sécrétées en grandes quantités induisent la formation d'une fine couche de surfactant, et permettent à des milliards de bactéries de se déplacer *via* un processus dit de fourmillement (*swarming*). Le *swarming* est donc un comportement social, et la production de rhamnolipides, hautement coûteuse en ressources, est normalement régulée par *P. a.* afin qu'ils ne soient produits que lorsque du carbone est disponible en excès dans le milieu. Le mutant délété de *cbrA* produit donc des quantités incontrôlées de rhamnolipides au détriment de sa propre croissance. En réalité, ce mutant qualifié d' « altruiste synthétique », produit de telles quantités de rhamnolipides qu'il permet en coculture à une autre souche de fourmiller, alors que son taux de croissance est si
faible qu'il en est lui-même incapable. En faisant évoluer ce mutant peu adapté en laboratoire, les auteurs ont pu suivre les modifications du génome, du métabolome et des phénotypes, et ont ainsi apporté une preuve expérimentale forte de l'implication du métabolisme dans l'évolution des comportements sociaux chez la bactérie ²¹.

Mais malgré les apports incontestables de ce type d'expérience, ces conditions d'évolution contrôlées en laboratoire restent éloignées du cadre naturel de l'évolution *in situ*, qui a souvent été dirigée par des événements, conditions et contraintes inconnues du passé ⁹⁰.

3.2. ÉVOLUTION ADAPTATIVE BACTERIENNE IN SITU

3.2.1. Les colonisations bacteriennes chroniques

Les colonisations bactériennes chroniques peuvent constituer une occasion rare d'étudier l'évolution adaptative *in situ*, car elles permettent le suivi simultané des populations bactériennes et de l'hôte. Pour une revue détaillée des études d'évolution intra-hôte de bactéries pathogènes causant des infections chroniques, le lecteur pourra se référer à Didelot et al. 2016 ⁹¹. Brièvement, l'étude de ce type de colonisations chroniques a par exemple permis de démontrer chez la souris, que les adaptations métaboliques de l'hôte en réponse à l'infection par le pathogène *Citrobacter rodentium* peuvent diriger la sélection de variants de virulence atténuée, et ainsi diriger l'évolution bactérienne chez l'hôte ⁹². Chez l'homme, il a été démontré que les modifications du pH gastrique de l'hôte au cours des infections chroniques par la bactérie *Helicobacter pylori* dirigent également l'adaptation bactérienne ⁹³.

D'autres exemples d'études de l'évolution adaptative bactérienne au travers des colonisations chroniques ont porté sur la bactérie *Staphylococcus aureus*, qui a la capacité de coloniser de multiples niches chez l'homme. Selon la niche occupée, cette bactérie pourra être portée de manière asymptomatique, par exemple dans la zone naso-pharyngée, ou provoquer des infections chroniques persistantes, par exemple dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose ⁹⁴. D'autres pathogènes sont par ailleurs capables de provoquer des infections pulmonaires chroniques chez les patients mucoviscidosiques, qui deviennent malgré eux un modèle pour l'étude de l'évolution adaptative bactérienne *in situ*. Certaines de ces études ont notamment porté sur les bactéries du complexe *Burkholderia (Bcc*, pour

Burkholderia cepacia complex) ⁹⁵, mais la plus largement étudiée aujourd'hui est certainement *P. a.*, qui fera l'objet d'une attention particulière dans ce manuscrit.

3.2.2. Le cas des infections pulmonaires chroniques a Pseudomonas aeruginosa chez les patients atteints de mucoviscidose

Une occasion rare d'étudier l'évolution bactérienne dans un cadre naturel est donnée par les la fréquente colonisation des voies respiratoires par P. a. chez les patients atteints de mucoviscidose ⁹⁶. Ces colonisations chroniques de la plupart des patients atteints de mucoviscidose s'accompagnent d'épisodes d'exacerbation, sont responsables d'une inflammation chronique délétère pour les fonctions respiratoires et peuvent donc être considérées comme des infections chroniques. Elles sont suivies de près en clinique, donnent lieu à des prélèvements réguliers chez les patients, et à la conservation d'isolats représentatifs de la population à différents temps de cette colonisation durable ⁹⁷. L'existence de telles banques de souches permet ainsi d'étudier l'évolution bactérienne dans un cadre évolutif naturel et complexe (l'environnement pulmonaire mucoviscidosique), en comparant des isolats représentatifs de différents stades d'évolution d'un même clone ayant initié cette infection chronique ⁹⁶. De plus, l'accès aux historiques médicaux des patients colonisés donne des informations sur les événements de santé majeurs ayant pu induire une modification de l'environnement dans lequel a évolué la population bactérienne. Enfin, l'importance clinique des infections à P. a., première cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose, ainsi que le manque de solutions thérapeutiques efficaces du fait de son haut potentiel de résistance aux antibiotiques en font un sujet de recherche prioritaire ⁹⁸.

En résumé, l'**évolution adaptative** des populations est dirigée par les phénotypes, de par la sélection naturelle des individus les plus adaptés. Ces phénotypes résultent de l'**intégration simultanée de signaux intrinsèques et extrinsèques** en provenance du génome et de l'environnement par le **métabolisme**.

Le développement des méthodes d'analyse biologique à haut débit (-omiques) permettent aujourd'hui l'étude approfondie des organismes et des processus d'évolution adaptative des populations. Parmi les disciplines -omiques existantes, **la métabolomique offre une vision au plus proche du phénotype**, ce qui en fait un outil puissant pour l'étude de l'évolution adaptative des organismes à leur environnement.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour étudier l'évolution adaptative au laboratoire, en particulier chez les bactéries *via* des expériences *in vitro* ou par le suivi de colonisations bactériennes chroniques chez l'animal ou l'homme. Le cas particulier des infections pulmonaires chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose constitue un modèle rare pour étudier l'évolution adaptative bactérienne en conditions naturelles.

Dans le chapitre à venir, nous présenterons les informations nécessaires à la compréhension des problématiques liées à la mucoviscidose et à *Pseudomonas aeruginosa*, avant d'exposer les éléments connus de l'évolution adaptative de *P. a.* survenant au cours de ces infections chroniques. Nous démontrerons ensuite en quoi la métabolomique constitue un outil particulièrement adapté pour l'étude de l'évolution adaptative intra-hôte de ce pathogène. Enfin, nous présenterons comment ce travail de thèse vise à mieux comprendre cette adaptation par une approche intégrée combinant mesures cliniques, phénotypiques et métabolomiques, réalisées dans des conditions proches de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique.

INTRODUCTION

1. LA MUCOVISCIDOSE

1.1. EPIDEMIOLOGIE

Chez les caucasiens, la mucoviscidose est la plus fréquente des maladies à transmission autosomique récessive mortelles, avec un nouveau-né touché sur 2500 en Europe. On estime à environ 7000 le nombre de malades en France, 100 000 dans le monde, avec une répartition géographique hétérogène des cas due à une distribution ethnique variable des mutations pouvant causer la maladie ^{99,100}. Aux Etats-Unis par exemple, on compte environ 30 000 personnes atteintes de mucoviscidose, avec une prévalence de 1 sur 2500-3500 chez les caucasiens, 1 sur 4000-10 000 chez les hispaniques, 1 sur 15 000–20 000 chez les africains-américains et 1 sur 100 000 chez les américains d'origine asiatique ¹⁰¹.

L'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose, qui était encore inférieure à 10 ans au début des années 1970, est aujourd'hui supérieure à 50 ans en Europe et aux Etats-Unis ^{96,102,103}. Cette augmentation de la durée de vie traduit les avancées importantes de la recherche, dues notamment aux efforts de mutualisation des données cliniques et d'organisation pluridisciplinaire des soins. La tenue de registres nationaux et internationaux de suivi des patients notamment, constitue une ressource précieuse pour la recherche et l'amélioration des soins ¹⁰⁴. D'autre part, l'organisation pluridisciplinaire de la prise en charge clinique dans des centres dédiés, comme les Centres de Ressource et de Compétences en Mucoviscidose (CRCM) en France, a permis une meilleure intégration des différents aspects de la maladie et de son traitement, en impliquant à la fois le patient et les soignants (pneumologues, diabétologues, kinésithérapeutes...) ¹⁰⁵. Par ailleurs, la meilleure connaissance des différentes mutations pouvant être à l'origine de la mucoviscidose a permis la mise en place d'un dépistage néonatal systématique dans de nombreux pays, permettant ainsi une prise en charge du patient dès sa naissance. Elle a également ouvert de nouvelles pistes thérapeutiques visant à corriger l'effet de certaines mutations, à l'image des thérapies protéiques telles que l'Ivacaftor ¹⁰⁶. Enfin, elle a permis le diagnostic parfois tardif de formes cliniquement moins sévères de la maladie, expliquant ainsi en partie l'augmentation de la survie médiane ¹⁰⁷.

Cette diminution de la mortalité a pour conséquence directe un vieillissement de la population mucoviscidosique, avec aujourd'hui une majorité de patients âgés de plus de 18 ans en France et dans de nombreux pays occidentaux ^{100,108}. Cette avancée en âge fait émerger de nouvelles problématiques dans la prise en charge des patients, avec notamment l'apparition d'infections pulmonaires chroniques par des microorganismes résistants aux antibiothérapies, ou encore avec les difficultés d'accès à la parentalité pour une grande partie des patients adultes.

1.2. BASES MOLECULAIRES DE LA MALADIE

La mucoviscidose est une maladie monogénique à transmission autosomique récessive. Elle se déclare lorsque les sujets héritent de deux copies défectueuses du gène codant la protéine *Cystic Fibrosis Transductance Regulator* (CFTR). Le CFTR est une protéine transmembranaire dont la fonction primaire est le transport des ions chlorure à travers la membrane apicale des cellules épithéliales. On compte plus de 2000 mutations du gène *cftr* identifiées à ce jour. Parmi elles, 159 sont trouvées chez plus de 0,01 % des patients recensés dans les registres de la mucoviscidose en Europe et en Amérique du Nord, dont 127 ont été confirmées comme causant la mucoviscidose ¹⁰⁹. La plus fréquente, *F508del*, est retrouvée chez 80 % des malades en France ¹⁰⁰.

Dans tous les cas, les mutations du gène *cftr* à l'origine de la mucoviscidose conduisent à une absence ou une diminution de la fonctionnalité du canal CFTR. Plusieurs systèmes de classification de ces mutations ont été proposés, basés sur l'effet fonctionnel de la mutation, la sévérité clinique de la maladie ou les thérapies correctives possibles. Généralement, on distingue les mutations sévères, qui conduisent à une absence de la protéine CFTR à la membrane cellulaire ou à une perte de sa fonction (classes I, II, III), des mutations moins sévères pour lesquelles la protéine est présente mais ne remplit que partiellement son rôle de canal ionique (classes IV, V, VI) (Figure 4). La mutation *F508del* est une mutation de classe II, c'est à dire caractérisée par un mauvais repliement de la protéine et un défaut de transport jusqu'à la membrane 1^{10–113}.



Figure 4. Classification traditionnelle des mutations du gène cftr selon leurs conséquences sur les phénotypes cellulaires ¹¹⁰.

Classe I : la protéine CFTR n'est pas synthétisée ; classe II : la protéine n'est pas correctement maturée et n'est pas ou peu acheminée jusqu'à la membrane ; classe III : la protéine est présente à la membrane mais ne remplit pas son rôle de canal ionique ; classe IV : la conductance du canal est diminuée ; classe V : la quantité de protéine à la membrane est diminuée ; classe VI : la stabilité de la protéine est diminuée.

ER : endoplasmic reticulum (réticulum endoplasmique) ; TGN : trans-Golgi network (réseau trans-Golgi)

1.3. COMPLICATIONS EXTRA-PULMONAIRES

La mucoviscidose touche l'ensemble des tissus où le canal CFTR est fortement exprimé et ses manifestations sont multiples. Si l'insuffisance respiratoire reste aujourd'hui la principale cause de mortalité et de morbidité de la maladie, les symptômes extra-pulmonaires peuvent eux aussi considérablement impacter la qualité de vie des patients. Ce paragraphe donne un aperçu des complications extra-pulmonaires les plus fréquentes, et les problèmes respiratoires seront développés plus loin.

Parmi les nombreuses complications reconnues de la maladie, le système digestif est particulièrement touché. On pourra citer notamment l'insuffisance pancréatique et le reflux gastro-œsophagien, qui concernent respectivement près de 80 et 20 % des patients en France ¹⁰⁰. La reconnaissance précoce de ces complications dans le suivi pédiatrique est vitale, la malnutrition ayant été prouvé être un prédicteur d'une fonction respiratoire altérée chez l'enfant et d'un mauvais pronostic de survie chez l'adulte ^{114,115}.

La fonction pancréatique exocrine est également altérée chez plus de 80 % des patients. Le diabète lié à la mucoviscidose, cliniquement distinct des diabètes de type I et II, est de plus en plus commun avec l'avancée en âge des patients, et touche aujourd'hui près de 20 % des malades en France ¹¹⁶. Les complications hépatiques telles que l'élévation des enzymes et l'apparition de cirrhose biliaire sont également non négligeables ¹⁰⁰.

Par ailleurs, le système reproducteur est également touché, avec 98 % des patients de sexe masculin souffrant d'une absence des canaux déférents conduisant à une azoospermie. Malgré tout, les progrès de l'aide médicale à la procréation permettent désormais à ces hommes l'accès à la paternité ¹¹³.

Parmi les autres complications fréquentes de la mucoviscidose, on pourra citer l'obstruction intestinale distale, les pathologies osseuses, ou encore la surdité totale ou partielle. Ajoutés aux importants symptômes respiratoires, elles font de la mucoviscidose une maladie difficile pour les patients et leur famille, et peuvent conduire à l'apparition de syndromes dépressifs ¹⁰⁰.

1.4. COMPLICATIONS RESPIRATOIRES

1.4.1. UN SYSTEME DE DEFENSE ALTERE

Le défaut de transport des ions chlorure (Cl⁻) causé par les mutations du canal CFTR entraîne une déshydratation et un épaississement du mucus qui tapisse les voies respiratoires. Ce mucus anormalement visqueux empêche la réalisation du processus de clairance mucociliaire en empêchant l'action de nettoyage réalisée par les cils vibratiles présents à la surface des cellules épithéliales. Il ne remplit alors plus son rôle de protection des voies aériennes contre les agressions extérieures, favorisant l'apparition d'infections pulmonaires opportunistes, qui elles-mêmes induisent une réponse inflammatoire importante de l'hôte (Figure 5) ^{96,117}. De plus, le CFTR défectueux conduit à une absence de sécrétion de bicarbonate et une acidification des voies aériennes pouvant rendre inefficaces les défenses innées hautement sensibles au pH ¹¹⁸.

Les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose sont donc particulièrement sensibles aux infections, qui constituent la principale cause de mortalité et de morbidité dans la mucoviscidose ⁹⁶.



Figure 5. Les défauts de clairance mucociliaire dans les voies respiratoires dus à la mucoviscidose créent des opportunités de colonisations microbiennes (adapté de ⁹⁶). Les cellules caliciformes et les glandes sub-mucosales produisent une couche de mucus à la surface de l'épithélium. Chez les individus sains, les cils vibratiles des cellules épithéliales peuvent efficacement éliminer les particules ou cellules microbiennes piégées dans le mucus, c'est la clairance mucociliaire. Chez les patients atteints de mucoviscidose, le mucus est anormalement épais et visqueux et les cils ne peuvent remplir leur rôle de nettoyage, entraînant la colonisation des voies aériennes par des bactéries telles que *P. a.*. La réponse immunitaire médiée par les polynucléaires neutrophiles et anticorps induit des dommages aux tissus pulmonaires. En cicatrisant, ces dommages vont conduire au développement d'une fibrose et à la détérioration des fonctions respiratoires.

1.4.2. INFECTIONS ET MICROBIOTE PULMONAIRE MUCOVISCIDOSIQUE

La flore microbienne du tractus respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose représente un écosystème complexe et diversifié dans lequel de multiples espèces coexistent ¹¹⁹. Si la présence d'un microbiote associé aux voies respiratoires supérieures a été mise en évidence chez les individus sains, la mucoviscidose se caractérise par l'existence d'un microbiote pulmonaire profond. De plus, la rhinosinusite chronique est extrêmement répandue chez ces patients et les infections sinusales persistantes peuvent constituer un réservoir infectieux pour les voies respiratoires inférieures ^{120,121}. La majorité des études des infections associées à la mucoviscidose se focalise sur les pathogènes les plus fréquents, notamment *Pseudomonas aeruginosa (P. a.), Staphylococcus aureus (S. a.), Haemophilus influenzae* ou les espèces du complexe *Bcc* ¹²².

En clinique, les infections pulmonaires sont généralement diagnostiquées par des méthodes de culture d'échantillons d'expectoration ou de lavages broncho-alvéolaires ¹²³. Les résultats sont ensuite rassemblés dans les bases de données des registres nationaux ou internationaux, permettant le suivi épidémiologique des principaux pathogènes de la mucoviscidose ¹¹⁷. On observe une dominance de la bactérie *S. a.* chez l'enfant, et une augmentation progressive de la prévalence de *P. a.* avec l'âge des patients. Chez le jeune adulte, la tendance s'inverse et *P. a.* devient majoritaire, au détriment de *S. a.* et des autres pathogènes (Figure 6). Extrêmement difficile à éradiquer du fait de sa haute capacité de résistance aux antibiotiques, *P. a.* est responsable d'infections chroniques persistantes et est aujourd'hui le pathogène le plus fréquemment isolé dans les expectorations des patients adultes ^{96,124}.



Figure 6.Prévalence des pathogènes respiratoires de la mucoviscidose les plus fréquents en fonction de l'âge ⁹⁶.

S. a. est le pathogène plus fréquemment isolé chez les enfants, *P. a.* chez les adultes. *MRSA : Multi-resistant Staphylococcus aureus, MDR-PA : Multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa*

Des analyses plus poussées du microbiote pulmonaire de patients confirment l'influence majeure de *P. a.* sur la structure de la communauté ¹²⁵. Une corrélation négative entre la présence de *P. a.* et celle de nombreux autres microorganismes a notamment été mise en évidence, suggérant de nombreuses interactions compétitives en faveur de *P. a.* Par ailleurs, ces études suggèrent une richesse et une complexité diminuée des populations microbiennes peuplant les poumons de patients chez qui l'on observe un déclin important des fonctions respiratoires au fil des années, comparativement aux patients jugés « stables » ^{126,127}. Ces résultats démontrent l'importance clinique de ces infections respiratoires, notamment par la bactérie *P. a.*, dans l'évolution de la pathologie respiratoire associée à la mucoviscidose ^{96,124}.

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* feront l'objet d'une attention particulière dans le chapitre suivant.

1.4.3. INFLAMMATION

Ces infections pulmonaires du poumon mucoviscidosique induisent une réponse inflammatoire importante de l'hôte, qui participe elle-même à l'aggravation des symptômes respiratoires ¹¹⁷. Certaines molécules produites notamment par *P. a.* telles que les pilines, flagellines, l'ADN, les lipopolysaccharides et les molécules du *quorum sensing* conduisent à une reconnaissance de la bactérie par les cellules de l'hôte. La réponse pro-inflammatoire engendrée par le relargage de cytokines conduit au recrutement massif de neutrophiles pour combattre l'infection ¹²⁸. Ces neutrophiles sont cependant peu efficaces pour éliminer *P.a.,* et libèrent des molécules actives (élastases, collagénases, radicaux libres), qui vont induire une inflammation chronique et provoquer des dommages aux tissus pulmonaires. Ils auront également comme effet délétère de réduire la clairance mucociliaire, conduisant à une augmentation de la charge bactérienne et une exacerbation du cycle défaut immunitaire – infection – inflammation (Figure 7) ^{117,129}.



Figure 7. Cycle par lequel l'infection pulmonaire par une bactérie opportuniste (ici, P. a.) conduit à une inflammation chronique non résolue et à l'apparition progressive de lésions pulmonaires irréversibles chez les patients atteints de mucoviscidose ¹¹⁷.

En plus de causer des dommages directs aux tissus pulmonaires, *P. a.* exprime des facteurs de virulence qui sont reconnus par le système immunitaire, induisant le relargage de cytokines proinflammatoires et le recrutement massif de neutrophiles. Ces neutrophiles vont produire des élastases, collagénases et radicaux oxygénés qui vont eux-mêmes induire des dommages aux tissus pulmonaires, mais également réduire la clairance mucociliaire, ce qui provoquera une augmentation de la charge bactérienne et l'exacerbation du cycle.

1.4.4. DECLIN PROGRESSIF DES FONCTIONS RESPIRATOIRES

L'état de santé respiratoire des patients atteints de mucoviscidose a été modélisé comme la superposition de deux processus : l'évolution chronique de la maladie, lors de laquelle la santé du patient évolue lentement vers un déclin progressif au fil des années ; et les exacerbations, épisodes aigus de détérioration clinique distribuées dans le temps de manière aléatoire (Figure 8) ¹³⁰.



Figure 8. Représentation schématique du processus d'évolution de l'état de santé d'un patient atteint de mucoviscidose, depuis l'enrôlement, au travers de plusieurs examens cliniques annuels, et jusqu'à son décès ¹³⁰.

L'axe vertical représente l'indicateur de santé mucoviscidosique modélisé par Aaron et al. ; l'axe horizontal représente la durée de vie du patient. Le processus composite consiste en la superposition du processus pathologique chronique et des processus d'exacerbation.

En cicatrisant, les dommages induits par les infections et l'inflammation non résolue conduisent au développement progressif d'une fibrose pulmonaire irréversible. On observe également une pathologie obstructive due à l'accumulation de mucus dans la lumière des voies aériennes ¹¹³. En conséquence, la fonction respiratoire des patients est sévèrement impactée, et diminue progressivement avec l'âge et l'avancée de la maladie. Elle est également significativement plus basse chez les patients ayant un Indice de Masse Corporelle (IMC) inférieur à la norme ou souffrant d'insuffisance pancréatique ou de diabète associé à la mucoviscidose, ainsi que chez les patients souffrant d'infection pulmonaire à *P. a.* ^{131–133}.

Différentes méthodes permettent d'étudier la gravité de l'atteinte respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose : exploration fonctionnelles respiratoires, imagerie ; LCI (Lung Clearance Index) ou encore questionnaires de qualité de vie ¹⁰⁸. Aujourd'hui, les mesures de Volume Expiratoire Maximum en 1 Seconde (VEMS) constituent le meilleur outil de pronostic et de suivi chez les adultes ^{130,134–138}.

1.4.5. EXACERBATIONS

Une des caractéristiques de la mucoviscidose est la survenue aléatoire d'épisodes d'exacerbation, venant entrecouper l'état basal relativement stable de la maladie ¹³⁰. Bien que plusieurs définitions aient été avancées, ces crises aiguës sont généralement caractérisées par une aggravation des symptômes respiratoires (augmentation de la toux, de l'encombrement, du volume et de la purulence des crachats, de la gêne respiratoire, hémoptysie nouvelle ou augmentée, sensibilité et modification des écoulements sinusaux, diminution du VEMS de 10 % ou plus par rapport à une valeur précédemment enregistrée) pouvant être accompagnée d'une altération de l'état général (anorexie ou perte de poids, asthénie, malaise ou léthargie) et de symptômes témoignant d'une surinfection pulmonaire (radiographie pulmonaire, élévation du taux de neutrophiles sanguins, température supérieure à 38°C) ^{139–141}. Souvent lourdes de conséquences cliniques, les exacerbations peuvent conduire au décès lorsqu'elles conduisent l'état de santé du patient sous un certain seuil (Figure 8) ¹³⁰. Elles nécessitent ainsi une prise en charge rapide par antibiothérapie orale, puis intraveineuse si les symptômes persistent ou s'aggravent après quelques jours ¹⁴².

Ces crises infectieuses transitoires sont probablement liées à la survenue d'une dysbiose dans la relation complexe entre les défenses de l'hôte et son microbiote pulmonaire ^{139,140}. En 2013, Twomey et son équipe ont mené une étude d'envergure afin de mesurer dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, les différences de profils métaboliques et microbiotiques d'échantillons prélevés pendant ou en dehors des phases d'exacerbation. L'étude du microbiote a permis de mettre en évidence une diminution importante de la diversité microbienne au sein des échantillons « exacerbation » comparés aux échantillons prélevés en phase stable. Cette diminution de la richesse bactérienne est accompagnée d'une plus faible variabilité des communautés microbiennes entre les patients, et de la prédominance de certaines espèces à l'image de *P .a.*, largement majoritaire chez tous les échantillons ont montré une augmentation significative des taux de pyruvate, lactate et putrescine et une diminution du palmitate dans les expectorations du groupe « exacerbation ». Ces modifications métaboliques, hautement corrélées avec l'abondance d'espèces du genre *Pseudomonas* et *Chrysiogenales*, montrent que les espèces microbiennes

peuplant les voies respiratoires peuvent de manière directe ou indirecte modifier la composition chimique de l'environnement pulmonaire du patient, et notamment augmenter les taux de métabolites liés à l'inflammation ¹⁴³.

1.5. INFECTIONS A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LA MUCOVISCIDOSE

La prise en charge de la mucoviscidose a considérablement évolué durant ces dernières décennies, et l'espérance de vie des patients est passée de 8 ans en 1974 à près de 50 ans aujourd'hui ⁸⁷. Cependant, ces traitements antibiotiques prolongés ont eu pour effet de sélectionner, parmi les différentes espèces présentes dans le microbiote pulmonaire des patients, celles qui avaient la capacité de résister à ces traitements, et *P. a.* s'est imposé comme un pathogène majeur de la maladie. Associées au déclin progressif des fonctions respiratoires, à la survenue des exacerbations et à l'inflammation, les infections à *P. a.* sont considérées comme la principale cause de morbi-mortalité dans cette maladie ^{132,133,144,145}.

1.5.1. INFECTIONS AIGUËS

Habituellement, les premières années de la vie du patient sont marquées par des infections ponctuelles récurrentes efficacement traitées par antibiothérapie. Durant cette période, le patient est fréquemment ré-infecté par de nouvelles souches de *P. a.* provenant d'une source environnementale nouvelle ou persistante, ou par contamination croisée avec d'autres patients atteints de mucoviscidose ^{96,146}. Il a également été mis en évidence que les voies aériennes supérieures peuvent constituer un réservoir protégé pour la bactérie, ainsi qu'une porte d'entrée pour de futures infections pulmonaires ^{147,148}.

Lors de la primo-colonisation, *P. a.* doit rapidement s'adapter à son nouvel environnement. A ce stade précoce, l'expression de facteurs de virulence sécrétés ou associés à la cellule est considérée fondamentale pour le succès de l'établissement de l'infection. Ils comprennent entre autres l'expression du système de sécrétion de type 3 (SST3) qui injecte des toxines directement dans la cellule cible, du flagelle qui permet la motilité dite *swimming*, des pili de type IV qui facilitent l'adhésion aux muqueuses, la sécrétion de pyoverdine, hémolysine et phospholipase C et l'activation du *quorum sensing* (QS) permettant aux bactéries de coopérer entre elles. Les principaux facteurs de virulence de *P. a.* seront détaillés dans le chapitre suivant (paragraphe 2.2.2, p. 55).

Durant cette phase d'infection aiguë, *P. a.* a un potentiel de virulence élevé mais est encore sensible à certains antibiotiques et son éradication par antibiothérapie intensive est encore possible. Cependant, dans 20 % des cas, le traitement échoue et l'infection devient chronique, et persiste jusqu'à la fin de la vie du patient ¹⁴⁹.

1.5.2. INFECTIONS CHRONIQUES

Chez la grande majorité des patients, cette phase de colonisation intermittente par *P. a.* laisse tôt ou tard la place à une nouvelle phase de colonisation chronique clonale. Cette infection chronique est caractérisée par la croissance continue de *P. a.* dans les sécrétions bronchiques, et par la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des patients. Elle est corrélée à une augmentation du niveau d'inflammation et du taux de neutrophiles comparativement aux individus colonisés de façon intermittente, et participe au cycle de non résolution de l'inflammation chronique décrit plus haut.

L'association entre infection à *P. a.* et diminution de la fonction respiratoire a été largement documentée ^{130–132}. Par ailleurs, cette association est plus importante lorsque le statut d'infection est défini comme « infection chronique » plutôt que « *P. a.* détecté au moins une fois », soulignant ainsi l'importance clinique de cette infection chronique ¹³¹.

Durant cette infection chronique, *P. a.* évolue pour s'adapter aux conditions spécifiques de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique.

Les éléments connus de cette évolution adaptative *in situ* seront développés dans la section 3 de cette Introduction (p. 62).

1.6. Prise en charge de la pathologie respiratoire associee a la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie héréditaire grave pour laquelle beaucoup de progrès ont été réalisés ces dernières années, notamment dans le domaine des stratégies thérapeutiques visant à corriger la protéine défectueuse (CFTR). Mais ces stratégies protéiques ne concernent que peu de patients, et pour la plupart d'entre eux la prise en charge, certes améliorée, reste symptomatique.

L'accent est mis notamment sur le suivi des patients dans des structures pluridisciplinaires à l'image des CRCM français ¹⁰⁵. Globalement, les soins consistent essentiellement à fluidifier les secrétions muqueuses épaisses, favoriser leur drainage par le biais du sport et ou de la kinésithérapie, et à prévenir et traiter les épisodes infectieux par antibiothérapie. Ces traitements pluriquotidiens peuvent durer plusieurs heures par jour, avec un impact net sur la qualité de vie des patients, pouvant rendre difficile l'observance au long cours. Des efforts sont également faits pour prévenir les contaminations inter-patients et depuis les sources environnementales, par exemple par l'information des patients au respect d'une hygiène de vie drastique ^{150,151}.

1.6.1. TRAITEMENT DES INFECTIONS RESPIRATOIRES

Dans la mucoviscidose, des antibiothérapies conventionnelles sont prodigués à la fois dans un but de prévention des infections, d'éradication des infections aiguës, de traitement des exacerbations et de contrôle des infections chroniques, notamment à *P. a.* ^{123,152}.

Après une première détection de *P. a.,* un traitement combiné d'antibiotiques aérosolisés et oraux ou intraveineux est le plus souvent administré dans le but d'éradiquer la bactérie ¹²³. Malheureusement dans 20 % des cas, la bactérie résiste à ce traitement intensif et s'établit durablement dans les voies aériennes du patient. Chez les patients infectés de manière chronique par *P. a.,* des inhalations d'antibiotiques aérosolisés tels que la tobramycine, l'aztreonam ou la colistine ont démontré leur efficacité pour réduire la pente du déclin respiratoire, diminuer les exacerbations et favoriser la prise de poids ^{153–155}. Bien qu'ayant largement contribué à l'augmentation de la durée et de la qualité de vie des patients, l'efficacité à long terme de ces traitements est mise à mal par la capacité de *P. a.* à développer

des résistances à l'ensemble des antibiotiques connus aujourd'hui. Cet aspect sera développé dans la section 2.2.3 (p. 59). Rares sont les études ayant cherché à évaluer l'efficacité de ces traitements sur d'autres infections bactériennes communes dans la mucoviscidose ¹⁵⁶.

1.6.2. Therapies geniques, therapies proteiques : un premier pas vers le curatif ?

En 1989, l'identification du gène à l'origine de la mucoviscidose, *cftr*, a donné lieu à plusieurs publications simultanées dans le magazine *Science*, et a immédiatement fait naître l'espoir de développer des traitements curatifs traitant la cause de la maladie ^{157–159}. Mais bien que cette découverte ait permis une meilleure compréhension de la pathologie, les premiers traitements ciblés pour corriger les effets des mutations du *cftr* ne sont disponibles que depuis quelques années.

Ces nouvelles thérapies protéiques ont pour objectif de corriger directement les effets de certaines mutations, en restaurant l'activité de la protéine CFTR défectueuse. Le premier d'entre eux à avoir été mis sur le marché est l'Ivacaftor, un potentiateur du canal CFTR chez les patients présentant une mutation de classe III ¹⁰⁶. Ce traitement a démontré des effets bénéfiques significatifs chez les patients portant ce type de mutations : amélioration de la fonction respiratoire, diminution de la fréquence des exacerbations, gain de poids ¹²³. Depuis, d'autres stratégies protéiques associent le potentiateur Ivacaftor avec des correcteurs de première ou de deuxième génération, qui visent à augmenter la quantité de protéines à la membrane. On citera notamment l'association de l'Ivacaftor avec le correcteur de première génération Lumacaftor (commercialisé sous le nom Orkambi) pour les patient porteurs d'une mutation *F508del*, puis avec le correcteur de deuxième génération Tezacaftor ^{160–163}. Plus récemment, des stratégies de triple modulation associant deux correcteurs à un potentiateur ont démontré une bonne efficacité et une faible toxicité lors d'essais cliniques de phase 2 ^{164,165}.

Des développements sont aujourd'hui en cours pour trouver des traitements efficaces sur l'ensemble des mutations causant la mucoviscidose, notamment par le biais de la thérapie génique. Un essai de phase 2 a notamment mis en évidence un bénéfice léger mais significatif de l'administration par aérosol de plasmides contenant des copies du gène *cftr* fonctionnel complexés à un liposome ¹⁶⁶. Mais si ces nouvelles stratégies à visée curative constituent un

52

espoir majeur pour les patients, aujourd'hui aucune thérapie génique ne bénéficie d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), et des thérapies protéiques ne sont disponibles que pour les patients porteurs d'une mutation de classe III.

1.6.3. DERNIER RECOURS : LA GREFFE PULMONAIRE

Malgré les progrès effectués, la morbidité et la mortalité dues aux complications respiratoires de la mucoviscidose restent aujourd'hui très lourdes.

La transplantation pulmonaire est le dernier recours actuel recommandé pour les patients souffrant d'insuffisance respiratoire en phase terminale. Bien que toujours risquée, le bénéfice de cette procédure est désormais de plus en plus évident avec une survie médiane post-greffe dépassant les 10 ans dans de nombreux centres. La principale cause d'échec thérapeutique est la dysfonction chronique du greffon (CLAD, *pour Chronic Lung Allograft Dysfonction*) dont la principale expression est la bronchiolite oblitérante (BOS pour *Bronchiolitis Obliterans Syndrome*) dans 80 % des cas et le syndrome restrictif d'allogreffe (RAS pour *Restricive Allograft Syndrome*), considérée comme une forme de rejet chronique de la greffe ¹⁶⁷.

Aujourd'hui en France, la mucoviscidose représente la 2^{ème} cause d'indication de transplantation pulmonaire, avec plus de 700 patients adultes vivant avec une greffe et 150 autres en attente sur liste. Des prises en charges spécifiques sont à envisager pour le traitement de ces patients, en moyenne plus âgés que le reste de la population mucoviscidosique, avec généralement un état nutritionnel plus sévère, et une condition respiratoire améliorée suite à l'intervention ¹⁶⁸.

2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

2.1. UN BACILLE VERSATILE

P. a. est un bacille à Gram négatif ayant la capacité de coloniser de nombreuses niches écologiques. Ubiquitaire dans l'environnement, *P. a.* est souvent retrouvée dans les sols, les eaux, les plantes et autres zones humides ¹⁶⁹. Il peut également coloniser les surfaces et dans certains cas causer des infections chez l'homme, avec de multiples tropismes (les poumons, la peau, le sang, la cornée, entre autres) ¹⁷⁰.

Le secret de sa versatilité réside essentiellement dans son génome, particulièrement grand (6,3 millions de paires de bases), et sa plasticité génétique (plus de 8 % de son génome code pour des régulateurs globaux), lui permettant d'utiliser de nombreuses sources d'énergie et de carbone et de résister à de nombreux stress ¹⁷¹.

2.2. PATHOGENICITE

2.2.1. INFECTIONS OPPORTUNISTES ET SANTE PUBLIQUE

Pathogène opportuniste, *P a.* peut provoquer des infections chez l'homme lorsque ses défenses sont altérées. Elle peut notamment causer des infections sévères chez les grands brûlés, ou des infections pulmonaires chez les patients admis en unités de soins intensifs et chez les patients atteints de mucoviscidose ¹⁷⁰. Particulièrement problématique dans les hôpitaux, *P. a.* est capable de résister aux produits désinfectants, et colonise ainsi les surfaces, matériels médicaux et mains du personnel soignant, et est l'un des principaux agents responsables d'infections nosocomiales ^{169,172}. L'émergence et la propagation continue de souches résistantes aux antibiotiques rendent le traitement de ces infections toujours plus difficile, et leur taux de mortalité est particulièrement élevé ^{173,174}.

P. a. a ainsi été classée parmi le groupe ESKAPE (<u>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus,</u> <u>Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa</u>, et les espèces du genre <u>Enterobacter</u>) des 6 pathogènes les plus menaçants en termes de santé publique ^{98,175,176}. Plus récemment, *P. a.* a été classée comme « **pathogène critique** » sur la « Liste de priorités mondiales de bactéries résistantes aux antibiotiques pour guider la recherche, la découverte et le développement de nouveaux antibiotiques » publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2017¹⁷⁷.

2.2.2. PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE

P. a. possède un arsenal de facteurs de virulence, qui seront plus ou moins exprimés selon le type d'infection ¹⁷⁸.

2.2.2.1. Les systèmes de sécrétion de P. aeruginosa

P. a. possède notamment 5 des 6 systèmes de sécrétion retrouvés chez les bactéries à Gram négatif. Ces machineries protéiques permettent l'export de molécules dans le milieu extracellulaire ou directement dans la cellule de l'hôte qu'elle infecte, et peuvent ainsi jouer un rôle dans la pathogénicité bactérienne (Figure 9) ¹⁷⁹.

Le plus important d'entre eux est le système de sécrétion de type 3 (SST3), également appelé injectisome, dont l'expression est associée à un mauvais pronostic chez les patients infectés ^{179,180}. Il s'agit d'un assemblage protéique formant une seringue moléculaire, qui permet à la bactérie d'injecter des toxines directement dans le cytoplasme des cellules hôtes. Les 4 exotoxines ExoS, ExoT, ExoY et ExoU sécrétées par le SST3 de P. a. sont exprimées de manière variable dans les différentes souches bactériennes. Si les gènes *exoY* et *exoT* sont retrouvés dans une majorité de souches, la quasi-totalité d'entre elles porte soit le gène exoS, soit le gène exoU, mais pas les deux. Ainsi, les protéines effectrices sécrétées définissent le phénotype d'une souche lors de l'infection, provoquant chacun un mécanisme de mort cellulaire propre. Ainsi, ExoU provoque une lyse membranaire rapide (moins de 2 heures) suivie d'une mort par nécrose. ExoS quant à elle, et dans une moindre mesure ExoT, entraînent une mort cellulaire retardée par apoptose, en détruisant les filaments d'actine qui entourent le cytosquelette de la cellule hôte. L'impact clinique de la présence d'ExoY n'a quant à elle pas été clairement démontrée ¹⁸¹. De la même manière, les trois différents **SST6** rencontrés chez P. a. ont également le potentiel d'injecter des toxines directement dans le cytoplasme de cellules cibles. Contrairement au SST3, le SST6-H1 permet le ciblage de cellules procaryotes, donnant ainsi à P. a. un avantage concurrentiel sur les autres bactéries de son environnement, tandis que les SST6-H2 et H3 peuvent cibler aussi bien les cellules eucaryotes et procaryotes 182,183

Les SST1, SST2 et SST5 permettent quant à eux la sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire. Le **SST2** permet la sécrétion de larges **protéases**, comme l'exotoxine A (ExoA) et les élastases LasA et LasB, chacune pouvant jouer un rôle clé dans l'infection. Bien que sécrétée dans le milieu extracellulaire, **ExoA** est capable par elle-même de s'internaliser dans les cellules eucaryotes pour rejoindre sa cible intracellulaire : le facteur d'élongation EF-2. Inhibant ainsi la synthèse protéique, elle conduit à la mort de la cellule par nécrose ¹⁷⁹. **LasB** dégrade les protéines A et D du surfactant impliqués dans la reconnaissance du pathogène, participant ainsi à l'échappement de la bactérie au système immunitaire de l'hôte ¹⁷⁸. **LasA** quant à elle, permet notamment à *P. a.* de s'attaquer aux espèces concurrentes, en dégradant les ponts pentaglycine des peptidoglycanes de la paroi cellulaire de *S. a.* ¹⁸⁴. Les **SST1** et **SST5** sécrètent également des protéines associées à l'adhésion, la virulence ou la diminution de la réponse de l'hôte, comme les protéases AprA et LepA ainsi que l'estérase EstA, impliquée dans la production des rhamnolipides ¹⁷⁹.



Figure 9. Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion trouvés chez la souche de référence PAO1 de *P. a.* ¹⁷⁹.

2.2.2.2. Les molécules du Quorum Sensing

Le *quorum sensing* (QS) est un mécanisme permettant aux populations de *P. a.* de coordonner leur réponse aux modifications de l'environnement. Il est médié par la production de trois molécules : deux acyl homosérines lactones (AHL : la 3-oxo-dodecanoyl homosérine lactone et la butyryl homosérine lactone) ainsi que la 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, également

nommée PQS (pour *Pseudomonas* quinolone signal). Sécrétées dans le milieu de manière constitutive, la concentration de ces molécules est proportionnelle à la concentration bactérienne. Lorsque cette concentration atteint un point critique (le « quorum »), la concentration des molécules du QS devient suffisante pour activer l'expression de certains gènes de manière simultanée dans toute la population, régulant ainsi la virulence, la survie bactérienne et la formation de biofilm ^{185–187}.

2.2.2.3. Motilité et adhésion : modes de vie planctonique et biofilms

Le **flagelle** et les **pili de type 4**, participent à la fois à l'adhésion de la bactérie sur les cellules épithéliales et à sa mobilité dite « swarming » et « twitching ». La flagelline est également un activateur de la réponse inflammatoire de l'hôte, tandis que les pili sont impliqués dans la formation des biofilms ¹⁷⁸.

Les **biofilms** sont des structures communautaires composées de bactéries attachées les unes aux autres ainsi qu'à une surface par le biais d'une matrice composée de polysaccharides (en particulier les alginates), acides nucléiques, lipides et protéines. Cette matrice offre aux bactéries vivant à l'intérieur du biofilm une protection physique et chimique contre les défenses de l'hôte, les antibiotiques ou les contraintes mécaniques. Ce mode de croissance dit « sessile » est retrouvé dans les tissus de l'hôte lors des infections chroniques du poumon mucoviscidosique, mais également dans les équipements médicaux (cathéters, dispositifs d'intubation), faisant de ces biofilms un problème majeur en milieu hospitalier ¹⁸⁸.

Ces deux modes de vie sessile et planctonique adoptés par *P. a.* participent de manière complémentaire à la colonisation de nouveaux milieux par la bactérie. Sous sa forme mobile, ou planctonique, *P. a.* peut se déplacer vers de nouvelles niches écologiques. Une fois sur place, elle pourra adhérer aux surfaces rencontrées, puis dans certaines conditions initier la formation de microcolonies, qui pourront se développer en biofilms. Une fois mature, le biofilm pourra à son tour libérer de nouvelles bactéries planctoniques, qui initieront un nouveau cycle en allant à leur tour conquérir de nouveaux environnements (Figure 10) ¹⁸⁹.



Figure 10. Représentation schématique du cycle de vie planctonique et biofilm de *P. a.* en trois étapes ¹⁹⁰.

1) Attachement : les bactéries à l'état planctonique adhèrent aux surfaces, adoptent un mode de vie sessile et forment des microcolonies ; 2) Croissance : les colonies grandissent et produisent des exopolysaccharides (PS), entraînant la formation du biofilm ; 3) Détachement : des groupes (clusters) de bactéries se détachent du biofilm et adoptent à nouveau un mode de vie planctonique, afin de conquérir de nouvelles niches écologiques.

2.2.2.4. Autres facteurs de virulence de P. a.

Parmi les autres facteurs de virulence décrits chez *P. a.*, on pourra citer le lipopolysaccharide LPS, qui forme la membrane externe de la bactérie. Formé d'un lipide A auquel est fixé un antigène O variable, le LPS a un rôle antigénique et participe la réponse pro-inflammatoire. Chez *P. a.*, on pourra distinguer les souches « lisses », qui portent à leur surface deux types d'antigène O, des souches « semi-rugueuses » ou « rugueuses » portant respectivement une ou aucune unité de saccharide O. Le type d'antigène O porté définit le **sérotype** de la souche bactérienne, l'infection par certains sérotypes étant suspectée d'avoir des retombées cliniques plus ou moins sévères ¹⁹¹.

Les **chromophores sécrétés** tels que la pyocyanine, la pyoverdine et la pyocheline sont également des facteurs de virulence reconnus de *P. a.*. La **pyocyanine**, pigment de couleur bleu-vert, induit un stress oxydatif dans les cellules de l'hôte et a des effets sur les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires neutrophiles, macrophages et lymphocytes. Elle interfère notamment avec la réponse immunitaire, et induit l'apoptose des neutrophiles ¹⁹². Dans les cellules épithéliales pulmonaires, le stress oxydatif

induit par l'oxydation du NADPH par la pyocyanine entraîne une baisse des niveaux de glutathion réduit et d'ATP. Ces modifications ont un impact direct sur la fonction du canal CFTR, sur la fréquence des battements ciliaires. A long terme, la pyocyanine provoque des modifications transcriptionnelles, qui se traduisent par la sécrétion de mucines et de cytokines dans le milieu extracellulaire ^{193,194}. La **pyoverdine** et la **pyocheline**, de couleur vert et rougebrun, agissent comme des sidérophores et participent à l'acquisition du fer dans le milieu extracellulaire, conférant un avantage sur les autres bactéries dans un environnement pauvre en fer libre ¹⁷⁸.

P. a. est également une des rares bactéries, avec les bactéries du *Bcc*, à avoir la capacité de produire du cyanure d'hydrogène (HCN)¹⁹⁵. Cette molécule très toxique à haute dose a été mesurée dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, et a été proposée comme un biomarqueur de l'infection à *P. a.*¹⁹⁶. Les niveaux de cyanure mesurés chez les patients ont d'ailleurs démontré une activité inhibitrice sur la fonction ciliaire de cellules épithéliales, et se sont révélés corrélés à une fonction respiratoire diminuée ^{195,197}.

Plus récemment, un facteur de virulence a été mis en évidence à Grenoble sur une souche de *P. a.* isolée d'un patient atteint de pneumonie hémorragique fatale. Il s'agit de l'exolysine A (ExIA), qui provoque une mort rapide des cellules eucaryotes en formant des pores dans les membranes. Il s'agit d'une preuve rare d'hyper-virulence chez une souche de *P. a.* dépourvue de SST3, et la prévalence des souches ExIA-positive dans les infections aiguës sévères pourrait être largement sous-estimée ¹⁹⁸.

2.2.3. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

P. a. possède de nombreux mécanismes de résistance intrinsèques et acquis aux antibiotiques.

Les facteurs intrinsèques comprennent notamment sa membrane externe relativement imperméable, avec peu de larges porines (OprF), et plus de petites porines (OprD, OprB), ou encore l'effet des 12 pompes à efflux permettant l'expulsion de nombreux antibiotiques des familles des bêta-lactamines, aminosides et fluoroquinolones ¹⁹⁹.

En plus de ces mécanismes qui confèrent une plus grande résistance naturelle à la bactérie, *P. a.* est capable d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance sous pression de sélection. Ainsi, la résistance aux bêta-lactamines peut résulter de mutations conduisant à la surexpression de bêta-lactamases (par exemple AmpC, une céphalosporinase d'importance clinique) ¹²³. Les mutations du gène codant pour la protéine OprD sont également fréquentes, et conduisent à la diminution de ces porines à la membrane, entraînant l'apparition de résistances aux carbapénèmes ²⁰⁰. Les mutations conduisant à la surexpression des pompes à efflux MexXY comptent parmi les plus fréquemment rencontrées dans les isolats cliniques de *P. a.* issus d'infections chroniques. Elles conduisent à l'augmentation de la résistance à de multiples antibiotiques, en particulier de la famille des aminosides. Enfin, *P. a.* peut acquérir des plasmides contenant des gènes de résistance par transfert horizontal depuis d'autres bactéries, des exemples de développement de résistances aux aminosides et bêta-lactamines ayant notamment été observés ¹²³. Pour une revue des principaux mécanismes de résistance antibiotique connus, nous recommandons la publication d'El Zowalaty et collègues ²⁰¹.

Dans la mucoviscidose, l'administration de traitements antibiotiques lourds et répétés impose une pression de sélection forte, et l'acquisition de mécanismes de résistances est fréquente chez les bactéries colonisant les voies respiratoires. Ces traitements modifient ainsi la structure écologique du microbiote pulmonaire, et diminuent la diversité des espèces bactériennes en faveur de *P. a..* La présence continue d'antibiotiques dans l'environnement pulmonaire mucoviscidosique constitue un des moteurs majeurs de l'évolution adaptative de *P. a.* au cours des infections chroniques ^{96,202}.

La dissémination rapide de clones multi-résistants aux antibiotiques responsables d'infections chroniques ou nosocomiales font de *P. a.* une menace grandissante en termes de santé publique, et l'OMS l'a récemment classée comme pathogène critique pour l'urgence de développer de nouvelles thérapies ^{175,177}.

2.2.4. RESISTANCE AUX DEFENSES DE L'HOTE

En plus de sa très haute capacité de résistance aux antibiotiques, *P. a.* a le potentiel de résister également aux défenses de l'hôte. Pour exemple, la pyocyanine et le cyanure d'hydrogène produits par *P. a.* ont un effet toxique direct sur la fonction ciliaire, aggravant ainsi le défaut de clairance caractéristique de la pathologie ^{195,203}. Certaines molécules sécrétées par *P. a.*, comme la pyocyanine et la kynurénine produite à partir de la dégradation du tryptophane, permettent également à la bactérie de contourner la réponse immunitaire innée en piégeant

les espèces réactives de l'oxygène produites par les neutrophiles ^{81,193}. Enfin, certains des facteurs de virulence de *P. a.* induisent directement la mort des cellules de l'immunité. Ainsi, la présence d'un SST3 seul induit la mort des cellules immunitaires par pyroptose, tandis que la pyocyanine pousse les neutrophiles à l'apoptose ^{202,204}.

Au cours de son adaptation aux voies respiratoires des patients durant les infections chroniques, *P. a.* va également mettre en place de nombreuses stratégies visant à diminuer sa reconnaissance par le système immunitaire (diminution de l'expression du flagelle et des facteurs de virulence, croissance ralentie, formation de biofilm...) ^{96,117,149,205,206}.

Ces nombreux mécanismes de défense contre les défenses de l'hôte ainsi que contre les traitements antibiotiques administrés rendent les infections à *P. a.* particulièrement difficiles à éradiquer, en particulier dans le cas des infections chroniques, dans lesquelles ces résistances ont été sélectionnées positivement ⁹⁶.

3. ADAPTATION DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* A L'ENVIRONNEMENT PULMONAIRE MUCOVISCIDOSIQUE

3.1. L'ENVIRONNEMENT PULMONAIRE MUCOVISCIDOSIQUE

L'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose est particulièrement favorable à une colonisation durable par *P. a.*. Hautement concentré en xénobiotiques et spatialement compartimenté, conquérir cet espace requiert une grande adaptabilité ainsi que la capacité de résister aux antimicrobiens omniprésents. Au sein de cet environnement complexe, rares sont les espèces capables de s'établir et la concurrence est faible.

La composition chimique de l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose diffère de celle des individus sains. On note en particulier la présence de concentrations élevées d'ADN issu de la lyse des cellules hôtes, et une augmentation des taux de N-acetylglucosamine (GlcNAc) et de lactate, marqueur de l'inflammation. Parmi les ions présents, on souligne une augmentation importante des niveaux de fer, nutriment critique des bactéries pathogènes. On observe également une augmentation de la concentration de mucine en période d'exacerbation, possiblement due à la sécrétion accrue par les cellules épithéliales causée par l'infection à *P. a..* En outre, nombre des nutriments présents dans les expectorations influencent le métabolisme et la pathogénicité de *P. a.*, et leurs effets spécifiques ont été décrits ailleurs ²⁰⁷.

Au cours de l'infection chronique des voies respiratoires d'un patient, *P. a.* s'adapte à son nouvel environnement et évolue avec son hôte durant des décennies. De nombreuses études ont cherché à investiguer les mécanismes évolutifs expliquant le succès invasif unique de *P. a.* chez les patients atteints de mucoviscidose. Ces études ont permis de mettre en évidence deux grands moteurs de cette adaptation : une **évolution parallèle** conduisant à un nombre restreint de phénotypes adaptés retrouvés dans les isolats d'infection chronique de différents patients, et une radiation adaptative conduisant à une **diversification** phénotypique et génotypique des souches ayant évolué indépendamment dans les différentes niches écologiques formées au sein des voies respiratoires d'un même patient ²⁰⁸.

3.2. DIVERSIFICATION CLONALE AU SEIN DES MICRO-HABITATS

Les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose constituent un environnement compartimenté et changeant au cours du temps et de l'infection (inflammation, dommages structuraux importants et irréversibles). A cette hétérogénéité spatiale et temporelle s'ajoute l'apparition de micro-environnements distincts au sein même des biofilms produits par la bactérie. Cette multitude de niches écologiques donne naissance à de très nombreuses sous-populations de *P. a.* spécialisées à leur niche appartenant toutes à une même **lignée clonale**, car descendant d'un unique ancêtre commun responsable de la colonisation initiale. L'existence de ces nombreux variants clonaux confère un avantage considérable à la bactérie, permettant à la population de résister aux nombreux stress rencontrés dans les voies aériennes des patients : défenses immunitaires, présence constante d'antibiotiques, compétition avec d'autres microorganismes, stress osmotique dû à la haute viscosité du mucus, altérations des voies aériennes survenant au cours de l'infection... ^{96,149,209}.

En 2013, Workentine et son équipe ont publié une étude visant à mesurer la diversité phénotypique de 169 isolats issus de 34 échantillons d'expectorations prélevés chez un unique patient sur une période d'un an. En mesurant 21 phénotypes liés à la persistance dans les voies aériennes mucoviscidose (morphologie des colonies, mobilité, sécrétion de molécules du *quorum sensing* et de protéases, auxotrophie, profils de croissance, antibiorésistance...), ils ont pu observer une grande variabilité entre les isolats pour chaque phénotype, et une indépendance de la plupart des phénotypes les uns vis-à-vis des autres ²¹⁰. Ces résultats, confirmés plus tard par Clark et son équipe, mettent également en évidence le **manque d'association entre le morphotype, le phénotype et le génotype** ²¹¹. Il est par ailleurs intéressant de noter qu'**aucune tendance manifeste ne se détache entre la prévalence de certains phénotypes et le statut clinique du patient**, défini comme en période d'exacerbation ou de stabilité ²¹⁰.

3.3. EVOLUTION PARALLELE DES CLONES VERS DES PHENOTYPES ADAPTES AU POUMON MUCOVISCIDOSIQUE

Malgré l'importante diversité intra-échantillon des souches prélevées chez un même patient, un certain nombre de traits phénotypiques sont communément retrouvés chez les isolats issus de différents patients. Au cours de l'infection chronique, *P. a.* est soumise à des pressions de sélection communes à tous les patients qui entraînent des trajectoires évolutives parallèles, dont les plus fréquentes sont présentées en Figure 11 ¹⁴⁹.

Parmi les adaptations fréquemment observées, on peut distinguer deux grandes stratégies de défense aux stress adoptées par la bactérie. La première, déjà décrite plus haut, consiste à acquérir des mécanismes de tolérance et de **résistance aux antibiotiques**. En plus des mécanismes de résistance spécifiques déjà cités plus haut, on peut noter la surproduction d'alginate qui aboutit à l'apparition de phénotypes mucoïdes et la formation de biofilms permettant aux populations sensibles d'éviter tout contact avec le traitement. La seconde stratégie de *P. a.* consiste à **échapper aux défenses de l'hôte** en diminuant la reconnaissance du pathogène par le système immunitaire ou en piégeant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les neutrophiles. Ces modifications phénotypiques comprennent notamment une croissance ralentie, la régulation négative de facteurs de virulence tels que le SST3, la mobilité ou les toxines sécrétées, des modifications des antigènes de surface (les lypopolysaccharides, LPS), la formation micro-colonies et de biofilms ^{96,117,149,205,206}.

Des modifications métaboliques sont également mises en place en réponse aux conditions nutritionnelles rencontrées dans les poumons mucoviscidosiques, comme l'apparition d'auxotrophies pour les acides aminés dont le coût métabolique de production est élevé ^{149,208}. Les adaptations métaboliques de *P. a.* survenant au cours des infections pulmonaires chroniques seront détaillées dans le paragraphe 3.4.2. Enfin, l'apparition de phénotypes « hypermutateurs » permet d'accélérer la diversification intra-clonale et d'améliorer la réponse aux nombreux stress rencontrés ¹⁴⁹.

64



Figure 11. Représentation schématique de l'évolution adaptative de *P. a.* (microévolution) au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose (traduit de ¹⁴⁹). T3SS : Système de sécrétion de type 3 ; AHLs : N-acylhomoserine lactones (molécules du quorum sensing).

Certains auteurs proposent de considérer les infections pulmonaires chroniques à *P. a.* dans la mucoviscidose comme une relation symbiotique débutante. En effet, durant son adaptation à l'environnement mucoviscidosique, *P. a.* diminue l'expression de facteurs de virulence et devient ainsi moins néfaste à son hôte. Par ailleurs, on observe le développement de caractéristiques retrouvées chez de nombreux symbiotes, comme la perte des gènes de réparation de l'ADN, ou l'apparition d'auxotrophies pour les acides aminés essentiels à l'espèce humaine, constamment retrouvés dans son environnement. Elle devient également spécifique à sa niche et semble perdre, au moins en partie, sa faculté de transmission entre patients. Dans les stades avancés de cette adaptation, *P. a.* pourrait même apporter certains bénéfices à son hôte, en développant des propriétés antagonistes envers d'autres clones et en évitant ainsi la colonisation par de nouvelles souches sauvages de virulence élevée. Malheureusement, cette symbiose débutante reste généralement confinée dans l'espace et dans le temps et est destinée à disparaître avec l'hôte, et l'accumulation de dommages dans les voies respiratoires reste une partie invariable de la maladie, en raison de la progressivité de la diminution de la virulence de *P. a.* ²¹².

En résumé, l'évolution adaptative de *P. a.* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose est caractérisée à la fois par une **diversification phénotypique des clones** au sein des différents micro-habitats constituant les voies aériennes d'un même patient, et par une **évolution parallèle des souches infectant différents patients** vers des phénotypes adaptés aux stress propres à cet environnement.

Cette évolution parallèle conduit généralement à une **augmentation de la résistance aux antibiotiques** et à une **diminution de la virulence** permettant l'**échappement de la bactérie aux défenses de l'hôte**.

3.4. Bases moleculaires de l'adaptation de *Pseudomonas Aeruginosa* a l'environnement pulmonaire mucoviscidosique

3.4.1. EVOLUTION GENOMIQUE ET POST-GENOMIQUE

Avec le développement des techniques de séquençage d'ADN à haut débit, de nombreuses études ont porté sur l'évolution génétique de *P. a.* par comparaison des génomes d'isolats séquentiels prélevés chez un ou plusieurs patients, afin d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de ces adaptations ^{42,213–215}.

Marvig et son équipe notamment, ont publié en 2015 une étude ambitieuse consistant au séquençage total du génome de 474 isolats cliniques de *P. a.* prélevés de manière longitudinale chez 34 patients. Ils ont ainsi mis en évidence 52 gènes dits « pathoadaptatifs », impliqués notamment dans les fonctions de résistance aux antibiotiques, de mobilité et d'attachement, de réplication, modification et réparation de l'ADN, de paroi cellulaire/LPS/capsule, de sécrétion (toxines, enzymes, alginate) et de régulation de la transcription, et sur lesquels les mutations sont sélectionnées positivement car elles favorisent le fitness bactérien. Ils ont ainsi pu observer un phénomène de convergence évolutive de lignées de fonds génétiques différents vers un nombre restreint d'adaptations génétiques conduisant à des phénotypes adaptés ²¹⁶. D'autres études soulignent l'importance des mutations de gènes codant pour la régulation globale de grands réseaux géniques (notamment *mucA, algT, rpoN, lasR, rpoD*), favorisant l'optimisation continue de l'expression des gènes en réponse aux fluctuations de l'environnement ²¹⁴.

Cependant, une seconde étude publiée par Marvig et son équipe démontre la **difficulté à corréler les mutations accumulées sur le génome bactérien avec les phénotypes observés**, en particulier en ce qui concerne les profils de résistance aux antibiotiques et de virulence ²¹⁵. Une autre étude récemment publiée par le même groupe suggère une adaptation convergente du métabolisme de 3 différentes lignées clonales de *P. a.* infectant un même patient *via* des schémas mutationnels distincts ²¹⁷. De la même manière, la caractérisation systémique d'isolats appartenant au même clone prélevés chez 2 patients différentes démontre que l'apparition de traits phénotypiques complexes découle de la combinaison de plusieurs mutations accumulées dans le temps à différents endroits du génome ²¹⁸.

Ainsi, depuis le début des années 2010, l'intérêt grandit autour des approches postgénomiques afin de mieux comprendre les mécanismes adaptatifs mis en place par *P. a.* à différents niveaux de régulation biologique. En 2010, Huse et son équipe ont démontré l'existence d'une évolution parallèle de la transcription de 24 gènes de 14 isolats prélevés chez 3 patients sur une période de 4 à 8 ans ²¹⁹. Mais bien qu'on puisse supposer que ces gènes codent pour des traits adaptatifs, une grande partie d'entre eux codent des protéines de fonction inconnue, et il est encore difficile de prévoir les conséquences de ces modifications sur le phénotype bactérien.

Si les évolutions parallèles de clones de *P. a.* infectant différents patients est largement documentée, certains auteurs soulignent quant à eux la dimension patient-spécifique de cette adaptation. Ainsi, Klockgether et son équipe ont caractérisé deux isolats prélevés chez deux patients mucoviscidosiques, tous deux ayant été colonisés par *P. a.* depuis la même épidémie locale. Les deux isolats étudiés avaient ainsi évolué pendant deux ans dans les poumons de ces deux patients, depuis un même clone s'étant disséminé dans le centre de la mucoviscidose de la clinique où ces patients étaient suivis. Un résultat majeur de cette étude fut la mise en évidence que malgré une séquence génomique quasiment identique, les isolats présentaient des profils transcriptomiques, métabolomiques et phénotypiques très différents. Cette observation démontre l'intérêt des approches post-génomiques pour l'étude de l'adaptation intra-hôte de *P. a.*, et suggère que cette adaptation s'est déroulée différemment dans les voies respiratoires de ces deux patients ²¹⁸. De la même manière, les travaux d'autres équipes suggèrent des adaptations patient-spécifiques des protéines membranaires et du

métabolome de *P. a.* au cours de l'infection pulmonaire chronique de patients atteints de mucoviscidose ^{208,220}.

3.4.2. EVOLUTION METABOLIQUE

Aujourd'hui, des efforts sont faits pour analyser les adaptations métaboliques de la bactérie au cours de ces infections chroniques, afin de gagner en connaissance, plus que sur les modifications simplement codées dans son génome ou dans son transcriptome, sur les adaptations fonctionnelles et physiologiques réellement mises en place *in vivo* par la bactérie. Mieux comprendre ces phénomènes en investiguant la croissance bactérienne dans les conditions rencontrées chez l'hôte, ainsi que les métabolites produits ou sécrétés par la bactérie et leur potentielle pathogénicité pour le patient, apparaît comme une thématique de recherche prioritaire.

L'amélioration des connaissances des voies métaboliques de *P. a.* a conduit au développement d'outils d'analyse en réseau du métabolisme de *P. a.*. Oberhardt et son équipe ont été les premiers à reconstituer *in silico* le réseau métabolique de *P. a.* à partir des données du génome de la souche de référence PAO1 ²²¹. Ce premier modèle a par la suite été amélioré et rendu accessible via des plateformes en ligne ^{222,223}.

A l'aide de ces outils, Jørgensen et *al.* ont pu assigner des voies métaboliques aux modifications des profils du catabolisme du carbone et de l'azote mesurés *via* la technologie *Biolog* obtenus par comparaison d'isolats d'infection aiguë ou chronique. Ainsi, malgré l'hétérogénéité des profils cataboliques lié à une diversification rapide des isolats dans les poumons, un trait d'évolution commun à ces souches est la réduction de la respiration sur différents substrats avec la durée de l'infection, pouvant être obtenue *via* différentes voies, notamment le métabolisme des acides aminés alanine, asparagine et glutamate ou le cycle de Krebs ²²⁴. Hoboth et son équipe avaient déjà mis en évidence ces modifications de l'activité du cycle de Krebs et du métabolisme des acides aminés ainsi que l'apparition de respirations en anaérobie et micro-aérobie dans une analyse protéomique et transcriptomique d'isolats isogéniques prélevés de manière séquentielle chez le même patient cultivés en milieu LB ²²⁵.

Une des premières études métabolomiques de l'adaptation métabolique de *P. a.* au cours de l'infection chronique a été publiée par Behrends et son équipe en 2013. Dans cette étude, les

auteurs ont analysé 179 isolats de *P. a.* prélevés à différents temps du suivi de 18 patients atteints de mucoviscidose, sur des périodes allant de 4 à 24 ans. Les bactéries ont préalablement été cultivées pendant 24 h en milieu riche conventionnel LB, et les surnageants de culture ont été analysés par RMN. Les résultats de cette étude ont notamment mis en évidence l'absence d'un métabolite universellement modifié avec la durée ou le stade de l'infection, et souligne le caractère patient-spécifique des signatures métabolomiques de *P. a.*. En revanche, plusieurs métabolites se sont révélés significativement associés à la durée de l'infection, la plus forte différence étant la diminution de la quantité d'acétate dans le milieu avec la durée de l'infection ²⁰⁸. Cependant, une seconde étude publiée par le même groupe peu de temps après souligne l'impact du milieu de culture sur les signatures métaboliques des souches de *P. a.*, remettant en perspective les résultats obtenus précédemment dans des milieux de culture classique ²²⁶. L'influence du milieu de culture avait déjà été mis en évidence comme la principale source de variation du métabolome de souches de *P. a.*, comparativement à l'origine de la souche testée (laboratoire ou clinique) ou à la phase de croissance (exponentielle ou stationnaire) ²²⁷.

En effet, comme expliqué précédemment, certains nutriments spécifiquement présents dans les voies aériennes des malades affectent le métabolisme et la pathogénicité de *P. a.*, rendant prioritaire le développement de modèles d'infection pertinents pour ces études de métabolisme ou de métabolomique. Des milieux de culture adaptés visant à reproduire au mieux les conditions chimiques et nutritionnelles présentes dans les expectorations ont donc été développés, dont les principaux sont les milieux ASM (pour *Artificial Sputum Medium*), SCFM (pour *Synthetic Cystic Fibrosis Sputum*) et sa version améliorée SCFM2 ^{228–230}.

Ainsi, Oberhardt et son équipe ont repris les données d'expression génique publiées par Hoboth et collègues en 2009, et les ont intégrées à leur modèle *in silico* du réseau métabolique de *P. a.* afin de simuler les phénotypes de croissance bactérienne en milieu SCFM. Ont ainsi été mis en évidence des trajectoires adaptatives distinctes du métabolisme de 2 lignées clonales évolutives responsables d'infections chroniques chez un même patient, avec une lignée caractérisée par une activation des voies de synthèse et de métabolisme des acides aminés et de l'énergie, et une seconde lignée caractérisée par des modifications successives des voies du catabolisme des composés carbonés. Cette étude ambitieuse a toutefois constitué un défi computationnel, notamment dans la difficulté à modéliser la nature nuancée

69

du métabolisme. Il en résulte à nouveau une difficulté importante à corréler les prédictions du modèle avec des mesures *in vitro* de phénotypes d'intérêt clinique ²³¹.

La **caractérisation métabolomique d'isolats** *P. a.* **cultivés dans des conditions proches de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique** par des méthodes hautement résolutives permettrait ainsi de mieux comprendre les mécanismes soustendant l'évolution adaptative de la bactérie au cours des infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

3.4.3. LA METABOLOMIQUE AU SERVICE DE L'ELUCIDATION DES MECANISMES DE PATHOGENICITE DES INFECTIONS PULMONAIRES A P. A.

3.4.3.1. Analyses métabolomiques des expectorations de patients atteints de mucoviscidose

Plusieurs études se sont intéressées aux modifications des métabolites présents dans les expectorations des patients durant les différentes phases cliniques de la maladie. On notera notamment les travaux de Twomey et son équipe, qui ont caractérisé au plan métabolomique et du microbiote les expectorations de 75 patients atteints de mucoviscidose pendant et en dehors des phases d'exacerbation. Ces découvertes mettent en lumière des modifications significatives du métabolome des expectorations durant les phases d'exacerbation, avec notamment une élévation des taux de lactate, pyruvate et putrescine. Ces modifications sont par ailleurs significativement corrélées à l'abondance de *P. a.* et de *Chrysiogenales* ¹⁴³. De même, les travaux d'une seconde équipe ont mis en évidence une augmentation significative des molécules du QS dans les expectorations, le plasma et l'urine en début d'exacerbation chez 60 patients, corrélée avec la charge de *P. a.* dans les voies respiratoires ²³².

Cependant, des recherches récentes mettent en évidence la complexité de la composition métabolomique des expectorations des patients atteints de mucoviscidose. Composé d'un mélange de molécules de l'hôte, du microbiote mais aussi de nombreux xénobiotiques et leurs produits de dégradation ²³³. De plus, le large chevauchement entre les métabolites bactériens et de l'hôte, ainsi que la nature personnelle des signatures métabolomiques des expectorations de différents patients, compliquent l'extrapolation des causes à l'origine des modifications chimiques observées ^{234,235}.
Malgré leurs limites, les études métabolomiques sur bactéries isolées cultivées *in vitro* révèlent ainsi un grand potentiel dans l'élucidation du métabolisme des principaux pathogènes de la mucoviscidose et de son impact sur la pathogénicité bactérienne ²³⁴.

2.6.2. Analyses métabolomiques sur cultures bactériennes isolées

La métabolomique sur cultures bactériennes isolées a démontré son potentiel pour révéler les mécanismes de pathogénicité et de résistance antibiotiques. Chez d'autres bactéries, Rees et *al*. ont relevé des différences dans les volatilomes (l'ensemble des métabolites volatiles) entre des souches sensibles ou résistantes aux carbapénèmes chez *Klebesiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*⁶⁵. De même, Shommu et son équipe ont revu en détail les apports de la métabolomique pour révéler les mécanismes de pathogénicité et de résistance antibiotiques chez les bactéries du complexe *Burkhoderia* (*Bcc*). Ces bactéries, souvent retrouvées en coinfection avec *P. a.*, sont elles aussi responsables d'infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose ⁶⁴.

Chez P. a., Behrends et son équipe ont analysé la production du gluconate de 86 mutants, portant chacun une mutation dans un gène impliqué dans le métabolisme du carbone ou dans un gène de régulation globale. Ils ont ainsi mis en évidence une accumulation importante de gluconate dans les surnageants de culture des mutants rpoN, gène fréquemment muté au cours de l'adaptation de P. a. à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique. Afin d'appréhender l'importance clinique de ces modifications métaboliques, ils ont ensuite mesuré la quantité de gluconate dans les surnageants de 156 isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose cultivés en milieu SCFM. Ils ont ainsi pu constater que la production de gluconate dans le milieu est très variable, patient et lignée clonale-spécifique, mais que ces différences ne sont pas liées à la durée de l'infection et ne constituent ainsi pas une signature de l'évolution adaptative. Cependant, un résultat majeur de cette étude est l'association significative entre la production élevée de gluconate et le niveau de résistance à 4 antibiotiques d'importance clinique ⁶². Peu de temps plus tard, une autre étude a démontré l'intérêt de la métabolomique pour suivre le développement du biofilm chez P. a. 63. Ces différents travaux donnent ainsi la preuve de concept du potentiel de la métabolomique sur cultures isolées pour l'étude de phénotypes bactériens.

Pour gagner en connaissance sur les retombées cliniques de ces phénotypes, Kozlowska et son équipe ont analysé par RMN non ciblée les surnageants de culture en milieu SCFM de 15 isolats cliniques de *P. a.* prélevés chez 13 patients atteints de mucoviscidose. De manière intéressante, les auteurs ont pu mettre en évidence une relation significative entre l'appartenance à l'un des 4 profils métabolomiques identifiés et le pH du milieu, mais aussi la fonction pulmonaire (VEMS). Ces résultats suggèrent que **les stratégies métaboliques bactériennes pourraient avoir un impact direct sur l'atteinte respiratoire des patients**. Cependant, la méthode analytique utilisée permet essentiellement de mesurer l'impact de la croissance bactérienne sur la composition du milieu de culture, et non la détection de molécules spécifiques sécrétées par *P. a.* ²³⁶.

La corrélation entre les signatures métaboliques de *Bcc* et *P. a.* avec leurs phénotypes de résistance antibiotique et de virulence démontrent la **pertinence de la métabolomique pour l'étude des voies métaboliques impliquées dans l'expression de phénotypes d'importance clinique.**

La métabolomique se révèle donc être un outil approprié et puissant pour la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement ces voies. Ces découvertes permettront probablement de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques, pour le développement de futurs traitements anti-virulence, ou d'adjuvants associés aux antibiotiques pour potentialiser leur effet sur des bactéries particulièrement résistantes ²³⁷.

4. ÉLEMENTS DE STATISTIQUES MULTIVARIEES

De manière générale, ce type d'analyses biologiques à haut débit produit des quantités importantes de données. Pour exemple, l'acquisition d'empreintes métabolomiques non ciblées d'échantillons biologiques produit des mesures quantitatives ou semi-quantitatives sur plusieurs dizaines à plusieurs milliers de variables, selon le système étudié et la méthode analytique utilisée. L'analyse de ces données ainsi que leur intégration avec d'autres niveaux de régulation biologique requiert l'utilisation de méthodes statistiques multivariées et d'algorithmes d'apprentissage machine (*machine learning*).

Ces méthodes permettent notamment de résumer l'information contenue dans un jeu de données de grande taille (analyses en composantes principales), de classer les individus selon leur profil (méthodes de classification), ou de modéliser une relation linéaire entre un jeu de

données explicatives et une ou plusieurs variables réponses (modèles de régression). On distinguera ici les méthodes dites non supervisées, où l'on cherche à résumer l'information contenue dans les données sans information *a priori*, et les méthodes supervisées, où l'on cherche à expliquer ou prédire une variable réponse. Les méthodes les plus couramment appliquées aux données de métabolomique ont été revues en détail dans un article récent et sont développées ci-dessous ²³⁸.

4.1. METHODES NON SUPERVISEES

4.1.1. ANALYSES EN COMPOSANTES PRINCIPALES

Les analyses en **Composantes Principales** (CP) permettent de résumer et représenter graphiquement l'information contenue dans un ensemble de données multivariées.

La plus populaire de ces méthodes est certainement l'**Analyse en Composantes Principales** (**ACP**) qui permet de résumer l'information contenue dans un jeu de données quantitatives ²³⁹. Il s'agit d'une méthode de réduction de dimensions, dans lesquelles on crée de nouvelles variables, appelées CP, moins nombreuses que les variables initiales et permettant de représenter les données dans un espace réduit. L'objectif de l'ACP est donc de représenter les données dans un nombre de dimensions réduit, de la manière permettant de représenter au mieux la variabilité des individus. Pour illustrer ce concept, la Figure 12 donne deux représentations de trois différents fruits. Dans les deux cas, il s'agit de la projection d'un objet à 3 dimensions dans un espace à 2 dimensions (donc 2 CP). Sur la première ligne, le point de vue adopté illustre mal la variabilité des différents objets, les rendant difficiles à distinguer. Sur la seconde ligne, le point de vue adopté permet d'expliquer au maximum la variabilité des objets dans cet espace en 2 dimensions, les rendant ainsi facilement reconnaissables (exemple tiré de ²⁴⁰).



Figure 12. Représentations en deux dimensions de fruits pour illustrer le concept de réduction dimensionnelle (extrait de ²⁴⁰).

De gauche à droite : un avocat, un melon, une banane. Chaque ligne correspond à la représentation en 2 dimensions de ces objets selon des points de vue distincts.

Techniquement, les CP sont des combinaisons linéaires des variables initiales. La première CP sera ainsi créée en assignant à chaque variable un coefficient, la combinaison linéaire de tous les *coefficient x, variable y* permettant d'appréhender un maximum de la variabilité du jeu de données. Une seconde CP sera ensuite calculée, orthogonale à la précédente, pour appréhender un maximum de la variabilité totale des données, etc. Ainsi, chaque CP permet d'exprimer une proportion de la variabilité totale des données, on appelle cette proportion la valeur propre. La somme cumulée des CP 1 à k donne la proportion de la variabilité globale des données exprimée par les k premières CP. On pourra ainsi déterminer le nombre k de CP jugées informatives pour appréhender la variabilité globale du jeu de données.

On pourra également citer l'**Analyse des Correspondances Multiples (ACM)**, qui est une extension de l'ACP pour l'analyse de variables qualitatives multiples ²⁴¹.

4.1.2. CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE

Les méthodes de **Classification** permettent de constituer des groupes d'individus similaires sur la base de l'étude de la matrice *X* des observations à analyser. Ces techniques se basent souvent sur la conversion de la matrice *X* en une seconde matrice dite de proximité, par le calcul des similarités ou des distances entre les individus, suivie d'une agglomération de cette matrice pour constituer les groupes. Ces méthodes sont appelées **Classifications Hiérarchiques**, la plus commune étant certainement la **Classification Ascendante** **Hiérarchique (CAH)**. Il existe également de nombreuses méthodes d'optimisation de la classification obtenue, parmi lesquelles on peut notamment citer les algorithmes de partition par les *k*-means ²⁴². Ils consistent, après une première classification, à recalculer la distance séparant chaque individu du centre moyen du groupe, et à reclasser les individus dans le groupe dont ils sont les plus proches afin de stabiliser la classification initiale ²⁴³.

4.1.3. ANALYSE HCPC : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE SUR LES COMPOSANTES PRINCIPALES

Associer ces deux types d'approches en réalisant une **Classification Hiérarchique sur les Composantes Principales** (analyse **HCPC**) est une démarche innovante permettant de combiner les avantages de réduction dimensionnelle, et de classification des individus. Globalement, la démarche se décompose comme suit : 1) une étape d'analyse en CP (ACP ou ACM selon le type de variables) ; 2) une étape de classification des individus ; et 3) une étape de stabilisation de la classification par partitionnement. Dans le cas de variables quantitatives, l'étape d'ACP peut être vue comme une étape de débruitage conduisant à une classification plus stable, pouvant être très utile si le nombre de variables est important (ce qui est le cas pour les analyses -omiques). Pour des données qualitatives, l'ACM peut être vue comme une étape de prétraitement consistant à transformer les variables qualitatives en un petit nombre de variables quantitatives, permettant ainsi la classification hiérarchique. L'algorithme utilisé comprend également une étape de partitionnement par la méthode *des k-means*, permettant d'optimiser et de consolider la classification. Les résultats peuvent également permettre de mettre en évidence des associations entre les variables ²⁴⁴.

4.1.5. ANALYSES FACTORIELLES MULTIPLES : UN EXEMPLE DE METHODE D'ANALYSE MULTI-ECHELLES

Récemment, de nouvelles méthodes d'analyse multi-échelles (ou multi-blocs) permettant l'analyse simultanée de plusieurs blocs de données de natures différentes ont vu le jour. On pourra notamment citer les **Analyses Factorielle Multiples (AFM)**, qui permettent de résumer et visualiser des jeux de données complexes où les individus sont décrits par plusieurs jeux de variables structurés en groupes ²⁴⁵. Cette méthode permet d'intégrer différents blocs de données décrivant les mêmes individus, y compris si les variables contenues dans chaque bloc sont différentes en nature ou en nombre ²¹⁸. Brièvement, la première étape de l'AFM consiste en une analyse en CP simultanée sur chaque bloc de données (ACP ou ACM selon la nature des variables). L'étape suivante va consister à pondérer l'influence de chaque bloc de données, en attribuant à chaque variable du bloc *j*, un poids égal à l'inverse de la proportion de variabilité expliquée par la première CP du bloc *j*. De nouvelles CP seront ensuite calculées par combinaison linéaire des CP pondérés de chaque bloc.

De manière pratique, ce type d'analyses peut être utilisé pour extraire l'information commune contenue dans plusieurs jeux de données, et peut en ce sens être considéré comme une forme d'analyse canonique. Elle peut également constituer la première étape d'une analyse HCPC, afin de constituer des groupes d'individus similaires sur la base des différents blocs de variables ²⁴¹. L'AFM peut en outre être utilisée sur des blocs de données de nature et de taille différente, la rendant particulièrement pertinente pour l'analyse de données représentant différents niveaux de régulation biologique (par exemple, sur un bloc de données métabolomiques et un bloc de données cliniques). Pour une explication détaillée des principes de l'AFM et des exemples d'application et d'interprétation, le lecteur pourra se référer au livre *Multiple Factor Analysis by Example Using R* de Pagès et collègues ²⁴⁶.

4.2. METHODES SUPERVISEES

Comme nous venons de le voir, si les analyses multivariées non supervisées permettent la réduction de dimensions et la classification d'individus de manière non biaisée, elles ne permettent pas la prédiction de l'appartenance des individus à une classe. Ce type de prédiction est permis par des méthodes supervisées, à l'image des régressions PLS (pour *Partial Least Squares* ou *Projection to Latent Structures*). La régression PLS est une généralisation de la régression linéaire multiple (RLM), et a pour objectif d'extraire la combinaison linéaire des variables de la matrice *X* de variables explicatives permettant de discriminer au mieux la matrice réponse *Y*. A l'inverse de la RLM, elle permet l'analyse de données caractérisées par une matrice *X* comportant de nombreuses variables, y compris si celles-ci sont fortement corrélées entre elles ou bruitées ²⁴⁷. Elle représente ainsi un intérêt particulier pour l'analyse de données de métabolomique, et est aujourd'hui la méthode d'analyse supervisée la plus communément utilisée pour ce type d'analyses. On distingue plusieurs variantes des modèles de régression PLS, comme la PLS-DA (pour *Discriminant Analysis*), qui permet de prédire l'information de classe lorsque la matrice réponse n'est constituée que d'une variable réponse discrète. Les régression OPLS (pour *Orthogonal PLS*)

intègrent quant à elles une étape de correction orthogonale du signal dans le modèle, qui permet en pratique de séparer la variation de la matrice X permettant la prédiction de Y de la variation résiduelle, non corrélée à Y^{238} .

Il est important de noter que les régressions (O-)PLS ont une forte tendance à sur-ajuster les modèles au données, et peuvent ainsi identifier d'excellentes séparations de classes dans des variables totalement aléatoires. La validation est donc une étape critique pour s'assurer de la pertinence du modèle obtenu. Idéalement, cette validation requiert de séparer les données en un jeu d'entrainement (training set), utilisé pour construire le modèle, et un jeu de validation, utilisé pour évaluer le pouvoir prédictif du modèle. Cette méthode de validation idéale est cependant difficile à appliquer aux études métabolomiques du fait du faible nombre d'échantillons et du coût élevé de la préparation des échantillons et de l'analyse. Pour pallier ce problème, une solution consiste à réaliser une validation croisée interne, qui consiste à diviser le jeu de données initial en N sous-jeux, qui seront chacun utilisés pour valider le modèle construit d'après les N-1 autres sous-jeux. Cette validation croisée fournit alors une valeur de Q2, qui correspond à une mesure de la prédictibilité du modèle comparativement aux données originales. Bien qu'aucune valeur consensus de Q2 ne permette de conclure à la significativité du modèle, un Q2 supérieur ou égal à 0,4 est généralement considéré comme acceptable pour un modèle biologique. Le coefficient R2, qui correspond à la proportion des données expliquée par le modèle, doit également être interprétée au regard du Q2. Des valeurs de R2 et de Q2 très différentes sont un indicateur possible de sur-ajustement d'une analyse supervisée, ce qui signifie que le modèle colle si bien aux données qu'il s'avère incapable de prédiction si on l'applique à d'autres données ²³⁸.

Mais malgré l'intérêt de ces méthodes PLS(-DA), il est important de rappeler l'existence de nombreuses autres méthodes statistiques utilisables pour la régression et la classification de données métabolomiques. On pourra notamment citer les forêts aléatoires (*Random Forest*), les machines vectorielles de support (*Support Vector Machine*) ou les régressions logistiques ^{248,249}. Le choix de la méthode supervisée doit ainsi être fait après une analyse minutieuse des propriétés statistiques des données ²⁵⁰.

Pour **l'interprétation de données de métabolomique**, il est généralement recommandé de **débuter par une analyse exploratoire non supervisée**, dont le résultat peut être utilisé pour formuler une hypothèse biologique. **Une analyse supervisée pourra ensuite être appliquée afin de vérifier et tester cette hypothèse**²³⁸.

PROBLEMATIQUE

Lorsqu'un organisme **colonise un nouvel environnement**, il doit rapidement s'adapter à ses nouvelles conditions de vie afin de pouvoir tirer parti des ressources disponibles, et résister aux stress et menaces qu'il va rencontrer. Au fil des générations, les mécanismes mis en place par les individus leur permettant d'acquérir un avantage dans cet environnement seront sélectionnés positivement : c'est **l'évolution adaptative**. Cette évolution adaptative est guidée par les **phénotypes**, qui sont les fonctions et caractères exprimés par les organismes en réponse à des signaux internes en provenance du génome, et à des *stimuli* externes en provenance de l'environnement.

Les **bactéries** sont un modèle particulièrement adapté pour l'étude des processus d'évolution adaptative, par exemple par des expériences d'évolution réalisées *in vitro*, en laboratoire. Elles permettent d'étudier les évolutions phénotypiques mises en place au fil des générations, ainsi que les mécanismes moléculaires rendant ces adaptations possibles.

Les infections chroniques (ou persistantes) à *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a.*), particulièrement fréquentes chez les patients atteints de mucoviscidose, offrent une occasion rare d'étudier l'évolution adaptative bactérienne en conditions réelles. La surveillance systématique de ces patients et la conservation des prélèvements microbiologiques tout au long de cette infection, permettent d'observer *a posteriori* l'évolution adaptative de la bactérie en réponse à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique *in situ*. Ces infections pulmonaires chroniques sont en outre d'importance clinique majeure. Elles concernent une grande majorité des patients adultes, et sont aujourd'hui considérées comme la **principale cause de morbidité et de mortalité** dans la mucoviscidose. Son **haut potentiel de résistance aux antibiotiques** fait par ailleurs de *P. a.* l'un des pathogènes les plus menaçants en termes de santé publique, et rend ces infections particulièrement difficiles à éradiquer. Ainsi, une fois établie, la colonisation chronique des voies respiratoires par un clone de *P. a.* chez un patient atteint de mucoviscidose persiste le plus souvent jusqu'à la fin de sa vie.

Au sein de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique, la bactérie est soumise à de nombreux stress. Ces stress constituent des **pressions de sélection**, communes à tous les

patients, qui résultent en des adaptations phénotypiques parallèles des souches infectant différents patients.

Devant l'importance clinique de ces infections, de nombreuses études ont cherché à élucider les **mécanismes moléculaires** permettant ce succès adaptatif par des méthodes de biologie à haut débit. La plupart de ces études ont porté sur les évolutions génomiques de la bactérie, par l'identification des mutations accumulées par des lignées clonales évolutives infectant différents patients. Cependant, ces approches génomiques se sont révélées limitées dans la prédiction de l'expression de phénotypes bactériens d'importance clinique (virulence, résistance aux antibiotiques...).

Notre hypothèse est que le manque d'association entre le génome et les phénotypes bactériens est dû en partie aux nombreuses étapes de régulation biologique survenant entre le code génétique et son expression phénotypique. Ainsi, seule une faible proportion de l'information codée dans l'ADN est effectivement exprimée. De plus, l'observation du génome seul ne permet pas d'intégrer l'influence directe de l'environnement sur les expressions phénotypiques. Aujourd'hui, le développement des approches post-génomiques permet l'élucidation de mécanismes moléculaires à un niveau toujours plus fonctionnel. La **métabolomique**, dernière-née des disciplines –omiques, offre ainsi une lecture au plus proche du phénotype. Par la mesure des niveaux de métabolites, elle fournit une prise de vue instantanée du métabolisme, au carrefour des signaux intrinsèques et extrinsèques pouvant influencer l'expression des phénotypes (Figure 13). Nous pensons ainsi que la métabolomique peut constituer un outil puissant pour étudier l'évolution adaptative de *P. a.* au cours des infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.



Figure 13. La mesure des niveaux des métabolites bactériens intracellulaires offre une prise de vue instantanée des activités métaboliques de la cellule.

En intégrant l'ensemble des déterminants intrinsèques et extrinsèques de l'expression des phénotypes, elle constitue un point de vue mécanistique fonctionnel de l'évolution adaptative de la bactérie au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose.

OBJECTIFS

Nous avons choisi d'étudier l'évolution adaptative de *P. a.* par une approche intégrative, combinant des mesures de phénotypes bactériens d'importance clinique, et l'acquisition d'empreintes métabolomiques non ciblées par des méthodes hautement résolutives, réalisées sur des cultures bactériennes effectuées dans des conditions proches de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique.

Notre objectif principal est de mettre en évidence des **mécanismes métaboliques sous-tendant l'évolution adaptative des phénotypes bactériens**. De tels résultats permettraient de faire émerger de nouvelles hypothèses de recherche pour le traitement des infections pulmonaires chroniques à *P. a.*, mais également de gagner en compréhension sur les mécanismes soustendant l'évolution adaptative de bactéries pathogènes en général. Nous chercherons ainsi à mettre en évidence des trajectoires adaptatives parallèles du métabolisme de souches infectant différents patients. Si nous parvenons à identifier certaines voies métaboliques impliquées de manière systématique dans l'adaptation de *P. a.* à son hôte, une stratégie thérapeutique future pourrait cibler ces voies, pour empêcher l'établissement de l'infection pulmonaire chronique. Si à l'inverse, nous n'identifions pas une unique voie d'adaptation du métabolisme bactérien à l'hôte, mais plusieurs voies possibles distinctes, nous chercherons à déterminer l'impact de chaque voie adaptative sur la pathogénicité de l'infection. Dans ce cas, cibler les voies métaboliques conduisant à l'apparition de phénotypes d'importance clinique, ou encore à une aggravation rapide des symptômes respiratoires pour le patient, pourrait constituer une stratégie prometteuse.

Le second objectif de cette étude est de mettre en évidence des **corrélations entre certaines signatures métaboliques bactériennes et l'expression de phénotypes associés à la virulence et à la résistance aux antibiotiques, ou encore avec l'état de santé respiratoire du patient infecté**. L'identification de voies métaboliques impliquées, par exemple, dans la résistance à certains antibiotiques pourrait permettre en évidence de nouveaux mécanismes de résistance. Des études futures pourraient ainsi chercher à restaurer sensibilité de *P. a.,* par exemple par l'ajout de molécules ciblant ces voies métaboliques de manière spécifique.

ORGANIGRAMME

Pour répondre à ces questions, le travail présenté ici s'organise en 4 grandes parties.

Dans un premier temps, nous avons **constitué une banque d'isolats cliniques de** *P. a.*, représentatifs de l'évolution clonale de la bactérie au cours de l'infection pulmonaire chronique chez plusieurs patients adultes atteints de mucoviscidose.

Dans un second temps, nous avons **caractérisé les patients de la cohorte au plan clinique**, par la construction d'indicateurs de la santé respiratoire. Nous avons ensuite **caractérisé l'ensemble des isolats bactériens de la banque au plan phénotypique** (mesure de nombreux phénotypes associés à la virulence et à la résistance aux antibiotiques).

Ensuite, les **profils métaboliques des isolats** ont été définis par analyse **métabolomique non ciblée à haute résolution** (HPLC-HRMS) sur cultures bactériennes.

La dernière étape de ce travail fut enfin d'**intégrer l'ensemble des données cliniques, phénotypiques et métabolomiques** par des méthodes statistiques multivariées et multi-échelles, afin d'identifier les voies métaboliques d'intérêt (Organigramme 1).



Organigramme 1 : Organisation globale de la présentation du travail de thèse.

PARTIE I

CONSTITUTION D'UNE BANQUE DE LIGNEES CLONALES EVOLUTIVES DE *P. AERUGINOSA* INFECTANT DES PATIENTS ADULTES ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

INTRODUCTION

L'objectif de notre étude est d'étudier l'évolution adaptative de *P. a.* lorsqu'elle colonise durablement les voies aériennes de patients adultes atteints de mucoviscidose. La première partie de ce travail a donc consisté à **constituer une banque d'isolats cliniques de** *P. a.* rassemblant les critères nécessaires à la poursuite des analyses.

Dans ce chapitre, nous décrirons l'ensemble des étapes ayant conduit à l'obtention de cette banque :

- Critères de sélection des patients à notre étude
- Constitution de la Master Cell Bank
- Génotypage par électrophorèse en champ pulsé
- Constitution de la *Final Cell Bank* de lignées clonales évolutives de *P. a.* colonisant les poumons des patients

Cette *Final Cell Bank* a servi de matériel de base à notre étude de l'évolution adaptative de *P. a.* (Organigramme 2).



Organigramme 2 : Positionnement de la Partie I (constitution d'une banque de lignées clonales évolutives de *P. a.* infectant des patients atteints de mucoviscidose) dans le contexte général de la thèse.

MATERIELS ET METHODES

1. MILIEUX ET CULTURES BACTERIENNES

Si non précisé, l'ensemble des pré-cultures et des cultures de *P. a.* ont été réalisées en conditions aérobie, à 37°C. Les cultures liquides ont été faites sous agitation à 230 rpm dans 2,5 mL de milieu. Les pré-cultures ont été faites pendant 24 à 48 h selon la vitesse de croissance des isolats, et la croissance bactérienne a été suivie par des mesures de densité optique à 595 nm (DO₅₉₅) à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec 10 Cell Density meter, Amersham Bioscience). Les milieux de culture utilisés sont les milieux Lysogeny Broth (LB) liquide et solide, les géloses *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) et Mueller-Hinton (MH), ainsi que le milieu *Sputum of Cystic Fibrosis Medium* 2 (SCFM2)²³⁰.

Les milieux LB et PIA ont été préparés comme indiqué Tableau 1, et stérilisés par autoclavage à 121°C, 1,05 bar pendant 20 min (Tableau 1).

Milieu	Composition pour 1 L	Références
Lysogeny Broth (LB) liquide	25 g de LB en poudre Eau distillée QSP	AthenaES
(solide)	(+ 15 g d'Agar-Agar)	(Euromedex)
Pseudomonas Isolation Agar (PIA) solide	45 g de PIA en poudre 20 mL de Glycérol Eau distillée QSP	Difco laboratories Euromedex
Mueller-Hinton (MH) solide	Pré-coulés	BioMérieux

Tableau 1. Composition des milieux de culture LB, PIA et MH

Le SCFM2 est un milieu chimiquement défini reproduisant les concentrations en acides aminés, sels, acides gras, ADN, glucose, acide lactique et N-acetylglucosamine retrouvées dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose. Il a été préparé comme décrit précédemment par Turner et collègues ²³⁰ (Tableau 2). L'ensemble des composés purs utilisés proviennent de chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) et sont au plus haut niveau de pureté. L'eau distillée utilisée a été filtrée à l'aide d'un système de purification Milli-Q (Millipore). Le pH a été ajusté à 6,8 par ajout d'acide chlorhydrique (HCl) puis le milieu a été stérilisé par filtration à 0,22 µm à l'aide d'une pompe à vide (colonne MILLIPORE Express PLUS). Après aliquotage dans des tubes Falcon de 50 mL, il a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Quelques heures avant utilisation, les tubes ont été décongelés à température

ambiante à l'abri de la lumière, puis mis sous agitation à 37°C pendant 15 min pour homogénéisation. Le milieu SCFM2-solide a été obtenu en mélangeant 1 volume de SCFM2 2X chauffé à environ 50°C à 1 volume d'agar 2X (30 g/L) autoclavé puis refroidi jusqu'à 60°C.

Au contraire de Turner et son équipe, nous avons pour des raisons pratiques écarté la Mucine de la liste des ingrédients du milieu SCFM2 ²³⁰. L'ajout de Mucine donne en effet une texture muqueuse au milieu, et crée un trouble important, ce qui empêche le suivi de la croissance bactérienne par mesures de DO₅₉₅.

Со	mposé	Concentration (mM)			Composé	Concentration (mM)
	L-Ser	1,5			NaH2PO4	1,3
	L-Glu *	1,5			Na2HPO4	1,3
	L-Pro	1,7			KNO3	0,35
	Gly	1,2	Sels	K2SO4	0,27	
	L-Ala	1,8		NH4CI	2,3	
	L-Val	1,1		KCI	14,9	
	L-Met	0,6		NaCl	51,8	
	L-lle	1,1		CaCl2 * 2H ₂ O	1,8	
	L-Leu	1,6		Tampon	MgCl2 * 6H ₂ O	0,61
Acides aminés	L-Orn * HCI	0,68			FeSO4 * 7H ₂ O	0,0036
unnes	L-Lys * HCI	2,1			MOPS	10
	L-Arg * HCI	0,31			D-glucose	3
	L-Trp	0,01			L-lactic acid	9,3
	L-Asp	0,83	Sources de carbone	N-acetyl-D-glucosamine	0,3	
	L-Tyr	0,80		1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DOPC)	100 µg/mL	
	L-Thr	1,1				
	L-Cys *	0,16				
	L-Phe	0,53			ADN de sperme de saumon	0,6 g/mL
	L-His * HCI	0,52				

Tableau 2. Composition du milieu SCFM2 (adaptée de ²³⁰)

NB : Le milieu SCFM2 utilisé ici est adapté du protocole décrit par Turner et son équipe, sans ajout de Mucine, protéine utilisée pour donner une texture muqueuse au milieu ²³⁰. L'absence de Mucine permet la stérilisation du milieu par filtration et son utilisation sans ajout d'antibiotiques, ainsi que le suivi de la croissance bactérienne par mesure de densité optique à 595 nm (DO₅₉₅).

2. SOUCHES DE REFERENCE

Souche (<i>espèce</i>)	Référence	Utilisation dans l'étude	
DH5 α (<i>Escherichia Coli</i>)	Bacterial Test Standard (Bruker BTS)	Standard analytique pour l'identification de l'espèce bactérienne par MALDI-TOF	
H9812 sérotype Braenderup (Salmonella enterica)	CDC Atlanta ²⁵¹	Standard analytique : ADN génomique utilisé comme marqueur de taille pour le génotypage par électrophorèse en champ pulsé	

Tableau 3. Souches bactériennes de référence utilisées pour la constitution de la banque

3. SELECTION DES PATIENTS

Depuis 2010, le laboratoire de bactériologie du CHU Grenoble-Alpes a constitué une banque unique d'isolats cliniques de *P. a.* isolés chez des atteints de mucoviscidose (plus de 100 patients). Afin d'étudier l'adaptation bactérienne au cours de l'infection chronique, nous avons sélectionné parmi ces patients une cohorte sur la base des critères suivants :

- Suivi au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) Adulte du CHU Grenoble-Alpes entre 2010 et 2015 ;
- Âge supérieur ou égal à 16 ans en 2010 ;
- Au moins 3 isolements de *P. a.* sur expectorations à des dates différentes entre 2010 et 2015 ;
- Au moins 3 ans d'intervalle entre le premier et le dernier prélèvement de *P. a.* effectués sur la période 2010-2015.

4. ISOLATS CLINIQUES DE P. AERUGINOSA

La constitution de la banque d'isolats cliniques de *P. a.* a été réalisée en collaboration avec le Pr. Max Maurin, responsable du service de bactériologie du CHU Grenoble-

Le suivi clinique des patients atteints de mucoviscidose au CRCM du CHU Grenoble-Alpes implique une visite de routine tous les trois mois. Au cours de ces visites sont collectés des échantillons des voies respiratoires inférieures (expectorations spontanées) à des fins de diagnostic. Les souches bactériennes sont ensuite isolées de ces expectorations suivant les méthodes de bactériologie clinique de référence, avant d'être conservées à -80°C dans des cryotubes à billes ²⁵².

Isolat : Un isolat bactérien définit une souche purifiée, séparée depuis une population microbienne hétérogène par des méthodes de culture (étalements sur gélose) ²⁵⁸.

Chez chaque patient, nous avons sélectionné 3 à 6 isolats selon les critères suivants :

- Trois périodes de prélèvement distinctes : début, milieu et fin de la période de suivi comprise entre 2010 et 2015 ;
- Isolat collecté à distance temporelle d'autres prélèvements de P. a., dans le but de se placer à l'écart des périodes d'exacerbation, lors desquelles les patients sont suivis de près et leurs expectorations prélevées plus fréquemment. Ce critère vise à obtenir des isolats représentatifs de l'état basal de l'infection chronique.

Les isolats sélectionnés ont été remis en culture et purifiés si nécessaire (plusieurs morphotypes observés après remise en culture sur gélose) par étalement sur LB-Agar. Le nombre de passages sur gélose a été réduit au minimum, afin d'éviter toute dérive adaptative due aux conditions de culture. Une colonie unique de chaque isolat purifié a ensuite été remise en culture LB liquide pendant 24 à 48 h à 37°C, 230 rpm pour constituer la **Master Cell Bank (MCB)**, conservée en LB-liquide + Glycérol 16 % à -80°C.

L'espèce bactérienne a ensuite été confirmée par profilage protéique par spectrométrie de masse couplée à une source d'ionisation laser assistée par matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF/MS) à l'aide d'un Microflex LT Biotyper[®] (Bruker Daltonics, Wissenbourg, France) au CHU Grenoble-Alpes. Les spectres obtenus ont été comparés automatiquement à la base de données de référence interne du logiciel constructeur (MBT Compass IVD, Bruker) et nous avons validé l'appartenance à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* lorsque le score d'identification fourni était supérieur à 2, soit une identification de haut niveau de confiance.

5. SYSTEME DE NUMEROTATION DES ISOLATS

Les isolats ont été identifiés comme suit (voir exemple Figure 14) :

- Un premier numéro correspondant à l'identifiant du patient ;
- Un deuxième numéro correspondant au « point temporel » de prélèvement dans le suivi du patient : début de suivi = point temporel 1, milieu = 2, fin = 3 ;

- Si plusieurs isolats ont été prélevés depuis la même expectoration, une lettre majuscule identifiant l'isolat ;
- Si une deuxième purification a été nécessaire, une lettre minuscule correspondant à l'isolat purifié.



Figure 14. Illustration du système de numérotation des isolats cliniques de *P. a.* (exemple du Patient 10).

Les « + » indiquent les dates auxquelles un échantillon de *P. a.* a été prélevé chez le patient 10, entre 2010 et 2015 ; les ronds rouges entourent les prélèvements sélectionnés pour la *Master Cell Bank*. Chez ce patient, deux isolats correspondant au début (10.1A et 10.1B), milieu (10.2A et 10.2B) et fin (10.3A, 10.3B) de la période de suivi ont été remis en culture par étalement sur LB-Agar. Lors de cet étalement, les colonies de l'isolat 10.1A présentaient deux morphotypes distincts et qui ont été séparés (10.1A.a et 10.1A.b).

6. GENOTYPAGE PAR MACRORESTRICTION GENOMIQUE ET ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE (PFGE)

Ces génotypages ont été réalisées en collaboration avec Benoit Cournoyer et Laurence Marjolet, au sein du laboratoire d'Ecologie Microbienne, à Marcy l'Etoile (Rhône, France).

Quelques colonies des isolats de *P. a.* de la *Master Cell Bank* obtenues après 24 à 48 h de croissance sur LB-Agar ont été suspendues dans un tampon de suspension bactérienne (TSB) contenant 100 mM de Tris à pH 8 et 100 mM d'EDTA. Le volume nécessaire de suspension bactérienne pour atteindre 1,4 unités de DO_{595nm} a été centrifugé et le culot a été repris dans 400 µL de tampon TSB avant ajout de protéinase K (pK, concentration finale = 1 µg/mL). Les suspensions bactériennes + pK ont ensuite été incluses dans des plugs d'Agarose 0,5 % (SeaKem[®] Gold Agarose) + SDS 0,5 % avant d'être lysées dans 5 mL de tampon de lyse contenant 50 mM de Tris à pH 8, 50 mM d'EDTA, 1% de N-Laurylsarcosine et 0.01 % de pK pendant 2 h à 54°C sous agitation. Les plugs ont enfin été lavés 3 fois à l'eau déminéralisée

stérile et 3 fois au tampon TE (Tris pH 8 10 mM + EDTA 1 mM), pendant 10 min à 54°C sous agitation, et conservés à 4°C dans du TE en attendant la digestion.

Les génomes bactériens contenus dans les plugs d'agarose ont ensuite été digérés par 40 unités d'enzyme *Spel* (ThermoFisher) pendant 2 h à 37°C. L'ADN de la souche *S. enterica* H9812 préparé et digéré par *Xbal* selon le même protocole a été utilisé comme marqueur de taille et inclus dans les gels tous les 2 à 9 puits. Les fragments d'ADN digérés par *Spel* ou *Xbal* (pour *S. enterica*) ont ensuite été séparés par PFGE dans un gel d'Agarose 1 % (SeaKem Gold Agarose, Lonza) dans du tampon de migration Tris-Borate-EDTA 0,5X. La migration a été faite à 14°C dans un automate CHEF-DR III (Bio-Rad) à 5,0 V.cm⁻¹ avec un temps de commutation de 5 à 25 secondes pendant 11 h, puis 5 à 60 s pendant 13 h.

Les empreintes génomiques ou **pulsotypes** des isolats, ont été révélées par excitation aux ultraviolets après un bain de Bromure d'Ethidium (BET), puis photographiés et convertis en fichiers TIFF à l'aide d'un Molecular Imager GelDoc[™] Biorad couplé au logiciel ImageLab 5.1 (Bio-Rad). Les images ainsi obtenues ont enfin été analysées à l'aide du logiciel BioNumerics 7.1 (Applied Maths) afin de normaliser et d'aligner l'ensemble des gels obtenus.

7. DEFINITION DES CLONES, COMPLEXES CLONAUX ET LIGNEES CLONALES EVOLUTIVES

Afin de pouvoir être comparés, les pulsotypes ont été convertis en une matrice discrète de présence/absence de bandes en fonction du poids moléculaire (codée 1/0) ²⁵³. La matrice des distances de Hamming a été calculée d'après la matrice de présence/absence. Elle résume le nombre de bandes différentes entre les pulsotypes de chaque isolat comparés deux à deux ²⁵⁴. Les résultats ont ensuite été interprétés selon les critères de Tenover, qui définissent comme **clonaux** les isolats dont les pulsotypes présentent 1 à 6 bandes différentes ²⁵⁵. Les groupes d'isolats appartenant à un même complexe clonal les isolats dont les pulsotypes présentent 1 à 6 bandes différentes ²⁵⁵. Les groupes d'isolats appartenant à un même complexe clonal ont ainsi été constitués par classification ascendante hiérarchique sur les distances euclidiennes, selon la méthode d'agglomération de Ward ²⁵⁶. Nous avons défini comme **lignée clonale évolutive**, l'ensemble des isolats partageant un même complexe clonal et ayant été prélevés chez un même patient à différents moments de la période de suivi.

L'ensemble des calculs a été réalisé à l'aide du logiciel R version 3.3.2²⁵⁷.

8. CONSTITUTION DE LA BANQUE FINALE

Notre banque finale ou « *Final Cell Bank* » (FCB), sur laquelle ont été menées les analyses phénotypiques et métabolomiques de l'évolution de *P. a.* dans les poumons des patients, a été constituée en sélectionnant pour chaque patient, deux isolats appartenant à la même lignée clonale évolutive et prélevés à un intervalle d'au moins un an.

La Figure 15 représente l'ensemble des différentes étapes ayant conduit à l'obtention de la FCB.



Figure 15. Résumé des principales étapes de constitution de la banque finale (FCB).

9. CONSERVATION DES ISOLATS

La *Master Cell Bank* (MCB) et la *Final Cell Bank* (FCB) ont été conservées en cryotubes à -80°C en LB liquide + Glycérol 16 % après 24 à 48 h de culture à 37°C, 230 rpm. La FCB a été dupliquée en *Working Cell Bank* (WCB) en milieu SCFM2 + Glycérol 16 % afin de pouvoir réaliser nos analyses sans affecter la banque source.

RESULTATS

1. SELECTION DES PATIENTS ET CONSTITUTION DE LA MASTER CELL BANK

Au total, 38 patients remplissaient les critères d'inclusion à notre étude. Pour 37 de ces 38 patients, nous avons pu remettre en culture 3 à 6 isolats cliniques de *P. a.* prélevés en début, milieu et fin de la période de suivi, les cultures s'étant révélées infructueuses pour l'un d'entre eux. La Figure 16 représente les séries temporelles des 792 prélèvements de *P. a.* effectués à partir des expectorations spontanées de ces patients, sur la période 2010-2015. Au total, 222 isolats prélevés à partir des expectorations de 37 patients ont été remis en culture pour constituer la *Master Cell Bank* (Figure 16).

L'ensemble de ces 222 isolats ont ensuite été testés par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de confirmer leur appartenance à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Lors de cette analyse, les isolats prélevés chez le patient 96 n'ont pas confirmé leur appartenance à l'espèce, portant le nombre de patients restant dans notre étude à 36.



Figure 16. Séries temporelles des prélèvements de *P. a.* réalisés à partir des expectorations des 38 patients correspondant aux critères d'inclusion.

Les patients sont représentés en ligne, avec leur numéro d'identification indiqué à gauche. Les + représentent les dates de prélèvement (en abscisse) des différents isolats de *P. a.* réalisés chez chaque patient (indiqué par son identifiant, en ligne). Les • représentent les dates de prélèvement des 222 isolats constituant la *Master Cell Bank*.

2. GENOTYPAGE PFGE ET CONSTITUTION DE LA FINAL CELL BANK

Cent vingt-et-un isolats issus de 34 des 36 patients restants ont été génotypés par PFGE. Les isolats de 2 patients n'ont pas pu être génotypés, en raison d'une trop faible concentration d'ADN génomique dans les cultures pour le patient 22, et de la production intrinsèque importante de DNAses pour le patient 71.

Les profils de macrorestriction (ou pulsotypes) obtenus suite à l'analyse PFGE ont été comparés 2 à 2 et interprétés selon les critères de Tenover (Figure 17). Ainsi, des isolats présentant des pulsotypes identiques ont été définis comme appartenant à un même **clone**, et des isolats dont les pulsotypes présentent 6 bandes ou moins ont été définis comme appartenant à un même **complexe clonal**. Dans ces deux cas, les similarités des empreintes génomiques sont jugées suffisantes pour conclure à l'existence d'un **ancêtre commun** récent ²⁵⁵. Ainsi, nous avons considéré que différents isolats appartenant à un même complexe clonal, prélevés chez le même patient à différents moments de sa vie, représentent différents stades d'évolution d'une lignée descendant du clone ayant initié l'infection chronique. Nous avons donc défini une **lignée clonale évolutive** comme un ensemble d'isolats appartenant à un même complexe le même patient.

Le génotypage des isolats de notre banque a permis la détection de 27 complexes clonaux (CC) distincts. La grande majorité des isolats typés appartiennent à un complexe clonal, et seuls 6/121 isolats ne sont associés à aucun autre. On remarque par ailleurs la constitution de 3 « Super-complexes », isolats de même complexe clonal ayant été collectés chez des patients différents (CC1 : 5 patients ; CC2 : 2 patients ; CC3 : 6 patients) (Figure 17). Il est à noter que les 2 patients du CC2 ainsi que 2 des 5 patients du CC1 appartiennent à une même fratrie, les autres patients liés par ces Super-complexes ne partageant aucun lien de parenté.



122 isolats

Figure 17. Classification ascendante hiérarchique des pulsotypes des 122 isolats bactériens génotypés par PFGE (distances de Hamming, méthode d'agglomération Ward).

Les 122 isolats apparaissent en ligne et en colonne et sont comparés 2 à 2. A l'intersection des lignes et des colonnes, est représentée l'interprétation des distances selon les critères de Tenover : en rouge, les pulsotypes sont identique (même clone) ; en orange, les pulsotypes comporte 1 à 6 bandes différentes (même complexe clonal). On remarque la constitution de 3 Super-complexes, complexes clonaux partagés entre différents patients.

Clone : Un clone définit une population bactérienne dont le génotype est identique selon la méthode de génotypage utilisée. Dans ce travail, des isolats de pulsotypes PFGE identiques sont définis comme clonaux.

Complexe clonal : Dans ce travail, un groupe d'isolats dont les pulsotypes PFGE présentent de 1 à 6 bandes de différence sont considérés comme appartenant à un même complexe clonal.

Super-complexe : Complexe clonal partagé par différents patients.

Lignée clonale évolutive : Dans ce travail, une lignée clonale évolutive est constituée de 2 isolats prélevés chez un même patient à un intervalle d'au moins un an et appartenant au même complexe clonal. Ces deux isolats sont les représentants, précoce et tardif, de différents stades d'évolution du clone ayant initié l'infection chronique.

La Figure 18 présente les résultats du génotypage des isolats prélevés chez chaque patient de la cohorte entre 2010 et 2015. On remarque que pour la grande majorité des patients, le même CC est retrouvé aux différents temps de prélèvement, preuve d'une infection chronique clonale, permettant la constitution de lignées clonales évolutives pour 32/34 patients.

Les 2 patients pour lesquels nous n'avons pas obtenu de lignée évolutive sont les patients 17 et 86. Pour le patient 17, un seul isolat a pu être génotypé, en raison de difficultés de culture des isolats correspondant aux autres points temporels. Pour le patient 86, 3 CC différents ont été identifiés à chaque temps de prélèvement, suggérant une succession d'infections intermittentes par clones. Il est intéressant de remarquer que chez ces 2 patients, le Supercomplexe 3 a été détecté de manière intermittente. Ce même Super-complexe est retrouvé de manière répétée chez les patients 18, 26, 58 et 97, suggérant que ce même CC a été efficacement éradiqué à un stade d'infection précoce chez 2 patients, tandis que chez les autres, l'éradication a échoué, permettant la colonisation durable des voies respiratoires du patient.

On remarque enfin que pour le patient 27, 2 CC distincts ont été détectés à différents temps de prélèvement, suggérant une co-infection chronique des poumons de ce patient par deux clones de *P. a.* différents (Figure 18).

Pour chaque patient, les isolats correspondant au prélèvement le plus précoce et le plus tardif et appartenant à une même lignée évolutive ont été sélectionnés pour la constitution de la *Final Cell Bank* (FCB). La FCB est ainsi constituée de 66 isolats appartenant à 33 lignées clonales ayant évolué chez 32 patients. Les prélèvements des isolats précoce et tardif chez chaque patients sont séparés de 1 à 5 ans (moyenne = 3,5 ans, médiane = 3,7 ans). Les 33 lignées clonales appartiennent à 25 CC distincts, dont 3 super-complexes partagés entre plusieurs patients. Il est à rappeler que le patient 27 est co-infecté par deux lignées clonales distinctes (Figure 18).

Cette FCB a ensuite été dupliquée en *Working Cell Bank* (WCB), et conservée à -80°C en vue des analyses.



Figure 18. Séries temporelles des prélèvements des isolats sélectionnés pour la banque finale (FCB).

La forme des points représente le CC déterminé par PFGE. Pour chaque patient, une lignée clonale évolutive constituée de 2 isolats (le plus précoce et le plus tardif) a été sélectionnée, à l'exception du patient 27, pour lequel 2 lignées ont été conservées. Les CC 1, 2 et 3 constituent des super-complexes, retrouvés chez plusieurs patients.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Afin de mener notre étude phénotypique, métabolomique et clinique de l'évolution adaptative de *P. a.*, nous avons construit notre propre banque d'isolats cliniques prélevés entre 2010 et 2015 chez des patients mucoviscidosiques suivis au CHU Grenoble-Alpes. Afin de réduire le risque de dérive évolutive lors des cultures en laboratoire, le nombre d'étapes de culture réalisées pour la constitution de la banque a été réduit au minimum. Notre MCB est constituée de 222 isolats séquentiels, prélevés chez 37 patients adultes.

Une partie des isolats de cette MCB ont été génotypés par PFGE, méthode de référence pour les études épidémiologiques en raison de son remarquable pouvoir discriminant ²⁵⁸. Ce génotypage a conduit à l'identification dans la banque de 3 « Super-complexes », CC partagés par différents patients. L'identification de clones de P. a. responsables de l'infection chez plusieurs patients est commune, et peut être due notamment à une contamination par une source environnementale commune, à une transmission directe entre patients ou à l'existence dans l'environnement de clones plus propices à coloniser l'environnement pulmonaire mucoviscidosique ^{96,214,259-261}. On note que les 2 fratries de notre cohorte partagent un même super-complexe, et l'on peut raisonnablement affirmer que dans leurs cas, l'hypothèse d'une contamination croisée ou par une source environnementale commune est hautement probable. Pour les autres patients, il est difficile de conclure sur l'origine de l'infection sans une étude épidémiologique poussée, incluant la comparaison de la prévalence des génotypes identifiés ici avec d'autres collections indépendantes. Il est important de noter cependant que la méthode PFGE utilisée ici, bien que très résolutive, est peu reproductible entre laboratoires. Pour comparer les génotypes de souches collectées dans différents centres, d'autres méthodes de génotypage seront à favoriser, comme le séquençage MLST (pour *Multi-Locus Sequence Typing*) ^{255,258,262}. Toutefois, considérant que tous les patients de notre cohorte sont suivis dans le même centre, on peut supposer que les risques de contamination par une source commune ou de transmission inter-patients à l'hôpital sont relativement importants.

Un résultat majeur du génotypage de la banque est l'identification, chez la grande majorité des patients, d'isolats de même CC prélevés à différents temps de la période de suivi. Ce résultat démontre chez ces patients la persistance d'une **infection chronique clonale**, initiée

dans le passé par un clone qui a ensuite colonisé durablement les voies respiratoires du patient. Nous avons ainsi pu constituer des **lignées clonales évolutives**, représentatives de l'évolution adaptative intra-hôte de *P. a.* au cours de l'infection chronique chez chaque patient. L'isolat le plus **précoce** et le plus **tardif** de chaque lignée évolutive ont été sélectionnés pour la constitution de la FCB.

Il est aujourd'hui admis que les bactéries responsables d'infections pulmonaires chroniques s'adaptent suivant 2 grands moteurs : d'une part, une évolution parallèle en réponse à des stress environnementaux communs, et d'autre part, une radiation adaptative conduisant à la formation d'une communauté diverse adaptée aux nombreuses micro-niches ^{208,263}. On pourrait ainsi se questionner sur la pertinence des collections longitudinales d'isolats uniques pour l'étude de l'évolution adaptative de *P. a.* dans les voies pulmonaires mucoviscidosiques. Pour répondre à cette question, Sommer et son équipe ont comparé les séquences métagénomiques des sécrétions bronchiques de patients atteints de mucoviscidose, avec les séquences des génomes d'isolats uniques issus des mêmes échantillons. Leurs résultats montrent que les mutations identifiées dans les métagénomes sont retrouvées dans les séquences d'isolats uniques, démontrant ainsi que ces isolats uniques représentent une souspopulation considérable, représentative de la population infectante. Les informations obtenues à partir de ces collections longitudinales sont donc pertinentes pour l'étude de l'évolution adaptative de *P. a.* dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose ⁹⁷.

La banque d'isolats cliniques constituée dans cette Partie (FCB) constitue la base de notre étude de l'évolution adaptative de *P. a.* dans les poumons de patients adultes atteints de mucoviscidose.

La FCB est constituée de 66 isolats représentant 33 lignées clonales de *P. a.* ayant évolué chez 32 patients, dont 1 co-infecté par deux lignées distinctes.

Partie II

CARACTERISATIONS PHENOTYPIQUES DES ISOLATS CLINIQUES EVOLUTIFS DE *P. AERUGINOSA*

INTRODUCTION

L'infection pulmonaire chronique à *P. a.* chez les patients atteints de mucoviscidose offre une opportunité unique d'étudier l'adaptation d'une bactérie pathogène à son hôte en conditions naturelles. Dans cet environnement hautement sélectif, la bactérie va devoir modifier ses phénotypes afin de contourner les réponses de l'hôte et survivre dans un milieu soumis en permanence à des concentrations élevées d'antibiotiques ^{96,205}.

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les modifications phénotypiques adaptatives d'une banque de souches cliniques de *P. a.* issus d'infections pulmonaires chroniques. Ces adaptations ont été observées sur deux axes majeurs : modifications de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique, caractérisé par des indicateurs cliniques de l'atteinte respiratoire ; et modifications de phénotypes bactériens de résistance aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, aminosides et fluoroquinolones, et de phénotypes associés à la virulence (vitesse de croissance dans un environnement proche des conditions pulmonaires mucoviscidosiques, mucoïdie, production de pigments, cytotoxicité sur lignées de cellules épithéliales et macrophages et stress induit par l'infection sur cellules épithéliales).

L'évolution bactérienne a été envisagée au regard à la fois de l'adaptation globale à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique, liée à la durée de l'infection chronique (*i.e.* indépendante du patient infecté) ; et des modifications intra-hôte (*i.e.* patient-spécifiques), survenues entre les isolats « précoce » et « tardif » prélevés chez chaque patient.

Remis dans le contexte global de ce travail de thèse, ce travail nous a permis de constituer les bases de données *Phénotypes* et *Clinique* associées à la FCB constituée précédemment, qui seront plus loin analysées conjointement avec les résultats de l'analyse *Métabolomique* des souches (Organigramme 3).



Organigramme 3 : Positionnement de la Partie II (caractérisation phénotypique et clinique de la banque et évolution phénotypique des lignées clonales) dans le contexte général de la thèse.
MATERIELS ET METHODES

1. PATIENTS ET DONNEES CLINIQUES

Les données cliniques recueillies par le CRCM de Grenoble sur la période 2010-2015 ont été extraites à partir des historiques médicaux des patients de la cohorte. Ont notamment été recensés : l'année de naissance, le sexe, la mutation du gène *cftr* à l'origine de la mucoviscidose, la date à laquelle l'infection chronique à *P. a.* a été diagnostiquée selon les critères de référence ²⁶⁴ (\geq 50 % des prélèvements respiratoires positifs à *P. a.* sur les 12 mois précédents), et les différentes mesures de Volume Expiratoire Maximal en 1 Seconde (VEMS) réalisées sur la période de suivi (en Litre). Les valeurs de VEMS ont ensuite été converties en *Z-score* ajusté sur l'âge, le sexe et la taille du patient par régression non linéaire grâce au logiciel GLI-2012 Data Conversion ²⁶⁵.

Z-score : Les valeurs de *Z-score* correspondent à l'écart-type séparant une mesure de sa valeur prédite dans une distribution normale ²⁶⁵. Ainsi, un *Z-score* de 0 correspond à une valeur égale à la moyenne de la population de référence, et un *Z-score* égal à - 1,64 ou +1,64 correspond à une valeur égale au 5^{ème} ou au 95^{ème} percentile de la distribution, respectivement.

Cette étude ne répond pas à la définition d'une recherche impliquant la personne humaine, en particulier elle porte sur la réutilisation de données récoltées dans le cadre du soin. La méthodologie de référence MR-004 de la Commission Nationale de l'Informatique et des libertés ²⁶⁶ (CNIL) encadre les traitements de données à caractère personnel à des fins de recherche n'impliquant pas la personne humaine. Les patients ont été informés de leur inclusion à l'étude puis les données ont été anonymisés après certification de non opposition.

2. SOUCHES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

2.1. ISOLATS CLINIQUES ET DUREE DE L'INFECTION CHRONIQUE A PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Les caractérisations des phénotypes bactériens décrites dans cette partie ont été réalisées sur l'ensemble des 66 isolats de la *Final Cell Bank* (FCB) décrite dans la **Partie I**. La durée de l'infection chronique a été définie comme le temps écoulé entre la date de début de l'infection chronique telle que renseignée dans les dossiers cliniques et la date de prélèvement de l'isolat.

2.2. Souches de reference de P. A.

Souche	Référence et contexte	Génotype	Utilisation dans l'étude	
OST	Souche de virulence atténuée : présence d'un SST3 mais absence des toxines ExoS et ExoT ²⁶⁷	exoS⁻, exoT⁻	Contrôle négatif de la présence des gènes <i>exoS</i> et <i>exoT</i> criblée par PCR	
СНА	Souche isolée d'une infection pulmonaire chez un patient atteint de mucoviscidose au CHU de Grenoble ²⁶⁸	Mucoïde <i>exoS</i> +, <i>exoT</i> +	Contrôles positifs de la présence des gènes <i>exoS</i> et <i>exoT</i> criblée par PCR. Contrôles positifs de cytotoxicité médiée par ExoS et ExoT sur cellules J774, contrôles négatifs de cytotoxicité sur A549.	
PAO1F	Souche de virulence modérée isolée en 1954 d'une plaie infectée à Melbourne ²⁶⁹	exoS⁺, exoT⁺		
PA14	Souche clinique de virulence élevée 270	exoU⁺	Contrôle positif de la présence du gène <i>exoU</i> criblée par PCR	
PA103	Souche hautement virulente ayant conduit à la découverte du potentiel cytotoxique de la protéine ExoU ^{271,272}	exoU⁺	Contrôle positif de cytotoxicité médiée par ExoU sur cellules J774 et A549	
IHMA87	Souche clinique de virulence élevée, dépourvue de SST3 mais produisant d'une toxine nouvellement décrite, l'exolysine ExIA, capable de détruire la membrane des cellules de l'hôte ²⁷³	exoS ⁻ , exoT ⁻ , exoU ⁻ exIA ⁺	Contrôle positif de cytotoxicité médiée par ExIA sur cellules J774 et A549	

Tableau 4. Souches de références de	P. a. utilisées	pour les expériences	de phénotypage de la
banque de souches			

2.3. CULTURES BACTERIENNES

Si non précisé, l'ensemble des pré-cultures et des cultures de *P. a.* ont été réalisées en conditions aérobie, à 37°C sous agitation en milieu SCFM2 liquide comme indiqué dans la **Partie I**.

3. CARACTERISATIONS DE PHENOTYPES BACTERIENS

3.1. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Les antibiogrammes ont été réalisés pour 16 antibiotiques (Tableau 5), par méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton (MH), suivant les recommandations de l'*European Comitee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) de 2017 (²⁷⁴). Brièvement, les précultures réalisées en SCFM2 liquide ont été centrifugées 2 minutes à 13 000 rpm, puis les culots ont été resuspendus et dilués en solution saline isotonique (Inoculum broth, Phoenix), jusqu'à atteindre une DO de 0,5 Mac Farland (DensiCHEK[®] system, bioMérieux). Les cultures diluées ont ensuite été étalées sur gélose MH avant dépôt des disques d'antibiotiques et incubés à 37°C pendant 24 à 48 h jusqu'à voir l'apparition de colonies. Les phénotypes sensible/intermédiaire/résistant (S/I/R) ont été définis pour chaque antibiotique par comparaison du diamètre d'inhibition avec les critères de référence de l'EUCAST 2017²⁷⁴.

Voie d'inhibition	Famille		Abréviation	Nom complet
		Carboxy	TIC	Ticarcilline
			TCC	Ticarcilline + acide clavulanique
	actamines	- pénicillines	PIL	Pipéracilline
			PTZ	Pipéracilline + Tazobactam
Synthèse du peptidoglycane		Cánhalannarinna	CZD	Ceftazidime
pop	ta-lâ	Cephalosponnes	FEP	Cefepime
	Bêl	Carbapénèmes	ATM	Aztreonam
			IPM	Imipénème
			MEM	Méropénème
	Aminosides		KMN (*)	Kanamycine (*)
Synthèse des			GMN	Gentamicine
protéines			TMN	Tobramycine
			AKN	Amikacine
Acides nucláigues	Fluoroquinolones		CIP	Ciprofloxacine
Acides indcieiques			LVX	Lévofloxacine
Folates Sulfamides + Triméthoprime		SXT (*)	Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (*)	
(*) Résistance naturelle de P. aeruginosa				

Tableau 5. Regroupement des antibiotiques testés par familles, en fonction de leur mode d'action

3.2. PHENOTYPES ASSOCIES A LA VIRULENCE

3.2.1. Mucoïdie et présence de pigments

Au cours des analyses bactériologiques de routine dans un CHU, le caractère mucoïde des souches est défini par analyse visuelle. Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence la meilleure conservation de ce phénotype sur gélose PIA ²⁷⁵. Nous avons donc défini comme mucoïdes les isolats présentant des colonies caractéristiques après 24 h de culture à 37°C sur gélose PIA. De manière similaire, les isolats produisant des cultures visiblement colorées après 24 h de croissance à 37°C en milieu SCFM2 ont été définis comme producteurs de pigments (Figure 19). Bien que peu sensible, ce type d'observations est fréquemment utilisé et permet de mettre en évidence les isolats produisant des quantités de pigments suffisantes pour être visibles à l'œil nu ^{276,277}.



Figure 19. Aspect typique de cultures d'isolats de la FCB présentant des caractères pigmenté (en haut) et mucoïde (en bas).

3.2.2. Croissance en milieu SCFM2

Les courbes de croissance en milieu SCFM2 ont été réalisées par suivi de la densité optique à 595 nm (DO₅₉₅) toutes les heures pendant 8 h et après 24h de culture en conditions aérobie à 37°C, 230 rpm.

Le taux de croissance bactérienne a été calculé par extraction de la pente du logarithme népérien de la DO₅₉₅ ($ln(DO_{595})$) en fonction du temps, sur la portion linéaire de 300 à 400 min la plus pentue située dans les 500 premières minutes de croissance. Le **temps de génération** *Tg* nécessaires au doublement de la population bactérienne pour chaque isolat a été extrapolé depuis cette pente selon la relation : $Tg = \frac{\ln(2)}{Pente}$. Ces calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel R, version 3.3.2, et les courbes de croissance bactérienne au cours du temps ont été illustrées à l'aide du package ggplot2 ^{257,278}.

1.3.2.3. Tests de cytotoxicité sur lignées cellulaires J774 et A549 par microscopie automatisée

Ces expériences ont été réalisées en étroite collaboration avec Eric Faudry et Tuan Dung Ngo, au sein de l'équipe *Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses* du CEA de Grenoble. Le potentiel cytotoxique sur cellules eucaryotes des isolats a été testé selon le protocole décrit par Basso et son équipe, avec de légères modifications ²⁷⁹.

Brièvement, des lignées de cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 et de macrophages murins J774 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) ont été cultivées en plaques 384 puits à 37°C, 5% CO₂ sur la nuit, dans 40 µL de milieu RPMI (Gibco) + 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma). Une heure avant l'incubation avec les bactéries, les cellules ont été marquées au Syto24 (ThermoFisher, 1,25 µM) et à l'Iodure de Propidium (IP) (Sigma, 0,5 µg/mL). Les pré-cultures des isolats bactériens ont été réalisées en plaque 96 puits, dans 200 µL de milieu SCFM2, à 37°C, 230 rpm pendant 48 h. Les souches de référence CHA, PAO1F, PA103 et IHMA pré-cultivées en milieu LB ont été utilisées comme contrôles positifs de cytotoxicité médiée par différents facteurs de virulence connus de *P. a.* (Tableau 4). Les cellules (10 000 cellules par puits) ont ensuite été incubées avec les bactéries à 37°C, à une Multiplicité d'Infection (MOI) de 10:1. La MOI a été calculée en estimant 5.10⁸ le nombre de bactéries contenues dans 1 mL de culture à DO₅₉₅ = 1. Une inoculation de 10 µL de milieu SCFM2 seul a servi de contrôle négatif. Chaque incubation a été répétée dans 4 puits, et sur 2 expériences indépendantes.

L'incorporation de l'IP a été suivie par microscopie en temps résolu, sur le microscope à fluorescence automatisée IncuCyte[®] ZOOM (Sartorius). Après infection, la plaque a été placée dans la chambre de l'IncuCyte et des images ont été acquises à l'aide d'un objectif X10, en lumière transmise (*Phase*), canal vert (*Green*) et rouge (*Red*) (temps d'acquisition 200 ms) pour évaluer la morphologie cellulaire, compter le nombre de cellules totales et le nombre de cellules mortes, respectivement. Ensuite, des images ont été acquises toutes les 45 min pendant 24 h, en lumière transmise et dans le canal rouge uniquement, pour suivre l'évolution de la morphologie et de la mortalité des cellules. Le nombre de cellules par puits a été obtenu par segmentation des noyaux et énumération dans le champ vert, et le nombre de cellules IP positives (IP⁺) par segmentation des noyaux et énumération dans le champ rouge sur la base de l'intensité de fluorescence. Ces données ont été utilisées pour calculer la proportion de cellules IP⁺ à chaque point temporel et tracer les courbes en fonction du temps à l'aide du logiciel R ²⁵⁷.

111

1.3.2.4. Criblage de la présence des gènes codant les exotoxines ExoU, ExoS et ExoT du SST3 par PCR

Les ADN génomiques des isolats ont été préparés en plaçant 15 µL de culture bactérienne dans 1 mL d'eau milliQ stérile, vortexés 15 s, puis conservés à -20°C. La présence des gènes codant pour les exotoxines *exoS*, *exo*T et *exo*U a été testée par PCR à l'aide des amorces indiquées dans le Tableau 6.

Brièvement, le mélange réactionnel (12,5 μ L de Master Mix 2x (PCR Master Mix with dye, Sigma), 1 μ L de chaque amorce à 25 μ M, 1 μ L de préparation d'ADN génomique et 10,5 μ L d'eau milliQ) a été placé dans le thermocycleur (Eppendorf) avec les paramètres de cycle suivants : dénaturation 3 min à 94°C ; puis 30 cycles (dénaturation 30 sec à 94°C, hybridation 30 sec à la température indiquée pour chaque amorce dans le Tableau 6, élongation 30 sec à 72°C ou 2 min pour *exoT*) ; et enfin 5 min d'élongation à 72°C. Les produits d'amplification obtenus ont été déposés sur gel d'agarose à 1,5 % + GelRedTM 1X (Biotium) avant migration pendant 25 min à 100 V. Les profils de migration ont ensuite été révélés à l'aide du logiciel HawkView et comparés à un marqueur de taille (DNA Ladder Mix, Euromodex).

Le gène *groEL* a été utilisé comme contrôle positif de présence d'ADN, les souches de référence CHA et PAO1 comme contrôles positifs pour la présence des gènes *exoS* et *exoT*, et PA14 pour *exoU*.

Gène	Amorce	Séquence	Taille du fragment amplifié (pb)	
ava 0	Forward	5'-ATCCTCAGGCGTACATCC-3'		
exos	Reverse	5'-ACGACGGCTATCTCTCCAC-3'	328	
oveT	Forward	5'-GCATATTCAATCATCTCAGCAG-3'	- 1010	
exol	Reverse	5'-CGATCCGTCCCGGTTG-3'	- 1310	
evel l	Forward	5'- AGTGCTTACATTCCCCAGATTAAG-3'	- 074	
exoU	Reverse	5'- TGTCAAAATTCTTGTCGATCATCT- 3'	271	
	Forward	5'-AGCCATGGAAAAAGTCGGTAAAG-3'		
groEL	Reverse	3'-CGGATGTTGGAGATCTTCTTGT-3'	201	

Tableau 6. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes *exoS*, *exoT*, *exoU* et *groEL*

4. ANALYSES STATISTIQUES

4.1. ETUDE DES ASSOCIATIONS ENTRE PHENOTYPES : TESTS BIVARIES

Le Tableau 7 présente les différents tests d'association entre deux variables utilisés, ainsi que leurs conditions d'application. Un test a été considéré significatif si la *p*-valeur était inférieure au seuil α , fixé à 0,05.

Variables	Test	Condition	Test alternatif	Hypothèse nulle <i>H₀</i> & Conclusion
Qualitative & Qualitative	X²	Les valeurs de tous les effectifs attendus sont ≥ 5	Test exact de Fisher	<i>H</i> ₀: Les 2 variables sont indépendantes <i>p</i> -valeur ≤ α : Les deux variables sont liées <i>p</i> -valeur > α : Les deux variables sont indépendantes
Quantitative & Quantitative	Coefficient de corrélation R de Pearson	Les deux variables suivent une loi normale	Coefficient de corrélation rho de Spearman	<i>H</i> ₀ : Les 2 variables ne sont pas corrélées <i>p-valeur</i> ≤ α : Les deux variables sont corrélées <i>p-valeur</i> > α : Les deux variables ne sont pas corrélées
Qualitative & Quantitative	2 classes : Test <i>t</i> de Student - ≥ 3 classes : ANOVA	Dans chaque groupe : - Homogénéité des variances - La variable quantitative suit une loi normale OU Effectifs > 30	2 classes : Test des rangs de Wilcoxon (Mann- Whitney) - ≥ 3 classes : Test de Kruskal-Wallis	<i>H</i> ₀: Les moyennes sont homogènes <i>p-valeur</i> ≤ α : Au moins une moyenne diffère <i>p-valeur</i> > α : Les moyennes sont homogènes

Tableau 7. Tests statistiques utilisés pour mesurer l'association entre deux variables

4.2. ANALYSE MULTIVARIEE DES PROFILS PHENOTYPIQUES

Tous les phénotypes mesurés ont été recodés en classes (variables qualitatives), et des groupes d'isolats présentant des caractéristiques similaires ont été constitués par des méthodes de classification non supervisées. Les résultats des tests d'antibiorésistance ont été analysés au regard des modes d'action des antibiotiques, groupés en trois grandes familles : bêta-lactamines, aminosides et fluoroquinolones (Tableau 5). Des groupes d'isolats ayant des profils de résistance similaires ont été constitués par classification ascendante hiérarchique (CAH, méthode Ward, distances euclidiennes ²⁵⁶). Le niveau de virulence ainsi que le potentiel pathogène des isolats ont été définis par Classification Hiérarchique sur les Composantes

Principales (HCPC) réalisée sur l'ensemble des phénotypes associés à la virulence et/ou à la résistance. Brièvement, l'algorithme de la HCPC comporte 3 étapes : 1) une Analyse des Correspondances Multiple (ACM ²⁴¹) permettant de calculer les Composantes Principales (CP) résumant au mieux la variabilité des données ; 2) une CAH (méthode Ward, distances euclidiennes) réalisée sur les CP ; et 3) une stabilisation de la classification par la méthode des *k-means* ²⁴².

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées et visualisées à l'aide logiciel R version 3.3.2 et des packages gplots, FactoMineR et factoextra version 1.0.5.999 ^{257,280–282}.

RESULTATS

1. CLINICOMES

1.1. PATIENTS

La cohorte est constituée de 32 patients, dont 14 femmes et 18 hommes âgés de 16 à 43 ans à la date d'inclusion, le 1^{er} janvier 2010 (médiane = 27 ans, moyenne = 26 ans). Parmi ces 32 patients, 16 sont homozygotes et 12 hétérozygotes pour la mutation $\Delta F508$, les 4 autres portant d'autres types de mutation. Certains de ces patients partagent des liens de parenté : les patients 2 et 3, 127 et 128 appartiennent à une même fratrie. Trois patients de la cohorte sont décédés à date du 1^{er} janvier 2018 : les patients 97 et 127, décédés en 2014 à l'âge de 32 et 30 ans respectivement, et la patiente 3, décédée en 2017 à l'âge de 32 ans.

Suivant nos critères d'inclusion, tous les patients de la cohorte ont eu au moins 3 prélèvements d'expectoration positifs pour *P. a.* sur la période 2010-2015, avec au moins 3 ans d'intervalle entre le premier et le dernier prélèvement (voir critères d'inclusion, **Partie I**). Pour 26/32 patients, la date de début de l'infection chronique par *P. a.* telle que définie par les critères cliniques de référence ²⁶⁴ était renseignée dans les dossiers médicaux. Cette date était comprise entre le 1^{er} janvier 1983 (infection chronique la plus ancienne) et le 18 mars 2013 (la plus récente).

1.2. CONSTRUCTION D'INDICATEURS CLINIQUES DE LA SANTE RESPIRATOIRE

Différentes méthodes permettent d'étudier la gravité de l'atteinte respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose : mesures de spirométrie, imagerie ou encore questionnaires de qualité de vie ¹³¹. Cependant, le suivi temporel du Volume Expiratoire Maximum en 1 Seconde (VEMS) et sa comparaison par rapport à une population de référence constituent aujourd'hui les prédicteurs les plus robustes de pronostic ^{130,137,138}. Suivant les recommandations de l'*ERS Global Lung Initiative*, nous avons converti en *Z-score* ajusté sur l'âge, le sexe et la taille du patient l'ensemble des mesures de VEMS réalisées chez les patients de la cohorte sur la période de suivi. Ces recommandations internationales préconisent également d'ajuster ce *Z-score* du VEMS en fonction de l'origine ethnique, mais la législation française ne permet pas de relever cette information. Considérant la plus grande prévalence

de la mucoviscidose chez les caucasiens, nous avons donc choisi dans ce calcul de considérer tous nos patients comme d'origine caucasienne ²⁶⁵.

Au total, 663 mesures de VEMS ont été effectuées entre 2010 et 2015 chez les 32 patients de la cohorte, soit 5 à 45 mesures par patient. Afin de caractériser le statut clinique des patients, nous avons construit trois indicateurs de la santé respiratoire sur la base des *Z*-scores des mesures de VEMS effectuées chez chaque patient :

- Un premier indicateur de Niveau moyen a permis de diviser la cohorte en deux groupes, en fonction de la moyenne des VEMS mesurés sur la période étudiée pour chaque patient, comparée à la moyenne de l'ensemble des mesures de la cohorte. Ainsi, les patients dont le VEMS moyen était supérieur à la médiane ont été classés en « Moyenne élevée », les autres en « Moyenne basse ».
- Deux indicateurs ont également été créés afin de caractériser la dynamique temporelle de la fonction respiratoire, à partir de la droite de régression linéaire des mesures de VEMS en fonction du temps.
 - Le premier de ces indicateurs a permis de déterminer si l'on observe un déclin progressif du VEMS dans le temps. Pour cela, nous avons classé « en déclin » les patients pour lesquels la pente de la droite était significativement inférieure à 0 (au seuil α de 0,05), « non déclin » les patients pour qui cette pente est nulle ou positive.
 - Le second indicateur a permis de déterminer si les fluctuations du VEMS entre les mesures successives sont importantes ou non. Pour cela, nous avons étudié les résidus, à savoir la distance entre les mesures réelles du VEMS et leur projection sur la droite de régression. Si la déviation standard des résidus était supérieure à 40 %, les patients ont été classés comme « instables », « stables » dans le cas contraire.

La figure 20 présente les différentes mesures de VEMS, ainsi que les résultats des classifications de la sévérité de l'atteinte respiratoire pour chaque patient (identifiants 2 à 141). Suivant ces critères, **18/32 patients ont été classés comme ayant une fonction respiratoire moyenne basse, 5 patients comme ayant subi un déclin significatif de leur**

fonction respiratoire entre 2010 et 2015, et 11 comme ayant une fonction respiratoire instable (Figure 20). On n'observe aucun lien statistique entre ces trois indicateurs et l'âge, la taille et le sexe du patient, indiquant l'efficacité de l'ajustement du calcul du *Z*-score.



Figure 20. Modélisation de la fonction respiratoire des 32 patients de la cohorte sur la période 2010-2015.

L'identifiant du patient est indiqué au sommet de l'encadré, les points représentent les *Z*-scores des mesures de VEMS effectuées sur la période 2010-2015, et les codes couleurs représentent les indicateurs de niveau et de dynamique temporelle de la fonction respiratoire.

D'autres études associent fréquemment la fonction respiratoire au type de mutation *cftr*, à l'infection par *P. a.* ou au déficit de production d'enzymes pancréatiques, nous avons donc testé ces associations lorsque cela était possible ^{130,137,138}. Tous les patients de notre cohorte étant infectés par *P. a.*, nous avons testé l'association entre les trois indicateurs de la fonction

respiratoire et la date de début de l'infection chronique à *P. a.* telle que renseignée dans les dossiers médicaux.

Au sein de la cohorte, nous n'observons aucune association entre les indicateurs de l'atteinte respiratoire et le type de mutation *cftr* (classée comme homozygote ou hétérozygote $\Delta F508$, ou autre), ou encore avec la date de début de l'infection chronique à *P. a.*. Seule une patiente (97) ne présentait pas d'insuffisance pancréatique, nous n'avons donc pas testé ce dernier paramètre. On n'observe enfin aucun lien statistique entre ces trois indicateurs, qui apportent donc chacun une information non redondante sur la santé respiratoire du patient.

2. CARACTERISATION DES PHENOTYPES BACTERIENS

2.1. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

2.1.1. Mesure des phénotypes de résistance aux antibiotiques

De par ses nombreux mécanismes de résistance innée et acquise aux antibiotiques, *P. a.* est classée parmi les pathogènes les plus critiques en termes de santé publique ^{98,175–177}. Les souches multi-résistantes ou hautement résistantes aux antibiotiques sont fréquentes dans le cas des infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose et contribuent à l'initiation et à la persistance de la colonisation ^{96,149,209}. Nous avons testé la résistance à 16 antibiotiques de pertinence clinique suivant les recommandations des comités d'experts européens ²⁷⁴.

Les proportions d'isolats de la FCB résistants pour chaque antibiotique testé sont présentés Figure 21. Ainsi, 100 % des isolats ont confirmé leur résistance naturelle à la Kanamycine (KMN) et au Triméthoprime/Sulfaméthoxazole (SXT), utilisés comme contrôles. Pour les 14 autres antibiotiques testés, le pourcentage d'isolats résistants varie entre 6 % pour la Tobramycine et 67 % pour la Lévofloxacine (42 % en moyenne). Une analyse par famille nous indique que les isolats sont plus fréquemment résistants aux fluoroquinolones (55 %) qu'aux Bêta-lactamines (43 %) et aux Aminosides (31 %) (Figure 22).



Figure 21. Pourcentage d'isolats résistants observés pour chaque antibiotique.

Le nombre de résistances cumulées aux 14 antibiotiques testés est très variable entre les isolats, allant de 0 (résultat sensible pour tous les antibiotiques) à 14 (résultat intermédiaire ou résistant pour tous les antibiotiques). Une proportion élevée d'isolats résistent à de nombreux antibiotiques, la moitié des isolats résistant à 6 antibiotiques ou plus, et 32 % résistant à 10 antibiotiques ou plus.

2.1.2. Définition des profils de résistance aux antibiotiques par Classification Ascendante Hiérarchique

Une analyse en CAH nous a permis de constituer des groupes d'antibiotiques et d'isolats de *P. a.* ayant des profils de résistance proches (Figure 21). Il est intéressant de constater que les groupes d'antibiotiques de profils similaires reconstituent naturellement les familles auxquels ils appartiennent, y compris en ce qui concerne les sous-familles de bêta-lactamines, à l'exception de l'Aztreonam (ATM), qui se trouve plus proche des carboxypénicillines que des autres carbapénèmes (Figure 20 A).

Au vu de ces observations, nous avons choisi de réaliser une analyse CAH séparée sur chaque famille d'antibiotiques, afin de constituer de nouvelles variables classifiant les isolats en fonction de leurs profils de résistance à la famille des bêta-lactamines, des aminosides et des fluoroquinolones (Figure 20 B). Ainsi, **34/66 isolats sont classés résistants aux bêta-lactamines**, **33/66 résistants aux aminosides** et **44/66 résistants aux fluoroquinolones** (dont 16 intermédiaires, à savoir résistants à la Lévofloxacine (LVX) et sensibles à la Ciprofloxacine (CIP) ; 22 sensibles). La résistance aux bêta-lactamines est significativement associée à la résistance aux fluoroquinolones (χ^2 significatif) et on observe une tendance d'association entre résistance aux bêta-lactamines et aminosides (p-valeur du χ^2 = 0,08).



Figure 22. Classification Ascendante Hiérarchique double des antibiotiques (en colonnes) et des isolats (en lignes).

A) Analyse globale (tous antibiotiques). On remarque que les antibiotiques (en colonnes) se regroupent par famille. B) Analyse et constitution des classes résistants/sensibles par famille d'antibiotiques. $R = groupe \ll résistants \gg$; $S = groupe \ll sensibles \gg$.

2.2. PHENOTYPES ASSOCIES A LA VIRULENCE

2.2.1. Courbes de croissance en milieu SCFM2

La réduction de la vitesse de croissance bactérienne a été définie comme une signature de l'évolution adaptative de P. a. lorsqu'elle passe de l'environnement aux voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose ²⁰¹. Afin de caractériser la croissance bactérienne dans un environnement chimique proche des conditions pulmonaires mucoviscidosiques, nous avons mesuré les courbes de croissance en milieu SCFM2 des isolats de la FCB. La Figure 23 présente les courbes de croissance et les temps de génération (Tg) mesurés pour les isolats précoce et tardif prélevés chez chaque patient (patients 2 à 141). Les DO₅₉₅ maximales sont comprises entre 0,8 et 6,7 (médiane = 2,5) et les Tg sont compris entre 68 et 342 min (médiane = 118 min, moyenne = 128 min). On observe de grandes différences dans les profils des courbes inter-patients, et les courbes des isolats précoce et tardif prélevés chez un même patient sont très similaires (Figure 23 A et B). Afin de simplifier les analyses multivariées à suivre, la vitesse croissance des isolats a été classée comme « rapide » ou « lente » si le Tg était inférieur ou supérieur ou égal à 120 min, respectivement (soit un total de 35 isolats de croissance rapide et 31 isolats de croissance lente) (Figure 23 C). La classe rapide ou lente de la vitesse de croissance bactérienne est significativement associée au patient chez qui a été prélevé l'isolat (Figure 23 B) (test de Fisher significatif).



Figure 23. Courbes de croissance et temps de génération en milieu SCFM2 des isolats précoce et tardif prélevés chez chaque patient.

A) Courbes de croissance des isolats précoce (en rouge) et tardif (en bleu) prélevés chez chaque patient ; B) Carte de chaleur des temps de génération calculés d'après les courbes de croissance pour les isolats précoce et tardif prélevés chez chaque patient (orange = rapide, bleu = lent). Les supercomplexes clonaux CC1, CC2 et CC3 sont représentés. C) Histogramme des temps de génération et représentation des classes de vitesse de croissance rapide ou lente.

NB : le patient 27 étant co-infecté par deux lignées clonales, les résultats des deux lignées sont présentés séparément (identifiants 27.1 et 27.2)

2.2.2. Phénotype mucoïde et production de pigments

La conversion vers un phénotype mucoïde est connue comme l'une des caractéristiques les plus frappantes de l'adaptation de *P. a.* aux conditions pulmonaires mucoviscidosiques. Permise par la production d'alginate dans le milieu, elle favorise l'apparition de biofilm et permet à la bactérie de se protéger en s'isolant des conséquences de la réponse de l'hôte à l'inflammation ainsi que des traitements antibiotiques ^{96,283}. En plus de favoriser l'établissement de la colonisation bactérienne, la production d'alginate semble être associée à une réponse anticorps accrue chez les patients, elle-même liée à un mauvais pronostic ²⁸⁴. *P. a.* est également capable de sécréter différents chromophores, notamment la pyocyanine, la pyoverdine et la pyocheline. Ces pigments, considérés comme des facteurs de virulence de la bactérie, participent notamment à la captation du fer dans le milieu extracellulaire, et confèrent ainsi un avantage concurrentiel à *P. a.* dans l'environnement pulmonaire où cette ressource est limitée. La pyocyanine, de couleur bleu-vert, est également connue pour son impact direct sur les processus inflammatoires chez l'hôte ¹⁷⁸.

Nous avons caractérisé le phénotype mucoïde et la production de pigments par les isolats de la banque par analyse visuelle des cultures. Ces observations se sont révélées extrêmement reproductibles entre les différentes expériences, avec **28/66 isolats (42 %) exprimant un phénotype mucoïde, et 35/66 (53 %) produisant des cultures pigmentées**.

2.2.3. Stress et cytotoxicité induite par l'infection sur lignées de cellules immunitaires et épithéliales

La capacité de *P. a.* à induire la mort des cellules eucaryotes dépend notamment du type cellulaire et de l'expression par la bactérie de facteurs de virulence majeurs. Ainsi, une souche munie d'un SST3 actif et exprimant la toxine ExoU ou dépourvue de SST3 mais exprimant l'exolysine ExlA provoque une lyse membranaire et une mort cellulaire rapide, tandis que la production d'ExoS peut induire une mort cellulaire plus tardive par apoptose, oncose ou nécrose ^{181,271,272,279,285–287}. En outre, la présence d'un SST3 seul (en absence d'exotoxines) induit une mort cellulaire par pyroptose des cellules immunitaires, et la libération de cytokines IL-1 β et IL18 permettant l'activation de l'inflammasome, complexe protéique impliqué dans la réponse immune ²⁸⁸.

Nous avons testé le potentiel cytotoxique des isolats de la FCB par microscopie en temps résolu sur une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 et une lignée de macrophages murins J774. Chaque expérience a été réalisée en 4 réplicats techniques (dans 4 puits différents) et en 2 réplicats biologiques (sur 2 jours différents).

2.2.3.1. Stress induit par l'infection sur cellules A549

Les toxines du SST3 de P. a. et l'exolysine ExlA induisent l'arrondissement des cellules épithéliales ^{181,198}. Nous avons caractérisé la rétraction cellulaire induite par l'infection sur A549 par analyse visuelle des images prises en contraste de phase à 1, 6 et 12 h post-infection (Figure 24). Nous avons ainsi pu mettre en évidence **34/66 isolats induisant un stress lors de** l'infection sur A549 (51 %).





Résultats représentatifs obtenus sur un isolat induisant un stress (60.1A), l'autre non (60.3B).

2.2.3.2. Cytotoxicité induite par l'infection sur cellules J774 et A549

La cytotoxicité des isolats, à savoir leur capacité à induire la mort les cellules eucaryotes lors de l'infection, a été mesurée en analysant les cinétiques de marquage des noyaux à l'Iodure de Propidium (IP). L'IP se fixant à l'ADN cellulaire suite à la perte irréversible de l'intégrité membranaire ; ce marquage constitue un indicateur robuste de mort cellulaire induite par l'infection ²⁵². Dans l'ensemble, les cellules J774 se sont révélées plus sensibles à l'infection que les A549, rarement cytotoxiques avant 10 heures post-infection. Nous avons ainsi défini la cytotoxicité des isolats selon les critères suivants, après analyse des médianes des mesures effectuées dans 8 puits, sur deux expériences indépendantes :

- Sur J774 : Cytotoxiques si la proportion de cellules mortes (noyau marqué à l'IP) après 10 h d'infection est supérieure à 50 % ;
- Sur A549 : Cytotoxiques si la proportion de cellules mortes après 20 h d'infection est supérieure à 25 %.

Globalement, ce test s'est révélé très reproductible, avec moins de 5 % des conditions ayant donné des résultats différents entre les deux réplicats biologiques. Notre objectif étant de mesurer la capacité des isolats à induire une mort cellulaire, nous avons retenu le résultat positif lorsqu'une discordance était observée. Le milieu de culture SCFM2, utilisé comme contrôle, s'est révélé non cytotoxique, tandis que les souches de référence PA103 et IHMA, qui possèdent les gènes codant les facteurs de virulence ExoU et ExlA, sont cytotoxiques sur les deux lignées cellulaires (Figure 25). La souche PAO1, initialement isolée d'une plaie, possède les gènes codant les toxines ExoS et ExoT et est cytotoxique sur J774 mais pas A549, tandis que CHA, isolée d'une infection pulmonaire mucoviscidosique et possédant les gènes codant les mêmes exotoxines, s'est révélée cytotoxique sur J774, mais également, dans une moindre mesure, sur A549 (Figure 25).

Parmi les isolats cliniques, **nous avons identifié 34/66 isolats cytotoxiques sur J774 (52 %), et 23/66 isolats cytotoxiques sur A549 (35 %)**. Il est à noter par ailleurs que 3 isolats (14.1A.c, 50.1.b et 50.3A) ont induit une cytotoxicité rapide sur cellules A549, avec plus de 25 % de mort cellulaire observée à 10 h post-infection. On observe également que les cinétiques d'entrée d'IP dans les cellules A549 suite à l'infection avec les isolats cliniques sont plus lentes que celles causées par les contrôles ExoU⁺ et ExIA⁺ (PA103 et IHMA), suggérant une toxicité sur A549 médiée par d'autres facteurs de virulence (Figure 25). De même, sur J774, on observe certains isolats présentant une cytotoxicité retardée par rapport aux contrôles et induisant une proportion de mortalité plus faible (exemples de l'isolat « tardif » des patients 50, 108, 97 et 125, des isolats « précoces » des patients 67 et 107 et des deux isolats des patients 127 et 128).



Figure 25. Cinétique de cytotoxicité induite par l'infection sur cellules J774 (A) et A549 (B) par les isolats prélevé de manière précoce (en rouge) et tardive (en bleu) chez les patients de la cohorte.

La proportion de cellules mortes est calculée comme la médiane des proportions de cellules mortes dans chaque puits (4 puits x 2 réplicats biologiques). SCFM : contrôle de non cytotoxicité du milieu de culture bactérienne ; CHA et PAO1, PA103, IHMA : contrôles positifs de cytotoxicité médiée par ExoS/ExoT ; ExoU, ExIA.

2.2.4. Criblage de la présence des exotoxines du SST3 par PCR

Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la cytotoxicité des isolats de la banque, nous avons criblé par PCR la présence des gènes codant pour les principales toxines du SST3 (Figure 26). La totalité des isolats de la banque se sont révélés positifs pour les gènes *exoS* et *exoT* et négatifs pour *exoU*. Ces prévalences très élevées de la présence des gènes *exoS* et *exoT* et très faibles d'*exoU* chez des isolats *P. a.* infectant des patients atteints de mucoviscidose avaient déjà été observés ailleurs, et concordent avec les prévalences de sécrétion des protéines mesurées dans des banques similaires ^{289,290}. En revanche, ces résultats ne permettent pas de distinguer de génotypes particuliers associés aux phénotypes de cytotoxicité sur J774 et A549.



Figure 26. Résultat représentatif de la détection des gènes codant pour les exotoxines ExoS, ExoT et ExoU du SST3 de *P. a..*

Les souches CHA et PAO1 ont été utilisées comme contrôles positifs de la présence des gènes *exoS* et *exoT*, la souche PA14 comme contrôle positif de la présence d'*exoU*, et le gène *groEL* comme contrôle positif de la présence d'ADN génomique. L'isolat 14.1A.c (prélevé précocément chez le patient 14) a été représenté pour illustrer les résultats obtenus sur l'ensemble de la banque.

2.2.5. Associations entre phénotypes de cytotoxicité et présence des gènes codant pour les exotoxines du SST3

En résumé, les profils de cytotoxicité des isolats de la FCB sont variés, malgré des génotypes similaires concernant les gènes codant pour les exotoxines du SST3. Ces résultats démontrent en premier lieu que la cytotoxicité observée de certains isolats vis-à-vis des cellules épithéliales n'est pas médiée par ExoU. Par ailleurs, et bien que tous les isolats semblent posséder les gènes codant pour ExoS et ExoT et de l'activation du SST3, les cinétiques de destruction cellulaire sont variées, notamment sur J774 (Figure 23). Ces données suggèrent une régulation variable de l'expression des toxines ExoS et ExoT parmi les isolats de la banque, ainsi que l'intervention probable d'autres facteurs de virulence. Il est à noter que l'ensemble de ces phénotypes de cytotoxicité sur J774 et A549 et stress induit par l'infection sur A549 sont statistiquement liés entre eux, suggérant l'existence de mécanismes de cytotoxicité efficaces sur ces deux types cellulaires (tests du χ^2 significatifs).

2.2.6. Définition du niveau de virulence des isolats par analyse multivariée HCPC

Afin d'étudier les profils de virulence des isolats, nous avons analysé l'ensemble des phénotypes associés à la virulence mesurés dans une logique multivariée, suivant la méthode de **Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (HCPC).** La démarche consiste à combiner une étape d'analyse en composantes principales et une étape de classification hiérarchique ²⁴⁴. Elle permet de constituer des groupes d'observations (individus) similaires selon les variables observées.

Les profils de virulence des souches ont été définis par analyse HCPC sur l'ensemble des 6 phénotypes associés à la virulence (mucoïdie, production de pigments, vitesse de croissance, cytotoxicité sur J774 et A549 et stress induit par l'infection sur A549).

Dans un premier temps, nous avons réalisé une ACM sur les 6 variables associées à la virulence. Cette analyse nous a permis d'analyser ces données dans un espace à 5 dimensions (5 CP) expliquant 96 % de la variabilité des données. Les CP ont été calculées par combinaison linéaire des variables initiales, après avoir assigné un coefficient à chacune des catégories afin d'expliquer au mieux la variabilité des données. Ainsi, l'ACM a constitué une étape de pré-traitement permettant de transformer les 6 variables qualitatives initiales en 5 CP

quantitatives. Nous pouvons ainsi projeter les isolats dans les dimensions constituées par les CP de l'ACM pour visualiser graphiquement les distances inter-isolat (Figure 27 A). Dans un second temps, nous avons réalisé une CAH en calculant les distances euclidiennes séparant les isolats sur les 5 CP de l'ACM et en appliquant une agglomération Ward (Figure 27 B). Suite à cette première classification, nous avons fixé à 3 le nombre de groupes d'isolats similaires à définir, et avons appliqué une partition par les *k-means* afin d'optimiser la classification initiale. La figure 27 A présente la classification finale des isolats en trois groupes selon leurs phénotypes de virulence, après consolidation de la classification par les *k-means*. Cette classification finale peut donc légèrement différer de la classification initiale réalisée sans partitionnement.

Cette analyse nous a permis de constituer trois groupes d'isolats ayant des profils de virulence similaires. Le tableau Figure 27 D présente les catégories de variables significativement associées à l'appartenance à chacun des groupes, que nous avons assimilés à des niveaux de virulence (Figure 27) :

- Les isolats non virulents (niveau 1), sont globalement non cytotoxiques sur J774 et A549, non stressants sur A549 et ont une vitesse de croissance lente. Ils représentent 45 % du total de la banque (n = 30/66) ;
- Les isolats de virulence modérée (niveau 2), causent du stress lors de l'infection sur A549, sont cytotoxiques sur J774 mais pas sur A549, et ont une vitesse de croissance rapide. Ils représentent 26 % du total de la banque (n = 17/66) ;
- Les isolats de virulence élevée (niveau 3), sont cytotoxiques sur les deux types cellulaires et stressent les cellules A549. Ils représentent 29 % du total de la banque (n = 19/66).

La méthode statistique présentée ici permet également de représenter visuellement les différentes catégories des phénotypes associés à la virulence (Figure 27 C). On remarque ainsi que certaines catégories de phénotypes de virulence se positionnent à proximité les uns des autres dans l'espace constitué par les CP 1 et 2 de l'ACM, traduisant ainsi des comportements similaires de ces variables parmi les isolats de la FCB. Par exemple, les phénotypes de cytotoxicité sur J774 et A549 et de stress induit par l'infection sur A549 (significativement liés entre eux) se projettent de manière très proche dans l'espace.





Les groupes ont été constitués sur la base des 5 premières CP de l'ACM (96 % de variabilité expliquée). On observe la constitution de 3 groupes d'isolats de niveaux de virulence bas (groupe 1), modéré (groupe 2), élevé (groupe 3). A) Représentation des isolats et des groupes dans l'espace des CP1 et 2 de l'ACM ; B) Résultat de la CAH sur les 5 premières CP de l'ACM ; C) Représentation des catégories de variables utilisées pour la construction du modèle dans l'espace des CP1 et 2 de l'ACM ; D) Tableau récapitulatif des catégories de variables significativement associées à chaque groupe (tests du χ² significatif).

NB : La classification représentée en B est le résultat intermédiaire de l'étape de CAH de l'analyse HCPC et peut être légèrement différente de la classification finale présentée en A, qui comporte une étape supplémentaire d'optimisation de la classification par les k-means.

3. ANALYSE MULTIVARIEE DES PHENOTYPES DE VIRULENCE ET ANTIBIORESISTANCE

3.1. DEFINITION DU POTENTIEL PATHOGENE DES ISOLATS PAR ANALYSE HCPC SUR LES PHENOTYPES ASSOCIES A LA VIRULENCE ET A LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Afin de caractériser le potentiel pathogène des souches, nous avons réalisé une analyse HCPC conjointe sur l'ensemble des phénotypes associés à la virulence et à la résistance. La Figure 28 présente les résultats de cette analyse réalisée sur 9 phénotypes bactériens regroupés en classes (mucoïdie, production de pigments, vitesse de croissance, cytotoxicité sur J774 et A549, stress induit par l'infection sur A549, résistance aux bêta-lactamines, aminosides et fluoroquinolones). Cette analyse nous a permis d'analyser ces données dans un espace à 8 dimensions (8 CP) expliquant 97 % de la variabilité des données, et de visualiser de manière conjointe la répartition des isolats (Figure 28 A) et des catégories des variables associées à la virulence (Figure 28 C) dans ce nouveau sous-espace.

Nous avons ainsi pu constituer 4 groupes d'isolats phénotypiquement similaires (Figure 28 A, B et D) :

- Groupe 1 : isolats résistants aux antibiotiques et non virulents (en bleu, n = 16/66).
 Ce groupe est proche du phénotype classiquement décrit des isolats de *P. a.* adaptés aux voies pulmonaires mucoviscidosiques ;
- Groupe 2 : isolats sensibles aux antibiotiques et non virulents (en jaune, n = 17/66) ;
- Groupe 3 : isolats résistants aux bêta-lactamines et fluoroquinolones et virulents (en gris, n = 13/66) ;
- Groupe 4 : isolats sensibles aux bêta-lactamines et virulents (en rouge, n = 20/66).
 Ce groupe est proche du phénotype sauvage de *P. a.*.

On observe ainsi une grande variabilité des profils phénotypiques, chaque groupe d'isolat représentant environ un quart de la banque (20 à 30 %). Ainsi, et bien que tous les isolats de la FCB soient issus d'infections pulmonaires chroniques, on trouve autant d'isolats ayant un profil phénotypique caractéristique de cette colonisation au long cours (Groupe 1, 24 % du total) que d'isolats proches du phénotype sauvage (Groupe 4, 30 %). Les isolats restants peuvent être considérés comme « intermédiaires » entre les phénotypes sauvage et

chronique, avec un groupe d'isolats à la fois résistants aux antibiotiques et virulents (donc potentiellement très pathogènes) et un groupe d'isolats sensibles et non virulents (potentiel pathogène faible).

3.3.2. Associations entre les phénotypes de virulence et d'antibiorésistance

En observant la représentation des catégories de variables dans l'espace formé par les deux premières CP (44 % de variabilité expliquée), on constate que la variabilité de nos données s'organise globalement selon un gradient de virulence (de gauche à droite) et de résistance (de haut en bas). Les variables portant le plus ces axes sont les mesures de cytotoxicité et de stress induit par l'infection pour la CP1, et la résistance à chacune des trois familles d'antibiotiques pour la CP2 (Figure 28 C).

Nous avons testé les relations entre les différents phénotypes d'antibiorésistance et de virulence au sein de notre banque. Aucune association n'a été mise en évidence entre les profils de résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides et les différents phénotypes associés à la virulence. En revanche, **la résistance aux bêta-lactamines est significativement associée à une absence de cytotoxicité sur cellules épithéliales A549 et de production de pigments**. Ainsi, les isolats de virulence élevée ont tendance à être sensibles à cette famille d'antibiotiques (*p-valeur* du test du χ^2 entre niveau de virulence et résistance aux Bêta-lactamines = 0,06, à la limite de la significativité).

Virulence : Dans cette étude, la virulence des isolats a été définie par analyse CHCP sur 6 phénotypes associés à la virulence : vitesse de croissance, production de pigments, mucoïdie, cytotoxicité sur J774 et A549 et stress induit par l'infection sur A549.

Potentiel pathogène : Dans cette étude, le potentiel pathogène des isolats a été défini par analyse CHCP sur 9 phénotypes associés à la virulence ou à la résistance aux antibiotiques.



Figure 28. Modélisation du potentiel pathogène des isolats : Résultat de l'analyse HCPC réalisée sur les mesures des phénotypes associés à la virulence et à la résistance aux bêta-lactamines, aminosides et fluoroquinolones (FQ).

Les groupes ont été constitués sur la base des 8 premières CP de l'ACM (97 % de variabilité expliquée). A) Représentation des isolats et des groupes dans l'espace constitué par les CP1 et 2 de l'ACM ; B) Résultat de la CAH sur les 8 premières CP de l'ACM ; C) Représentation des catégories de variables utilisées pour la construction du modèle dans l'espace des CP 1 et 2 de l'ACM et des gradients de virulence et antibiorésistance (en noir) ; D) Tableau récapitulatif des catégories de variables significativement associées à chaque groupe (tests du χ^2 significatif). *NB : La classification représentée en B est le résultat intermédiaire de l'étape de CAH de l'analyse HCPC et peut être légèrement différente de la classification finale présentée en A, qui comporte une étape supplémentaire d'optimisation de la classification par les k-means.*

4. ASSOCIATIONS ENTRE GENOTYPES BACTERIENS, PHENOTYPES ET CLINIQUE

Plusieurs études mettent en évidence une association entre le génotype (type clonal défini par une méthode de génotypage) et les phénotypes bactériens exprimés parmi des souches de *P. a.* issues de patients atteints de mucoviscidose ^{217,260}.

Dans notre banque, nous avons sélectionné les isolats de chaque patient sur le critère d'appartenance à un même complexe clonal. Pour s'affranchir de ce biais de sélection, nous avons testé l'association entre phénotypes et génotype au sein des Super-Complexes clonaux partagés par plusieurs patients (CC1 : patients 2, 3, 50, 107 et 137 ; CC2 : patients 127 et 128 ; CC3 : 18, 26, 58 et 97). Nous avons pu constater qu'au sein de ces super-complexes, les phénotypes bactériens sont plus fortement associés au patient chez qui l'isolat a été prélevé qu'au complexe clonal d'appartenance.

Par ailleurs, nous avons dans notre cohorte un patient (patient 27) co-infecté par 2 lignées clonales (27.1 et 27.2). Bien que cet échantillon soit trop réduit pour conclure, il est intéressant de constater que chez ce patient, on observe une proximité phénotypique supérieure intra-clone qu'inter-clone. Ces observations concordent avec les observations de La Rosa et collègues, qui décrivent une proximité phénotypique supérieure intra-clones qu'inter-clones co-infecté par plusieurs lignées en parallèle ²¹⁷.

Enfin, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence d'association entre génotype des clones et données cliniques. Ces résultats soulignent le manque d'association entre le type clonal de *P. a.* responsable de l'infection chronique et des retombées cliniques de l'infection, déjà documentée auparavant ^{96,260}.

5. ASSOCIATIONS ENTRE PHENOTYPES BACTERIENS ET SEVERITE DE L'ATTEINTE RESPIRATOIRE DU PATIENT INFECTE

Dans les chapitres précédents, nous avons caractérisé les patients de la cohorte au plan clinique, par la construction d'indicateurs de niveau, déclin et dynamique de la fonction pulmonaire sur la période étudiée. Nous avons également caractérisé les isolats bactériens prélevés chez ces patients au plan phénotypique, afin de définir leurs profils de résistance aux antibiotiques des familles des bêta-lactamines, fluoroquinolones et aminosides ; leur niveau de virulence ainsi que leur potentiel pathogène.

Dans ce chapitre, nous chercherons à mettre en évidence d'éventuelles associations entre les profils phénotypiques des isolats de la FCB et la santé respiratoire des patients infectés.

5.1. Associations entre resistance aux antibiotiques et atteinte respiratoire

Aucune association significative n'a été observée entre les phénotypes « résistant » ou « sensible » aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, fluoroquinolones et aminosides et les phénotypes cliniques indiquant le niveau, le déclin et la dynamique de la fonction respiratoire (tests du χ^2 non significatifs).

5.2. Associations entre virulence bacterienne et severite de l'atteinte respiratoire

La Figure 29 présente les catégories des variables cliniques caractérisant la santé respiratoire des patients (niveau, déclin et stabilité) dans le plan formé par les CP 1 et 2 de l'ACM des phénotypes de virulence. On observe ainsi que les catégories cliniques VEMS moyen haut et fonction respiratoire instable (à savoir, hautement fluctuante) se placent dans le quadrant supérieur droit, à proximité des phénotypes associés à un haut niveau de virulence. A l'inverse, les catégories VEMS moyen bas et déclin du VEMS se placent dans le quadrant inférieur gauche, à proximité de phénotypes associés à une virulence faible.

On observe d'ailleurs des relations significatives entre le niveau de virulence des isolats et les phénotypes cliniques de niveau et de dynamique de la fonction respiratoire (tests du χ^2 significatifs). Ainsi, les isolats non virulents (Groupe 1) ou de virulence modérée (Groupe 2) proviennent essentiellement des expectorations de patients dont le VEMS est bas (67 % des isolats du groupe 1, 76 % du groupe 2) et stable (67 % des isolats du groupe 1, 94 % du groupe

2). A l'inverse, les isolats de haut niveau de virulence (Groupe 3) proviennent essentiellement de patients dont le VEMS est haut (à 74 %) et instable (58 %).



Figure 29. Représentation des indicateurs cliniques de la santé respiratoire (en vert) dans l'espace formé par les CP1 et 2 de l'ACM réalisée sur les phénotypes associés à la virulence (en rouge).

Considérant une fonction respiratoire basse et stable comme caractéristique d'une pathologie pulmonaire avancée, et une fonction respiratoire haute et instable plutôt typique d'une pathologie respiratoire débutante, nous pouvons avancer l'hypothèse d'une diminution du niveau de virulence de *P. a.* concomitante avec l'avancée de l'atteinte respiratoire du patient infecté. Cette hypothèse sera analysée en détail dans le chapitre suivant (section 6.1, p.139).

5.3. Associations entre potentiel pathogene des isolats et atteinte respiratoire

En analysant simultanément les phénotypes bactériens associés à la virulence et à la résistance aux antibiotiques, nous avons pu mettre en évidence 4 groupes caractérisant le potentiel pathogène des isolats (section 3.1, p. 132). Nous avons notamment pu mettre en évidence l'existence de deux groupes d'isolats ayant des profils phénotypiques opposés : le groupe 1, qui présente les caractéristiques typiques des isolats issus d'infections pulmonaires chroniques (non virulents et résistants aux antibiotiques), et le groupe 4, phénotypiquement proche des souches sauvages ou d'infections aiguës (virulents et sensibles aux antibiotiques).

Il est intéressant de constater que le profil pathogène des isolats est significativement associé au niveau du VEMS du patient chez qui l'isolat a été prélevé (test du χ^2 significatif). On observe en particulier que les isolats du groupe 4 (proches du phénotype sauvage) ont été en majorité (à 70 %) prélevés chez des patients dont la fonction respiratoire a été classée comme haute. Ces observations viennent renforcer les résultats précédents sur l'association entre diminution de la virulence et avancement de la pathologie respiratoire, et suggèrent que le stade d'évolution adaptative de la bactérie est corrélé à l'avancée de la pathologie respiratoire.

6. ÉVOLUTION ADAPTATIVE DES PHENOTYPES DE *P. A.* AU COURS DES INFECTIONS PULMONAIRES CHRONIQUES

Nous avons étudié l'évolution adaptative des phénotypes de *P. a.* au cours de l'infection pulmonaire chronique sous deux angles distincts.

Premièrement, nous avons recherché des associations entre les phénotypes bactériens caractérisés dans les chapitres précédents et la durée de l'infection chronique, telle que définie dans les dossiers cliniques des patients. Cette première vision prend l'ensemble des isolats cliniques de la FCB comme un tout, et ne tient pas compte de la variable "patient". Les résultats de cette analyse décrivent l'adaptation globale de *P. a.* aux conditions pulmonaires mucoviscidosiques.

Deuxièmement, nous avons recherché les **modifications de phénotypes survenues entre les isolats précoce et tardif de chaque lignée clonale évolutive**. Cette seconde vision tient compte de la structure appariée de nos données, et révèle les **adaptations intra-hôte, patientspécifiques des phénotypes bactériens** mesurés chez les patients de la cohorte.

6.1. ADAPTATION PHENOTYPIQUE GLOBALE A L'ENVIRONNEMENT PULMONAIRE MUCOVISCIDOSIQUE

6.1.1. Durée de l'infection chronique à P. aeruginosa

Le stade d'évolution adaptative à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique des clones de *P. a.* dépend du nombre de générations bactériennes écoulées depuis le début de l'infection chronique, et donc de **la durée de l'infection**.

La date du début de l'infection chronique à *P. a.* telle que définie par les critères cliniques de référence était renseignée pour 26/32 patients (6 valeurs manquantes). Elle est comprise entre le 1^{er} janvier 1983 et le 18 mars 2013 (infection chronique la plus ancienne et la plus récente, respectivement). Pour chaque isolat prélevé chez ces patients, nous avons calculé la durée de l'infection chronique comme la différence entre la date de prélèvement de l'isolat et la date de début de l'infection chronique. Ces valeurs, renseignées pour 52/66 isolats, sont comprises entre -0,8 et 31 ans (moyenne = 14 ans, médiane = 13 ans). Le patient 27 (pour qui 4 isolats cliniques ont été sélectionnés) fait partie de ceux pour lesquels la date de début d'infection chronique.

Il est à noter que pour le patient 26, cette valeur est négative : ce patient ne remplissait pas encore les critères cliniques d'infection chronique à *P. a.* le 21 mai 2012, bien que le génotypage du clone prélevé à cette date nous ait révélé qu'il s'agissait bien d'une colonisation clonale durable (voir Partie I, Figure 18 p. 100). Il est possible que pour ce patient, nous ayons capturé un événement rare de colonisation chronique débutante.

L'infection chronique a été considérée comme **ancienne**, **récente ou inconnue** si la date d'initiation était antérieure de 10 ans ou plus, moins de 10 ans ou non renseignée.

6.1.2. Évolution adaptative de la résistance aux antibiotiques avec la durée de l'infection

Afin d'étudier les profils de résistance associés à l'adaptation de *P. a.* à l'environnement pulmonaire caractéristique de la mucoviscidose, nous avons testé les associations entre les profils de résistance des isolats à chaque famille d'antibiotique et la durée de l'infection chronique calculée précédemment, pour les 52/66 isolats pour lesquels cette information était renseignée.

On observe notamment que les isolats provenant des infections les plus anciennes sont significativement plus résistants aux Bêta-lactamines (infection initiée en moyenne 16 ans avant le prélèvement des isolats pour les résistants, 12 ans pour les sensibles, test *t* de Student significatif). Les isolats résistants aux aminosides ont également tendance à provenir d'infections plus anciennes (moyenne = 15 ans pour les résistants, 12 pour les sensibles, *p*-

valeur du test *t* de Student = 0,11). Aucune association n'a été observée entre durée de l'infection et résistance aux fluoroquinolones.

La résistance des isolats aux antibiotiques de la famille des Bêta-lactamines et, dans une moindre mesure, aux aminosides, a tendance à augmenter avec la durée de l'infection chronique chez le patient. Cette observation n'est pas retrouvée pour les antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, pour lesquels la résistance semble indépendante du temps écoulé depuis l'initiation de la colonisation à *P. a.*.

6.1.3. Évolution adaptative de la virulence bactérienne

L'évolution adaptative de *P. a.* à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique a été analysée en testant l'association entre l'appartenance aux différents groupes de virulence avec la durée de l'infection chronique.

En testant un à un l'ensemble des phénotypes de virulence, on observe une diminution significative de la cytotoxicité sur cellules A549 et J774 et de la vitesse de croissance bactérienne au cours des années d'infection chronique. De même, on observe que le niveau de virulence global des souches est significativement associé à la durée de l'infection chronique (tests du χ^2 significatifs). La grande majorité des isolats non virulents ou de virulence modérée proviennent d'infections de plus de 10 ans (88 et 75 % pour les groupes de virulence 1 et 2, respectivement), tandis que la majorité des isolats de virulence élevée (groupe 3) proviennent d'infections plus récentes (53 %).

On observe ainsi une **diminution de la virulence des isolats cliniques de** *P. a.* **avec la durée de l'infection pulmonaire chronique**. En outre, une virulence bactérienne amoindrie avait déjà été associée à une pathologie respiratoire avancée pour le patient (caractérisée par une fonction pulmonaire basse et stable). Ces résultats suggèrent que l'évolution adaptative de *P. a.* est **concomitante avec l'avancement de la pathologie respiratoire du patient infecté**.

Le niveau de virulence des isolats diminue avec la durée de la colonisation chronique des voies respiratoires.

Cette diminution de l'expression de phénotypes de virulence concorde avec l'établissement d'une pathologie respiratoire avancée, caractérisée par un VEMS bas et stable.

6.1.4. Évolution adaptative de la pathogénicité des clones

L'analyse multivariée des phénotypes associés à la virulence et à la résistance aux antibiotiques nous a permis de constituer 4 groupes d'isolats présentant des profils de pathogénicité similaires. Nous avons pu constater que les caractéristiques du groupe 1 sont proches des phénotypes classiquement décrits des isolats d'infection pulmonaire chronique hautement adaptés à leur environnement (non virulents et hautement résistants aux antibiotiques). A l'inverse, le groupe 4 est plus proche du phénotype sauvage ou des isolats d'infections aiguës ou chronique débutante (hautement virulents et sensibles aux antibiotiques). Les groupes 2 et 3 quant à eux, semblent correspondre à deux intermédiaires adaptatifs possibles, l'un ayant augmenté sa résistance aux antibiotiques, l'autre ayant abaissé son niveau de virulence.

Ces hypothèses sont confortées par les associations significatives entre appartenance aux différents profils de pathogénicité et durée de l'infection chronique. Ainsi, 81 % des isolats du groupe 1 (phénotypes "adaptés") sont issus d'infections chroniques de plus de 10 ans, contre 65 % du groupe 2, 38 % du groupe 3 et 40 % du groupe 4 (test du χ^2 significatif). En outre, une majorité des isolats issus d'infections récentes (moins de 10 ans) se situe dans le groupe 4 (phénotype sauvage).

Ces résultats confortent des résultats antérieurs démontrant qu'au cours de l'infection chronique, *P. a.* s'adapte à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique en augmentant sa résistance aux antibiotiques et en diminuant sa virulence ^{96,149,205}. On observe cependant une proportion non négligeable d'isolats ayant conservé un phénotype proche du phénotype sauvage (virulents et sensibles aux antibiotiques), y compris 10 ans après le début de l'infection chronique.

Nos résultats confortent des observations antérieures démontrant une **évolution des** clones de *P. a.* au cours de l'infection chronique, d'un phénotype virulent et sensible aux antibiotiques, proche du phénotype sauvage des souches environnementales, vers un phénotype avirulent et résistant aux antibiotiques, adapté à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique.

On observe également des isolats ayant des profils adaptatifs intermédiaires, possiblement représentatifs de deux voies évolutives distinctes vers le phénotype adapté.

Le niveau d'avancement du clone dans ces processus adaptatifs est corrélé avec le stade d'avancement de la pathologie respiratoire.

6.2. MODIFICATIONS INTRA-HOTE DES PHENOTYPES BACTERIENS AU COURS DE L'INFECTION CHRONIQUE

6.2.1. Calcul d'un indicateur de l'adaptation intra-hôte : le degré de polarité

Afin d'analyser les **adaptations évolutives intra-hôte, patient-spécifiques** des lignées clonales de *P. a.,* nous avons étudié les modifications phénotypiques survenues entre les isolats précoce et tardif de chaque lignée évolutive. Cette analyse a été réalisée pour chacun des phénotypes mesurés en calculant le *degré de Polarité*_{*i*,*j*}, pour chaque couple *lignée clonale évolutive i, phénotype j* selon le calcul suivant :

$$Polarité_{i,j} = \frac{Tardif_{i,j} - Précoce_{i,j}}{Tardif_{i,j} + Précoce_{i,j}};$$

après recodage 0/0,5/1 du statut présent/intermédiaire/absent du **phénotype j** chez les isolats **Précoce** et **Tardif** du **clone i**.

Ainsi :

- Si **Polarit**é _{i, i} = **0**, le phénotype j **n'est pas modifié** chez le clone i
- Si **Polarit**é *i*, *i* > **0**, le phénotype *j* **est augmenté** chez le *clone i*
- Si *Polarit*é _{i. i} < 0, *le phénotype j* est diminué chez le *clone i.*
6.2.2. Modifications intra-hôte des profils de résistance aux antibiotiques

Afin d'étudier l'évolution intra-hôte des profils de résistance aux antibiotiques, nous avons calculé les degrés de polarité de chaque isolat pour chaque antibiotique, après recodage 0/0,5/1 des phénotypes sensible/intermédiaire/résistant. Dans l'ensemble, les aminosides sont les antibiotiques pour lesquels on observe le moins de gains de résistance (6 à 12 % des clones), et ce sont également deux aminosides (AKN et GMN) pour lesquels on observe le plus de gains de sensibilité (22 et 24 %). A l'inverse, une proportion non négligeable de clones ont développé une résistance à au moins une des deux fluoroquinolones testées (36 %), dont la moitié aux deux (CIP et LVX). Les profils de gain ou perte de résistance aux bêta-lactamines sont variés, avec moins de modifications observées pour l'Aztreonam (ATM, 12 % de gains et 7 % de pertes), et plus pour la Ceftazidime (CZD, 30 % de gains et 21 % de pertes).

Afin de mieux caractériser l'évolution adaptative intra-hôte des profils de résistance à chaque famille d'antibiotique, nous avons réalisé une CAH sur les degrés de polarité de chaque couple *antibiotique j, clone i,* ainsi que leur somme par famille (et sous-famille chimique dans le cas des Bêta-lactamines) (Figure 30). Cette analyse nous a permis de constituer des groupes de lignées clonales ayant eu des trajectoires évolutives distinctes concernant leur résistance à chaque famille d'antibiotiques. Ainsi, on observe une augmentation de la résistance chez 6 clones pour les aminosides (7 diminutions), 12 clones pour les fluoroquinolones (5 diminutions) et 9 pour les bêta-lactamines (2 diminutions).

On remarque que le gain de résistance aux aminosides est significativement associé à un gain de résistance aux bêta-lactamines (test de Fisher significatif). Le même type d'association est observé pour les modifications des profils de résistance aux bêta-lactamines et fluoroquinolones, et aminosides et fluoroquinolones, mais ces liens restent non significatifs, probablement en raison des faibles effectifs dans chaque classe (*p-valeur* des tests de Fisher = 0,15 et 0,12 pour les deux associations testées, respectivement).

143



Figure 30. Evolution intra-hôte des phénotypes de résistance aux antibiotiques chez 33 lignées clonales évolutives de *P. a.* responsables d'infections pulmonaires chroniques de patients atteints de mucoviscidose.

A) Calcul du degré de polarité, indicateur des modifications survenues entre les isolats précoce et tardif d'une lignée clonale évolutive *i*, pour un phénotype *j*; B) C) et D) Résultats des classifications ascendantes hiérarchique sur les degrés de polarité et définition des groupes de clones chez qui la résistance aux aminosides, fluoroquinolones et bêta-lactamines (respectivement) a été augmentée, diminuée ou inchangée au cours de l'infection chronique.

6.2.3. Modifications intra-hôte des phénotypes de virulence

La Figure 31 présente les résultats de l'analyse HCPC sur les modifications intra-hôte (degrés de polarité) des phénotypes associés à la virulence. La classification a été réalisée sur les 3 premières CP de l'ACM (51 % de variabilité expliquée). Cette analyse nous a permis de constituer trois groupes de lignées évolutives de *P. a.* au sein desquels les modifications intra-hôte des phénotypes associés à la virulence sont similaires (Figure 31 A et C). Ces groupes se distinguent notamment par des modifications de cytotoxicité sur cellules A549 et J774 et de stress induit par l'infection sur A549 (Figure 31 B et D).

On constate que la grande majorité des isolats ont maintenu leur niveau de virulence (groupe 2, n = 24, soit 72 % des lignées évolutives), et qu'une proportion non négligeable ont vu ce niveau de virulence diminué (groupe 3, n = 7, soit 21 %). Seules deux lignées clonales se distinguent par un gain de virulence important : les lignées responsables de l'infection chez les patients 18 et 137. Ainsi, sur la fenêtre d'observation étudiée (3,5 ans en moyenne entre les prélèvements), les clones de *P. a.* infectant les patients de la cohorte ont pour la grande majorité d'entre eux, maintenu ou diminué l'expression de phénotypes associés à la virulence.



Figure 31. Evolution intra-hôte des phénotypes de virulence chez 33 lignées clonales évolutives de *P. a.* responsables d'infections pulmonaires chroniques de patients atteints de mucoviscidose.

Les groupes ont été constitués sur la base des 3 premières CP de l'ACM (51 % de variabilité expliquée). A) Représentation des isolats et des groupes dans l'espace constitué par les CP1 et 2 de l'ACM ; B) Représentation des catégories de variables associées à la virulence dans le plan formé par les CP 1 et 2 de l'ACM ; C) Résultat de la CAH sur les 3 premières CP de l'ACM ; D) Tableau récapitulatif des catégories de variables significativement associées à chaque groupe (tests du χ^2 significatif).

6.2.4. Associations entre modifications intra-hôte de la virulence et de la résistance aux antibiotiques

Durant son adaptation aux voies pulmonaires mucoviscidosiques, *P. a.* est connue pour diminuer l'expression de facteurs de virulence et augmenter sa résistance aux antibiotiques ⁹⁶. Nous avons donc testé les associations entre les modifications intra-hôte du niveau de virulence des isolats, avec les modifications de résistance aux 3 familles d'antibiotiques. On observe ainsi que le gain de résistance aux bêta-lactamines est significativement associé à une diminution de la virulence (test de Fisher significatif). De plus, aucune des 2 lignées chez lesquelles nous avons observé une augmentation du niveau de virulence n'a augmenté sa résistance aux antibiotiques. A l'inverse, chez le patient 137, l'augmentation de la virulence s'est accompagnée d'une perte de la résistance aux fluoroquinolones et bêta-lactamines. Les associations entre modifications du niveau de virulence et de la résistance aux fluoroquinolones et aminosides restent cependant non significatives, certainement en raison du faible effectif dans chaque classe.

6.2.5. Associations entre modifications intra-hôte des phénotypes bactériens et atteinte respiratoire

Il est à noter que la totalité des clones infectant les patients subissant un déclin substantiel de leur fonction respiratoire (n = 5) ont modifié leur niveau de résistance aux aminosides (2 augmentations, 3 diminutions de la résistance), tandis que les clones issus de patients du groupe « non déclin » n'ont généralement pas modifié leur résistance à cette famille d'antibiotiques (test exact de Fisher significatif). On observe également une tendance à l'association entre stabilité de la résistance aux bêta-lactamines et fonction respiratoire peu fluctuante (patients « stables », *p-valeur* du χ^2 = 0,08). Ces résultats sont probablement le fruit de modifications de la prise en charge thérapeutique chez les patients dont la fonction respiratoire est instable ou déclinante.

La trajectoire d'évolution intra-hôte des phénotypes bactériens de virulence n'est significativement associée à aucun statut particulier de la pathologie respiratoire. On observe cependant que les deux patients chez qui on observe une augmentation de la virulence étaient infectés chroniquement depuis plus de 12 ans à la date d'inclusion, et que tous deux ont une fonction respiratoire plutôt haute et sans déclin temporel, ce qui pourrait traduire une augmentation de la virulence survenue tardivement au cours de l'histoire de l'infection chronique à *P. a.*. L'analyse d'isolats prélevés plus tardivement chez ces patients est requise afin de pouvoir conclure sur le caractère permanent ou transitoire de ces modifications.

DISCUSSION

INDICATEURS CLINIQUES DE LA SANTE RESPIRATOIRE

Nous avons construit **trois indicateurs de la santé respiratoire des patients** de la cohorte, sur la base des mesures de VEMS réalisées sur la période de suivi 2010-2015, et exprimées en *Z*-score ajusté sur l'âge, le sexe et la taille (selon les recommandations de l'*ERS global lung initiative* ²⁶⁵). Simplement basés sur le calcul de la moyenne et de la régression linéaire de l'ensemble des mesures réalisées sur la période de suivi, ces indicateurs permettent de classer les patients en fonction du **niveau moyen**, de la **stabilité temporelle** et du **déclin** progressif des fonctions respiratoires. Ainsi, nous avons classé la moitié des patients ayant un VEMS moyen inférieur à la médiane comme ayant une fonction respiratoire de niveau bas, 5 patients (16 %) comme ayant subi un déclin progressif du VEMS entre 2010 et 2015, et 11 patients (34 %) comme ayant une fonction respiratoire particulièrement instable.

Le déclin des fonctions respiratoires est habituellement décrit comme non linéaire dans le temps, et fortement influencé par d'autres paramètres cliniques comme l'âge, le sexe, la taille ou l'insuffisance pancréatique ¹³⁷. Tenant compte de la faible variabilité des patients de notre banque (tous adultes, infectés chroniquement à *P. a.* et tous sauf un souffrant d'insuffisance pancréatique), de l'ajustement du *Z-score* sur l'âge, la taille et le sexe et de la durée relativement courte de la période étudiée ramenée à la durée de vie du patient (5 ans), nous avons considéré l'utilisation d'une régression linéaire suffisamment informative pour définir le statut clinique des patients. En outre, la prise en compte de l'ensemble des mesures de VEMS plutôt qu'uniquement le « meilleur annuel », fréquemment utilisé, permet de mieux mettre en évidence un déclin progressif de cette fonction respiratoire ²⁹¹.

Par ailleurs, le fait d'intégrer l'ensemble de ces mesures nous a permis de constituer un indicateur original de la dynamique temporelle de la fonction respiratoire, basé sur l'amplitude des fluctuations des mesures. Ce nouvel indicateur pourrait permettre d'identifier des patients « exacerbateurs fréquents », qui correspondent à une problématique clinique spécifique, distincte de celles associées à une fonction respiratoire basse ou en déclin progressif.

Non corrélés, les trois indicateurs *niveau*, *stabilité* et *déclin* apportent chacun une information différente sur la nature de l'atteinte pulmonaire du patient, et sont indépendants du type de mutation *cftr* et de la date d'initiation de l'infection chronique à *P. a.*. Ces paramètres respiratoires n'étant pas expliqués par d'autres informations cliniques présentes dans les historiques médicaux, il est pertinent de chercher par ailleurs les causes sous-tendant ces manifestations cliniques diverses. L'ensemble de ces patients étant infecté de manière chronique par *P. a.*, nous avons étudié les caractéristiques des clones représentatifs de ces infections chroniques ainsi que leur évolution au cours de l'infection, afin de mettre en évidence des phénotypes bactériens associés au statut clinique des patients.

RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

La problématique de la résistance antibiotique est particulièrement étudiée chez *P. a.*, classée par l'OMS comme pathogène critique du fait de sa multi-résistance aux antibiotiques ¹⁷⁷. Dans notre banque, nous avons pu observer une **prévalence élevée de résistance aux aminosides** (50 %), fluoroquinolones (67 %) et bêta-lactamines (48 %).

Les prévalences de résistance observées ici concordent avec les mesures précédemment observées sur une banque similaire de *P. a.* issus d'infections chroniques mucoviscidosiques, réalisée dans le même hôpital mais sur des critères d'inclusion différents ²⁹². Elles sont cependant largement supérieures à celles observées dans les études réalisées en milieu hospitalier général ou en unités de soins intensifs ²⁹³. Ces différences proviennent vraisemblablement du fait que durant l'infection pulmonaire chez un patient atteint de mucoviscidose, les bactéries sont soumises en permanence et durant plusieurs années à de fortes concentrations d'antibiotiques, entrainant une sélection forte des phénotypes résistants ^{96,149,209}.

Nous observons en outre des corrélations entre les phénotypes de résistance à différentes familles d'antibiotiques. Ces résultats suggèrent l'acquisition de différents mécanismes de résistance accumulés au cours de l'infection, suite à l'administration de différents traitements antibiotiques au patient au cours de sa prise en charge clinique. Il est également possible que certains isolats aient acquis des mécanismes de résistance croisée ou de co-résistance à

150

plusieurs antibiotiques, à l'image par exemple des modifications de la porine membranaire OprD, qui rendent la membrane bactérienne imperméable aux carbapénèmes ^{199,200,292,293}.

Les hautes prévalences des résistances observées pour chaque antibiotique testé ainsi que la présence de nombreux isolats résistants à de multiples antibiotiques (32 % des isolats sont résistants à plus de 70 % des antibiotiques testés) mettent en lumière la grande complexité du traitement de ces infections chroniques extrêmement difficiles à éradiquer.

PHENOTYPES ASSOCIES A LA VIRULENCE

Afin de caractériser le niveau de virulence des isolats de la banque, nous avons mesuré plusieurs phénotypes bactériens associés à la virulence chez *P. a.*.

La vitesse de croissance, que nous pouvons associer à un potentiel infectieux élevé et à la capacité à coloniser de nouvelles niches, a été mesurée dans un milieu de culture chimiquement défini, conçu pour mimer les conditions chimiques rencontrées par la bactérie dans les poumons des patients ²³⁰. Nous avons ainsi défini 35/66 isolats de croissance rapide (Tg < 120 min), et 31/66 isolats de croissance lente ($Tg \ge 120$ min). Les temps de génération mesurés dans notre étude sont similaires aux mesures réalisées par d'autres équipes, aussi bien en conditions de laboratoire similaires à celles utilisées ici qu'*in situ*, directement dans des échantillons d'expectorations ^{217,294}. Les travaux de Yang et son équipe ont par ailleurs démontré que la majorité de la population bactérienne présente dans les expectorations étaient en phase de croissance active, ainsi qu'une excellente corrélation entre les mesures de taux de croissance réalisées *in situ* et *in vitro* ²⁹⁴. Ces données nous permettent d'affirmer que les mesures présentées ici sont une représentation fidèle la croissance réelle des clones de *P. a.* dans les poumons des patients.

La formation de colonies mucoïdes et la production de pigments peuvent également être considérés comme des facteurs de virulence chez *P. a.*, et leur prévalence parmi au sein de notre banque est élevée (42 et 53 %, respectivement). Contrairement à ce qui a été observé dans d'autres équipes, nous n'avons pas constaté d'association entre ces deux phénotypes bactériens et des conséquences respiratoires particulières ^{206,276,277}. Ces différences peuvent être dues aux différentes méthodes utilisées pour classifier la fonction respiratoire des patients. Par exemple, Mayer-Hamblett tout comme Hunter et leurs équipes ont considéré le

déclin des fonctions respiratoires sur une période de deux ans, contre 5 dans notre étude ^{206,276}. De plus, les trois études sus-citées ont basé leurs caractérisations sur le VEMS exprimé en % de la valeur prédite. Or il existe plusieurs manières de calculer ces valeurs prédites, qui ont tendance à être biaisées par l'âge. Ainsi, l'*ERS Global Lung Initiative* recommande désormais d'abandonner ces unités au profit de l'utilisation du *Z-score*, que nous avons utilisé dans notre étude ²⁶⁵.

La **cytotoxicité** des isolats bactériens a été évaluée par une approche innovante de microscopie automatisée en temps résolu sur des lignées cellulaires de **cellules épithéliales pulmonaires A549 et de macrophages J774**. Nous avons ainsi mis en évidence 34/66 isolats cytotoxiques sur J774, 23/66 cytotoxiques sur A549 et 34/66 provoquant une rétraction cellulaire due au stress sur A549. Par ailleurs, nous n'avons mis en évidence aucune association entre la cytotoxicité des isolats et la présence d'autres phénotypes associés à la virulence (vitesse de croissance, mucoïdie, production de pigments ou présence des gènes codant pour les exotoxines ExoU, ExoS et ExoT du SST3). Ainsi, si des études plus poussées sont nécessaires pour identifier avec précision les mécanismes conduisant à cette cytotoxicité, nous pouvons d'ors et déjà confirmer la présence dans notre banque d'isolats issus d'infection pulmonaire chronique hautement cytotoxiques.

Les deux types cellulaires testés ici (cellules immunitaires et épithéliales) sont d'importance majeure dans la physiopathologie des infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose, puisqu'elles constituent les principales défenses de l'hôte vis-à-vis des pathogènes. Par ailleurs, des travaux antérieurs ont démontré la corrélation entre les résultats du type de tests *in vitro* d'invasion sur cellules épithéliales A549 utilisé ici, et les conséquences de l'infection *in vivo* sur un modèle murin d'infection pulmonaire à *Burkholderia cepacia*, pathogène présentant des caractéristiques proches de *P. a.* ²⁹⁵. Ces observations confortent la pertinence des mesures de cytotoxicité réalisées ici pour caractériser la virulence des isolats de la banque.

Une analyse statistique multivariée sur les 6 phénotypes associés à la virulence nous a permis de caractériser le **niveau de virulence** des isolats. Nous avons ainsi défini comme **non virulents** les isolats associés à l'absence de cytotoxicité sur les 2 lignées cellulaires et à une croissance lente ; de **virulence modérée** les isolats associés à une croissance rapide, généralement

152

cytotoxiques sur J774 mais pas sur A549 ; et de **virulence élevée** les isolats cytotoxiques sur les 2 types cellulaires ; représentant respectivement 45, 26 et 29 % de la banque. Ainsi, et bien que la diminution de la virulence de *P. a.* lors du passage de l'environnement aux voies pulmonaires des patients soit largement documentée, nous observons une proportion importante d'isolats présentant une virulence modérée à élevée au sein de notre banque (55 %) ^{96,149,205}.

Associations entre resistance aux antibiotiques et virulence

De nombreux auteurs ont documenté une association entre gain de résistance aux antibiotiques et diminution du fitness *in vivo* ainsi que de la virulence chez *P. a.* ²⁹⁶. Ce type de compromis adaptatifs, ou *ecological trade-offs,* consistant à compenser le coût métabolique d'une adaptation à une condition environnementale stressante en sacrifiant un autre caractère coûteux en énergie est bien connu en écologie. Cependant, des preuves expérimentales démontrant une nouvelle augmentation du fitness par des phénomènes de compensation suite à l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones ; ou même de gain de fitness et de la virulence *in vivo* remettent en question ce paradigme ^{297–299}. Il est intéressant de constater que dans notre banque, nous n'avons observé aucune association entre les phénotypes de résistance aux antibiotiques et le niveau de virulence des isolats.

ÉVOLUTION ADAPTATIVE DES PHENOTYPES BACTERIENS

Nos résultats mettent en évidence une évolution adaptative des souches vers une diminution de la virulence et une augmentation de la résistance aux antibiotiques, notamment les bêtalactamines, concordante avec des observations antérieures. Ces observations démontrent l'importance des facteurs de virulence dans l'initiation de l'infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose, ainsi que leur régulation négative dans les stades plus tardifs de l'infection, permettant à la bactérie d'échapper aux réponses immunes et inflammatoires de l'hôte, ainsi que la sélection positive de la résistance dans un environnement perpétuellement soumis à des concentrations élevée d'antibiotiques ^{96,149,205,300}. En outre, ces adaptations évolutives sont significativement associées avec des caractéristiques cliniques typiques d'une pathologie respiratoire avancée. Nos données suggèrent ainsi qu'en début d'infection, *P. a.* exprime un certain nombre de facteurs de virulence, qui seront par la suite régulés négativement. En parallèle de cette adaptation bactérienne, la fonction respiratoire du patient diminue de manière irréversible. Ces observations vont dans le sens des hypothèses formulées par Qin, qui propose les infections pulmonaires chroniques à *P. a.* dans la mucoviscidose comme un modèle de relation symbiotique débutante. Ainsi, la bactérie deviendrait au cours de son adaptation moins nocive à son hôte, notamment en diminuant l'expression de ses facteurs de virulence. En revanche, les dommages pulmonaires et l'aggravation de l'atteinte respiratoire qui en résultent restent la partie invariable de la maladie, du fait du caractère progressif de la diminution de la virulence bactérienne²¹².

Ces résultats confortent des études déjà publiées plaçant *P. a.* comme l'une des principales causes de diminution des fonctions respiratoires dans la mucoviscidose ^{96,132,133,144,145,301}. Il est cependant important de souligner que ce type de relation causale est difficile à établir, et malgré les corrélations observées, nos résultats ne permettent pas d'affirmer que *P. a.* est la cause de la diminution de la fonction respiratoire. Ainsi, les dommages pulmonaires survenus au cours de l'aggravation de la pathologie pourraient avoir considérablement modifié l'environnement dans lequel la bactérie évolue, et être eux-mêmes la cause des modifications phénotypiques de *P. a.*.

Nous avons enfin calculé un indicateur, le **degré de Polarité**, permettant de mesurer les modifications intra-hôte survenus entre les isolats précoce et tardif de chaque lignée évolutive. Cet indicateur nous a permis de mettre en évidence des trajectoires adaptatives intra-hôte, patient-spécifiques des lignées clonales. Si ces résultats sont en accord avec l'observation d'une tendance générale à la diminution de la virulence, les profils d'évolution intra-hôte de la résistance aux antibiotiques sont plus variés.

Mis ensemble, nos résultats suggèrent une adaptation à la fois globale et patient-spécifique des phénotypes de *P. a.* au cours de l'infection pulmonaire chronique. Ces évolutions étant indépendantes du génotype des clones, nous pensons que des études post-génomiques d'envergures sont nécessaires pour élucider les mécanismes conduisant à ces adaptations et mieux comprendre les retombées cliniques diverses de cette colonisation.

154

CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons caractérisé au plan phénotypique une banque de lignées clonales évolutives de *P. a.* responsables d'infections pulmonaires chroniques chez des patients adultes atteints de mucoviscidose. Plusieurs phénotypes bactériens associés à la résistance aux antibiotiques et à la virulence ont été mesurés sur l'ensemble des isolats cliniques de la banque. Des profils phénotypiques résumant le **niveau de résistance à chaque famille d'antibiotique**, le **niveau de virulence** et le **potentiel pathogène** des isolats ont été définis par des analyses statistiques multivariées. La **pathologie pulmonaire des patients** de la cohorte a également été caractérisée, par la construction d'indicateurs du **niveau** et de la **dynamique temporelle à court et moyen terme de la fonction respiratoire**.

Nous avons ainsi pu étudier les évolutions adaptatives des phénotypes bactériens, et leurs corrélations avec l'état de santé respiratoire du patient infecté. Nous avons pu mettre en évidence une évolution parallèle des souches vers une diminution de la virulence et une augmentation de la résistance aux antibiotiques, concordante avec l'avancement de la pathologie respiratoire pour le patient.

Les données phénotypiques et cliniques acquises dans ce chapitre, ainsi que les trajectoires d'évolution intra-hôte des phénotypes bactériens, constitueront les **bases de données Phénotypes et Clinique** de notre étude. Dans la Partie IV de ce travail, elles seront analysées de manière intégrative avec les données de Métabolomiques décrites dans la Partie III, afin de rechercher les bases métaboliques permettant les adaptations phénotypiques décrites ici.

PARTIE III

CARACTERISATION METABOLIQUE DE LA BANQUE DE LIGNEES CLONALES EVOLUTIVES DE *P. AERUGINOSA* PAR METABOLOMIQUE NON CIBLEE HPLC-HRMS

INTRODUCTION

Arrêt sur image d'un processus dynamique, l'**empreinte métabolomique** est la signature instantanée des réactions métaboliques se produisant dans le système étudié ²⁴. Des

développements technologiques récents permettent aujourd'hui l'analyse globale des métabolites à une échelle comparable à ses prédécesseurs -omiques ¹⁸. Deux grandes méthodes sont utilisées pour analyser la composition chimique des échantillons : la **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**, et la **Spectrométrie de Masse (MS)**, couplée à une technique de séparation des molécules par Chromatographie Liquide (LC-MS) ou Gazeuse (GC-MS).

La **RMN** a pour principe de mesurer les propriétés magnétiques intrinsèques des noyaux atomiques (le *spin*), dont la fréquence de résonnance dépend de l'environnement électronique, renseignant ainsi la structure moléculaire. Connue pour être robuste et quantitative, la RMN est limitée par sa faible sensibilité, et ne peut renseigner la totalité des molécules présentes dans un échantillon biologique complexe.

La **MS** quant à elle, repose sur le principe d'ionisation des métabolites dans une *source*, suivie d'une séparation des ions produits en fonction de leur **rapport masse/charge (***m/z***)** dans *l'analyseur*. Le *détecteur* transforme ensuite les ions en signal électrique et représente les données sous forme d'un spectre de masse. La MS est généralement précédée d'une étape de séparation des métabolites en fonction de leurs propriétés physico-chimiques par *chromatographie* gazeuse ou liquide, selon la nature volatile ou non des composés analysés. Les molécules sortent donc du chromatographe pour entrer dans le spectromètre de masse à différents temps, correspondant au **temps de rétention (***rt***)** sur la colonne chromatographique. Ainsi, les résultats sont obtenus sous forme de spectres en trois dimensions, où les pics sont caractérisés par le temps de rétention *rt* de la molécule sur la colonne de chromatographie, le rapport *m/z* de l'ion produit et l'intensité relative du signal détecté ³⁰² (Figure 32). La MS est plus communément utilisée en métabolomique non ciblée du fait de sa plus grande sensibilité et de sa meilleure couverture dans des échantillons biologiques complexes ¹⁷.



Figure 32. Principe de la spectrométrie de masse couplée à une méthode de chromatographie.

Généralement, une étude métabolomique peut se décomposer suivant les étapes illustrées Figure 33 : partant d'une question biologique, l'expérience est conçue et les échantillons récoltés et préparés selon une méthodologie précise. L'acquisition des données peut alors être effectuée, généralement par RMN ou MS couplée à une séparation chromatographique des espèces chimiques. Les données sont ensuite pré-traitées, traitées et analysées à l'aide d'outils informatiques, les métabolites pertinents sont identifiés et les résultats sont enfin interprétés au regard de la question biologique initiale ^{303,304}).



Figure 33. Flux analytique général d'une étude métabolomique non ciblée.

L'acquisition de données de métabolomique non ciblée MS et la quantification précise de tous les métabolites présents dans ces échantillons représente aujourd'hui un défi technique majeur ³⁰⁵. La préparation des échantillons par des méthodes appropriées et la combinaison de différentes méthodes d'acquisition LC-MS sont des éléments clés de l'obtention d'une vision complète et non biaisée des métabolites présents dans les échantillons biologiques ^{306–}

Par la suite, l'utilisation de puissants algorithmes de pré-traitement des données brutes basés sur la détection des pics, l'alignement des spectres et le groupement des pics détectés dans les différents échantillons est nécessaire pour convertir les spectres instrumentaux en tableaux de données utilisables en statistiques ³⁰⁹. L'un des développements les plus importants dans le domaine de la métabolomique non ciblée par spectrométrie de masse fut le développement de l'algorithme XCMS²⁷. Il permet la détection et l'alignement des pics représentant les mêmes analytes à travers les différents échantillons, et la traduction des spectres de masse en tableaux de données utilisables pour les analyses statistiques, comportant une intensité ionique pour chaque pic détecté dans chaque échantillon ³⁰⁹. Cet outil, libre d'accès et gratuit, a ouvert la voie au développement d'autres outils de prétraitement similaires. Il est aujourd'hui le plus fréquemment cité dans la littérature spécialisée, et ses performances sont parmi les plus élevées pour la déconvolution de spectres LC-MS³¹⁰. Suivant l'ionisation préalable à détection des pics, un même analyte peut conduire à la formation de plusieurs ions, incluant des isotopes et des adduits. Pour l'interprétation biologique, il est généralement préférable de s'intéresser à l'analyte lui-même plutôt qu'à la redondance d'information induite par la présence de ces différentes espèces ioniques. Le package CAMERA permet la reconnaissance et l'annotation des isotopes et des adduits, et le groupement des différents pics correspondant à un même analyte ³¹¹.

En outre, une attention particulière doit être apportée au contrôle qualité des données obtenues, afin de remédier à une éventuelle dérive analytique due à l'encrassement de l'appareil au cours de l'acquisition (notamment lorsque le nombre d'échantillons à analyser est grand), et à la présence de contaminants chimiques introduits durant le processus de préparation des échantillons ³¹². Les différentes étapes de traitement et de normalisation des données obtenues pouvant considérablement influencer le résultat final des analyses statistiques, le choix minutieux des méthodes appliquées est lui aussi fondamental ^{313,314}.

La question de la normalisation du signal est ainsi centrale dans l'analyse des données de métabolomique non ciblée, souvent acquises sur plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines d'échantillons distincts en une seule analyse. Pourtant, la question est souvent peu adressée dans la littérature spécialisée : pour exemple, selon une étude publiée en 2016, la moitié des articles traitant de métabolomique de l'urine n'évoquent pas la question de la normalisation. Toujours selon cette même équipe, il existe trois stratégies permettant de normaliser l'intensité mesurée dans les spectres de masse : en pré-acquisition, par l'ajustement du volume d'échantillon injecté, et en post-acquisition, par la correction d'un éventuel « effet batch » ou par la normalisation globale du signal par un algorithme choisi ³¹⁴.

Par essence, la métabolomique non ciblée MS conduit à l'accumulation de données dans une logique de haut débit, et résulte en la création de matrices de grandes dimensions, décrivant chacun des échantillons étudiés en fonction de plusieurs centaines voire plusieurs milliers de variables. L'objectif étant de déterminer les différences relatives entre les métabolomes des différents objets biologiques étudiés, l'utilisation de méthodes statistiques multivariées est indispensable à la conduite de ce type d'études ²³⁸. Parmi les méthodes les plus populaires, on peut notamment citer l'ACP, qui permet de résumer de manière non supervisée l'information contenue dans un jeu de données quantitatif²³⁹. L'ACP permet ainsi de visualiser les principales sources de variabilité des données, et peut être utilisée pour l'identification de groupes d'observations similaires ou de valeurs hors-normes. Très populaires également, les méthodes de régression PLS reposent sur le même principe de réduction des dimensions, cette fois-ci dans un mode supervisé, où l'on cherche la meilleure combinaison linéaire des variables de la matrice X (de données métabolomiques, par exemple) pour prédire la matrice réponse Y (de données cliniques, par exemple) ²⁴⁷. La PLS-DA est une variante de la régression PLS, typiquement utilisée pour identifier les métabolites discriminant des échantillons appartenant à deux classes distinctes (*e.g.* malade/non malade).

Enfin, un dernier grand défi dans l'analyse et l'interprétation biologiques de données de métabolomique MS non ciblée réside dans d'élucidation de la structure des métabolites inconnus. Bien que plusieurs bases de données publiques ou privées permettent d'annoter les pics détectés sur la base de leur *m/z* ou de leur spectre de fragmentation MS2, ces listes ne recensent pas la totalité des métabolites existants dans la nature, et ces informations ne peuvent être déduites directement du code génétique, comme cela est possible en 160

protéomique ^{315–321}. La construction de listes propres à chaque espèce et chaque type d'échantillon étudiée est donc nécessaire, mais nécessite beaucoup de temps et de moyens. De plus, l'annotation des métabolites détectés est nécessaire pour investiguer les mécanismes physiopathologiques et la pertinence des biomarqueurs mis en évidence par les études métaboliques ³⁰⁵. Ainsi, une stratégie pratique consiste à concentrer l'interprétation des données sur les métabolites annotés.

Dans ce chapitre, nous présentons des étapes ayant conduit à l'acquisition des empreintes métabolomiques des 66 isolats cliniques de *P. a.* issus d'infections pulmonaires chroniques chez des patients atteints de mucoviscidose constituant la FCB. Une attention toute particulière a été apportée à la méthodologie de préparation des échantillons, d'acquisition et de traitement des données HPLC-HRMS, afin d'obtenir des données de grande qualité. Notre analyse a permis l'annotation putative de 272 métabolites, et la définition de 3 métabotypes, profils métabolomiques distincts des isolats cliniques de *P. a.* issus d'infection pulmonaire chronique. Le calcul d'un indicateur des modifications survenues entre différents isolats prélevés à plusieurs années d'intervalle depuis les expectorations des patients a permis l'identification de voies d'évolution distinctes du métabolisme bactérien au cours de la colonisation chronique des voies respiratoires.

L'Organigramme 4 représente le positionnement de ce chapitre dans l'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit. Les résultats présentés ici seront dans le chapitre suivant analysés de manière intégrative avec les données phénotypiques et cliniques décrivant la FCB, décrites dans le chapitre précédent.



Organigramme 4 : Positionnement de la Partie III (caractérisation métabolomique de la banque et évolution métabolique des lignées clonales) dans le contexte général de la thèse.

MATERIELS ET METHODES

Les expériences de métabolomique HPLC-HRMS décrites ici ont été réalisées en étroite collaboration avec Florence Castelli et François Fenaille du Laboratoire d'étude du Métabolisme des Médicaments du CEA Paris-Saclay.

1. RELATIONS CFU/DO

La relation CFU/DO définit le nombre d'unités formant des colonies (CFU) par mL de culture bactérienne à une DO₅₉₅ de 1. Elle a été mesurée pour chaque isolat à partir de cultures en milieu SCFM2. Brièvement, lorsque la DO₅₉₅ mesurée atteint une valeur proche de 1 (ou ½ de la DO₅₉₅ maximale mesurée pour les isolats créant une faible turbidité), 300 μ L de la culture bactérienne a été prélevée et diluée en série dans 3 mL de LB à 4°C. Cinquante et 100 μ L de la suspension diluée à 10⁻⁵ et 100 μ L de la dilution à 10⁻⁶ ont ensuite été étalés sur LB-Agar à l'aide de billes de verre stérile, chaque étalement ayant été répété 3 fois. Les boîtes ont ensuite été placées à 37°C pendant 24 à 48 h (jusqu'à ce que les colonies soient visibles). Les relations CFU/DO ont été calculées pour chaque boîte pour lesquelles le nombre de colonies était compris entre 10 et 800 selon la formule :

$$CFU/DO = \frac{Nombre\ de\ colonies}{Volume\ \acute{e}tal\acute{e}*Dilution}*\frac{1}{DO}$$

La moyenne des 9 comptages (3 étalements X 3 réplicats) a été conservée comme valeur de référence de la relation CFU/DO pour chaque isolat de la FCB.

2. PREPARATION DES ECHANTILLONS

2.1. CONDITIONS DE CULTURE BACTERIENNE

Les isolats de la FCB ont été pré-cultivés pendant 24 à 48 h en conditions aérobie, dans 1 mL de milieu SCFM2 à 37°C, 230 rpm, jusqu'à obtenir une DO₅₉₅ > 0,5. Les cultures ont ensuite été diluées à une DO₅₉₅ de 0,1 dans 5 mL de milieu SCFM2 puis réparties équitablement dans 2 tubes de culture de 14 mL. Les cultures bactériennes ont été réalisées à 37°C, 230 rpm (InfoRS HT, Ecotron, Basel, Suisse) jusqu'à atteindre la DO₅₉₅ correspondant au milieu de la phase exponentielle de croissance, déterminée d'après les courbes de croissance présentées dans la

partie précédente (Partie II, p. 123, Figure 23). L'ensemble des cultures ont été réalisées en triplicats biologiques sur des expériences indépendantes.

2.2. ÉCHANTILLONNAGE ET EXTRACTION DES METABOLITES INTRACELLULAIRES

Cette étape a été réalisée selon le protocole décrit par Aros-Calt et collègues avec de légères modifications (Figure 34) ^{307,308}.

2.2.1. Protocole de filtration rapide et arrêt du métabolisme

Brièvement, les cultures bactériennes ont été filtrées rapidement à l'aide de filtres à membrane stériles polyéther sulfone (Supor450, 0,45 µm, PALL, Washington, New York) montés sur un système de filtration sous vide (Neuberger, Village-Neuf, France). Les bactéries retenues sur les filtres ont rapidement été lavées avec 5 mL de NaCl 0,6 % à 4°C. Le filtre a ensuite été transféré dans un tube Falcon de 50 mL contenant 5 mL d'éthanol 60 % (v/v) à - 20°C, puis le tube Falcon été immédiatement plongé dans de l'azote liquide afin de stopper le métabolisme. L'ensemble de ce protocole de filtration rapide a été effectué en moins de 5 min.

2.2.2. Extraction des métabolites intracellulaires

A la suite de l'arrêt du métabolisme, les tubes Falcon ont été décongelés sur glace et vortexés 10 fois 30 sec à vitesse maximale pour décoller les bactéries du filtre. La suspension cellulaire a ensuite été transférée dans des tubes en polystyrène stérile (Falcon) et conservés à -80°C jusqu'au jour de la préparation des extraits secs à partir des échantillons.

Ensuite, 1 mL de suspension bactérienne a été transféré dans des tubes de 1 mL contenant des microbilles de verre (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Les cellules ont été cassées mécaniquement par 3 cycles de 30 sec, 3800 rpm à 4°C dans un homogénéiseur Precellys 24 (Bertin Technologies). Les billes de verre et les débris cellulaires ont été séparés du surnageant par centrifugation 5 min à 10 000 g, à 4°C, puis 200 µL de surnageant ont été prélevés et séchés par évaporation sous vide à l'aide d'un appareil SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Les échantillons (extraits secs) ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.



Figure 34. Procédure expérimentale de la préparation des extraits métaboliques de P. a. pour l'analyse métabolomique LC-MS (figure issue de ²⁸⁵).

2.2.3. Normalisation pré-analytique et reconstitution des échantillons en vue des analyses

Le volume de reprise des échantillons après évaporation a été calculé d'après les relations CFU/DO afin de standardiser le contenu métabolique correspondant à environ 1,25 X 10⁷ bactéries pour 10 µL d'échantillon injectés. Les extraits métaboliques bactériens secs ont été repris dans un tampon contenant 40 % de carbonate d'ammonium 10 mM pH 10.5 et 60 % 60 % d'acétonitrile (ACN) ou 95 % H20 et 5% ACN pour les analyses HILIC et C18, respectivement.

2.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS DE CONTROLE QUALITE

20 µL de chaque échantillon biologique et de standards externes ont été assemblés afin de préparer des échantillons de contrôle qualité (QC) contenant l'ensemble des espèces chimiques présentes dans les échantillons biologiques. Ces échantillons QC ont été injectés régulièrement tous les 10 échantillons tout au long de l'acquisition, afin de contrôler l'apparition d'un éventuel « effet batch » dû à l'encrassement de l'appareil. Des échantillons QC dilués 2, 4 et 8 fois ont également été préparés en vue du contrôle de la qualité des pics détectés.

2.4. STANDARDS

Des standards externes ont été ajoutés à chaque échantillon biologique et de QC afin de calibrer les spectres. Tous les composés purs provenaient de chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) et étaient au plus haut niveau de pureté. Brièvement, la solution étalon 20X contenait : 200 µg/mL d'alanine marquée au carbone 13 (¹³C), 10 µg/mL de meltformine, 30

µg/mL d'acide éthylmalonique, 200 µg/mL d'aspartate marqué à l'azote 15 (¹⁵N), 200 µg/mL de glucose ¹³C, 10 µg/mL de 2-aminoanthracène, 100 µg/mL d'amiloride, 5 µg/mL d'imipramine, 10 µg/mL d'atropine, 50 µg/mL d'ampiciline, 10 µg/mL de prednisolone, 5 µg/mL de colchicine, 200 µg/mL de dihydrostreptomycine et 200 µg/mL de roxythromycine, dilués dans une solution eau/méthanol (1/3) et a été conservée à -80°C jusqu'à utilisation. La solution étalon a été diluée 20X dans échantillon biologique et QC (5 µL de solution étalon ajoutés à 95 µL d'échantillon).

3. ANALYSE HPLC-HRMS

Les expériences HPLC-HRMS (pour *High Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry*) ont été effectuées à l'aide d'un système de chromatographie Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) couplé à un spectromètre de masse Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) équipé d'une source électrospray (ESI). Deux méthodes analytiques distinctes ont été utilisées :

- Analyse HILIC en source d'ionisation négative. Pour cette analyse, la séparation chromatographique a été opérée sur colonne ZIC-pHILIC 5 μm, 2,1 X 150 mm (Merck, Damstadt, Allemagne), à 15°C sous gradient d'élution de phases mobiles A et B à un flux d'élution de 200 μL/min. La phase mobile A était constituée de carbonate d'ammonium pH 10,5, et la phase mobile B d'ACN 100 %. L'élution a été initiée avec 80 % de phase B pendant 2 min, suivie d'un gradient linéaire de 80 à 40 % de B entre 2 et 12 min et d'un rinçage à 0 % B pendant 5 min, et terminée par une phase d'équilibration de 15 min. Le spectromètre de masse a été paramétré à un voltage capillaire de -3 kV et à une température capillaire de 280°C.
- Analyse C18 en source d'ionisation positive. Pour cette analyse, la séparation chromatographique a été opérée sur colonne hypersil GOLD C18 1,9 mm, 2,1 mm × 150 mm (Thermo Fisher Scientific, les Ulis, France), à 30°C sous gradient d'élution de phases mobiles A et B à un flux d'élution de 500 μL/min. La phase mobile A était constituée de H₂O 0,1 % HCOOH, et la phase mobile B de ACN 0,1 % HCOOH. L'élution a été initiée avec 5 % de phase mobile B pendant 2 min, suivie d'un gradient linéaire de 5 % à 100 % de phase mobile B et d'un rinçage à 100 % de B pendant 11 min, et terminée par une phase d'équilibration de 4,5 min à 5 % de B. Le spectromètre de 166

masse a été paramétré à un voltage capillaire de 5 kV et à une température capillaire de 280°C.

Pour les deux analyses, la température du compartiment d'échantillonnage automatique a été réglée à 4°C et le volume d'injection à 10 μ L. La détection a été effectuée sur la plage 75-1000 *m/z* à une résolution de 50 000 à 200 *m/z*, comme indiqué par Aros-Calt et al. 2015 ³⁰⁸.

4. TRAITEMENT DES DONNEES

Les spectres bruts enregistrés au format *.raw* dans l'interface logicielle XcaliburTM (version 2.1, Thermo Fisher Scientific) du spectromètre de masse ont été convertis au format *.mzXML* à l'aide du logiciel MSConvert ³²² (version 3.0.9393, ProteoWizard). La détection et l'intégration des pics a été réalisée à l'aide du package XCMS sous R, et l'annotation des adduits, fragments et isotopes à l'aide du package CAMERA ^{309,311,323,324}. Le calcul a été optimisé par parallélisation à l'aide du package BiocParallel ³²⁵. Le script complet de l'analyse XCMS et CAMERA avec l'ensemble des paramètres utilisés est disponible en **Annexe**. Globalement, les pics ont été détectés grâce à l'algorithme *centWave* à un pas de 0,01, à une tolérance de déviation du *m/z* de 10 ppm et une largeur de pic de 10 à 40 secondes pour C18, 20 à 120 secondes pour HILIC, et le ratio signal/bruit a été fixé à 5. Les pics ont ensuite été groupés par densité et les temps de rétention lissés de façon non linéaire (méthode *loess*), et les valeurs manquantes ont été imputées par la méthode *chrom*.

Les pics détectés par l'analyse XCMS-CAMERA ont ensuite été filtrés selon les critères suivants :

- Coefficient de corrélation entre le facteur de dilution et l'aire du pic dans les QC > 0,7 ;
- Ratio de l'aire moyenne du pic dans les blancs sur les échantillons biologiques < 0,33 ;
- Coefficient de variation de l'aire du pic dans les QC < 30%.

Les intensités des pics ont ensuite été normalisées grâce à l'algorithme PQN (pour *Probabilistic Quotient Normalization*) décrit par Dieterle et collègues ³²⁶. L'ensemble des étapes de filtration et de normalisation ont été réalisées de manière automatique et reproductible sur la plateforme Workflow4Metabolomics ^{327,328}.

5. ANNOTATION ET IDENTIFICATION DES METABOLITES

Les pics ont été annotés putativement par comparaison des m/z avec les bases de données publiques KEGG, HMDB, PAMDB et Metlin ^{315–317,321} ainsi que par comparaison des m/z et des rt avec les bases de données interne du CEA Paris-Saclay ^{318,319}.

6. ANALYSES STATISTIQUES MULTIVARIEES

Les données HPLC-HRMS obtenues ont été analysées par des méthodes de statistiques multivariées non supervisées. Des groupes d'isolats présentant des signatures métaboliques similaires ont été constitués par analyses HCPC (ACP suivie d'une CAH et d'une partition par les *k-means*). Le nombre de CP informatives de l'ACP a été fixé par la simulation de nombreux jeux de données aléatoires de taille similaire aux données testées, en considérant comme informatives les CP pour lesquelles l'inertie expliquée était supérieure au 95^{ème} percentile des distributions aléatoires ³²⁹. Pour les analyses menées conjointement sur les données C18 et HILIC, l'étape d'ACP a été remplacée par une analyse factorielle multiple (AFM). Une AFM est une forme d'analyse en composantes principales permettant d'extraire l'information commune depuis plusieurs jeux de données décrivant les mêmes individus. Elle consiste à réaliser une analyse en composantes principales sur chaque bloc de données en parallèle (une ACP dans le cas de variables quantitatives), puis à pondérer les coefficients appliqués à chaque variable en fonction de la variance expliquée par la première CP (ou valeur propre) du bloc de variables correspondant. Cette méthode permet d'équilibrer l'information apportée par chaque jeu de données, par exemple dans le cas où le nombre de variables dans chaque bloc est différent ^{241,330,331}. Si non précisé, le nombre de groupes constitués lors de l'étape de classification a été calculé par analyse du gain d'inertie apporté par la constitution de chaque groupe ²⁴⁴.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées et visualisées à l'aide logiciel R version 3.3.2 et des packages gplots, FactoMineR, FactoInvestigate et factoextra ^{257,280–282,329}.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. ACQUISITION DES EMPREINTES METABOLIQUES BACTERIENNES PAR ANALYSE METABOLOMIQUE NON CIBLEE

Dans cette section, nous présenterons l'ensemble du processus de préparation des échantillons ; d'acquisition, prétraitement, nettoyage, normalisation pré- et post-analytique et annotation des données HPLC-HRMS ; et enfin d'identification et traitement des échantillons aberrants ; ayant conduit à l'obtention des empreintes métaboliques intracellulaires des isolats cliniques de *P. a.* constituant la FCB.

1.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES DE P. A.

1.1.1. Mesure des relations CFU/DO pour la normalisation pré-analytique

Les relations entre densité optique et nombre d'unités formant des colonies (CFU/DO) mesurées pour chaque isolat sont présentées Figure 35. Pour chaque isolat, nous avons conservé entre 6 et 9 comptages compris dans la gamme 10-800 colonies par boite, sur les 9 comptages réalisés au total (3 dilutions X 3 réplicats techniques). Les valeurs moyennes des CFU/DO mesurées pour chaque isolat sont comprises entre 3,8.10⁷ et 1,2.10⁹ (médiane = 4,6.10⁸; moyenne = 5,2.10⁸). Ces valeurs concordent avec l'expertise pour l'espèce *P. a.* du laboratoire TheREx, qui définit comme référence la valeur de 5.10⁸ CFU/DO. Les coefficients de variation (CV) par isolat sont en moyenne de 26 % (médiane = 24 % ; 1^{er} - 3^{ème} quartiles = 18 - 33 %). On observe cependant que les mesures effectuées sur l'isolat 3.3B sont particulièrement basses (3,8.10⁷ en moyenne, contre 2,16.10⁸ pour le 10^{ème} percentile des moyennes), possiblement en raison de sa grande mucosité pouvant induire des « fusions » entre colonies voisines et fausser le comptage sur boîte (Figure 35).

Nous avons donc conservé la moyenne des mesures de CFU/DO comme valeur de référence pour chaque isolat, à l'exception de l'isolat 3.3B dont nous avons remplacé la valeur par le 10^{eme} percentile des mesures. Ces valeurs ont été retenues pour ajuster le volume de reprise des extraits bactériens et normaliser le contenu métabolique injecté dans le système HPLC-HRMS.



Figure 35.Relations CFU/DO des isolats de la banque (échelle logarithmique). Pour chaque isolat, les comptages ont été réalisés à 3 dilutions différentes, en triplicats. 90 % des comptages réalisés sont compris entre les lignes pointillées noires. Les pointillés bleus et rouges représentent respectivement la moyenne et la médiane des mesures. Les isolats provenant d'un même patient sont encadrés en blanc.

1.1.2. Cultures bactériennes et préparation des échantillons

Afin d'obtenir une vision complète et non biaisée du contenu métabolique d'isolats cliniques de *P. a.* issus de patients atteints de mucoviscidose, une attention toute particulière doit être apportée aux conditions de culture bactérienne et à la préparation des échantillons.

Des études précédentes ont démontré l'impact considérable du milieu de culture sur les signatures métaboliques de cultures bactériennes de *P. a.* ^{62,226,227}. De plus, il a été démontré que la présence de certains nutriments présents spécifiquement dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose (concentrations importantes de fer, Mucine, présence d'ADN issu de la lyse des cellules hôtes, taux de lactate élevé des suites de l'inflammation, taux d'acides aminés et GlcNAc supérieurs à la normale...) influencent le métabolisme et la pathogénicité de *P. a.* ²⁰⁷. Nous avons donc cultivé les isolats bactériens de la FCB dans un milieu SCFM2 chimiquement défini, sans Mucine (décrit dans la **Partie I**) conçu pour imiter les conditions nutritionnelles rencontrées par les bactéries dans les voies respiratoires des

patients mucoviscidosiques. La Mucine a été supprimée des ingrédients du milieu pour deux raisons. D'une part, car sa présence dans les cultures crée un trouble empêchant la mesure précise de la DO₅₉₅, utilisée à la fois pour standardiser la phase de croissance d'échantillonnage au milieu de la phase exponentielle et pour calculer le nombre de bactéries par culture à l'aide des relations CFU/DO. D'autre part, car la présence de Mucine crée une texture très épaisse des cultures bactériennes, empêchant la récupération des bactéries par filtration rapide.

Des études précédentes ont soigneusement conçu des protocoles de préparation d'échantillons en vue de l'analyse des métabolites intracellulaires de bactéries d'importance clinique par métabolomique non ciblée LC-MS ^{306,307}. Suivant leurs recommandations, nous avons arrêté les cultures bactériennes en milieu de phase exponentielle (défini d'après les courbes de croissance présentées **Partie II**, paragraphe 2.2.1, Figure 23), soit à une DO₅₉₅ comprise entre 0,35 et 1,95 selon les isolats (médiane = 1). Les bactéries ont ensuite été récupérées suivant un protocole de filtration rapide, et le métabolisme a été stoppé dans un bain d'éthanol à 60 % froid. Les bactéries ont ensuite été cassées mécaniquement à l'aide d'un broyeur à billes, les débris cellulaires éliminés par centrifugation et les extraits métaboliques obtenus séchés par évaporation. Les extraits secs ont enfin été repris dans le volume de solvant approprié, calculé d'après les mesures de DO₅₉₅ et de relations CFU/DO afin qu'ils soient équivalents au contenu métabolique d'environ 1,25.10⁷ bactéries pour 10 µL.

1.2. Acquisition des spectres HPLC-HRMS par la combinaison de deux methodes analytiques

La combinaison de plusieurs techniques HPLC-HRMS complémentaires permet la détection et l'identification d'un maximum de métabolites, chimiquement très divers par nature ^{308,318,332}. Dans ce travail, nous avons utilisé une colonne de chromatographie HILIC (pour *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) couplée à une analyse HRMS en mode d'ionisation négative (données HILIC), ainsi qu'une colonne de chromatographie C18 couplée à une analyse HRMS en mode d'ionisation positive (données C18), afin de maximiser le recouvrement chimique de notre analyse.

Nous avons appliqué cette procédure aux 198 extraits métaboliques bactériens (66 isolats de *P. a.* x 3 réplicats biologiques), ainsi qu'aux échantillons QC et blancs, afin d'obtenir une vision non biaisée et la plus complète possible des endométabolites des isolats *P. a.* de notre banque.

1.3. *PRE-TRAITEMENT DES DONNEES : DECONVOLUTION XCMS ET ANNOTATION CAMERA DES ADDUITS ET ISOTOPES*

Les données brutes acquis *via* le système HPLC-HRMS et enregistrés au format *.raw* dans l'interface logicielle Xcalibur ont d'abord été converties au format *.mzXML* à l'aide du logiciel MSConvert. Ensuite, les spectres bruts ont été pré-traités à l'aide des packages R XCMS et CAMERA brutes suivant le script indiqué en Annexe 1, afin d'obtenir des tableaux de données décrivant les échantillons selon l'intensité des pics détectés, traduits en variables. L'extraction XCMS initiale a permis de détecter 2718 variables correspondant aux pics détectés sur les spectres acquis lors de l'analyse HILIC, 4831 sur C18, chaque variable *MxTy* étant caractérisée par un *m/z x* et un *rt y* (Figure 36).



Figure 36. Résumé des étapes d'acquisition et pré-traitement des données HPLC-HRMS.

1.4. Controles de qualite des donnees

1.4.1. Contrôle de l'absence d'effet batch

La visualisation des intensités ioniques totales des échantillons QC dans chaque jeu de données (définies comme la somme des intensités mesurées pour chaque variable) en fonction de l'ordre d'injection des échantillons permet la visualisation d'un « effet batch » éventuel, dérive analytique due à l'encrassement de la colonne ou de la source au cours de l'analyse ²⁷⁵. Les résultats de cette analyse pour chaque jeu de données sont présentés Figure 37. Sur les données C18, on remarque que les échantillons QC injectés tout au long du batch sont très reproductibles, indiquant l'absence de dérive analytique. Sur les données HILIC, on observe 5 échantillons QC ayant une intensité totale anormalement basse, nous avons donc choisi d'éliminer ces échantillons de l'analyse. Hormis ces exceptions, l'intensité ionique totale dans les QC reste globalement stable au cours du batch (pas de diminution du signal). Au vu de ces observations, nous avons conclu à l'absence de dérive analytique au cours de l'acquisition, aussi bien C18 que HILIC, et n'avons pas appliqué de correction d'effet batch.



Figure 37. Absence de dérive du signal due à l'encrassement de l'appareil au cours de l'acquisition (« *effet batch* »).

L'intensité ionique totale a été calculée comme la somme des intensités mesurées pour l'ensemble des variables. Les différents types d'échantillons sont indiqués en légende : Blanc (points bleu clair en début et fin d'ordre d'injection), QC (points bleus répartis tout au long du batch et permettant de visualiser l'absence d'effet batch), QC/facteur de dilution (en début de batch), et échantillons biologiques (extraits bactériens de *P. a.*, en orange).

1.4.2. Sélection des variables de bonne qualité

Parmi ces variables initiales, respectivement 57 % et 62 % ont été éliminées sur C18 et HILIC en raison d'une mauvaise qualité, à savoir : intensité moyenne dans les échantillons biologiques moins de 3 fois supérieure à l'intensité moyenne dans les blancs ; intensité dans les échantillons QC non corrélée au facteur de dilution ; ou CV dans les échantillons QC non corrélée au facteur de dilution. Cette étape de filtration nous a permis d'éliminer les pics contaminants et de conserver les variables de bonne qualité, à savoir reproductibles dans les échantillons QC et dissociées du bruit de fond. Au final, 1030 variables ont été retenues suite à l'analyse HILIC, 2084 suite à l'analyse C18.

1.4.3. Intensité ionique totale selon le type d'échantillon

L'intensité de chaque pic est directement proportionnelle à la quantité du métabolite correspondant dans l'échantillon ³³³. Ainsi, l'intensité ionique totale est proportionnelle au contenu métabolique total de chaque échantillon. La Figure 38 présente les intensités ioniques totales mesurées pour chaque type d'échantillon (blanc, QC, biologique) après élimination des pics contaminants. On remarque que l'intensité ionique mesurée dans les QC est très reproductible et suit le facteur de dilution.



Figure 38. Intensité ionique totale dans les échantillons pour chaque type d'échantillon Blanc, Contrôle Qualité (QC/facteurs de dilution), extraits bactériens de *P. a.* (Biologique).

L'intensité ionique totale dans les échantillons biologiques est en moyenne proche de celle mesurée dans les QC non dilués. En outre, les intensités ioniques totales mesurées par chacune des deux méthodes analytiques sont du même ordre de grandeur (médiane = 9.10⁸ pour C18, 4.10⁸ pour HILIC), et très bien corrélées entre elles (*p-valeur* test de corrélation de Pearson < 2.10⁻¹⁶), confortant notre méthode analytique.

1.4.5. Reproductibilité intra- et variabilité inter-isolat de l'intensité ionique totale dans les échantillons biologiques

La Figure 39 illustre la somme des intensités ioniques mesurées dans les extraits bactériens correspondant à chaque isolat clinique. On remarque que l'intensité du signal est plus variable lorsqu'on compare les isolats bactériens entre eux qu'au sein des différents réplicats biologiques du même isolat (CV global de 63 et 68 %, contre 14 et 13 %, CV médian intra-isolat pour C18 et HILIC, respectivement). Sur les données HILIC, on remarque également la présence de trois échantillons pour lesquels cette intensité paraît anormalement basse (Figure 39, en rouge). Ces *outliers* n'étant pas retrouvés sur l'analyse des données C18, nous pouvons conclure qu'ils sont probablement dus à une erreur technique survenue lors de l'analyse HILIC.

La bonne reproductibilité au sein des triplicats biologiques confirme la robustesse de la méthodologie de préparation des échantillons et d'acquisition des données. En revanche, la variabilité non négligeable des intensités ioniques totales inter-isolats suggère que le contenu métabolique dans chaque échantillon diffère selon l'isolat bactérien, malgré les efforts de normalisation pré-analytique effectués par l'ajustement du volume d'injection. Cette hypothèse sera étudiée en détail dans les paragraphes suivants.



Isolat

Figure 39. Intensité ionique totale calculée après normalisation PQN dans les échantillons dans les extraits métaboliques intracellulaires d'isolats cliniques de *P. a.*.

Les points entourés en rouge ont été identifiés comme outliers techniques.

90 % des valeurs sont comprises entre les lignes pointillées noires. Les pointillés bleus et rouges représentent respectivement la moyenne et la médiane des mesures.

1.5. NORMALISATION POST-ANALYTIQUE

1.5.1. Bilan de la normalisation pré-analytique par les relations CFU/DO

La Figure 40 présente l'intensité ionique totale mesurée dans les échantillons en fonction du volume de reprise des extraits métaboliques secs, calculés d'après les valeurs de CFU/DO spécifiques à chaque isolat.

On remarque en premier lieu que cette relation est peu variable pour les volumes d'injection supérieurs à 75 µL, avec une intensité ionique totale moyenne de 3,0.10⁸ pour l'analyse HILIC, 6,6.10⁸ pour C18 (CV = 46 et 30 % pour HILIC et C18, respectivement). On observe toutefois une corrélation négative significative entre le volume de reprise des extraits métaboliques secs et l'intensité ionique totale mesurée dans les échantillons (coefficients de corrélation de Pearson = -0,46 et -0,60; *p*-valeurs = 1,4.10⁻⁶ et 3,6.10⁻¹¹ pour HILIC et C18, respectivement).

On remarque que pour les volumes inférieurs à 75 µL, la corrélation négative entre le volume de reprise et le contenu métabolique des échantillons est plus importante (coefficients de corrélation de Pearson = -0,74 et -0,80 pour HILIC et C18, respectivement ; *p*-valeur < 2,2.10⁻¹⁶). En outre, les relations CFU/DO des isolats sont en moyenne de 3,3.10⁸ pour les échantillons dont le volume de reprise est inférieur à 75 µL, 7,1.10⁸ pour les volumes supérieurs (*p*-valeur du test *t* de Student < 2,2.10⁻¹⁶). Ces données suggèrent une sous-estimation des valeurs de CFU/DO pour certains isolats, possiblement en raison de la propension de certains isolats de *P. a.* à former des agrégats en culture. Dans ce cas, une partie des colonies comptées lors des mesures de CFU/DO résultent de la division non pas d'une bactérie, mais de plusieurs, conduisant à un résultat faussement bas.



Volume de reprise des extraits métaboliques secs (µL)



Le trait rouge indique un volume de reprise de 75 µL, correspondant à la limite inférieure pour laquelle la relation entre volume d'injection et intensité ionique n'est plus constante.

En résumé, notre méthode de normalisation pré-analytique semble globalement efficace pour les relations CFU/DO les plus élevées, avec une intensité ionique totale d'environ 3,0.10⁸ pour HILIC, 6,6.10⁸ pour C18, correspondant au contenu d'environ pour 1,25.10⁷ CFU. *A contrario*, cette méthode n'a pas été efficace pour normaliser le contenu métabolique injecté lorsque la relation CFU/DO est faible. Nous avons donc souhaité étudier d'autres stratégies de normalisation pré-analytique des extraits métaboliques bactériens, afin d'établir des recommandations en vue d'analyses futures.

Des travaux précédents d'analyse métabolomique sur cultures bactériennes mettent en évidence deux stratégies de normalisation pré-analytique par ajustement du volume d'extraits bactériens injecté :

- La première, que nous avons appliquée ici, consiste à standardiser le « nombre de bactéries » contenues dans l'échantillon ²³⁶. Notre démarche a consisté à calculer le « nombre de bactéries » correspondant à 1 mL de culture à une DO₅₉₅ de 1 (CFU/DO).
- La seconde stratégie consiste à standardiser la « quantité de matière » injectée, de par des mesures de DO₅₉₅, de quantités de protéines totales ou d'absorbance UV après marquage des groupements amine et phénol par dansylation ^{62,306,308,334,335}.

Afin d'identifier la stratégie la plus pertinente à adopter pour normaliser les extraits métaboliques intracellulaires de *P. a.* avant l'analyse LC-MS, nous avons comparé les résultats obtenus par la normalisation CFU/DO (stratégie « nombre de bactéries », Figure 37) avec les
résultats théoriques que nous aurions obtenus en normalisant uniquement sur la DO₅₉₅ (stratégie « quantité de matière », Figure 38). Pour cela, nous avons calculé les intensités ioniques totales et les volumes de reprise des extraits métaboliques que nous aurions obtenus en considérant les relations CFU/DO de l'ensemble des isolats égales à 5.10⁸.

La Figure 41 présente l'intensité ionique totale en fonction du volume de reprise des extraits secs théoriques de cette expérience simulée. On observe en premier lieu que l'amplitude des intensités totales théoriques est supérieure à celle des intensités totales réelles mesurées, avec un coefficient de variation environ deux fois supérieur pour les données théoriques (CV = 0,6 et 0,7 pour les intensités totales mesurées C18 et HILIC, respectivement ; contre 1,2 pour les intensités totales théoriques C18 et HILIC). Cette expérience simulée suggère ainsi que la normalisation pré-analytique par la DO₅₉₅ seule ne permet pas d'obtenir une quantité de signal constante pour des extraits de différents isolats bactériens.



Volume de reprise théorique des extraits métaboliques secs (µL)



En outre, bien que la corrélation entre intensité ionique totale et volume de reprise des extraits secs soit toujours significative sur les données de cette expérience simulée, elle est beaucoup plus faible que celle observée sur les mesures réelles ; avec un coefficient de corrélation proche de -0,2 pour l'expérience simulée de normalisation sur la DO, contre -0,7 pour l'expérience réelle de normalisation par la relation CFU/DO. Il semble ainsi plus difficile de contrôler la quantité de métabolites injectés par l'ajustement du volume de reprise des extraits secs en considérant les relations CFU/DO des différents isolats bactériens comme constante.

Nous recommandons ainsi de privilégier une méthode de normalisation pré-analytique basée sur le comptage du nombre de bactéries injectées, pour chaque isolat bactérien à analyser. En revanche, nos observations suggèrent que notre méthode de mesure par les relations CFU/DO sous-estime parfois le nombre de bactéries présentes dans les échantillons, certainement en raison de la formation d'agrégats bactériens lors des cultures. Ainsi, dans le cas d'espèces ou de souches bactériennes ayant tendance à s'agréger, nous recommandons l'utilisation d'une autre méthode d'estimation du nombre de bactéries contenues dans les cultures bactériennes, à l'instar de la PCR quantitative (qPCR) sur un gène de ménage, comme utilisée par Kozlowska et collègues ²³⁶. Une amélioration du protocole de mesure des relations CFU/DO est également envisageable, par exemple par l'ajout d'une étape de traitement aux ultrasons (sonication) des cultures bactériennes afin de désolidariser les agrégats ³³⁶.

1.5.2. L'intensité ionique totale : facteur de variabilité majeur des empreintes métabolomiques par HPLC-HRMS

Dans le paragraphe précédent, nous avons constaté que la méthode de normalisation préanalytique appliquée à nos échantillons est imparfaite, donnant lieu à des intensités ioniques totales particulièrement élevées pour les échantillons repris dans des volumes faibles. Nous avons donc souhaité mesurer l'impact de cette intensité ionique totale sur la variabilité globale des données obtenues.

La Figure 42 présente les résultats de l'ACP réalisée sur les variables mesurées par les méthodes analytiques HILIC et C18. Les points représentant les différents échantillons biologiques ont été colorés en fonction de la somme des intensités pour l'ensemble des variables. On remarque une forte dispersion des points selon cette intensité ionique totale, en particulier pour les valeurs élevées (couleurs chaudes). Ces observations confirment l'influence majeure de l'intensité ionique totale sur la variabilité totale des données.



Figure 42. Graphiques des individus de l'ACP sur les données HILIC et C18 non normalisées. Les points représentant les échantillons sont colorés en fonction de leur intensité ionique totale.

1.5.3. Normalisation post-analytique PQN

Comme démontré dans le paragraphe précédent, l'intensité ionique totale contenue dans les échantillons, relative à leur contenu métabolique constitue une source de variation majeure des empreintes métabolomiques des échantillons biologiques analysés. L'application d'une normalisation post-analytique de l'intensité de l'ensemble des pics est donc indispensable pour ramener l'intensité ionique totale mesurée à une valeur stable pour l'ensemble des échantillons, afin de pouvoir étudier l'abondance relative des ions détectés.

Parmi les algorithmes de normalisation post-analytique existants, les principaux sont la normalisation par l'intensité ionique totale, et par le calcul d'un quotient de normalisation probabiliste (PQN, pour *Probabilistic Quotient Normalisation* ³²⁶). Dans une étude récente, les auteurs se sont employés à comparer l'influence des différentes méthodes de traitement des données sur les résultats des analyses statistiques de données HPLC-HRMS, et recommandent l'utilisation de cette seconde méthode de normalisation PQN ³¹³. La méthode consiste à comparer le spectre testé avec un spectre de référence, en tenant compte du fait qu'une modification de concentration d'un analyte seul n'influence qu'une partie du spectre, tandis qu'une modification de la concentration globale de l'échantillon influence l'ensemble du spectre. En résumé, les grandes étapes de l'algorithme PQN sont les suivantes ³²⁶ :

1. Normalisation par l'intensité totale ;

- Calcul du spectre de référence (idéalement, le spectre médian des échantillons de contrôle qualité QC) ;
- Pour chaque variable, et dans chaque spectre testé : calcul du quotient de dilution entre le spectre testé et le spectre de référence ;
- Pour chaque variable : calcul des médianes des quotients de dilution pour l'ensemble des spectres testés ;
- 5. Division de chaque variable du spectre testé par le quotient médian correspondant.

Nous avons donc appliqué cette normalisation PQN à l'ensemble de nos échantillons biologiques, en prenant pour référence le spectre médian des échantillons de contrôle qualité (QC). Il est à noter que cette méthode peut conduire à l'obtention de valeurs manquantes, dans le cas notamment de variables rarement représentées dans les échantillons, et ayant donc donné des intensités nulles lors de la mesure dans les échantillons QC. Ainsi cette étape de normalisation nous a conduits à exclure de l'analyse 5/1030 variables détectées sur HILIC, 19/2084 sur C18 (soit moins de 1 % des pics détectés).

La Figure 43 présente la somme des intensités ioniques normalisées par l'algorithme PQN pour chaque échantillon biologique. On remarque la présence d'un échantillon hors-norme sur les données C18+ : l'échantillon 2.3B.a_1 (premier réplicat de l'isolat tardif échantillonné chez le patient 2) donnant une intensité totale normalisée plus de 50 fois supérieure aux autres. Après élimination de cet échantillon, on observe que certains échantillons sortent légèrement des valeurs normales (notamment l'échantillon 67.3B_1 sur C18, et les trois réplicats de l'échantillon 52.2 sur les deux jeux de données). Néanmoins, la grande majorité des intensités totales normalisées PQN sont comprises dans l'intervalle réduit [1 ; 3], démontrant l'efficacité de l'algorithme de normalisation PQN.





Pour chaque isolat bactérien, les valeurs obtenues pour les trois réplicats biologiques sont présentées. 90 % des valeurs sont comprises entre les lignes pointillées noires.

1.6. ANNOTATION ET IDENTIFICATION DES METABOLITES

Les différents pics détectés lors des analyses HPLC-HRMS C18 et HILIC ont été annotés par comparaison des *m/z* ou des *m/z* et des *rt*, avec les bases de données publiques KEGG, HMDB, PAMDB et Metlin ^{315–317,321} ou privées du CEA Paris-Saclay ^{318,319}. Les pics annotés à l'aide des bases de données internes ont ensuite été vérifiés suivant deux critères : 1) nombre de scans par pic supérieur à 6 ; et 2) vérification de la présence de la molécule avec un ¹³C (soufre 34 ou Chlore 37 le cas échéant) au *delta* de masse attendu (ex : +1.0033 pour un ¹²C remplacé par un ¹³C). Le niveau de confiance de l'identification a été défini comme « standard » si basé uniquement sur les *m/z* (bases de données publiques) ou « haut » si basé sur *m/z* et *rt* (bases de données internes).

Il est à noter que ce premier niveau d'annotation peut conduire à l'identification répétée du même métabolite, par exemple si le pic correspondant a été détecté sur les deux analyses C18 et HILIC. Dans ce cas, et afin d'éviter les redondances dans le tableau final des métabolites identifiés, la liste des métabolites annotés a été curée sur la base de 1) le niveau de confiance de l'annotation ; 2) le temps de rétention (exclusion des métabolites non retenus sur la colonne) ; 3) la *p*-valeur du coefficient de corrélation de l'intensité du pic avec le facteur de dilution dans les échantillons QC dilués ; 4) intensité du pic. Si plusieurs métabolites candidats avaient été proposés lors de cette identification putative, nous avons conservé le nombre de variables correspondant au nombre de candidats. Cette analyse a donné lieu à l'annotation putative de 272 variables (160 sur HILIC et 112 sur C18), dont 132 avec un haut niveau de confiance.

1.7. IDENTIFICATION ET ELIMINATION DES ECHANTILLONS ABERRANTS

Les empreintes métabolomiques bactériennes peuvent être particulièrement sensibles aux conditions de culture et à l'intervention du manipulateur lors des différentes étapes de culture bactérienne, préparation des échantillons et analyse HPLC-HRMS. Ainsi, la recherche et l'élimination d'échantillons hors norme apparaît comme une bonne pratique, notamment si l'on dispose de plusieurs réplicats biologiques de chaque isolat.

Une première analyse HCPC sur chacun des jeux de données C18 et HILIC nous a permis d'identifier comme aberrants les échantillons dont les signatures métaboliques étaient très différentes de l'ensemble (Figure 44). Nous avons ainsi considéré comme *outliers* les échantillons isolés dans des groupes de taille inférieure ou égale à trois individus, sauf s'ils provenaient de la culture du même isolat bactérien (reproductibilité au sein des réplicats biologiques).

Cette analyse nous a permis d'identifier 6 échantillons hors norme sur les données HILIC, 3 échantillons sur C18. Parmi les valeurs aberrantes repérées sur les données HILIC, on note la présence des trois échantillons préalablement identifiés comme ayant un contenu métabolique anormalement faible, ainsi que l'échantillon 67.3B_1 sur les données C18, qui avait une intensité totale après normalisation particulièrement élevée (paragraphe 1.4.5, Figure 39). Les échantillons aberrants identifiés étant différents sur les deux jeux de données C18 et HILIC, nous pouvons supposer qu'il s'agit essentiellement d'*outliers* techniques. *A contrario*, on remarque que l'échantillon *2.3B.a_1*, qui avait déjà été identifié comme hors norme lors de l'analyse des intensités totales normalisées C18, est également identifié comme aberrant sur l'ACP des données HILIC. Cet échantillon étant retrouvé hors norme suivant les deux méthodes analytiques, nous pouvons supposer qu'il s'agit d'un *outlier* biologique, dû à un problème survenu lors de la culture ou des premières étapes de préparation.



Figure 44. Détection des échantillons aberrants par analyse HCPC sur les résultats d'une ACP sur les analyses C18 (A) et HILIC (B).

Les panels A) et B) présentent les dendrogrammes et les graphiques des individus et des groupes des résultats de l'analyse HCPC pour les données C18 et HILIC, respectivement, et les échantillons considérés comme hors norme ont été mis en évidence. L'ACP a été réalisée sur 2065 et 1025 variables pour C18 et HILIC, respectivement. La classification a été réalisée par agrégation complète sur les distances maximales, sans consolidation par les *k-means*, en constituant de 11 groupes sur 21 et 22 CP pour C18 et HILIC, respectivement.

1.8. BILAN DES DONNEES HPLC-HRMS ET DETERMINATION DES EMPREINTES METABOLIQUES DES ISOLATS CLINIQUES DE P. A.

A la suite des différentes étapes de traitement des données présentées dans ce chapitre, nous avons obtenu 2065 variables sur C18 (dont 112 annotées) et 1025 sur HILIC (160 annotées), soit un total de 3090 variables mesurées par HPLC-HRMS (272 annotées) (Figure 45 A).

Afin de déterminer les empreintes métaboliques de chaque isolat bactérien, nous avons calculé les spectres médians des réplicats biologiques après exclusion des échantillons aberrants repérés par analyse HCPC. Nous avons ainsi obtenu 66 spectres de référence correspondant chacun à un isolat de *P. a.* de la FCB. La Figure 45 B présente les distributions de l'ensemble des intensités ioniques médianes pour chaque variable et chaque isolat. On observe que les données obtenues par les deux méthodes analytiques suivent globalement une loi normale.





A) Nombre de variables détectées par chaque méthode analytique et nombre de variables annotées ;
B) Distribution des intensités normalisées PQN médianes des 66 isolats cliniques de *P. a.*, pour l'ensemble des variables (à gauche) et pour les variables annotées (à droite).

2. DETERMINATION DE PROFILS METABOLIQUES D'ISOLATS CLINIQUES DE P. A.

2.1. CONCORDANCE ENTRE LES PROFILS METABOLIQUES DES ISOLATS DETECTES PAR LES DIFFERENTES METHODES ANALYTIQUES

Une analyse HCPC a été conduite sur les spectres médians HILIC et C18 afin de définir des profils métaboliques similaires parmi les isolats cliniques de *P. a.*. Onze composantes principales ont été retenues pour la classification, expliquant 72 et 74 % de la variabilité des données HILIC et C18, respectivement. Trois groupes de profils métaboliques distincts ont pu être identifiés suite à l'analyse des données issues de chacune des deux méthodes analytiques (Figure S1, en Annexe 2). On observe une très bonne correspondance entre l'appartenance aux clusters métaboliques C18 et HILIC (*p-valeur* du test de Fisher < 2.10⁻¹⁶), confirmant la concordance entre les signatures métaboliques détectées par chacune des méthodes d'analyse.

2.2. DETERMINATION DES PROFILS METABOLIQUES DES ISOLATS DE P. A. PAR ANALYSE HCPC

2.2.1. Concordances de l'information apportée par les données HPLC-HRMS annotées et non annotées

Tenant compte de la concordance observée entre les profils métaboliques mesurés par les analyses HPLC-HRMS C18 et HILIC, nous avons défini les profils métaboliques des isolats *P. a.* par analyse HCPC conjointe sur les deux jeux de données obtenus. L'analyse HCPC effectuée se décompose comme suit : 1) AFM sur les 5 premières CP de chaque bloc de données HILIC et C18, permettant d'équilibrer l'influence de chaque bloc sur les CP finales ; 2) CAH par méthode d'agglomération Ward sur les distances euclidiennes ; et 3) stabilisation de la classification par partition par les *k-means*.

La Figure S2 (en Annexe 2) présente les résultats de cette analyse pour l'ensemble des 3090 variables C18 et HILIC (panel A) ainsi que pour le sous-ensemble des 272 variables annotées (panel B). Pour chaque analyse, 3 groupes d'isolats bactériens ayant des profils métaboliques similaires ont été constitués. L'appartenance aux groupes obtenus par l'analyse des données totales et du sous-ensemble de données annotées sont extrêmement concordantes (*p-valeur* du test de Fisher < 2.10⁻¹⁶). Ces observations indiquent que bien que le sous-ensemble des

données annotées représente moins de 10 % des variables initiales, l'information apportée par ces variables est représentative de l'ensemble. Nous avons donc choisi de concentrer notre étude sur l'analyse des groupes constitués par l'analyse de ces 272 métabolites annotés.

2.2.2. Détermination de trois métabotypes distincts chez des isolats cliniques de *P. a.* issus d'infections pulmonaires chroniques

Les résultats de l'analyse HCPC sur les 272 variables annotées sont présentés Figure 46. Comme indiqué précédemment, on observe la constitution de trois groupes d'isolats au sein desquels les empreintes métabolomiques HPLC-HRMS sont similaires. Les groupes 1 et 2 sont de taille comparable, avec respectivement 15 et 19 isolats, tandis que le groupe 3, plus important, compte 32 isolats de la FCB (Figure 46).

Le Tableau 8 présente la liste des 10 métabolites les plus significativement associés à l'appartenance à chacun des trois groupes. Afin de caractériser le métabolisme des isolats appartenant à chacun de ces groupes, nous avons recherché les principales caractéristiques et voies métaboliques associées à ces métabolites dans la base de données PAMDB spécifique à l'espèce *P. a.* ³¹⁷.

Parmi les plus discriminants, on compte notamment des métabolites associés à la synthèse des acides nucléiques et à la production énergétique (ribose, arabinose, adénine, adénosine, guanine, uracile, cytosine, AMP/dGMP, phosphate inorganique), dont les niveaux sont plus élevés dans les groupes 1 et 3, et moins élevés dans le groupe 2. Certains acides aminés permettent également de séparer les groupes, comme la méthionine et la glutamine, plus fortement exprimés dans les groupes 1 et 2, respectivement. Le 3-dehydro-shikimate, impliqué dans la biosynthèse de la phénylalanine, du tryptophane et de la tyrosine est quant à lui plus abondant dans le groupe 3, et moins abondant dans le groupe 2. Dans le groupe 3, on trouve également un niveau élevé de D-glyceraldehyde-3-phosphate, connu pour être un intermédiaire central de la glycolyse et de la néoglucogenèse, mais également de la biosynthèse du tryptophane. Le groupe 1 semble également caractérisé par une modification de la balance des précurseurs des phospholipides membranaires (phosphatidylglycérol PG, phosphatidylsérine PS, 1, 2-acyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol).

Également fortement discriminants, sont retrouvés la putrescine et la spermidine, et le gamma-glutamyl-L-putrescine, un acide aminé. La putrescine est connue pour être un précurseur de la biosynthèse de la spermidine. Ces deux métabolites sont des polyamines, connus pour participer à la réplication de l'ADN, l'expression génique et la synthèse protéique. Ils sont ainsi fréquemment associés aux protéines, phospholipides membranaires et protéines et peuvent agir comme des facteurs de croissance ^{337–339}. De manière intéressante, ces deux métabolites sont surexprimés dans le groupe 3, à l'instar des précurseurs des acides nucléiques adénosine et cytosine. A l'inverse, la spermidine est fortement sous-exprimée dans le groupe 2, tout comme les bases des acides nucléiques adénine, guanine, cytosine et uracile. De manière intéressante, on observe dans ce même groupe 2, une augmentation du gamma-glutamyl-L-putrescine, produit de dégradation de la putrescine.

En résumé, nous avons pu constituer trois groupes d'isolats cliniques de *P. a.* issus d'infections pulmonaires chroniques et présentant des signatures métaboliques distinctes. Le groupe 1, qui représente environ un quart des isolats de la banque, est essentiellement caractérisé par une modification de la balance des acides gras à chaînes courtes constitutifs de la membrane. Les groupes 2 et 3 se distinguent quant à eux par les niveaux des précurseurs de la synthèse d'acides aminés et nucléiques et des facteurs de croissance putrescine et spermidine. Ces métabolites sont présents à des niveaux élevés dans le groupe 3, qui représente près de la moitié des isolats de la banque. Dans le groupe 2 au contraire, ces métabolites sont à un niveau particulièrement bas, et on observe une accumulation de gamma-glutamyl-L-putrescine, produit de dégradation de la putrescine. **On pourrait ainsi supposer que ce groupe 2, qui représente environ un quart des isolats de la banque, se caractérise par un ralentissement des voies permettant la croissance bactérienne**. Cette hypothèse sera explorée en détail en Partie IV, où nous nous emploierons à intégrer les données métabolomiques obtenues dans ce chapitre avec les données phénotypiques et cliniques décrites Partie II.



Figure 46. Trois profils métaboliques distincts d'isolats cliniques de P. a. identifiés par analyse HPLC-HRMS.

Les groupes ont été constitués sur la base d'une analyse HCPC, comportant une étape d'AFM sur les deux blocs de données annotées C18 et HILIC, une étape de CAH puis une étape de partition par les *k-means*. A) Dendrogramme de la CAH (méthode d'agglomération Ward sur les distances euclidiennes des 5 premières CP de l'AFM) ; B) Représentation des trois clusters déterminés par l'analyse HCPC dans l'espace constitué par les 2 premières CP de l'AFM. *NB : L'analyse du dendrogramme et du gain d'inertie apporté par la constitution d'un groupe supplémentaire a permis de déterminer le nombre de groupes à identifier. Le dendrogramme présenté en A) ayant été réalisé avant l'étape de stabilisation de la classification par les k-means, la classification qu'il représente est légèrement différente de la classification finale présentée en B).*

Groupe	Variable	Métabolite correspondant tel que renseigné dans les bases de données (*)	Niveau	Analyse	Base de données ayant permis l'annotation
1	M482T326	1-Acyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (N-C16:1)/2-Acyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (N-C16:1)	Moins abondant	C18	PAMDB
	M615T347	PG(10:0(3-OH)/12:0(3-OH))/PG(12:0(3-OH)/10:0(3-OH))	Moins abondant	C18	PAMDB
	M569T340	Protoporphyrinogen IX	Moins abondant	C18	PAMDB
	M571T340	PG(10:0/10:0(3-OH))/PG(10:0(3-OH)/10:0)	Moins abondant	C18	PAMDB
	M680T357	PS(10:0(3-OH)/17:0cycw7c)/PS(12:0(3-OH)/15:0cyclo)/PS(15:0cyclo/12:0(3-OH))/PS(17:0cycw7c/10:0(3-OH))	Plus abondant	C18	PAMDB
	M148T242	L-Methionine	Plus abondant	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M97T432	Inorganic phosphate	Moins abondant	HILIC	PAMDB
	M361T357_2	Octadecanoyl-phosphate (n-C18:1)	Moins abondant	C18	PAMDB
	M149T242	Ribose/L-Arabinose/L-Ribose/beta-D-ribofuranose/beta-D-Ribopyranose	Plus abondant	HILIC	PAMDB
	M215T458	2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate	Plus abondant	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
2	M134T194	Adenine	Moins abondant	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M170T194	3-Dehydro-shikimate	Moins abondant	HILIC	PAMDB
	M150T334	Guanine	Moins abondant	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M111T172	uracil	Moins abondant	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M110T258	Cytosine	Moins abondant	HILIC	PAMDB
	M146T41_1	83_Spermidine_M+H_Mono_0.66_TRUE	Moins abondant	C18	Interne CEA - SPI
	M348T276	Adenosine monophosphate/2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	Moins abondant	C18	PAMDB
	M227T78	Myristic acid	Plus abondant	HILIC	PAMDB
	M145T474	D-Glutamine/L-Glutamine	Plus abondant	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M216T550	gamma-GlutamyI-L-putrescine	Plus abondant	HILIC	PAMDB
3	M97T432	Inorganic phosphate	Plus abondant	HILIC	PAMDB
	M170T194	3-Dehydro-shikimate	Plus abondant	HILIC	PAMDB
	M268T66	6_Adenosine_M+H_Mono_1.08_TRUE	Plus abondant	C18	Interne CEA - SPI
	M89T43	82_Putrescine_M+H_Mono_0.69_TRUE	Plus abondant	C18	Interne CEA - SPI
	M346T497	5'AMP/deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)*	Plus abondant	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M171T523	192_3-hydroxydecanoic-acid_M+H-H2O_Mono_8.7_TRUE/193_10-hydroxydecanoic- acid_M+H-H2O_Mono_7.29_TRUE	Plus abondant	C18	Interne CEA - SPI
	M171T41	D-Glyceraldehyde 3-phosphate/Dihydroxyacetone phosphate	Plus abondant	C18	PAMDB
	M153T523	685_a-Pinene-oxide_M+H_Mono_7.18_TRUE	Plus abondant	C18	Interne CEA - SPI
	M110T258	Cytosine	Plus abondant	HILIC	PAMDB
	M146T41_1	83_Spermidine_M+H_Mono_0.66_TRUE	Plus abondant	C18	Interne CEA - SPI

Tableau 8. Liste des 10 métabolites les plus significativement associés à l'appartenance aux trois métabotypes d'isolats cliniques de *P. a.* issus de colonisation chronique chez des patients adultes atteints de mucoviscidose

(*) Si l'annotation a donné lieu à plusieurs métabolites candidats pour la même variable, tous sont indiqués séparés par un /, tels que renseignés dans la base de données utilisée.

Notre analyse place la **voie de la putrescine** comme particulièrement discriminante des différents métabotypes identifiés. Il est intéressant de noter que des métabolites de cette voie ont déjà été identifiés comme importants dans la pathogénicité des infections pulmonaires à *P. a.* dans la mucoviscidose. Ainsi, Twomey et son équipe ont comparés les empreintes métabolomiques d'échantillons d'expectorations prélevés chez des patients atteints de mucoviscidose, pendant et en dehors des phases d'exacerbation. Ils ont ainsi mis en évidence une augmentation significative des taux de lactate, pyruvate et putrescine et une diminution du palmitate au cours des exacerbations, corrélée avec l'abondance des espèces *P. a.* et *Chrysiogenales* ¹⁴³. Un haut niveau de putrescine pourrait ainsi signer un emballement de la croissance bactérienne, notamment de *P. a.*, possible cause du déclenchement d'une dysbiose à l'origine de l'exacerbation.

En résumé, notre analyse HPLC-HRMS sur cultures bactériennes nous a permis de mettre en évidence **3 profils métaboliques distincts** au sein de notre banque d'isolats cliniques de *P. a.* responsables d'infections pulmonaires chroniques chez des patients atteints de mucoviscidose.

Par analogie avec les termes génotype et phénotype, l'appartenance des isolats à un des 3 profils métaboliques identifiés sera par la suite défini comme son **métabotype**.

Ces premières observations constituent une base solide de l'évolution adaptative du métabolisme de *P. a.* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose, ainsi que de l'importance clinique de l'infection. Ces aspects seront analysés en détail dans la Section 3.3. de ce chapitre ainsi que dans la Partie IV.

3. EVOLUTION ADAPTATIVE DU METABOLISME DE *P. A.* AU COURS DE LA COLONISATION PULMONAIRE CHRONIQUE

Tout comme dans le chapitre précédent, qui portait sur les phénotypes des isolats cliniques de la FCB, nous avons étudié l'évolution adaptative du métabolisme bactérien sous deux aspects. D'une part, nous avons étudié l'adaptation globale à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique, par la recherche de liens entre les profils métaboliques des isolats et la durée de la colonisation chronique des voies pulmonaires du patient par le clone au temps de prélèvement de l'isolat. En second lieu, nous avons exploré les adaptations métaboliques patient-spécifiques des clones, de par l'analyse des modifications des intensités des métabolites mesurés entre les isolats précoce et tardif d'un même clone, prélevés à différents moments de l'infection chronique chez le même patient.

3.1. ETUDE DE L'ASSOCIATION ENTRE METABOTYPES ET DUREE DE LA COLONISATION CHRONIQUE PAR P. A.

Nous n'observons aucune association entre le métabotype des isolats et leur statut « précoce » ou « tardif » défini par leur date de prélèvement depuis une expectoration du patient (p-valeur du test du $\chi^2 = 0,6$). Nous avons également testé l'association entre le métabotype bactérien et la durée écoulée entre le début de la colonisation chronique à *P. a.* chez le patient et le prélèvement de l'isolat, pour les 52 isolats pour lesquelles cette information était disponible (voir Partie II paragraphe 6.1.1, p. 139) et avons pu constater que le métabotype des isolats n'est pas associé à la durée de colonisation des poumons du patient par le clone (*p-valeur* du test de Kruskal-Wallis = 0,6). De même, des analyses supervisées de type régression PLS n'ont pas permis d'identifier un modèle convaincant de signature métabolique systématiquement modifiée avec la durée de l'infection.

Ces données suggèrent que l'évolution adaptative du métabolisme bactérien peut être différente entre les clones.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de modifications universelles du métabolome de *P. a.* survenues au cours des années d'infection chronique chez différents patients atteints de mucoviscidose.

Ces résultats suggèrent la coexistence de plusieurs voies d'adaptation intra-hôte possibles du métabolisme bactérien.

3.2. EVOLUTION INTRA-HOTE DES METABOTYPES DE CLONES DE P. A. RESPONSABLES DE COLONISATION PULMONAIRE CHRONIQUE

Afin d'analyser plus en détail les trajectoires adaptatives propres à chaque lignée évolutive nous avons étudié en détail les modifications métaboliques observées entre les isolats précoce et tardifs prélevés chez les 32 patients de la cohorte.

3.2.1. Modifications de métabotype entre les isolats précoce et tardif d'une même lignée clonale évolutive

La Figure 47 présente les associations entre les métabotypes des isolats précoce et tardif représentant différents stades évolutifs de chaque lignée clonale (Figure 47). Cette relation entre le métabotype de l'isolat précoce et celui du tardif d'une même lignée est à la limite de la significativité (*p*-valeur du test de Fisher = 0,052), certainement en raison du faible nombre de lignées évolutives représentées (n = 33).





A) Définition des métabotypes des isolats par analyse HCPC ; B) Représentation schématique d'une lignée clonale évolutive ; C) Représentation des trajectoires du métabotype des différentes lignées évolutives (en orange : nombre de lignées dont le métabotype reste stable entre les isolats précoce et tardif).

On observe que lorsque l'isolat d'une lignée appartient au métabotype 3, son descendant tardif aura tendance à conserver ce métabotype (dans 79 % des cas). A l'inverse, les métabotypes 1 et 2 paraissent plus instables, avec une proportion nettement plus importante

de lignées ayant modifié leur profil métabolique entre les isolats précoce et tardif (45 et 40 % de maintien du même métabotype lorsque l'isolat précoce appartient au groupe 1 et 2, respectivement).

Cette analyse suggère ainsi l'existence d'un métabotype persistant (le métabotype 3), avec 11 des 33 lignées de la FCB pour lesquelles les isolats précoce et tardif appartiennent tous deux à ce profil, contre 4 lignées pour lesquelles les isolats ont maintenu les métabotypes 1 et 2.

3.3. EVOLUTION INTRA-HOTE DES SIGNATURES METABOLOMIQUES DES CLONES ENTRE LES REPRESENTANTS PRECOCES ET TARDIFS DES LIGNEES CLONALES EVOLUTIVES DE P. A.

3.3.1. Calcul et distributions des degrés de Polarité métabolique

Pour étudier plus en détail les différences relatives de l'abondance des différents métabolites identifiés entre les isolats précoce et tardif de chaque lignée évolutive, nous avons calculé les degrés de *Polarité i,j*, pour chaque *lignée clonale évolutive i*, *intensité (normalisée PQN) du métabolite i* selon la formule suivante :

$$Polarité_{i,j} = \frac{Tardif_{i,j} - Précoce_{i,j}}{Tardif_{i,j} + Précoce_{i,j}};$$

Pour rappel, et comme indiqué dans la Partie III, l'interprétation des degrés de Polarité obtenus peut être formalisée comme suit :

- Si Polarité i, j = 0, le niveau du métabolite j n'est pas modifié chez la lignée i
- Si *Polarit*é *i i* > 0, le niveau du métabolite *j* est augmenté chez la *lignée i*

Si *Polarit*é *i*, *i* < 0, le niveau du métabolite *j* est diminué chez la *lignée i*.

La Figure 48 présente la distribution des degrés de Polarité obtenus pour les 272 métabolites annotés, pour chaque lignée évolutive infectant les patients de la cohorte. Cette distribution est pour chaque lignée centrée sur 0, et comprise dans l'intervalle [-1, 1]. On remarque cependant des différences non négligeables dans les profils de modifications métaboliques intra-hôte entre les différents patients. Pour exemple, cette distribution est normale et très fortement centrée sur 0 pour le patient 119, avec donc un grand nombre de métabolites bactériens dont l'intensité est restée globalement stable au cours de l'infection, et peu de métabolites qui ont vu leur intensité modifiée. A l'inverse, la proportion de métabolites fortement modifiés au cours de l'infection du patient 52 est importante, donnant ainsi une distribution beaucoup plus étalée des degrés de Polarité métaboliques.

Le calcul de la médiane des valeurs absolues des degrés de Polarité métabolique pour chaque patient permet de distinguer quantitativement les patients selon l'amplitude globale des modifications d'intensité des métabolites mesurés. Cet indicateur est compris entre 0,09 pour le patient 119 et 0,30 pour le patient 52 (1^{er} - 3^{ème} quartiles = 0,14 - 0,23 ; médiane = 0,18 ; moyenne = 0,19). Nous avons donc dans un premier temps réalisé une classification relative des lignées évolutives ayant subi des modifications importantes ou non des empreintes métaboliques entre les isolats précoce et tardif, par comparaison avec la médiane des valeurs absolues des degrés de Polarité métabolique (Figure 48).



Figure 48. Distribution des degrés de Polarité métabolomiques, représentatifs des modifications de l'intensité de 272 métabolites entre les isolats précoce et tardifs représentant l'évolution adaptative de 33 lignées clonales de *P. a.* responsables de la colonisation chronique chez des patients atteints de mucoviscidose.

Les distributions colorées en jaune représentent les lignées pour lesquelles les modifications métaboliques ont été les plus importantes.

3.3.2. Définition de trajectoires adaptatives intra-hôte distinctes du métabolisme de *P. a.* au cours des infections pulmonaires chroniques

Afin de définir les différentes trajectoires adaptatives intra-hôte du métabolisme des clones de *P. a.* survenue au cours de l'infection chronique chez les différents patients de la cohorte, nous avons réalisé une analyse HCPC sur les degrés de Polarité des 272 métabolites annotés. Comme précédemment, une analyse MFA a d'abord été réalisée sur les deux blocs de données correspondant aux analyses HILIC et C18, puis une CAH (agglomération Ward sur les distances euclidiennes) a été réalisée sur les 5 premières CP de la MFA (55 % de variabilité expliquée). La variance étant comparable entre les différentes variables de par la méthode de calcul des degrés de Polarité (toutes les valeurs sont comprises dans l'intervalle [-1, 1]), cette analyse a été réalisée sans standardisation des variances.

La Figure 49 présente les résultats de cette analyse. On observe la formation de 5 groupes de taille comparable (5 à 10 lignées clonales par groupe), représentant chacun une voie d'évolution intra-hôte particulière du métabolisme de *P. a.*. Par exemple, la trajectoire 2 est notamment caractérisée par une diminution des niveaux de pyocyanine et de quinolones (2-heptyl-4-quinolone et *Pseudomonas* Quinolone Signal, PQS), molécules particulièrement importantes dans la pathogénicité des infections à *P. a.* ^{186,232,340}. Les 10 métabolites les plus significativement associés à chaque voie évolutive sont présentés Tableau 9.

Nous avons pu mettre en évidence l'existence de plusieurs trajectoires adaptatives intra-hôte distinctes du métabolome de *P. a.* responsables d'infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose.

Ces résultats seront analysé en détail au regard des phénotypes bactériens et du statut clinique des patients infectés dans le chapitre suivant.



Figure 49. Identification de plusieurs voies d'adaptation intra-hôte distinctes de clones de *P. a.* responsables d'infection pulmonaire chronique chez des patients adultes atteints de mucoviscidose.

A) Dendrogramme de la CAH (méthode d'agglomération Ward sur les distances euclidiennes des 5 premières CP de l'AFM) ; B) Représentation des cinq clusters déterminés par l'analyse HCPC dans l'espace constitué par les 2 premières CP de l'AFM.

Tableau 9. Liste des 10 métabolites les plus fortement associés à l'appartenance aux différents groupes d'évolution métabolique intra-hôte de *P. a.* issus de la colonisation pulmonaire chronique chez des patients atteints de mucoviscidose

Groupe	Variable	Métabolite correspondant tel que renseigné dans les bases de données	Niveau	Analyse	Base de données ayant permis l'annotation
	M680T357	PS(10:0(3-OH)/17:0cycw7c)/PS(12:0(3- OH)/15:0cyclo)/PS(15:0cyclo/12:0(3- OH))/PS(17:0cycw7c/10:0(3-OH))	Augmenté	C18	PAMDB
	M346T497	5'AMP/deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)*	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	1001 606101	ODP-Glucose/ODP-galaciose	Diminue	HILIC	Interne CEA - Bacteriologie
1	M1711536_2		Diminue	HILIC	Interne CEA - Bacteriologie
	M1911642_2	Citric acid/DL-Isocitric acid	Diminue	HILIC	Interne CEA - Bacteriologie
	M403T608	UDP	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M611T626	811_L-Glutathione oxidized_M-H_Mono_10.49_TRUE	Diminué	HILIC	Interne CEA - SPI
	M613T62	Glutathione disulfide	Diminué	C18	PAMDB
	M175T50	N-Acetylornithine	Diminué	C18	PAMDB
	M288T71	Indoleglycerol phosphate	Diminué	C18	PAMDB
2	M258T83	2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone/Pseudomonas quinolone signal/2-Heptyl-4-quinolinol 1-oxide	Diminué	HILIC	PAMDB
	M260T531	791_Propranolol_M+H_Mono_7_TRUE	Diminué	C18	Interne CEA - SPI
	M288T600	1-Hydroxy-2-nonyl-4(1H)-quinolinone	Diminué	C18	PAMDB
	M136T167	1015_Salicylamide_M-H_Mono_2.1_TRUE	Diminué	HILIC	Interne CEA - SPI
	M138T329	2-Aminobenzoic acid/p-Aminobenzoic acid	Diminué	C18	PAMDB
	M214T502	Glycerylphosphorylethanolamine/sn-glycero-3- phosphoethanolamine	Diminué	HILIC	PAMDB
	M244T535	2-heptyl-4-quinolone	Diminué	C18	PAMDB
	M333T94	Hexadecanoyl-phosphate (n-C16:0)	Diminué	HILIC	PAMDB
	M259T574	745_Tetradecanedioic-acid_M+H_Mono_9.45_TRUE	Diminué	C18	Interne CEA - SPI
	M212T192	Pyocyanin	Diminué	C18	PAMDB
3	M482T326	1-Acyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (N-C16:1)/2-Acyl-sn- glycero-3-phosphoglycerol (N-C16:1)	Augmenté	C18	PAMDB
	M615T347	PG(10:0(3-OH)/12:0(3-OH))/PG(12:0(3-OH)/10:0(3-OH))	Augmenté	C18	PAMDB
	M133T572	L-Malic acid	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M138T110	4-Nitrophenol/Pimeloyl-[acyl-carrier protein]	Diminué	HILIC	PAMDB
	MOCOTEOO	GlcNAc-MurNAc-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-	Augmontó	C10	DAMDB
	10001 309	diaminopimelyl-D-alanine	Augmente	010	FAMDB
	M361T357_2	2 Octadecanoyl-phosphate (n-C18:1)	Augmenté	C18	PAMDB
	M844T498	PGP(16:1(9Z)/19:0)/PGP(17:0/18:1(11Z))/PGP(18:1(11Z)/17:0) /PGP(19:0/16:1(9Z))/PGP(16:0/19:0cycw8c)/PGP(16:0/19:1(9Z))/PGP(16:1(9Z)/19:0cycv8c/16:0)/PGP(19:1(9Z)/1 6:0)/PGP(19:iso/16:1(9Z))	Augmenté	C18	PAMDB
	M130T65	352_D-Pyroglutamic-acid_M+H_Mono_1.05_TRUE/575_N- Acetyl-L-aspartic-acid_M+H- HCOOH_Mono_0.95_TRUE/950_L-Pyroglutamic- acid_M+H_Mono_1.06_TRUE	Augmenté	C18	Interne CEA - SPI
	M150T334	Guanine	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M288T71	Indoleglycerol phosphate	Augmenté	C18	PAMDB
	M117T547	Methylmalonic acid / Succinic acid	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
4	M87T162	249_Isobutyric acid_M-H_Mono_2.72_TRUE	Augmenté	HILIC	Interne CEA - SPI
	M243T79	3-Hydroxymyristic acid	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M145T514	2-Aceto-2-hydroxy-butyrate/(R)-3-Hydroxy-3-methyl-2- oxopentanoate	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M88T454	Sarcosine	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M163T669	Molybdate	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M161T669	Phosphoroselenoic acid	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M213T499	2-Deoxyribofuranose 1-phosphate	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M173T644	262_Dehydroascorbic acid_M-H_Mono_9.55_TRUE/450_cis- Aconitic acid_M-H_Mono_10.72_TRUE	Augmenté	HILIC	Interne CEA - SPI
	M174T533	N-Acetyl-L-aspartic acid	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M139T631	Sulfoacetate	Augmenté	HILIC	PAMDB
5	M134T194	Adenine	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M230T133	N2-Succinyl-L-glutamic acid 5-semialdehyde	Diminué	HILIC	PAMDB
	M215T79	DL-beta-Hydroxylauric acid	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M110T258	Cytosine	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M321T484	Thymidine 5'-monophosphate (dTMP)*	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M426T542	ADP	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M442T648	Guanosine diphosphate	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M145T474	D-Glutamine/L-Glutamine	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M163T541	phenylpyruvate	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
				-	

CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons mis en place une démarche analytique minutieuse afin d'acquérir les empreintes métaboliques intracellulaires d'isolats cliniques de P. a. issus d'infections respiratoires chroniques par HPLC-HRMS. Nous avons notamment porté une attention particulière à la normalisation pré-analytique des échantillons bactériens, pour laquelle de nombreuses méthodes ont été décrites mais parviennent difficilement à des résultats optimaux ³³⁵. Nous recommandons en première intention une normalisation préanalytique par ajustement du volume de reprise des extraits métaboliques en fonction du nombre de bactéries plutôt que sur la quantité de matière présente dans l'échantillon. Dans notre étude, la normalisation pré-analytique par les CFU/DO s'est avérée très efficace, à l'exception des isolats pour lesquels la relation CFU/DO semble sous-estimée. Dans le cas d'espèces bactériennes ayant tendance à s'agréger en culture, il sera essentiel d'ajouter une étape de sonication au protocole de comptage des CFU/DO, afin de désolidariser efficacement les agrégats et de ne pas sous-estimer le résultat. Dans le cas où la normalisation préanalytique n'est pas optimale (différences non négligeables d'intensités ioniques totales mesurées dans les différents échantillons biologiques), nous recommandons l'application d'une normalisation post-analytique PQN, qui a déjà démontré des performances satisfaisantes ^{313,326}. Les conditions de culture bactérienne, de préparation des échantillons et le choix des méthodes analytiques appliquées ont été déterminés en se reposant sur des travaux antérieurs, avec l'objectif d'être le plus représentatif possible de l'état métabolique naturel du système étudié, et d'obtenir des données de la meilleure qualité possible 62,226,306,307,312,332

Une dernière étape indispensable du nettoyage des données est l'identification et l'élimination d'échantillons aberrants. En effet, non seulement l'objet étudié (les métabolites bactériens intracellulaires) mais aussi la méthode utilisée (HPLC-HRMS) sont particulièrement sensibles aux différents traitements effectués durant la préparation des échantillons. Nous conseillons ainsi, lorsque cela est possible, l'utilisation de réplicats biologiques indépendants qui permettent de confirmer ou non le statut aberrant des échantillons identifiés.

Suite à ces différentes étapes de traitement des données HPLC-HRMS, nous avons pu définir les empreintes métabolomiques des 66 isolats de la FCB. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence de 3 métabotypes, définissant des profils métaboliques distincts des isolats de notre banque. Ces métabotypes diffèrent notamment sur les niveaux des métabolites associés aux voies métaboliques de synthèse des acides nucléiques, des acides aminés et des phospholipides membranaires ; à la production énergétique et à la synthèse et dégradation des polyamines. Les implications phénotypiques et cliniques de ces différents profils métaboliques seront étudiées et discutées en détail dans le chapitre suivant.

En analysant l'évolution adaptative de ces métabotypes, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modifications universelles du métabolome bactérien avec la durée de l'infection. Ces résultats sont concordants avec les travaux antérieurs de Behrends et collègues, qui n'avaient mis en évidence aucun métabolite universellement modifié avec la durée de l'infection chez 179 souches cliniques de *P. a.* cultivées en milieu LB ⁸⁶. Nos données ne permettent donc pas de conclure à une évolution convergente du métabolisme de souches infectant chroniquement différents patients. Nous avons au contraire pu identifier plusieurs trajectoires distinctes de l'adaptation métabolique intra-hôte. L'impact des modifications intra-hôte des niveaux de métabolites exprimés par les lignées clonales de *P. a.* sur les modifications des phénotypes associés à l'évolution adaptative et à la pathogénicité de l'infection seront analysés plus en détail dans le chapitre suivant.

Il est à noter que les données obtenues ici permettent également d'établir un métabolome noyau, constitué des portions du métabolome restées constantes entre les isolats précoce et tardif de chaque lignée évolutive. Cette notion est similaire à celle du génome noyau déjà défini pour *P. a.*, mais sort du cadre de la présente étude ²³⁰. Ainsi, les données obtenues dans ce chapitre seront rendues disponibles à la communauté scientifique.

Les données de métabolomique acquises dans ce chapitre ont permis de définir les **métabotypes** et **profils d'évolution métabolique intra-hôte des clones**. Ils constituent une base solide pour l'analyse intégrative de l'évolution adaptative de *P. a.* présentée dans le chapitre suivant. Dans ce chapitre à venir, nous chercherons à identifier l'importance clinique des différents profils et trajectoires d'évolution métaboliques présentés ici.

PARTIE IV

INTEGRATION MULTI-ECHELLE DES DONNEES CLINIQUES, PHENOTYPIQUES ET METABOLOMIQUES D'UNE BANQUE DE LIGNEES CLONALES EVOLUTIVES DE *P. A.* RESPONSABLES D'INFECTIONS PULMONAIRE CHRONIQUE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

INTRODUCTION

Dans les parties précédentes, nous avons **constitué et caractérisé une banque de lignées clonales évolutives de** *P. a.* **responsables d'infections pulmonaires chroniques chez des patients atteints de mucoviscidose**. Les isolats précoce et tardif de chaque lignée clonale représentent différents stades de l'évolution adaptative du clone, prélevés à 1 à 5 ans d'intervalle (3,5 ans en moyenne). Chaque isolat bactérien a été caractérisé au plan **phénotypique** (notamment sur les axes de virulence et de résistance aux antibiotiques) et **métabolomique** (acquisition des empreintes métaboliques des cultures bactériennes par HPLC-HRMS non ciblée). Le statut **clinique** des patients infectés a quant à lui été caractérisé par la construction de 3 indicateurs de la santé respiratoire, basés sur l'étude de l'ensemble des mesures de VEMS (exprimées en *Z-score*) réalisés pendant la période de suivi.

Nous avons par ailleurs extrait les adaptations intra-hôtes de la bactérie, par la construction d'un indicateur permettant de détecter et quantifier les modifications phénotypiques et métabolomiques survenues entre les isolats précoce et tardif de chaque lignée. Cet indicateur, que nous avons nommé Degré de Polarité, a été calculé pour l'ensemble des phénotypes et des métabolites mesurés précédemment. Il nous a permis de décrire les trajectoires adaptatives des clones infectant chaque patient, sur chacun des plans étudiés (phénotypes et métabolisme), et au regard de l'atteinte respiratoire du patient.

Dans cette partie, nous chercherons à faire le lien entre les différents blocs de données présentés précédemment. Nous chercherons dans un premier temps à identifier des signatures métaboliques associées à certains profils phénotypiques, afin de **mettre en évidence d'éventuelles voies métaboliques impliquées dans l'expression de ces phénotypes**. Dans un second temps, nous nous concentrerons sur l'aspect évolutif et chercherons des corrélations entre les modifications intra-hôte des phénotypes bactériens et des signatures métaboliques des clones. De telles modifications mises en évidence sur des isolats de fond génétique similaire (même complexe clonal) pourraient permettre de mettre en évidence des **voies métaboliques associées à l'acquisition de phénotypes adaptés**, et soulever ainsi des hypothèses de recherche sur le ciblage de ces voies dans un objectif thérapeutique.

Le positionnement de la Partie IV dans le contexte général du travail de thèse est illustré dans l'Organigramme 5.



Organigramme 5 : Positionnement de la Partie IV (intégration multi-échelle des données cliniques, phénotypiques et métabolomiques) dans le contexte général de la thèse.

MATERIELS ET METHODES

L'ensemble des analyses statistiques présentées dans cette partie ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.3.3²⁵⁷. Les modèles HCPC non supervisés ont été construits et représentés graphiquement à l'aide des packages FactoMineR et factoextra ^{280,281}.

Les meilleurs modèles logistiques supervisés ont été choisis par sélection descendante pas à pas selon le critère d'AIC (*Akaike Information Criterion*). La totalité des combinaisons des métabolites sélectionnés ont été testées. Les interactions entre les métabolites dont la *p-valeur* du coefficient de corrélation de Pearson était < 0,15 ont également été incluses dans la sélection. Les différents modèles proposés ont été analysés, et les meilleurs ont été sélectionnés après validation interne. Les rapports de cote (*Odds Ratios,* OR) et leurs intervalles de confiance ont été calculés comme les exponentielles des paramètres du modèle. Les courbes ROC (*Receiver Operating Characteristic*), les aires sous la courbe (*Area Under the Curve,* AUC), et les meilleurs seuils pour la prédiction ont été calculées à l'aide du package pROC ³⁴¹.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La métabolomique est aujourd'hui considérée comme la fenêtre d'observation d'un organisme offrant la vision globale la plus proche du phénotype, en interaction avec son environnement ⁵². Nous avons donc recherché la présence d'associations entre les profils métaboliques des isolats bactériens (tels que définie dans la **Partie III**) et leurs phénotypes (définis dans la **Partie II**), ainsi qu'avec la santé respiratoire des patients infectés (telle que définie dans la **Partie II**).

L'organisation de cette analyse multi-échelle est représentée schématiquement Figure 50.

Dans un premier temps, nous avons recherché des associations entre l'appartenance des isolats à un certain métabotype et les phénotypes bactériens exprimés, ainsi qu'avec les indicateurs de santé pulmonaire des patients infectés (Figure 50, balises (1)). Cette première analyse avait pour objectif de rechercher d'éventuels **biomarqueurs** d'une infection particulièrement pathogène (*e. g.* par des clones de *P. a.* de virulence élevée, possiblement associés à une atteinte sévère des voies respiratoires).

Dans un second temps, nous avons étudié plus en détail les modifications intra-hôte des lignées clonales évolutives, survenues entre les isolats précoce et tardif prélevés chez un même patient (Figure 50, balises (2)). Cette seconde analyse avait pour objectif de mettre en évidence les **mécanismes** métaboliques impliqués dans l'apparition de phénotypes **patho-adaptatifs** (par exemple, identification de voies métaboliques impliquées dans le développement de résistances antibiotiques).

Enfin, il est à noter que les possibilités d'analyse des bases de données constituées dans les chapitres précédents sont multiples. Par manque de temps, nous avons ici concentré notre étude sur un nombre restreint de questions nous paraissant pertinentes. Afin de permettre la poursuite et l'exploitation du potentiel du travail effectué ici, nous rendrons la banque de souches ainsi que des bases de données cliniques, phénotypiques et métabolomiques accessibles à la communauté scientifique.



Figure 50. Représentation schématique de l'intégration multi-échelle des caractérisations phénotypiques, métabolomiques et cliniques d'une banque d'isolats cliniques de *P. a.* responsables d'infection pulmonaire chronique chez des patients atteints de mucoviscidose.

(1) La première partie de l'analyse a consisté à rechercher des associations entre les profils métaboliques des isolats, et avec l'expression de phénotypes bactériens d'intérêt clinique ainsi qu'avec les indicateurs de santé respiratoire du patient infecté. (2) La seconde partie de l'analyse a consisté à rechercher des signatures métaboliques de l'adaptation intra-hôte des lignées clonales évolutives, en étudiant les modifications métaboliques et phénotypiques survenues entre les isolats précoce et tardif prélevés chez un même patient.

1. RECHERCHE D'ASSOCIATIONS ENTRE METABOTYPES BACTERIENS, PHENOTYPES ET ATTEINTE RESPIRATOIRE DU PATIENT INFECTE

Cette première partie de l'analyse intégrative des données acquises dans les chapitres précédents a consisté à rechercher des associations entre les profils métaboliques des isolats et l'expression de phénotypes bactériens, ou encore avec le statut de la pathologie respiratoire du patient (Figure 50, balises (1)). A ce stade de l'analyse, la variable « patient » n'a pas été prise en compte, et l'ensemble des isolats de la banque ont été analysés simultanément.

1.1. Associations entre metabotypes bacteriens et sante respiratoire du patient infecte

Dans la Partie III, l'analyse des empreintes métaboliques des cultures bactériennes nous a permis d'identifier 3 métabotypes distincts caractérisant les isolats de la banque. Parmi les métabolites particulièrement discriminants de ces 3 profils, on trouvait notamment certains métabolites impliqués dans les voies de biosynthèse des acides aminés et nucléiques, ainsi que la **voie de la putrescine/spermidine**, des polyamines favorisant la croissance bactérienne ^{337–339,337}. Ces métabolites étaient fortement **surexprimés dans le métabotype 3**, et **sous-exprimés dans le métabotype 2**, dans lequel on observait en même temps une accumulation de produits de dégradation de la putrescine. Le métabotype 1 était quant à lui caractérisé essentiellement par une modification de la composition en acides gras membranaires.

Nous avons ici recherché la présence d'associations entre le métabotype des isolats bactériens de notre banque et le statut de la fonction pulmonaire des patients infectés, défini d'après les mesures de VEMS comme indiqué en Partie II. Pour ce faire, nous avons testé l'association entre les critères de niveau (haut/bas), stabilité (stable/instable) et déclin (déclin/non déclin) du VEMS et le métabotype des isolats infectants. La *p-valeur* des tests de Fisher est de 0,03, 0,08 et 0,17 pour les associations entre métabotype et stabilité, niveau et déclin du VEMS, respectivement.

Bien que non significatives, les associations avec le niveau et le déclin de la fonction respiratoire sont à noter. Ainsi, les isolats du métabotype 1 (modifications des acides gras membranaires) ont majoritairement été prélevés chez des patients ayant un VEMS bas (73 %),

stable (93 %) et non déclinant (100 %), caractéristique d'une pathologie respiratoire avancée. A l'inverse, le métabotype 2 est associé à une fonction pulmonaire relativement haute (63 %, contre 27 et 38 % pour les métabotypes 1 et 3), et ce malgré le fait que la plupart des isolats de ce groupe soient issus d'infections chroniques de plus de 10 ans. **Ces associations pourraient suggérer que l'infection chronique par des souches présentant ce métabotype 2** (caractérisé notamment par des niveaux bas de putrescine et spermidine) seraient moins délétères pour le patient, impactant moins sévèrement les voies respiratoires.

En revanche, le test de Fisher a révélé une association significative entre métabotype et stabilité du VEMS (*p*-valeur du test de Fisher = 0,03). Ainsi, la majorité des isolats prélevés chez des patients dont la fonction respiratoire est instable appartiennent au métabotype 3 (64 %). Une fonction pulmonaire hautement instable pourrait en outre être associée à un phénotype clinique d'« exacerbateur fréquent », particulièrement problématique pour le patient. On relève également une tendance à l'association entre ce métabotype et le déclin des fonctions respiratoires (7/10 isolats prélevés chez des patients « en déclin » sont dans le métabotype 3, *p*-valeur du test de Fisher = 0,17). **Ces observations suggèrent ainsi que les patients infectés par des souches de** *P. a.* présentant ce métabotype 3 (niveaux de spermidine et putrescine élevés) auraient plus de risques de présenter une pathologie respiratoire sévère (déclinante et instable). Par ailleurs, il est important de rappeler que lorsque l'isolat précoce d'une lignée évolutive appartient au métabotype 3, l'isolat tardif aussi (voir Partie III, section 3.2, p. 195). Ces résultats suggèrent que certains patients sont infectés de manière chronique par une lignée clonale présentant un métabotype associé à une pathogénicité importante, et que ce métabotype reste stable dans le temps.

De manière intéressante, le niveau de putrescine dans les voies respiratoires des patients a déjà été identifié comme significativement augmenté lors des périodes d'exacerbation dans les expectorations, et corrélé à l'abondance de *P. a.*. Dans notre étude, nous démontrons ainsi que l'augmentation du niveau de putrescine observée par Twomey et son équipe dans les expectorations des malades en lien avec l'exacerbation, est également retrouvée dans des cultures isolées de *P. a.* cultivées dans des conditions proches de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique ¹⁴³.

1.2. Associations entre metabotypes et phenotypes bacteriens

Nous avons ici testé les associations entre les métabotypes définis dans la Partie III et chacun des phénotypes bactériens mesurés dans la Partie II.

1.2.1. Associations entre métabotypes et phénotypes

En premier lieu, on observe une tendance forte à un ralentissement du temps de génération parmi les isolats du métabotype 2, avec un temps de génération moyen de 144 min, contre 133 et 115 min pour les métabotypes 1 et 3, respectivement (*p-valeur* du test de Kruskal-Wallis = 0,051). Il est intéressant de rappeler que ce métabotype 2 est caractérisé notamment par des bas niveaux de putrescine et spermidine, deux polyamines pouvant agir comme des facteurs de croissance ³³⁷. Nos données confirment donc un ralentissement de la croissance bactérienne associé à ce métabotype. Le ralentissement de la croissance bactérienne est par ailleurs considéré comme un marqueur de l'évolution adaptative de *P. a.* aux conditions pulmonaires mucoviscidosiques ²¹⁷. On remarque ainsi, 74 % des isolats du métabotype 2 sont issus d'infections pulmonaires de plus de 10 ans, contre 47 et 53 % pour les métabotypes 1 et 3, respectivement (test de Fisher significatif).

Néanmoins, nous n'observons aucune autre association significative entre le métabotype et les autres phénotypes de virulence ou de résistance aux antibiotiques mesurés dans la Partie II. La raison de cette absence d'association peut venir du fait que les phénotypes ont été rassemblés en classes (*e. g.* résistant/sensible, cytotoxique/non cytotoxique...), traduisant des profils tranchés, tandis que les métabotypes ont été définis sur les différences d'expression parfois subtiles de l'ensemble des métabolites. Nous avons donc fait l'hypothèse que pour expliquer ces grandes différences phénotypiques, il serait judicieux de concentrer notre analyse sur les métabolites présentant les plus grandes variations d'expression.

1.2.2. Sélection de métabolites pour l'identification de signatures métaboliques au plus proche des phénotypes

Une des caractéristiques des données -omiques, y compris métabolomiques, est le nombre particulièrement élevé de variables mesurées, souvent largement supérieur au nombre d'échantillons. La sélection des métabolites candidats d'intérêt par rapport à la question posée constitue donc une étape cruciale de l'analyse de données de métabolomiques acquises par spectrométrie de masse ²⁴⁸.

Nous avons donc procédé à une nouvelle classification métabolique des isolats, précédée cette fois-ci d'une étape de sélection des variables pertinentes. Afin de mettre en exergue des différences d'intensité en métabolites les plus marquées, qui pourraient se traduire par l'expression de phénotypes marqués, nous avons sélectionné les 151/272 métabolites dont le CV au sein de la banque était supérieur à 50 % (dont 58 détectés sur C18, 93 sur HILIC) (Figure 51 A).

Cette nouvelle classification donne à nouveau lieu à la constitution de 3 métabotypes, légèrement différents de ceux obtenus sur l'ensemble des métabolites (Figure 51 B et C). Les 10 métabolites les plus significativement associés à chaque métabotype sont indiqués Tableau 10. On observe que la voie de la **putrescine/spermidine** est encore une fois largement discriminante, avec ces deux métabolites significativement moins abondants dans le groupe 1 (39 % de la banque). Ces molécules sont par ailleurs connues pour être fréquemment associées aux acides nucléiques, et on constate également une diminution des précurseurs de synthèse des acides nucléiques dans ce groupe ^{338,342}. Parmi les différences des profils métaboliques les plus discriminantes entre les groupes, on trouve également des modifications des métabolites impliqués dans la synthèse et la dégradation de l'ornithine, qui est lui-même le principal précurseur de la putrescine. Le groupe 2 (35 % de la banque) est ainsi caractérisé par une augmentation de N2-succinylornithine, un catabolite de l'ornithine. Le groupe 3 (26 % de la banque) est quant à lui caractérisé par une augmentation de N-acetyl-L-ornithine (précurseur de l'ornithine) et une diminution de N2-succinylglutamatesemialdéhyde (catabolite du N2-succinylornithine) ^{343,344}. Les voies de synthèse des acides nucléiques sont également très discriminantes, avec des niveaux des précurseurs plus bas dans le groupe 1, et plus élevés dans les groupes 2 et 3.

Nous avons alors testé les associations entre ces nouveaux métabotypes et l'ensemble des phénotypes décrits dans la Partie II. Bien que les associations entre les métabotypes et les phénotypes de résistance aux 3 familles d'antibiotiques soient toujours non significatives, on observe cette fois-ci des associations significatives entre les métabotypes et la plupart des **phénotypes associés à la virulence**. Les phénotypes significativement associés à ces nouveaux métabotypes sont : la cytotoxicité sur J774 et A549, la mucoïdie, la production de pigments (tests de Fisher significatifs) et la vitesse de croissance (test de Kruskal-Wallis significatif), ainsi que le niveau de virulence global (isolats non virulents, de virulence modérée ou élevée comme défini dans la **Partie II**) (test de Fisher significatif).

Ainsi, les isolats du métabotype 1 ont tendance à être non virulents, mucoïdes et de croissance lente, les isolats du métabotype 2 à être de virulence nulle ou modérée et non mucoïdes, et les isolats du métabotype 3 de virulence élevée. En particulier, les isolats du métabotype 1 sont en majorité non cytotoxiques sur les 2 lignées cellulaires testées (à 65 et 62 % de non cytotoxiques pour A549 et J774, respectivement) ; les isolats du métabotype 2 sont en majorité non cytotoxiques sur A549 (83 % de non cytotoxiques), mais plus fréquemment cytotoxiques sur J774 (48 % de cytotoxiques) ; et les isolats du métabotype 3 sont en majorité cytotoxiques sur les 2 lignées cellulaires (59 et 76 % de cytotoxiques pour A549 et J774, respectivement) (tests de Fisher significatifs). Par ailleurs, les isolats du métabotype 2 et 24 % pour le métabotype 3.

En résumé, le **métabotype 3**, associé à une cytotoxicité accrue, est caractérisé entre autres par une augmentation du niveau de 1-hydroxy-2-nonyl-4(1H)-quinolinone, une molécule signal du q*uorum sensing* (QS) dérivée du *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS). Ces analogues du PQS sont associées à l'expression de nombreux facteurs de virulence chez *P. a.*, et sont connues pour être régulées négativement au cours de l'infection pulmonaire chronique ^{232,371,372}. A l'inverse, **le métabotype 1**, **caractérisé notamment par des niveaux bas de putrescine et spermidine et de précurseurs de synthèse des acides nucléiques, est donc associé à une virulence atténuée, une croissance ralentie, une augmentation des phénotypes mucoïdes et à une infection chronique plus ancienne, signatures de l'évolution adaptative au poumon mucoviscidosique.**


Figure 51. Trois profils métaboliques distincts d'isolats cliniques de P. a. identifiés par analyse HCPC sur une sélection de métabolites d'expression variable au sein de la banque.

A) Sélection des métabolites présentant des différences d'expression marquées au sein des isolats de la banque (153 métabolites ayant un CV > 50 % ; soit 55 % du total) ; B) Dendrogramme de la CAH (méthode d'agglomération Ward sur les distances euclidiennes des 5 premières CP de l'AFM (48 % de variabilité expliquée)) ; C) Représentation des trois clusters déterminés par l'analyse HCPC dans l'espace constitué par les 2 premières CP de l'AFM.

Base de données ayant Métabolite correspondant tel que renseigné dans les bases de données (*) Niveau Analyse Groupe Variable permis l'annotation M111T172 uracil Moins abondant HILIC PAMDB PAMDB 82 Putrescine M+H Mono 0.69 TRUE C18 M89T43 Moins abondant M346T497 5'AMP/deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)* Moins abondant HILIC Interne CEA - SPI 192 3-hydroxydecanoic-acid M+H-H2O Mono 8.7 TRUE/193 10-hydroxydecanoic-M171T523 Moins abondant C18 Interne CEA - SPI acid_M+H-H2O_Mono_7.29_TRUE UDP-Glucose/UDP-galactose M565T607 Moins abondant HILIC Interne CEA - Bactériologie 1 M153T523 685 a-Pinene-oxide M+H Mono 7.18 TRUE Moins abondant C18 PAMDB M110T258 Cytosine Moins abondant HILIC Interne CEA - SPI Interne CEA - SPI M146T41_1 83_Spermidine_M+H_Mono_0.66_TRUE Moins abondant C18 M426T542 ADP HILIC PAMDB Moins abondant M402T602 CDP Moins abondant HILIC Interne CEA - SPI M150T334 Guanine Plus abondant HILIC Interne CEA - Bactériologie Guanosine monophosphate/Cvclic pyranopterin monophosphate/8-oxodGMP/Melibiose/Cellobiose/D-Maltose/alpha-Plus abondant M364T67 C18 PAMDB Lactose/Sucrose/Trehalose/&alpha:,&alpha:-trehalose M258T563 Glucosamine 6-phosphate (/Galactosamine 6-phosphate)* Plus abondant HILIC Interne CEA - Bactériologie M606T570 UDP-N-acetylgalactosamine/UDP-N-acetylglucosamine Plus abondant HILIC Interne CEA - Bactériologie 2 M111T172 uracil HILIC Interne CEA - Bactériologie Plus abondant M215T79 DL-beta-Hvdroxvlauric acid HILIC Interne CEA - Bactériologie Plus abondant M153T523 685_a-Pinene-oxide_M+H_Mono_7.18_TRUE Plus abondant C18 Interne CEA - SPI 5 Guanosine M+H Mono 1.16 TRUE C18 Interne CEA - SPI M284T70 Plus abondant M110T258 Cytosine HILIC PAMDB Plus abondant M233T522 N2-Succinyl-L-ornithine/4-(Glutamylamino) butanoate Plus abondant C18 PAMDB M230T133 N2-Succinyl-L-glutamic acid 5-semialdehyde HILIC PAMDB Moins abondant M346T497 5'AMP/deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)* Plus abondant HILIC Interne CEA - Bactériologie M288T600 1-Hydroxy-2-nonyl-4(1H)-guinolinone Plus abondant C18 PAMDB M253T77 Palmitoleic acid Plus abondant HILIC PAMDB M267T77 Heptadecenoic acid Plus abondant HILIC PAMDB 3 M175T50 C18 PAMDB N-Acetylornithine Plus abondant M140T555 735_O-Phosphorylethanolamine _M-H_Mono_9.22_TRUE Plus abondant HILIC Interne CEA - SPI M214T502 Glycerylphosphorylethanolamine/sn-glycero-3-phosphoethanolamine HILIC PAMDB Plus abondant HILIC PAMDB M305T93 Tetradecanoyl-phosphate (n-C14:0) Plus abondant M288T71 C18 PAMDB Indoleglycerol phosphate Plus abondant

Tableau 10. Liste des 10 métabolites les plus fortement associés à l'appartenance aux trois métabotypes d'isolats cliniques de *P. a.* issus de colonisation chronique chez des patients adultes atteints de mucoviscidose

(*) Si l'annotation a donné lieu à plusieurs métabolites candidats pour la même variable, tous sont indiqués séparés par un /, tels que renseignés dans la base de données utilisée.

Pour affiner notre analyse, nous avons étudié en détail les niveaux des 2 métabolites putrescine et spermidine mesurés chez les isolats de la banque. Premièrement, nous observons que les niveaux de ces 2 métabolites sont parfaitement corrélés (*p-valeur* du test de corrélation de Pearson < 2.10⁻¹⁶), confirmant le lien entre la production de spermidine et le niveau de son précurseur putrescine, et donc l'augmentation du flux métabolique sur cette voie. Ensuite, nous avons testé les associations entre le niveau de chacun de ces métabolites et le niveau de virulence, la classe de vitesse de croissance et la cytotoxicité sur les deux lignées cellulaires testées (Figure 52).

On observe des tendances d'associations entre les niveaux de putrescine et spermidine et l'ensemble des phénotypes associés à la virulence, ces associations étant généralement plus fortes pour la spermidine. On observe notamment des tendances non significatives à l'augmentation du niveau de spermidine avec le niveau de virulence des isolats (*p-valeur* de l'ANOVA = 0,11), ainsi qu'avec le stress induit par l'infection sur A549 (*p-valeur* du test t de Student = 0,076). De manière significative, le niveau de spermidine est significativement plus élevé chez les isolats capable d'induire la mort de macrophages J774, et moins élevé chez les isolats présentant un phénotype mucoïde (tests *t* de Student significatifs). De plus, on trouve que les niveaux de ces 2 métabolites sont significativement augmentés chez les isolats de croissance rapide, confirmant leur rôle d'activateurs de la croissance bactérienne.

Pour rappel, la recherche ciblée de marqueurs génétiques de virulence connus par technique PCR sur les gènes *exoS*, *exoT* et *exoU* (les principales toxines du SST3) n'avait pas permis d'identifier de mécanismes expliquant la cytotoxicité ou la virulence chez les isolats de la banque, tandis que notre approche métabolomique non ciblée permet ici la mise en évidence de signatures associées à ces expressions phénotypiques.

Nos résultats viennent ainsi renforcer les travaux de Zhou et collègues, qui démontrent l'influence de la spermidine sur l'expression du SST3 et des exotoxines, ainsi que sur la cytotoxicité sur cellules épithéliales chez des souches de laboratoire de *P. a.* ³⁴⁵.



Figure 52. Associations entre les niveaux de putrescine et spermidine et l'expression de phénotypes de virulence par les isolats de la banque.

Nos observations démontrent que **la caractérisation d'isolats bactériens par métabolomique non ciblée hautement résolutive** vient efficacement compléter le panel d'outils existants pour l'identification de **mécanismes conduisant à l'expression de phénotypes cliniquement pertinents.** Elle permet ainsi d'établir de nouvelles hypothèses de recherche fondamentale sans *a priori*.

Mis ensemble, nos résultats nous ont permis de mettre en évidence qu'une diminution des niveaux de polyamines est associée à l'évolution adaptative vers des traits caractéristiques d'une colonisation chronique latente, moins délétère pour le patient. Ainsi, une diminution de la synthèse (ou une augmentation de la dégradation) des polyamines semble provoquer une diminution de la croissance bactérienne et de la synthèse des acides nucléiques. Ce ralentissement de croissance semble s'accompagner d'une diminution de la virulence bactérienne, et l'infection par des souches présentant ce métabolisme adapté est associée à une atteinte respiratoire moins sévère pour le patient. **Ces résultats suggèrent que des modifications des voies de synthèse des polyamines induisant une diminution des niveaux de putrescine et spermidine constituent une signature d'un métabolisme bactérien adapté à son hôte.**

2. ANALYSE DES MODIFICATIONS INTRA-HOTE DU METABOLISME BACTERIEN POUR LA RECHERCHE DE MECANISMES D'ACQUISITION DE PHENOTYPES D'INTERET CLINIQUE

Nous entrons ici dans la seconde partie de l'analyse multi-échelle des données métabolomiques, phénotypiques et cliniques décrivant la FCB. Dans ce chapitre, nous avons étudié en détail les modifications survenues au cours de l'évolution adaptative de chaque lignée clonale, entre les prélèvements précoce et tardif prélevés chez les patients (Figure 50, balises (2)).

2.1. PRINCIPE

Dans cette étude, les indicateurs de **Degré de Polarité**, représentant les modifications entre précoce et tardif pour l'ensemble des phénotypes et métabolites mesurés chez les bactéries de la banque, nous ont permis d'analyser ces paramètres de façon **appariée** sur chaque lignée clonale évolutive. Cet indicateur traduit en effet les différences d'expression entre isolats de fond génétique similaire (même complexe clonal), représentant différents stades de l'évolution adaptative des clones infectant les patients de la cohorte. Il permet ainsi d'écarter de l'analyse le "métabolome noyau" de chaque lignée clonale, qui reste inchangé au cours du temps, et de mettre l'accent sur les voies métaboliques ayant été modifiées au cours de l'infection chronique, pouvant expliquer les modifications phénotypiques survenues en parallèle.

Nous avons donc mis en place un flux d'analyse statistique pour étudier les **Degrés de Polarité**, *j* pour chaque **lignée évolutive**, **métabolite** et **phénotype**, de façon simultanée. En premier lieu, nous avons conduit une analyse statistique multi-échelles non supervisée, afin d'extraire les informations communes aux deux blocs de données métabolomiques et phénotypiques. Nous avons ensuite opéré une sélection de variables (métabolites et phénotypes) statistiquement associées selon cette première analyse non supervisée. Enfin, nous avons construit un modèle supervisé sur cette sélection de variables, afin de chercher à expliquer les modifications de phénotypes à partir des modifications de niveau de métabolites.

L'objectif de cette analyse multi-échelles sur les **Degrés de Polarité** est de soulever des hypothèses quant aux mécanismes sous-tendant l'évolution adaptative des phénotypes bactériens, par l'étude des signatures métabolomiques des souches. *P. a.* étant reconnu

comme un pathogène critique par l'OMS du fait de ses nombreux mécanismes de résistance innées et acquis aux antibiotiques, nous avons choisi de centrer notre analyse sur les métabolites associés à l'acquisition de phénotypes de résistance antibiotique au cours de l'infection chronique ¹⁷⁷.

2.2. Analyse non supervisee des degres de Polarite metabolomiques et de resistance aux antibiotiques

Nous avons construit un premier modèle HCPC non supervisé intégrant les blocs constitués par les degrés de Polarité de l'ensemble des métabolites et des phénotypes de résistance aux 14 antibiotiques testés. Ces valeurs de Polarité sont comprises entre -1 et 1 (variables quantitatives) pour chaque métabolite (voir les distributions présentées dans la **Figure 48**, **Partie III**), et ont été codées -1, 0 ou 1 (variables qualitatives) pour chaque antibiotique, selon si l'on a observé une perte, un maintien ou un gain de résistance (voir **Figure 30**, **Partie II**). Pour les mêmes raisons que celles évoquées dans la Partie précédente (voir **Partie III paragraphe 3.3.2**), les degrés de Polarité des métabolites n'ont pas été standardisés à variance constante au cours de l'analyse. L'AFM et la classification ont été réalisées sur les 4 premières CP de l'ACM sur les degrés de Polarité des phénotypes de résistance (61 % de variabilité expliquée pour ce bloc), et les 25 CP de l'ACP sur les degrés de Polarité métaboliques (95 % de variabilité expliquée pour ce bloc).

Ce modèle HCPC a conduit à la constitution de 3 groupes d'évolution intra-hôte du « métaborésistome » (groupe 1 : n = 10, groupe 2 : n = 19, groupe 3 : n = 4) de lignées évolutives présentant des caractéristiques similaires (Figure 53 A). Le **groupe 1** est significativement associé au **développement de la résistance** à 11/14 antibiotiques, le **groupe 2** au **maintien du phénotype initial (résistant ou sensible)** pour 12/14 antibiotiques, et le **groupe 3** à la **perte de la résistance** à 7/14 antibiotiques (tests du χ^2 significatifs). On remarque que les antibiotiques les plus associés à l'appartenance aux différents groupes sont les 9 antibiotiques de la famille des **Bêta-lactamines**, avec 9/9 associés à l'apparition de résistance dans le groupe 1, 9/9 au maintien de résistance dans le groupe 2, et 4/9 à la perte de résistance dans le groupe 3 (Figure 53 B). Les métabolites dont les modifications d'intensités sont significativement associées à l'appartenance à chaque groupe sont indiqués Tableau 11 (tests de l'ANOVA significatifs). On observe que les degrés de Polarité de 6 métabolites sont associés à a l'appartenance au groupe 1, 10 métabolites sont associés au groupe 2 et 13 métabolites au groupe 3. On note en particulier, les 6 métabolites significativement associés au gain de résistance : l'acide isobutyrique, l'acide 13(S)-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoique, le Methyl-4-hydroxyphenylacetate, l'acide 3-Methyl-2-oxovalérique/acide 2-Ketohexanoique, le L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate et l'acide diaminopimélique.



Figure 53. Identification de 3 voies d'adaptation intra-hôte des signatures métaboliques et des phénotypes de résistance antibiotiques au cours de l'infection pulmonaire chronique par *P. a.*.

Les groupes ont été constitués par analyse multi-échelle non ciblée (HCPC), permettant d'extraire l'information commune aux 2 blocs de données d'évolution intra-hôte (degrés de Polarité) de la résistance et des niveaux de métabolites. Les groupes ont été constitués par intégration des 4 premières CP du bloc « Résistance » et les 25 premières CP du bloc « Métabolites » (61 et 95 % de variabilité expliquée pour chaque bloc, respectivement). A) Représentation des groupes déterminés par l'analyse HCPC dans l'espace constitué par les 2 premières CP de l'AFM. B) Tableau présentant les modifications des profils de résistance significativement associés à chaque groupe.

Tableau 11. Liste des métabolites significativement associés aux voies d'adaptation intra-hôte des signatures métaboliques et des phénotypes de résistance antibiotiques présentés Figure 53

Groupe	Variable	Métabolite correspondant tel que renseigné dans les bases de données	Sens de la modification	Analyse	Base de données ayant permis l'annotation
1	M87T162	249_Isobutyric acid_M-H_Mono_2.72_TRUE	Diminué	HILIC	Interne CEA - SPI
	M295T78	360_13(S)-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoic acid_M-H_Mono_1.34_TRUE	Augmenté	HILIC	Interne CEA - SPI
	M167T624	311_Methyl-4-hydroxyphenylacetate_M+H_Mono_10.08_TRUE	Augmenté	C18	Interne CEA - SPI
	M129T98	3-Methyl-2-oxovaleric acid / 2-Ketohexanoic acid	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M389T577	L-Ala-D-Glu-meso-A2pm	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M191T54_2	Diaminopimelic acid/Meso-2,6-Diaminoheptanedioate	Diminué	C18	PAMDB
	M877T374	PGP(16:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	Diminué	C18	PAMDB
	M87T162	249_Isobutyric acid_M-H_Mono_2.72_TRUE	Augmenté	HILIC	Interne CEA - SPI
	M89T866	L-Lactic acid/D-Glyceraldehyde/D-Lactic acid	Diminué	HILIC	PAMDB
	M151T366	xanthine*	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
2	M193T94	326_Ferulic acid _M-H_Mono_2.59_TRUE/391_3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid (=Isoferulic acid)_M-H_Mono_2.42_TRUE	Augmenté	HILIC	Interne CEA - SPI
	M164T64	L-Glutamyl-tRNA(Glu)	Diminué	C18	PAMDB
	M129T98	3-Methyl-2-oxovaleric acid / 2-Ketohexanoic acid	Diminué	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M662T503	¤-Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD)	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
	M663T503	NAD	Augmenté	HILIC	PAMDB
	M389T577	L-Ala-D-Glu-meso-A2pm	Diminué	HILIC	PAMDB
	M504T384	pederin	Augmenté	C18	PAMDB
	M190T508	1-Nitronaphthalene-5,6-oxide/1-Nitronaphthalene-7,8-oxide	Diminué	C18	PAMDB
	M213T79	641_Tridecanoic acid_M-H_Mono_1.35_TRUE	Diminué	HILIC	Interne CEA - SPI
	M381T593	1-Tetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate/2-tetradec-7-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate	Diminué	C18	PAMDB
		1-Octadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate/2-octadec-11-enoyl-sn-glycerol 3-			
3	M437T593	phosphate/LPA(18:1(9Z)/0:0)/1-Acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (N-C12:0)/2- Acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (N-C12:0)	Diminué	C18	PAMDB
	M147T549	2-Aceto-2-hydroxy-butyrate/(R)-3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate	Diminué	C18	PAMDB
	M151T366	xanthine*	Augmenté	HILIC	Interne CEA - Bactériologie
		1-Octadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate/2-octadec-11-enoyl-sn-glycerol 3-			
	M435T76	phosphate/LPA(18:1(9Z)/0:0)/1-Acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (N-C12:0)/2- Acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (N-C12:0)	Diminué	HILIC	PAMDB
	M170T151	Pyridoxine	Diminué	C18	PAMDB
	M137T103	167_Salicylic acid_M-H_Mono_1.81_TRUE	Diminué	HILIC	Interne CEA - SPI
	M288T600	1-Hydroxy-2-nonyl-4(1H)-quinolinone	Augmenté	C18	PAMDB
	M323T84	pyochelin I/pyochelin II/pyochelin	Diminué	HILIC	PAMDB
	M227T403	Chorismate/Prephenate	Diminué	C18	PAMDB

2.3. RECHERCHE D'UN MODELE PREDICTIF DE L'ACQUISITION DE RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES

Tenant compte des résultats du modèle non supervisé présenté dans le paragraphe précédent, nous avons cherché à construire un modèle supervisé, prédictif de l'acquisition de résistance aux Bêta-lactamines, à partir des degrés de Polarité des 6 métabolites associés à l'appartenance au groupe 1.

2.3.1. Principe

Les modèles PLS-DA font partie des méthodes les plus fréquemment utilisés pour la classification à partir de données de métabolomique ²⁴⁹. Ils peuvent cependant être difficiles à interpréter et à valider, et ont une tendance intrinsèque au sur-ajustement ^{249,346}. De plus, les modèles PLS-DA sont peu adaptés lorsque les effectifs dans chaque classe de la variable à expliquer sont déséquilibrés, et des méthodes statistiques plus simples, associées à une sélection pertinente des variables explicatives, peuvent parfois s'avérer plus robustes ^{248,250}. Dans notre analyse, les effectifs de la variable à expliquer (acquisition ou non de la résistance aux Bêta-lactamines) sont déséquilibrés, avec 9 lignées clonales ayant acquis un phénotype résistant entre les isolats précoce et tardif, contre 24 ne l'ayant pas acquis. De plus, le nombre de variables explicatives sélectionnées est relativement faible (6), permettant ainsi l'utilisation d'un modèle plus classique de régression logistique.

La formule générique des modèles de régression logistique est de la forme :

$$\ln\left(\frac{P(X|Y)}{1-P(X|Y)}\right) = \beta_0 + \beta_1 * x_1 + \dots + \beta_k * x_k;$$

où **Y** est la variable à expliquer (ici, acquisition ou non de résistance aux Bêta-lactamines, codée 1 ou 0), β_0 correspond à l'ordonnée à l'origine, β_1, \dots, β_k sont les coefficients associés aux variables **1**, ..., **k** de la matrice explicative **X**. Le modèle retourne une valeur comprise entre 0 et 1, et la prédiction est ajustée à 0 ou 1 après comparaison avec une valeur seuil (ajustement à 1 si la valeur calculée par le modèle est supérieure au seuil, 0 sinon). La recherche du meilleur seuil pour la prédiction se fait par analyse de la courbe ROC.

2.3.2. Modèles logistiques prédictifs de l'acquisition de la résistance aux Bêta-lactamines

Nous avons donc cherché à construire un modèle de régression logistique afin de prédire l'existence ou non d'un gain de résistance aux Bêta-lactamines, à partir des degrés de Polarité d'un nombre minimum de métabolites parmi les 6 sélectionnés. La recherche des meilleurs modèles (*i. e.,* présentant le meilleur rapport information/complexité) a été effectuée par sélection descendante pas à pas sur le critère d'AIC.

Le Tableau 12 présente les coefficients et paramètres de validation des 3 meilleurs modèles sélectionnés.

Le modèle C, le plus complexe, prédit l'acquisition de résistance à partir des modifications des L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate, niveaux 3 métabolites 3-Methyl-2de : oxovalérique/acide 2-Ketohexanoique, et acide butyrique. Les OR supérieurs à 1 pour les 2 premiers métabolites indiquent qu'une augmentation de leur niveau entre les isolats précoce et tardif d'une même lignée est associée à un risque accru d'acquisition de résistance, tandis que l'OR inférieur à 1 de l'acide butyrique indique que c'est une diminution du niveau de ce métabolite qui a une valeur prédictive. Ce modèle est très sensible (89 %) et très spécifique (92 %). Cependant, les associations des variables explicatives au modèle sont inférieures au seuil de significativité, suggérant un possible manque de robustesse. Le modèle B, plus simple, prédit l'acquisition de résistance à partir d'une augmentation des niveaux de L-Ala-D-Glumeso-diaminopimelate et 3-Methyl-2-oxovalérique/acide 2-Ketohexanoique, avec une sensibilité de 67 % et une spécificité de 92 %. Le modèle A enfin, obtient un pouvoir prédictif similaire au B, à partir des modifications intra-hôte du niveau d'un seul métabolite : le L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate.

Ce dernier métabolite est d'un intérêt particulier, puisqu'il est connu pour être impliqué dans le recyclage du peptidoglycane, polymère constitutif de la paroi bactérienne. La synthèse du peptidoglycane (ou muréine) est la principale cible des antibiotiques de la famille des Bêtalactamines. Les voies de recyclage, qui peuvent compter pour 50 % de la synthèse muréique, peuvent constituer une voie alternative de production du peptidoglycane sans passer par les précurseurs de synthèse *de novo*, cibles de certains antibiotiques ^{347,348}. De plus, l'accumulation de certains muropeptides (notamment 1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate, ou AnhMurNAc-tripeptide) dans le cytoplasme induit la production de la bêta-lactamase AmpC, mécanisme de résistance aux céphalosporines et pénicillines le plus fréquent chez *P. a.* ^{349,350}. La voie de recyclage du peptidoglycane est ainsi un acteur majeur de la résistance aux Bêta-lactamines, et le ciblage de cette voie se révèle être une stratégie efficace pour restaurer la sensibilité de *P. a.* à ces antibiotiques ^{348,349}.

Nos observations suggèrent que l'accumulation intra-bactérienne du tripeptide L-Ala-D-Glumeso-diaminopimelate en particulier, pourrait constituer un marqueur d'acquisition de la résistance aux Bêta-lactamines par *P. a.* au cours de l'infection chronique du poumon mucoviscidosique. Cette augmentation de la résistance pourrait être due à une intensification de la voie de recyclage du peptidoglycane, ou à la surproduction constitutive de bêtalactamases. Il est à noter que nos mesures ont été réalisées en absence de pression antibiotique.

Nous avons également observé que seul, ce tripeptide permet la détection d'une acquisition de résistance hautement spécifique (92 %) mais peu sensible (67 %). Ce phénomène peut être dû au fait qu'il ne reflète qu'un mécanisme de résistance acquise parmi d'autres. On remarque ainsi une augmentation importante de sensibilité (89 %) lorsqu'on observe simultanément les modifications du niveau de ce tripeptide et de 2 autres métabolites : 3-Methyl-2-oxovalérique/acide 2-Ketohexanoique, et acide butyrique. La combinaison de ces 3 marqueurs pourrait ainsi permettre de capturer un panel plus large de mécanismes d'acquisition intra-hôte de la résistance aux antibiotiques. Des études complémentaires sont requises pour élucider les mécanismes sous-tendant ces modifications dans les niveaux de métabolites, et pour valider leur utilisation comme biomarqueurs de l'acquisition de résistance aux Bêta-lactamines, utilisables en clinique pour le choix des traitements les mieux adaptés.

Tableau 12. Résultats des modèles de régression logistique pour prédire l'acquisition de résistance aux Bêta-lactamines entre les isolats précoces et tardifs des lignées évolutives

	Modèle A			Modèle B			Modèle C		
Variable	β	OR	p-valeur	β	OR	p-valeur	β	OR	p-valeur
Constante (intersection)	-2,68	-	0,0066**	-3,49	-	0,016*	-10,07	-	0,135
L-Ala-D-Glu- meso-A2pm	4,02	55	0,0038**	5 ,17	1,75.10 ²	0,010*	11,31	8,16.10 ⁴	0,136
3-Methyl-2- oxovaleric acid / 2-Ketohexanoic acid				7,46	1,74.10 ³	0,060.	24,51	4,42.10 ¹⁰	0,118
Isobutyric acid							-24,76	1,77.10 ⁻¹¹	0,150
Diagnostic interne									
Sensibilité	0,67		0,67			0,89			
Spécificité	0,92		0,92			0,96			
AUC ROC	0,90		0,97			0,99			

AUC : Area Under the Curve ; β : coefficient ; OR : Odds Ratio ; ROC : Receiver Operating Characteristic. Significativité des *p*-valeurs : *p* < 0,01 : ** ; *p* < 0,05 : * ; *p* < 0,10 : ...

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Afin d'identifier les mécanismes patho-adaptatifs à l'origine du succès de la colonisation par *P. a.* des voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, nous avons analysé de manière intégrative les données cliniques, phénotypiques et biologiques collectées caractérisant notre banque de lignées clonales évolutives. Notre analyse a permis de mettre en évidence des voies métaboliques impliquées dans la patho-adaptation de *P. a.* au cours de l'infection chronique des voies pulmonaires mucoviscidosiques.

1. IMPLICATION DE LA VOIE DE LA PUTRESCINE DANS LA VIRULENCE ET L'ADAPTATION DE *P. A.* A SON HOTE

Nous avons mis en évidence l'implication de la voie des polyamines dans l'expression de phénotypes de virulence chez des isolats cliniques de *P. a.* issus d'infection chronique. Ces molécules sont retrouvées chez l'ensemble des organismes vivants, et participent notamment à la croissance cellulaire ^{337,338}. Les principales polyamines trouvées chez les bactéries sont la putrescine, la spermidine et la cadavérine, 3 métabolites qui semblent avoir des fonctions similaires ³³⁹.

Nos observations associent l'augmentation des niveaux de spermidine et putrescine avec l'expression de phénotypes de virulence bactérienne, et avec une instabilité importante de la fonction respiratoire, liée à la fréquence de survenue des exacerbations. Ces données sont en accord et viennent renforcer les résultats d'études antérieures. Ainsi, Zhou et son équipe avaient démontré l'implication de la spermidine dans l'expression de facteurs de virulence majeurs et la cytotoxicité sur cellules épithéliales de *P. a.* ³⁴⁵. Nos données viennent donc renforcer les résultats de cette étude menée sur des souches de laboratoire de *P. a.*, en confirmant l'implication des polyamines dans la virulence bactérienne chez des isolats cliniques, cultivés dans des conditions proches de celles rencontrées dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Par ailleurs, Twomey et collègues avaient mis en évidence une augmentation du niveau de putrescine dans les sécrétions bronchiques des patients au cours des crises exacerbatoires, corrélées à l'abondance de *P. a.* ¹⁴³. Nos observations confirment que cette augmentation de putrescine et instabilité de la fonction respiratoire dans nos

cultures pures d'isolats cliniques de *P. a.*. Mises ensemble, ces données suggèrent qu'une augmentation importante de la synthèse de polyamines par *P. a.* pourrait signer un emballement de la croissance bactérienne, associée à la survenue et à la fréquence des exacerbations.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que les isolats de *P. a.* produisant de hauts niveaux de polyamines sont associés à une infection particulièrement virulente. A l'inverse, nous avons mis en évidence que les patients infectés par des isolats non accumulateurs de putrescine ont une fonction respiratoire en moyenne plus élevée que les autres, malgré une date de début de colonisation ancienne, suggérant une pathogénicité moins importante de ces souches. Ces isolats sont également associés à une croissance bactérienne ralentie, et à une virulence diminuée. Ce type d'observation suggère une **adaptation bactérienne réussie**, tendant vers une relation proche-symbiotique entre *P. a.* et son hôte, beaucoup moins néfaste pour le patient ²¹². **Les isolats capables de dégrader efficacement la putrescine, ou d'orienter le catabolisme de l'ornithine vers d'autres voies non productrices de polyamines, semblent ainsi particulièrement adaptés aux voies pulmonaires mucoviscidosiques.**

De manière intéressante, des études récentes mettent en évidence l'implication de la voie de la putrescine dans le dialogue entre des bactéries du genre Pseudomonas et le système immunitaire de leur hôte. Notamment, Whiteson et collègues ont démontré que les surnageants de cultures d'isolats cliniques de P. a. produisant de hauts niveaux de putrescine mis au contact de cellules dendritiques humaines, induisent leur activation et notamment la production d'interleukine (IL)-12, conduisant à une polarisation de la réponse immune (lymphocytes T CD4) de type pro-inflammatoire. De manière importante, des résultats similaires ont été obtenus en répétant l'expérience avec la putrescine purifiée, confirmant le rôle de ce métabolite comme activateur de la réponse immunitaire de l'hôte, et donc ses propriétés pro-inflammatoires ³⁵¹. Venant conforter ce résultat, Liu et son équipe ont démontré chez la plante l'implication d'une putrescine aminotransférase, enzyme permettant la dégradation de la putrescine, dans l'évasion de Pseudomonas fluorescens, bactérie de la rhizosphère du système immunitaire de plantes ³⁵². L'échappement aux défenses de l'hôte est une signature importante de l'évolution adaptative de P. a. à l'environnement pulmonaire mucoviscidosique, et il serait d'un grand intérêt d'explorer l'implication de la voie de la putrescine dans ce processus.

Nous observons également que la grande majorité des isolats prélevés chez des patients présentant un déclin substantiel de leur fonction respiratoire produisent de hauts niveaux de polyamines. Cette relation reste non significative, en raison certainement du faible nombre de patients présentant les critères de déclin de la fonction respiratoire sur la période étudiée. Elle mérite cependant d'être soulignée, car le déclin de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose est connu pour être provoqué par une inflammation chronique non résolue, provoquant des dommages irréversibles aux tissus pulmonaires (fibrose). Ces dommages ont pour effet de réduire la clairance mucociliaire, favorisant la croissance des bactéries opportunistes comme *P. a.*, et ainsi la production de facteurs de virulence reconnus par le système immunitaire, entraînant l'exacerbation du cycle défaut immunitaire - infection - inflammation typique de la mucoviscidose ¹¹⁷. Compte tenu de l'implication potentielle de la putrescine produite par *P. a.* dans l'activation de la réponse immunitaire, des études plus poussées sont requises pour comprendre l'implication de cette voie dans le déclin progressif des fonctions respiratoires associé à la mucoviscidose.

Ainsi, évaluer l'impact de la voie de la putrescine sur la croissance et la virulence bactérienne, ou encore sur la polarisation de la réponse immune induite par *P. a.*, pourront constituer des pistes de recherche particulièrement pertinentes pour le développement de nouveaux traitements. Des travaux à venir consisteront ainsi à comparer au plan génomique les isolats présentant de hauts ou de bas niveaux de putrescine et spermidine, afin de mieux caractériser les mécanismes de régulation de cette voie qui paraît importante pour l'évolution adaptative de *P. a.*. La construction de mutants inactivés pour les gènes permettant la synthèse de la putrescine, notamment *speA* et *speC*³⁵³, chez les isolats cliniques producteurs de putrescine permettrait également d'explorer l'impact de cette voie sur les phénotypes de croissance, virulence et polarisation de la réponse immune mesurés *in vitro*.

Par ailleurs, la putrescine est un précurseur pour la production de succinate ³⁵⁴. Dans une étude récente, nous avons mis en évidence le succinate comme métabolite biomarqueur de l'infection pulmonaire aiguë à *P. a.* dans un modèle pré-clinique ⁷¹. Les différents mutants dans les voies de la putrescine pourraient ainsi être testés *in vivo*, dans ce modèle animal d'infection aigüe à *P. a.*, afin d'étudier l'impact de l'activation ou de l'inactivation de cette voie chez la bactérie sur les voies pulmonaires de l'hôte. Notre article concernant l'étude de

l'impact sur l'hôte de l'infection à *P. a.* dans un modèle murin d'infection aigüe par métabolomique non ciblée sur biopsies de poumons est présenté dans la Partie V.

Ces recherches pourraient à terme aboutir au développement de nouveaux traitements permettant de diminuer la charge et la virulence bactérienne, stimuler la réponse immunitaire et prévenir la survenue des exacerbations. De premiers résultats encourageants ont été obtenus récemment par Wang et son équipe, démontrant que l'utilisation d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la spermidine et la spermine, (une autre polyamine produite par les organismes eucaryotes), diminue la cytotoxicité de P. a. sur cellules A549 in vitro, ainsi que la mortalité induite par l'infection en modèle animal, en empêchant l'intégration des polyamines extracellulaires et en réduisant l'expression du SST3 ³⁵⁵. Ces premiers résultats obtenus à partir de souches de laboratoire demandent à être confirmés par l'utilisation d'isolats cliniques comme ceux de notre banque. Par ailleurs, les auteurs ont dans cette étude exploré l'impact des polyamines extracellulaires sur la virulence bactérienne. Nos résultats suggèrent qu'il serait pertinent d'explorer également l'effet de ce type de traitement sur l'action des polyamines intracellulaires produites de novo par P. a.. Enfin, notre modèle préclinique de mesure de l'impact de l'infection par métabolomique non ciblée sur poumons de souris apporterait des informations mécanistiques supplémentaires sur les retombées de l'infection *in vivo*⁷¹.

Les résultats de Wang et collègues constituent toutefois la preuve de concept de l'efficacité de traitements ciblant les polyamines pour réduire la pathogénicité de l'infection à *P. a.*. Ces recherches demandent donc à être poursuivies, car de telles découvertes pourraient constituer un espoir majeur pour les patients souffrant d'infections récalcitrantes à *P. a.*.

2. IMPLICATION DU RECYCLAGE DU PEPTIDOGLYCANE DANS L'ACQUISITION DE PHENOTYPES DE RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES

Notre stratégie de mesures appariées sur deux isolats précoce et tardif représentatifs de chaque lignée évolutive a également permis la mise en évidence de voies métaboliques importantes dans la mise en place d'adaptations phénotypiques bactériennes. En écartant de l'analyse le métabolome noyau associé à chaque clone, nous avons pu explorer les modifications métaboliques survenues au cours de l'infection, étudiées au regard des modifications phénotypiques concomitantes.

Nous avons pu ainsi mettre en évidence un ensemble de 6 métabolites associés à l'acquisition de résistances antibiotiques, dont 3 permettant la prédiction de l'**acquisition d'un phénotype résistant aux Bêta-lactamines**. En particulier, nous avons mesuré qu'une augmentation du niveau de L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate, tripeptide formé lors de la dégradation du peptidoglycane de la paroi et directement réutilisé dans le processus de recyclage ^{349,350}, constitue un biomarqueur potentiel de l'acquisition de la résistance aux Bêta-lactamines, antibiotiques qui ciblent la synthèse du peptidoglycane.

Dans une validation interne du modèle supervisé, ce biomarqueur seul s'est révélé faiblement sensible, mais hautement spécifique de la résistance acquise au cours de la colonisation de l'hôte. Nous avons également mis en évidence que l'association de ce métabolite avec le 3-Methyl-2-oxovalérique/acide 2-Ketohexanoique et l'acide butyrique permettait d'augmenter considérablement la sensibilité de la détection. Des recherches futures pourraient ainsi porter sur le potentiel de l'association de ces 3 métabolites comme biomarqueurs de l'acquisition intra-hôte de résistance aux Bêta-lactamines au cours des infections pulmonaires chroniques. Ces études pourraient par ailleurs inclure l'acide 13(S)-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoique, le Methyl-4-hydroxyphenylacetate et l'acide diaminopimélique, qui bien que non sélectionnés pour le modèle supervisé, présentent des associations significatives avec l'acquisition de la résistance à de nombreux antibiotiques.

A l'instar de la voie de la putrescine, la voie de recyclage du peptidoglycane est elle aussi associée à l'**échappement de la bactérie aux défenses de son hôte**. Ainsi, la reconnaissance des muropeptides bactériens induit une réponse immunitaire de l'hôte vertébré, et le recyclage de ces molécules permet de supprimer cette réponse ³⁵⁶. Récemment, le ciblage de

la voie de recyclage du peptidoglycane s'est révélé efficace pour restaurer la sensibilité aux antibiotiques, mais également pour potentialiser la réponse du système immunitaire inné et diminuer la virulence bactérienne *in vitro* ³⁵⁷. Nos observations viennent renforcer ces observations antérieures et démontrent l'implication de cette voie dans l'acquisition de la résistance aux Bêta-lactamines par *P. a. in vivo* chez son hôte. L'utilisation d'inhibiteurs du recyclage du peptidoglycane pourraient ainsi constituer une stratégie thérapeutique particulièrement intéressante dans le traitement des infections à *P. a.*, et constituent ainsi une piste de recherche prometteuse. Ils pourraient permettre de restaurer la sensibilité aux Bêta-lactamines, mais également dans une certaine mesure, de prévenir l'apparition de la résistance ; tout en potentialisant la réponse immunitaire et en diminuant la virulence bactérienne.

3. VERS LE DEVELOPPEMENT DE BIOMARQUEURS UTILISABLES EN CLINIQUE ?

Nos résultats soulèvent enfin l'hypothèse de l'utilisation des métabolites identifiés comme associés à la pathogénicité bactérienne ou à la résistance aux antibiotiques comme biomarqueurs utilisables en clinique. Ainsi, étudier la faisabilité et la pertinence de l'utilisation de la **putrescine**, **la spermidine et le succinate comme biomarqueurs prédictifs de l'exacerbation** ; ou des 6 métabolites **13(S)**-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoique, Methyl-4-hydroxyphenylacetate, acide diaminopimélique, 3-Methyl-2-oxovalérique/acide 2-Ketohexanoique, acide butyrique et L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelate comme biomarqueurs d'acquisition de la résistance aux Bêta-lactamines pourraient être d'un intérêt particulier pour améliorer la prise en charge des patients mucoviscidosiques infectés chroniquement à *P. a.*.

La validation de ces métabolites comme biomarqueurs pourra se faire par mesure ciblée de ces métabolites dans une collection indépendante prospective d'isolats cliniques cultivés dans des conditions similaires. Une autre question à adresser sera de déterminer si la détection de ces métabolites est possible directement dans les expectorations de patients mucoviscidosiques chroniquement infectés par *P. a.*. Pour ce faire, une étude prospective de caractérisation métabolomique et métagénomique de prélèvements longitudinaux d'échantillons d'expectorations est actuellement en cours au CHU Grenoble-Alpes.

234

En résumé, notre travail a permis la **mise en évidence de voies métaboliques probablement impliquées dans la patho-adaptation de** *P. a.* à **son hôte au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose**. Nos résultats sont renforcés par des études antérieures, qui confirment la plausibilité biologique des hypothèses soulevées.

Nous démontrons ainsi la **pertinence de l'étude intégrative de données métabolomiques, phénotypiques et cliniques,** pour étudier l'évolution adaptative bactérienne, mais aussi pour faire émerger de nouvelles pistes pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques et diagnostiques.

Nous rappelons ici que nos analyses statistiques ont été ciblées sur certaines questions clés. Le potentiel des informations collectées au cours de ce travail de thèse est encore important, et l'ensemble de ces données sera rendu disponible à la communauté scientifique.

$\mathsf{PARTIE}\,\mathsf{V}$

ETUDE PRECLINIQUE DE L'IMPACT DE L'INFECTION A *P. A.* SUR SON HOTE PAR METABOLOMIQUE NON CIBLEE (ARTICLE)

Venant compléter le travail présenté dans ce manuscrit, nous avons conduit une étude métabolomique préclinique visant à étudier l'impact de l'infection pulmonaire à *P. a.* sur son hôte. Cette seconde étude vient compléter nos recherches sur le dialogue et l'influence mutuelle entre *P. a.* et son hôte. En effet, dans ce travail de thèse, nous avons recherché les signatures métaboliques de l'adaptation de *P. a.* aux conditions pulmonaires mucoviscidosiques. Dans ce second travail, nous avons étudié l'impact de l'infection par *P. a.* sur la signature métabolique du poumon infecté, dans un modèle murin d'infection aiguë. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2018 dans le *Journal of Proteome Research* ⁷¹. Cette partie présente un résumé succinct de cette étude, ainsi que la publication dans son intégralité.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au potentiel de la métabolomique pour identifier l'atteinte respiratoire induite par l'infection par des souches de *P. a.* de différents niveaux de virulence et évaluer l'efficacité d'un nouveau candidat vaccin développé au laboratoire. Pour cela, nous avons mesuré par RMN du solide non ciblée (HRMAS NMR, pour *High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*) les empreintes métabolomiques de poumons de souris infectées ou non par différentes souches de *P. a.*, avec ou sans immunisation vaccinale préalable. Les résultats obtenus nous ont permis de construire un modèle multivarié OPLS-DA permettant de prédire le statut infecté ou non du poumon sur la base des empreintes métabolomiques mesurées, infectées ou non, ont des signatures métaboliques similaires à celles des poumons non infectés, démontrant respectivement l'efficacité et la sécurité d'utilisation du vaccin testé (Figure 54 B). De plus, nous avons pu trouver un gradient dans les modifications des métabolites les plus fortement discriminants du modèle, corrélé au niveau de virulence de la souche utilisée lors du challenge infectieux (Figure 54 C).



Figure 54. La métabolomique par RMN HRMAS révèle des modifications de la composition métabolomique des poumons de souris suite à l'infection par *P. a.* et permet d'évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement et de discriminer la sévérité de l'infection (adapté de ⁷¹).

A) Modèle OPLS-DA (CHA-PBS) permettant de discriminer les poumons infectés par une souche virulente (en rouge) et non infectés (en bleu). Les poumons infectés par une souche avirulente (en jaune) présentent des signatures métabolomiques intermédiaires. B) Projection des poumons de souris vaccinées dans le modèle CHA-PBS. Les poumons des souris vaccinées infectés (en bleu clair) et non infectés (en turquoise) ont des signatures métaboliques similaires à ceux des souris non infectées. C) Intensités relatives des 10 métabolites les plus prédictifs du modèle CHA-PBS dans les poumons des souris non infectées ou infectées avec une souche avirulente ou virulente (en bleu, jaune et rouge, respectivement).

PBS : contrôle négatif ; Δ BD : souche avirulente (SST3 négative) ; CHA : souche virulente (SST3 positive) ; KBMA (Killed But Metabolically Active) : immunisation vaccinale par une souche de P. a. morte mais métaboliquement active (candidat vaccin).

Afin de nous rapprocher des problématiques cliniques, nous avons également construit deux modèles logarithmiques permettant de prédire le statut infecté ou non, ainsi que la sévérité de l'infection. Le premier modèle obtenu permet de prédire le **statut infecté ou non** du poumon à partir du **niveau de succinate uniquement**, avec une sensibilité de 89 % et une spécificité de 95 %. Le second modèle permet quant à lui de prédire le statut d'infection sévère (définie comme l'infection par une souche virulente SST3 positive, comparativement à une souche SST3 négative) à partir du niveau de Leucine/Isoleucine seul, avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 95 %.

Ce travail démontre ainsi de manière originale l'intérêt de la métabolomique pour l'évaluation de nouveaux traitements de l'infection à *P. a.* et pour la découverte de biomarqueurs de sévérité de l'infection.

L'identification du succinate comme biomarqueur de l'infection à *P. a.* par des souches virulente est d'un intérêt particulier au regard des résultats obtenus sur notre banque d'isolats cliniques. En effet, la putrescine, identifiée comme impliquée dans la pathogénicité de *P. a.* lors de l'analyse des isolats de la banque, est un précurseur de synthèse du succinate ^{354,358}. Mieux comprendre l'implication de ces voies dans le dialogue entre la bactérie et son hôte apparaît donc comme une thématique de recherche pertinente.

Journal of **Droteome** Cite This: J. Proteome Res. 2018, 17, 3409–3417 • research

High-Resolution Magic Angle Spinning NMR-Based Metabolomics Revealing Metabolic Changes in Lung of Mice Infected with *P. aeruginosa* Consistent with the Degree of Disease Severity

Audrey LeGouëllec,*^{,†}[©] Oriane Moyne,[†] Elodie Meynet,[†] Bertrand Toussaint,[†] and Florence Fauvelle^{‡,§}

[†]Université Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC-IMAG, F38000 Grenoble, France [‡]GIN Inserm U1216 GIN Grenoble Institute Neurosciences, U1216 Inserm/UGA F-38000 Grenoble, France [§]MRI facility, IRMaGe, UGA/Inserm US17/CNRS UMS 3552/CHU, F-38000 Grenoble, France

S Supporting Information

ABSTRACT: *Pseudomonas aeruginosa* is a critical pathogen for human health, due to increased resistances to antibiotics and to nosocomial infections. There is an urgent need for tools allowing for better understanding mechanisms underlying the disease processes and for evaluating new therapeutic strategies with animal models. Here, we used a novel approach, applying high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy (HRMAS NMR) directly to lung biopsies of mice to better understand the impact of infection on the tissue at a molecular level. Mice were infected with two *P. aeruginosa* strains of different virulence levels. Statistical analysis applied to HRMAS NMR data allowed us to build a multivariate discriminant model to



distinguish the lungs' metabolic profiles of mice, infected or not. Moreover, a second model was built to appreciate the degree of severity of infection, demonstrating sufficient sensitivity of HRMAS NMR-based metabolomics to investigate this type of infection. The metabolic features that discriminate infection statuses are dominated by some key differentially expressed metabolites that are related, respectively, to bacterial carbon metabolism (glycerophosphocholine) and to septic hypoxic stress response of host (succinate). Finally, to get closer to clinical and diagnosis issues, we proposed to build simple logistic regression models to predict the infection status on the basis of only one metabolite intensity. Thus, we have demonstrated that succinate intensity could discriminate the infected/noninfected status infection with a sensibility of 89% and a specificity of 95%, and leucine/isoleucine intensity could predict the severe/not severe status of infection with a sensibility of 100% and a specificity of 95%. We also looked for the interest of this model in order to predict the efficacy of anti-*P. aeruginosa* treatment. By HRMAS metabolomics analysis of lungs infected with *P. aeruginosa* after vaccination, we demonstrated that this model could be a useful tool to predict the efficacy of new anti-*P. aeruginosa* drugs. This metabolomics approach could therefore be useful both for the definition of biomarkers of severity of infection and for an earlier characterization of therapeutic efficacy.

KEYWORDS: metabolomics, OPLS-DA, HRMAS, proton NMR, biomarkers, vaccine, infectious disease, Pseudomonas aeruginosa, pulmonary infection

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is considered one of the most publichealth-threatening bacteria.¹ This consideration is mainly due to its ubiquity and its intrinsic tolerance to almost all known antibiotics and to cause nosocomial infections (3rd agent responsible for 11% of nosocomial infections; French Institute for Public Health Surveillance (InVS 2012 report)). Hospitalized patients with resistant and multidrug-resistant *P. aeruginosa* infections appear to have increased all-cause mortality and hospital length of stay.² In particular, this pathogen causes pulmonary infections in patients suffering from bronchiectasis, chronic obstructive pulmonary disease, and cystic fibrosis (CF) and in critically ill patients in intensive care units.

Thanks to its large genome (6.3 Mb) and its genetic plasticity, *P. aeruginosa* could regulate the expression of mechanisms for antibiotic resistances and virulence factors, which enables it to escape the treatments and immune response. Among the many virulence factors of *P. aeruginosa*, type IV pili, flagella, and lectin,which are involved in adhesion, and several protein secretion systems such as Type 1 secretion system (secretion of AprA, etc.), Type 2 secretion system or T3SS (exotoxins S, T, Y, and U), and siderophores (pyochelin, pyoverdin, pyocyanin, etc.) are of importance for acute infections.³ The T3SS was

Received: May 3, 2018 **Published:** August 21, 2018

ACS Publications

Journal of Proteome Research

considered for a long time as the most significant virulence factor of *P. aeruginosa*, associated with poorer outcomes in acute infections⁴ and highly regulated by multiples mechanisms involving quorum sensing.⁵ The T3SS is like a molecular syringe composed of >20 proteins assembled together to allow the injection of toxins directly into the cytosol of cells thanks to the translocon (PopB and PopD).⁶ The pore-forming activity of the translocon has been associated with alteration of the host epigenome.⁷

Because of the high *P. aeruginosa* adaptability, there has been limited progress on the clinical development of new antibiotics with novel modes of action. However, insights have been made in development of new therapeutic strategies to manage *P. aeruginosa* infections,^{8–10} including the inhibition of quorum sensing, efflux pumps, and lectins and the use of iron chelators, bacteriophages, immunization, and immunotherapy.¹¹ Furthermore, an innovative and safe candidate vaccine based on a killed but metabolically active *P. aeruginosa* strain has been recently developed. This vaccine has the advantage to elicit not only broad humoral- but also cell-mediated immune responses.¹²

On the long road to new medicines for the well-being of patients, in many cases, trials on and with animals remain a unique source of in vivo information. The use of animal in acute toxicity tests to determine a median lethal dose (LD50) has always been a controversial procedure because it may involve an excessive suffering of animal. Usually treatment efficiency is evaluated by following the survival of animals, a very limited outcome. Hence, it is now a priority to develop a new standard tool to assess pathological mechanisms, severity of infection, and treatment efficiency for these infections.

Recent advances in metabolomics technologies are leading to a growing number of common biomedical applications. In particular, metabolomics is increasingly being used to diagnose disease, understand disease mechanisms, identify novel drug targets, customize drug treatments, and monitor therapeutic outcomes.¹³ Metabolomics refers to the exploration of all the metabolites detectable in a biological sample and provides "an instantaneous snapshot" of all cascades of molecular events. The data collected with high-resolution analytical methods, essentially NMR spectroscopy and mass spectrometry, are processed using a multivariate approach in order to build global metabolic profiles. NMR-based metabolomics is a very rapid and reproducible method particularly well-suited for clinical applications.¹⁴ In particular, HRMAS NMR-based metabolomics allows for analyzing intact small-size biopsies without any preparation and is then well-suited for preclinical and clinical applications by bypassing the extraction of metabolites, which requires several steps and the use of organic solvent, takes a lot of time, and can introduce bias.¹⁵

Metabolomics has been widely applied to lung pathologies. It has been used to better understand physiopathology of cystic fibrosis,¹⁶ as well as acute lung diseases like pneumonia and acute respiratory distress syndrome.¹⁷ Metabolomics was used in preclinical studies to evaluate the efficacy of a new anticancer drug.¹⁸ Recently, McClenathan and colleagues showed that serum metabolomics could be used to find biomarkers of adverse effects of vaccine.¹⁹ The progression of tuberculosis following bacterial infection has been evaluated in pig tissue from 15 to 60 days using HRMAS NMR-based metabolomics.^{20,21}

In this work our aim was (i) to build a robust multivariate statistical model based on HRMAS NMR spectra of *P. aeruginosa*-infected animals (CHA) compared to phosphate-

buffered saline instillation one (PBS group) and to extract the most discriminant metabolites; (ii) to evaluate if this method is sensitive enough to appreciate the degree of severity of infection, by using bacterial strains of different virulence levels; (iii) to evaluate if metabolomics can be used to predict the efficiency of a new therapy by using a candidate vaccine against *P. aeruginosa*; and (iv) to assess if we can identify a very small set of biomarkers among the most discriminant metabolites that could be measured in clinical care to support diagnosis and treatment decision making. We demonstrated the value of using HR MAS NMR-based metabolomics to evaluate the severity of infection and the efficacy of new anti *P. aeruginosa* treatment and finally as a new tool to identify new biomarkers of lung infection with *P. aeruginosa*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Seven-week-old female mice (C57Bl/6J from Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, France)) were infected with 5×10^6 bacteria, by intranasal instillation of 20 μ L in each nostril. The P. aeruginosa strains, named CHA^{22} and $CHA\Delta popBD^{23}$ (named Δ BD), were prepared as previously described in LB broth at 37 °C, 250 rpm, until exponential phase. Three groups of mice were infected either with PBS (sham group) or with CHA or Δ BD. For the immunization with KBMA vaccine, the immunization was performed as previously described.²⁴ Briefly, subcutaneous injection of 100 μ L of the vaccine preparation (killed but metabolically active *P. aeruginosa*) three times with escalating doses of 1×10^8 , 2×10^8 , and 2×10^8 bacteria were administered at 14-day intervals before the infectious challenge. All mice were euthanized between 15 and 18 h after infection with the strain CHA or Δ BD. Lung biopsies were harvested, placed in dry cryotubes, snap-frozen into liquid nitrogen, and then stored at -80 °C. The overall sample-collection procedure was standardized to be performed in <5 min after death. Each group was constituted of two different experiments. Animals were kept under specific pathogen-free conditions in the PHTA (Platform for High Technology for Animal Research) facility at the University of Grenoble Alpes (France), and experiments were performed in accordance with institutional and national guidelines. All efforts were made to minimize suffering to the animals. All mice were anesthetized (isoflurane) when necessary. A total of 72 mice was then used in this study, with the following repartition: PBS only, n = 24; Δ BD-infected, n =16; CHA-infected only, n = 20; KBMA-immunized and CHAinfected, n = 6; KBMA-immunized and PBS, n = 6.

Sample Preparation for Metabolomics

Dissected lungs were placed in dry cryotubes, snap-frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80 °C. The overall sample-collection procedure was standardized to be performed in <5 min after death. For HRMAS NMR, biopsies were sampled in frozen lung at -20 °C using a 2 mm biopsy punch and inserted in disposable inserts. Eight μ L of D₂O was added, the inset was sealed, and it was stored at -80 °C.

HRMAS NMR Spectroscopy

Data Acquisition. ¹H spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer (Bruker Biospin, Wissembourg, France) (IRMaGe facility and CEA-Grenoble, INAC-LRMN), using a ¹H-¹³C 4 mm HRMAS probehead (proton frequency 500.13 MHz). The samples were spun at 4 kHz and temperature was maintained at 4 °C for all experiments. A Carr–Purcell–



Figure 1. (A) HRMAS NMR spectra of intact lung biospies, of PBS- and CHA-infected mice. (B) Score plot of the CHA-PBS OPLS-DA model built with HRMAS NMR spectra of mice lungs. The CHA-infected mice (red) are clearly separated from the PBS one (blue). The model is well-fitted (R2Y = 0.98) and very robust (Q2 = 0.92). (C) 1D loadings plot of the model, drawn as S-line, showing metabolites that are increased (positive peaks) or decreased (negative peaks) in CHA-infected lung compared to PBS. The most discriminant metabolites that explain the clustering in (B) have high correlation coefficient (in orange). These metabolites are indicated on the plot. For assignment, see Supporting Information data. The *x* axis represents the NMR buckets in ppm and is not linear since becauseregions (represented by a double slash) have been excluded from the analysis: ethanol: (1.20–1.15) ppm, (3.69–3.63) ppm; PEG: (3.73–3.69) ppm; lipids: (1.40–1.23) ppm, (0.98–0.8) ppm. Gluc, glucose; Asc, ascorbate; GPC, glycerophosphocholine; Gly, glycine; Succ, succinate; bHB, beta-hydroxybutyrate; Val, valine; Leu/iso, leucine/isoleucine; Lac, lactate; Gsh, glutathione.

Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence synchronized with the spinning rate of 4 kHz (interpulse delay 250 μ s, total spin echo time 30 ms) and presaturation of residual water signal during 1.7 s, for a total acquisition time of 17 min, was used. The 90° pulse was calibrated on each sample. Metabolites were assigned using standard 2D experiments (¹H–¹H homonuclear total correlation spectroscopy and ¹H–¹³C heteronuclear single quantum coherence sequences), using standard human metabolome database (HMDB), and according to the literature. The assignments of observed resonances of detected metabolites are recapitulated in Table S1.

Data Processing. All NMR spectra were Fourier transformed, phased, and aligned on alanine 1.475 ppm (right peak of the doublet) with the Bruker software Topspin v3.2. Then they were preprocessed for multivariate statistics using the NMRprocflow open source software (http://nmrprocflow. org).²⁵ More precisely, after a global baseline correction, spectra were locally baseline corrected when necessary using the airPLS procedure²⁶ included in the software and realigned when needed, and then each spectrum between 4.7 and 0.8 ppm was uniformly segmented in 0.001 ppm size buckets, which were normalized to the sum of buckets. Ethanol detected at 1.19 and

3.65 ppm and polyethylene glycol (PEG) detected at 3.72 ppm were considered as exogenous compounds, probably coming more from pollution during surgery (alcohol) or decontamination (PEG) than from lung or *P. aeruginosa* metabolism. The corresponding spectral regions, i.e., (1.20-1.15) and (3.69-3.63) ppm for ethanol and (3.73-3.69) ppm for PEG, were then excluded from the study. Then, in order to focus our analysis on metabolites only, the most intense peaks of lipid chains, i.e., the (1.40-1.23) ppm region of methylene groups and the (0.98-0.8) ppm region of methyl groups, were excluded.

Data Analysis

The buckets were imported into the SIMCA v14 software (UmetricsAB, Sweden) for the multivariate statistical analysis. Each variable (bucket) was mean-centered and scaled to unit variance (i.e., weighted by 1/standard deviation). Unsupervised principal component analysis was first performed on this X variable matrix to visualize samples in a reduced dimensionality, find clusters, and identify outliers. Then supervised analyses were performed by applying orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) using the challenge, PBS or infected, as the Y response variable. The number of components was determined using the cross-validation procedure, which

Article



Figure 2. (A) Prediction of Δ BD classification using the CHA-PBS OPLS-DA. (B) Score plot of the Δ BD-PBS OPLS-DA. (C) Kruskal–Wallis ANOVA with PBS, CHA, and Δ BD data, followed by a Mann–Whitney pairwise comparison. For metabolite abbreviations, see Figure 1.

produces the R2Y and Q2 factors, indicators of the goodness of fit and of the predictability of the model. All model details are recapitulated in Table S2. Exclusion of six outliers was performed after examination of both the model residuals (DMOdX plot) and the spectral resolution, because, for these outlier spectra, a loss of resolution was observed that may be due to blood accumulation in the lung. DMOdX shows the distance of observations to the model plane and is proportional to the residual standard deviation of the X observation. Samples from immunization experiment were used to validate the CHA-PBS OPLS-DA model: both PBS, CHA, and CHA-immunized mice were then predicted using the CHA-PBS model. Δ BD samples were also predicted using the CHA-PBS model in order to evaluate if a gradient in infection severity can be highlighted using metabolomics.

The results were visualized by plotting the scores of individuals in a plan, allowing for showing how the model can separate the samples according to their group belonging. Loadings were also plotted in one dimension as S-line, which mimics a NMR spectrum, but with positive (negative) peaks representing metabolites that increase (or decrease) in infected lungs compared to PBS and with color of peaks representing how discriminant these metabolites are in the statistical model (correlation and covariance between the metabolite level and the model).

The amplitudes of the most discriminant metabolites (peaks or part of peaks with the smallest overlap possible with another compound; see Table S1) were submitted to univariate test using the Statistica software v10 (Statsoft, Tulsa, U.S.A.). A Kruskal–Wallis test was first performed for the comparison of the 3 groups PBS-CHA- Δ BD, followed by posthoc Mann–Whitney test for pairwise comparisons, with Bonferroni correction for multiple comparisons. The results were visualized by means and standard errors (Figure 2).

Biomarker Identification

To get closer to clinical issues, we built a binomial logistic regression model in order to predict the infected or uninfected status from a reduced number of measured metabolites. Similarly, a second model has been built in order to predict a severe/not severe infection (infection with the virulent CHA strain or not).

The input explanatory variables were the intensities of the 10 more discriminant metabolites according to the OPLS-DA PBS-CHA model and S-line analysis. The models were built on R software version 3.3.3 (R Core Team (2016); *R: A language and environment for statistical computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. URL: https://www.R-project. org). The two best models according to stepwise bottom-up selection and Akaike Information Criterion (AIC) were analyzed, and the best one was chosen after proper validation. Odds ratios and their confidence intervals have been calculated as exponential of each parameter of the model. Receiver operating characteristic (ROC) curve, area under the ROC

Article



Figure 3. Metabolomics is a powerful tool for evaluation of therapeutic efficiency. (A) Mice (n = 12) were immunized or not with KBMA *P. aeruginosa* vaccine (3 times with escalating dose) before challenge with the wild-type CHA strain or PBS. (B) Prediction of samples from mice immunized and challenged or not in the score plot of the CHA-PBS OPLS-DA model built previously. The immunized and challenged mice (KBMA-CHA, light blue points) are clearly separated from the nonimmunized and challenged mice (CHA, red points).

curve (AUC), and best threshold for prediction were calculated on the pROC R package.²⁷

RESULTS

Metabolic Signature of Lung Infected by P. aeruginosa

An untargeted ¹H NMR metabolomics study was conducted on uninfected and infected lungs of mice to investigate whether a distinct metabolic signature could be identified in infected ones (group CHA vs PBS). Two representative HRMAS NMR spectra of intact tissues from infected and not-infected lungs (normalized to total area) are shown in Figure 1A. We can observe the good resolution and signal-to-noise ratio obtained, allowing for searching for metabolic differences between CHA and PBS animal. The whole spectra were preprocessed and bucketed from 0.8 to 4.7 ppm, resulting in 2674 variables being detected. The intense lipid peaks were then excluded in order to focus on metabolites only, after verifying that exclusion did not modify the analysis (see Figure S3, PCA and OPLS DA including the lipids region). A PCA analysis (Figure S1) was performed prior to orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) modeling, and a clear classification between infected and not-infected lungs could be visualized. A supervised model (named CHA-PBS OPLS-DA model hereafter) was built with the normalized spectral data from 22 PBS and 12 CHA-infected lungs (Figure 1B). It is well-fitted (R2Y = (0.98) and very predictive (Q2 = 0.92). A permutation test allowed for validating the model (see Figure S2A). Moreover, this predictive capability was evaluated by predicting new samples (2 PBS and 2 CHA, one from the immunization experiment) without any prior knowledge. As seen in the score plot in Figure 2B, these new samples are well-classified in each of their groups.

The S-line, i.e., the 1D loadings reported to mimic a 1D NMR spectrum, was plotted in order to highlight in a single graph the metabolites that are increased or decreased in CHA-infected lung compared to PBS one, with a color code depending on the correlation between loadings and score. Thus, the most discriminant metabolites (in orange, Figure 1C) are the most important metabolites in the metabolic profile of the studied group. Assignment of ¹H NMR signals of tissue metabolites was

carried out using standard 2D experiments and human metabolome database. Twenty metabolites were unambiguously assigned (Table S1). We have found that glycerophosphocholine, succinate, beta-hydroxybyturate, valine, leucine/isoleucine, glycine, and ascorbate, and with less robustness lactate and glucose, were the most affected metabolites.

Metabolomics As an Innovative Method for Evaluation of the Virulence of *P. aeruginosa* Strains

To evaluate if the sensitivity of HRMAS NMR-based metabolomics is enough to appreciate the degree of severity of infection, the strain Δ BD, deleted from popB and popD genes, has been used for infection and HRMAS NMR spectra acquired with the same protocol as with CHA infection. As observed in Figure 2A, the prediction of Δ BD mice using the CHA-PBS OPLS-DA model shows that Δ BD is slightly different from the PBS ones. To emphasize this difference, we have performed an OPLS-DA with PBS and \triangle BD samples (Figure 2B), which led to a well-fitted and predictive model (R2Y = 0.95 and Q2 = 0.86, and Figure S2B for permutation test). Like in the PBS-CHA model, a decrease in the levels of GPC and glycine is wellcorrelated with the separation between Δ BD and PBS samples, while levels of succinate and lactate are increased (loadings not shown). All the metabolic variations are recapitulated in Figure 2C, with significance indicated resulting from univariate statistics. We can observe that glucose, ascorbate, glutathione, beta-hydroxybutyrate, valine, and leucine/isoleucine are significantly modified only in CHA compared to PBS, while amplitude of lactate, succinate, glycine, and glycerophosphocholine is gradually modified with the strain virulence. This indicates that ΔBD lungs have a metabolic profile closer to PBS than to CHA ones. This modulation of metabolite perturbation in ΔBD and CHA mice compared to PBS ones is clearly visible on the score plot of the CHA-PBS OPLS-DA (Figure 2A).

Metabolomics As an Innovative Method for Evaluation of the Efficacy of Treatment Against *P. aeruginosa*

The vaccine "killed but metabolically active" (KBMA) *P. aeruginosa* has been recently demonstrated as a safe and efficient vaccine in an acute model of *P. aeruginosa* pulmonary infection. In the previous work, we analyzed the efficiency through animal

Table 1. Results for	Simple Logistic	Regression Models	to Predict (A) Infection or (E	Severity of Infection
	1 0	0		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · ·

				OR		ROC curve	
model	dependent variable	term	β estimate	estimate	<i>p</i> -value	AUC	best threshold
А	infection ^a	intercept (β 0)	-5.275	5.12e-03	0.0017 ^b	0.9675	0.50
		Succ $(\beta 1)$	8.025	3.06e+03	0.0035 ^b		
В	severe infection ^b	intercept (β 0)	-9.561	7.04e-05	0.0027 ^b	0.9868	0.16
		Leu.Iso $(\beta 1)$	13.022	4.52e+05	0.0034 ^b		
a		1 . 1 . 1 . 1			$(\mathbf{p}\mathbf{p}\mathbf{q})$ he		(, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,

^aStatus infected = 1 (mice challenged with either ΔBD or CHA strains) versus uninfected = 0 (PBS). ^bStatus severe infection (mice challenged with CHA strain) versus no severe infection (mice challenged with ΔBD strain or PBS controls).

survival and Kaplan-Meier curves according to the following protocol of vaccination (Figure 3A). Briefly, mice were immunized or not, 3 times with escalating dose before the challenge with either a lethal dose of the wild-type strain CHA or a PBS negative control. We observed a substantial increase of CHA-infected mice survival following KBMA immunization.² To see if metabolomics could be a new useful tool for evaluation of new therapeutics against P. aeruginosa, we applied our previously described protocol of HRMAS NMR on lung biopsy protocol to a group of mice KBMA-immunized and CHA- or PBS-challenged. Then we graphically projected the acquired data in the previously built CHA-PBS OPLS-DA model to see the influence of immunization on molecular signature of mice's lungs (Figure 3B). Finally, we used the CHA-PBS OPLS-DA model to predict the infected or uninfected classification of KBMA-immunized mice. Interestingly, we noticed that, when mice were KBMA-immunized, they projected close to notimmunized and not-challenged mice (PBS), and this observation is valid for both immunized and not challenged (KBMA-PBS) and immunized and infected (KBMA-CHA) mice (Figure 3B).

Identification of Biomarkers Associated with *P. aeruginosa* Infection

Univariate statistics have been performed to compare CHA, Δ BD, and PBS groups. As observed in Figure 2C, glycerophosphocholine, glycine, glutathione, and ascorbate were significantly decreased while glucose, succinate, valine, and leucine/isoleucine were significantly increased in CHA group compared to PBS one. Lactate was significantly modified mainly in Δ BD compared to PBS, and the increase of lactate in CHA group was not homogeneous and led to nonsignificant statistics. All these data clearly confirmed that CHA animals have a strong metabolic disruption following *P. aeruginosa* infection and that this metabolic profile is differentially affected according to the severity of infection.

On the basis of intensities of the most discriminant metabolites of the OLPS-DA model, we built two simple binomial logistic regressions. The generic equation of both models is of the following form,

$$\log \frac{p(x)}{1 - p(x)} = \beta_0 + \beta_1 \times x$$

where x is the explanatory variable and β_0 and β_1 are the parameters associated with the intercept and the explanatory variable, respectively.

The models return a value between 0 and 1, and the best threshold to adjust the prediction to 0 or 1 has been calculated on the basis of the ROC curve. If the model returns a value greater than or equal to the threshold, the prediction is adjusted to 1 (which corresponds to infected in model A, no severe infection in model B), and it is adjusted to 0 if not. Model parameters for both models are given in Table 1.

Model A predicted the infected or uninfected status according to succinate intensity with a sensibility of 89% and a specificity of 95%. Model B predicted the status of severe infection or no severe infection according to leucine/isoleucine intensity with a sensibility of 100% and a specificity of 95%.

DISCUSSION

Metabolomics on mice lung biopsies infected with P. aeruginosa enables the identification of disease biomarkers in the form of endogenous metabolites (host-derived metabolites) and exogenous metabolites (bacterial-derived metabolites). It also provides unique insights into the fundamental consequences of the disease and aids the design or development of new treatments. In this study, the metabolic fingerprints of mice lungs could be acquired easily and quickly (only a few minutes per sample) with a relatively good sensitivity by HRMAS NMR method. No preparation was performed prior to metabolomics analysis, neither perfusion of lung with serum to remove blood nor fluid from the organ, nor washing the organ with deuterated water to replace water proton. This ensures the metabolic profiles recorded are the most representative of in vivo conditions and that less metabolites are lost during samplepreparation procedures. Moreover, this technology applied to mice infection model could help to minimize the animal suffering as we euthanized mice at 15 h after the infection challenge, before severe clinical symptoms were observed. Here, we built an OPLS-DA "P. aeruginosa CHA vs PBS" model with data extracted from HRMAS NMR spectra, and we have shown its good fitness (R2Y = 0.98) and its very high predictive power (Q2 = 0.92). Moreover, we have shown that, depending on the P. aeruginosa strain used (more or less virulent), we got a different lung metabolic fingerprint. The ΔBD strain, deleted from the translocon of the Type 3 secretion system, is already known to be more virulent and less cytotoxic than the wild-type. Here, we observed that spectra of lung from mice infected with this strain are distinct from the PBS- and CHA-infected ones in the model. Hence, the model allowed for observing the severity of the infection. Furthermore, mice with previous immunization with an efficient vaccine (considered resistant to the infection) have lung profiles similar to the noninfected ones (PBS). These results are of importance for two reasons: (i) it shows that there were no major modification of lung molecular contents following immunization; and (ii) immunized mice that were challenged with the virulent CHA strain were effectively resistant to the infection, as the metabolomics fingerprint of their lungs is similar to uninfected ones. These data confirm the benefit of this model to predict the efficiency of a prophylactic anti-P. aeruginosa treatment. Hence, this type of untargeted metabolomics-based model could efficiently replace classical survival assays to determine the virulence of a clinical strain of *P*.

aeruginosa and/or its mutants, as well as the efficacy of a new treatment against *P. aeruginosa* in an animal model.

In this work, we have found that glycerophosphocholine, succinate, beta-hydroxybutyrate, valine, leucine/isoleucine, glycine, ascorbate, and glucose, and with less robustness lactate, were the most affected metabolites when mice are infected with P. aeruginosa. In detail, we have shown in this study that metabolites implicated in energy metabolism:, glucose, lactate, succinate, and beta-hydroxybutyrate, are increased in infected lungs, while metabolites linked to oxidative stress, ascorbate and glutathione, are decreased. Glycine is largely decreased in lung tissue infected with the CHA strain. Going further, we demonstrated that the concentration of glycerophosphocholine in the lungs decreases markedly when the severity of the infection increases. Pulmonary surfactant is a complex mixture of phospholipids, neutral lipids, and specific proteins that is essential for lung function because it reduces surface tension at the air-liquid interface of alveolar spaces. The main phospholipids are phosphatidylcholines. P. aeruginosa has the capacity to grow at high cell density in the pulmonary environment, in particular by its ability to use as a carbon source the various degradation products of phosphatidylcholines: long-chain fatty acid, glycerol, and choline via the secretion of phospholipase C and lipases.²⁸ Blocking the use of phosphatidylcholines by P. aeruginosa by inactivation of the genes involved in the catabolism of these products showed a lower virulence of bacteria in a model of lung infection in mice.² The major differences in pulmonary surfactant composition between rodents and humans have been recently measured using ¹H NMR. It appears that glycerophosphocholine is present in significant quantities in rodents but in much smaller quantities in humans.³⁰ Bacterial enzymes in lung infection of mice can therefore also use GPC as a substrate, and it is therefore perfectly logical to observe, as we do in this work, a decrease in GPC concentration during P. aeruginosa infection. In this sense, our study is remarkable because it demonstrates for the first time the use in vivo of this phosphatidylcholine pathway by the bacterium. In addition, we also demonstrate that, the more severe is the infection, i.e., the more bacterial replication is important, the more the GPC is consumed by the bacteria. We can therefore suppose that in human the phosphatidyl choline pathway as carbon source for the bacteria would be used but from another substrate than GPC.

Our results showed also an increase in lactate in lung biopsies that is correlated with the intensity of the infection. It is wellknown by intensive care or infection physicians that during a sepsis or a severe infectious state it is common to see an increase in lactate in blood of patients. The increase in circulating lactate is particularly associated with greater morbidity and mortality. The underlying mechanisms are multiple, but there is often infected tissues hypoxia or a more generalized hypoxia related to the infection or to the shock states, which in turn increases lactate production through anaerobic glycolysis (for a recent review, see ref 31). In P. aeruginosa infections, recent studies also suggest the intervention of factors directly related to bacteria that also explain the increase in lactate production at the site of the infection. Thus, it has been demonstrated that P. aeruginosa is able to participate in a modification of the metabolism of human bronchial epithelial cells that then secrete more lactate via the MCT2-like transporters.³² This latter mechanism would be exacerbated in cystic fibrosis by the often-present hyperglycemia that promotes anaerobic glycolysis and is responsible for lowering the pH of the airway surface liquid. Moreover, one

of the virulence factors of *P. aeruginosa* is a redox pigment (pyocyanin) that is known to interfere with many cellular functions such as electron transport, cellular respiration, and energy metabolism.³³ In agreement with this, we also observed a marked increase in succinate associated with the infection and demonstrated that it could be a "candidate" surrogate marker. In a study concerning *Mycobacterium tuberculosis* lung infection, a similar increase of succinate concentration in lung has been observed in infected mice.³⁴ The blocking of tricarboxylic acid cycle has been described in severe sepsis state due to a biochemical mechanism within the mitochondria where the oxidation of succinate to fumarate by succinate dehydrogenase (complex II) is reversed in sepsis (hypoxia) and could explain the higher production of succinate by stressed cells.³⁵

CONCLUSIONS

This study supports the potential of using HRMAS NMR-based metabolomics analyses of lung biopsy for differentiating infected lungs with *P. aeruginosa* from healthy lungs, with high sensitivity and specificity. Moreover, the technique is sensitive enough to evaluate the degree of severity of lung infections. Metabolite profiling reveals changes associated with various pathways including energy metabolism or linked to oxidative stress. So, we think that this type of untargeted metabolomics, as well as succinate and leucine/isoleucine levels only, could be further investigated with other analytical methods (because their intensities—mainly of leucine/isoleucine—are very low) for their potential use as putative surrogate markers of vaccination or new therapeutics against the critical pathogen *P. aeruginosa*.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jproteo-me.8b00306.

Unambiguously assigned resonances of detected metabolites in the ¹HRMAS NMR spectra of lung biopsies, main properties of the CHA-PBS and Δ BD-PBS OPLS-DA model, score plot of the PCA analysis built with CHA-PBS samples, permutation tests of CHA-PBS OPLS-DA and Δ BD-PBS OPLS-DA, and CHA-PBS OPLS-DA model built with all buckets from HRMAS NMR spectra of mice lungs, including lipid peaks (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: alegouellec@chu-grenoble.fr. Phone: 00 (33) 476766376.

ORCID [©]

Audrey LeGouëllec: 0000-0002-4905-3854

Author Contributions

A.L. and O.M. contributed equally to this work. A.L. did the experiments on mice, and E.M. and O.M. built the two simple binomial logistic regressions.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by association "Vaincre la mucoviscidose" and a grant named "emergence" from the laboratory TIMC.

ABBREVIATIONS

Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; NMR, nuclear magnetic resonance; HRMAS, high-resolution magic angle spinning; PBS, phosphate-buffered saline; PCA, principal component analysis; OPLS, orthogonal partial least squares; CF, cystic fibrosis; T3SS, Type 3 secretion system; KBMA, killed but metabolically active; Gluc, glucose; Asc, ascorbate; GPC, glycerophosphocholine; Gly, glycine; Succ, succinate; bHB, beta-hydroxybutyrate; Val, valine; Leu/iso, leucine/isoleucine; Lac, lactate; Gsh, glutathione reduced; PEG, polyethylene glycol; ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under ROC curve

REFERENCES

(1) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48* (1), 1–12.

(2) Nathwani, D.; Raman, G.; Sulham, K.; Gavaghan, M.; Menon, V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* **2014**, *3* (1), 32.

(3) Bleves, S.; Viarre, V.; Salacha, R.; Michel, G. P.; Filloux, A.; Voulhoux, R. Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, *300* (8), 534–43.

(4) Jain, M.; Bar-Meir, M.; McColley, S.; Cullina, J.; Potter, E.; Powers, C.; Prickett, M.; Seshadri, R.; Jovanovic, B.; Petrocheilou, A.; King, J. D.; Hauser, A. R. Evolution of Pseudomonas aeruginosa type III secretion in cystic fibrosis: a paradigm of chronic infection. *Transl Res.* **2008**, *152* (6), 257–64.

(5) Le Gouellec, A.; Polack, B.; Toussaint, B. Regulation of the expression of type 3 secretion system: An exemple from *P. aeruginosa. Regulation of Bacterial Virulence*; Vasil, M. L., Darwin, A. J., Eds.; ASM Press: 2012.

(6) Dacheux, D.; Goure, J.; Chabert, J.; Usson, Y.; Attree, I. Poreforming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of Pseudomonas aeruginosa-infected macrophages. *Mol. Microbiol.* **2001**, *40* (1), 76–85.

(7) Dortet, L.; Lombardi, C.; Cretin, F.; Dessen, A.; Filloux, A. Poreforming activity of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system translocon alters the host epigenome. *Nat. Microbiol* **2018**, 3 (3), 378–386.

(8) Savoia, D. New perspectives in the management of Pseudomonas aeruginosa infections. *Future Microbiol.* **2014**, *9* (7), 917–28.

(9) Rello, J.; Borgatta, B.; Lagunes, L. Management of Pseudomonas aeruginosa pneumonia: one size does not fit all. *Crit Care* **2014**, *18* (2), 136.

(10) Priebe, G. P.; Goldberg, J. B. Vaccines for Pseudomonas aeruginosa: a long and winding road. *Expert Rev. Vaccines* **2014**, *13* (4), 507–19.

(11) Hurley, M. N.; Cámara, M.; Smyth, A. R. Novel approaches to the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2012**, *40* (4), 1014–1023.

(12) Meynet, E.; Laurin, D.; Lenormand, J. L.; Camara, B.; Toussaint, B.; Le Gouellec, A. Killed but metabolically active Pseudomonas aeruginosa-based vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against Pseudomonas aeruginosa pulmonary infections. *Vaccine* **2018**, *36* (14), 1893–1900.

(13) Wishart, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15* (7), 473–84.

(14) Markley, J. L.; Bruschweiler, R.; Edison, A. S.; Eghbalnia, H. R.; Powers, R.; Raftery, D.; Wishart, D. S. The future of NMR-based metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *43*, 34–40.

(15) Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H. C.; Wang, Y.; Ebbels, T. M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. High-resolution magicangle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (6), 1019–32.

(16) Muhlebach, M. S.; Sha, W. Lessons learned from metabolomics in cystic fibrosis. *Mol. Cell Pediatr* **2015**, *2* (1), 9.

(17) Stringer, K. A.; McKay, R. T.; Karnovsky, A.; Quemerais, B.; Lacy, P. Metabolomics and Its Application to Acute Lung Diseases. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 44.

(18) Duarte, I. F.; Rocha, C. M.; Gil, A. M. Metabolic profiling of biofluids: potential in lung cancer screening and diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2013**, *13* (7), 737–48.

(19) McClenathan, B. M.; Stewart, D. A.; Spooner, C. E.; Pathmasiri, W. W.; Burgess, J. P.; McRitchie, S. L.; Choi, Y. S.; Sumner, S. C. Metabolites as biomarkers of adverse reactions following vaccination: A pilot study using nuclear magnetic resonance metabolomics. *Vaccine* **2017**, 35 (9), 1238–1245.

(20) Somashekar, B. S.; Kamarajan, P.; Danciu, T.; Kapila, Y. L.; Chinnaiyan, A. M.; Rajendiran, T. M.; Ramamoorthy, A. Magic angle spinning NMR-based metabolic profiling of head and neck squamous cell carcinoma tissues. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (11), 5232–41.

(21) Somashekar, B. S.; Amin, A. G.; Tripathi, P.; MacKinnon, N.; Rithner, C. D.; Shanley, C. A.; Basaraba, R.; Henao-Tamayo, M.; Kato-Maeda, M.; Ramamoorthy, A.; Orme, I. M.; Ordway, D. J.; Chatterjee, D. Metabolomic signatures in guinea pigs infected with epidemicassociated W-Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (10), 4873–84.

(22) Toussaint, B.; Delic-Attree, I.; Vignais, P. M. Pseudomonas aeruginosa contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *196* (1), 416–421.

(23) Goure, J.; Pastor, A.; Faudry, E.; Chabert, J.; Dessen, A.; Attree, I. The V antigen of Pseudomonas aeruginosa is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.* **2004**, 72 (8), 4741–50.

(24) Meynet, E.; Laurin, D.; Lenormand, J. L.; Camara, B.; Toussaint, B.; Le Gouellec, A. Killed but metabolically active Pseudomonas aeruginosa-based vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against Pseudomonas aeruginosa pulmonary infections. *Vaccine* **2018**, *36*, 1893–1900.

(25) Jacob, D.; Deborde, C.; Lefebvre, M.; Maucourt, M.; Moing, A. NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics* **2017**, *13* (4), 36.

(26) Zhang, Z. M.; Chen, S.; Liang, Y. Z. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst* 2010, 135 (5), 1138–46.

(27) Robin, X.; Turck, N.; Hainard, A.; Tiberti, N.; Lisacek, F.; Sanchez, J. C.; Muller, M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinf.* **2011**, *12*, 77.

(28) Son, M. S.; Matthews, W. J., Jr.; Kang, Y.; Nguyen, D. T.; Hoang, T. T. In vivo evidence of Pseudomonas aeruginosa nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* **2007**, 75 (11), 5313–24.

(29) Sun, Z.; Kang, Y.; Norris, M. H.; Troyer, R. M.; Son, M. S.; Schweizer, H. P.; Dow, S. W.; Hoang, T. T. Blocking phosphatidylcholine utilization in Pseudomonas aeruginosa, via mutagenesis of fatty acid, glycerol and choline degradation pathways, confirms the importance of this nutrient source in vivo. *PLoS One* **2014**, *9* (7), e103778.

(30) Benahmed, M. A.; Elbayed, K.; Daubeuf, F.; Santelmo, N.; Frossard, N.; Namer, I. J. NMR HRMAS spectroscopy of lung biopsy samples: Comparison study between human, pig, rat, and mouse metabolomics. *Magn. Reson. Med.* **2014**, *71* (1), 35–43.

(31) Suetrong, B.; Walley, K. R. Lactic Acidosis in Sepsis: It's Not All Anaerobic: Implications for Diagnosis and Management. *Chest* **2016**, *149* (1), 252–61.

Journal of Proteome Research

(32) Garnett, J. P.; Kalsi, K. K.; Sobotta, M.; Bearham, J.; Carr, G.; Powell, J.; Brodlie, M.; Ward, C.; Tarran, R.; Baines, D. L. Hyperglycaemia and Pseudomonas aeruginosa acidify cystic fibrosis airway surface liquid by elevating epithelial monocarboxylate transporter 2 dependent lactate-H(+) secretion. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37955.

(33) Rada, B.; Leto, T. L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. *Trends Microbiol.* **2013**, *21* (2), 73–81.

(34) Shin, J. H.; Yang, J. Y.; Jeon, B. Y.; Yoon, Y. J.; Cho, S. N.; Kang, Y. H.; Ryu, D. H.; Hwang, G. S. (1)H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (5), 2238–47.

(35) Bar-Or, D.; Carrick, M. M.; Mains, C. W.; Rael, L. T.; Slone, D.; Brody, E. N. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: Are there clues to better treatment? *Redox Rep.* **2015**, *20* (5), 193–7. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES
Les infections respiratoires chroniques à *P. a.* sont un problème clinique majeur, en particulier pour les patients atteints de mucoviscidose. Particulièrement difficiles à éradiquer, du fait notamment de la grande capacité de résistance aux antibiotiques de cette bactérie, ces infections perdurent bien souvent pendant des décennies, et suivent le patient jusqu'à la fin de sa vie. Mieux comprendre les mécanismes sous-tendant l'évolution adaptative de *P. a.* pendant les années de colonisation des voies aériennes constitue une voie de recherche d'importance dans la prise en charge de cette adaptation, il est particulièrement difficile d'établir des corrélations entre les mutations identifiées sur le génome bactérien, et l'expression de phénotypes cliniquement pertinents, ou encore avec l'état de santé du patient infecté.

Nous avons donc cherché à étudier l'évolution adaptative de P. a. durant les infections pulmonaires chroniques en se plaçant à une échelle d'observation au plus proche du phénotype : le métabolisme. Pour cela, nous avons utilisé l'outil de la métabolomique, qui permet de mesurer le contenu métabolique (ou encore métabolome) et donc l'activité métabolique d'un système, offrant ainsi une lecture au plus proche de l'expression des phénotypes. Nous avons ainsi constitué et caractérisé une banque d'isolats cliniques de P. a. représentatifs de différents stades d'adaptation de la bactérie à son hôte sur plusieurs années, chez 32 patients adultes atteints de mucoviscidose. La caractérisation métabolique des isolats a été faite par métabolomique non ciblée à haute résolution par HPLC-HRMS, sur des cultures bactériennes réalisées dans des conditions proches de l'environnement pulmonaire mucoviscidosique. Les isolats bactériens ont également été caractérisés au plan phénotypique, par la mesure de résistances à 14 antibiotiques d'intérêt clinique, et de plusieurs phénotypes associés à la virulence. La cohorte des patients inclus à notre étude a été caractérisée au plan clinique, par la construction d'indicateurs indiquant le niveau, la stabilité et le déclin de la fonction respiratoire. L'ensemble des résultats obtenus ont été analysés selon des méthodes statistiques multivariées et multi-tableaux (ou multi-blocs).

Parmi les résultats majeurs de cette étude, nous avons mis en évidence l'implication de certaines voies métaboliques dans la **patho-adaptation** de *P. a.* à son hôte. Ainsi, l'activation de la voie de **recyclage du peptidoglycane** semble importante dans l'acquisition intra-hôte de

la résistance aux Bêta-lactamines. De même, des modifications dans les voies d'**utilisation de l'ornithine**, conduisant notamment à une diminution des niveaux des **polyamines putrescine et spermidine**, paraissent impliquées dans le ralentissement de la croissance et la diminution de la virulence bactérienne, concordantes avec un état de santé respiratoire moins sévèrement impacté pour le patient. A l'inverse, les souches produisant de hauts niveaux de putrescine et spermidine sont associées à une pathogénicité accrue et à une instabilité importante des fonctions pulmonaires, suggérant que l'activation de cette voie pourrait être associée à la survenue d'épisodes d'exacerbation aigüe. Selon les travaux d'autres équipes, les deux voies métaboliques présentées ici semblent également impliquées dans l'échappement de la bactérie aux défenses de l'hôte, une autre signature de l'évolution adaptative intra-hôte de la bactérie ^{352,356}. **Ces adaptations métaboliques pourraient constituer un moteur de l'évolution des clones vers un phénotype particulièrement adapté à son environnement. Les niveaux des différents métabolites de ces voies pourraient quant à eux constituer une signature de cette adaptation.**

Le **dialogue hôte-pathogène** est une thématique de recherche clé au sein de notre équipe de recherche. Pour aller plus loin dans cette caractérisation, l'objectif d'**une thèse en cours** au laboratoire est d'identifier de nouveaux métabolites (ou immunométabolites) produits par *P. a.*, capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte, à partir de notre banque d'isolats. Pour cela, nous avons en parallèle de la préparation des échantillons pour l'acquisition des empreintes métaboliques endocellulaires des isolats présentée dans la Partie III, prélevé et conservé à -80°C les surnageants de culture correspondants. Une étude récente a démontré que la congélation et la conservation à froid des échantillons d'expectorations permet de maintenir les profils de métabolites dans le temps ³⁵⁹. Ainsi, il sera possible à partir de ces surnageants de culture, de caractériser les **exométabolomes** des isolats, définis comme l'ensemble des métabolites extracellulaires des échantillons. Les surnageants seront notamment analysés par HPLC-HRMS ciblée sur des **immunométabolites** au cours de ce travail de thèse, ou encore de la voie du tryptophane (kynurénine et acide kynurénique), dont le rôle dans la modulation de l'immunité de l'hôte a été largement étudié au laboratoire ^{81,82}.

En parallèle de cette caractérisation, l'étudiante en thèse pourra analyser la polarisation de la réponse immune induite par les isolats de la banque. Pour cela, les surnageants de culture seront mis au contact de cellules dendritiques, qui seront une fois activées utilisées pour étudier la polarisation de lymphocytes T (Treg, Th1, Th2) *in vitro*. Les métabolites les plus pertinents seront également testés seuls ou en combinaison, afin de valider leur rôle direct dans la polarisation de la réponse de l'hôte (thèse de Caroline Plazy, 2017-2020). Les résultats obtenus pourront permettre de valider la voie de synthèse de la putrescine comme activatrice de l'immunité, et renforcerait l'hypothèse du rôle de l'inactivation de cette voie dans l'échappement de *P. a.* aux défenses de son hôte. Ils permettront également l'identification d'autres métabolites produits par la bactérie et induisant l'activation, ou au contraire la tolérance du système immunitaire, permettant ainsi de gagner en connaissance sur la pathogénicité des infections chroniques à *P. a.*.

De plus, nous avons au cours de ce travail de thèse étudié l'**impact de l'infection à** *P. a.* **sur son hôte**, dans un **modèle préclinique d'infection pulmonaire aigüe**, pouvant se rapprocher des crises exacerbatoires rencontrées chez le patient. Cette seconde étude nous a permis d'identifier une vingtaine de **métabolites significativement modifiés dans le poumon au cours de l'infection**, notamment le **succinate** ou encore la **glycérophosphocholine**. Comme évoqué précédemment, la putrescine est un précurseur de la synthèse du succinate, et il serait d'un grand intérêt d'étudier l'interaction entre les voies métaboliques de la putrescine (côté bactérie) et du succinate (côté hôte). Cette interaction pourrait influencer la relation entre la bactérie et son hôte, entre symbiose et dysbiose, et avoir un rôle dans la survenue des exacerbations. Le marquage préalable des métabolites bactériens au carbone 13 (par culture dans un milieu enrichi en C13) permettrait distinguer les métabolites bactériens de ceux de l'hôte dans ce type d'infection modèle et d'investiguer plus en détail ce dialogue hôte-pathogène.

En conclusion, nos résultats démontrent que la métabolomique non ciblée peut constituer un outil pertinent pour l'identification d'une part de mécanismes sous-tendant l'évolution bactérienne vers des phénotypes adaptés, et d'autre part des biomarqueurs de sévérité de l'infection. Elle permettra potentiellement à terme le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et diagnostiques afin d'améliorer la prise en charge des patients. Ces observations pourraient à terme donner lieu au développement de nouveaux outils thérapeutiques et diagnostiques pour ces infections bactériennes résistantes aux antibiotiques. Par exemple, l'inhibition de la voie de recyclage du peptidoglycane pourrait permettre de restaurer la sensibilité de la bactérie aux Bêta-lactamines, comme démontré par Borisova et son équipe ³⁴⁸. Cette stratégie de combinaison de Bêta-lactamines avec des inhibiteurs enzymatiques a déjà démontré sa pertinence, puisque c'est le cas d'un des antibiotiques les plus prescrits au monde, l'association amoxicilline et acide clavulanique. De même, le ciblage de la synthèse des polyamines pourrait conduire au développement de nouveaux traitements anti-virulence. Enfin, nous pouvons faire l'hypothèse que la mesure ciblée des métabolites marqueurs de l'activation de ces voies dans les prélèvements respiratoires des patients pourrait servir de biomarqueurs prédictifs des exacerbations ou de non réponse à certaines antibiothérapies. De tels outils pourraient à terme permettre d'améliorer la prise en charge des patients, de rationaliser l'utilisation des antibiotiques et de fournir des alternatives ou des compléments aux antibiothérapies conventionnelles.

Au-delà du cadre de la mucoviscidose, la menace d'une ère post-antibiotique, dans laquelle des infections mineures et facilement curables depuis des décennies pourraient à nouveau tuer, est aujourd'hui de plus en plus réelle, et fait du développement de ce type d'outils une urgence de santé publique ³⁶⁰.

Par ailleurs, et bien qu'elle soit souvent majoritaire, *P. a.* n'est pas unique mais est l'une des bactéries qui composent le microbiote pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Les interactions entre les espèces composant le microbiote sont nombreuses, et il a ainsi été démontré que *P. a.* a un impact majeur sur la structure de cette communauté ¹²⁵. Cependant, les autres espèces microbiennes en présence peuvent influencer les profils d'expression génique, métabolique et phénotypique de *P. a.*. Un exemple connu est l'utilisation de la mucine produite par l'hôte. Incapable de métaboliser cette mucine directement, *P. a.* utilise les produits de dégradation de la mucine d'autres espèces comme source de carbone ^{361,362}. Parmi les autres exemples d'interactions largement étudiées, on compte les interactions parfois mutualistes, parfois compétitrices, entre *P. a.* et *S. a.*, qui cohabitent fréquemment dans les voies aériennes des patients ³⁶³.

Ces interactions entre espèces peuvent être médiées par les métabolites. Il a notamment été démontré que l'acide lactique et le 2,3-butanediol, produits de fermentation de certaines espèces de la communauté microbienne et potentiels biomarqueurs de l'exacerbation ³⁶⁴, modifient les profils métabolomiques, transcriptomiques et les phénotypes de motilité d'un isolat clinique de *P. a.*. Parmi les métabolites différentiellement exprimés en présence de ces produits de fermentation, on compte cette fois-ci encore, le succinate et la spermidine ³⁶⁵. D'autres travaux de cette même équipe ont par ailleurs démontré que *P. a.* utilise les métabolites produits par *Rothia mucilaginosa*, un autre micro-organisme commun des voies aériennes mucoviscidosique, comme substrats de son métabolisme central ³⁶⁶.

Ces relations entre pathogènes peuvent avoir un impact considérable sur les retombées cliniques de l'infection ³⁶³. Ainsi, si les études sur cultures d'isolats purs comme celles présentées ici apportent des éléments importants pour la compréhension des mécanismes patho-évolutifs de l'infection chronique à *P. a.*, les hypothèses soulevées nécessitent d'être étudiées dans le cadre de l'écosystème pulmonaire mucoviscidosique dans son ensemble. Pour adresser ces questions, une collection longitudinale prospective d'expectorations de patients est actuellement en cours au CRCM adulte de Grenoble (protocole de recherche clinique *Dysbiose*). Cette nouvelle banque permettra d'étudier la structure des populations microbiennes présentes dans les voies respiratoires des patients par métagénomique, ainsi que la caractérisation des métabolites microbiens, xénobiotiques et de l'hôte par métamétabolomique non ciblée ou ciblée sur certaines voies d'intérêt.

Il sera par exemple d'un grand intérêt d'étudier l'influence d'isolats de *P. a.* produisant de hauts niveaux de polyamines sur la structure du microbiote et l'impact de la communauté microbienne sur les cellules de l'hôte. En effet, de nombreux pathogènes humains bactériens, mais aussi des *archae*, levures et protozoaires, possèdent des systèmes de transport permettant l'utilisation des polyamines extracellulaires pour supporter la croissance ³³⁸. Il est ainsi possible que la surproduction de polyamines par des isolats particulièrement virulents de *P. a.* induisent l'activation de la croissance d'autres espèces colonisatrices des poumons des patients, provoquant ainsi la dysbiose à l'origine de la survenue des exacerbations. Pour cela, des modèles de culture de microbiote dans des conditions reproduisant l'environnement pulmonaire mucoviscidosique pourront être utilisés, afin d'évaluer l'impact de souches de *P.*

a. produisant différents niveaux de polyamines sur la diversité et l'abondance des différentes espèces ^{367,368}.

Enfin, il est important de souligner que des études précédentes ont démontré que les voies métaboliques de l'ornithine et des polyamines (dont spermidine et putrescine) sont régulées à un niveau post-génomique ^{344,358}. Ce constat suggère que la mise en évidence de l'implication de ces voies dans l'expression de phénotypes d'intérêt clinique n'aurait pas été possible par l'observation des bactéries au niveau génomique, et souligne ainsi **la pertinence de notre approche métabolomique, qui permet l'étude des mécanismes patho-adaptatifs au plus proche du phénotype**. Cette hypothèse pourra être vérifiée par la recherche de mutations dans les gènes des voies de synthèse et de dégradation des polyamines, ou encore dans les régulateurs globaux de ces voies métaboliques.

Pour rappel, nous avions au début de ce manuscrit argumenté qu'à l'instar des mutations génétiques, des modifications post-génomiques, physiologiques et métaboliques ont le potentiel de se transmettre aux générations suivantes ^{10–13,16,20,22}. De plus, plusieurs éléments suggèrent que des modifications post-génomiques induites par l'environnement pourraient favoriser l'implantation de ces adaptations dans le génome dans un second temps ^{14,16}. Des cas de régulation adaptative post-génomique stabilisées ensuite dans le génome existent, à l'image de la conversion de *P. a.* vers un phénotype mucoïde, médiée par l'activation de la transcription du gène *algD*, qui est ensuite implémentée dans le génome par inactivation du gène *mucA* ^{369,370}. Nous avions ainsi fait le **postulat que le métabolisme, situé au centre des signaux intrinsèques et extrinsèques et contrôlant les processus physiologiques, peut avoir un rôle moteur dans l'évolution adaptative.**

Dans ce sens, Boyle et son équipe ont récemment montré dans une expérience d'évolution en laboratoire, comment le métabolisme permet de déterminer les coûts et bénéfices des comportements sociaux chez *P. a.*, et d'influencer ainsi les relations entre différentes souches d'une même espèce. Les auteurs démontrent ainsi la position centrale du métabolisme dans l'évolution des comportements sociaux chez *P. a.*²¹. Mais ces expériences d'évolution *in vitro* restent très éloignées du cadre naturel de l'évolution adaptative, et le suivi des infections

pulmonaires chroniques à *P. a.* chez les patients atteints de mucoviscidose offre une occasion rare d'étudier l'évolution adaptative bactérienne *in situ* ⁹⁶.

Pour conclure, le travail présenté dans ce manuscrit démontre que **la métabolomique peut permettre de gagner en connaissance sur les mécanismes d'adaptation de** *P. a.* à l'environnement pulmonaire **mucoviscidosique**.

Ce niveau d'observation permet en effet d'intégrer l'ensemble des adaptations génomiques et post-génomiques aux changements environnementaux, qui peuvent avoir un impact sur la **pathogénicité de l'infection**.

Nos résultats dévoilent également que la métabolomique peut permettre de gagner en connaissance sur les processus d'évolution adaptative bactérienne en conditions naturelles, et possiblement sur l'évolution adaptative en général.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. Awramik, S. M. The oldest records of photosynthesis. *Photosynthesis Research* (1992). doi:10.1007/BF00039172
- 2. Darwin, C. On the Origin of Species by Means of Natural Selection. D. Appleton and Company (1859). doi:10.1126/science.146.3640.51-b
- 3. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* (1970). doi:10.1038/227561a0
- 4. Kimura, M. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 1181–8 (1969).
- 5. Laland, K. et al. Does evolutionary theory need a rethink? Nature (2014). doi:10.1038/514161a
- 6. | Inserm La science pour la santé. Available at: https://www.inserm.fr/. (Accessed: 25th January 2019)
- 7. Jeltsch, A. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. Edited by Trygve Tollefsbol. *ChemBioChem* (2011). doi:10.1002/cbic.201100065
- 8. Calvanese, V. & Fraga, M. F. Epigenetics of Embryonic Stem Cells. in *Advances in experimental medicine and biology* **741**, 231–253 (2012).
- 9. Cota, I. *et al.* Epigenetic Control of Salmonella enterica O-Antigen Chain Length: A Tradeoff between Virulence and Bacteriophage Resistance. *PLoS Genet.* (2015). doi:10.1371/journal.pgen.1005667
- 10. Pembrey, M. E. Time to take epigenetic inheritance seriously. *Eur. J. Hum. Genet.* **10**, 669–671 (2002).
- 11. Bygren, L. O., Kaati, G. & Edvinsson, S. Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheor.* **49**, 53–59 (2001).
- 12. Kaati, G., Bygren, L. O. & Edvinsson, S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur. J. Hum. Genet.* **10**, 682–688 (2002).
- 13. Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Waterland, R. A. & Jirtle, R. L. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ. Health Perspect.* (2006). doi:10.1289/ehp.8700
- 14. Sater, M. R. A. *et al.* DNA Methylation Assessed by SMRT Sequencing Is Linked to Mutations in Neisseria meningitidis Isolates. *PLoS One* **10**, (2015).
- 15. Rosier, F. L'épigénétique, l'hérédité au-delà de l'ADN. Le Monde (2012).
- 16. Standen, E. M., Du, T. Y. & Larsson, H. C. E. Developmental plasticity and the origin of tetrapods. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13708
- 17. Liu, X. & Locasale, J. W. Metabolomics: A Primer. Trends Biochem. Sci. 42, 274–284 (2017).
- 18. Patti, G. J., Yanes, O. & Siuzdak, G. Metabolomics: the apogee or the omic trilolgy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 263–269 (2013).
- 19. Bersaglieri, T. *et al.* Genetic Signatures of Strong Recent Positive Selection at the Lactase Gene. *Am. J. Hum. Genet.* (2004). doi:10.1086/421051
- 20. Blekhman, R. *et al.* Comparative metabolomics in primates reveals the effects of diet and gene regulatory variation on metabolic divergence. *Sci. Rep.* (2014). doi:10.1038/srep05809
- 21. Boyle, K. E. *et al.* Metabolism and the evolution of social behavior. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 2367–2379 (2017).
- 22. Fumagalli, M. *et al.* Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation. *Science (80-.).* **349**, 1343–1347 (2015).
- 23. Offit, K. Decade in review—genomics: A decade of discovery in cancer genomics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2014). doi:10.1038/nrclinonc.2014.170
- 24. McGarrah, R. W., Crown, S. B., Zhang, G. F., Shah, S. H. & Newgard, C. B. Cardiovascular Metabolomics. *Circulation research* (2018). doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311002

- 25. Quinn, R. A. *et al.* Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**, 143–154 (2017).
- 26. Wishart, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery* (2016). doi:10.1038/nrd.2016.32
- 27. Johnson, C. H., Ivanisevic, J., Benton, H. P. & Siuzdak, G. Bioinformatics: The next frontier of metabolomics. *Analytical Chemistry* (2015). doi:10.1021/ac5040693
- 28. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, (1953). doi:10.1038/171737a0
- 29. Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of the Pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid isolated from Pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* (1944). doi:10.1084/jem.79.2.137
- 30. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1977). doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- 31. Maxam, A. M. & Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1977). doi:10.1073/pnas.74.2.560
- 32. Guttmacher, A. E. & Collins, F. S. Welcome to the Genomic Era. *N. Engl. J. Med.* (2003). doi:10.1056/NEJMe038132
- 33. Collins, F. S., Green, E. D., Guttmacher, A. E. & Mark, S. A vision for the future of genomics research. *Nature* **422**, 15–17 (2003).
- 34. Altshuler, D. L. *et al.* A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* (2010). doi:10.1038/nature09534
- 35. Walker, R. L. & Morrissey, C. Bioethics Methods in the Ethical, Legal, and Social Implications of the Human Genome Project Literature. *Bioethics* (2014). doi:10.1111/bioe.12023
- 36. Southern, K. W. Determining the optimal newborn screening protocol for cystic fibrosis. *Thorax* **67**, 281–282 (2012).
- 37. Palkopoulou, E. *et al.* Complete genomes reveal signatures of demographic and genetic declines in the woolly mammoth. *Curr. Biol.* (2015). doi:10.1016/j.cub.2015.04.007
- 38. Meadows, J. R. S. & Lindblad-Toh, K. Dissecting evolution and disease using comparative vertebrate genomics. *Nature Reviews Genetics* (2017). doi:10.1038/nrg.2017.51
- 39. Seehausen, O. *et al.* Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics* (2014). doi:10.1038/nrg3644
- 40. Sheppard, S. K., Guttman, D. S. & Fitzgerald, J. R. Population genomics of bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics* (2018). doi:10.1038/s41576-018-0032-z
- 41. Marsit, S. *et al.* Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nature Reviews Genetics* (2017). doi:10.1038/nrg.2017.49
- 42. Marvig, R. L., Sommer, L. M., Molin, S. & Johansen, H. K. Convergent evolution and adaptation of Pseudomonas aeruginosa within patients with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* (2015). doi:10.1038/ng.3148
- 43. Parks, M. *et al.* Ancient population genomics and the study of evolution. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**, (2015).
- 44. Raamsdonk, L. M. *et al.* A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat. Biotechnol.* (2001). doi:10.1038/83496
- 45. White, K. P. Functional genomics and the study of development, variation and evolution. *Nature Reviews Genetics* (2001). doi:10.1038/35080565
- 46. Steinmetz, L. M. & Davis, R. W. Maximizing the potential of functional genomics. *Nature Reviews Genetics* (2004). doi:10.1038/nrg1293
- 47. Sauer, S., Konthur, Z. & Lehrach, H. Genome projects and the functional-genomic era. *Comb Chem High Throughput Screen* (2005). doi:10.2174/138620705774962436
- 48. Hawkins, R. D., Hon, G. C. & Ren, B. Next-generation genomics: An integrative approach. *Nature Reviews Genetics* (2010). doi:10.1038/nrg2795

- 49. Klupczyńska, A., Dereziński, P. & Kokot, Z. J. Metabolomics in medical sciences Trends, challenges and perspectives. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research* (2015). doi:10.1364/OL.36.001491
- 50. Dongre, A. R., Opiteck, G., Cosand, W. L. & Hefta, S. A. Proteomics in the post-genome age. *Biopolymers* **60**, 206–211 (2001).
- 51. Ouidir, T., Jouenne, T. & Hardouin, J. Post-translational modifications in Pseudomonas aeruginosa revolutionized by proteomic analysis. *Biochimie* **125**, 66–74 (2016).
- 52. Reed, L. K., Baer, C. F. & Edison, A. S. Considerations when choosing a genetic model organism for metabolomics studies. *Current Opinion in Chemical Biology* (2017). doi:10.1016/j.cbpa.2016.12.005
- 53. Bakker, O. B. *et al.* Integration of multi-omics data and deep phenotyping enables prediction of cytokine responses. *Nat. Immunol.* (2018). doi:10.1038/s41590-018-0121-3
- 54. Hasin, Y., Seldin, M. & Lusis, A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* (2017). doi:10.1186/s13059-017-1215-1
- 55. Haas, R. *et al.* Designing and interpreting 'multi-omic' experiments that may change our understanding of biology. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **6**, 37–45 (2017).
- 56. Rohart, F., Gautier, B., Singh, A. & Lê Cao, K. A. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* (2017). doi:10.1371/journal.pcbi.1005752
- 57. Pauling, L., Robinson, A. B., Teranishi, R. & Cary, P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2374–6 (1971).
- 58. Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. & Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **16**, 373–8 (1998).
- 59. Liu, X. & Locasale, J. W. Biochemistry: A toxin that fuels metabolism. *Nature* (2017). doi:10.1038/nature23541
- 60. Johnson, C. H., Ivanisevic, J. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 451–459 (2016).
- 61. Nicholson, J. K. & Lindon, J. C. Systems biology: Metabonomics. *Nature* **455**, 1054–1056 (2008).
- 62. Behrends, V. *et al.* Metabolite profiling to characterize disease-related bacteria: Gluconate excretion by pseudomonas aeruginosa mutants and clinical isolates from cystic fibrosis patients. *J. Biol. Chem.* **288**, 15098–15109 (2013).
- 63. Borgos, S. E. F. *et al.* Rapid metabolic profiling of developing Pseudomonas aeruginosa biofilms by high-resolution mass spectrometry fingerprinting. *Ann. Microbiol.* **65**, 891–898 (2015).
- 64. Shommu, N. S., Vogel, H. J. & Storey, D. G. Potential of metabolomics to reveal Burkholderia cepacia complex pathogenesis and antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* (2015). doi:10.3389/fmicb.2015.00668
- 65. Rees, C. A., Burklund, A., Stefanuto, P. H., Schwartzman, J. D. & Hill, J. E. Comprehensive volatile metabolic fingerprinting of bacterial and fungal pathogen groups. *J. Breath Res.* (2018). doi:10.1088/1752-7163/aa8f7f
- 66. Campo, L. *et al.* Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in cokeoven workers. *Toxicol. Lett.* (2010). doi:10.1016/j.toxlet.2008.12.018
- 67. Raes, J. & Bork, P. Molecular eco-systems biology: Towards an understanding of community function. *Nat. Rev. Microbiol.* (2008). doi:10.1038/nrmicro1935
- 68. Boaro, A. A., Kim, Y. M., Konopka, A. E., Callister, S. J. & Ahring, B. K. Integrated 'omics analysis for studying the microbial community response to a pH perturbation of a cellulose-degrading bioreactor culture. *FEMS Microbiol. Ecol.* (2014). doi:10.1111/1574-6941.12435
- 69. Dorrestein, P. C., Mazmanian, S. K. & Knight, R. Finding the Missing Links among Metabolites, Microbes, and the Host. *Immunity* (2014). doi:10.1016/j.immuni.2014.05.015
- 70. Zhang, A., Sun, H., Yan, G., Wang, P. & Wang, X. Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
- 71. Le Gouëllec, A., Moyne, O., Meynet, E., Toussaint, B. & Fauvelle, F. High-Resolution Magic Angle Spinning NMR-Based Metabolomics Revealing Metabolic Changes in Lung of Mice

Infected with P. aeruginosa Consistent with the Degree of Disease Severity. *J. Proteome Res.* **17**, 3409–3417 (2018).

- 72. Guijas, C., Montenegro-Burke, J. R., Warth, B., Spilker, M. E. & Siuzdak, G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nature Biotechnology* (2018). doi:10.1038/nbt.4101
- 73. Matsuda, R. *et al.* Studies of metabolite-protein interactions: A review. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* (2014). doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.043
- 74. Cao, J. *et al.* Structure-based investigation on the binding interaction of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with thyroxine transport proteins. *Toxicology* (2010). doi:10.1016/j.tox.2010.08.012
- 75. Sperber, H. *et al.* The metabolome regulates the epigenetic landscape during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat. Cell Biol.* (2015). doi:10.1038/ncb3264
- 76. Wei, J., Raynor, J., Nguyen, T. L. M. & Chi, H. Nutrient and metabolic sensing in T cell responses. *Front. Immunol.* **8**, 1–14 (2017).
- 77. Haase, S., Haghikia, A., Wilck, N., Müller, D. N. & Linker, R. A. Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity. *Immunology* (2018). doi:10.1111/imm.12933
- 78. Altmann, D. M. Establishing the new playbook for interactions among microbiota, bacterial metabolites, adaptive immunity, autoimmune disease and metabolic syndrome. *Immunology* **154**, 533–534 (2018).
- 79. Barth, M. C. *et al.* Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J. Biol. Chem.* (2009). doi:10.1074/jbc.M109.024042
- 80. Wirthgen, E., Hoeflich, A., Rebl, A. & Günther, J. Kynurenic Acid: The Janus-faced role of an immunomodulatory tryptophan metabolite and its link to pathological conditions. *Frontiers in Immunology* (2018). doi:10.3389/fimmu.2017.01957
- 81. Genestet, C. *et al.* Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps Pseudomonas aeruginosa escape neutrophil killing. *Free Radic. Biol. Med.* **73**, 400–410 (2014).
- 82. Bortolotti, P. *et al.* Tryptophan catabolism in Pseudomonas aeruginosa and potential for interkingdom relationship. *BMC Microbiol.* **16**, 1–10 (2016).
- 83. Aboud, O. A. & Weiss, R. H. New opportunities from the cancer metabolome. *Clinical Chemistry* (2013). doi:10.1373/clinchem.2012.184598
- 84. Strucko, T. *et al.* Laboratory evolution reveals regulatory and metabolic trade-offs of glycerol utilization in Saccharomyces cerevisiae. *Metab. Eng.* (2018). doi:10.1016/j.ymben.2018.03.006
- 85. Ben-Abu, Y., Beiles, A., Flom, D. & Nevo, E. Adaptive evolution of benzoxazinoids in wild emmer wheat, Triticum dicoccoides, at "Evolution Canyon", Mount Carmel, Israel. *PLoS One* (2018). doi:10.1371/journal.pone.0190424
- 86. La Rosa, R., Behrends, V., Williams, H. D., Bundy, J. G. & Rojo, F. Influence of the Crc regulator on the hierarchical use of carbon sources from a complete medium in Pseudomonas. *Environ. Microbiol.* (2016). doi:10.1111/1462-2920.13126
- 87. Li, Z. *et al.* The relations between metabolic variations and genetic evolution of different species. *Anal. Biochem.* (2015). doi:10.1016/j.ab.2015.02.024
- 88. Barrick, J. E. & Lenski, R. E. Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics* (2013). doi:10.1038/nrg3564
- 89. Tenaillon, O. *et al.* Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. *Nature* (2016). doi:10.1038/nature18959
- 90. Hindré, T., Knibbe, C., Beslon, G. & Schneider, D. New insights into bacterial adaptation through in vivo and in silico experimental evolution. *Nat. Publ. Gr.* **10**, (2012).
- 91. Didelot, X., Walker, A. S., Peto, T. E., Crook, D. W. & Wilson, D. J. Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology* (2016). doi:10.1038/nrmicro.2015.13
- 92. Sanchez, K. K. *et al.* Cooperative Metabolic Adaptations in the Host Can Favor Asymptomatic Infection and Select for Attenuated Virulence in an Enteric Pathogen. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2018.07.016

- 93. Bugaytsova, J. A. *et al.* Helicobacter pylori Adapts to Chronic Infection and Gastric Disease via pH-Responsive BabA-Mediated Adherence. *Cell Host Microbe* **21**, 376–389 (2017).
- 94. Fitzgerald, J. R. Evolution of Staphylococcus aureus during human colonization and infection. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 542–547 (2014).
- 95. Viberg, L. T. *et al.* Within-Host Evolution of *Burkholderia pseudomallei* during Chronic Infection of Seven Australasian Cystic Fibrosis Patients. *MBio* **8**, (2017).
- 96. Folkesson, A. *et al.* Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, (2012).
- 97. Sommer, L. M. *et al.* Is genotyping of single isolates sufficient for population structure analysis of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis airways? *BMC Genomics* **17**, (2016).
- 98. Boucher, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Rep. Dev. Pipeline* **48**, 12 (2009).
- 99. Davies, J. C., Ebdon, A. M. & Orchard, C. Recent advances in the management of cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* (2014). doi:10.1136/archdischild-2013-304400
- 100. Bellis, G., Dehillotte, C. & Lemonnier, L. *Registre français de la mucoviscidose Bilan des données 2016.* (2017).
- Palomaki, G. E., FitzSimmons, S. C. & Haddow, J. E. Clinical sensitivity of prenatal screening for cystic fibrosis via CFTR carrier testing in a United States panethnic population. *Genet. Med.* 6, 405–14
- 102. MacKenzie, T. *et al.* Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: Survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. *Ann. Intern. Med.* (2014). doi:10.7326/M13-0636
- 103. Dodge, J. A., Lewis, P. A., Stanton, M. & Wilsher, J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur. Respir. J.* (2007). doi:10.1183/09031936.00099506
- 104. Jackson, A. D. & Goss, C. H. Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population. *J. Cyst. Fibros.* **17**, 297–305 (2018).
- 105. Conway, S. *et al.* European cystic fibrosis society standards of care: Framework for the cystic fibrosis centre. *Journal of Cystic Fibrosis* (2014). doi:10.1016/j.jcf.2014.03.009
- 106. Ramsey, B. W. *et al.* A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the *G551D* Mutation. *N. Engl. J. Med.* (2011). doi:10.1056/NEJMoa1105185
- 107. Rodman, D. M. *et al.* Late diagnosis defines a unique population of long-term survivors of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2005). doi:10.1164/rccm.200403-404OC
- 108. Kerem, E. & Webb, A. K. European cystic fibrosis society standards of care: A road map to improve CF outcome. *J. Cyst. Fibros.* **13**, 357–358 (2014).
- 109. Sosnay, P. R. *et al.* Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat. Genet.* **45**, 1160–1167 (2013).
- 110. Veit, G. *et al.* From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol. Biol. Cell* **27**, 424–433 (2016).
- 111. De Boeck, K., Zolin, A., Cuppens, H., Olesen, H. V. & Viviani, L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* (2014). doi:10.1016/j.jcf.2013.12.003
- 112. Marson, F. A. L., Bertuzzo, C. S. & Ribeiro, J. D. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir. Med.* **4**, e37–e38 (2016).
- 113. Ratjen, F. et al. Cystic fibrosis. Nat. Rev. Dis. Prim. 1, 15010 (2015).
- 114. Konstan, M. W. *et al.* Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* (2003). doi:10.1067/mpd.2003.152
- 115. Sharma, R. *et al.* Wasting as an independent predictor of mortality in patients with cystic fibrosis. *Thorax* (2001). doi:10.1136/thorax.56.10.746
- 116. Moran, A. *et al.* Clinical care guidelines for cystic fibrosis-related diabetes: a position statement of the American Diabetes Association and a clinical practice guideline of the Cystic Fibrosis Foundation, endorsed by the Pediatric Endocrine Society. *Diabetes Care* **33**, 2697–708 (2010).

- 117. Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M. & McColley, S. A. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* (2011). doi:10.1128/CMR.00036-10
- 118. Pezzulo, A. A. *et al.* Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature11130
- 119. Harrison, F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **153**, 917–23 (2007).
- 120. King, V. van B. Upper respiratory disease, sinusitis, and polyposis. *Clin. Rev. Allergy* (1991). doi:10.1007/BF02914539
- 121. Hansen, S. K. *et al.* Evolution and diversification of Pseudomonas aeruginosa in the paranasal sinuses of cystic fibrosis children have implications for chronic lung infection. *ISME J.* (2012). doi:10.1038/ismej.2011.83
- 122. Koch, C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* **34**, 232–236 (2002).
- 123. Smith, W. D. *et al.* Current and future therapies for Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters* (2017). doi:10.1093/femsle/fnx121
- 124. Marshall, B. C. *et al.* Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2014 Annual Data Report. *Cyst. Fibros. Found.* (2015). doi:10.1183/09031936.00196314.2
- 125. Pages-Monteiro, L. *et al.* Strong incidence of Pseudomonas aeruginosa on bacterial rrs and ITS genetic structures of cystic fibrosis sputa. *PLoS One* **12**, 1–19 (2017).
- 126. Bacci, G. *et al.* Pyrosequencing unveils cystic fibrosis lung microbiome differences associated with a severe lung function decline. *PLoS One* (2016). doi:10.1371/journal.pone.0156807
- 127. Paganin, P. *et al.* Changes in cystic fibrosis airway microbial community associated with a severe decline in lung function. *PLoS One* **10**, (2015).
- 128. Konstan, M. W., Hilliard, K. A., Norvell, T. M. & Berger, M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (1994). doi:10.1164/ajrccm.150.2.8049828
- 129. Ulrich, M. *et al.* Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* (2010). doi:10.1016/j.jcf.2010.03.001
- 130. Aaron, S. D., Stephenson, A. L., Cameron, D. W. & Whitmore, G. A. A statistical model to predict one-year risk of death in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Epidemiol.* **68**, 1336–45 (2015).
- 131. Kerem, E. *et al.* Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: Analysis of the ECFS patient registry. *European Respiratory Journal* **43**, 125–133 (2014).
- 132. Konstan, M. W. *et al.* Risk Factors For Rate of Decline in Forced Expiratory Volume in One Second in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* (2007). doi:10.1016/j.jpeds.2007.03.006
- 133. Vandevanter, D. R. *et al.* Pulmonary outcome prediction (POP) tools for cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* (2010). doi:10.1002/ppul.21311
- 134. Taylor-Robinson, D. *et al.* Understanding the natural progression in %FEV1 decline in patients with cystic fibrosis: A longitudinal study. *Thorax* **67**, 860–866 (2012).
- 135. Taylor, C. *et al.* A novel lung disease phenotype adjusted for mortality attrition for cystic fibrosis Genetic modifier studies. *Pediatr. Pulmonol.* (2011). doi:10.1002/ppul.21456
- 136. Schluchter, M. D., Konstan, M. W., Drumm, M. L., Yankaskas, J. R. & Knowles, M. R. Classifying severity of cystic fibrosis lung disease using longitudinal pulmonary function data. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2006). doi:10.1164/rccm.200512-1919OC
- 137. Harun, S. N., Wainwright, C., Klein, K. & Hennig, S. A systematic review of studies examining the rate of lung function decline in patients with cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* (2016). doi:10.1016/j.prrv.2016.03.002
- 138. Nkam, L. *et al.* A 3-year prognostic score for adults with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* (2017). doi:10.1016/j.jcf.2017.03.004
- Fuchs, H. J. *et al.* Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 331, 637–642 (1994).
- 140. Ramsey, B. W. et al. Intermittent Administration of Inhaled Tobramycin in Patients with Cystic

Fibrosis. N. Engl. J. Med. (1999). doi:10.1056/NEJM199901073400104

- 141. Collège Haute Autorité de Santé (HAS). Mucoviscidose Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. 1–34 (2006).
- 142. Bhatt, J. M. Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 22, 205–216 (2013).
- 143. Twomey, K. B. *et al.* Microbiota and metabolite profiling reveal specific alterations in bacterial community structure and environment in the cystic fibrosis airway during exacerbation. *PLoS One* **8**, e82432 (2013).
- 144. Bhagirath, A. Y. *et al.* Cystic fibrosis lung environment and Pseudomonas aeruginosa infection. *BMC Pulm. Med.* **16**, 174 (2016).
- 145. Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B. & Gibson, R. L. Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* (2002). doi:10.1002/ppul.10127
- 146. Kidd, T. J. *et al.* The social network of cystic fibrosis centre care and shared Pseudomonas aeruginosa strain infection: A cross-sectional analysis. *Lancet Respir. Med.* (2015). doi:10.1016/S2213-2600(15)00228-3
- 147. Mainz, J. G. *et al.* Concordant genotype of upper and lower airways P aeruginosa and S aureus isolates in cystic fibrosis. *Thorax* **64**, 535–540 (2009).
- 148. Bonestroo, H. J. C., De Winter-De Groot, K. M., Van Der Ent, C. K. & Arets, H. G. M. Upper and lower airway cultures in children with cystic fibrosis: Do not neglect the upper airways. *J. Cyst. Fibros.* **9**, 130–134 (2010).
- 149. Sousa, A. M. & Pereira, M. O. V. Pseudomonas aeruginosa Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. *Pathogens* **3**, 680–703 (2014).
- 150. Edmondson, C. & Davies, J. C. Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: Latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* (2016). doi:10.1177/2040622316641352
- 151. Saiman, L. *et al.* Infection Prevention and Control Guideline for Cystic Fibrosis: 2013 Update. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* (2014). doi:10.1086/676882
- 152. Smyth, A. R. *et al.* European cystic fibrosis society standards of care: Best practice guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis* (2014). doi:10.1016/j.jcf.2014.03.010
- 153. Konstan, M. W. *et al.* Tobramycin inhalation powder for P. aeruginosa infection in cystic fibrosis: The EVOLVE trial. *Pediatr. Pulmonol.* (2011). doi:10.1002/ppul.21356
- 154. Konstan, M. W. *et al.* Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial. *J. Cyst. Fibros.* (2011). doi:10.1016/j.jcf.2010.10.003
- 155. McCoy, K. S. *et al.* Inhaled aztreonam lysine for chronic airway Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2008). doi:10.1164/rccm.200712-1804OC
- 156. Tullis, D. E. *et al.* Inhaled aztreonam for chronic burkholderia infection in cystic fibrosis: A placebo-controlled trial. *J. Cyst. Fibros.* (2014). doi:10.1016/j.jcf.2013.08.011
- 157. Riordan, J. R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science (80-.).* **245**, 1066–1073 (1989).
- 158. Rommens, J. M. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science (80-.).* **245**, 1059–1065 (1989).
- 159. Kerem, B. S. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science (80-.).* **245**, 1073–1080 (1989).
- 160. Elborn, J. S. *et al.* Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis. *Lancet Respir. Med.* **4**, 617–626 (2016).
- 161. Boyle, M. P. *et al.* A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: A phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* (2014). doi:10.1016/S2213-2600(14)70132-8
- 162. Wainwright, C. E. *et al.* Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del *CFTR. N. Engl. J. Med.* (2015). doi:10.1056/NEJMoa1409547

- 163. Taylor-Cousar, J. L. *et al.* Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N. Engl. J. Med.* (2017). doi:10.1056/NEJMoa1709846
- 164. Keating, D. *et al.* VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1612–1620 (2018).
- 165. Davies, J. C. *et al.* VX-659–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1599–1611 (2018).
- 166. Alton, E. W. F. W. *et al.* Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir. Med.* **3**, 684–691 (2015).
- 167. Hirche, T. O. *et al.* Practical guidelines: Lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *Pulm. Med.* (2014). doi:10.1155/2014/621342
- 168. Bellis, G., Dehillotte, C. & Lemonnier, L. *Registre français de la mucoviscidose Bilan des do nnées 2015.* (2016).
- 169. Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. & Chihib, N. E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology* **196**, 453–472 (2014).
- 170. Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* (2000). doi:10.1016/S1286-4579(00)01259-4
- 171. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* (2000). doi:10.1038/35023079
- 172. Vincent, J. L. *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *J. Am. Med. Assoc.* **302**, 2323–2329 (2009).
- 173. Vincent, J. L. Vaccine development and passive immunization for Pseudomonas aeruginosa in critically ill patients: A clinical update. *Future Microbiol.* **9**, 457–463 (2014).
- 174. Tumbarello, M. *et al.* Clinical outcomes of Pseudomonas aeruginosa pneumonia in intensive care unit patients. *Intensive Care Med.* (2013). doi:10.1007/s00134-013-2828-9
- 175. Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C. & Juan, C. The increasing threat of Pseudomonas aeruginosa high-risk clones. *Drug Resist. Updat.* **21–22**, 41–59 (2015).
- 176. Rice, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* (2008). doi:10.1086/533452
- 177. Tacconelli, E. *et al.* Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery And Development Of New Antibiotics. *World Heal. Organ.* (2017). doi:10.1046/j.1439-0523.2001.00562.x
- 178. Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. Pseudomonas aeruginosa: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 67, 159–173 (2013).
- 179. Bleves, S. *et al.* Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology* (2010). doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.005
- 180. Roy-Burman, A. *et al.* Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Infect. Dis.* (2001). doi:10.1086/320737
- 181. Hauser, A. R. The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. *Nat. Publ. Gr.* **7**, (2009).
- 182. Sana, T. G., Berni, B. & Bleves, S. The T6SSs of Pseudomonas aeruginosa Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2016). doi:10.3389/fcimb.2016.00061
- 183. Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G. & Jin, Q. A Pseudomonas aeruginosa type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe* (2014). doi:10.1016/j.chom.2014.04.010
- Toder, D. S., Ferrell, S. J., Nezezon, J. L., Rust, L. & Iglewski, B. H. IasA and IasB genes of Pseudomonas aeruginosa: Analysis of transcription and gene product activity. *Infect. Immun.* (1994).
- 185. Juhas, M., Eberl, L. & Tümmler, B. Quorum sensing: The power of cooperation in the world of

Pseudomonas. Environmental Microbiology (2005). doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00769.x

- 186. O'Loughlin, C. T. *et al.* A quorum-sensing inhibitor blocks Pseudomonas aeruginosa virulence and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 17981–17986 (2013).
- 187. Papenfort, K. & Bassler, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* (2016). doi:10.1038/nrmicro.2016.89
- 188. Bjarnsholt, T. & Givskov, M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor Pseudomonas aeruginosa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007). doi:10.1007/s00216-006-0774-x
- 189. Mikkelsen, H., Sivaneson, M. & Filloux, A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. *Environmental Microbiology* (2011). doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x
- 190. Center for Biofilm Engineering Center for Biofilm Engineering | Montana State University. Available at: http://www.biofilm.montana.edu/. (Accessed: 18th December 2018)
- 191. Lu, Q. *et al.* Pseudomonas aeruginosa serotypes in nosocomial pneumonia: Prevalence and clinical outcomes. *Crit. Care* **18**, (2014).
- 192. Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Médecine Mal. Infect.* **36**, 78–91 (2006).
- 193. Rada, B. & Leto, T. L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. *Trends Microbiol.* **21**, 73–81 (2013).
- 194. Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. *Trends Mol. Med.* **10**, 599–606 (2004).
- 195. Nair, C. *et al.* Cyanide levels found in infected cystic fibrosis sputum inhibit airway ciliary function. *Eur. Respir. J.* **44**, 1253–1261 (2014).
- 196. Smith, D., Španěl, P., Gilchrist, F. J. & Lenney, W. Hydrogen cyanide, a volatile biomarker of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Breath Res.* **7**, 044001 (2013).
- 197. Ryall, B., Davies, J. C., Wilson, R., Shoemark, A. & Williams, H. D. Pseudomonas aeruginosa, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients. *Eur. Respir. J.* **32**, 740–747 (2008).
- 198. Elsen, S. *et al.* A type III secretion negative clinical strain of Pseudomonas aeruginosa employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* (2014). doi:10.1016/j.chom.2014.01.003
- 199. Murray, J. L., Kwon, T., Marcotte, E. M. & Whiteley, M. Intrinsic Antimicrobial Resistance Determinants in the Superbug Pseudomonas aeruginosa. *MBio* **6**, e01603-15 (2015).
- 200. Richardot, C. *et al.* Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of Pseudomonas aeruginosa as a result of amino acid substitutions in porin OprD. *Int. J. Antimicrob. Agents* (2015). doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.12.029
- 201. El Zowalaty, M. E. *et al. Pseudomonas aeruginosa* : arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* **10**, 1683–1706 (2015).
- 202. Yang, L. *et al.* Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. *PNAS* **108**, 7481–7486 (2011).
- 203. Wilson, R. *et al.* Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by Pseudomonas aeruginosa inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *J. Clin. Invest.* (1987). doi:10.1172/JCI112787
- 204. Managò, A. *et al. Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Induces Neutrophil Death *via* Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Acid Sphingomyelinase. *Antioxid. Redox Signal.* (2015). doi:10.1089/ars.2014.5979
- 205. Faure, E., Kwong, K. & Nguyen, D. Pseudomonas aeruginosa in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? *Frontiers in Immunology* (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.02416
- 206. Hunter, R. C. *et al.* Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2012). doi:10.1165/rcmb.2012-0088OC

- 207. Palmer, G. C. & Whiteley, M. Metabolism and Pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa Infections in the Lungs of Individuals with Cystic Fibrosis. in *Metabolism and Bacterial Pathogenesis* **3**, 185–213 (2014).
- 208. Behrends, V. *et al.* Metabolic adaptations of Pseudomonas aeruginosa during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environ. Microbiol.* **15**, 398–408 (2013).
- Cullen, L. & McClean, S. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens* 4, 66–89 (2015).
- 210. Workentine, M. L. *et al.* Phenotypic Heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa Populations in a Cystic Fibrosis Patient. *PLoS One* **8**, e60225 (2013).
- 211. Clark, S. T. *et al.* Phenotypic diversity within a Pseudomonas aeruginosa population infecting an adult with cystic fibrosis. *Nat. Sci. Reports* (2015). doi:10.1038/srep10932
- 212. Qin, X. Chronic pulmonary pseudomonal infection in patients with cystic fibrosis: A model for early phase symbiotic evolution. *Crit. Rev. Microbiol.* (2014). doi:10.3109/1040841X.2014.907235
- 213. Smith, E. E. *et al.* Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients. *PNAS* **103**, 8487–8492 (2006).
- 214. Damkiaer, S., Yang, L., Molin, S. & Jelsbak, L. Evolutionary remodeling of global regulatory networks during long-term bacterial adaptation to human hosts. *PNAS* **110**, 7766–7771 (2013).
- 215. Marvig, R. L. *et al.* Within-host microevolution of Pseudomonas aeruginosa in Italian cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* (2015). doi:10.1186/s12866-015-0563-9
- 216. Marvig, R. L., Sommer, L. M., Molin, S. & Johansen, H. K. Convergent evolution and adaptation of Pseudomonas aeruginosa within patients with cystic fibrosis . *Nat. Genet.* **47**, 57–65 (2015).
- 217. La Rosa, R., Johansen, H. K. & Molina, S. Convergent metabolic specialization through distinct evolutionary paths in Pseudomonas aeruginosa. *MBio* **9**, (2018).
- 218. Klockgether, J. *et al.* Intraclonal diversity of the Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis airway isolates TBCF10839 and TBCF121838: Distinct signatures of transcriptome, proteome, metabolome, adherence and pathogenicity despite an almost identical genome sequence. *Environ. Microbiol.* **15**, 191–210 (2013).
- 219. Huse, H. K. *et al.* Parallel Evolution in Pseudomonas aeruginosa over 39,000 Generations In Vivo. *MBio* **1**, 00199-10 (2010).
- 220. Shantharam Kamath, K. *et al.* Pseudomonas aeruginosa Cell Membrane Protein Expression from Phenotypically Diverse Cystic Fibrosis Isolates Demonstrates Host- Specific Adaptations. *J. Proteome Res.* **15**, 2152 2163 (2016).
- 221. Oberhardt, M. A., Puchałka, J., Fryer, K. E., Martins Dos Santos, V. A. P. & Papin, J. A. Genomescale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa PAO1. *J. Bacteriol.* **190**, 2790–2803 (2008).
- 222. Cottret, L. *et al.* MetExplore: A web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* (2010). doi:10.1093/nar/gkq312
- 223. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* (2003). doi:10.1101/gr.1239303
- 224. Jørgensen, K. M. *et al.* Diversity of metabolic profiles of cystic fibrosis pseudomonas aeruginosa during the early stages of lung infection. *Microbiol. (United Kingdom)* **161**, 1447–1462 (2015).
- 225. Hoboth, C. *et al.* Dynamics of Adaptive Microevolution of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* **200**, 118–130 (2009).
- 226. Behrends, V., Geier, B., Williams, H. D. & Bundy, J. G. Direct Assessment of Metabolite Utilization by Pseudomonas aeruginosa during Growth on Artificial Sputum Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2467–2470 (2013).
- 227. Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L. & Schomburg, D. How Pseudomonas aeruginosa adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ. Microbiol.* **12**, 1734–1747 (2010).
- 228. Sriramulu, D. D., Lünsdorf, H., Lam, J. S. & Römling, U. Microcolony formation: a novel biofilm

model of Pseudomonas aeruginosa for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* **54**, 667–676 (2005).

- 229. Palmer, K. L., Aye, L. M. & Whiteley, M. Nutritional cues control Pseudomonas aeruginosa multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J. Bacteriol.* **189**, 8079–8087 (2007).
- 230. Turner, K. H., Wessel, A. K., Palmer, G. C., Murray, J. L. & Whiteley, M. Essential genome of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis sputum. *PNAS* **112**, 4110–4115 (2015).
- Oberhardt, M. A., Goldberg, J. B., Hogardt, M. & Papin, J. A. Metabolic Network Analysis of Pseudomonas aeruginosa during Chronic Cystic Fibrosis Lung Infection. *J. Bacteriol.* 192, 5534– 5548 (2010).
- 232. Barr, H. L. *et al.* Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. in *European Respiratory Journal* (2015). doi:10.1183/09031936.00225214
- 233. Quinn, R. A. *et al.* Microbial, host and xenobiotic diversity in the cystic fibrosis sputum metabolome. *ISME J.* (2015). doi:10.1038/ismej.2015.207
- 234. Muhlebach, M. S. & Sha, W. Lessons learned from metabolomics in cystic fibrosis. *Mol. Cell. Pediatr.* **2**, (2015).
- 235. Quinn, R. A. *et al.* Metabolomics of pulmonary exacerbations reveals the personalized nature of cystic fibrosis disease. *PeerJ* (2016). doi:10.7717/peerj.2174
- 236. Kozlowska, J. *et al.* A relationship between Pseudomonal growth behaviour and cystic fibrosis patient lung function identified in a metabolomic investigation. *Metabolomics* **9**, 1262–1273 (2013).
- 237. Whalen, K. E., Poulson-Ellestad, K. L., Deering, R. W., Rowley, D. C. & Mincer, T. J. Enhancement of Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant Bacteria by the Efflux Pump Inhibitor 3,4-Dibromopyrrole-2,5-dione Isolated from a *Pseudoalteromonas* sp. *J. Nat. Prod.* **78**, 402–412 (2015).
- 238. Worley, B. & Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* **1**, 92–107 (2013).
- 239. Abdi, H. & Williams, L. J. Principal component analysis. WIREs Comput. Stat. 2, 433–459 (2010).
- 240. Husson, F., Lê, S. & Pagès, J. Exploratory multivariate analysis by example using R. Exploratory Multivariate Analysis by Example Using R (2010). doi:10.1201/b10345
- 241. Kassambara, A. Practical Guide to Principal Component Methods in R. Sthda 2, 12–50 (2017).
- 242. MacQueen, J. Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations. in *5th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability 1967* (1967). doi:citeulikearticle-id:6083430
- 243. Everitt, B. S., Landau, S., Leese, M. & Stahl, D. *Cluster analysis: Fifth edition. Cluster Analysis: Fifth Edition* (John Wiley & Sons, Ltd, 2011). doi:10.1002/9780470977811
- 244. Kassambara, A. Practical Guide to Cluster Analysis in R: Unsupervised Machine Learning. Multivariate Analysis I (2017).
- 245. Pagès, J. & Husson, F. Inter-laboratory comparison of sensory profiles: Methodology and results. *Food Qual. Prefer.* (2001). doi:10.1016/S0950-3293(01)00015-5
- 246. Pagès, J. Multiple Factor Analysis by Example Using R. (CRC Press, 2014). doi:10.1201/b17700
- 247. Wold, S., Sjostrom, M., Eriksson, L. & Sweden^{°°}, S. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **58**, 109–130 (2001).
- 248. Xi, B., Gu, H., Baniasadi, H. & Raftery, D. Statistical analysis and modeling of mass spectrometry-based metabolomics data. *Methods Mol. Biol.* **1198**, 333–53 (2014).
- 249. Gromski, P. S. *et al.* A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* **879**, 10–23 (2015).
- 250. Brereton, R. G. & Lloyd, G. R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemom.* **28**, 213–225 (2014).
- 251. Hunter, S. B. *et al.* Establishment of a universal size standard strain for use with the pulsenet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: Converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* (2005). doi:10.1128/JCM.43.3.1045-1050.2005

- 252. Société française de microbiologie. Section de Microbiologie clinique. Groupe Rémic. *et al.* Rémic : référentiel en microbiologie médicale. (2015).
- 253. Lavenir, R. *et al.* Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a Pseudomonas aeruginosa water network hospital population: Invasion and selection of clonal complexes. *J. Appl. Microbiol.* (2008). doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03907.x
- 254. Hamming, R. W. Error Detecting and Error Correcting Codes. *Bell Syst. Tech. J.* (1950). doi:10.1002/j.1538-7305.1950.tb00463.x
- 255. Tenover, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* (1995). doi:0095-1137/
- 256. Ward, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *J. Am. Stat. Assoc.* (1963). doi:10.1080/01621459.1963.10500845
- 257. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2016).
- 258. van Belkum, A. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1–46 (2007).
- 259. Cramer, N., Wiehlmann, L. & Tümmler, B. Clonal epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. *International Journal of Medical Microbiology* **300**, 526–533 (2010).
- 260. Cigana, C. *et al.* Genotypic and phenotypic relatedness of Pseudomonas aeruginosa isolates among the major cystic fibrosis patient cohort in Italy. *BMC Microbiol.* **16**, (2016).
- 261. Speert, D. P. *et al.* Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis in British Columbia, Canada. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 988–993 (2002).
- 262. Cholley, P. *et al.* Comparison of double-locus sequence typing (DLST) and multilocus sequence typing (MLST) for the investigation of Pseudomonas aeruginosa populations ☆. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **82**, 274–277 (2015).
- 263. Markussen, T. *et al.* Environmental heterogeneity drives within-host diversification and evolution of Pseudomonas aeruginosa. *MBio* (2014). doi:10.1128/mBio.01592-14
- 264. Pressler, T. *et al.* Chronic Pseudomonas aeruginosa infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J. Cyst. Fibros.* **10**, S75–S78 (2011).
- 265. Quanjer, P. H. *et al.* Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: The global lung function 2012 equations. *Eur. Respir. J.* (2012). doi:10.1183/09031936.00080312
- 266. Accueil | Légifrance, le service public de la diffusion du droit. Available at: https://www.legifrance.gouv.fr/. (Accessed: 28th January 2019)
- Epaulard, O. *et al.* Anti-tumor Immunotherapy via Antigen Delivery from a Live Attenuated Genetically Engineered Pseudomonas aeruginosa Type III Secretion System-Based Vector. *Mol. Ther.* 14, 656–661 (2006).
- 268. Toussaint, B., Delic-Attree, I. & Vignais, P. M. Pseudomonas aeruginosa contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **196**, 416–421 (1993).
- Holloway, B. W. Genetic Recombination in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* 13, 572–581 (1955).
- 270. Rahme, L. G. *et al.* Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science (80-.).* **268**, 1899–1902 (1995).
- 271. Liu, P. V. The roles of various fractions of Pseudomonas aeruginosa in its pathogenesis. III. Identity of the lethal toxins produced in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* **116**, 481–489 (1966).
- 272. Finck-Barbançon, V. *et al.* ExoU expression by Pseudomonas aeruginosa correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* (1997). doi:10.1046/j.1365-2958.1997.4891851.x
- 273. Basso, P. *et al.* Pseudomonas aeruginosa Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. *MBio* **8**, (2017).
- 274. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. *Version 7.0* (2017). doi:10.1016/S1350-4177(00)00068-7

- 275. Cullen, L. *et al.* Phenotypic characterization of an international Pseudomonas aeruginosa reference panel: strains of cystic fibrosis (CF) origin show less in vivo virulence than non-CF strains. *Microbiology* **161**, 1961–1977 (2015).
- 276. Mayer-Hamblett, N. *et al.* Pseudomonas aeruginosa in vitro phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2014). doi:10.1164/rccm.201404-0681OC
- 277. Crull, M. R. *et al.* Change in Pseudomonas aeruginosa prevalence in cystic fibrosis adults over time. *BMC Pulm. Med.* **16**, 1–7 (2016).
- 278. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. (Springer-Verlag New York, 2016).
- 279. Basso, P. *et al.* Multiple *Pseudomonas* species secrete exolysin-like toxins and provoke Caspase-1-dependent macrophage death. *Environ. Microbiol.* **19**, 4045–4064 (2017).
- 280. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. **FactoMineR**: An *R* Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* **25**, 1–18 (2008).
- 281. Kassambara, A. & Mundt, F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. (2017).
- 282. Warnes, G. R. et al. gplots: Various R programming tools for plotting data. (2016).
- 283. Venkatesan, N., Perumal, G. & Doble, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* **10**, 1743–1750 (2015).
- 284. Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F. & Koch, C. Role of alginate in infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. *Thorax* (1992). doi:10.1136/thx.47.1.6
- 285. Dacheux, D. *et al.* Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* (2000). doi:10.1128/IAI.68.5.2916-2924.2000
- 286. Wood, S. J., Goldufsky, J. W., Bello, D., Masood, S. & Shafikhani, S. H. Pseudomonas aeruginosa ExoT induces mitochondrial apoptosis in target host cells in a manner that depends on its GTPase-activating protein (GAP) domain activity. *J. Biol. Chem.* (2015). doi:10.1074/jbc.M115.689950
- 287. Galluzzi, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation* (2015). doi:10.1038/cdd.2014.137
- 288. Yang, J., Zhao, Y., Shi, J. & Shao, F. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2013). doi:10.1073/pnas.1306376110
- 289. Feltman, H. *et al.* Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **1021**, (2001).
- 290. Jain, M. *et al.* Type III Secretion Phenotypes of Pseudomonas aeruginosa Strains Change during Infection of Individuals with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5229–5237 (2004).
- 291. Twiss, J., Stewart, A. W. & Byrnes, C. A. Longitudinal pulmonary function of childhood bronchiectasis and comparison with cystic fibrosis. *Thorax* **61**, 414–418 (2006).
- 292. Courtois, N., Caspar, Y. & Maurin, M. Phenotypic and genetic resistance traits of Pseudomonas aeruginosa strains infecting cystic fibrosis patients: A French cohort study. *Int. J. Antimicrob. Agents* (2018). doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.05.008
- 293. Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* (2009). doi:10.1128/CMR.00040-09
- 294. Yang, L. *et al.* In situ growth rates and biofilm development of Pseudomonas aeruginosa populations in chronic lung infections. *J. Bacteriol.* (2008). doi:10.1128/JB.01581-07
- 295. Cieri, M. V., Mayer-Hamblett, N., Griffith, A. & Burns, J. L. Correlation between an in vitro invasion assay and a murine model of Burkholderia cepacia lung infection. *Infect. Immun.* (2002). doi:10.1128/IAI.70.3.1081-1086.2002
- 296. Andersson, D. I. & Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* (2010). doi:10.1038/nrmicro2319
- 297. Kugelberg, E., Löfmark, S., Wretlind, B. & Andersson, D. I. Reduction of the fitness burden of

quinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa. *J. Antimicrob. Chemother.* (2005). doi:10.1093/jac/dkh505

- 298. Roux, D. *et al.* Fitness cost of antibiotic susceptibility during infection. *Sci. Transl. Med.* **7**, 1–11 (2015).
- Skurnik, D. *et al.* Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of Pseudomonas aeruginosa revealed through high-throughput sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2013). doi:10.1073/pnas.1221552110
- 300. Hogardt, M. *et al.* Stage-Specific Adaptation of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa Isolates during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* **195**, 70–80 (2007).
- 301. Aaron, S. D. *et al.* Infection with transmissible strains of Pseudomonas aeruginosa and clinical outcomes in adults with cystic fibrosis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* (2010). doi:10.1001/jama.2010.1665
- 302. Menet, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev. Francoph. des Lab.* **2011**, 41–53 (2011).
- 303. Liebeke, M. & Lalk, M. Staphylococcus aureus metabolic response to changing environmental conditions A metabolomics perspective. *International Journal of Medical Microbiology* **304**, 222–229 (2014).
- 304. Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Plumb, R. S. & Wilson, I. D. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2014). doi:10.1016/j.jpba.2013.06.032
- 305. Matsuda, F. Technical Challenges in Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrom.* (2016). doi:10.5702/massspectrometry.S0052
- 306. Marcinowska, R., Trygg, J., Wolf-Watz, H., Mortiz, T. & Surowiec, I. Optimization of a sample preparation method for the metabolomic analysis of clinically relevant bacteria. *J. Microbiol. Methods* (2011). doi:10.1016/j.mimet.2011.07.001
- Aros-Calt, S. *et al.* Metabolomic investigation of Staphylococcus aureus antibiotic susceptibility by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 1871, 279–293 (2019).
- 308. Aros-Calt, S. *et al.* Annotation of the Staphylococcus aureus metabolome using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry and application to the study of methicillin resistance. *J. Proteome Res.* **14**, 4863–4875 (2015).
- 309. Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R. & Siuzdak, G. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* **78**, 779–787 (2006).
- 310. Coble, J. B. & Fraga, C. G. Comparative evaluation of preprocessing freeware on chromatography/mass spectrometry data for signature discovery. *J. Chromatogr. A* **1358**, 155–164 (2014).
- 311. Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T. R. & Neumann, S. CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal. Chem.* (2012). doi:10.1021/ac202450g
- 312. Broadhurst, D. *et al.* Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics* **14**, 72 (2018).
- 313. Di Guida, R. *et al.* Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics* **12**, 1–14 (2016).
- 314. Gagnebin, Y. *et al.* Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies. *Anal. Chim. Acta* **955**, 27–35 (2017).
- 315. Ogata, H. *et al.* KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 29–34 (1999).
- 316. Wishart, D. S. *et al.* HMDB: The human metabolome database. *Nucleic Acids Res.* (2007). doi:10.1093/nar/gkl923

- 317. Huang, W. *et al.* PAMDB: A comprehensive Pseudomonas aeruginosa metabolome database. *Nucleic Acids Res.* **46**, (2018).
- 318. Boudah, S. *et al.* Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* (2014). doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.025
- 319. Roux, A. *et al.* Annotation of the human adult urinary metabolome and metabolite identification using ultra high performance liquid chromatography coupled to a linear quadrupole ion traporbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* (2012). doi:10.1021/ac300829f
- 320. Wang, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* (2016). doi:10.1038/nbt.3597
- 321. Smith, C. a *et al.* METLIN: a metabolite mass spectral database. *Proc. 9th Int. Congr. Ther. drug Monit. Clin. Toxicol.* (2005). doi:10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39
- 322. Adusumilli, R. & Mallick, P. Data conversion with proteoWizard msConvert. in *Methods in Molecular Biology* (2017). doi:10.1007/978-1-4939-6747-6_23
- 323. Tautenhahn, R., Bottcher, C. & Neumann, S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* **9**, 1–16 (2008).
- 324. Benton, H. P., Want, E. J. & Ebbels, T. M. D. Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data. *Bioinformatics* (2010). doi:10.1093/bioinformatics/btq441
- 325. Morgan, M., Obenchain, V., Lang, M. & Thompson, R. BiocParallel: Bioconductor facilities for parallel evaluation. (2017).
- 326. Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G. & Senn, H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal. Chem.* **78**, 4281–4290 (2006).
- 327. Giacomoni, F. *et al.* Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* (2015). doi:10.1093/bioinformatics/btu813
- 328. Guitton, Y. *et al.* Create, run, share, publish, and reference your LC–MS, FIA–MS, GC–MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2017). doi:10.1016/j.biocel.2017.07.002
- 329. Thuleau, S. & Husson, F. FactoInvestigate: Automatic Description of Factorial Analysis. (2018).
- 330. Abdi, H., Williams, L. J. & Valentin, D. Multiple factor analysis: principal component analysis for multitable and multiblock data sets. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **5**, 149–179 (2013).
- 331. Pagès, J. Multiple factor analysis: Main features and application to sensory data. *Rev. Colomb. Estad.* **27**, 1–26 (2004).
- 332. Wernisch, S. & Pennathur, S. Evaluation of coverage, retention patterns, and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 6079–91 (2016).
- 333. Richards, D. P., Sojo, L. E. & Keller, B. O. Quantitative analysis with modern bioanalytical mass spectrometry and stable isotope labeling. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **50**, 1124–1136 (2007).
- 334. Wu, Y. & Li, L. Dansylation metabolite assay: A simple and rapid method for sample amount normalization in metabolomics. *Anal. Chem.* (2014). doi:10.1021/ac503359v
- 335. Wu, Y. & Li, L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *Journal of chromatography. A* (2016). doi:10.1016/j.chroma.2015.12.007
- Monsen, T., Lövgren, E., Widerström, M. & Wallinder, L. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2496–501 (2009).
- 337. Bitonti, A. J., Kelly, S. E. & McCann, P. P. Regulation of growth and macromolecular synthesis by putrescine and spermidine in Pseudomonas aeruginosa. *Life Sci.* **34**, 1513–1520 (1984).
- Shah, P. & Swiatlo, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 68, 4–16 (2008).
- 339. Carriel, D. *et al.* A Novel Subfamily of Bacterial AAT-Fold Basic Amino Acid Decarboxylases and Functional Characterization of Its First Representative: Pseudomonas aeruginosa LdcA. *Genome Biol. Evol.* **10**, 3058–3075 (2018).

- 340. Häussler, S. & Becker, T. The Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) Balances Life and Death in Pseudomonas aeruginosa Populations. *PLoS Pathog.* **4**, e1000166 (2008).
- 341. Robin, X. *et al.* pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* (2011). doi:10.1109/ACCESS.2018.2805869
- 342. Lightfoot, H. L. & Hall, J. Endogenous polyamine function—the RNA perspective. *Nucleic Acids Res.* **42**, 11275–11290 (2014).
- 343. Stalon, V., Vander Waven, C., Momin, P. & Legrain, C. Catabolism of Arginine, Citrulline and Ornithine by Pseudomonas and Related Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2487–2495 (1987).
- 344. Hebert, M. D. & Houghton, J. E. Regulation of ornithine utilization in Pseudomonas aeruginosa (PAO1) is mediated by a transcriptional regulator, OruR. *J. Bacteriol.* (1997). doi:10.1128/jb.179.24.7834-7842.1997
- 345. Zhou, L., Wang, J. & Zhang, L.-H. Modulation of bacterial Type III secretion system by a spermidine transporter dependent signaling pathway. *PLoS One* **2**, e1291 (2007).
- 346. Ruiz-Perez, D. & Narasimhan, G. So you think you can PLS-DA? *doi.org* 207225 (2017). doi:10.1101/207225
- 347. Goodell, E. W. Recycling of murein by Escherichia coli. J. Bacteriol. 163, 305–10 (1985).
- 348. Borisova, M., Gisin, J. & Mayer, C. Blocking Peptidoglycan Recycling in *Pseudomonas aeruginosa* Attenuates Intrinsic Resistance to Fosfomycin. *Microb. Drug Resist.* **20**, 231–237 (2014).
- 349. Zamorano, L. *et al.* NagZ inactivation prevents and reverts β-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3557–3563 (2010).
- 350. Jacobs, C., Huang, L. J., Bartowsky, E., Normark, S. & Park, J. T. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* (1994). doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06792.x
- 351. Whiteson, K., Agrawal, S. & Agrawal, A. Differential responses of human dendritic cells to metabolites from the oral/airway microbiome. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 371–379 (2017).
- 352. Liu, Z. *et al.* A Genome-Wide Screen Identifies Genes in Rhizosphere-Associated *Pseudomonas* Required to Evade Plant Defenses. *MBio* **9**, (2018).
- 353. Nakada, Y. & Itoh, Y. Identification of the putrescine biosynthetic genes in Pseudomonas aeruginosa and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology* **149**, 707–714 (2003).
- 354. Bardócz, S., Grant, G., Brown, D. S. & Pusztai, A. Putrescine as a source of instant energy in the small intestine of the rat. *Gut* (1998). doi:10.1136/gut.42.1.24
- 355. Wang, J., Wang, J. & Zhang, L.-H. Immunological blocking of spermidine-mediated hostpathogen communication provides effective control against Pseudomonas aeruginosa infection. *Microb. Biotechnol.* (2018). doi:10.1111/1751-7915.13279
- 356. Boudreau, M. A., Fisher, J. F. & Mobashery, S. Messenger functions of the bacterial cell wallderived muropeptides. *Biochemistry* (2012). doi:10.1021/bi300174x
- 357. Torrens, G. *et al.* Targeting the permeability barrier and peptidoglycan recycling pathways to disarm Pseudomonas aeruginosa against the innate immune system. *PLoS One* **12**, (2017).
- 358. Majumdar, R. *et al.* Glutamate, Ornithine, Arginine, Proline, and Polyamine Metabolic Interactions: The Pathway Is Regulated at the Post-Transcriptional Level. *Front. Plant Sci.* **7**, 78 (2016).
- 359. Wandro, S., Carmody, L., Gallagher, T., LiPuma, J. J. & Whiteson, K. Making It Last: Storage Time and Temperature Have Differential Impacts on Metabolite Profiles of Airway Samples from Cystic Fibrosis Patients. *mSystems* **2**, (2017).
- 360. World Health Organization. Antimicrobial resistance : global report on surveillance.
- 361. Flynn, J. M., Niccum, D., Dunitz, J. M. & Hunter, R. C. Evidence and Role for Bacterial Mucin Degradation in Cystic Fibrosis Airway Disease. *PLOS Pathog.* **12**, e1005846 (2016).
- 362. Flynn, J. M., Phan, C. & Hunter, R. C. Genome-Wide Survey of Pseudomonas aeruginosa PA14 Reveals a Role for the Glyoxylate Pathway and Extracellular Proteases in the Utilization of Mucin.

Infect. Immun. 85, e00182-17 (2017).

- 363. Nguyen, A. T. & Oglesby-Sherrouse, A. G. Interactions between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus during co-cultivations and polymicrobial infections. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 6141–6148 (2016).
- 364. Quinn, R. A. *et al.* A Winogradsky-based culture system shows an association between microbial fermentation and cystic fibrosis exacerbation. *ISME J.* **9**, 1024–1038 (2015).
- 365. Phan, J., Gallagher, T., Oliver, A., England, W. E. & Whiteson, K. Fermentation products in the cystic fibrosis airways induce aggregation and dormancy-associated expression profiles in a CF clinical isolate of Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, (2018).
- 366. Gao, B. *et al.* Tracking Polymicrobial Metabolism in Cystic Fibrosis Airways: *Pseudomonas aeruginosa* Metabolism and Physiology Are Influenced by *Rothia mucilaginosa* -Derived Metabolites. *mSphere* **3**, (2018).
- 367. Quinn, R. A. *et al.* A Winogradsky-based culture system shows an association between microbial fermentation and cystic fibrosis exacerbation. *ISME J.* **9**, 1024–1038 (2015).
- 368. Quinn, R. A. *et al.* Biogeochemical forces shape the composition and physiology of polymicrobial communities in the cystic fibrosis lung. *MBio* **5**, e00956-13 (2014).
- 369. Deretic, V., Gill, J. F. & Chakrabarty, A. M. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the algD gene. *Nucleic Acids Res.* **15**, 4567–81 (1987).
- 370. Martin, D. W. *et al.* Mechanism of conversion to mucoidy in Pseudomonas aeruginosa infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8377–81 (1993).
- 371. Ilangovan, A. *et al.* Structural Basis for Native Agonist and Synthetic Inhibitor Recognition by the Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing Regulator PqsR (MvfR). *PLoS Pathog.* **9**, e1003508 (2013).
- 372. Hodgkinson, J., Bowden, S. D., Galloway, W. R. J. D., Spring, D. R. & Welch, M. Structureactivity analysis of the Pseudomonas quinolone signal molecule. *J. Bacteriol.* **192**, 3833–7 (2010).

ANNEXES

1. SCRIPT XCMS ET CAMERA

Pour exemple, est présenté ici le script utilisé pour les données de l'analyse C18. Pour HILIC, l'argument peakwidth du xcmsSet a été modifié (ligne 89).

```
## Written by: H Paul Benton
## On: June 2, 2016
## For: Paris 2016 xcms session
## Edited by: Oriane Moyne
## On: March 15, 2018
# version
# R : 3.3.3
# xcms: 3.0.2
#-----
#install.packages("tibble")
#install.packages("igraph")
#install.packages("rgl")
## Téléchargement des packages (absents dans le CRAN : on doit définir la source).
#source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
#biocLite("multtest")
#biocLite("readMzXmLData")
#biocLite("digest")
#biocLite("xcms")
#biocLite("CAMERA")
#biocLite("BiocParallel")
require(rgl) || install.packages("rgl")
equire(multtest) || install.packages("multtest")
require(xcms) || stop("Cannot find XCMS")
require(readMzXmlData) || install.packages("readMzXcmlData")
require("igraph")
require(digest)
require(CAMERA) || stop("Cannot find CAMERA")
require(BiocParallel)
browseVignettes("xcms")
#-----
                   _____
setwd("/data/tmp/")
getwd()
c18_spectra <- list.files("./C18-mzXML", recursive = TRUE, full = TRUE)</pre>
c18_spectra
length(c18_spectra) # nombre de spectres
#------
                                 _____
****
###
           XCMS
                        ###
bpparam <- SnowParam(40, log = TRUE, stop.on.error = FALSE)</pre>
# xcmsSet : Détection des pics
xs <- xcmsSet(</pre>
           c18_spectra,
           method = "centWave",
           ppm = 10,
```

```
peakwidth = c(10, 40), # c(20, 120) pour HILIC
snthresh = 5,
mzdiff = 0.01,
prefilter = c(3,100),
noise = 0,
profparam = list("step" = 0.01),
BPPARAM = bpparam
)
```

Attention l'argument BPPARAM détermine le nombre de coeurs ("workers") impliqués dans le calcul. A régler selon la puissance de l'ordinateur (40 coeurs correspondent à un supercalculateur)

```
# group : Groupement des buckets correspondants à des pics adjacents
gxs <- group(
            xs,
             method = 'density',
             bw = 5,
             minfrac = 0.7,
             mzwid = 0.01,
             max = 50
# retcor : Correction des temps de rétention (dû à l'encrassement de l'appareil au cours du
run)
ret <- retcor(</pre>
               gxs,
              method = 'peakgroups',
smooth = 'loess',
               extra = 1,
               missing = 7,
               span = 0.2,
               family = 'gaussian',
               plottype = 'none'
               )
# group : à refaire après le retcor
gret <- group(</pre>
               ret,
               method = 'density',
               bw = 5,
               minfrac = 0.7,
               mzwid=0.01,
               max = 50
               )
# fillPeaks : Retour dans les spectres pour imputer une valeur lorsque les pics présents
ailleurs n'ont pas été détectés : remplacement des valeurs manquantes
fill <- fillPeaks(</pre>
                   gret,
                   method = 'chrom'
                   )
save(gret, file = "gret.RData")
save(fill, file = "fill.RData")
#----
report <- diffreport(</pre>
                       fill,
                       file="Diffreport c18",
                       sortpval= FALSE
```

)

```
#---
### Recherche des adduits et isotopes ###
# CAMERA
## Création d'un objet xsAnnotate
xsa <- xsAnnotate(fill)</pre>
## Groupement des pics co-élués sur la base des rt
xsaF <- groupFWHM(</pre>
                xsa,
                sigma = 6,
                perfwhm = 1
                )
## Vérification des groupements
xsaC <- groupCorr(</pre>
                xsaF,
                cor_eic_th = 0.6,
                pval = 0.05,
                graphMethod = "hcs",
                calcCiS = TRUE,
                calcIso = FALSE,
                calcCaS=FALSE
                )
## Annotation des isotopes et des adduits
xsaFI <- findIsotopes(</pre>
                   xsaC,
                   maxcharge = 2,
                   maxiso = 3,
                   minfrac = 0.5
                   )
xsaFA <- findAdducts(</pre>
                   xsaFI,
                   polarity="positive",
                   max_peaks = 100,
                   multiplier = 3
                   )
# Obtention de la liste des pics annotés
peaklist <- getPeaklist(xsaFA)</pre>
#----
****
### Création et export du tableau final ###
*****
C18_annotated <- cbind(
                    report,
                    peaklist[,c((ncol(peaklist)-2):ncol(peaklist))]
                    )
write.table(
           C18 annotated,
          file = "C18_annotated_CAMERA.tsv",
          sep = "\t",
```

```
dec = ".",
row.names = FALSE
)
```

Découpage du tableau selon le format utilisé sur la plateforme Workflow4Metabolomics :

```
#-----
# Variable Metadata :
## Découpage
c18_variable_metadata <- c18[, c(1, 6:15, (ncol(C18_annotated)-2):ncol(C18_annotated))]</pre>
## Aperçu
rmarkdown::paged_table(c18_variable_metadata)
## Export
write.table(c18_variable_metadata,
           file = "C:/Users/moyneo/Datas/Thèse/Manips/Métabo_SAclay/FINAL/Output
XCMS_R/output_30032018/VariableMetadata_c18_R.tsv",
           dec = ".",
           sep="\t",
           row.names = FALSE)
#-----
# DataMatrix :
## Découpage
c18_datamatrix <- c18[,c(1, 16:(ncol(C18_annotated)-3))]</pre>
## Aperçu
rmarkdown::paged_table(head(c18_datamatrix))
## Export
write.table(c18_datamatrix,
           file = "C:/Users/moyneo/Datas/Thèse/Manips/Métabo_SAclay/FINAL/Output
XCMS_R/output_30032018/DataMatrix_c18_R.tsv",
           dec = ".",
           sep="\t",
           row.names = FALSE)
```

2. FIGURES SUPPLEMENTAIRES



Figure S1. Groupes de profils métaboliques des isolats cliniques de *P. a.* détectés sur les données HPLC-HRMS suite aux analyses C18 (A) et HILIC (B).

Les groupes ont été constitués par analyse HCPC (ACP sur 11 CP, suivie d'une CAH par agglomération Ward sur les distances euclidiennes, et d'une partition par les *k-means*). L'appartenance des isolats aux groupes constitués par l'analyse des données HILIC et C18 est concordante (test de Fisher significatif).



Figure S2. Trois profils métaboliques distincts d'isolats cliniques de *P. a.* identifiés par analyse HPLC-HRMS. Les groupes ont été constitués sur la base d'une analyse HCPC, comportant une étape d'AFM. Les profils identifiés par l'analyse du sous-ensemble des 272 variables annotées (panel B) concordent avec les profils identifiés par l'analyse de l'ensemble des 3090 variables mesurées (panel A) (test de Fisher significatif).

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

Ce travail de thèse a fait l'objet de 8 communications orales et de 9 présentations de poster dans des congrès ou lors de séminaires dans des laboratoires nationaux ou internationaux (résumés dans la liste des publications pp. 285-286). Un exemple de poster est fourni page 287 à titre d'illustration. Un article est actuellement en cours d'écriture sur l'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit, avec un objectif de publication en 2019 dans le journal *PNAS*.

Par ailleurs, des efforts de vulgarisation ont été réalisés afin de communiquer ce travail vers un public non expert. Une vidéo de 5 minutes présentant les grands principes de ce travail a été réalisée en 2018, dans le cadre d'un concours organisé par le laboratoire TIMC-IMAG. L'objectif était de présenter les travaux de thèse du laboratoire dans un format vidéo court, adressé à un public scientifique non expert. La vidéo de ce travail s'est classée 3^{ème} du concours, et est disponible au lien suivant :

https://www.youtube.com/watch?v=yOIyY3E6Z3Q&feature=youtu.be.

Notre travail servira également d'illustration dans le chapitre « L'information de Santé : l'Informatique au service des problèmes de Santé » du livre de Jean-Jacques Sotto retraçant l'histoire de la Faculté de Médecine de Grenoble (à paraître prochainement).

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications écrites

- 2019 Moyne et al. Article en cours d'écriture sur le travail présenté dans ce manuscrit de thèse.
- 2018 Audrey Le Gouëllec*, <u>Oriane Moyne*</u>, Elodie Meynet, Bertrand Toussaint, Florence Fauvelle. HR-MAS NMR-based metabolomics reveals metabolic changes in lung of mice infected with *P. aeruginosa* consistent with the degree of disease severity, and is a powerful evaluation tool for new treatment. *Journal of Proteome Research*, **17**, 3409–3417 (2018). DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00306.

* co-first authorship.

Communications orales

2018

Evolutionary adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infections in patients with cystic fibrosis.

8 octobre 2018	Séminaire interne au sein des Joint meetings of Dorrestein and Knight
	Labs, San Diego, Californie, États-Unis.
9 octobre 2018	Séminaire interne au sein du Whiteson Lab, Irvine, Californie,
	États-Unis.

La métabolomique comme outil d'étude de l'évolution de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose.

23-25 mai 2018	11 ^{èmes} Journées scientifiques du réseau francophone de métabolomique
	et fluxomique (RFMF), Liège, Belgique.
22 juin 2018	Séminaire interne au sein du laboratoire Analyses biomédicales et
	métabolomiques, Genève, Suisse.

2017

A metabolomics approach to study within-host adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during Cystic Fibrosis chronic infections.

30 mars 2017 Bacto-Gre 2017, *Maison Minatec, Grenoble, France.*

Étude de l'évolution du métabolome de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections chroniques dans la mucoviscidose.

14 février 2017	18 ^{ème} Colloque français des jeunes chercheurs en Mucoviscidose,
	Institut Pasteur, Paris, France.
20 mars 2017	Journée des doctorants du laboratoire TIMC-IMAG, Grenoble, France.
2016	
Evolution métaboli	que de Pseudomonas aeruginosa au cours des infections chroniques
dans la mucoviscid	ose.
16 décembre 2016	Séminaire interne laboratoire TIMC-IMAG, équipe EPSP,
	Grenoble. France

17 mai 2016 Séminaire interne laboratoire TIMC-IMAG, équipe TheREx, *Grenoble, France*

Posters

2017-2018

<u>O. Moyne</u>, B. Cournoyer, F. Castelli, F. Fenaille, P. Lamourette, C. Junot, D.J. Bicout, M. Maurin, B. Toussaint, A. Le Gouëllec. Étude longitudinale du métabolome de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections pulmonaires chroniques dans la mucoviscidose.

20 février 2018	19 ^{ème} Colloque français des jeunes chercheurs en mucoviscidose, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>
5 octobre 2017	Congrès Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique (SMMAP) 2017, <i>Hôtel New-York, Marne-la-Vallée, France.</i>

2016-2017

<u>O. Moyne</u>, B. Cournoyer, F. Castelli, D.J. Bicout, M. Maurin, B. Toussaint, A. Le Gouëllec. Évolution métabolique de *Pseudomonas aeruginosa* au cours des infections chroniques dans la mucoviscidose.

),

A. Le Gouëllec, F. Fauvelle, <u>O. Moyne</u>, D.J. Bicout, M. Maurin, B. Toussaint. Empreinte métabolique d'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa.*

23-25 mai 2018	11 ^{èmes} Journées scientifiques du RFMF, <i>Liège, Belgique</i>
13 juin 2016	Journée de la Recherche Médicale, <i>Faculté de Médecine Pharmacie, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France</i>
9 février 2016	18 ^{ème} Colloque français des jeunes chercheurs en Mucoviscidose, <i>Institut Pasteur, Paris, France</i>


Résumé

L'infection pulmonaire chronique à *Pseudomonas aeruginosa (P. a.*) est considérée comme la principale cause de morbidité et de mortalité liée à la mucoviscidose. Au cours de cette infection persistante, la bactérie s'adapte à l'environnement pulmonaire caractéristique de ces patients et évolue avec son hôte pendant des décennies. Cette évolution adaptative est portée par les phénotypes, avec notamment une diminution de la virulence et une augmentation de la résistance aux antibiotiques au cours du temps. Bien que plusieurs études aient tenté d'évaluer les mécanismes génétiques de cette évolution, il demeure aujourd'hui difficile d'expliquer les relations entre les mutations accumulées dans le génome bactérien et l'expression de phénotypes cliniquement pertinents, ou encore de corréler ces mutations avec l'état de santé du patient.

Nous proposons dans ce travail d'étudier les mécanismes sous-tendant cette évolution adaptative à un niveau d'observation post-génomique : la métabolomique. Dernière-née des disciplines –omiques, la métabolomique permet la prise de vue instantanée du métabolisme, et offre une vision au plus proche du phénotype. Pour cela, nous avons constitué une banque de lignées clonales évolutives de *P. a.* prélevées au cours de l'infection pulmonaire chronique chez des patients atteints de mucoviscidose. Cette banque a ensuite été caractérisée aux plans clinique, phénotypique et métabolomique. L'intégration de ces différents niveaux d'information par des méthodes statistiques multi-tableaux nous a permis de mettre en évidence des voies métaboliques impliquées dans la patho-adaptation de *P. a.* à son hôte.

Nos résultats permettent de faire émerger de nouvelles hypothèses pour le développement d'outils thérapeutiques et diagnostiques visant à améliorer la prise en charge de ces infections particulièrement résistantes aux antibiotiques. De plus, nos travaux démontrent l'intérêt de la métabolomique pour l'étude de l'évolution adaptative bactérienne en conditions naturelles.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, évolution adaptative, métabolomique, analyses multi-tableaux, mucoviscidose.

Abstract

Chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a.*) is considered as the leading cause of cystic fibrosis (CF) morbidity and mortality. During this persistent infection, the bacterium adapts to the typical lung environment of these patients and evolves within its host for decades. This adaptive evolution is driven by phenotypes, including a decrease in virulence and an increase in antibiotic resistance over time. Although several studies have attempted to elucidate the genetic mechanisms of this evolution, it remains difficult today to explain the relationships between the accumulated genomic mutations and the expression of clinically relevant phenotypes, or to correlate these mutations with the patient's health status.

In this work, we propose to study the mechanisms underlying this adaptive evolution at a post-genomic observation level: metabolomics. Metabolomics, the newest of the -omics disciplines, provides an instant view of the metabolic activities, and furnishes a vision as close as possible to the phenotype. To this end, we constructed a bank of evolutive clonal *P. a.* lineages sampled during chronic lung infection in patients with CF. This bank was then clinically, phenotypically and metabolomically characterized. Integration of these different levels of information by multi-block statistical methods has allowed us to highlight metabolic pathways involved in within-host patho-adaptation of *P. a.*.

Our results rise new hypotheses for the development of therapeutic and diagnostic tools with the aim of improving the management of these infections particularly resistant to antibiotics. In addition, our work demonstrates the interest of metabolomics to study bacterial adaptive evolution under natural conditions.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, adaptive evolution, metabolomics, multi-block analysis, cystic fibrosis.